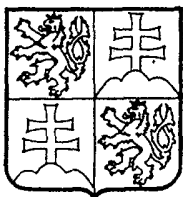


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

269 834

(21) PV 759-87.S
(22) Přihlášeno 05 02 87

(40) Zveřejněno 13 10 89
(45) Vydáno 15 07 91

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl.⁴
A 23 J 7/00

(75) Autor vynálezu

RANNÝ MOJMÍR ing. CSc.,
MUSIL JAN prof. MUDr. RNDr. DrSc.,
SEDLÁČEK JIŘÍ ing. CSc.,
SOUČEK JIŘÍ ing. CSc., PRAHA

(54)

Fosfolipoproteiny a způsob jejich výroby

(57) Fosfolipoproteiny jsou nové komplexy obsahující kyselé fosfolipidy a peptidy nebo bílkoviny v hmotnostním poměru 1 až 50 : 99 až 50. Peptidy musejí obsahovat nejméně dva aminokyselinové zbytky, z nichž aspoň jeden je tvořen bazickou aminokyselinou. Získávají se smísením kyselých fosfolipidů s peptidy nebo bílkovinami za intenzivního míchání při 10 až 100 °C. Fosfolipoproteiny najdou uplatnění jako nové biologické faktory v lékařství, kosmetice, v potravinářském průmyslu a v zemědělství.

Vynález se týká fosfolipoproteinů, obsahujících kyselé fosfolipidy komplexně vázané na peptidy nebo proteiny a způsobu jejich výroby.

Fosfolipoproteiny jsou nové biologické faktory, k jejichž přípravě lze použít fosfolipidy získané známými izolačními a syntetickými postupy. Pro průmyslovou přípravu jsou vhodné zejména směsi fosfatidových kyselin a bis/diacylglycerol/fosforečných kyselin a jejich lysoderivátů, které se připravují fosforylací směsi parciálních acylglycerolů, například postupem podle čs. autorského osvědčení č. 173 220, čs. autorského osvědčení č. 203 421, čs. autorského osvědčení č. 256 691 a čs. autorského osvědčení č. 259 440.

Komplexy, které vznikají interakcí bílkovin s fosfolipidy, se vyskytují ve všech živých objektech, kde plní řadu funkcí, z nichž nejdůležitější je funkce strukturální /biomembrány/ a transportní /přenášecí látek přes membrány nebo lipoproteiny/. V biologických membránách se komplexy tvoří na fázovém rozhraní lipidové dvojvrstvy s integrálními a periferními proteiny. Z hlediska struktury vzniklých komplexů s integrálními bílkovinami jde o útvary, kde vazba obou složek je zprostředkována především hydrofobními interakcemi mezi uhlovodíkovými řetězci acylových skupin fosfolipidů a lipofilními částmi aminokyselin v polypeptidových molekulách, jako jsou aromatická jádra v tryptofanu, tyrosinu a fenylalaninu a alifatické, popřípadě rozvětvené řetězce leucinu, isoleucinu a valinu. Periferní bílkoviny, které jsou lokalizovány na povrchu membrán jsou na něj vázány polárními vazbami a většinou také vodíkovými vazbami. I tyto vazby jsou relativně slabé, protože periferní bílkoviny lze z povrchu snadno uvolnit, například účinkem zředěných roztoků neutrálních solí. Počet molekul fosfolipidů vázaných na molekulu bílkoviny závisí jak na velikosti molekuly integrálního proteinu, tak i na složení a struktuře jeho povrchu, který je ve styku s lipidovou dvojvrstvou. Fosfolipidy vázané na bílkovinnou molekulu se neustále vyměňují rychlostí, srovnatelnou s rychlostí laterální difúze těchto molekul v prostoru membrány a jejich složení významně ovlivňuje funkci daného komplexu. Lipoproteiny, které jsou nejvýznamnější transportní formou lipidů krevní plazmy jsou, podobně jako biomembrány, tvořeny jádrem /s obsahem triacylglycerolů a esterů cholesterolu/ a dále pláštěm tvořeným fosfolipidovou vrstvou, na které jsou vázány speciální proteinové molekuly, tzv. apoproteiny. Také zde se vazba realizuje především hydrofobními interakcemi mezi hydrofobními řetězci fosfolipidů a hydrofobními postranními řetězci apolipoproteinů /o jejichž struktuře se říká, že je amfifilní/. Hydrofilní postranní řetězce apoproteinů vyčnívají do vodné fáze a umožňují transport lipidů v krevní plazmě. Vazba všech složek v lipoproteinových částicích je poměrně volná, protože při pohybu lipoproteinů v krevní plazmě se jednotlivé molekuly apoproteinů, ale i lipidů, snadno vyměňují za jiné. Existence shora popsaných komplexů fosfolipoproteinů v biomembránách i v lipoproteinech byla odvozena především z fyzikálních vlastností nativních systémů. Pokud je nám známo, takové komplexy nebyly, vzhledem k jejich malé stabilitě, zatím izolovány. Interakce lipidů s peptidy a bílkovinami se významně uplatňují i při některých jiných fyziologických dějích, například při myelinizaci nervových vláken, kdy se uskutečňuje mimo jiné vazba lysofosfatidylcholinu na základní protein myelinu, dále při tvorbě antiatřelektaktického lipoproteinu, který vystýlá vnitřní povrch plicních alveolů a při vzniku ionoforů, komplexů lipidů s nižšími peptidy, které umožňují transport iontů přes membrány a podobně. V posledních letech je také věnována pozornost významu interakce lipidů a proteinů v potravinách, kde se vzniku komplexu přisuzuje významná úloha při trávení a při resorpci živin ze zažívacího traktu. V této souvislosti byly především studovány interakce neutrálních /amfifilních/ fosfolipidů /fosfatidylcholinu, lysofosfatidylcholinu/ s některými potravinářskými bílkovinami a jejich frakcemi, zejména s mléčnými a sójovými bílkovinami. Také z těchto prací vyplývá, že při vzniku komplexů se uplatňují převážně hydrofobní interakce mezi acylovými řetězci fosfolipidů a hydrofobními skupinami bílkoviny a že polární část fosfolipidů zůstává relativně volná. Jinými slovy řečeno, izolace těchto komplexů pro praktické využití jako biologických faktorů v lékařství a ve výživě by byla, vzhledem k jejich malé chemické

