

PATENTOVÝ SPIS

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2001-474**
(22) Přihlášeno: **10.08.1999**
(30) Právo přednosti: **13.08.1998 SK 1098/1998**
(40) Zveřejněno: **11.07.2001**
(**Věstník č. 7/2001**)
(47) Uděleno: **05.10.2011**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **16.11.2011**
(**Věstník č. 46/2011**)
(86) PCT číslo: **PCT/SK1999/000013**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 2000/009616**

(11) Číslo dokumentu:

302 799

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

C09B 61/00 (2006.01)
C09B 67/54 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 39/06 (2006.01)
A61P 31/18 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:

CN 1 059 540 A; WO 97/34011 A; WO 97/34010 A; RU 2 116 036 A; RU 2 083 214 A; JP 4 175 377 A; JP 8 012 557 A.

(73) Majitel patentu:

KERESTĚŠ Ján Jr., Považská Bystrica, SK
KERESTĚŠ Ján, Považská Bystrica, SK

(72) Původce:

Kerestěš Ján Jr., Považská Bystrica, SK
Kerestěš Ján, Považská Bystrica, SK
Venger Ljubov Andrejevna, Považská Bystrica, SK

(74) Zástupce:

Ing. Josef Smola, Mendlovo nám. 1a, Brno, 60300

(54) Název vynálezu:

**Biologicky účinná frakce rostlinného melaninu,
způsob její výroby a její použití**

(57) Anotace:

Frakce rostlinného melaninu sestávající se z monomerních jednotek rostlinných flavonoidů, především katechinů a leukoantokyanidinů, se sumárním empirickým vzorcem H-formy $[C_{34-59}O_{14-23}H_{32-44}N_{6-8}]_n$ kde $n = 6$ až 8, s molekulovou hmotností $(5 \pm 1) \cdot 10^3$, s množstvím -OH skupin 4,02 až 4,05 % hmotn., s množstvím =O skupin 1,04 až 1,06 % hmotn., s obsahem jednotlivých prvků v % hmotn.: C 49,44 až 49,52; H 5,10 až 5,73; N 1,15 až 1,24; O 41,20 až 42,10; s koncentrací nespárovaných elektronů 1018 až 1022 spin/g a jasnými spektrálními čarami v oblastech 3433, 1620, 1400 a 1200 až 1100 cm^{-1} . Způsob výroby frakce rostlinného melaninu spočívá v tom, že na rostlinnou surovinu, která obsahuje nativní polymer a/nebo základní stavební jednotky, jako katechiny a leukoantokyanidiny, se působí 0,05 až 0,3 M vodným roztokem hydroxidu alkalického kovu při teplotě 15 až 75 °C, pH extraktu se upraví na hodnotu 1 až 2 přidávkem anorganické kyseliny na bázi chlórů, přičemž vyloučený sediment se vyčistí a následně vysuší při teplotě 100 až 110 °C.

CZ 302799 B6

Biologicky účinná frakce rostlinného melaninu, způsob její výroby a její použitíOblast techniky

5

Vynález se týká melaninů, vhodných pro použití v potravinářském a farmaceutickém průmyslu, lékařství a elektronice.

10

Vynález se týká také způsobu výroby úzkomolekulové frakce melaninu (tedy melaninu s úzkým rozmezím molekulové hmotnosti) ze surovin rostlinného původu tzv. fytomelaninu, který má definované a reprodukovatelné fyzikálně-chemické vlastnosti a vyšší biologickou aktivitu než známé popsané rostlinné melaniny, a který je vhodný pro praktické použití v průmyslu a ve farmakologii.

15

Dosavadní stav techniky

20

25

30

35

40

45

50

55

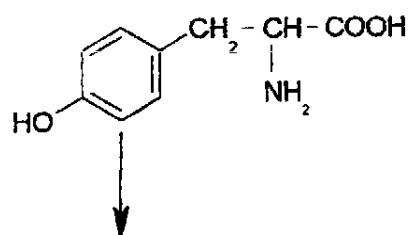
Melaniny – všeobecný název pro skupiny vysokomolekulárních černých a hnědých pigmentů, vznikajících při oxidaci a polymerizaci fenolů. Melaniny se běžně nachází v přírodě a jsou jedním z nejčastějších zoochromů. Nacházejí se ve vlasech, očích, kůži, ve vnitřních orgánech, jsou často lokalizované v podstatě v povrchových částech organismů. Dále se nachází v tmavých semenech, bobulích, lístcích květů, rostlin. Opálení člověka, kůže černochů a mnohé druhy živočichů vděčí svému zbarvení především melaninům jak je uvedeno například v Nicolaus R.A.: Melanins, Paris–Hermann 1968, strana 310; Ljach S.P., Ruban R.D.: Mikrobnie melaniny. Moskva. Nauka 1972, s. 184 a Bidzilja N.I.: Svobodnye radikaly v oblucennych rastenijach i semenach. Kiev. Naukova dumka 1972, strana 210. Samotný termín „melanin“ vznikl z řeckého slova a označoval význam „černý“. Melaniny jsou unikátní biopolymery, mající v živém organismu především funkci ochrany proti UV–záření, ionizační radiaci, vysokým a nízkým teplotám. V poslední době se melaninogeneze představovala jako komplexní adaptace živých organismů na hranicích adaptability života. Je možné najít unikátní příklady rezistence živých organismů k geofyzikálním a geochemickým faktorům v extrémních situacích. Jsou to především vysoce položené oblasti, kde ve výšce 4 až 5 km houby s černým pigmentem představují jedinou mikrofloru, a také horké písečné a chladné kamenité pouště některých regionů [Ljach S.P.: Mikrobnij melaninogenez i ego funkci. Moskva, Nauka 1981, 274s; Ostrovskaja M., Doncov A.: Fyziologičeskyje funkci melanina v organizme. Fyziologija čelověka 1985, strany 670 až 679.]. Známe jsou také organismy, stabilní při ozáření subletálními dávkami řádu 900 Krad. Se ztrátou pigmentu klesá také inertnost k γ –záření. Nesmírně zajímavou představou jsou otázky týkající se melaninů z paleobiologického hlediska. Spory hub s vysokým obsahem melaninu se neobyčejně často objevují ve velkých množstvích ve vrstvách ze začátku „křídý“, kdy bylo prokázáno vymření mnohých druhů zvířat a rostlin. Tato perioda je shodná s periodou přechodu Země přes „magnetickou nulu“, a tak také její neschopnosti ochrany před kosmickou radiací [Bidzilja N.I.: Svobodnye radikaly v oblucennych rastenijach i semenach, Kiev. Naukova dumka 1972, strana 210; Ljach S.P.: Mikrobnij melaninogenez i ego funkci. Moskva, Nauka 1981, strana 274; Ostrovskaja M., Doncov A.: Fyziologičeskyje funkci melanina v organizme. Fyziologija čelověka 1985, strany 670 až 679.]. Takže existuje také vědecky podložený základ myšlenky, že melaniny byly ten „blahorodný“ materiál, který posloužil při chemické evoluci některých polymerních předbiologických struktur. Možnost výše uvedeného je daná charakterem samotného procesu syntézy těchto látek a také vlastností současných melaninů. Velkou pozornost si především zasluhuje lehkost, s jakou se tyto pigmenty syntetizují při modelování podmínek, které, jak se předpokládá, existovaly na Zemi v periodě vzniku složitých látek z aromatických struktur [Blois M.S.: Proischozhdenije predbiologičeskych systém. Moskva, Mir 1966, strana 464; Pavlovskaja T.E.: Abiogeneze i nacalnyje stadii evolucii žizni. Moskva, Nauka 1968, strana 216; Blois M.S.: The melanins, their synthesis and structure. Photochem and Photobiol. Rev. 1978 roč. 3, strana 151; Swan G.A.: Current knowledge of melanin structure. Pigment cell. roč. 1. Basel: Harger 1973, strana 151.].

Klasifikace melaninů

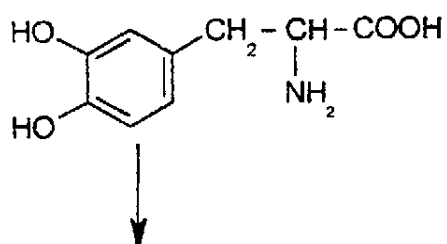
- Melaniny, v závislosti na biologických objektech, které je syntetizují, se rozdělují na tři základní skupiny: mikrobiální, živočišné a rostlinné. Existují také syntetické melaniny, které vznikají autooxidací 3,4-dioxidifenylationinu (DOPA-melanin) jak uvádějí například Mason H.S.: In *Pigment Cell Growth*, Acad. Press Inc., N.Y. 1953, strana 235, Peers E.: *Histochemistry*. Moscow, IL 1962, strana 640, Keretz D.: *Ann. intab. dermatol. din. sperimentale* 1961, strana 268 a Thomas M.: *Modern methods of plant analysis*. Springer-Verlag. 1953, 4. strana 661. S mikrobiálními melaniny se setkáváme pouze u některých mikroorganismů patřících především k rodům: *Bacillus*, *Pseudomonas* a *Azotobacter*. Jsou to černé a hnědé, někdy červeno-hnědé pigmenty, všeobecně nerozpustné v organických rozpouštědlech, rozpustné v zásadách s nespecifickými spektrálními charakteristikami. Mnohé skutečnosti dokazují, že se jedná o oxidační procesy, které jsou základem při vzniku bakteriálních melaninů. Pozornost si vyžaduje ten fakt, že absolutní většina mikroorganismů syntetizujících tyto pigmenty patří k aerobním formám. Živočišné melaniny se lokalizují v povrchových tkáních – kůži, vlasech, srsti, peří a sítnici očí. Rostlinné melaniny jsou popsány velmi málo. Je známo, že se nachází v povrchových tkáních některých semen a plodů. Dosud jsou známy a popsány tři způsoby izolace melaninů rostlinného původu, a to fytomelaninu z *Vitis Vinifera* L. Tyto preparáty jsou však sumárními produkty se širokým spektrem fyzikálně-chemických vlastností, což má za následek, že není možné použít tento produkt za základ léčiva, jak je uvedeno v Zharebin J.L. a kol.: *Sposob polučeniya vodorostvorimogo melanina*. t.A.S.SSSR patent.N.939446. 1983, Sendega R.V., Venger L.A., Baklanova L.V.: *Sposob polučeniya enomelanina*. Patent A.S.SSSR N. 1345606. 1987 a Godzenko A.I. a kol.: *Sposob polučeniya enomelanina*. Patent RU 07,09,93. bl.N.33–36. Mezi melaniny je nejvíce popsán a známý tzv. syntetický melanin, a nebo také DOPA-melanin, který vzniká autooxidací 3,4-dioxyfenylationinu (DOPA). Oxidace DOPA probíhá takovým způsobem a takovými stadii, jako fermentativní autooxidace tyrozinu v živých organizmech, jejímž výsledkem je vznik živočišných a mikrobiálních melaninů. Schéma tohoto procesu je uvedeno v Villet Claude A., Dethier Vincent G.: *Biological principles and processes*. Philadelphia–London–Toronto. 1971, strana 822 a Brechtlová, Halčák, Chandoga a kol.: *Lekárska biochémia I.*, Asklepios. 1992, strana 228.

