RZECZPOSPOLITA POLSKA

Urząd Patentowy Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **234592**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **413884**

(22) Data zgłoszenia: **09.09.2015**

(51) Int.Cl.
A61K 35/618 (2015.01)
A61P 31/04 (2006.01)

(54) **Sposób izolowania śluzu ślimaka, kompozycja i zastosowanie śluzu ślimaka *Limax maximus***

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
13.03.2017 BUP 06/17

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
31.03.2020 WUP 03/20

(73) Uprawniony z patentu:
UNIWERSYTET PRZYRODNICZY WE WROCŁAWIU, Wrocław, PL
UNIWERSYTET MEDYCZNY IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCŁAWIU, Wrocław, PL
INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ IM. LUDWIKA HIRSZFELDA POLSKIEJ AKADEMII NAUK, Wrocław, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:
IRENEUSZ CAŁKOSIŃSKI, Wrocław, PL
ANDRZEJ GAMIAN, Wrocław, PL
KATARZYNA MAŁOLEPSZA-JARMOŁOWSKA, Wrocław, PL
ANNA LEŚKÓW, Wrocław, PL
KINGA GOSTOMSKA-PAMPUCH, Wrocław, PL
KRZYSZTOF RYPUŁA, Siechnice, PL
ALEKSANDRA KUMALA, Wrocław, PL

(74) Pełnomocnik:
rzecz. pat. Anna Kasperowicz

PL 234592 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób izolacji śluzu, kompozycja zawierająca ten śluz, a także jego zastosowanie do wytwarzania preparatów o właściwościach przeciwbakteryjnych. Preparaty mogą być stosowane na skórę, jak i błony śluzowe, zewnętrznie i wewnętrznie.

Znane jest z opisu zgłoszenia patentowego nr BG 20100110665 wykorzystanie właściwości przeciwbakteryjnych śluzu i hemolimfy ślimaków muszlowych, *Helix aspersa* i *Rapana venosa*. Są to jednak gatunki niewystępujące naturalnie w Polsce, co więcej ich hodowla wymaga sztucznych i często kosztownych warunków, przez co wykorzystanie ich do pozyskiwania związków o aktywności biologicznej jest znacząco ograniczone.

Nieoczekiwanie okazało się, że śluz ślimaków bezmuszlowych *Limax maximus* wykazuje bakteriostatyczne działanie w stosunku do bakterii chorobotwórczych dla człowieka, wywołujących stan zapalny przewodu pokarmowego, który w pewnych przypadkach rozwijać się może do uogólnienia procesu chorobowego z zajęciem narządów wewnętrznych i posocznicą.

Z opisów zgłoszeń patentowych WO2007124625 i US2010048457, znana jest metoda izolowania z ciała ślimaków konkretnych cząsteczek (glikoproteiny i polisacharydy), która polega na homogenizacji całych ślimaków, a następnie ekstrakcji tych cząsteczek etanolem. Jednak wytrząsanie w etanolu może powodować degradację białek ze śluzu, jest szkodliwe dla ślimaków, trudne w utylizacji i szkodliwe dla środowiska.

Celem wynalazku było opracowanie metody izolowania samego śluzu, pozwalającej na ponownie wykorzystanie ślimaków do otrzymywania śluzu, przy udziale roztworu izoosmotycznego względem ślimaków, nieszkodliwego dla białek, środowiska i łatwego w utylizacji.

Ślimak z gatunku *Limax maximus* należy do rodziny pomrowiowatych (*Limacidae*). Jest to jeden z największych ślimaków lądowych. Ślimaki te charakteryzują się szarą barwą ciała z ciemnymi plamami zawsze widocznymi na płaszczu, mają długości do 20 cm. Stopa tych ślimaków jest zwykle jasno szara lub jasno żółta. Prowadzą nocny tryb życia. Ich polska nazwa to pomrów wielki. Na terenie Polski występują bardzo licznie, nie są one gatunkiem chronionym. Z uwagi na to, że jest to gatunek agresywny, w miejscach w których bytuje, głównie parkach i ogrodach znajdujących się blisko siedzib ludzkich, jest on gatunkiem dominującym w obrębie swojej grupy zwierząt, toteż uważany jest za szkodnika, zjadając wszystkie rośliny ogrodowe, zarówno uprawne jak i ozdobne.

