

2. **Национален патент:** Биологично активни пептиди от хемолимфа на *Rapana venosa*.
Изобретение заявка № 110665/28.05.2010г.; **Защитен № 66614 В1/31.10.2017 г.**, П.
Долашка, Й. Йовчев, А. Долашки, В. Мощанска, **Л. Велкова**.



ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО
на Република България

ПАТЕНТ
ЗА
ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 66614

Председател:

Д-р  Петко Николов

Дата: 01.11.2017



ОПИСАНИЕ КЪМ ПАТЕНТ
ЗА
ИЗОБРЕТЕНИЕ

(51) Int.Cl.

A 61 K 38/17 (2006.01)

A 61 K 35/56 (2006.01)

C 07 K 14/435 (2006.01)

ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

(21) Заявителски № 110665

(22) Заявено на 28.05.2010

(24) Начало на действие
на патента от: 28.05.2010

Приоритетни данни

(31) (32) (33)

(41) Публикувана заявка в
бюлетин № 11 на 30.11.2011

(45) Отпечатване на 31.10.2017

(46) Публикувано в бюлетин № 10
на 31.10.2017

(56) Информационни източници:

(62) Разделена заявка от рег. №:

(73),(72) Патентоприитежател(и) и изобретател(и):

ПАВЛИНКА АЛЕКСАНДРОВА ДОЛАШКА-
АНГЕЛОВА, 1220 СОФИЯ, ЖК "НАДЕЖДА",
БЛ. 272, ВХ. 3, АП. 182;
ЙОВО ИВЕЛИНОВ ЙОВЧЕВ, 1527 СОФИЯ,
УЛ. "ХРИСТО КОВАЧЕВ" 24-26, ЕТ. 1, АП. 1;
АЛЕКСАНДЪР КОНСТАНТИНОВ
ДОЛАШКИ, 1220 СОФИЯ, ЖК "НАДЕЖДА",
БЛ. 272, ВХ. 3, АП. 182;
ВЕСЕЛА СОТРОВА МОЩАНСКА,
1612 СОФИЯ, ЖК "ИВАН ВАЗОВ",
УЛ. "ЯНКО ЗАБУНОВ" 35, ВХ. Б, АП. 27;
ЛЮДМИЛА ГЕОРГИЕВА ВЕЛКОВА,
1504 СОФИЯ, БУЛ. "КНЯЗ ДОНДУКОВ" 95,
ВХ. А, ЕТ. 5, АП. 11

(74) Представител по индустриална
собственост:

(86) № и дата на РСТ заявка:

(87) № и дата на РСТ публикация:

(54) БИОЛОГИЧНО АКТИВНИ ПЕПТИДИ ОТ ХЕМОЛИМФА НА RAPANA VENOSA

(57) Изобретението се отнася до биокомпоненти, представляващи биологично активни пептиди с антимикробна активност и до метод за получаването им. Биокомпонентите са получени от хемолимфата на морски охлюв *Rapana venosa*, като са доказани терапевтичните им свойства.

3 претенции, 7 фигури

BG 66614 B1

липопептиди и 6) макроциклически цистеинови пептиди [4].

не на хидролази, които разграждат клетъчните

на *H. aspersa*.

Таблица 1. Антимикробна активност на пептиди, получени от хемолимфата на *H. aspersa* и *R. venosa* срещу различни бактерии.

Примери за изпълнение на изобретението

Биокомпонентите с маса под 10 кДа, получени от слюзта на градински охлюви *H. aspersa*

Пример 1

Биокомпоненти с маса под 10 кДа се изолират от слюзта на градински охлюви *Helix aspersa*. Слизта се отделя от чрез прилагане на техника с променлив ток и солеви разтвор от 0.1 М натриев хлорид. Отделената слюз се концентрира чрез вакуум лиофилизатор, след което се дезинтегрира, като се използва механичен дезинтегратор в продължение на 20 min. Различните компоненти на слюзта се разделят в зависимост от молекулната им маса с мембранна техника за микрофилтрация. Получената слюз се разделя на 3 фракции с Милипор мембрани (А, под 10 кДа; Б, 10-100 кДа и В, над 100 кДа), след което получените фракции се лиофилизират и съхраняват в продължение на месеци при 4°C.

Поотделно, фракциите с маса под 10 кДа са подложени на високоефективна течна хроматография HPLC, с колона Nucleosil C18 (250 mm x 10 mm; Macherey-Nagel, Diiren, Germany), калибрирана с буфер А (H₂O, 0.1% ТФОК). Елуирането е проведено с линеен градиент на буфер Б (80% ацетонитрил, с 0.08% ТФОК), в продължение на 60 min, със скорост на потока 1.5 ml/min. Абсорбцията в ултравиолетовата област е следена при 280 и 214 nm. Елуираните фракции са събрани и изсушени с помощта на вакуум-концентратор. Фракциите са разтворени в Milli-Q вода с 0.10% ТФОК (v/v). За рехроматография е използван линеен градиент от 5% А (H₂O, 0.1% ТФОК) до 100% В (0.085% ТФОК в ацетонитрил) в продължение на 50 min, при скорост на потока 1 ml/min.

Пример 2

Биокомпоненти с маса под 10 кДа се изолират от слюзта на градински охлюви *Helix aspersa*. Слизта се отделя чрез престояване на охлювите в солеви разтвор от 0.25 М натриев хлорид в продължение на 10 min. с разбъркване. Отделената слюз се концентрира чрез лиофилизиране, след което се дезинтегрира, като се използва механичен дезинтегратор в продължение на 30 min.

Различните компоненти в слюзта се разделят в зависимост от молекулната им маса с мембранна техника за микрофилтрация. Получената слюз се разделя на 2 фракции с Милипор мембрани (А, под 10 кДа и над 100 кДа) и фракциите се лиофилизират, и се съхраняват в продължение на месеци при 4°C.