Schéma:

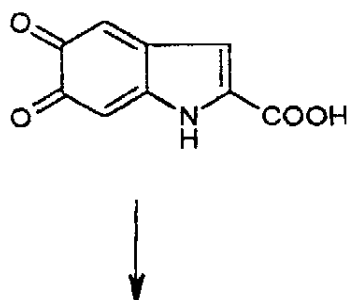
TYROSIN



3,4-DIHYDROXYPHENYLALANIN (DOPA)



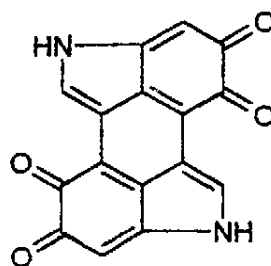
DOPACHROM



1

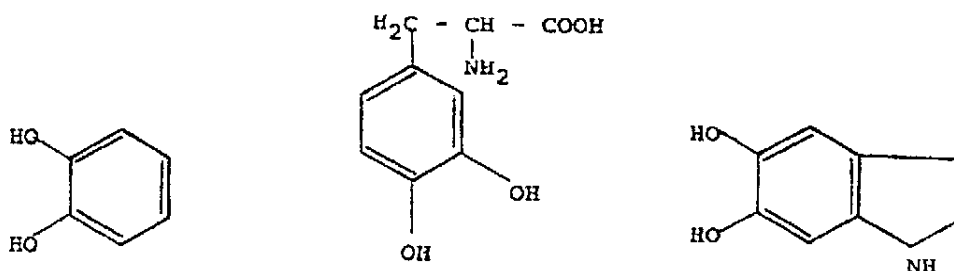
INDOLCHINON

MELANIN



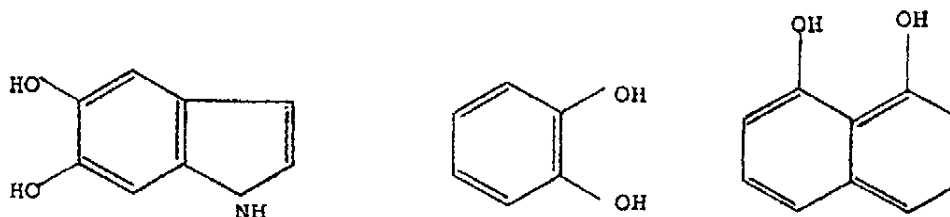
Chemická struktura a melaninogeneze

Chemická struktura přírodních melaninů není dodnes známá. Melaniny mají velice složitou polymerní strukturu a vykazují typovou různorodost, takže nemůžeme získat vyčerpávající popis struktury dokonce ani u těch pigmentů, které byly několik roků předmětem studia. V současnosti neexistuje dokonce ani jednotný názor na to, které sloučeniny odpovídají pojmu „melanin“. Mason popisuje melaniny jako vysokomolekulární polymery, které vznikají při enzymatické oxidaci fenolů, především pyrokatecholu, 3,4-dihydroxyfenylalaninu (DOPA) (Ia) a 5,6-dihydroxyindolu. [Mason H.S.: In Pigment Cell Growth, Acad. Press Inc., N.Y. 1953, strana 235].



(Ia)

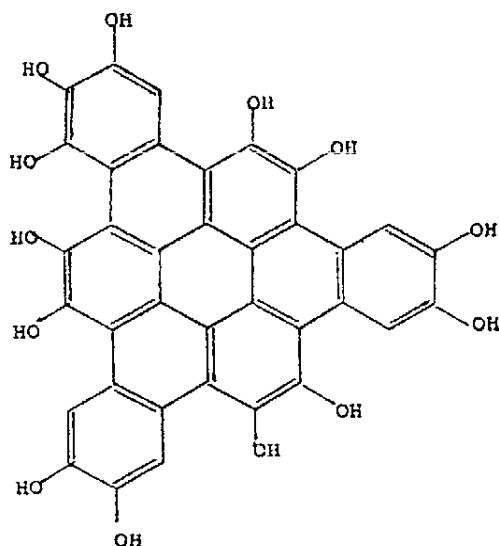
Podobný výrok napsal Nicolaus: „Přírodní melaniny jsou složité makromolekuly, které vznikají při enzymatické oxidaci orto-difenolů, většinou nenahrazených, takových jako 5,6-dihydroxyindol, pyrokatechinol a 1,8-dihydroxynaftalen“ [Nicolaus R.A.: Melanins, Paris-Hermann 1968, strana 310.].



(Ib)

Peers a Keretz popisují melaninové pigmenty, vznikající při oxidaci aromatických aminokyselin: tyrozinu a dihydroxyfenylalaninu [Peers E.: Hystochemistry. Moscow, IL 1962, 640s; Keretz D.: Ann.intab.dermatol,din.esperimentele 1961, strana 268.]. Thomas navrhuje považovat za melanin pouze dusík obsahující pigmenty, to je deriváty 5,6-dihydroxyindolu, který se nachází v oxidovaném nebo redukováném stavu [Thomas M.: Modern methods of plant analysys Springer-Verlag. 1953, 4. strana 661.].

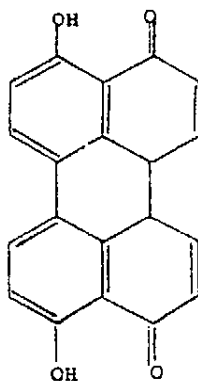
V současnosti existují dvě základní teorie vzniku a struktury zumelaninů. První pojednává o tom, že zumelaniny jsou v podstatě homopolymery indol-5,6-chinonu [Pulman B., Pulman A.: Kvantovaja biochemia. Moskva, Mir 1965, strana 654.]. Druhá, Nicolausova interpretace, vyplývá z množství experimentů uskutečňovaných na základě předpokladu, že v mechanismu melanogeneze probíhá polymerizace volných radikálů různých monomerů. Polyfunkčnost monomerů a nepřítomnost strohé stavby vazeb mezi radikály vede k syntéze polymerů s nerovnoměrným obsahem a organizační strukturou, což nakonec přispělo k názoru, že v přírodě pravděpodobně neexistují dva absolutně shodné melaninové pigmenty [Nicolaus R.A.: Melanins, Paris-Hermann 1968, strana 310.]. Proto je melanin trojrozměrný polymer, jehož počet možných struktur se rovná množství druhů molekul melaninu v přírodě. Po dlouhou dobu se za základní model považoval pigment spór houby *Ustilago maydis*. Je to prakticky jediný melanin (mikrobiální), jehož struktura je všeobecně přezkoumaná a potvrzená. (Vzorec IIa)



(IIa)

5 Nicolaus usuzuje, že při polymerizaci pyrokatechinolu na melanin vznikají složité cyklické struktury s kondenzovanými kruhy, které jsou přítomny v různých stupních oxidace [Nicolaus R.A.: Melanins, Paris-Hermann 1968, strana 310; Ljach S.P., Ruban R.D.: Mikrobnye melaniny. Moskva. Nauka 1972, strana 184.].

10 Druhým, v podstatě prozkoumaným melaninem je černý pigment, který vzniká ve zralých spórách houby *Aspergillus niger*. Patří do skupiny tzv. alomelaninů a nazývá se *Aspergillus niger*-melanin. [Nicolaus R.A.: Melanins, Paris-Hermann 1968, strana 310; Blois M.S.: Proischozdeniye predbiologičeskych system. Moskva, Mir 1966, strana 464.] (Vzorec IIb)



(IIb)

15 V současnosti je možné předpokládat, že základ melaninogeneze v živých organizmech je proces založený na fermentační oxidaci tyrozinu přes DOPA v přítomnosti tyrozinázy na dopachinon, z kterého množstvím oxidací, dekarboxylací a konjugací vzniká pigment. To je „klasická cesta“.

16 Stejně tak ale někdy syntéza probíhá odlišnou cestou a melanogenem může být nejen tyrozin, ale také jiné fenoly, například pyrokatechinol. Ale přesto je třeba připomenout, že geneticky podmíněná schopnost vytvářet tyrozinázu a melaninové pigmenty v živých organizmech je celkově
20 vysoce stabilní [Brechtlová, Halčák, Chandoga a kol.: Lekárska biochémia I., Asklepios. 1992, strana 228; Škárka B., Ferencík M.: Biochémia. Bratislava, Vydavateľství Alfa 1992, strana 846.].

Identifikace melaninů

Jednou z příčin nedostatečného prozkoumání melaninů je problematika izolace z biologických objektů, protože tyto pigmenty jsou nerozpustné ve většině známých organických a minerálních rozpouštědel [Nicolaus R.A.: *Melanins*, Paris–Hermann 1968, strana 310; Ljach S.P.: *Mikrobný melaninogenez i ego funkci*. Moskva, Nauka 1981, strana 274; Blois M.S.: *The melanins, their synthesis and structure*. *Photochem and Photobiol. Rev.* 1978 roč. 3, strana 151.]. Kromě toho se melanin nachází v biologických objektech *in vivo* a je pružně navázaný na jiné biopolymery: bílkoviny, polysacharidy, lipidy, ostatní pigmenty a příměsi.

Těžkosti a problémy oddělení (izolace) spočívají také v jejich koloidní podstatě a neschopnosti krystalizovat. To vede k tomu, že existují dvě základní metody izolace melaninových pigmentů.

První skupina metod spočívá nejdříve v extrakci melaninu vhodnými rozpouštědly a potom v odstranění doprovodných příměsí. Jediným, téměř univerzálním rozpouštědlem melaninů jsou 0,5 až 1,0M vodné roztoky zásad NaOH a KOH. Tyto vlastnosti melaninů jsou podmíněny jejich polyfenolovou strukturou. Proto se také zásaditá extrakce používá na izolování z buněk a tkání živočichů, mikrobiálních a některých rostlinných objektů.

Druhá skupina metod extrakce melaninu se představuje jako způsob, při kterém se odstraňují všechny ostatní materiály kromě melaninu. Toto odstranění nepotřebných materiálů se uskutečňuje kyselou hydrolyzou a promýváním vhodnými rozpouštědly až do té doby, dokud nezůstane požadovaný preparát – melanin [Ljach S.P., Ruban R.D.: *Mikrobný melaniny*, Moskva, Nauka 1972, strana 184.].

V důsledku chemické složitosti a různorodosti biologických materiálů a specifických vlastností samotných melaninů není možné navrhnout standardní metodu vhodnou pro všechny druhy přírodních melaninů, je nezbytný individuální přístup. Například, při extrakci *Ustilago maydis* se nechá působit koncentrovaná HCl a potom se postupně různými rozpouštědly odstraňují příměsi. Melaniny některých objektů se izolují v podstatě snadno „měkkými metodami“. Například melanin duhovky býčího oka a nebo melanin z atramentu chobotnice *Sepia officinalis* – sépiomelanin. Tyto preparáty se izolují bez zpracování kyselinou a nebo zásadami, jelikož se nachází v biologickém objektu ve formě sodných solí. Takových příkladů je však velmi málo. Jako základní se používá způsob zásadité extrakce s následným vysrážením kyselinou pro melaniny živočišného, mikrobiálního a také rostlinného původu [Nicolaus R.A.: *Melanins*, Paris–Hermann 1968, strana 310.].

Obsah melaninů v buňkách hub je značně odlišný v širokém rozmezí: od 2 až 3 % hmotn. až do 35 až 40 % hmotn. Obsah melaninu v rostlinných objektech je podstatně nižší, a to od 0,2 do 0,3 % hmotn. až 6 až 8 % hmotn.

Jedním z testů identifikace melaninů jsou VIS–spektra. Melaniny mají jasně spektrální čáry absorpce, jednu v oblasti vlnových délek 1600 až 1700 cm^{-1} , druhou v oblasti 3300 až 3500 cm^{-1} . Tyto spektrální čáry odpovídají karbonylovým skupinám (absorpce v oblasti 1700 cm^{-1}), uhlík–uhlíkovým vazbám (absorpce v oblasti 1600 cm^{-1}), NH_4 a OH–skupinám (absorpce v oblasti 3300 až 3500 cm^{-1}).