a fyzikální stabilitě jen obtížně realizovatelná. Dosvědčuje to ostatně i skutečnost, že komplexy tohoto typu se zatím nikde neobjevily na trhu.

Pro průmyslovou výrobu a pro aplikace jako biologické faktory v lékařství, potravinářském průmyslu a ve výživě zvířat jsou podle vynálezu vhodné fosfolipoproteiny charakterizované tím, že obsahují kyselé fosfolipidy a peptidy nebo bílkoviny v hmotnostním poměru 1 až 50 : 99 až 50. Jako kyselé fosfolipidy lze použít přírodní nebo syntetické glycerolfosfolipidy nebo sfingofosfolipidy, obsahující aspoň jednu volnou kyselou fosfatovou nebo karboxylovou skupinu schopnou interakce s bazickými skupinami peptidů nebo bílkovin. Patří sem mimo jiné zejména kyseliny fosfatidové, bis/diacylglycerol/fosforečná, plasmanová, plasménová a fosfatidylglycerolfosforečná, dále fosfatidylglycerol, difosfatidylglycerol, fosfatidylserin, fosfatidylinositol nebo jejich lysoderiváty, dále kyseliny ceramidfosforečná, ceramidfosfoinositol, ceramidfosfoserin nebo jejich směsi s neutrálními fosfolipidy.

Jako peptidy se hodí nízkomolekulové i vysokomolekulové peptidy, obsahující nejméně dva aminokyselinové zbytky /dipeptid/, z nichž aspoň jeden je tvořen bazickou aminokyselinou, jako arginin, lysin, histidin nebo ornithin. Lze je připravit buď izolací z přírodních materiálů, nebo vhodnými metodami chemické syntézy a biosyntézy.

Bílkovinná složka ve fosfolipoproteinech může být tvořena jakoukoliv bílkovinou rostlinného, mikrobiálního nebo živočišného původu nebo připravená synteticky /čistě chemicky nebo biochemicky/, nativní nebo denaturovanou, která nese ve svých postranních řetězcích bazické skupiny schopné vázat fosfatové nebo karboxylové anionty. Mohou to být mimo jiné například proteinové koncentráty ze sóje, řepky, brambor, řas, z listů rostlin a stromů, z kvasinek, z mléka, kostí, z kůže, z krve a krevní plazmy, z vaječného bílku a žloutku nebo jejich směsi.