Получените фракции с маса под 10 кДа са разделени с високоефективна течна хроматографска система (HPLC), на колона Nucleosil C18 (250 mmx10 mm; Macherey-Nagel, Duren, Germany), която предварително е калибрирана с буфер А (H₂O, 0.1% ТФОК). Елуирането на фракцията с маса под 10 кДа е проведено със стъпаловиден градиент на буфер Б (100% ацетонитрил, с 0.08% ТФОК), в три стъпки 20, 50 и 80% буфер Б, с продължителност на всяка стъпка от 20-30 min, със скорост на потока 1.5 ml/min. Елуираните фракции са събрани и изсушени с помощта на вакуум-концентратор. Фракциите са разтворени в Milli-Q вода с 0.1% ТФОК (v/v). За рехроматография е използван линеен градиент от 5% А (0.1% ТФОК във вода) до 100% Б (0.085% ТФОК в ацетонитрил) в продължение на 50 min, при скорост на потока 1 ml/min.

Биокомпонентите с маси под 10 кДа, получени от хемолимфата на градински охлюви *H. aspersa*

Пример 3

Биокомпонентите с маса под 10 кДа се изолират от хемолимфата на градински охлюви *Helix aspersa*, която се събира, като се разрязва ходилото със скалпел. Получената течност се подлага на ултрацентрофугиране при 5000 g в продължение на 30 min. и температура 0°C, като се събира супернатантата. Пептидите се изолират от супернатантата чрез Милипор мембрани с различни размери (А, под 10 кДа). Получените фракции се лиофилизират и се съхраняват в продължение на месеци в Трис/HCl, при 4°C.

Получената фракция А (с маса под 10 кДа) е разделена чрез високоефективна течна хроматография (HPLC), на колона Nucleosil C4 (250 mm x 10 mm; Macherey-Nagel, Duren, Germany), предварително уравновесена с буфер А (H₂O, 0.1% ТФОК). Елуирането на биокомпонентите е проведено със стъпаловиден градиент на буфер Б (80% ацетонитрил, с 0.08% ТФОК), в три стъпки с 20, 50 и 80% буфер Б, с продължителност на всяка стъпка 20-30 min. и скорост на потока 1.5

стени, нарушават функциите на мембраната и повреждат основни вътреклетъчни компоненти [6].

Нарастващият проблем с резистентността на бактериите към антибиотици, налага да се получават нови антибактериални пептиди с активност върху щамове патогенни бактерии, резистентни на общоприетите (традиционните) антибиотици, като се разширява суровинната база за получаването им с използване на биологично чисти природни продукти при контролирани условия. Разработените методи за получаване на антимикробните пептиди осигуряват получаването на големи количества чисти препарати и с по-малко разходи, което е от особено значение за използването на тези продукти с широк диапазон на приложение.

Техническа същност на изобретението

Задача на изобретението е да се изолират и охарактеризират нови биокomпоненти (пептиди и протеини) от хемолимфата на морски охлюв *Rapana venosa* (Rv), както и метод за получаването им.

Исходният материал се събира от слузта и хемолимфата на градински охлюв *H. aspersa*, който се отглежда в специални ферми в България и хемолимфата на морски охлюв *Rapana venosa* от Черно море. След центрофугиране при 3000-5000 оборота, и температура 0 - 8°C, супернатантата се концентрира с различни мембрани Amicon®, (от 5 до 100 кДа). Компонентите, съдържащи се в така получените фракции се разделят с бързо-разделителна течна хроматографска система (FPLC) и колона Resource 6 ml или с високоефективна течна хроматографска система (HPLC), на колона Nucleosil R C18, с буфер А (0.1% трифлуороцетна киселина-ТФОК) и буфер Б (80% ацетонитрил, 0.08% ТФОК) (фигура 1). След прилагане на стъпаловиден или линеен градиент на различни концентрации на ацетонитрил (20, 50 и 80% в 0,1% ТФОК), получените фракции се лиофилизират, след което се разтварят в малки обеми Milli-Q вода. Молекулните маси и чистотата на изолираните компоненти се определя с мас-спектрометър (фигура 2).

Следващата стъпка включва охарактеризиране на получените биокomпоненти от слузта и хемолимфата. Биокomпонентите с маса под 10 кДа са идентифицирани чрез определяне на N-крайните им аминокиселинни последователнос-

ти (фигура 3) и молекулни маси, докато биокomпонентите с маса над 10 кДа са идентифицирани чрез 2Д-електрофореза на 10% гел (фигура 4) и мас спектрометрия (фигура 5). Получените резултати са сравнени чрез BioTools софтуер със съществуващите структури на протеини в база данни.

Определени са и различните биокomпоненти, изолирани от хемолимфата на градински охлюв *Helix aspersa*, които проявяват антимикробна активност спрямо пет вида бактерии: *Staph.epidermidis*, *Enterococcus faecium*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staph. aureus*.

За определяне на антимикробната активност на биокomпонентите от хемолимфата на *Rapana venosa* са използвани два различни бактериални щамове: Грам положителен (*Staphylococcus aureus*) и Грам отрицателен (*Klebsiella pneumoniae*) като референтни щамове бактерии.

Като резултат се получават чисти компоненти от слузта и хемолимфата на охлюви, с молекулна маса между 3 и 10 кДа, както и други компоненти с маса над 10 кДа. Доказани са специфичните антимикробни свойства на получените биокomпоненти от хемолимфата на *H. aspersa* и *R. venosa* (фигура 6) (таблица 1).

Изобретението се илюстрира с приведените по-долу примери, които не го ограничават.

Пояснение на приложените фигури

Фигура 1. Хроматограма на разделяне на фракция, получена от хемолимфата на *H. aspersa* (А) и *Rapana venosa* (Б), с маса между 3 и 10 кДа на колона Nucleosil R C18, с високоефективна течна хроматографска система (HPLC). Компонентите са елуирани със стъпаловиден градиент с буфер А (вода и 0.1% ТФОК) и буфер Б (80% ацетонитрил, 0.08% ТФОК).

Фигура 2. Мас-спектър на пептид с маса 7867.3 Да, получен от слузта на *H. aspersa*.