Pro melaniny přírodního i syntetického původu je charakteristické UV–spektrum, ve kterém nejsou píky, nemají ani jasná absorpční pásma, hlavně v oblasti krátkých vlnových délek. Podobná charakteristika je patrná také v oblasti viditelné části spektra s nakloněnou diagonálou v hranicích $-0,0019$ až $-0,0040$. Tyto optické charakteristiky jsou pro melaniny typické.

Charakteristické jsou také různé chemické reakce, s jejichž pomocí je možné vyvodit závěr o přítomnosti melaninových monomerů v preparátu:

- a) nerozpustnost ve vodě a většině organických rozpouštědel
- b) úplná rozpustnost v 0,5M NaOH a nebo KOH
- c) vysrážení se z roztoků v přítomnosti FeCl₃
- d) odbarvování při použití silných oxidačních činidel (KMnO₄, H₂O₂)
- 5 e) schopnost regenerovat amoniakální roztok AgNO₃

Nejdůležitější charakteristika melaninových pigmentů je přítomnost paramagnetických center v koncentraci 1015 až 1018 spin/g [Nicolaus R.A.: Melanins, Paris-Hermann 1968, strana 310; Bidzilja N.I.: Svobodnye radikaly v oblucennych rastenijach i semenach. Kiev. Naukova dumka 1972, strana 210; Ostrovskaja M., Doncov A.: Fyziologičeskyje funkcie melanina v organizme. Fyziologia čelověka 1985, strany 670 až 679.].

Z biologické stránky stanovení melaninové podstaty pigmentů obnáší izolování tyrozinázy a jejich substrátů v daných objektech, a také stanovení přímé vazby mezi tyrozinázovou aktivitou a melaninogenezí (pigmentogenezí).

Identifikace melaninu způsobem na základě jednoho – dvou testů je nejednoznačná, je nevyhnutelné použít celý komplex testování.

Přítomnost nezaplněné spodní energetické hladiny v melaninech a jejich schopnost „lovit“ z okolního prostředí nespárované elektrony vede k tomu, že melanin ochraňuje před radiačním zářením pohlcováním nespárovaných elektronů volných radikálů, vznikajících v systémech při účinku ionizující radiace [Bidzilja N.I.: Svobodnye radikaly v oblucennych rastenijach i semenach. Kiev. Naukova dumka 1972, strana 210; Godzenko A.I. a kol.: Sposob polučeniya enomelanina. Patent Ru. 07,09,93. bl.N.33–36.].

V posledních letech byly publikované výsledky experimentálních výzkumů, které potvrdily vlastnost melaninů ochraňovat před radiačním zářením. Přitom, tyto vlastnosti projevují melaniny nejen, když se nachází v objektu, ale také po jejich umělém zavedení do živého organismu [Hill H.Z., Hill G.J.: Eumelanin Causes DNA strand Breaks and kills Cells. – Pigments Cell Research 1, 1987, 163 až 170; Hill H.Z., Peak J.G., Peak M.J.: Introduction of DNA-Protein crosslinks in melanotic cloudman S91 mouse melanoma cells by monochromatic 254 and 405 nm light. Pigment Cell Research 2: 1989, strany 427 až 430; Tsuneaki Chida, Hugh D. Sisler: Effect of inhibitors of melanin biosynthesis on appresorial penetration and reductive reactions in *Pyricularia oryzae* and *Pyricularia grisea*. Pesticide Biochemistry and Physiology 29, 1987, strany 244 až 251; Jacobsohn M.K., Dobre V.C., Branam Ch., Jacobsohn G.M.: Oxidation of 2-hydroxyestradiol and its incorporation into melanin by mushroom tyrosinase. J. Steroid Biochem. Vol. 31, No. 4A, 1988, s. 377 až 385; Giovanni Sichel: Biosynthesis and function of melanins in hepatic pigmentary systém, Pigment Cell Research 1: 250 až 258, 1988.]. Experimenty, prováděné na černých buňkách kvasinek *Nadsomiela nigra* obsahujících melanin ukázaly, že černé buňky jsou podstatně rezistentnější k ozáření než buňky kvasinek, které neobsahovaly melaniny. Při umělém pěstování kvasinek v biologické půdě s obsahem hexachloracetonu, inhibitoru melaninogeneze, byla vypěstována kultura, která úplně ztratila rezistenci k záření [Chruljova I.M.: Issledovaniye struktury i svojstv melanina i ego syntetičeskych analogov. Ref., Moskva 1973, strana 20; Baraboj V.A.: Biologičeskoe dejstvije rastitelnych fenolnych soedinenij. Kiev. Naukova dumka 1976, strana 260; Zherebin J.L. a kol.: Farmakologičeskije svojstva enomelaninovyh pigmentů. Doklady AN SSSR seria B 1984, s. 64 až 68.].

Výsledky praktických pokusů a přehled dostupné literatury dává předpoklad vyvinutí melaninového preparátu sloužícího jako účinná ochrana živých buněk organismů vůči radiaci, vyrobeného na bázi přírodních materiálů a produktů látkové přeměny metabolismu.

Protinádorová aktivita melaninových pigmentů

V současnosti je většina výzkumných pracovníků a vědců názoru, že rakovinná buňka se odlišuje od normální ne tím, že v ní chybí některé specifické látky, ale poměrem komponent biochemických systémů, patřících k normální buňce. Práce N. M. Emanuela a kol. potvrdily, že pro negativní růst je podstatná změna koncentrace volných radikálů v biochemických komponentách buňky, důsledkem je názor, že antioxidanty musí mít vliv na rozvoj těchto procesů.

To byl pro autory základ předpokladu, že tato fyzikálně–chemická vlastnost melaninů, jako je antioxidační aktivita, je důležitý ukazatel procesu buněčného metabolismu. Na tom je založena schopnost fenolových skupin reagovat s volnými radikály – s aktivními centry biochemického systému buňky. Elementární akt spolupůsobení inhibitoru s volným radikálem R vede v systému ke vzniku radikálu inhibitoru, stabilnějšího a méně reaktivního než vlastní radikál R [Chruljova I.M.: Issledovanie struktury i svojstv melanina i ego syntetičeskych analogov. Ref., Moskva 1973, strana 20.].

Tato hypotéza byla potvrzena ve vědeckých pracích. V nich jako předmět výzkumu byl vybrán syntetický, přírodní (živočišný) a biosyntetický melanin. Živočišný melanin byl získán pomocí kyselino–zásadité metody z myšího melanomu Harding–Passa. Biosyntetický melanin se syntetizoval z DOPA v přítomnosti tyrozinázy, izolované z myšího melanomu Harding–Passa [Chruljova I.M., Berlin A.A.: Protivopucholjevaja aktivnost syntetičeskych, biosyntetičeskych i prirodnych melaninů. Izvestija AN SSSR. 1973 č. 3, strany 438 až 442.]. Na základě provedených experimentů bylo dokázáno, že melaniny nejsou karcinogenní a výsledky umožnily potvrdit, že melaniny mají schopnost protinádorové aktivity v dávkách od 150 do 250 mg/kg a dosahují účinku 50 až 60% inhibice růstu nádoru.

Imunogenní aktivita melaninových pigmentů

V současnosti existuje značné množství lékařských preparátů, jako v lékařství nikdy předtím. Téměř vždy, jako pravidlem, se po nějaké době v literatuře objevují články, pojednávající o zvýšené citlivosti k novému preparátu. Objevila se řada pokusů stanovit závislost mezi fyzikálně–chemickými vlastnostmi a imunogenní aktivitou [Vladimirov V.G., Krasilmikov I.J., Arapov O.B.: Radioprotektory. Kiev. Naukova dumka, 1980, s. 264; VIDAL cat. –Lekarstvennyje preparaty v Rosii. Astra–Pharm–Servis, Moskva, 1997, strana 1166.] léčivých sloučenin proto, aby bylo možné předpovídat a posoudit jejich alergenitu. Přesto dodnes není možná aplikace takovýchto pravidel za stavu současných vědeckých poznatků, ale jsou stanovené určité skutečnosti, které je možno shrnout následujícím způsobem.

Imunogenní aktivita antigenu závisí na jeho fyzikálně–chemických vlastnostech a na schopnosti imunizovaného organismu odpovědět na daný antigen. Podle schopnosti indukce imunitní odpovědi je možné antigeny rozdělit na dvě skupiny – slabé a silné. Mezi látkami určité chemické podstaty jsou nejsilnějšími imunogeny bílkoviny, ale také polysacharidy, syntetické polypeptidy a jiné polymery mohou být při určitých podmínkách imunogeny [Koen S., Word P., Mat–Classen R.: Immunology. Moskva Medicina. 1983, strana 400; Allergy i immunopatologija v klinike i experimente, Sborník naučných trudov. Moskva 1988, strana 164; Buc M. a kol.: Klinická imunologia. Bratislava, Veda. 1997, strana 364.]. Dostatečně vysoká molekulová hmotnost je také podmínkou dostačující imunogenity antigenů. Například, pokud je molekulová hmotnost menší než 10 000, je pravidlem, že taková látka je slabě imunogenní.

Většina vysokomolekulárních bílkovin má molekulovou hmotnost větší než 100 000. Se zmenšením rozměrů a molekulové hmotnosti antigenů se ztrácí individualita jejich struktury, snižuje se cizorodost a imunogenní aktivita. Bylo zaznamenáno, že čím složitější je struktura molekuly antigenu, tím víc je imunogenní. Příklad byl ukázán na imunogenitě syntetických polypeptidů. Jestliže byl polypeptid vytvořen z aminokyselinových zbytků jednoho druhu, byl slabě imunogenní. Pokud byl složen ze dvou a nebo tří druhů aminokyselin, tak získával imunogenní vlastnosti. Při-

tomnost aromatických aminokyselin (například tyrozinu) v syntetických polypeptidech zabezpečuje imunogennost molekuly. Ukázalo se, že schopnost vyvolat vznik protilátek patří zejména látkám, které mají povrchově nabitě skupiny.

5 Některé teorie spojují imunitní aktivitu sloučenin také s pevností jejich molekuly. Imunogennost, schopnost indukovat buněčnou a nebo humorální imunitní odpověď, tak do značné míry závisí na druhu a fyzikálně–chemických vlastnostech antigenu, rozměrech jeho molekuly, charakteru a množství i lokalizace antigenních determinant v molekule antigenu.

10 Na základě výše uvedeného a ostatních všeobecných poznatků o vlastnostech živočišných, mikrobiálních, rostlinných a syntetických melaninů, všechny tyto látky vykazují imunogenní aktivitu, a podle všeho je možné je zařadit do skupiny slabých antigenů.

Farmakologické vlastnosti melaninů

15 Při použití melaninů pro farmakologické účely má značný význam jejich rozpustnost. V dosud popsanych pracích se používaly preparáty melaninů ve formě vodných suspenzí a nebo suspenzí ve fyziologickém roztoku, aplikovaly se intramuskulárně, ale prakticky se nikdy nevstřebávaly, a proto měly pouze lokální účinek.

20 Nejúčinnější jsou rozpustné melaniny aplikované perorálně nebo intravenózně. Byly vyrobené podobné preparáty, ale představovaly především pseudoglobulinové melanoproteiny, tj. komplexy chromogenních částí s bílkovinami, které nejsou schopné transportovat elektrony a mají sníženou schopnost obrany před působením radiace a toxických volných radikálů [Buc M. a kol.: Klinická imunologia. Bratislava, Veda. 1997, strana 364; Ferenčík M., Štvrtinová V., Bernadič M., Jakubovský J., Hulín I.: Zápal, horúčka, bolesť. Bratislava, Slovak Academic Press. 1997, strana 216; Mayer V., Hallauer J., Baum M.K.: Ochorenie spôsobené nákazou vírusom HIV/AIDS. Bratislava, Vydavateľstvo Slovenskej Akadémie Vied, 1996, strana 364.].

