

PATENTOVÝ SPIS

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **1997-2024**
(22) Přihlášeno: **21.12.1995**
(30) Právo přednosti: **28.12.1994 IT 1994MI/2663**
(40) Zveřejněno: **12.11.1997**
(Věstník č. 11/1997)
(47) Uděleno: **10.06.05**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **17.08.2005**
(Věstník č. 8/2005)
(86) PCT číslo: **PCT/EP1995/005084**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 1996/020284**

(11) Číslo dokumentu:

295 489

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl. 7

C 12 P 21/00
C 07 K 14/415
A 61 K 38/16
A 61 K 7/48

(73) Majitel patentu:

INDENA S. P. A., Milano, IT

(72) Původce:

Bombardelli Ezio, Milano, IT
Ponzzone Cesare, Milano, IT

(74) Zástupce:

KOREJZOVÁ & SPOL. v.o.s., JUDr. Zdeňka
Korejzová, Spálená 29, Praha 1, 11000

(54) Název vynálezu:

**Glykoproteiny bohaté hydroxyprolinem a
prostředky, které je obsahují**

(57) Anotace:

Vynález se týká glykoproteinů s vysokým obsahem hydroxyprolinu, které lze získat alkoholovou extrakcí v kyselém prostředí z buněčných kultur *Ginkgo biloba*, *Lycopersicum esculentum*, vykazujících následující charakteristiky: průměrnou molekulovou hmotnost 20 000 s intervalem variability od 12 000 do 38 000, stanovenou pomocí gelové filtrace a elektroforézy; a velkou rozpustnost ve vodě.

CZ 295489 B6

Glykoproteiny bohaté hydroxyprolinem a prostředky, které je obsahují

Oblast vynálezu

Předkládaný vynález se týká glykoproteinů bohatých na hydroxyprolin, které lze získat z rostlinných zdrojů, a jejich farmaceutického a kosmetického použití.

Přesněji se vynález týká glykoproteinů s vysokým obsahem hydroxyprolinu, které je možné získat extrakcí alkoholem v kyselém prostředí z buněčných kultur rostlin *Ginkgo biloba* a *Lycopersicon esculentum*, majících následující charakteristiky:

- průměrnou molekulovou hmotnost 20 000 s intervalem variability od 12 000 do 38 000, stanovovanou pomocí gelové filtrace a elektroforézy;
- rozpustnost v kyselých vodných roztocích.

Dosavadní stav techniky

Je známo, že některé glykoproteiny živočišného původu, jako kolagen a proteoglykany, vykazují příznivé působení na pokožku při místním nanesení těchto látek samotných, anebo začleněných ve vhodných prostředcích.

Kolagen, který je glykoproteinem s vysokým obsahem prolinu a hydroxyprolinu, je používán zvláště sám o sobě, anebo v kombinaci s jinými polypeptidovými bázemi při léčbě vrásek a jiných estetických vad, spojených se špatnou hydratací kůže a špatnou pružností (elastičností). Ovšem živočišný původ kolagenu omezuje jeho použití vzhledem k nebezpečí kontaminace viry a toxiny. Ačkoli látky rostlinného původu tato rizika neobsahují, bylo jejich použití v kosmetických prostředcích až doposud značně omezené: jsou známy například kosmetické prostředky, obsahující surové extrakty takových rostlin jako aloe nebo i celé rozemleté rostliny jako avokádo.

Rostlinné glykoproteiny, nazývané extensiny, které jsou vytvářeny z rostlinných buněk ve stadiu proliferace a mající strukturu podobnou živočišnému kolagenu, jsou již známy. EP-A 0 533 4078 předkládá kosmetické využití extensinů, majících průměrnou molekulovou hmotnost vyšší než 100 000. Ovšem způsoby extrakce extensinů, které byly dosud popsány a zahrnují extrakci rostlinných materiálů různého původu pomocí vodných roztoků solí s následným čištěním silnými kyselinami jako kyselinou trichloroctovou, neumožňují získání produktů vhodných pro kosmetické účely. Obtíže se týkají jejich rozpustnosti, stálosti, opakovatelnosti a soudržnosti (konzistence) jejich fyzikálně chemických charakteristik.

Podstata vynálezu

Nyní bylo zjištěno, že glykoproteiny s vysokým obsahem hydroxyprolinu, které jsou strukturně podobné výše popsaným extensinům, ale mají menší molekulovou hmotnost a vyšší rozpustnost ve vodných roztocích kyselin, lze získat takovým postupem, který zahrnuje kultivaci buněk zvolených rostlin *in vitro* a extrakci buněk rostoucích ve vhodném médiu okyselenými alkoholovými roztoky.