Фигура 3. Сравняване на N-крайните аминокиселинни последователности на изолираните пептиди от хемолимфата на *R. venosa*.

Фигура 4. 2Д-електрофореза на 10% гел за разделяне на протеините с маса над 10 кДа.

Фигура 5. Мас-спектър на получените пептиди след хидролиза с трипсин на отделните гелчета от 2-Д електрофореза, показана на фигура 4.

Фигури 6 и 7. Определяне на антимикробната активност на пептиди, получени от хемолимфата

ml/min. Абсорбцията в ултравиолетовата област е следена при 280 и 214 nm. Елуираните фракции са събрани и изсушени с помощта на вакуум концентратор, след което са разтворени в MilliQ вода с 0.10% ТФОК (v/v). За рехроматография на някои фракции е приложен линеен градиент от 5% А (0.1% ТФОК във вода) до 100% В (0.085% ТФОК в ацетонитрил) в продължение на 50 min, при скорост на потока 1 ml/min.

Пример 4

Биокомпонентите с маса под 10 кДа се изолират от хемолимфата на градински охлюви *Helix aspersa*, която се събира, като се разрязва ходилото със скалпел. Получената течност се подлага на ултрацентрофугиране при 30000 g в продължение на 4 h и температура 0°C, като се събира супернатантата. Пептидите се изолират от супернатантата чрез Милипор мембрани (10 кДа). Получените фракции се лиофилизират и се съхраняват в продължение на месеци в Трис/HCl, при 4°C.

Получената фракция с маса под 10 кДа е разделена с HPLC система, с колона Nucleosil C4 (250 mm x 10 mm; Macherey-Nagel, Diiren, Germany), калибрирана с буфер А (H₂O, 0.1% ТФОК). Елуирането е проведено с линеен градиент на буфер В (100% ацетонитрил, с 0.08% ТФОК), в продължение на 70 min, със скорост на потока 1.5 ml/min. Абсорбцията в ултравиолетовата област е следена при 280 и 214 nm. Елуираните фракции са събрани и изсушени с помощта на вакуум концентратор, след което фракциите са разтворени в Milli-Q вода с 0.1% ТФОК (v/v). За рехроматография е използван линеен градиент от 3% А (H₂O, 0.1% ТФОК) до 80% В (0.085% ТФОК в ацетонитрил) в продължение на 50 min, при скорост на потока 1 ml/min.

Биокомпонентите с маси под 10 кДа, получени от хемолимфата на морски охлюв *Rapana venosa*

Пример 5

Хемолимфата на морски охлюв *R. venosa* се събира, като се разрязва ходилото със скалпел. Получената течност се подлага на ултрацентрофугиране при 5000 g в продължение на 30 min и температура 0°C, като се събира супернатантата. Пептидите се изолират от супернатантата чрез Милипор мембрани с различни размери (А, под 10 кДа). Получените фракции се лиофилизират и се съхраняват в продължение на месеци

в Трис/HCl, при 4°C.

Получената фракция А (с маса под 10 кДа) е разделена чрез високоефективна течна хроматография (HPLC), на колона Nucleosil C4 (250 mmx10 mm; Macherey-Nagel, Diiren, Germany), предварително уравновесена с буфер А (H₂O, 0.1% ТФОК). Елуирането на компонентите е проведено със стъпаловиден градиент на буфер В (80% ацетонитрил, с 0.08% ТФОК), в три стъпки с 5, 50 и 80% буфер В, с продължителност на всяка стъпка 20-30 min и скорост на потока 1.0 ml/min. Абсорбцията в ултравиолетовата област е следена при 280 и 214 nm. Елуираните фракции са събрани и изсушени с помощта на вакуум концентратор, след което са разтворени в MilliQ вода с 0.10% ТФОК (v/v). За рехроматография на някои фракции е приложен линеен градиент от 20% А (0.1% ТФОК във вода) до 100% В (0.085% ТФОК в ацетонитрил) в продължение на 50 min, при скорост на потока 1 ml/min.

Пример 6

Хемолимфата на морски охлюв *R. venosa* се събира, като се разрязва ходилото със скалпел. Получената течност се подлага на ултрацентрофугиране при 30000 g в продължение на 4 h и температура 0°C, като се събира супернатантата. Пептидите се изолират от супернатантата чрез Милипор мембрани (10 кДа). Получените фракции се лиофилизират и се съхраняват в продължение на месеци в Трис/HCl, при 4°C.

Получената фракция с маса под 10 кДа е разделена с HPLC система, с колона Nucleosil C4 (250 mm x 10 mm; Macherey-Nagel, Diiren, Germany), калибрирана с буфер А (H₂O, 0.1% ТФОК). Елуирането е проведено линеен градиент на буфер В (100% ацетонитрил, с 0.08% ТФОК), в продължение на 70 min, със скорост на потока 1.5 ml/min. Абсорбцията в ултравиолетовата област е следена при 280 и 214 nm. Елуираните фракции са събрани и изсушени с помощта на вакуум-концентратор, след което фракциите са разтворени в MilliQ вода с 0.10% ТФОК (v/v). За рехроматография е използван линеен градиент от 3% А (H₂O, 0.1% ТФОК) до 80% В (0.085% ТФОК в ацетонитрил) в продължение на 50 min, при скорост на потока 1 ml/min.

Биокомпонентите с маси над 100 кДа

Пример 7

Получената фракция от слузта на градински охлюви *H. aspersa*, с маса над 100 кДа, е подло-

жена на обратно-фазова високоефективна хроматография HPLC, с колона Nucleosil C18 (250 mmx10 mm; Macherey-Nagel, Diiren, Germany), калибрирана с буфер А (H_2O , 0.1% ТФОК). Разделянето на компонентите е проведено чрез елуиране на колоната в продължение на 60 min с линеен градиент на буфер Б, съдържащ 100% ацетонитрил (ACN) и 0.08% ТФОК и скорост на потока 1.5 ml/min. Отчитана е абсорбцията в ултравиолетовата област при 280 и 214 nm. Елуираните фракции са събрани и изсушени с помощта на вакуум изпарител. Чистотата им е определена електрофоретично.