30 Zájem se soustřeďuje na výzkum farmakologické aktivity (chromogenní) části pigmentu ve vodě rozpustné, extrahované z rostlinných kultur – fytomelaninu.

Melaninové preparáty ve světě

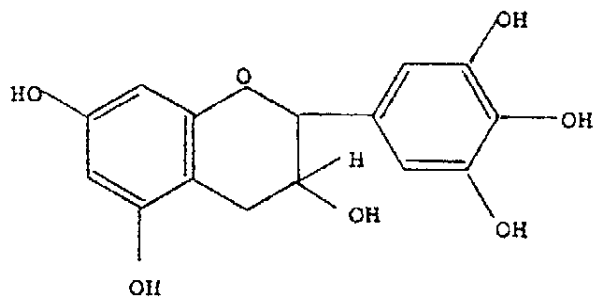
35 V současnosti, především v období posledních 15 let, se soustřeďuje čím dál více pozornosti ve světě melaninům jako perspektivním preparátům pro mnoho oblastí v průmyslu a v lékařství. Melaniny v současnosti vyrábí více společností, nejznámější jsou produkty, které vyrábí a dodává SIGMA CHEMICAL Corp., USA [Sigma Chemical Co.: Biochemikalien und Reagenzien für die Naturwissenschaftliche Forschung. Deutschland, 1997, s. 2736; The Merck Index, An encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals, 12. vydání. Whitehouse Station, NJ. 1996, strana 2668.].

45 Dosud byla osvojená výroba syntetického melaninu (tzv. DOPA–melanin) a sépiomelaninu, izolovaného z atramentové náplně *Sepia officinalis*. Preparáty jsou však především díky exotickým surovinám velmi drahé, v nedostatečném množství, a tak také všeobecně nedostupné pro široké použití. V malých množstvích se na laboratorní bázi vyrábí některé druhy melaninů živočišného a mikrobiálního původu, které ale kvůli značné komplikovanosti výroby a nedostatku základních surovin v současnosti nepředstavují seriózní a levné možnosti k osvojení průmyslové velkovýroby. Výroba melaninů rostlinného původu v chemicky čisté podobě k dnešnímu dni není známá.

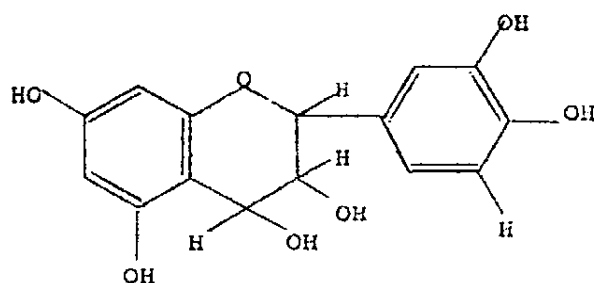
50 Všechny známé procesy jsou založené na izolaci melaninu komplikovanými metodami z biologických struktur, ve kterých se nachází, nebo synteticky, to je autooxidací tyrozinu.

Podstata vynálezu

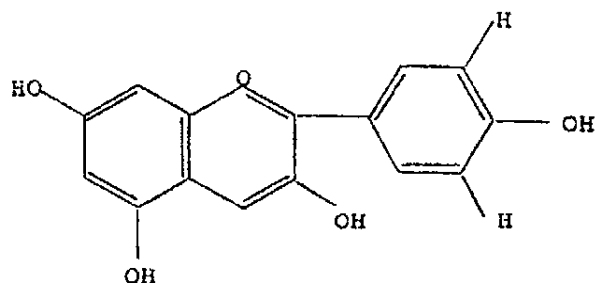
Výše uvedené nedostatky jsou do značné míry odstraněny biologicky účinnou frakcí melaninu podle vynálezu, jehož struktura vzniká jako výsledek polymerizace rostlinných flavonoidů, především katechinů a leukoanto-kyanidinů (III).



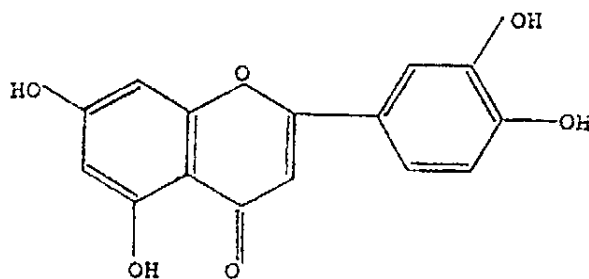
catechin



leukoantokyanidin



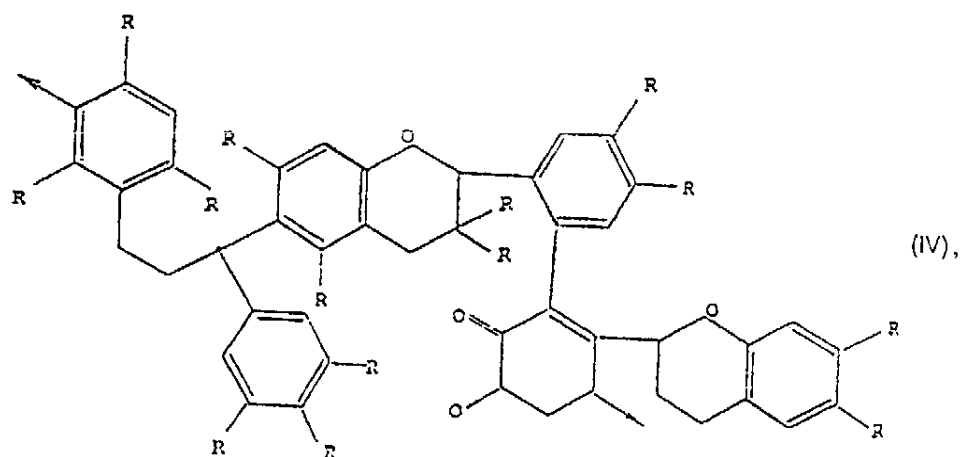
antokyanidin



flavon

(III)

Protože jde o amorfní látku, není možné určit přesnou strukturu. Jako příklad uvádíme jednu z nejpravděpodobnějších struktur vzorce IV, kde šipkami jsou zobrazeny další cesty možné polymerizace.



kde R nezávisle představuje $-\text{OH}$, $-\text{COOH}$ a nebo $-\text{NH}_2$.

5 Základem molekuly fytomelaninu je struktura skládající se z monomerních jednotek rostlinných flavonoidů podle vynálezu, především katechinů a leukoantokyanidinů. Protože samotný proces polymerizace a tím také počet možností vzniku různých struktur je značně velký, limitujícím fak-
torem je v tomto případě molekulová hmotnost $M_h = (5 \pm 1) \cdot 10^3 \text{ Da}$.

10 Empirický vzorec jedné z nejpravděpodobnějších struktur znázorněný vzorcem IV je

$$[\text{C}_{34-59}\text{O}_{14-23}\text{H}_{32-44}\text{N}_{6-8}]_n, \text{ kde } n = 6 \text{ až } 8.$$

V následující tabulce č. 1 jsou uvedené fyzikálně-chemické vlastnosti látky vznikající jako výsledek polymerizace rostlinných flavonoidů podle námi navržené technologie.

15

Tabulka č. 1: Fyzikálně-chemické vlastnosti fytomelaninu

Molekulová hmotnost	$(5 \pm 1) \cdot 10^3 \text{ Da}$
-OH skupiny	4,02 až 4,05 hmotn. %
=O skupiny	1,04 až 1,06 hmotn. %
Obsah jednotlivých prvků (% hmotn.)	
C	49,44 až 49,52
H	5,10 až 5,73
N	1,15 až 1,24
O	41,20 až 42,10
Koncentrace nespárovaných elektronů (spin/g)	$10^{18} \text{ až } 10^{22}$
Spektrum,	3433, 1620, 1400
(cm^{-1})	1200 až 1100

20 „Melaniny rostlinného původu“ je pouze celkový sumární název pro tmavohnědé a černé pigmenty rostlin, které jsou z chemického hlediska produkty oxidace flavan-3,4-diolů. V souvislosti

s tím, že na vlastní reakci oxidační polymerizace má vliv celá řada faktorů, jako například teplota, pH–prostředí, hydromodul, poměr fází, doba reakce, obsah a koncentrace složek a podobně, mohou se její produkty částečně lišit a nemají přesné fyzikálně–chemické charakteristiky, a nebo se také značně odlišují jeden od druhého.

5

Tato struktura je nejpravděpodobnější při dodržení podmínek polymerizace při jejich syntéze z přírodních rostlinných surovin, podrobně popsaných dále, a odpovídajícího technologického postupu. Tyto podmínky prakticky vylučují cestu kondenzace flavonoidů s otevřením pyranového cyklu (schéma K. Freidenberga), ale odpovídající reakci podle schématu D.E. Katueno o spojení molekul „hlava k hlavě“ a „ocas k ocasu“ [Kretovich V.A.: Osnovy biochimii rastenij. Moskva. Vysšaja škola. 1970, strana 540.).

10

Přítom základem molekuly známých melaninů je pyrokatechinolová struktura (vzorec II), která vzniká jako výsledek při otevření pyranového cyklu molekul leukoantokyanidinů a následnou polymerizací vzniklých fragmentů. To je možné vysvětlit „tvrdšími“ podmínkami, přičemž jedna z hlavních příčin je používání vysokých koncentrací zásad 0,25 až 1,20 M, neadekvátních tepelných režimů, použití nedemineralizované vody v průběhu celého procesu nebo pouze částečně. Kromě toho, námi navrhovaná technologie zabezpečuje vznik struktury polymeru s nepříliš velkým stupněm kondenzace ($n = 5$ až 7), což má za následek možnost syntetizovat po chemické stránce homogenní produkt – polymer, fytomelanin, s určitými fyzikálně–chemickými a biologickými charakteristikami a reprodukovatelnými vlastnostmi.

20

Izolace přírodního polymeru z biologických objektů je prakticky nemožná. Zvláště se to týká melaninů rostlinného původu, pro které neexistuje inertní rozpouštědlo. Jedinými rozpouštědly jsou pouze 0,5 až 1,0M vodné roztoky NaOH a nebo KOH. Jinak řečeno, proces rozpouštění není fyzikální proces, ale ve skutečnosti chemická reakce zásady a polymeru, která způsobuje destrukci vlastního nativního biopolymeru. Takovým zásahem se hrubě narušuje chemická podstata, dochází vlastně k rozkladu na jednotlivé fragmenty, které se dále spojují podle některého ze známých schémat oxidační polymerizace. Dalším postupem se odstraňují vzniklé příměsi a jiné produkty reakce.

30

V souvislosti s výše uvedeným, tímto postupem získaný produkt není jeho původní nativní forma, ale syntetický polymer, jenž je také charakterizován vlastnostmi náležejícími původním melaninům a této třídě sloučenin. Tak vlastně můžeme hovořit o syntéze produktu biochemickou cestou na bázi původních rostlinných surovin.

35

Identifikace

Jedním z testů identifikace fytomelaninu jsou VIS–spektra.

40

Jasně spektrální čáry absorpce:

- v oblasti vlnové délky 1600 až 1700 cm^{-1}
- v oblasti 3300 až 3500 cm^{-1}

45

Tyto spektrální čáry odpovídají karbonylovým skupinám (absorpce v oblasti 1700 cm^{-1}), uhlí–uhlíkovým vazbám (absorpce v oblasti 1600 cm^{-1}) (tab. č. 1).

