

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **043096**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.04.25

(21) Номер заявки
202090986

(22) Дата подачи заявки
2018.10.09

(51) Int. Cl. *A61K 8/64* (2006.01)
A61K 8/04 (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01)

(54) КОМПОЗИЦИЯ, ВКЛЮЧАЮЩАЯ СТРУКТУРИРОВАННУЮ ВОДНУЮ ФАЗУ И СЕРИЦИН

(31) **17198217.6**

(32) **2017.10.25**

(33) **EP**

(43) **2020.07.09**

(86) **PCT/EP2018/077417**

(87) **WO 2019/081196 2019.05.02**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ЮНИЛЕВЕР ГЛОБАЛ АйПи
ЛИМИТЕД (GB)**

(72) Изобретатель:
**Патил Ниведита Джагдиш, Перала
Сива Рама Кришна, Раут Джанхави
Санджай, Тивари Джоти Кумар (IN)**

(74) Представитель:
Фелицына С.Б. (RU)

(56) **US-A1-2005130857**

EP-A1-1731556

EP-A1-2865442

LIА HUANG ET AL.: "Cloning, Expression, and Assembly of Sericin-like Protein", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 278, no. 46, 14 November 2003 (2003-11-14), pages 46117-46123, XP055430155, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M307792200 page 46118 - page 46121; figures 5b,6,7; table II

DASH R ET AL.: "Isolation, purification and characterization of silk protein sericin from cocoon peduncles of tropical tasar silkworm, Antheraea mylitta", INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES, ELSEVIER BV, NL, vol. 38, no. 3-5, 30 May 2006 (2006-05-30), pages 255-258, XP027949897, ISSN: 0141-8130 [retrieved on 2006-05-30] the whole document

HIDETOSHI TERAMOTO ET AL.: "Preparation of Gel Film from Bombyx mori Silk Sericin and Its Characterization as a Wound Dressing", BIOSCI. BIOTECH. BIOCHEM., vol. 72, no. 12, 23 December 2008 (2008-12-23), pages 3189-3196, XP055350177, ISSN: 0916-8451, DOI: 10.1271/bbb.80375, page 3190 - page 3192

(57) Изобретение относится к косметической композиции, включающей 5-100 мас.% структурированной водной фазы, причем композиция содержит 0,1-10 мас.% серицина относительно массы воды, где серицин характеризуется долей бета-листа во вторичной структуре более 90% и где структурированная водная фаза имеет рН в диапазоне 2,0-4 или 5,5-10,5. При этом структурированная водная фаза представляет собой водную фазу, которая характеризуется неньютоновским поведением, и включает гидрогель серицина. Изобретение также обеспечивает способ получения этой композиции, содержащей один или несколько других компонентов в дополнение к структурированной водной фазе. При этом способ включает получение водного компонента, содержащего серицин, характеризующийся долей бета-листа во вторичной структуре более 90%; и смешивание 100 мас.ч. указанного водного компонента по меньшей мере с 5 мас.ч. одного или нескольких дополнительных компонентов, причем рН водного компонента доводят до рН в диапазоне 4,0-5,5 перед смешиванием, а затем, после смешивания, рН доводят до уровня менее 3,9 или более 5,6. Такой серицин является превосходным структурообразующим компонентом для воды и может использоваться для структурирования водной фазы широкого спектра продуктов, особенно косметических продуктов.

B1**043096****043096 B1**

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к композициям, которые включают структурированную водную фазу и 0,1-10 мас.% серицина относительно массы воды, причем указанный серицин характеризуется долей бета-листа во вторичной структуре более 80%.

Предпосылки создания изобретения

В косметических, фармацевтических, моющих средствах, в тканевой инженерии и пищевых продуктах на водной основе необходимо контролировать реологические свойства состава, чтобы придать составу желаемые тактильные свойства, внешний вид, вязкость и т.д. Структурообразующий ингредиент (компонент, структурирующий воду) используют в водной фазе таких составов для регулировки реологических свойств. В зависимости от природы структурообразующего компонента для воды, состава водного раствора и концентрации применяемого структурообразующего компонента эти реологические свойства могут меняться в широких пределах.