Glykoproteiny, které lze získat podle tohoto vynálezu, mají hydratační vlastnosti, ionizační vlastnosti, schopnost vytvářet povrchový film a napomáhat hojení (zajizvování) výraznější než kolagen. Glykoproteiny podle tohoto vynálezu tedy mohou být využity v kosmetických nebo dermatologických prostředcích po léčbu suché pokožky, lupenky, ichtyózy, lupů, keratózy, vrásek, akné, ekzému, zánětlivé dermatózy, stárnutí pokožky a při všech dalších použitích, pro něž bylo navrženo využití živočišného kolagenu.

5 Vodné roztoky glykoproteinů podle vynálezu zůstávají stále bez jakékoli polymerizace glykoproteinů, vedoucí ke vzniku nerozpustných produktů. Navíc viskozita takových roztoků je zvláště vysoká a nezávisí na jejich koncentracích; 0,1 % koncentrace překvapivě vykazují stejnou schopnost vytváření povrchového filmu a hydratační schopnost jako roztoky 1 % kolagenu nebo 5 % rostlinného albuminu.

10 Rostlinný materiál, který má být extrahován, se získává z kvasných kultur buněk *Ginkgo biloba* a *Lycopersicum esculentum*. Techniky pro pěstování buněčných kultur jsou běžné a zahrnují suspenzní kultivaci, vycházející z kalusových kultur, získaných z různých částí rostlin jako jsou listy, kůra, kořeny, stonek či semena, jak je popsáno Dobbsem a Robertsem v publikaci "Experiments in plant tissue culture", 2. vydání, Cambridge University Press, New York, 1985.

15 Rostlinné tkáně kalusu se po sterilizaci a případném přidání antibakteriálních látek typicky používají pro zaočkování vhodného kapalného kultivačního média, jak je popsáno ve výše zmíněné příručce Dobbse a Robertse. Pro tento vynález se zvláště hodí médium podle Murashigeho a Skooga. Pro zvýšení produkce požadovaných glykoproteinů může být vhodné dodat specifické přídavné látky jako prolin, redukční činidla, ethylen nebo látky schopné uvolňovat ethylen, jako Ethephon nebo L-aminocyklopropankarboxylovou kyselinu.

20 Přednost se dává použití naftyloctové kyseliny jako auxinu, 6-(γ,γ -dimethylamino)-purinu jako cytokininu, vitaminů a 3% roztoku sacharózy jako zdroje uhlíku. Pro prevenci hnědnutí konečného produktu může být v závislosti na zvoleném materiálu vhodné přidání vitaminu C.

25 Doba kvašení se může pohybovat od 3 do 12 dnů a s výhodou činí 5 až 6 dnů. Jakmile je kvašení dokončeno, kultivační médium se odstředí a masa buněk se extrahuje alkoholem, s výhodou ethanolem, za přítomnosti zředěných minerálních kyselin, s výhodou kyseliny chlorovodíkové nebo sírové. Tento proces inaktivuje některé enzymy, které by mohly ohrozit stálost glykoproteinů podle vynálezu, zvláště polyfenoloxidázu a tyrosinoxidázu, které napomáhají polymerizaci glykoproteinů s následnou tvorbou nerozpustných produktů.

30 Alkoholová extrakce v přítomnosti minerálních kyselin umožňuje úplnou extrakci bazických glykoproteinů a byla prokázána v tomto ohledu jako extrémně selektivní metoda. Kromě ethanolu lze použít i jiné alkoholy mísitelné s vodou, jako methanol či isopropanol. Výsledné vodné alkoholové extrakty se neutralizují, poté se zahušťují a zahřívají na teplotu 70 až 100 °C, s výhodou přibližně na teplotu 80 °C, až do úplného vysrážení denaturovaných bílkovin. Suspenze se pak pročistí zahuštěním a kapalina je podrobena trakční ultrafiltraci k odstranění látek s vysokou a s nízkou molekulovou hmotností. Ultrafiltrace se provádí pomocí polysulfonových membrán, oddělujících frakci od 10 000 do 40 000, jako jsou membrány Centricon® nebo Romicon®, jejichž vlákna mohou být dutá nebo stočená do smyček. Výsledný zfilmovaný produkt se elektro-
35 dialyzuje k odstranění nežádoucích látek jako jsou sole a nízkomolekulární cukry. Po filtraci a dialýze může být výsledný roztok použit jako takový v kosmetických či farmaceutických prostředcích, nebo může být zahuštěn na menší objem a poté lyofilizován nebo atomizován (rozprášen).