50

- a) nerozpustnost ve vodě a většině organických rozpouštědel
- b) úplná rozpustnost v $0,5\text{M}$ NaOH a nebo KOH
- c) vysrážení z roztoků v přítomnosti FeCl_3
- d) odbarvení při použití silných oxidačních činidel (KMnO_4 , H_2O_2)
- e) schopnost regenerovat amoniakální roztok AgNO_3

Nejdůležitější charakteristika pro fyto melanin je přítomnost paramagnetických center (nespárovaných volných elektronů) v koncentraci 1018 až 1022 spin/g.

- 5 Způsob výroby frakce rostlinného melaninu spočívá v tom, že na rostlinnou surovinu se působí 0,05 až 0,3M vodným roztokem hydroxidu alkalického kovu při teplotě 15 až 75 °C, pH extraktu se upraví na hodnotu 1 až 2, přidavkem anorganické kyseliny na bázi chloru, přičemž vyloučený sediment se vyčistí a následně vysuší při 100 až 110 °C.
- 10 Výhodně se čištění uskutečňuje promýváním roztokem kyseliny na bázi chloru s pH 1,0 až 3, až do dosáhnutí bezbarvé kapaliny nad sedimentem, následným promýváním etanolem a dalšími organickými polárními rozpouštědly. Při všech procesech se používá voda farmakologické kvality.
- 15 Po vysušení se produkt může podrobit ještě dalšímu čištění a aktivuje se semichinonový radikál.

Způsob přípravy látky, jejíž fyzikálně-chemické parametry odpovídají tab. č. 1, spočívá v následujících krocích:

- 20 Izolování sumárního produktu

Základní surovina



Zásaditá reakce



Zásaditý extrakt



filtrace, centrifugace,
sedimentace kyselinou

Sediment fyto melaninu



promývání kyselými vodnými roztoky
a farmakologicky čistou vodou

Sediment fyto melaninu - H-forma

sediment očištěný od příměsí a produktů

degradace nativního pigmentu



promývání etanolem

H-forma fyto melaninu očištěná od forem taninu rozpustných v etanolu,
antokyanového komplexu



promývání etylacetátem

H-forma fyto melaninu očištěná od
etylacetátové frakce taninu a ligninu



promývání acetonem

H-forma fyto melaninu očištěná od
ligninu a acetonové frakce taninu



vysušení při 102 až 105 °C

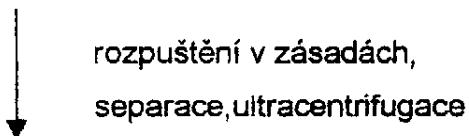
H-forma fyto melaninu
sumární produkt nerozpustný ve vodě

5 Získaný sumární produkt představuje frakci rostlinných melaninů s molekulovou hmotností $M_h = (5 \pm 2) \cdot 10^3$. Dalším stadiem technologického procesu je odstranění zbytkových doprovodných příměsí a produktů degradace nativního polymeru.

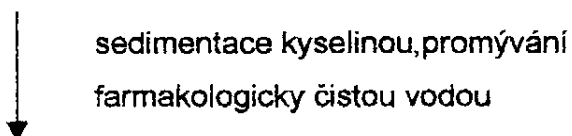
Resedimentace a doplňkové očištění

H-forma fyto melaninu

(sumární produkt)

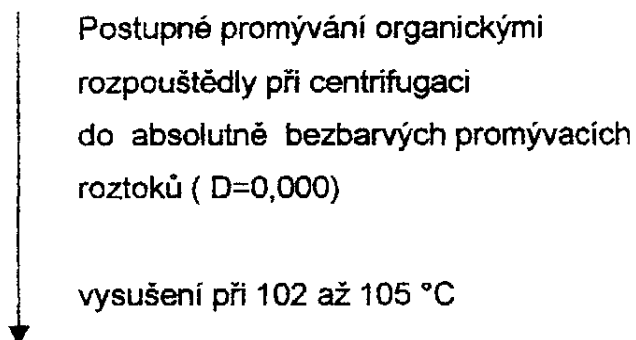


Očištěný zásaditý roztok



H-forma fyto melaninu

očištěná od zbytkových množství doprovodných příměsí



H-forma fyto melaninu

očištěná od příměsí a produktů

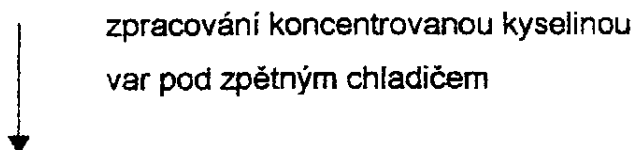
degradace nativního polymeru

konečného produktu

H-forma fyto melaninu

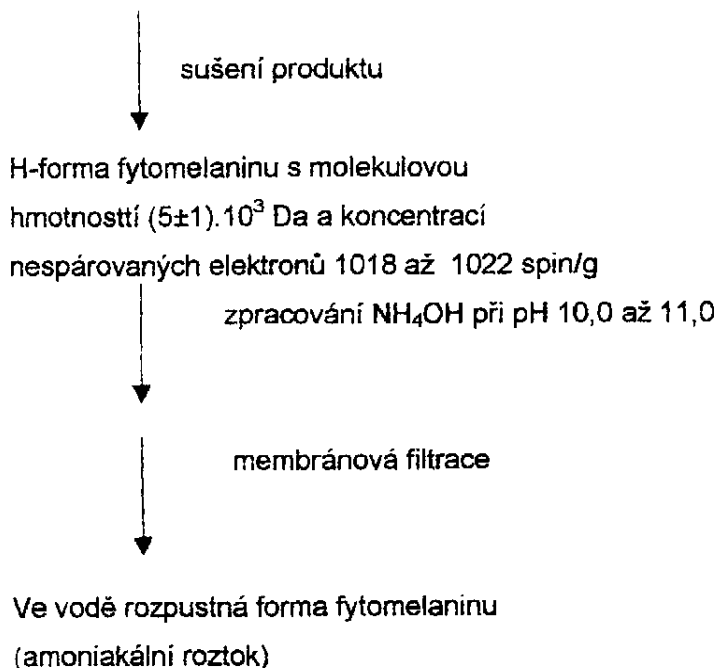
očištěná od příměsí a produktů

degradace nativního polymeru



H-forma fyto melaninu homogenní po chemické stránce

- promývání farmakologicky čistou vodou do celkového odstranění CI, promývání dimetylformamidem



Konečný produkt může být připravený v následujících formách:

- a) Suchý amorfnní prášek tmavohnědé barvy s charakteristickým kovovým leskem, nerozpustný ve vodě.
- b) Suchý amorfnní prášek tmavohnědé barvy s charakteristickým kovovým leskem, rozpustný ve vodě.
- c) Vodný roztok fyto-melaninu s maximální koncentrací do 3 až 5 % hmotn.
- d) Pasta tmavohnědé barvy s obsahem základního produktu 10 až 15 % hmotn.

Podstatu vynálezu tvoří také farmaceutický prostředek, který obsahuje frakci rostlinného melaninu podle vynálezu a farmaceuticky přijatelný nosič.

Bylo zjištěno, že frakce rostlinného melaninu podle vynálezu je vhodná na použití jako léčivo, a to zejména jako antioxidant, pro blokování peroxidace lipidů, na aktivaci leukocytů, na regulaci a průběh komplementového systému.

Na základě dosažených výsledků uvedených dále a popisu biologické funkce látek melaninové povahy [Ferenčík M., Štvrtinová V., Bernadič M., Jakubovský J., Hulín I.: Zápal, horúčka, bolesť. Bratislava, Slovak Academic Press. 1997, strana 216; Mayer V., Hallauer J., Baum M.K.: Ochorenie spôsobené nákazou vírusom HIV/AIDS. Bratislava, Vydavateľstvo Slovenskej Akadémie Vied, 1996, strana 364; Sigma Chemical Co.: Biochemikalien und Reagenzien für die Naturwissenschaften. Forschung. Deutschland, 1997, s. 2736; Ďuračková Z., Bergendi L., Liptáková A., Muchová J.: Free radicals derived from oxygen and medicine. Bratislava Medical Journal, 1993 No. 8, strana 419 až 434; Ďuračková Z., Felix K., Feniková L., Kepštová I., Labuda J., West U.: Superoxide dismutase mimetic activity of a cyclic tetrameric Schiff base N-coordinated Cu(II) complex. BioMetals 1995 No. 5, strana 183 až 187; Novák, M.:

Neuroimmunology of The Alzheimer's Disease. Bratislava Medical Journal 1997, 98. strana 303 až 314.] můžeme vyvodit následující:

Poškození v lidském organismu vzniká působením vnějších anebo vnitřních faktorů. Jako poškození je potřeba rozumět měřitelné změny, při kterých se poruší homeostáza intracelulárního prostředí natolik, že nitrobuněčné struktury, a také samotné buňky, nedokáží udržet a kompenzovat poruchu vlastními mechanismy. V tomto momentu dochází k poruše subcelulárních struktur a ke ztrátě integrity buněk. Pokud proces postihne dostatečně velký počet buněk, tak se ireverzibilní buněčné poměry projeví ztrátou funkce příslušného orgánu. Výsledkem je porucha orgánů s následnými změnami funkcí celého organismu.

Melaniny, a tím také fytomelanin, patří do skupiny látek, které se zúčastňují opravných opatření. To znamená, že nejde o látku, která nějakým způsobem kompenzuje ztrátu a nebo poruchu. Nejde ani o látku, která se uplatňuje jako faktor náhrady deficitu. Jde o látku aktivně zasahující do procesů, které se spustí při poškození homeostázy buněk a následně celých orgánů. Ve smyslu moderních koncepcí medicíny je řešení problému poškození buněk a orgánů principiálním řešením. Tento přístup plně respektuje nejmodernější trendy v rozvoji vědeckého výzkumu v oblasti biologicko-lékařských věd.

Princip ztráty homeostázy buněk je základem vzniku všech poruch v lidském organismu kromě geneticky podmíněných poruch. Ve své podstatě také působení fyzikálních faktorů jako je radiace, působení extrémních teplot a fyzikálních faktorů způsobuje poruchu struktury buněk. Také v těchto případech musí organismus zabezpečit optimalizaci poměrů ve smyslu přežití organismu. To, co následně v organismu probíhá, je proces, na kterém se podílí mnoho mechanismů a látek. Látka fytomelanin má v tomto procesu celkem zásadní postavení. Vyplývá to z toho, že v procesu poškození se aktivují mechanismy zaměřené na odstranění poškozující škodliviny. Přitom vznikají látky, které mají vysokou baktericidní účinnost a schopnost velmi intenzivně reagovat s jinými látkami, které se v místě poškození nachází. Látky zaměřené na likvidaci škodliviny nemají schopnost rozlišit mezi poškozením užitečným a neužitečným. V konečném důsledku tyto látky poškozují všechny struktury, které se nachází v místě jejich vzniku, tvorby a působení. Jde většinou o látky s nízkou molekulovou hmotností. Podobný proces poškození vzniká také tehdy, pokud dojde k poruše už poškozeného a adaptovaného orgánu a nebo tkáně. Tak při ateroskleróze vzniká jistý druh rovnovážného stavu mezi porušenou cévou, průtokem krve a tkání, která je zásobována krví z této cévy. Když se poruší integrita cévy preaterosklerotický proces, tak se této dramatické situace zúčastňují opět mechanismy směřující k nápravě a přežití organismu. Tyto také výše uvedené procesy nápravy poškození probíhají s účastí tvorby reaktivních intermediátů kyslíku, superoxidového aniontu, peroxidu vodíku, hydroxylového radikálu, singletového kyslíku a reaktivních intermediátů dusíku. Fytomelanin se na základě dosavadních analýz uplatňuje jako prostředek na „ovládání“ tvorby těchto látek. Tyto látky mají schopnost reagovat se škodlivinou, ale jejich významná úloha je v tom, že spouštějí kaskádu změn tvorby dalších látek, které se uplatňují jako poškozující látky a jako látky, které zabezpečují aktivaci a regulaci reparačních procesů. Těmito látkami se ovlivňuje výměna mezibuněčných informací. Dosud používané látky při léčbě mají charakter látek s tlumivým nebo stimulačním účinkem. Další látky mají funkci suplementace nebo kompetitivní inhibice.