Серицин, компонент шелка, является белком, который может действовать как структурообразующий компонент для воды. Шелк является натуральным белковым волокном, получаемым от шелкопряда *Bombyx mori*, и обычно состоит из двух белков фиброина (70-80%) и серицина (20-30%), остальная часть представляет собой смесь воска, углеводов и неорганических веществ. Фиброин является волокнистым гликопротеином, присутствующим в виде тонкой двойной нити, покрытой слоями серицина, который способствует формированию кокона. Для производства шелка из высушенных коконов тутового шелкопряда фиброин отделяют от серицина с помощью так называемого процесса "дегуммирования", а серицин отправляют в сточные воды. Дегуммирование под воздействием тепла или тепла под давлением имеет то преимущество, что оно приводит к меньшему количеству примесей. Многие промышленные методы удаления включают экстракцию с мылом и моющими средствами, ферментативный гидролиз, кислотный или щелочной гидролиз.

До недавнего времени серицин считался отходом производства шелка. Серицин существует с широким диапазоном молекулярных масс от 10 до более 400 кДа. Серицин находится, в основном, в структуре аморфной статистической спирали и в меньшей степени - в структуре бета-листа (Padamwar et al., *Silk sericin and its applications: A review* (Серицин шелка и его применения: Обзор), *Journal of Scientific & Industrial Research*, 2004, 63, стр. 323-329).

US 2009/176965 раскрывает, что молекулярная структура выделенного серицина может быть модифицирована путем облучения раствора серицина с получением высокомолекулярного серицина, обладающего улучшенной способностью поглощать радикалы и способностью ингибировать тирозиназу. Образуется максимум 50% структуры бета-листа (фиг. 2, доза облучения 200 кГр). Серицин, имеющий модифицированную молекулярную структуру, может быть использован при производстве различных продуктов для улучшения антиоксидантной и тирозиназной ингибирующей способности, которые включают пищевые продукты, косметические средства и/или фармацевтические продукты и лекарства.

JP 2006111667 раскрывает способ получения гидрогеля серицина. Предложен экстракт шелка с молекулярной массой более 50 кДа, к которому добавляют спирт и выдерживают смесь. Серицин в водном растворе характеризуется поглощением при 1641 см^{-1} , что относится к статистической структуре в полосе поглощения амида. С другой стороны, гидрогель серицина поглощает при 1620 см^{-1} , что соответствует структуре бета-листа в полосе поглощения амида I. Добавление этанола, способствующее образованию водородной связи между молекулами серицина, и возникающая в результате трехмерная структура, формирует гидрогель серицина.

US 2016/0136241 раскрывает гидрогель серицина. В качестве сырья используют коконы мутантного шелкопряда с дефицитом фиброина *Bombyx mori*. Раствор серицина получают экстракцией и очисткой исходного материала, а затем сшивают сшивающим агентом (альдегидами и генипозидом) для получения гидрогеля серицина. Сшитый гидрогель серицина сохраняет природную конформацию серицина.

Краткое описание сути изобретения

Авторы изобретения разработали способ, который позволяет выделить серицин из шелка, так что такой серицин характеризуется чрезвычайно высокой долей (>80%) бета-листа во вторичной структуре. Также было установлено, что такой серицин является превосходным структурообразующим компонентом для воды и может соответственно использоваться для структурирования водной фазы широкого спектра продуктов, таких как косметические продукты, фармацевтические продукты, пищевые продукты и моющие композиции.

Таким образом, настоящее изобретение относится к композиции, включающей 5-100 мас.% структурированной водной фазы, причем указанная композиция содержит 0,1-10 мас.% серицина относительно массы воды, и указанный серицин характеризуется долей бета-листа во вторичной структуре более 80%.

Серицин по настоящему изобретению, то есть серицин, имеющий более 80% структуры бета-листа, может быть выделен из коконов тутового шелкопряда способом, который включает следующие стадии:

- разрезание коконов на кусочки приблизительно 5x5 мм;
- первая промывка коконов деминерализованной водой (демин-водой) примерно при 25°C;
- вторая промывка коконов деминерализованной водой примерно при 70°C;
- вторая промывка коконов этанолом примерно при 25°C;

удаление этанола из промытых коконов испарением при температуре ниже 30°C;
 смешивание 1 мас.ч. сухих промытых коконов с около 20 мас.ч. горячей воды (~95°C) для формирования водной суспензии;

выдерживание водной суспензии при около 120°C в течение около 5-20 мин;

центрифугирование нагретой суспензии при 4000 g в течение 20 мин с последующей декантацией для извлечения экстракта белка серицина.

