

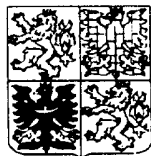
PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

282 276

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **254-95**

(22) Přihlášeno: **28. 07. 93**

(30) Právo přednosti:
04. 08. 92 IT 92MI/1927

(40) Zveřejněno: **13. 09. 95**
(Věstník č. 9/95)

(47) Uděleno: **18. 04. 97**

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: **11. 06. 97**
(Věstník č. 6/97)

(86) PCT číslo: **PCT/EP93/02006**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 94/03502**

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.⁶:
C 08 B 37/18

(73) Majitel patentu:

ANGELINI RICERCHE S.p.A. SOCIETÀ
CONSORTILE, S. Palomba-Pomezia, IT;

(72) Původce vynálezu:

Nicoletti Rosario, Roma, IT;
Balocchi Leandro, Roma, IT;

(74) Zástupce:

Zelený, advokát Pavel JUDr., Hálkova 2,
Praha 2, 12000;

(54) Název vynálezu:

**Glykogenové polysacharidy a způsob
jejich přípravy**

(57) Anotace:

Glykogenové polysacharidy s obsahem dusíku menším než 60 ppm, stanoveno Kjeldahlovou metodou, a obsahem redukčních cukrů menším než 0,25 %, stanoveno metodou podle F.D. Snella a Snella. Výhodně se jedná o látky s obsahem uhlíku asi 44 % až 45 % a specifickou otáčivostí $(\alpha)_D^{20} 197 \pm 2,0$ (c=1 ve vodě). Příprava probíhá tak, že po získání roztoku surového glykogenu, připraveného obvyklým postupem, se pH upraví na neutrální hodnotu a tento roztok se zpracuje katlontovou pryskyřicí, katlontová pryskyřice se oddělí odfiltrováním, roztok se zpracuje ne-acidickým těkavým rozpouštědlem mísitelným s vodou k vysrážení požadovaného polysacharidu a sraženina se oddělí filtrací.

CZ 282 276 B6

Glykogenové polysacharidy a způsob jejich přípravy

Oblast techniky

5

Vynález se týká glykogenových polysacharidů a způsobu jejich přípravy. Konkrétně je možno uvést, že se vynález týká glykogenových polysacharidů, které v podstatě neobsahují dusíkaté sloučeniny a redukční cukry.

10

Dosavadní stav techniky

Uvedený termín "glykogen" se všeobecně používá v tomto oboru k označení skupiny sloučenin, která je podobná, nikoliv ovšem identická, proteoglykanovým sloučeninám, které se v značné míře vyskytují u zvířat.

15

K nejvíce zkoumaným glykogenům patří glykogen extrahovaný z jater králíka, přičemž se předpokládá, že se jedná o protein (glykogenin), který má molekulovou hmotnost asi 37 000 a který je připojen glykosidickou vazbou tyrosinu na vysoce rozvětvený polysacharid glukosy, který má molekulovou hmotnost 10 000 000 (beta-částice). Tyto beta-částice se mohou ve značném počtu spojovat, přičemž může dojít ke spojení až 50 těchto beta-částic, čímž vznikne sloučenina (alfa-částice), která má molekulovou hmotnost asi 500 000 000 a která tvoří jednotku přirozeně se vyskytujícího glykogenu [viz. D.J. Manners, Carbohydrate Polymers, 16, str. 37-82, (1991)].

20

25

Různé glykogeny, získané z různých druhů zvířat, projevují rozdíly, pokud je až dosud známo, ve stupni rozvětvení polysacharidu. Například v publikaci A.S. Craig a kol. Carbohydrate Research 179, str. 327-340 (1988), se uvádí významné rozdíly pokud se týče rozvětvení polysacharidů v glykogenových vzorcích získaných extrakcí ze savců a bezobratlých.

30

V literatuře podle dosavadního stavu techniky se sice vyskytuje několik různých metod extrahování glykogenu ze tkání zvířat, ovšem všechny tyto metody sledují dva základní cíle:

35

(i) kvantitativní extrakci glykogenu pro analytické účely biochemie, to znamená, že tato extrakce je zaměřena tak, aby mohlo být následně provedeno kvantitativní stanovení úrovně glykogenu v určité tkáni;

(ii) extrakci glykogenových vzorků při minimalizování denaturace původního polymeru za účelem následně prováděných biochemických a konformačních studií.

40

Bez ohledu na zdroj těchto látek jsou produktem v případě všech těchto postupů běžně komerčně dostupné glykogeny, které vždy obsahují určitý podíl dusíku (v rozmezí od 500 do 600 ppm), což odpovídá přinejmenším množství vypočtenému pro proteoglykan (viz. D.J. Manners a kol. výše citovaná publikace).