V případě fytomelaninu jde o látku, jejíž účinek závisí na stavu aktivace při poškození a na stavu aktivace systémů zúčastňujících se těchto složitých procesů (komplementový systém, koagulační systém a kininový systém). Fytomelanin se uplatňuje v pravém slova smyslu jako regulátor, který by mohl sloužit na to, aby se do důsledků ovládaly procesy, které probíhají spontánně.

Pro přípravu koncepce výzkumu celkového využití, v lékařství zaměřeného na objasnění úlohy této molekulové frakce melaninů rostlinného původu, je dále potřebné vytvořit a sledovat modelové situace na celém organismu (reperfúzní poškození, kyslíkový a kalciový paradox). Šlo by o studie, které by měly definovat účast fytomelaninu při poškození a reparaci organismu. Fytomelanin může být mimořádně perspektivní látka, její vazba na enzymy a na látky obsahující

kovové prvky může znamenat velmi široké použití. Navíc látka, která se chová jako regulátor procesů, může nalézt použití při mnohých smrtelných chorobách a objasnění původu vzniku mnohých, dosud neobjasněných chorob.

- 5 Frakce fyto melaninu podle vynálezu, jako účinná látka pro použití jako léčivo, může být použita v následujících farmakologických formách:

10 suchá látka rozpustná ve vodě, injekční forma, suchá látka pro perorální použití, roztok pro injekční aplikaci, roztok pro perorální použití, tablety, granule, kapsule, dražé, suspenze, sirup, gel, želé, mast, krémy, roztok pro vnější použití, roztok pro infúze, aerosolové formy, kosmetická přísada pro tekutiny, krémy, šampóny.

Příklady provedení vynálezu

15

Příklad 1

Způsob výroby *Aesculus hippocastanicum* L. – fyto melaninu

20

Jako základní surovina pro izolování produktu byly použity slupky *Aesculus hippocastanicum* v množství 2000 g, předtím oddělené od jádra, promyté vodou a vysušené na max. 10 % hmotn. vody.

25

použité chemické látky:

- demineralizovaná voda ve farmakologické kvalitě
- HCl 37% dým. p.a.
- NaOH p.a.
- 30 – etanol p.a.
- etylester kyseliny octové p.a.
- aceton p.a.
- dimetylformamid p.a.

35

(Na sedimentaci a promývání je možné použít jakoukoliv kyselinu na bázi chloru, ale pro jednodušost je nejvhodnější použít kyselinu chlorovodíkovou.)

Použitá technika:

40

- laboratorní sklo
- centrifuga Heraeus Megafuge 2
- vakuová odparka Heidolph VRSTV 2000
- demineralizační stanice Werner Ro6
- magnetické míchadlo a příslušenství
- 45 – kontrolní a měřicí technika
- ostatní zařízení a příslušenství (sušička,

Izolování sumárního produktu z *Aesculus hippocastanicum* L.

Základní surovina

- 5 – vysušené slupky se rozdělily do 10 skleněných nádob, každá o objemu 3500 ml, a to tak, že do každé nádoby jsme dali 200 g vysušených slupek *Aesculus hippocastanicum*,
- připravená surovina se zalila 0,3M vodným roztokem NaOH, promíchala 30 min a celá směs se zahřála na teplotu 50 °C. Doba reakce byla 10 hodin.

10 Zásaditý extrakt

- po 10 hodinách se extrakt očistil od hrubých mechanických příměsí na hrubém filtru a na centrifuze při 3500 ot/minutu se odstranily malé a mikroskopické mechanické nečistoty
- 15 – celkově se získalo 32 l zásaditého extraktu, který se rovnoměrně rozdělil do 10 skleněných reakčních lahví s objemem každé 20 l
- do každé láhve se do plného objemu dolila farmakologicky čistá voda a doplnila se HCl tak, aby se dosáhla hodnota pH 1,5
- 20 – celá směs se promíchala, v průběhu krátké doby vznikl sediment červeno–hnědé až tmavohnědé barvy, který se nechal 12 hodin sedimentovat

Sediment fyto melaninu *Aesculus hippocastanicum* L.

- 25 – získaný sediment se centrifugací oddělil od tekuté složky směsi
- sediment se dále promýval slabě kyselým vodným roztokem HCl o pH 1,5 až 3,0, dokud kapalina nad sedimentem nebyla bezbarvá (10 x opakované promývání) při poměru směsi 1:8.

30 Sediment fyto melaninu *Aesculus hippocastanicum* H–forma

- oddělený zakoncentrovaný sediment se dále promyl etanolem a centrifugací se oddělil sediment od kapaliny
- 35 – etanolem se sediment promýval, dokud se etanol zabarvoval příměsemi v něm rozpustnými
- promývalo se postupně dále etylacetátem a následně acetonem, až do dosažení stavu, kdy organická rozpouštědla nejsou zbarvená příměsemi, které se v nich rozpouštějí
- 40 – vysušení produktu na vzduchu při pokojové teplotě
- přemletí vysušeného produktu na laboratorním mlýnku na rozměr zrna 0,200 až 0,250 mm
- 45 – přesetí na laboratorním síti 0,25 mm
- vysušení při teplotě 100 až 110 °C do trvalé hmotnosti

H–forma fyto melaninu *Aesculus hippocastanicum*

50 ve vodě nerozpustný sumární produkt

prášek tmavohnědé barvy s kovovým leskem

Získaný sumární produkt představuje frakci rostlinných melaninů s $M_h = (5 \pm 2) \cdot 10^3$ Da. Další stadium technologického procesu je odstranění zbytkových doprovodných příměsí a produktů degradace nativního polymeru.

5 Resedimentace a doplňkové očištění

H-forma fyto melaninu *Aesculus hippocastanicum* (sumární produkt)

10 Získaná H-forma se opětovně rozpustila v 20 l 0,3M NaOH, získaný zásaditý extrakt se centrifugoval až do úplného odstranění mikroskopických mechanických příměsí. Centrifugace se prováděla při 3500 ot/minutu po dobu 25 minut. Získaný očištěný extrakt se zředil 5násobným množstvím farmakologicky čisté vody a přidala se HCl do pH 2,0. Dostatečné bylo 3násobné promytí vodným roztokem HCl při pH 2,0 až 3,0 pro úplné odstranění příměsí.

15 Dále se promýval organickými rozpouštědly v pořadí etanol, etylacetát, aceton při centrifugaci do absolutně bezbarvých promývacích roztoků ($D=0,000$). Produkt se vysušil při 102 až 105 °C.

20 Získala se H-forma fyto melaninu *Aesculus hippocastanicum* očištěná od příměsí a produktů degradace nativního polymeru ve formě tmavohnědého prášku s charakteristickým kovovým leskem.

Konečný produkt

25 H-forma fyto melaninu *Aesculus hippocastanicum* očištěná od příměsí a produktů degradace nativního polymeru

30 Získaný produkt se povařil s 6M HCl pod zpětným chladičem po dobu 6 hodin v poměru směsi 1:5. Produkt se promyl farmakologicky čistou vodou až do úplného odstranění Cl^- , to bylo ověřené kvalitativní reakcí na Cl^- .

35 Získal se produkt – H-forma fyto melaninu, homogenní po chemické stránce. Pro zvýšení biologické aktivity a aktivace semichinonového radikálu se produkt rozsuspendoval s dimethylformamidem 1:5, suspenze se rozdělila centrifugací při 2400 ot/min po dobu 10 minut. Produkt se sušil při 102 až 105 °C po dobu 120 minut.

Na získání ve vodě rozpustné formy se preparát rozpustil ve vodném roztoku NH_4OH , který se připravil tak, aby hodnota pH byla 10 až 11, přebytečný amoniak byl odpařen ve vakuové odparce a část roztoku se zakoncentrovala na 1,375 % hmotn.

40 Ve vodě rozpustná forma fyto melaninu tzv. *Aesculus hippocastanicum* – melanin. Získaný produkt je prášek tmavohnědé až černé barvy, který se beze zbytku rozpouští v redestilované (apyrogenní) vodě, maximální koncentrace je cca 5 % hmotn.

45 Preparát svými vlastnostmi odpovídá tabulce č. 1, přičemž koncentrace nespárovaných elektronů je 10^{19} spin/g.

Touto technologií se vyrobilo z 2000 g základní suroviny 17,565 g konečného produktu, to je 0,87 % hmotn., vztažené na celkovou hmotnost suroviny.

50 V závislosti na šarži slupek *Aesculus hippocastanicum* tedy základní suroviny se může počet promývání a množství použitých reagentů v určitých hranicích lišit od uvedeného příkladu. Samozřejmě tím také celkové množství konečného produktu může kolísat v rozmezí 0,7 až 1,15 %.

Tato skutečnost a nepatrné rozdíly v technologii a výstupu konečného produktu jsou způsobené tím, že přírodní suroviny, v konkrétním případě *Aesculus hippocastanicum* L., nemají identické chemické složení a homogennost, přičemž některé části v závislosti především na daných klimatických podmínkách a samotných stromech (rostlinách) se mohou také značně odlišovat.

5

Příklad 2 až 8

Jako základní surovina pro výrobu fytomelaninu se použily následující výchozí produkty:

10

- 2 *Vitis vinifera* L.
- 3 *Fagopyrum esculentum* L.
- 4 *Heliantus annus* L.
- 5 *Hippophae ramnoides* L.
- 15 6 *Thea* L.
- 7 *Vice faba* L.
- 8 *Junglas regia* L.

20

Tabulka č. 2: Fyzikálně–chemické vlastnosti rostlinných fytomelaninů

č.	Druh Suroviny	Mh Da $\times 10^3$	-OH % hmot.	=O % hmot.	Chemické složení prvek, % hmot.				EPR Spin/g	k_{abs} při $\lambda=465$ nm
					C	H	N	O		
2	<i>Vitis vinifera</i> L.	5±1	4,05	1,06	49,52	5,73	1,14	41,20	10^{18}	0,019
3	<i>F. esculentum</i>	5±1	4,08	1,03	49,63	5,84	1,20	41,49	10^{18}	0,019
4	<i>Helianthus a.L.</i>	5±1	4,04	1,00	49,58	5,46	1,32	41,66	10^{18}	0,019
5	<i>Hippophae r.L.</i>	5±1	4,08	1,02	49,20	5,04	1,40	42,36	10^{19}	0,019
6	<i>Thea</i> L.	5±1	4,00	1,04	49,12	5,08	1,28	42,68	10^{20}	0,019
7	<i>Vice faba</i> L.	5±1	4,09	1,06	49,80	4,95	1,28	42,92	10^{18}	0,019
8	<i>Junglas regia</i> L.	5±1	4,04	1,04	49,44	5,10	1,24	42,10	10^{19}	0,019

Spektrum pro všechny druhy (cm^{-1}): 3433, 1620, 1400, 1200–1100

25

Tyto výchozí suroviny byly zpracovány stejným postupem, jako v příkladu 1. Vlastnosti získané frakce z těchto surovin byly v dobré shodě s vlastnostmi uvedenými v tabulce 1. Pokusy s uvedenými rostlinnými surovinami ukázaly, že fytomelanin je možné vyrobit – biosyntetizovat ze všech typů, přičemž samotný konečný produkt je stejný a nezávisí na druhu základní suroviny. Nicméně na základě tabulek a výše uvedené literatury je zřejmé, že pravděpodobný obsah melaninu v rostlinných objektech je nižší než námi dosažené hodnoty, to také svědčí o tom, že nezpolymerizované na konečný produkt – fytomelanin. Z toho důvodu je možné vyrobit fytomelanin také ze suroviny, která neobsahuje původní nativní polymer, ale pouze monomery základních stavebních jednotek polymeru – fytomelaninu. V tomto případě můžeme hovořit o syntéze produktu.