В вышеописанном способе предпочтительно водную суспензию выдерживают при температуре около 120°C в течение до 15 мин, предпочтительно 10 мин и наиболее предпочтительно до 5 мин. Авторы настоящего изобретения определили, что, когда водную суспензию выдерживают при температуре около 120°C в течение до около 20 мин, полученный таким образом серицин характеризуется долей бета-листа во вторичной структуре более 80%. Количество серицина в форме бета-листа снижается если указанная температура сохраняется дольше.

В отличие от способа, известного из уровня техники и описанного в US 2009/0176965, серицин с высоким содержанием бета-листа легко может быть использован без применения облучения гамма-излучением, электронным или рентгеновским излучением.

Было установлено, что реологические свойства структурированной серицином водной фазы в композиции по изобретению можно регулировать, изменяя pH и/или регулируя концентрацию многовалентных катионов (например, Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ca^{2+}).

Также предложен способ получения композиции по настоящему изобретению, включающий получение водного компонента, содержащего серицин, характеризующийся долей бета-листа во вторичной структуре более 80%; и

смешивание 100 мас.ч. указанного водного компонента с по меньшей мере 5 мас.ч. одного или нескольких других компонентов.

Подробное описание изобретения

Используемый в описании термин "включающий" охватывает термины "состоящий по существу из" и "состоящий из". Если используется термин "включающий", перечисленные стадии или варианты не обязательно являются исчерпывающими.

Если не указано иное, числовые диапазоны, выраженные в формате "от x до y", трактуются как включающие x и y.

При указании любого диапазона значений или количеств любое конкретное более высокое значение или количество может быть скомбинировано с любым конкретным более низким значением или количеством.

За исключением примеров и сравнительных экспериментов или случаев, когда явно указано иное, все числа следует понимать как модифицированные словом "около".

Все проценты и соотношения, содержащиеся в данном документе, рассчитаны по массе, если не указано иное.

В соответствии с использованием в настоящем документе неопределенный артикль "a" или "an" и соответствующий ему определенный артикль "the" означают по меньшей мере один или один или более, если не указано иное.

Различные признаки настоящего изобретения, упомянутые в отдельных разделах выше, применимы, где это уместно, к другим разделам *mutatis mutandis* (т.е. с необходимыми модификациями). Следовательно, признаки, указанные в одном разделе, могут быть скомбинированы с признаками, указанными в других разделах, где это уместно. Любые заголовки разделов добавлены только для удобства и не предназначены для ограничения настоящего раскрытия каким-либо образом.

Следует понимать, что, когда признаки, указанные в формуле изобретения, сопровождаются номерами позиций, такие номера включены исключительно с целью улучшения ясности формулы изобретения и никоим образом не ограничивают объем формулы изобретения.

Настоящее изобретение относится к композиции, включающей 5-100 мас.% структурированной водной фазы, причем композиция содержит 0,1-10 мас.% серицина относительно массы воды, и указанный серицин характеризуется долей бета-листа во вторичной структуре более 80%.

Используемый в описании термин "структурированная водная фаза", если не указано иное, относится к водной фазе, которая характеризуется неньютоновским поведением из-за присутствия одного или нескольких гидроколлоидов.

Используемый в описании термин "серицин", если не указано иное, относится к полипептиду серицина, полученному из шелкопряда *Bombyx mori*, причем указанный полипептид имеет молекулярную массу по меньшей мере 2 кДа. Серицин из *Bombyx mori* определяется идентификатором P07856 в базе данных UniProtKB. Термин "серицин" также охватывает частично гидролизованные формы природного серицина.

Используемый в настоящем документе термин "вторичная структура", если не указано иное, относится к пространственному расположению локальных сегментов полипептидов серицина, обозначаемому как альфа-спираль, бета-лист или статистическая спираль.