45

Na základě studií provedených v literatuře podle dosavadního stavu techniky bylo zjištěno, že existují značné rozdíly v pohledu jednotlivých autorů na toto množství dusíku, neboť někteří z těchto autorů považují uvedené množství dusíku za stopové nečistoty, zatímco jiní autoři toto množství označují již jako minoritní (vedlejší) složku tvořící glykogen. Na druhé straně není v mnoha komerčně dostupných zdrojích specifikován rozdíl mezi proteoglykanovým glykogenem a jeho polysacharidem.

50

I když extrakce glykogenu byla velice důkladně prozkoumána, byla až dosud věnována pouze malá pozornost extrakci glykogenového polysacharidu. Pouze velice staré publikace podle dosavadního stavu techniky popisují postup přípravy glykogenových vzorků "neobsahujících

dusík" z jater krys [viz. například publikace M. Somogyi, J. Biol. Chem., 104, 2.45 (1934)]. Ovšem při provádění tohoto postupu se glykogen podrobuje kyselinovému zpracování po dobu přes noc, to znamená za hydrolyzních podmínek glykogenového polysacharidu. Kromě toho není známa přesnost analytické metody použité autory tohoto postupu ke stanovení obsahu dusíku.

5

Při praktickém provádění tohoto postupu bylo autory uvedeného vynálezu zjištěno, že je tato metoda špatně reprodukovatelná, přičemž získaný produkt sice obsahuje malé množství dusíku, ovšem toto množství je značně proměnlivé a/nebo se objevuje značné množství redukčních cukrů (více než 0,15 %) jako důsledek hydrolytického štěpení.

10

V případě glykogenů bylo podle dosavadního stavu techniky nalezeno mnoho různých druhů farmaceutického použití, přičemž jako příklad je možno uvést, že tyto látky se používají jako změkčovač (viz japonský patent JP-A-87-178 505), jako vehikula vzhledem k jejich hydratačním vlastnostem (viz. japonský patent č. JP-A-88-290 809) a jako složky dermatologických produktů, které se používají proti stárnutí kůže (viz. patent Spojených států amerických č. 5 093 109).

15

Kromě toho bylo navrženo jejich použití jako živné prostředí pro bakterie, které produkují kyselinu mléčnou, a pro farmaceutické prostředky k regulování vaginální hodnoty pH (viz. evropský patent EP-A-0 257 007). Ovšem tyto látky nejsou dostatečně stabilní a je pravděpodobné, že stopy proteinů, nukleových kyselin a fragmentů těchto látek jsou příčinou citlivosti na tyto látky. Dokonce mohou být v některých případech přítomny živé kontaminující složky.

20

25

Podstata vynálezu

Cílem uvedeného vynálezu je příprava sloučenin, u kterých je zachována v maximální míře struktura glykogenového polysacharidu, přičemž je současně zajištěna maximální neškodnost a bezpečnost takto získaných produktů. To znamená, že získané sloučeniny jsou prostě dusíkových sloučenin a redukčních cukrů.

30

Po mnoha bezvýsledných pokusech byla podle uvedeného vynálezu zcela neočekávatelně zjištěna metoda, podle které se zpracovává vodný roztok surového glykogenu po dostatečně dlouhou dobu kationtovou pryskyřicí, přičemž výsledkem tohoto postupu je získání požadovaného polysacharidu v tomto roztoku. Tento polysacharid je potom možno snadno vysrážet přidávkou rozpouštědla mísitelného s vodou.

35

Takže prvním aspektem uvedeného vynálezu je získání glykogenového polysacharidu, který v podstatě neobsahuje dusíkové sloučeniny a redukční cukry.

40

Podstatu předmětného vynálezu tvoří glykogenový polysacharid, který má obsah dusíku menší než 60 ppm, stanoveno Kjeldahlovou metodou, a obsah redukčních cukrů je menší než 0,25 %, stanoveno metodou podle F.D. Snella a Snella.

45

Výhodně má tento glykogenový polysacharid obsah uhlíku v rozmezí od 44 % do 45 %.

Výhodně je specifická otáčivost $(\alpha)_D^{20}$ tohoto glykogenového polysacharidu podle vynálezu $197 \pm 2,0$ (c=1 ve vodě).