Istota sposobu według wynalazku polega na tym, że żywe ślimaki *Limax maximus* wytrząsa się w fizjologicznym roztworze NaCl w sposób umożliwiający omycie ślimaka ze śluzu, przy jednoczesnym przeżyciu osobników. Wytrząsanie prowadzi się do momentu stwierdzenia zmian charakteru roztworu, który jest możliwie jednolicie galaretowaty. Stosunek wagowo-objętościowy masy ślimaków do ilości roztworu NaCl powinien być tak dobrany, aby zachować stabilizację białek w śluzie. Kolejno, po odłowieniu zwierząt, roztwór odwirowuje się, a uzyskany supernatant poddaje się dializie w celu usunięcia soli i liofilizacji w celu usunięcia rozpuszczalnika.

Korzystnie jest, gdy stosunek wagowo-objętościowy masy ślimaków do ilości roztworu NaCl wynosi od 1:5 do 1:15.

Istotą wynalazku jest również kompozycja, która zawiera śluz izolowany według sposobu będącego przedmiotem wynalazku oraz ewentualnie nośniki i/lub środki pomocnicze i/lub rozcieńczalniki.

Korzystnie jest gdy kompozycja stanowi formę maści, kremów, żeli, past, roztworów, mazideł, zawiesin i emulsji. Korzystne jest szczególnie nadanie postaci żelu, który dzięki hydrofilowemu charakterowi odpowiada właściwościom śluzu.

Istotą jest także zastosowanie śluzu ślimaka *Limax maximus* do wytwarzania wyrobu medycznego, niebędącego lekiem, który zapobiega występowaniu, hamuje wzrost lub zwalcza bakterie, korzystnie z rodzaju *Salmonella*.

Istotą wynalazku jest również medyczne zastosowanie śluzu ślimaka *Limax maximus* do wytwarzania leków do leczenia zakażeń bakteryjnych, o etiologii zwłaszcza *Salmonella*, korzystnie *S. typhimurium* i *S. enteritidis*.

Preparaty zawierające śluz ślimaka mogą być zastosowane na skórę i błony śluzowe zewnętrznie i wewnętrznie.

Testy na ludzkich fibroblastach potwierdziły brak toksyczności śluzu ślimaka tego gatunku.

Duża dostępność w warunkach naturalnych na terenie kraju oraz łatwość hodowli tego gatunku ślimaka, jest atutem przedstawionego wynalazku. Opracowana metoda izolacji śluzu jest nieinwazyjna, nieszkodliwa dla ślimaków. Metoda izolacji jest także mniej szkodliwa dla białek zawartych w śluzie, dzięki rezygnacji z wykorzystania etanolu, jak w innych znanych metodach. Dodatkowo, ponieważ

wszystkie stosowane w procesie pozyskiwania śluzu roztwory są roztworami wodnymi, nie dochodzi do generowania szkodliwych odpadów.

Poniżej podano przykłady możliwych kompozycji poprzez składy wybranych preparatów.

Skład preparatu 1

Śluz	0,2 części masowych
Metyloceluloza 4000 cp	4,0 części masowych
Woda oczyszczona	95,8 części masowych

Skład preparatu 2

Śluz	0,2 części masowych
Metyloceluloza 1500 cp	4,0 części masowych
Woda oczyszczona	95,8 części masowych

Skład preparatu 3

Śluz	0,2 części masowych
Metyloceluloza 4000 cp	4,0 części masowych
Glicerol	5,0 części masowych
Woda oczyszczona	90,8 części masowych

Skład preparatu 4

Śluz	0,2 części masowych
Metyloceluloza 4000 cp	4,0 części masowych
Glikol propylenowy-1,2	10,0 części masowych
Woda oczyszczona	85,8 części masowych

Skład preparatu 5

Śluz	0,2 części masowych
Metyloceluloza 4000 cp	4,0 części masowych
Glikol polioksyetylenowy 200	15,0 części masowych
Woda oczyszczona	80,8 części masowych

Skład preparatu 6

Śluz	0,2 części masowych
Metyloceluloza 4000 cp	4,0 części masowych
Glicerol	15,0 części masowych
Woda oczyszczona	80,8 części masowych

Skład preparatu 7

Śluz	0,2 części masowych
Metyloceluloza 1500 cp	4,0 części masowych
Glikol polioksyetylenowy 200	5,0 części masowych
Woda oczyszczona	95,8 części masowych