Используемый в настоящем документе термин "альфа-спираль", если не указано иное, относится к

части молекулярной структуры, которая представляет собой стержнеподобную структуру, в которой плотно скрученный каркас образует внутреннюю часть стержня, а боковые цепи направлены наружу в виде спиральной структуры. Альфа-спираль стабилизируется водородными связями между группами NH и CO основной цепи. В частности, группа CO каждой аминокислоты образует водородную связь с группой NH аминокислоты, которая расположена на четыре остатка вперед ($i+4$) в основной цепи (Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L., Biochemistry 5th Ed. New York, WH Freeman, 2002, 3.3.1).

Используемый в настоящем документе термин "бета-лист", если не указано иное, относится к части молекулярной структуры, образованной в результате связывания двух или более бета-нитей водородными связями. Бета-нить представляет собой отрезок полипептидной цепи, обычно длиной 3-10 аминокислот вдоль основной цепи в растянутой конформации. Соседние цепи в бета-листе могут проходить в противоположных направлениях (антипараллельный β -лист) или в одном направлении (параллельный β -лист). В антипараллельном расположении группа NH и группа CO каждой аминокислоты соответствующим образом связаны водородной связью с группой CO и группой NH партнера в соседней цепи, в параллельном расположении схема водородного связывания является более сложной. Для каждой аминокислоты группа NH имеет водородную связь с группой CO одной аминокислоты соседней цепи, тогда как группа CO связана водородной связью с группой NH аминокислоты на два остатка дальше вдоль цепи (Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L., Biochemistry 5th Ed. New York, WH Freeman, 2002, 3.3.2).

Используемый в настоящем документе термин "статистическая спираль", если не указано иное, относится к части молекулярной структуры, не имеющей определенной закономерности в водородных связях, такой как альфа-спираль или бета-лист.

Вторичная структура серицина может быть определена с использованием спектроскопии кругового дихроизма в спектральной области "дальнего-УФ" (190-250 нм). При этих длинах волн хромофор представляет собой пептидную связь, и сигнал возникает, когда он расположен в обычной укладке. Для структуры бета-листа характерна максимальная эллиптичность на остаток (тета) при 195 нм и минимальная эллиптичность при 220 нм. Для альфа-спирали характерны максимальная эллиптичность на остаток (тета) около 190 нм и двойные минимумы около 205 нм и 225 нм. Для структуры статистической спирали характерны минимальная эллиптичность около 200 нм и широкий максимум между 210 и 220 нм.

В соответствии с наиболее предпочтительным вариантом осуществления серицина в композиции по настоящему изобретению характеризуется долей бета-листа во вторичной структуре более 80% или даже более 85% и наиболее предпочтительно более 90%.

В одном предпочтительном варианте осуществления серицин имеет молекулярную массу в диапазоне 2-400 кДа, предпочтительно 25-300 кДа, более предпочтительно 40-250 кДа, еще более предпочтительно в диапазоне 60-200 кДа.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения композиция содержит 0,2-4 мас.% серицина относительно массы воды. Предпочтительно композиция содержит 0,3-3 мас.% серицина относительно массы воды, более предпочтительно 0,4-2 мас.% серицина относительно массы воды.

Предпочтительно по меньшей мере 80 мас.% серицина, содержащегося в композиции, присутствует в структурированной водной фазе. Более предпочтительно по меньшей мере 90 мас.% серицина, наиболее предпочтительно по меньшей мере 95 мас.% серицина, содержащегося в композиции, присутствует в структурированной водной фазе.

Авторы изобретения установили, что способность серицина к структурированию воды оптимальна, когда pH структурированной водной фазы находится в диапазоне 2,0-4,0 или 5,5-10,5. Предпочтительно структурированная водная фаза имеет pH в диапазоне 5,8-9,5, еще более предпочтительно в диапазоне 6-8,5.

Композиция по настоящему изобретению может быть получена в форме однофазной водной композиции или в форме композиции, которая включает одну или несколько дополнительных отдельных фаз. Примерами таких многофазных композиций являются эмульсии и суспензии. В соответствии с наиболее предпочтительным вариантом осуществления композиция включает 1-80 мас.%, более предпочтительно 5-70 мас.%, наиболее предпочтительно 10-50 мас.% одной или нескольких неводных фаз.