50

Podstata postupu přípravy glykogenového polysacharidu, který má obsah dusíku menší než 60 ppm, stanoveno Kjeldahlovou metodou, a obsah redukčních cukrů je menší než 0,25 %, stanoveno metodou podle F.D. Snella a Snella, při kterém se tkáň zvířat bohatá na glykogen vaří ve vodném roztoku silné bazické látky, takto získaný vývar se ochladí, přidá se ne-acidické

těkavé rozpouštědlo, které je mísitelné s vodou, filtrací se oddělí takto vzniklá sraženina a tato sraženina se rozpustí ve vodě, spočívá podle předmětného vynálezu v tom, že se hodnota pH takto získaného vodného roztoku sraženiny upraví na neutrální hodnotu a tento roztok se zpracuje kationtovou pryskyřicí, tato kationtová pryskyřice se oddělí odfiltrováním, roztok se
 5 zpracuje ne-acidickým těkavým rozpouštědlem mísitelným s vodou k vysrážení polysacharidu v podstatě neobsahujícího dusíkové sloučeniny a redukční cukry a sraženina se oddělí filtrací.

Ve výhodném provedení tohoto postupu se neutralizace provádí slabou organickou kyselinou.

10 Zpracování kationtovou pryskyřicí se ve výhodném provedení podle vynálezu provádí při teplotě místnosti, a výhodně po dobu v rozmezí 8 až 48 hodin, nejvýhodněji po dobu asi 24 hodin.

Uvedeným rozpouštědlem je ve výhodném provedení podle vynálezu ethylalkohol nebo aceton.

15 V popisné části a v patentových nárocích je použit termín "v podstatě neobsahující dusíkové sloučeniny a redukční cukry", přičemž tímto termínem se míní to, že obsah dusíku je menší než 60 ppm, měřeno Kjeldahlovou metodou, a obsah redukčních cukrů je menší než 0,25 %, měřeno metodou F.D. Snell a Snell, "Colorimetric Methods of Analysis, New York, 1954, vol. III, str. 204.

20 Zejména vhodným zdrojem glykogenu jsou měkkýši *Mytilus Edulis* a *Mytilus Gallus Provincialis*, přičemž tyto měkkýši se vyskytují ve velkých množstvích, přičemž jejich cena je přiměřeně nízká a přitom mají poměrně vysoký obsah glykogenu. Vzhledem k výše uvedenému patří mezi výhodné glykogenové polysacharidy podle uvedeného vynálezu látky získané
 25 z měkkýšů *Mytilus Edulis* a *Mytilus Gallus Provincialis*.

Ovšem rozsah uvedeného vynálezu není nijak omezen na glykogenové polysacharidy získané pouze z měkkýšů *Mytilus Edulis* a *Mytilus Gallus Provincialis*. Mezi další zdroje glykogenu vhodné pro přípravu odpovídajících polysacharidů podle uvedeného vynálezu patří jiné druhy
 30 měkkýšů, jako jsou například ústřice a *Credipula Fornicata*, nebo orgány zvířat patřících k obratlovcům, které jsou bohaté na obsah glykogenu, jako jsou například játra a svalovina.

Glykogenové polysacharidy podle uvedeného vynálezu je tedy možno charakterizovat obsahem uhlíku v rozmezí od asi 44 % do asi 45 %, a dále molekulovou hmotností asi $2,5 \pm 0,1 \times 10^6$
 35 a specifickou otáčivostí $(\alpha)_D^{20} 197 \pm 2,0$ (c=1 ve vodě).

První stupeň postupu získání glykogenového polysacharidu podle uvedeného vynálezu se provede běžnými metodami, známými z dosavadního stavu techniky, což zahrnuje vaření zvolené
 40 tkáně ve vodném roztoku silné bazické látky, ochlazení takto získaného vývaru a vysrážení glykogenu přidávkem ne-acidického těkavého rozpouštědla, které je mísitelné s vodou.

Jak je všeobecně velice dobře známo, množství glykogenu obsažené v různých tkáních se velice liší, a to nejenom pokud se týče konkrétní tkáně a druhu zvířete, ale v případě stejných tkání
 45 zvířat stejného druhu i pokud se týče různých jiných faktorů, jako je například nutriční stav a doba v roce.

Z výše uvedeného je patrné, že množství glykogenu extrahovaného při provádění výše uvedeného postupu závisí ve značné míře na množství obsaženém ve zpracovávaných tkáních
 50 zvířat.

Nový znak postupu podle uvedeného vynálezu spočívá v úpravě neutrální hodnoty pH roztoku, který se získá rozpuštěním uvedené sraženiny ve vodě, a potom zpracování takto získaného roztoku kationtovou pryskyřicí.