Fosfolipoproteiny podle vynálezu lze připravit intenzivním mícháním obou složek za teplot 10 až 100 °C. Fosfolipidy, které jsou za dané teploty tekuté, lze míchat s práškovými peptidy a bílkovinami, přičemž se reakce urychluje přidávkou malého množství vody. Tuhé fosfolipidy lze předem rozpustit ve vhodných organických rozpouštědlech, například alifatických uhlovodících, v chlorovaných a fluorovaných uhlovodících, v diethyletheru a vyšemolekulových etherech, v nižších alkoholech aj. Přebytečné rozpouštědlo se po reakci odstraní odpařením. Reakci mezi kyselými fosfolipidy a peptidy nebo bílkovinami lze uskutečnit i rozptýlením fosfolipidů ve vhodných roztocích bílkovin a odpařením vody ve vhodném zařízení za zvýšené teploty, popřípadě i sníženého tlaku.

Fosfolipidy jsou ve fosfolipoproteinech, připravených podle vynálezu, vázány nejen běžnými hydrofobními interakcemi a vodíkovými vazbami, ale prostřednictvím svých fosfatových a volných karboxylových skupin i pevnějšími elektrostatickými vazbami na bazické skupiny lysinu, histidinu, argininu v postranních řetězcích peptidů a proteinů. Vznik této vazby, ať již H-vazebného iontového páru bez přenosu protonu nebo iontové vazby, vyplývá mimo jiné i ze zřetelné změny pH reaguujícího systému.

Vazbou fosfolipidů na peptidy nebo bílkoviny se výrazně změní jejich rozpustnost ve vodě i v organických rozpouštědlech. Většina fosfolipoproteinů je na rozdíl od výchozích fosfolipidů dobře rozpustná nebo dispergovatelná ve vodě a chová se - podle poměru mezi fosfolipidem a peptidem nebo proteinem - jako typická povrchově aktivní látka, vytvářející s hydrofobními oleji emulze typu olej ve vodě nebo voda v oleji. Přítomnost vyšemolekulové peptidové nebo proteinové složky zaručuje dobrou stabilitu vzniklých emulzí nebo disperzí.

Příklad 1

85 kg práškového sójového koncentrátu obsahujícího 72 % hmot. proteinů bylo smícháno v uzavřeném homogenizátoru, napojeném na chlazený kondenzátor s disperzí 15 kg kyselých amonných solí fosfatidových a bis/diacylglycerol/fosforečných kyselin v 100 kg

n-hexanu. Kyselé soli byly vyrobeny fosforylací diacylglycerolů ze slunečnicového oleje a parciální neutralizací plynným amoniakem a obsahovaly 40 % hmot. fosfatidových kyselin, 15 % hmot. bis/diacylglycerol/fosforečných kyselin, 6 % hmot. jejich lysoderivátů, 1 % mastných kyselin, 2 % hmot. diacylglycerolů a 36 % hmot. triacylglycerolů. Po přidání 2 kg vody byla reakční směs 2 hodiny míchána při 40 až 55 °C za sníženého tlaku. Získaný fosfolipoprotein byl upraven na prášek v síťovém mlýnu a byl použit jako nutriční faktor v dietetických přípravcích pro sportovce. Obsahoval komplex fosfolipidů a bílkovin v hmotnostním poměru 25 : 75.

Příklad 2

1 kg lyofilizovaného lidského serralbuminu reagovalo s disperzí 10 kg syntetické 1-hexadecyl-2-lyso-sn-glycerol-3-fosforečné kyseliny /1-hexadecyl-2-lyso-plasmanové kyseliny/ v 200 ml diethyletheru a 20 ml vody. Po 30 minutách míchání byl diethylether oddestilován za sníženého tlaku při 30 °C a takto získaný práškový fosfolipoprotein byl sušen v tenké vrstvě ve vakuové sušárně po dobu 2 hodin při 30 °C. Přípravek obsahoval komplex fosfolipidů a bílkovin v hmotnostním poměru 1 : 99 a byl zkoušen jako modifikátor maligních transformací a růstu buněk.

Příklad 3

10 kg ultrafiltrátu sérových mléčných bílkovin s obsahem 65 % hmot. proteinů bylo rozptýleno v disperzi 7 kg fosfatidylcholinové frakce sójového lecithinu v 30 litrech n-hexanu a po 20 minutách míchání bylo rozpouštědlo odpařeno při 40 °C za sníženého tlaku. Bylo získáno 16,5 kg komplexu obsahujícího fosfolipid a bílkovinu v hmotnostním poměru 50 : 50.