В соответствии с особенно предпочтительным вариантом осуществления структурированная водная фаза представляет собой непрерывную водную фазу. Композиции, включающие такую непрерывную структурированную водную фазу, предпочтительно имеют динамический модуль упругости (G') при 25°C в диапазоне 50-3000 Па, более предпочтительно в диапазоне 100-2000 Па и наиболее предпочтительно 200-800 Па. Модуль потерь (G'') этой композиции предпочтительно находится в диапазоне 10-300 Па, более предпочтительно в диапазоне 20-200 Па и наиболее предпочтительно в диапазоне 50-100 Па.

Используя колебательные методы определения реологических свойств, можно количественно определить как вязкоподобные, так и упругоподобные свойства материала в разных временных масштабах. Основной принцип колебательного реометра состоит в том, чтобы вызвать синусоидальную деформацию сдвига в образце и измерить результирующее напряжение; измеренная временная шкала определяется частотой колебаний ω деформации сдвига. Образец помещают между двумя пластинами. В то время как верхняя пластина остается неподвижной, двигатель вращает нижнюю пластину, создавая тем самым за-

висящую от времени деформацию $\gamma(t) = \gamma \sin(\omega t)$ на образце. Одновременно зависящее от времени напряжение $\sigma(t)$ определяется количественно путем измерения крутящего момента, который образец передает верхней пластине.

Как динамический модуль упругости (G'), так и модуль потерь (G'') жидкого продукта определяют при 25°C с использованием реометра AR1000 (TA Instruments), используя геометрию конической пластины, с диаметром конуса 40 мм, углом конуса 2° и зазором 58 мкм.

Применяемые настройки программы следующие.

Напряжение τ выбирается в линейно-вязко-эластичном диапазоне продукта (LVER определяется с помощью амплитудной развертки). Напряжение поддерживается постоянным на уровне 1 Па.

Скорость повышения угловой частоты ω на образце задается от низкой до высокой частоты, начиная с 6,28 рад/с. Конечная ω составляет 628,32 рад/с.

Настройка, при которой набираются точки измерения, это "настройки без времени". В этом режиме устройство находится в ждущем режиме до достижения своей точки измерения.

Для каждого десятка берется 10 точек измерения.

В соответствии с еще одним предпочтительным вариантом осуществления структурированная водная фаза представляет собой гелированную водную фазу, которая структурирована трехмерной структурой гидроколлоида. Гелированная водная фаза может быть гелирована трехмерной структурой, которая состоит исключительно из серицина (гидрогель серицина) или, в альтернативном варианте, она может включать трехмерную структуру, которая также включает другие гелеобразующие агенты.

Структурированная водная фаза обычно содержит по меньшей мере 50 мас.% воды. Предпочтительно структурированная водная фаза содержит по меньшей мере 60 мас.% воды, более предпочтительно по меньшей мере 70 мас.% воды, более предпочтительно по меньшей мере 80 мас.% воды и наиболее предпочтительно по меньшей мере 85 мас.% воды.

В соответствии с наиболее предпочтительным вариантом осуществления настоящая композиция представляет собой эмульсию, включающую 1-80 мас.% гидрофобной фазы и 20-99 мас.% структурированной водной фазы. Более предпочтительно эмульсия включает 5-70 мас.% гидрофобной фазы и 30-95 мас.% структурированной водной фазы. Наиболее предпочтительно эмульсия содержит 10-50 мас.% гидрофобной фазы и 50-90 мас.% структурированной водной фазы. Помимо гидрофобной фазы и структурированной водной фазы, композиция эмульсии может содержать другие фазы, например дисперсную фазу, состоящую из мелких частиц твердого материала.

Авторы изобретения установили, что способность серицина к структурированию воды может быть усилена присутствием катионов многовалентных металлов. Следовательно, в еще одном предпочтительном варианте осуществления композиция включает по меньшей мере 0,08 ммоль катиона многовалентного металла, причем указанный катион многовалентного металла выбран из Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ca^{2+} и их комбинаций. Более предпочтительно композиция включает по меньшей мере 0,1 ммоль указанного катиона поливалентного металла, еще более предпочтительно в диапазоне 0,2-0,9 ммоль указанного катиона многовалентного металла, более предпочтительно 0,3-0,8 ммоль указанного катиона многовалентного металла и наиболее предпочтительно 0,4-0,6 ммоль указанного катиона многовалентного металла.