Пример 8

Получената фракция от слюзта на градински охлюви *H. aspersa*, с маса между 10 и 100 кДа е подложена на йонообменна хроматография на FPLC система, с Resource Q 6 ml колона, калибрирана с буфер А (Трис/HCl). Няколко фракции са елуирани с буфер А, рН 8.0 и солеви градиент на натриев хлорид (NaCl) 0-0.7 М. Абсорбцията в ултравиолетовата област е следена при 280 nm. Чистотата на всички елуирани фрагменти се доказва чрез електрофореза и масспектрометър. Молекулните им маси са определени, както електрофоретично, така и с помощта на масспектрометър. С аминокиселинатор са получени N-крайните аминокиселинни последователности за всички фракции.

Пример 9

Получената фракция от слюзта на градински охлюви *H. aspersa*, с маса над 100 кДа е подложена на йонообменна хроматография FPLC, Q-Sepharose Fast Flow колона, калибрирана с буфер А (Трис/HCl), рН 8.0 и солеви градиент на натриев хлорид (NaCl) 0-1.0 М. Абсорбцията в ултравиолетовата област е следена при 280 nm. Чистотата на всички елуирани фрагменти е доказана чрез електрофореза и масспектрометър.

Пример 10

Разделяне на фракциите от слюзта с маса над 10 кДа чрез 2Д-електрофореза. Разделянето на протеините е проведено на два етапа: 1) според изоелектричната точка или заряда на протеина и 2) според молекулното тегло. За целта са използвани стрипове с рН градиент от 3 до 10 за изоелектрично фокусиране. Анализирани са настъпилите промени в някои протеини, изразени в промяна на интензитета или разположението им на 2Д-гела. Протеиновите петна са изрязани от

полиакриламидния гел и обезцветени, след което са подложени на хидролиза за 24 h с трипсин (съотношение 1:50), за разкъсване на молекулата на протеина на пептиди.

Пептидите са секвенирани с масспектрометър, като е определена аминокиселинната им последователност след анализиране на тези спектри. Получените резултати са сравнени чрез BioTools софтуер със съществуващите структури на протеини в база данни.

Идентифициране на получените биокомпоненти

Пример 11

Получените чисти биокомпоненти от фракциите с маса под 10 кДа са разтворени в 40% метанол/1% мравчена киселина, след което са подложени на автоматично Едманово разграждане с Pulsed Liquid Protein Sequencer (Applied Biosystems GmbH, Foster City, CA). Определени са N-крайните аминокиселинни последователности на всички биокомпоненти и са сравнени със съществуващите в база данни.

Молекулните маси на компонентите са измерени на Autoflex™ III, High-Performance MALDI-TOF & TOF/TOF Systems (Bruker Daltonics), като за анализ са използвани по около 50 pmol от всеки пептид. α -циано-4-хидроксиканелена киселина е използвана като матрица. Получените стойности за масите на пептидите са между 3 и 9 кДа.

Пречистените биокомпоненти са тествани за наличие на захари, като 2-4 μ l от всеки пептид се накапват на плака за тънкослойна хроматография и се изсушават на въздуха, като се внимава диаметъра на капката да е 2-3 mm. Плаката се напръсква с орцинол/ H_2SO_4 и се нагрява за 20 min при 100°C.

Определяне на антибактериалната активност на биокомпонентите

За анализиране на антимикробната активност на изолираните пептиди от хемолимфата на *Rapana venosa* са използвани два различни бактериални щама: Грам положителен (*Staphylococcus aureus*) и Грам отрицателен (*Klebsiella pneumoniae*) като референтни щамове бактерии. *Klebsiella pneumoniae* е често срещан патоген, който причинява инфекции на уро-гениталния тракт, пневмонии и интраабдоминални инфекции. *S. aureus* причинява най-често кожни инфекции, както и инфекции на други органи.

За анализиране на антимикробната активност на изолираните пептиди от хемолимфата на *Helix aspersa* са използвани пет различни бактериални щамове: Грам положителните (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* и *Enterococcus faecium*) и Грам отрицателните (*E. coli* и *Pseudomonas aeruginosa*) като референтни щамове бактерии. *S. aureus* причинява най-често кожни инфекции, както и инфекции на други органи. Въпреки че обикновено *S. epidermidis* е непатогенен микроорганизъм, е възможно хора със слаба имунна система да развият инфекция. *Enterococcus faecium* също не е болестотворен микроорганизъм, част от нормалната чревна микрофлора, но може и да предизвика болести, като неонатален менингит. *Pseudomonas aeruginosa* е често срещана бактерия, причинител на различни инфекции при животни и хора.

Пример 12

Изолираните биокомпоненти са тествани за антимикробна активност в течна хранителна среда. 10 µl от компонентите са добавени към 6 ml бактериална суспензия в логаритмична-фаза, в хранителна среда-обикновен бульон, 1% декстроза, с определена оптична плътност по McFarland (McF). Микробният растеж е отчетен като промяна в стойността на McF, след инкубиране за 24 h при 37°C. Като контрола е използвана същата хранителна среда, без добавяне на пептидите, инкубирана при същите условия. Една единица по McF отговаря на 3×10^8 клетки/ml. Мътността е измерена с помощта на DENSIMAT (BioMerieux, France).

Пример 13

Изолираните пептиди са изследвани за наличието на антимикробна активност чрез радиален дифузионен растеж. Радиалният дифузионен растеж се определя чрез: дифундиране на антимикробните пептиди и гликопептиди, нанесени в ямки, в твърдата хранителна среда, която е предварително посята с определен инокулум (чиста бактериална култура). Така се определя зоната на инхибиране, пропорционална на чувствителността на бактериите към съответния пептид. Този метод е удобен за изследване на антимикробната активност на голям брой пептиди, и може да бъде използван за тяхното предварително тестване.