Příklad 4

90 kg bílkoviny z brambor /85 % hmot. proteinu/ bylo v temperovaném homogenizátoru při 80 °C smícháno s 10 kg směsí fosfatidových a bis/diacylglycerol/fosforečných kyselin, získaných fosforylací diacylglycerolů z řepkového oleje s nízkým obsahem kyseliny erukové. Fosfolipidová směs obsahovala 60 % hmot. fosfatidové kyseliny, 10 % hmot. kyseliny bis/diacylglycerol/fosforečné, 15 % hmot. jejich lysoderivátů, 4 % hmot. mastné kyseliny a 11 % hmot. triacylglycerolů. Po 2 hod. míchání, když původně kyselé směs přešla na neutrální, byly získané fosfolipoproteiny prosety v síťovém mlýnu a použity jako nutriční faktory při výrobě dietetického pečiva a jako emulgátory v emulgovaných tucích. Hmotnostní poměr mezi fosfolipidy a proteiny byl v tomto komplexu 16 : 84.

Příklad 5

V 1 kg tekutých vaječných bílků s obsahem 10,5 % hmot. bílkovin bylo dispergováno 10 g sójového lecithinu, získané chromatografií lecithinu na sloupci oxidu hlinitého. Kysele reagující frakce obsahovala 64 % hmot. fosfatidylinositu, 12 % hmot. fosfatidylserinu, 10 % hmot. fosfatidylethanolaminu, 5 % hmot. fytoglykolipidů, 4 % hmot. fosfatidylcholesterolu, 1 % hmot. lysofosfatidylcholesterolu, 3 % hmot. fosfatidové kyseliny a 1 % hmot. mastných kyselin. Po 10 minutách míchání při 25 °C byla získaná emulze práškována v proudě horkého vzduchu v rozprašovací sušárně. Finální práškové fosfolipoproteiny byly použity jako nutriční faktor a emulgátor v enterální výživě. Obsahovaly fosfolipidy a bílkoviny v hmotnostním poměru 9 : 91.

Příklad 6

Ke 500 mg vodného roztoku /4%/ nonapeptidu bradykinu bylo při 40 °C přimícháno 100 mg 1% disperze 1,2-dioleyl-sn-glycerol-3-fosfátu /fosfatidové kyseliny/, připravené reakcí 1,2-sn-dioleylglycerolu oxychloridem fosforečným. Po 5 minutách míchání se

původně kyselá reakce směsi změnila na neutrální. Získaný roztok fosfolipoproteinů byl použit jako biologicky aktivní látka při studiu experimentálních zánětů. Hmotnostní poměr mezi kyselým fosfolipidem a peptidem byl 5 : 95.

Fosfolipoproteiny jsou nové látky, jejichž uplatnění v lékařství, v potravinářském průmyslu, v zemědělství, popřípadě i v jiných oborech si vyžádá ještě značnou výzkumnou práci. Podle zatím získaných výsledků lze počítat s jejich využitím pro přípravu disperzních enterálních dietních směsí pro aplikaci v medicíně, které se zavádějí jako plnohodnotný doplněk parenterální výživy. V dermatologii se pravděpodobně uplatní především komplexy s albuminy a kolageny jako přísady do krémů a lotionů a jako farmaka pro léčení ran a popálenin. V humánní výživě je lze aplikovat jako aditiva s vysokou nutriční hodnotou do nových typů dietetik a směsí s roborujícím účinkem, zejména pro sportovce, rekonvalescenty, nemocné se zhoubnými nádory jakož i pro fyziologicky stárnoucí populaci. Dále jako netoxické emulgátory a stabilizátory do speciálních potravinářských emulzí a jako dispergátory tuku v masných výrobcích a podobně.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Fosfolipoproteiny složené z kyselých přírodních nebo syntetických glycerofosfolipidů a bílkovin rostlinného, mikrobiálního nebo živočišného původu, vyznačující se tím, že obsahují kyselé fosfolipidy a peptidy nebo bílkoviny v hmotnostním poměru 1 až 50 : 99 až 50.
2. Fosfolipoproteiny podle bodu 1, vyznačující se tím, že peptidy obsahují alespoň dva aminokyselinové zbytky, z nichž aspoň jeden je tvořen basicickou aminokyselinou, jako je arginin, lisin, histidin nebo ornithin.
3. Způsob výroby fosfolipoproteinů podle bodů 1 a 2, vyznačující se tím, že se při teplotě 10 až 100 °C smísí za intenzivního míchání kyselé fosfolipidy nebo jejich roztoky v organických rozpouštědlech nebo jejich disperze ve vodě s práškovými peptidy nebo bílkovinami nebo s vodnými roztoky peptidů nebo bílkovin a po ukončení reakce se přebytečná voda odstraní odpařením nebo azeotropickou destilací.