Серицин, применяемый в соответствии с настоящим изобретением, предпочтительно является серицином высокой чистоты. Соответственно, в другом предпочтительном варианте осуществления настоящая композиция содержит фиброин и серицин в массовом отношении фиброин:серицин не более 1:5, предпочтительно не более 1:10.

В наиболее предпочтительном варианте осуществления структурированная водная фаза включает гидрогель серицина. Было установлено, что серицин по настоящему изобретению образует гидрогель без дополнительных гидроколлоидов. Обычно серицин, содержащийся в композиции, способен образовывать стабильный гель при концентрации серицина 1% относительно массы воды. Более предпочтительно указанный стабильный гель имеет динамический модуль упругости (G') при 25°C по меньшей мере 200 Па.

В отличие от серицинов, описанных в US 2016/036241, серицин по настоящему изобретению не является сшитым глютеральдегидом серицином. Более предпочтительно серицин не является сшитым серицином.

В отличие от серицинов, описанных в US 2009/176965, серицин по настоящему изобретению не является облученным серицином, который подвергался облучению с поглощенной дозой 10-500 кГр.

Структурированная фаза композиции по настоящему изобретению предпочтительно содержит менее 0,1 мас.% этанола, более предпочтительно менее 0,01 мас.% этанола.

В конкретном варианте осуществления настоящая композиция включает по меньшей мере 0,3%, предпочтительно по меньшей мере 0,4% серицина относительно массы воды. Этот серицин предпочтительно имеет молекулярную массу по меньшей мере 10 кДа и характеризуется долей бета-листа во вторичной структуре более 80%.

В более предпочтительном варианте осуществления композиция включает по меньшей мере 0,3%, предпочтительно по меньшей мере 0,4% серицина относительно массы воды, имеющего молекулярную массу по меньшей мере 15 кДа и характеризующегося долей бета-листа во вторичной структуре более 85%.

Композиция по настоящему изобретению предпочтительно представляет собой косметический продукт, более предпочтительно косметический продукт, выбранный из лосьона, крема, мази и целебной мази.

Другой аспект настоящего изобретения относится к способу получения композиции, как она определена в описании выше, причем указанный способ включает:

получение водного компонента, содержащего серицин, характеризующийся долей бета-листа во вторичной структуре более 80%; и

смешивание 100 мас.ч. указанного водного компонента с по меньшей мере 5 мас.ч., предпочтительно по меньшей мере 10 мас.ч., более предпочтительно по меньшей мере 20 мас.ч. одного или нескольких других компонентов.

Предпочтительно водный компонент, содержащий серицин, является жидким, когда его смешивают с одним или несколькими другими компонентами. В случае, если водный компонент содержит серицин в концентрации, достаточной для гелеобразования водного компонента, водный компонент может быть переведен в жидкое состояние до смешивания и оставлен для гелирования после смешивания. Этого можно достичь путем доведения рН водного компонента до рН в диапазоне 4,0-5,5 перед смешиванием, с последующим доведением рН до уровня менее 3,9 или более 5,6 после указанного смешивания.

Один или несколько других компонентов, которые смешивают с водным компонентом в настоящем способе, предпочтительно выбирают из группы, состоящей из наполнителей, красителей, модификаторов рН, растворителей, полимеров и загустителей.

В соответствии с наиболее предпочтительным вариантом осуществления способ включает добавление водорастворимой соли катиона многовалентного металла, выбранного из Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ca^{2+} и их комбинаций.

Примеры

Пример 1: экстракция серицина.

Серицин экстрагируют из коконов *Bombyx mori* с использованием следующей процедуры.

i) Коконы замачивают в ультрачистой и дегазированной воде при температуре окружающей среды в течение 15 мин, с встряхиванием содержимого каждые 5 мин. Коконы отделяют от воды с помощью пинцета.

ii) Предварительно промытые кусочки снова замачивают в сверхчистой и дегазированной воде при 70°C в течение 30 мин (при встряхивании каждые 5 мин). Коконы отделяют от воды с помощью пинцета.

iii) Коконы замачивают в этаноле при комнатной температуре в течение 15 мин (встряхивая каждые 3 мин). Коконы отделяют от этанола с помощью пинцета.