Пример 14

Изолираните биокомпоненти са изследвани за наличието на антимикробна активност чрез

метод на пределните разреждания в течна хранителна среда. Чрез него се определя ефекта на различни концентрации на изолираните пептиди и гликопептиди срещу бактериална суспензия, с предварително определена, подходяща концентрация, в течна хранителна среда, с определен състав. Така се определят и най-ниските концентрации на тестваните пептиди и гликопептиди, които инхибират растежа на определен вид бактерии. Минималната инхибираща концентрация (МИК) обикновено се изразява в mg/ml или mg/l.

Предимства на тези методи

1. Получени са нови биокомпоненти с антимикробно действие, които показват активност върху щамове патогенни бактерии, резистентни към общоприетите (традиционните) антибиотици, използвани в медицината. Проявяването на резистентност към природните антибиотици се наблюдава по-рядко, за разлика от тези, които се прилагат в клиничната практика.

2. Разширена е и суровинната база за получаване на антимикробни пептиди, като се използват биологично чисти природни източници, отглеждани при контролирани условия.

3. Разработените методи за получаване на биокомпонентите осигуряват получаването на големи количества чисти препарати и с по-малко разходи, което е от особено значение за използването на тези продукти с широк диапазон на приложение в медицинската терапия.

4. Свойствата на биокомпонентите са определени в естествените условия, при които получената информация позволява да бъдат предвидени проблемите, които биха възникнали при прилагането на антимикробни пептиди.

5. Използването на тези биокомпоненти е с големи възможности, тъй като те може да се прилагат, както индивидуално, така и комбинирано за лечение на бактериални инфекции при хора или животни. Тези продукти са мощни агенти при борбата с бактериалните инфекции и могат да бъдат решение на нарастващия проблем с резистентността.

Патентни претенции

1. Биологично активен пептид, изолиран от хемолимфата на морски охлюв *Rapana venosa*, характеризиращ се с това, че е с молекулна маса от 3 до 10 kDa и с наличие на два или три последователно свързани пролинови остатъци

в N-крайната си аминокиселинна последователност, избран от групата, включваща пептиди със следните N-крайни последователности:

SEQ ID 2 SPPNQPSIMTFDYAKTNK;

SEQ ID 4 SLPPTLEEEFNMKKMG;

SEQ ID 5 SPPSEQLGKSFNF;

SEQ ID 6 SPPPGESKVDMSFNYSNPAQ;

SEQ ID 7 APPPGLSAGV;

SEQ ID 8 APPPGYAMESDSFS.

2. Биологично активен пептид с N-крайна последователност SEQ ID 7, съгласно претенция 1, характеризира се с това, че включва три последователно свързани пролинови остатъка в N-крайната си аминокиселинна последователност APPPGLSAGV за използване спрямо бактерии *Klebsiella pneumoniae* и *Staphylococcus aureus*.

3. Метод за изолиране на биологично активни пептиди, съгласно претенции 1 и 2, включващ центрофугиране, ултрафилтрация и високоефективна течна хроматография, характеризира се с това, че: центрофугирането е проведено между 1000-5000 оборота, разделянето на супернатанта на фракции е постигнато чрез микрофилтрация на мембрани между 3-100 kDa, фракцията под 10 kDa е разделена чрез обратно-фазова високоефективна течна хроматография със стъпаловиден градиент на буфер Б, съдържащ 80-100% ацетонитрил с 0.05-0.1% трифлуороцетна киселина.

Приложение: 7 фигури

Литература

1. P. Dolashka-Angelova, A. Dolashki, S. N. Savvides, R. Hristova, J. Van Beeumen, W. Voelter, B. Devreese, U. Weser, P. Di Muro, B. Salvato and S. Stevanovic, "Structure of Hemocyanin Subunit CaESS2 of the Crustacean Mediterranean Crab *Carcinus aestuarii*". *J. Biochemistry* 138 (3) 303-312 (2005).
2. Aleksander Dolashki, Jurgen Schutz, Romyana Hristova, Wolfgang Voelter and Pavlina Dolashka-Angelova Spectroscopic properties of non-glycosylated functional unit KLH_{1c} of keyhole limpet hemocyanin" *World J. Agric. Scien.* 1 (2)129-136 (2005).
3. R. Toshkova, E. Ivanova, M-D. Nastke, S. Stevanovic, L. Velkova, W. Voelter P. Dolashka-Angelova., Hemocyanins as immunostimulators. *IDOSI, Global J. Mol. Sci.* 1,22-32 (2006).
4. R. Toshkova, L. Velkova, W. Voelter, P. Dolashka-Angelova, Protective effect of *Rapana venosa* hemocyanin (RvH) on survivability of hamsters with transplanted myeloid Graffi tumours. *Comptes rendus de l'Academie bulgare des sciences* 59,(9) 977-982 (2006).
5. R. Toshkova, E. Ivanova, R. Hristova, W. Voelter P. Dolashka-Angelova, Effect of *Rapana venosa* Hemocyanin on Antibody-Dependent Cell Cytotoxicity (ADCC) and Mitogen Responsibility of Lymphocytes from Hamsters with Progressing Myeloid Tumors, accepted in *IDOSI* (2007).
6. Krumova, E., Dolashka-Angelova, P., Pashova, S., Stefanova, L., Van Beeumen, J., Vassilev, S., Angelova, M. Improved production by fed-batch cultivation and some properties of Cu/Zn- superoxide dismutase from the fungal strain *Humicola lutea* 103. *Enzyme and Microb. Technology* 40,4, 524-532 (2007).
7. K. Sandra, P. Dolashka-Angelova, B. Devreese, J. Van Beeumen, New insights in *Rapana venosa* hemocyanin N-glycosylation resulting from on-line mass spectrometric analyses. *Glycobiology*, 17(2),141-56 (2007).
8. P. Dolashka-Angelova, St. Stefanovic, A. Dolashki, B. Devreese, B. Tzvetkova., W. Voelter., J. Van Beeumen, B. Salvato, A challenging insight on the structural unit 1 of molluscan *Rapana venosa* hemocyanin. *Arch. Biochem. Biophys* 1,459(1), 50-8 (2007).
9. Salvato, B., and Beltramini, M. (1990) Hemocyanin: Molecular architecture: structure and reactivity of the binuclear copper active site. *Life Chem. Rep.* 8,1-47.
10. Dolashka, P., Genov, N., Pervanova, K., Voelter, W., Geiger, and M., Stoeva. (1996) *Rapana thomasiana* grosse (gastropoda) haemocyanin: spectroscopic studies of the structure in solution and the conformational stability of the native protein and its structural subunits. *Biochem J.* 315, 139-144.
11. Campo, M.S., O'Neil, B.W., Grindlay, G.J., Curtis, F., Knowles, G., and Chandrachud, L. (1997) A peptide encoding a B-cell epitope from the N-terminus of the capsid protein L2 of bovine papilloma virus-4. *Virology* 234, 261-266.
12. Tincu, J. A. and Taylor, S .W. (2004) Antimicrobial agents and chemotherapy. Antimicrobial peptides from marine invertebrates. 48,10, 3645-3654.
13. Marshall, S. H., and Arenas, G. (2003) Antimicrobial peptides: A natural alternative to