Takže dalším aspektem uvedeného vynálezu je postup přípravy glykogenového polysacharidu, který v podstatě neobsahuje dusíkové sloučeniny a redukční cukry, při kterém se vaří živočišná tkáň bohatá na glykogen ve vodném roztoku silné bazické látky, takto získaný vývar se ochladí, přidá se ne-acidické těkavé rozpouštědlo, které je mísitelné s vodou, oddělí se takto získaná sraženina odfiltrováním a tato sraženina se rozpustí ve vodě, přičemž podstata tohoto postupu spočívá v tom, že se pH uvedeného vodného roztoku sraženiny upraví na neutrální hodnotu a tento roztok se zpracovává kationtovou pryskyřicí, zfiltruje se za účelem odstranění kationtové pryskyřice, zpracuje se ne-acidickým těkavým rozpouštědlem mísitelným s vodou za účelem vysrážení polysacharidu, který v podstatě neobsahuje dusíkové sloučeniny a redukční cukry, a nakonec se zfiltruje k oddělení vzniklé sraženiny.

Uvedená neutralizace se ve výhodném provedení podle vynálezu provádí za použití slabé organické kyseliny, která je rozpustná ve vodě, jako je například kyselina octová.

Zpracování kationtovou pryskyřicí se ve výhodném provedení podle vynálezu provádí po dobu v rozmezí od 8 do 48 hodin za míchání a při teplotě místnosti.

Jako příklad vhodné kationtové pryskyřice je možno uvést Amberlite™ IR-120 v kyselé formě, přičemž ovšem je možno použít i jiné kationtové pryskyřice, které mají podobné vlastnosti.

V další fázi tohoto postupu se kationtová pryskyřice oddělí odfiltrováním a přidá se rozpouštědlo mísitelné s vodou.

Jako příklad vhodných rozpouštědel je možno uvést nižší alkoholy a ketony, jako je například ethylalkohol a aceton.

Postupem podle vynálezu se získá sraženina, která představuje glykogenový polysacharid neobsahující dusíkové sloučeniny a redukční cukry, přičemž tato sraženina se oddělí filtrací. V případě tohoto postupu není zapotřebí použít jiných čisticích stupňů, kromě odstranění rozpouštědla.

Výtěžek tohoto postupu, pokud se týče glykogenu vysráženého z uvedeného vývaru, je téměř kvantitativní.

Vzhledem k výše uvedenému spočívá další výhoda postupu podle uvedeného vynálezu v tom, že výrobní náklady na získání polysacharidu podle uvedeného vynálezu jsou v podstatě stejné jako jsou náklady na extrakci glykogenu. Jinak řečeno, při v podstatě stejných nákladech se podle uvedeného vynálezu získá produkt, který je možno použít pro všechny známé aplikace glykogenu, aniž by tento produkt měl nevýhody produktů získaných podle dosavadního stavu techniky, to znamená obsah proteinů, nukleových kyselin nebo jejich fragmentů a/nebo redukčních cukrů.

Příklady provedení vynálezu

Glykogenové polysacharidy a postup jejich přípravy bude v dalším blíže ilustrován s pomocí příkladů provedení, které slouží pouze k ilustrování tohoto vynálezu aniž by jej jakýmkoliv způsobem omezovaly.

Příklad 1

(A) Extrakce glykogenu.

- 5 Podle tohoto provedení bylo do ocelové nádoby umístěno 1000 gramů suspenze *Mytilus Gallus Provincialis* společně s 1,0 litrem 30% roztoku hydroxidu draselného, přičemž tato směs byla zahřáta na teplotu 100 °C a při této teplotě byla zahřívána po dobu 1 hodiny.

10 Takto získaný roztok byl potom ochlazen na teplotu místnosti, načež bylo přidáno 1,5 litru 95% roztoku ethylalkoholu. Tímto způsobem byla získána pevná sraženina (v množství 62 gramů), která byla oddělena odfiltrováním.

Po usušení měl takto získaný produkt následující charakteristiky:

- 15 obsah uhlíku: 44,44 %,
obsah dusíku: 0,18 - 0,34 %.

(B) Postup přípravy glykogenového polysacharidu.

- 20 Pevný podíl, získaný oddělením ve shora uvedeném stupni A, byl rozpuštěn v 1 litru vody, přičemž hodnota pH tohoto výsledného roztoku byla potom upravena na neutrální hodnotu za pomoci ledové kyseliny octové, načež byla tato směs filtrována až do dosažení úplné čirosti.

- 25 K takto získanému roztoku bylo potom přidáno 60 gramů pryskyřice Amberlit™ IR-120 v kyselé formě a tato směs byla potom udržována za míchání při teplotě místnosti po dobu 24 hodin.