Skład preparatu 8

Śluz	0,2 części masowych
Metyloceluloza 1500 cp	4,0 części masowych
Glikol propylenowy-1,2	5,0 części masowych
Woda oczyszczona	90,8 części masowych

Skład preparatu 9

Śluz	0,2 części masowych
Metyloceluloza 1500 cp	4,0 części masowych
Glicerol	5,0 części masowych
Woda oczyszczona	90,8 części masowych

Izolacja śluzu ślimaka *Limax maximus*

P r z y k ł a d 1: Ślimaki gatunku *Limax maximus* pozyskiwane są z odłowu w środowisku naturalnym, np. przydomowych ogrodów. Jest to gatunek o nocnym trybie życia i zbiory odbywają się nocą. Ślimaki przetrzymywane są w glinianych naczyniach, z dostępem tlenu, światła słonecznego i słodkiej wody oraz pożywienia w postaci roślin ogrodowych.

Śluz pozyskiwany jest w następujący sposób: ślimaki w ilości 5 osobników dorosłych na jedno powtórzenie (ok. 40 g) umieszcza się w szklanym naczyniu, następnie uzupełnia się je buforowanym

0,9% roztworem NaCl o temperaturze pokojowej, w stosunku 1:9 wagowo-objętościowym. Tak przygotowane ślimaki ostrożne wytrząsa się na wytrząsarce laboratoryjnej rotacyjnej, firmy Elpan – water bath shaker type 357. Ślimaki nie ulegają uszkodzeniu, a śluz osmotycznie odpływa z ich ciała. Wytrząsanie prowadzi się przez 20 minut przy 150 obr/min., otrzymując w miarę jednolity, galaretowaty roztwór, natomiast stan ślimaków wskazuje na ich pełne omycie. Następnie zwierzęta odławia się.

Pozyskaną mieszaninę poddaje się wirowaniu na urządzeniu firmy Sigma przez 15 minut przy 15 000 rpm w celu usunięcia zanieczyszczeń. Po tym etapie przeprowadza się proces dializy w 10°C (12 wymian wody, co ok. 3 h z przerwą nocną), mający na celu usunięcie soli z preparatu w zlewkach, a po jego zakończeniu całość liofilizuje się aż do momentu całkowitego usunięcia wody.

P r z y k ł a d 2: Postępuje się jak w przykładzie 1, z tym, że wstrząsanie ślimaków w roztworze NaCl, prowadzi się przez 30 minut przy 120 obr/min., oraz w stosunku wagowo-objętościowym ślimaków do NaCl 1:15. Dalej postępuje się jak w przykładzie 1.

P r z y k ł a d 3: Postępuje się jak w przykładzie 1, z tym, że wstrząsanie ślimaków w roztworze NaCl, prowadzi się przez 10 minut przy 180 obr/min., oraz w stosunku wagowo-objętościowym ślimaków do NaCl 1:5. Dalej postępuje się jak w przykładzie 1.

Z kolei osad po wirowaniu, ze wszystkich trzech powtórzeń, badany był pod kątem mikrobiologicznym. Wyniki wymazów pobranych z ciał ślimaków przed izolacją śluzu potwierdzają znikomą obecność żywych bakterii w śluzie badanych ślimaków oraz dużą liczbę bakterii w osadzie uzyskanym po wirowaniu na etapie izolacji śluzu. Jest to zgodne z założeniem, że wirowanie jest etapem mającym za zadanie usunięcie ewentualnych zanieczyszczeń oraz bakterii. Ponadto należy dodać, że ślimaki, jak wspomniano wyżej, żyją w środowisku skażonym działalnością ludzką oraz zwierząt domowych, co mogłoby powodować nagromadzenie się mikroorganizmów chorobotwórczych w naskórnym śluzie ślimaków. Taka sytuacja nie ma jednak miejsca, co widać po wynikach wymazów załączonych w tabeli 1. Na podstawie wymazów podjęto decyzję o sprawdzeniu właściwości przeciwbakteryjnych w stosunku do wybranych mikroorganizmów chorobotwórczych. Wybrane do badania mikroorganizmy są powszechnie występującymi w środowisku i wywołującymi infekcje mikroorganizmami. Skupiono się na 4 szczepach, które są najpowszechniejsze i jak np. w przypadku *S. aureus* w wielu przypadkach odporne na działanie aktualnie dostępnych antybiotyków. W tym celu wykonano m.in. test na przeżywalność na płytce 96-dołkowej.