chemical antibiotics and a potential for applied biotechnology. *Electron. J. Biotechnol.* 6, 1-14.

14. Tanaka, K. (2001) P-13- kinase p85 is a target molecule of proline-rich antimicrobial peptide to suppress proliferation of ras-transformed cells. *Japanese J. of Cancer Research.* 92, 959-967.

15. Chinchar, V.G., Wang, J., Murti, G., Carey, C., and Rollins-Smith, L. (2001) Inactivation of frog virus 3 and channel catfish virus by esculentin-2P and ranatuerin-2P, two antimicrobial peptides isolated from frog skin. *Virology* 288, 351-357.

16. Chemish, S., Kim, S.I., Beckeer, G., Pleskach, V.A., Filatova, N.A., Anikin, V.B., Platonov, V.G., and Bulet, P. (2002) Antiviral and antitumor peptides from insects. *Proceedings of the National Academy of Science USA.* 99,20,12628-12632.

17. Jiravanichpaisal, P., Lee, S.Y., Kim, Y., Andren, T., and Soderhall, I. (2007) Antibacterial

peptides in hemocytes and hematopoietic tissue from freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*: Characterization and expression pattern. *Developmental and Comparative Immunology.* 31, 441- 455.

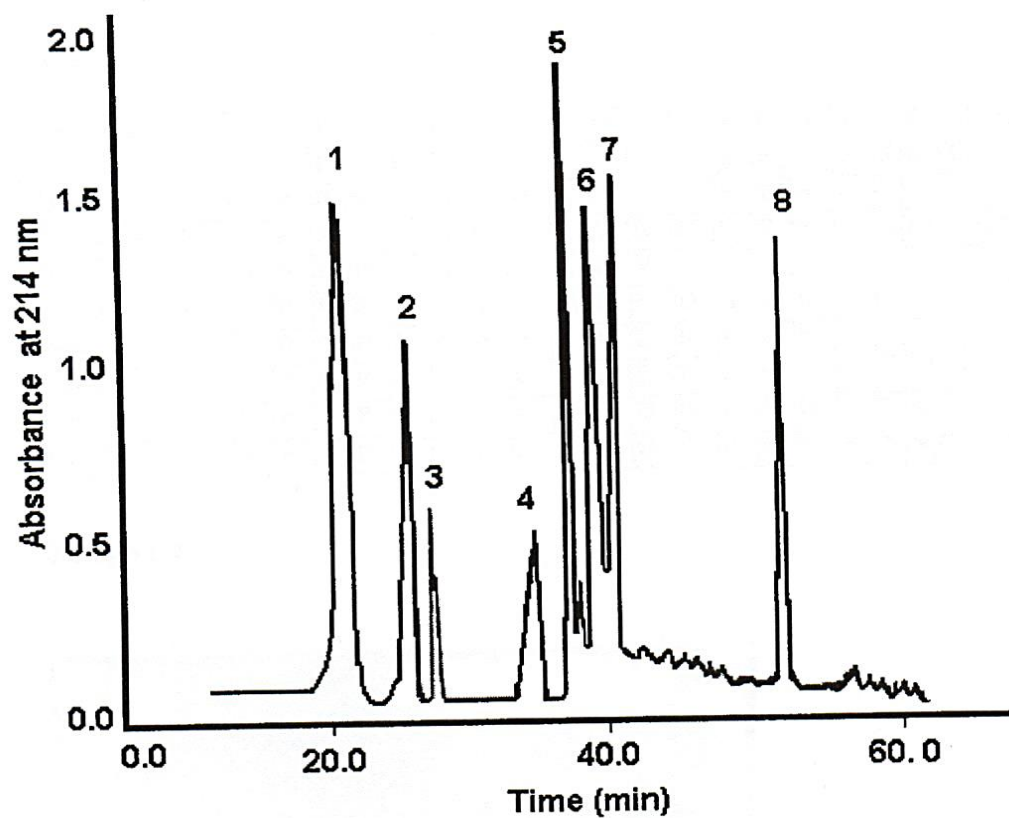
18. Hancock, R. E. W. and Chappie, D. (1999) Peptide Antibiotics. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 1317-1323.

19. Cytrynska, M., Mak, P., Suder P., and Jakubowicz, T. (2007) Purification and characterization of eight peptides from *Galleria mellonella* immune hemolymph. *Peptides.* 28, 533-546.