Коконы сушат на фильтровальной бумаге Whatman при температуре окружающей среды и атмосферном давлении. Высушенные коконы используют в качестве исходного материала для процесса экстракции.

Известные количества воды вводят в контейнеры и нагревают до 95°C (с использованием автоклава с нижним перемешиванием). Предварительно промытые коконы (отношение коконов к воде 1:30) добавляют в воду и полученные таким образом суспензии подвергают различным режимам экстракции.

Образец 1 выдерживают при перемешивании и нагреве до 120°C в течение 5 мин.

Образец 2 экстрагируют в тех же условиях, используя время экстракции 30 мин.

Образец 3 также экстрагируют в тех же условиях, используя время экстракции 90 мин.

В конце периода нагрева нагрев отключают и давление сразу сбрасывают (это позволяет быстрее охладить суспензию).

Серицин отделяют от фиброина центрифугированием (6000 об/мин (4000 г) в течение 30 мин) и декантацией. Содержание серицина в экстрактах составляет около 1,1 мас.%

Молекулярную массу экстрагированного серицина из образца 1 определяют с помощью SDS-PAGE анализа и получают значения между 35 кДа и 250 кДа.

Пример 2: вторичная структура.

Вторичную структуру белка серицина в образцах 1-3 из примера 1 анализируют с использованием измерений кругового дихроизма (CD). Стандартные спектры CD вторичных структур белка регистрируют с использованием сканирования в диапазоне длины волны 195-240 нм, и затем данные получают с использованием программного обеспечения для онлайн-анализа "K2D3".

Свернутый белок состоит из вторичных структур α -спираль; β -лист; петли (остатки линкера, соединяющие домены вторичной структуры). Программное обеспечение "K2D3" использует сканирование в диапазоне длины волны 200-240 нм. Среднее значение эллиптичности остатка кругового дихроизма относится к проценту аминокислот, которые вносят вклад во вторичные структуры (α -спираль и β -лист) и не включает остатки в области линкера. Максимальная сумма всех вторичных структур (46%) взята из компьютерной модели белка серицина. Структуру бета листа серицина оценивают с использованием результатов, полученных с использованием программного обеспечения K2D3.

Данные CD представлены в виде средней эллиптичности остатка (MRE), выраженной в град $см^2$ дмоль⁻¹, в зависимости от длины волны, с использованием следующего уравнения:

$$[\theta]_{MRE} = \frac{MRW \times [\theta]_{obs}}{10 \times dx \times c}$$

где рассчитанная средняя эллиптичность остатка ($\text{град см}^2 \text{ дмоль}^{-1}$); MRW средняя масса остатка для пептидной связи (MRW рассчитывается как $\text{MRW}=\text{M}/\text{N}^{-1}$, где M -молекулярная масса пептидной цепи (Da), а N - количество аминокислот в цепи); $[\theta]_{\text{obs}}$, наблюдаемая эллиптичность (выраженная в градусах); d длина оптического пути (см); c, концентрация белка (гг^{-1}). Все спектры CD скорректированы с учетом концентрации буфера, а вторичная структура рассчитана с использованием веб-инструмента K2D3 для анализа K2D3: Kelly et al. (2005) *Biochimica et Biophysica Acta* 1751: 119-39. PMID: 16027053 пакет программного обеспечения нейронной сети.

Результаты измерений CD приведены в табл. 1.

Таблица 1

Образец	Время экстракции/минуты	Температура/°C	% бета-листа
1	5	120	92%
2	30		71%
3	90		30%

Пример 3: реологические исследования.

Реологические свойства экстрактов серицина из примера 1 определяют путем измерения динамического модуля упругости и модуля потерь этих экстрактов (при 25°C). Результаты приведены в табл. 2.

Таблица 2

Образец	Концентрация серицина	Температура/°C	Время экстракции/минуты	G' (Па)	G'' (Па)
1	1,1	120	5	980	120
2	1,1		30	65	7
3	1,1		90	5	1

Гидрогели получены с использованием различных концентраций образца 1 из примера 1. Определяют динамический модуль упругости и модуль потерь гидрогелей (при 25°C). Результаты этих измерений приведены в табл. 3.