T a b e l a 1

typ posiewu	badany gatunek ślimaka	wynik
różnicowy bezpośredni	ciało ślimaka- *Limax maximus* (Przykład 1)	*Escherichia coli* (niefermentująca) - pojedynczo
		Enterococcus spp. - pojedynczo
	ciało ślimaka- *Limax maximus* (Przykład 2)	brak wzrostu bakterii
	ciało ślimaka- *Limax maximus* (Przykład 3)	*Enterococcus* spp. - pojedynczo
	osad po wirowaniu - *Limax maximus*	*Enterococcus faecalis* - bardzo licznie
		Serratia marcescens - obficie
posiew po namnożeniu	ciało ślimaka- *Limax maximus* (Przykład 1)	tj. wyżej
	ciało ślimaka- *Limax maximus* (Przykład 2)	
	ciało ślimaka- *Limax maximus* (Przykład 3)	
	osad po wirowaniu - Limax maximus	
badanie mikologiczne	ciało ślimaka- *Limax maximus* (Przykład 1)	brak wzrostu grzybów drożdżopodobnych i pleśniowych
	ciało ślimaka- *Limax maximus* (Przykład 2)	
	ciało ślimaka- *Limax maximus* (Przykład 3)	
	osad po wirowaniu - Limax maximus	

Badanie właściwości przeciwbakteryjnych śluzu ślimaka *Limax maximus*.

Badania potwierdzające właściwości bakteriostatyczne śluzu ślimaka *Limax maximus* wykonano metodą krążkowo-dyfuzyjną. Rozpuszczono liofilizowany śluz w wodzie uzyskując stężenie 2 mg śluzu/ml roztworu. Przygotowano płytki do hodowli mikrobiologicznej z podłożem Mueller Hinton II Agar. Firmy GRASO® BIOTECH. Na płytki wysiano zawiesinę bakterii o zmętnieniu 0,5 wg skali McFarlanda. Przeciwbakteryjność śluzów badano na 4 szczepach bakteryjnych wzorcowych, tj.:

– *Salmonella typhimurium* ATCC 1402
– *Salmonella enteritidis* ATCC 13076
– *Escherichia coli ATCC 25922*
– *Staphylococcus aureus MSSA ATCC 29213*

Na płytki z podłożem agarowym i wysianymi bakteriami nakładano sterylne krążki o średnicy 6 mm. Na każdy krążek nałożono po 5 μl lub 10 μl odpowiedniego stężenia badanego śluzu. Płytki umieszczono w cieplarce o temperaturze 37°C i pozostawiono w tych warunkach na 22 h. Po tym czasie płytki wyjęto z cieplarki i poddano wizualnej ocenie występujące strefy zahamowania wzrostu.

Badanie przeciwbakteryjnych właściwości śluzu ślimaka *Limax maximus* z jednoczesnym określeniem MIC.

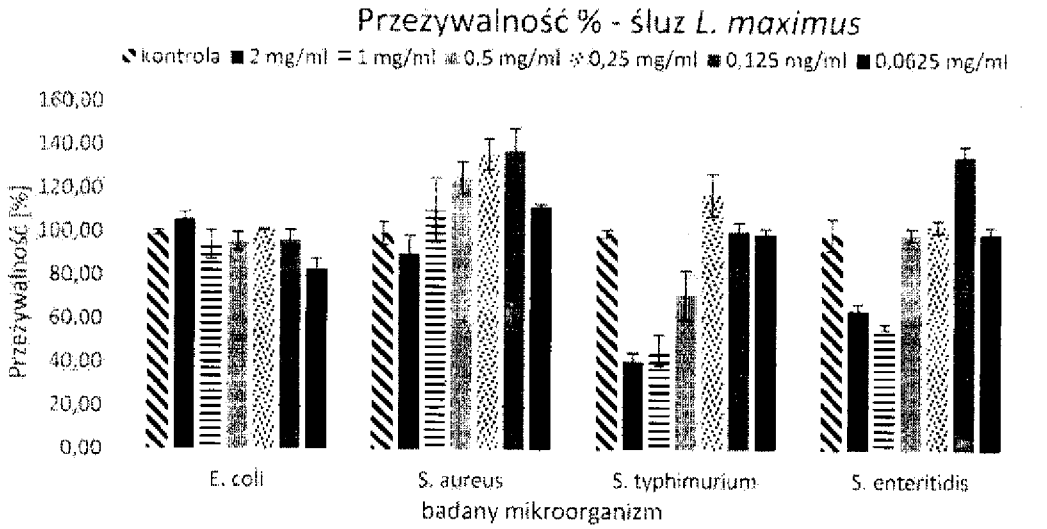
Przygotowano jałową płytkę 96-dołkową. Do każdego dołka zaaplikowano 200 μl pożywki BHI Bulion firmy GRASO® BIOTECH. Do każdego dołka dodano po 2 μl płynnej hodowli bakteryjnej o zmętnieniu 1 w skali McFarlanda. Do tak uzyskanej zawiesiny dodano po 20 μl odpowiednio rozcieńczonych wodnych roztworów śluzu ślimaka *Limax maximus* tak, by końcowe stężenia w dołkach wynosiły odpowiednio:

– 2 mg liofilizowanego śluzu/ml
– 1 mg/ml
– 0,5 mg/ml
– 0,25 mg/ml
– 0,125 mg/ml
– 0,0625 mg/ml

Każde stężenie badane było w trzech powtórzeniach. Wykonano także, również w trzech powtórzeniach, kontrolę, którą stanowiła pożywka z dodatkiem zawiesiny bakteryjnej o zmętnieniu 1 w skali McFarlanda.

Po aplikacji wszystkich roztworów i płynów na płytkę, zamknięto ją szczelnie parafilmem w celu ochrony przed parowaniem i wstawiono do cieplarki o temperaturze 37°C i pozostawiono w niej na 20 h. Po tym czasie płytki wyjęto i zmierzono stopień zmętnienia w poszczególnych dołkach, korzystając z czytnika płytek.

Wyniki przedstawiono na wykresie 1.



Wykres 1. Wynik testu płytkowego śluzu *Limax maximus*.

Na podstawie uzyskanych danych i przygotowanych na ich podstawie wykresów obserwuje się, iż w przypadku śluzu ślimaków *Limax maximus*, wpływa on na przeżywalność hamując przyrost bakterii *Salmonella typhimurium* i *Salmonella enteritidis*. W przypadku bakterii *S. typhimurium* oraz *S.* enteritidis, najlepiej działającym stężeniem jest stężenie 2 mg/ml, które hamuje przyrost bakterii kolejno o 59% oraz 35%. W przypadku zastosowania stężenia 1 mg/ml hamuje on przyrost bakterii o kolejno 54% oraz 43%. W przypadku *S. enteritidis*, zastosowanie śluzu w stężeniu 0,5 mg/ml także hamuje przyrost tych bakterii o ok. 28%.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób izolacji śluzu ślimaka, **znamienny tym**, że żywe ślimaki *Limax maximus* wytrząsa się w fizjologicznym roztworze NaCl w sposób umożliwiający omycie ślimaka ze śluzu, przy jednoczesnym przeżyciu osobników i pozwalający na wizualną ocenę zmian charakteru roztworu, przy czym stosunek wagowo-objętościowy masy ślimaków do ilości roztworu NaCl powinien być tak dobrany aby zachować stabilizację białek w śluzie, następnie, po odłowieniu zwierząt, roztwór odwirowuje się, a uzyskany supernatant poddaje się dializie w celu usunięcia soli i liofilizacji w celu usunięcia rozpuszczalnika.
2. Sposób, według zastrz. 1, **znamienny tym**, że stosunek wagowo-objętościowy masy ślimaków do ilości roztworu NaCl wynosi od 1:5 do 1:15.
3. Kompozycja, **znamienna tym**, że zawiera śluz izolowany według sposobu opisanego w zastrz. 1 i 2 oraz ewentualnie nośniki i/lub środki pomocnicze i/lub rozcieńczalniki.
4. Kompozycja, według zastrz. 3, **znamienna tym**, że jest w postaci maści, kremów, żeli, past, roztworów, mazideł, zawiesin i emulsji.
5. Zastosowanie śluzu ślimaka *Limax maximus* do wytwarzania wyrobu medycznego, zapobiegającego występowaniu, hamującego wzrost lub zwalczającego bakterie, zwłaszcza z rodzaju *Salmonella*.
6. Zastosowanie śluzu ślimaka *Limax maximus* do wytwarzania leków do leczenia infekcji bakteryjnych, o etiologii zwłaszcza *Salmonella*, zwłaszcza *S. typhimurium* i *S. enteritidis*.