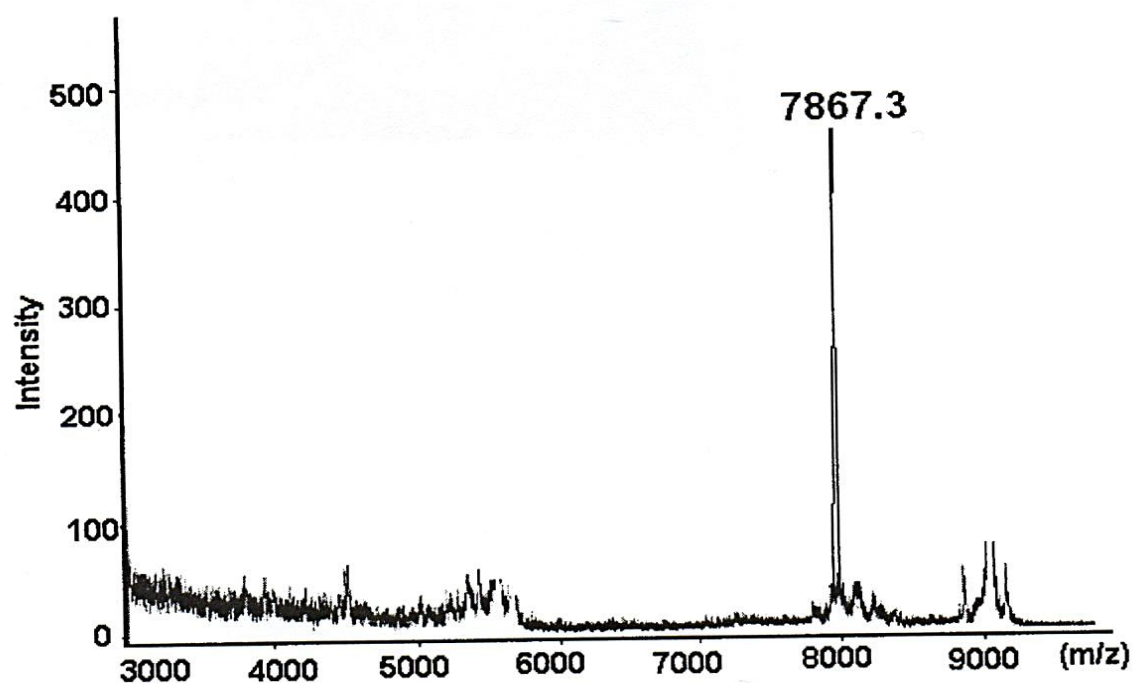
20. Otvos, Jr L. (2002) The short proline-rich antibacterial peptide family. *Cell. Mol. Life Sci.* 59, 1138-1150.

21. Yu, D., Sheng, Z., Xu, X., Li, J., Yang, H., Liu, Z., H. Rees, H. and Lai, R. A novel antimicrobial peptide from salivary glands of the hard tick, *Ixodes sinensis*. (2005).

Фигура 1.



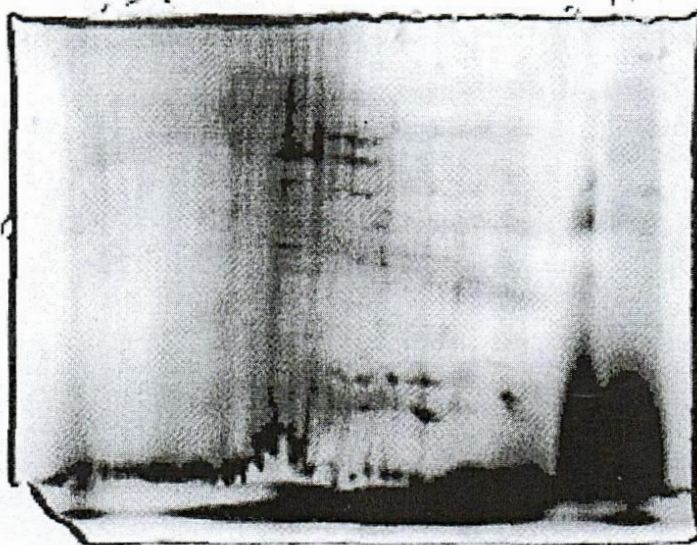
Фигура 2.



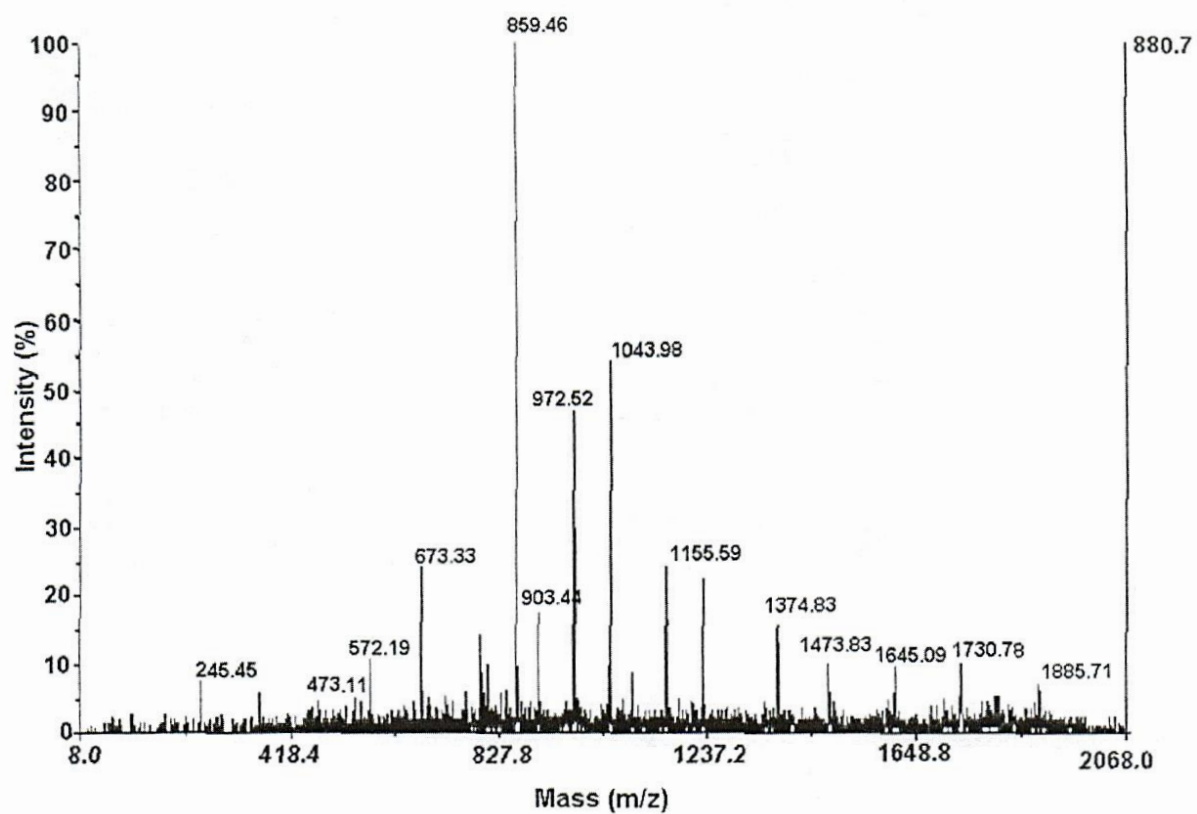
Фигура 3.