30

35

Na základě uvedeného je možné předpokládat, že všechny ostatní, zatím nesledované rostliny obsahující melanin (suroviny), také obsahují fytomelanin, který je možné získat v této popisované podobě, přičemž rozdíl představuje pouze příliš se nelišící koncentrace nespárovaných elektro-

nů (paramagnetických center), což závisí na stupni aktivace semichinonového radikálu. Tento závěr se týká také jiných druhů surovin s dostatečným obsahem rostlinných flavonoidů, vhodných na polymerizaci fyto melaninu.

- 5 Za účelem zefektivnění promývacího procesu slabě kyselými vodnými roztoky (HCl) je možné použít tento roztok zahřátý na teplotu max. 75 °C, což má za následek snížení počtu promytí.

Na základě dosud dosažených výsledků a odvozených závěrů předpokládáme, že použitím nových způsobů aktivace (elektrochemickou cestou, ozářením, promytím, rozsuspendováním jinými vhodnými polárními rozpouštědly a kyselinami) semichinonového radikálu můžeme dosáhnout hodnotu EPR – koncentraci nespárovaných volných elektronů 10^{22} spin/g. Zároveň předpokládáme, na základě praktických výsledků, které jsou dále uvedené, že zvýšení této hodnoty zároveň zvyšuje biologickou aktivitu fyto melaninu a potencionalizuje jeho možnosti, a tím také možnosti a eventuální použití.

15 Ne vždy je potřeba provést resedimentaci, pokud výchozí produkt po první sedimentaci už odpovídá požadované kvalitě. To je způsobené různými druhy vstupní suroviny a tím také jejich různou kvalitou. V případě použití suroviny například černého fermentovaného vietnamského čaje, už původně zpracovaného na přímé použití, vstupní kvalita suroviny je natolik vysoká a produkt
20 homogenní, že není potřebné použít čištění a resedimentaci na dosažení konečného produktu odpovídajícího vlastnostmi tabulky č. 1 a vyznačujícího se biologickou aktivitou.

Farmakologické vlastnosti fyto melaninu

25 Na základě provedení toxikologických zkoušek bylo stanovené, že fyto melanin není toxický a ani mutagenní preparát. Toxicita je velmi nízká, $LD_{50} > 2500$ mg/kg z čehož je možné vyvodit závěr, že látka je použitelná na základě předběžných výsledků jako fyto farmakum. Jako standard pro základní studie byl použit *Aesculus hippocastanicum* – melanin, dále už pouze fyto melanin, převedený do amoniakální formy a skladovaný při teplotě 8 až 10 °C po dobu 3 měsíců. Potom
30 byl vzorek použit na experimentální určení biologické aktivity. Původní vzorek použitý na komplex testů stanovení biologické aktivity měl úroveň EPR $1,47 \cdot 10^{18}$ spin/g. Další šarže, použité na srovnání (SOD-like aktivita a IC_{50}) měla hodnotu $2,8 \cdot 10^{19}$ spin/g. Rozdíl vznikl v důsledku lepšího chemického vyčištění preparátu a aktivace semichinonového radikálu vícenásobným suspendováním v polárních organických rozpouštědlech.

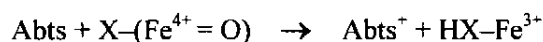
35 Experimentálně byly určeny některé antioxidační vlastnosti fyto melaninu, které můžeme shrnout následujícím způsobem za některých předpokladů a vysvětlením základních termínů.

40 Volné radikály jsou vysoce reaktivní molekuly odvozené od kyslíku a nebo dusíku a hrají kromě pozitivní úlohy v některých fyziologických procesech převážně negativní úlohu. Proti toxicitě volných radikálů existují v organismu nebo obecněji v přírodě, látky schopné eliminovat. Tyto látky se obecně označují jako antioxidanty [Brechtlová, Halčák, Chandoga a kol.: *Lékařská biochemie* I., Asklepios. 1992, strana 228; Ďuračková Z., Bergendi L., Liptáková A., Muchová J.: Free radicals derived from oxygen and medicine. Bratislava Medical Journal, 1993, č. 8, strana
45 419 až 434; Ďuračková Z., Felix K., Feniková L., Kepštová I., Labuda J., West U.: Superoxide dismutase mimetic activity of a cyclic tetrameric Schiff base N-coordinated Cu(II) complex. *BioMetals* 1995, č. 5, strany 183 až 187.].

50 Sérií praktických experimentů na bázi současných moderních a ověřených metod byly stanoveny některé základní antioxidační vlastnosti, které potvrdily perspektivnost a široké možnosti použití v této oblasti. byly stanovené antioxidační vlastnosti této látky, fyto melaninu, s EPR pořadí 10^{18} spin/g.

Stanovení celkové antioxidační schopnosti (Total antioxidant status)

Na stanovení celkové antioxidační schopnosti se použil kit TAS firmy Randox, Velká Británie. Metoda je založená na tvorbě radikálu Abts⁺ (2,2'-azino-di-(3-etylbenzthiazoline sulphonate)). Tento radikál vzniká působením peroxidu vodíku na metmyoglobin, kdy vzniká ferrylyoglobin, který reaguje s Abts za vzniku Abts⁺ radikálu.



HX-Fe³⁺ metmyoglobin

X-(Fe⁴⁺=O) ferrylyoglobin

Byly připraveny vzorky a pipetovaly se podle postupu uvedeného v kitu. Výsledky antioxidační schopnosti látky jsou vyjádřené jako koncentrace Troloxu, který byl použitý jako standard a výpočet antioxidační aktivity. Od naměřených absorbancí jsme odečítali absorbanci blanku a vypočítali koncentraci Trolox-like ve vzorku podle vzorce:

$$C_{\text{vz}} = \frac{(A_{\text{BL}} - A_{\text{vz}})}{(A_{\text{bl}} - A_{\text{st}})} \times C_{\text{ST}}$$

Výsledky jsou uvedené v následující tabulce č. 3.

Tabulka č. 3

vzorek fyto melaninu [c]	Trolox-like [c]	Trolox-like [c]/ LX [c]
0,1	0,663	6,63
0,01	0,113	11,29
0,1	1,215	12,15
0,1	1,216	12,16
0,1	1,047	10,47

Ze dvou roztoků fyto melaninu o koncentracích 0,1 a 0,01 mmol/l byla vypočítaná antioxidační schopnost na Trolox a představuje:

10,54 ± 1,02 mmol/l Troloxu-like aktivity

Linearita byla ověřená v koncentrační závislosti, výsledky jsou uvedené v tabulce č. 3.

Zachování biologické aktivity jsme stanovili změřením TAS v roztoku v 0,7 a 14 dnech. Výsledky jsou uvedené v tabulce č. 4.

Tabulka č. 4

Den stanovení	Koncentrace (mmol/l)		
	0,01	0,1	1,0
0	0,531	1,125	2,374
7		1,217	
14		1,025	

Stanovení antioxidační schopnosti fytyomelaninu jako ve vodě rozpustného antioxidantu (ACW)

Na stanovení se použily roztoky kitu FAT, Berlín pro ACW (Antioxidant capacity in water soluble antioxidants)

– jako standard byl použit Trolox – rozpustná forma vitamínu E

– postupovalo se podle návodu uvedeného v kitu, přičemž na stanovení se použily roztoky fytyomelaninu v koncentracích:

A = 1 mmol/l (5 mg/ml)

B = 0,1 mmol/l (10 x ředěný roztok A)

C = 0,01 mmol/l (10 x ředěný roztok B)

Při měření ACW se antioxidační schopnost vyhodnotila jako posun přes „lag“ fázi křivky, který představuje posun křivek při použití standardu Troloxu, a ze kterých byla sestavená kalibrační křivka, která je znázorněná na přiloženém obrázku.

Z této kalibrační křivky byla pomocí počítače vypočítaná koncentrace ACW a po přepočítání aktivity ACW na jednotku koncentrace fytyomelaninu (0,0087:0,01) aktivita charakterizovaná ACW je aktivita fytyomelaninu = 0,87 aktivity vitamínu E, pokud vyhodnocujeme posun „lag“ fáze, to je trappingovou aktivitu.

Pokud ale pro vyhodnocení použijeme plochu integrálu chemiluminiscenční křivky, což lépe odpovídá scavengerové aktivitě, tak v přepočtu na jednotkovou koncentraci fytyomelaninu je 5,56 scavengerové aktivity Troloxu.

Stanovení SOD-like aktivity a IC₅₀ fytyomelaninu

Na stanovení SOD-like aktivity byla použita chemiluminometrická metoda na chemiluminometru PHOTOCHEM, kde se na stanovení použil kit FAT, Berlín pro SOD aktivitu. Měření byla prováděna po dobu 3 minut a zaznamenával se integrál plochy chemiluminiscenční křivky, pomocí počítače byla přepočítaná hodnota na jednotkovou aktivitu SOD (hmotnosti) a ta představuje 0,2 aktivity SOD, v molové koncentraci přepočet na jednotkovou aktivitu je aktivita fytyomelaninu 0,0316 aktivity SOD. Tento velký rozdíl je daný rozdílem v molekulové hmotnosti 5000 pro fytyomelanin versus 32 000 pro SOD.

Aktivita SOD se vyjadřuje hodnotou IC₅₀, což je koncentrace látky, při které je detekce volných radikálů inhibována na 50 %. Tato hodnota byla přepočítána přes hmotnost na 0,28 aktivity SOD.

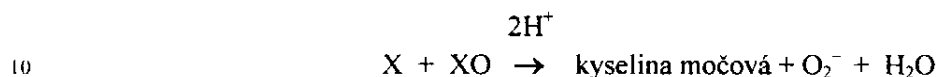
Jestliže však byl použit fytyomelanin se zvýšenou koncentrací volných nespárovaných elektronů na hodnotu 10¹⁹ spin/g, použitím výše uvedené metody jsme dosáhli následující výsledky, které jsou uvedené v tabulce č. 5.

Tabulka č. 5

Vzorek č.	$-\log IC_{50}$	% aktivity SOD
1	6,171422	76,53
2	5,482290	67,98
3	5,768617	71,53
4	5,445406	67,53

Vliv fyto melaninu na degradaci DNA

Na určení vlivu fyto melaninu na degradaci DNA byla použita chromozomální bovinní DNA a systém xantin–xantin oxidáza na tvorbu superoxidu.



Reakční směs (1 ml) obsahovala 0,25 mg DNA/RZ, xantin 3,10 až 4 mol/l RZ. Xantin–oxidáza byla přidávána do reakční směsi tak, aby změna absorbance (510 nm) za minutu, což je ukazatel tvorby superoxidu, byla v rozmezí 0,03 až 0,04.