Po usušení měl takto připravený glykogenový polysacharid (získaný v množství 61 gramů) následující fyzikálně-chemické charakteristiky:

- 30 obsah uhlíku: 44,44 %,
obsah dusíku: nepřítomen *
obsah redukčních cukrů: nepřítomny **
molekulová hmotnost: $2,5 \pm 0,1 \times 10^6$ ***
 $(\alpha)_D^{20}$: $198 \pm 1,0$ (c=1 ve vodě).

35 * citlivost metody 60 ppm

** testováno metodou F.D. Snell a Snell, "Colorimetric Methods of Analysis, New York, 1954, vol. III, str. 204; citlivost metody 0,25 %,

40 *** vypočteno z hodnoty (eta) aplikací Floryho rovnice s následujícími hodnotami $\underline{k} = 1,80 \times 10^{-4}$,
 $\underline{a} = 0,70$, zjištěnými metodou L.P. Yu a J.E. Rollinga pro glykogen [viz. J. Applied Pol. Sci., 33, 1909 (1987)].

45 Příklad 2

Podle tohoto příkladu byl glykogenový polysacharid připraven z *Mytilus Gallus Provincialis*, přičemž bylo použito stejného postupu jako je uvedeno ve stupni (B) v příkladu 1 s tím rozdílem, že vysrážení bylo provedeno acetonem místo ethylalkoholu.

- 50 Výtěžek: 60,5 gramu,
 $(\alpha)_D^{20}$: $196 \pm 1,0$ (c=1 ve vodě),
redukční cukry: nepřítomny.

Příklad 3

Podle tohoto příkladu bylo 5 gramů glykogenu získaného z jater vepře extrakcí provedenou postupem uvedeným v publikaci Bell a kol., Biochem. J. 28, 882 (1934), rozpuštěno ve vodě (85 mililitrů), přičemž tento roztok byl zpracován pryskyřicí Amberlite™ IR-120 (v množství 5 gramů), načež bylo provedeno vysrážení 95% roztokem ethylalkoholu (85 mililitrů), což bylo provedeno stejným způsobem jako je uvedeno ve stupni (B) v příkladu 1.

V získaném produktu nebyl přítomen ani dusík ani redukční cukry, přičemž hodnota specifické otáčivosti byla podobná jako u glykogenových polysacharidů v příkladech 1 a 2.

PATENTOVÉ NÁROKY

15

1. Glykogenový polysacharid, který má obsah dusíku menší než 60 ppm, stanoveno Kjeldahlovou metodou, a obsah redukčních cukrů je menší než 0,25 %, stanoveno metodou podle F.D. Snella a Snella.

20

2. Glykogenový polysacharid podle nároku 1, který má obsah uhlíku v rozmezí od 44 % do 45 %.

25

3. Glykogenový polysacharid podle nároků 1 nebo 2, jehož specifická otáčivost $(\alpha)_D^{20}$ je $197 \pm 2,0$ ($c=1$ ve vodě).

30

4. Způsob přípravy glykogenového polysacharidu, který má obsah dusíku menší než 60 ppm, stanoveno Kjeldahlovou metodou, a obsah redukčních cukrů je menší než 0,25 %, stanoveno metodou podle F.D. Snella a Snella, při kterém se tkáň zvířat bohatá na glykogen vaří ve vodném roztoku silné bazické látky, takto získaný vývar se ochladí, přidá se ne-acidické těkavé rozpouštědlo, které je mísitelné s vodou, filtrací se oddělí takto vzniklá sraženina a tato sraženina se rozpustí ve vodě. **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se hodnota pH takto získaného vodného roztoku sraženiny upraví na neutrální hodnotu a tento roztok se zpracuje kationtovou pryskyřicí, tato kationtová pryskyřice se oddělí odfiltrováním, roztok se zpracuje ne-acidickým těkavým rozpouštědlem mísitelným s vodou k vysrážení polysacharidu v podstatě neobsahujícího

35

5. Způsob podle nároku 4, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se neutralizace provádí slabou organickou kyselinou.

40

6. Způsob podle některého z nároků 4 nebo 5, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že zpracování kationtovou pryskyřicí se provádí při teplotě místnosti.

45

7. Způsob podle některého z nároků 4 až 6, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se zpracování kationtovou pryskyřicí provádí po dobu v rozmezí 8 až 48 hodin.

50

8. Způsob podle nároku 7, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se zpracovávání kationtovou pryskyřicí provádí po dobu 24 hodin.

9. Způsob podle některého z nároků 4 až 8, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že uvedeným rozpouštědlem je ethylalkohol nebo aceton.

Konec dokumentu