Пептид 2	S	-	P	P	N	-	Q	P	S	I	M	-	-	T	F	D	Y	A	K	T	N	K			
Пептид 4	S	L	P	P	T	L	E	E	-	-	-	-	-	E	F	N	M	K	K	M	G				
Пептид 5	S	-	P	P	S	E	Q	L	G	K	-	-	-	S	F	N	F								
Пептид 6	S	-	P	P	P	-	G	E	S	K	V	D	M	S	F	N	Y	A	L	S	N	P	A	Q	
Пептид 7		A	P	P	P	-	G	L	S	A	G	V													
Пептид 8		A	P	P	P	-	G	Y	A	M	E	S	D	S	F	S									
Pen-1		R	P	P	P	I	G	R	P	-	P	L	R	L	V	V									
Pen-2		R	P	P	P	I	G	R	P	-	P	F	R	P	V										
Pen-3a		R	P	P	P	F	V	R	P	L	P	G	G	P	I	G	P	Y	N	G	C				
Pen-3b		R	P	P	P	F	V	R	P	L	P	G	G	P	I	G	P	Y	N	G	C	P			

Фигура 4.



Фигура 5



Фигура 6



Фигура 7

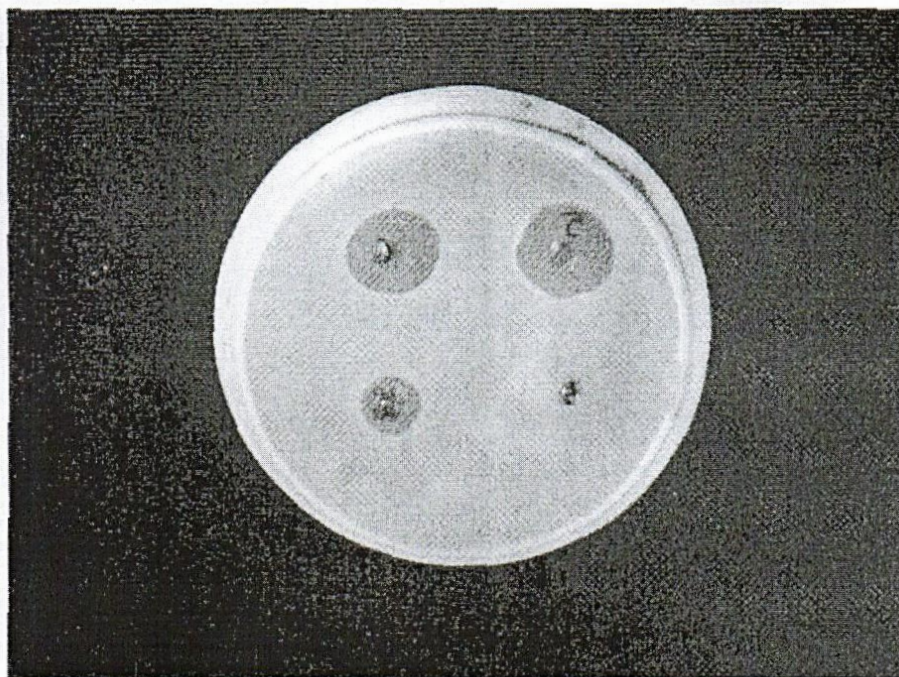


Таблица 1.

Пептид	E.coli 0h	E.coli 24h	Staph.epidermidis 0h	Staph.epidermidis 24h	Enterococcus faecium 0h	Enterococcus faecium 24h
1Н	0,034	0,384	0,036	0,567	0,049	0,203
2Н	0,039	0,743	0,037	0,534	0,053	0,215
3Н	0,038	0,749	0,032	0,444	0,052	0,211
4Н	0,038	0,774	0,036	0,452	0,059	0,189
5Н	0,035	0,377	0,049	0,396	0,052	0,157
6Н	0,043	0,608	0,044	0,654	0,050	0,225
7Н	0,047	0,101	0,048	0,045	0,047	0,149
8Н	0,042	0,470	0,043	0,584	0,052	0,161
Контрола	0,035	0,485	0,032	0,498	0,038	0,137

Пептид	Pseudomonas aeruginosa 0h	Pseudomonas aeruginosa 24	Staph. aureus 0h	Staph. aureus 24h
1Н	0,043	1,091	0,033	0,125
2Н	0,049	1,15	0,041	0,132
3Н	0,048	0,834	0,040	0,255
4Н	0,051	1,001	0,038	0,128
5Н	0,045	0,948	0,035	0,111
6Н	0,053	1,021	0,039	0,197
7Н	0,052	1,094	0,038	0,034
8Н	0,052	1,064	0,038	0,241
Контрола	0,038	0,384	0,032	0,247

Издание на Патентното ведомство на Република България
1113 София, бул. "Г. М. Димитров" 52-Б

Експерт: М. Колибарова

Пор. № 69292