Таблица 3

Концентрация серицина (% мас.)	G' (Па)	G'' (Па)
0,9	104	11
1,3	1027	97
1,6	3156	323

Пример 4: реологические исследования в присутствии ионов металлов.

Гидрогели, содержащие Zn^{2+} , готовят с использованием образца 1 из примера 1 и путем добавления различных количеств ZnCl_2 .

Определяют динамический модуль упругости и модуль потерь гидрогелей. Результаты этих измерений приведены в табл. 4.

Таблица 4

ppm ZnCl_2	G' (Па)	G'' (Па)
0	114	11
8	157	16
25	253	27
50	433	45
125	849	117

Пример 5: влияние pH.

Влияние pH на динамический модуль упругости гидрогеля серицина определяют с использованием образца 1 из примера 1. pH 0,9% водного раствора серицина корректируют с использованием HCl (молярность 0,1) или NaOH (молярность 0,1) для получения растворов с различным pH.

Определяют динамический модуль упругости и модуль потерь гидрогелей. Результаты этих измерений приведены в табл. 5.

Таблица 5

pH рецептуры	G'	G''
2,5	104	19
3,5	260	31
4,5	Осадок серицина	Осадок серицина
6,4	126	12
7,5	149	14
9	40	4

Образование гидрогеля происходит при $\text{pH} < 3,5$ и pH между 6-9,5. Гидрогель не образуется в диапазоне pH 4-5,5.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Косметическая композиция, включающая 5-100 мас.% структурированной водной фазы, причем композиция содержит 0,1-10 мас.% серицина относительно массы воды, где серицин характеризуется долей бета-листа во вторичной структуре более 90%, и где структурированная водная фаза имеет рН в диапазоне 2,0-4 или 5,5-10,5,

где структурированная водная фаза представляет собой водную фазу, которая характеризуется не-ньютоновским поведением, и включает гидрогель серицина.

2. Композиция по п.1, в которой серицин имеет молекулярную массу в диапазоне 2-400 кДа.

3. Композиция по п.1 или 2, содержащая 0,2-4 мас.% серицина относительно массы воды.

4. Композиция по любому из пп.1-3, включающая 1-80 мас.% одной или нескольких неводных фаз и 20-99 мас.% структурированной водной фазы.

5. Композиция по любому из пп.1-4, включающая по меньшей мере 0,08 ммоль катиона многовалентного металла, причем указанный катион многовалентного металла выбран из Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ca^{2+} и их комбинаций.

6. Композиция по любому из пп.1-5, в которой структурированная водная фаза представляет собой непрерывную водную фазу.

7. Композиция по любому из пп.1-6, в которой структурированная водная фаза содержит по меньшей мере 50 мас.% воды.

8. Композиция по любому из пп.1-7, включающая по меньшей мере 0,4% серицина относительно массы воды, где указанный серицин имеет молекулярную массу по меньшей мере 10 кДа и характеризуется долей бета-листа во вторичной структуре более 90%.

9. Композиция по любому из пп.1-8, представляющая собой косметический продукт, выбранный из лосьона, крема и мази.

10. Способ получения композиции по любому из пп.1-9, содержащей один или нескольких других компонентов в дополнение к структурированной водной фазе, причем способ включает

получение водного компонента, содержащего серицин, характеризующийся долей бета-листа во вторичной структуре более 90%; и

смешивание 100 мас.ч. указанного водного компонента по меньшей мере с 5 мас.ч. одного или нескольких дополнительных компонентов,

причем рН водного компонента доводят до рН в диапазоне 4,0-5,5 перед смешиванием, а затем, после смешивания, рН доводят до уровня менее 3,9 или более 5,6.

11. Способ по п.10, в котором один или несколько других компонентов выбирают из группы, состоящей из наполнителей, красителей, модификаторов рН, растворителей, полимеров и загустителей.

12. Способ по п.10 или 11, включающий добавление водорастворимой соли катиона многовалентного металла, выбранного из Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ca^{2+} и их комбинаций.