K reakční směsi byl buď přidán nebo v kontrole nepřidán určitý objem roztoku fyto melaninu. Reakční směs byla doplněna 25 nM fosfátovým pufrům při pH 7,4 na potřebný objem. Reakční směs byla doplněna 25 nM fosfátovým pufrům při pH 7,4 na potřebný objem. Reakční směs byla inkubována při 37 °C 60 minut. Reakce byla zastavena pomocí TCA (2,8% zásobní roztok) – 0,75 ml. Po přidání 0,25 ml thiobarbiturové kyseliny (TBA) byla reakční směs v uzavřených zkumavkách ponechána při teplotě 95 °C, po dobu 30 minut. Po ochlazení byla spektrofotometricky proti blanku změřena a pomocí standardu tetraetoxypromanu (TEP) vypočítána tvorba koncového produktu oxidačního poškození DNA–malondialdehydu (MDA) v přepočtu na 1 mg DNA. Výsledky jsou uvedené v tabulce č. 6.

Tabulka č. 6

	DNA + X + XO	DNA + X + XO +	DNA + X – XO+	DNA + X – XO+
fyto melanin mmol/l	0,0	0,1	0,01	0,001
MDA $\mu\text{mol/mg DNA}$	$4,87 \pm 0,41$	$1,14 \pm 0,12$	$2,07 \pm 0,18$	$2,99 \pm 0,32$
n	9	6	9	6
Štěpení DNA	100%	23,4%	42,5%	61%
Inhibice štěpení	0 %	76,6%	57,5%	39 %

Na základě dosažených výsledků se zjistilo, že“

- a) fytomelanin je schopný eliminovat volné radikály
- 5 b) fytomelanin vykazuje minimálně 10,00násobek aktivity rozpustné formy vitamínu E (Troloxu) při použití organického radikálu ABTS z kitu TAS, Randox, Anglie
- c) fytomelanin vykazuje více scavengerovou než trappingovou aktivitu
- 10 d) fytomelanin vykazuje min. 5,50 scavengerové aktivity Troloxu
- e) fytomelanin vykazuje min. 0,87 trappingové aktivity Troloxu
- f) fytomelanin vykazuje min. 0,20 aktivity Superoxiddismutázy
- 15 g) fytomelanin je schopný inhibovat štěpení DNA superoxidem. Při koncentraci 0,01 mmol/l štěpení DNA inhibuje na min. 57,5 %
- h) se zvýšením koncentrace nespárovaných volných elektronů (EPR) se biologická aktivita fytomelaninu stupňuje.
- 20

Dále bylo základními screeningovými testy stanoveno, že:

- a) fytomelanin je schopný plně zablokovat peroxidaci lipidů
- 25 b) fytomelanin je schopný aktivovat (anergovat) leukocyty
- c) fytomelanin má vliv na regulaci a průběh komplementového systému
- d) fytomelanin má vliv na kontrakci cév (kapilár)
- e) fytomelanin si zachovává stabilní a reprodukovatelné vlastnosti po dobu dlouhého období a neztrácí je ani při agresivním chemickém zpracování.
- 30

Průmyslová využitelnost

- Fyzikálně-chemické vlastnosti a biologická aktivita umožňují použití fytomelaninu ve vícero průmyslových oblastech, ale především v elektronickém a elektrochemickém průmyslu, živočišné výrobě, zemědělském průmyslu, ve výrobě a zpracování potravin, ve spotřební chemii a u nejmodernějších technologií nových materiálů patřících k melaninům v jaderných technologiích. Velmi zajímavým faktem je také, díky farmakologickým vlastnostem, uplatnění látky v různých modifikacích prakticky ve všech oblastech kosmetiky. Současná tendence uplatňování nových biotechnologií v ekologických a také jiných směrech dává velmi široké uplatnění také v tomto odboru, perspektivním pro budoucí tisíciletí.
- 35
- 40

Biologické použití

- Na základě současných poznatků předpokládáme, že bude možné použití fytomelaninu na léčení různých typů zhoubných rakovinných nádorů, poruch imunitního systému včetně AIDS, chorob krevního původu a poruch vyplývajících z porušení homeostázy buněk, složitých a těžko léčitelných psychických poruch organismu (schizofrenie, epilepsie,), poruch nervového a ostatních regulačních systémů, závislosti na narkoticích. Na bázi této látky je možné vyrobit ochranný preparát před radiací s binárním účinkem.
- 45
- 50

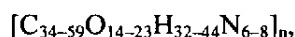
Na základě uvedených skutečností v dosud publikované literatuře a dosažených praktických výsledků ze základních screeningových testů předpokládáme použití fytomelaninu jako: antioxi-

dantu, ochranné látky před radiací, fagostatika, cytostatika, antikarcinogenního přípravku, přípravku na léčení poruch imunitního systému, atd.

5

PATENTOVÉ NÁROKY

- 10 1. Biologicky účinná frakce rostlinného melaninu sestávající z monomerních jednotek rostlinných flavonoidů, především katechinu a leukoantokyanidinů, se sumárním empirickým vzorcem H-formy:



15

kde $n = 6$ až 8 ,

s molekulovou hmotností $(5 \pm 1) \cdot 10^3$,

20 s množstvím $-OH$ skupin $4,00$ až $4,09$ % hmotn.,

množstvím $=O$ skupin $1,00$ až $1,06$ % hmotn.,

s obsahem jednotlivých prvků v % hmotn.

25

C $49,12$ až $49,80$,

H $4,95$ až $5,84$,

N $1,14$ až $1,40$,

O $41,20$ až $42,93$,

30

s koncentrací nespárovaných elektronů 10^{18} až 10^{22} spin/g, a s jasnými spektrálními čarami v oblastech 3433 , 1620 , 1400 a 1200 až 1100 cm^{-1} , připravitelná izolací biologicky účinné frakce rostlinného melaninu, kde na rostlinnou surovinu, která obsahuje nativní polymer a/nebo základní stavební jednotky, jako katechiny a leukoantokyanidiny, se působí $0,05$ až $0,3M$ vodným roztokem hydroxidu alkalického kovu při teplotě 15 až 75 $^{\circ}C$, pH extraktu se upraví na hodnotu 1 až 2 přidávkem anorganické kyseliny na bázi chloru, přičemž vyloučený sediment se vyčistí a následně vysuší při teplotě 100 až 110 $^{\circ}C$.

35

2. Způsob izolace biologicky účinné frakce rostlinného melaninu podle nároku 1, **v y z n a -**
 40 **č u j í c í s e t í m**, že na rostlinnou surovinu, která obsahuje nativní polymer a/nebo základní stavební jednotky, jako katechiny, a leukoantokyanidiny, se působí $0,05$ až $0,3M$ vodným roztokem hydroxidu alkalického kovu při teplotě 15 až 75 $^{\circ}C$, pH extraktu se upraví na hodnotu 1 až 2 , přidávkem anorganické kyseliny na bázi chloru, přičemž vyloučený sediment se vyčistí a následně vysuší při teplotě 100 až 110 $^{\circ}C$.

45

3. Způsob izolace biologicky účinné frakce rostlinného melaninu podle nároku 2, **v y z n a -**
č u j í c í s e t í m, že čištění se uskutečňuje promýváním roztokem kyseliny na bázi chloru s pH $1,0$ až 3 až do dosáhnutí bezbarvé kapaliny nad sedimentem, následným promýváním organickým polárním rozpouštědlem.

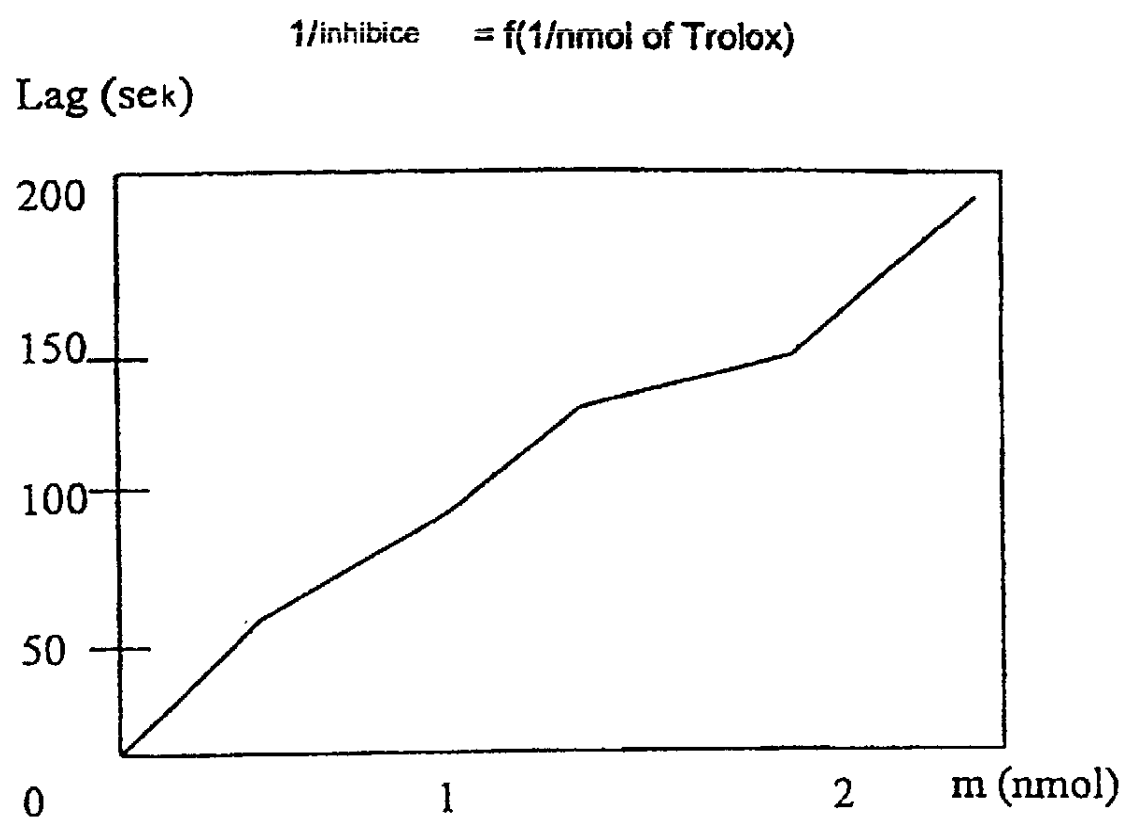
50

4. Způsob izolace biologicky účinné frakce rostlinného melaninu podle nároku 3, **v y z n a -**
č u j í c í s e t í m, že vhodnými organickými rozpouštědly jsou etanol, etylacetát, aceton, dimethylformamid.

5. Způsob izolace biologicky účinné frakce rostlinného melaninu podle nároků 2, 3 a/nebo 4, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že po vysušení se produkt znovu podrobí čištění a dále se aktivizuje semichinonový radikál.
- 5 6. Způsob izolace biologicky účinné frakce rostlinného melaninu podle nároku 5, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že na úplné odstranění minerální složky a další aktivaci semichinonového radikálu se používá anorganická kyselina na bázi chloru, jako je HCl a HClO₄.
- 10 7. Způsob izolace biologicky účinné frakce rostlinného melaninu podle nároků 2 až 6, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že ve všech procesech se používá voda ve farmakologické kvalitě.
8. Farmaceutický prostředek, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že obsahuje biologicky účinnou frakci rostlinného melaninu podle nároku 1, a farmaceuticky přijatelný nosič..
- 15 9. Biologicky účinná frakce rostlinného melaninu podle nároku 1, pro použití jako léčivo.
10. Biologicky účinná frakce rostlinného melaninu podle nároku 1, pro použití jako antioxidant.
11. Biologicky účinná frakce rostlinného melaninu podle nároku 1, pro použití k blokování peroxidace lipidů.
- 20 12. Biologicky účinná frakce rostlinného melaninu podle nároku 1, pro použití k regulaci aktivity leukocytů.
- 25 13. Biologicky účinná frakce rostlinného melaninu podle nároku 1, pro použití k regulaci a průběhu komplementového systému.

30

1 výkres



Obr. 1

Konec dokumentu