45 Analytická charakterizace produktů podle vynálezu byla provedena gelovou filtrací za použití zařízení pro HPLC, sestávajícího z jednotky Watersovy pumpy, soustavy kolon Ultrahydrogel Linear Waters® 30 cm x 0,5 cm a UV absorpčního detektoru Waters, modelu 484. Jako eluční činidlo byl používán vodný roztok, obsahující 0,067 mol.l⁻¹ fosforečnan draselný, 0,1 mol.l⁻¹ NaCl a 6.10⁻⁴ mol.l⁻¹ NaN₃. Vzorky glykoproteinů k analýze byly rozpuštěny ve stejném elučním roztoku (3 mg/10 ml) a skalární množství stanovené látky i referenčních (srovnávacích) látek byla zvolena jako molekulové hmotnosti v rozmezí mezi cytochromem C (12 400) a dextranovou modří (dextran blue, 2 000 000). Produkty či jejich meziprodukty mohly pak být alternativně nebo souběžně stanoveny také pomocí elektroforézy v 12,5% polyakrylamidovém gelu a 4% zaostřovacím gelu. V takovém případě byly vzorky pro analýzu rozpuštěny v pufru s obsahem
55 dodecylsulfátu sodného (SDS) a 0,1 % merkptoethanolu a nanášená množství se pohybovala od

- 100 mg do 300 mg. Migrace probíhala za konstantního proudu při 20 mA po dobu 4 hodin. Kalibrační křivka byla stanovena z pěti standardních hmotností (7000, 14 000, 24 000, 54 000 a 66 000). Z této kalibrační křivky byly hmotnosti dvou hlavních proužků stanoveny jako 22 500 a 25 000 a hmotnosti dvou méně intenzivně zbarvených proužků jako 31 000 a 34 000. Zde popsané postupy umožňují získat směsi produktů se srovnatelnými molekulovými hmotnostmi a srovnatelným složením aminokyselin z různých buněčných explantátů, přičemž se vychází z různých rostlin. Výsledek analýzy aminokyselin u glykoproteinů, extrahovaných z buněk *Ginkgo biloba*, je uveden níže jako příklad.

aminokyselina plocha maxima (píku) v %

Asp	4,399
Glu	4,328
Hyp	17,505
Ser	7,065
Gly	6,056
Hys	1,782
Arg	2,471
Thr	4,739
Pro	10,036
Ala	8,2
Tyr	2,388
Val	6,162
Met	1,154
Ile	2,479
Leu	5,525
Phe	1,862
Lys	14,254

- 10 Výše uvedené údaje se vztahují k procentům celkového množství aminokyselin, přítomných ve směsi glykoproteinů. Cukry, obsažené ve směsi, jsou arabinóza a galaktóza. Poměr aminokyselin a cukrů odpovídá pro různé produkty v průměru hodnotě 2 : 1.
- 15 Jak bylo zmíněno dříve, produkty podle vynálezu mohou být použity jak ve farmaceutickém, tak i v kosmetickém oboru. Pro farmaceutické použití může být produkt začleněn v gelech nebo mastech, nebo nanesen na léčebné gázy pro specifickou léčbu popálenin či otevřených ran. V takovém případě je produkt obvykle podroben sterilizaci nebo sterilizačním filtracím a lyofilizován.
- 20 Kosmetické a dermatologické prostředky podle vynálezu mohou být připraveny tradičními metodami. K příkladům forem pro podávání patří vodné spreje, pleťové vody, roztoky, emulze, gely, masti (mazání) a krémy.
- 25 Kosmetické a dermatologické prostředky podle vynálezu mohou obsahovat glykoproteiny s vysokým obsahem hydroxyprolinu v hmotnostních procentech přibližně od 0,01 % do 50 % a lépe přibližně od 0,05 do 5 %, stejně jako běžné pomocné látky. Vzhledem k vysoké stálosti glykoproteinů podle tohoto vynálezu mohou být získány farmaceutické a kosmetické prostředky s obsahem nad 50 % rozpustných glykoproteinů s vysokým obsahem hydroxyprolinu.
- 30 Glykoproteiny podle vynálezu mohou být přidávány do farmaceutických a kosmetických prostředků jako takové anebo mikroenkapsulované (mikroskopicky zapouzdřené) tak, aby bylo zajištěno dlouhodobé hydratační působení. Mikrokapsle mohou být buď hydrofilní, nebo lipofilní. Prostředky podle vynálezu mohou zahrnovat i další aktivní složky, mající doplňkové anebo jinak vhodné působení vzhledem k požadovanému účelu.
- 35

Vynález je dále dokreslen následujícími příklady.

Příklady provedení vynálezu

5

Příklad 1

Příprava kalusu a kapalně kultury *Gingko biloba* k produkci glykoproteinů

10

Explantát z mladých listů rostliny *Gingko biloba* se připraví promytím listů v 0,1% roztoku Tween 80®. Čepele jsou přibližně po 0,5 cm rozděleny na části a předsterilizovány po dobu 1 minuty v 75% ethanolu. Poté je sterilizace dokončena ve 2% roztoku chlornanu sodného a trojím promytím explantátu sterilní vodou. Výsledné explantáty jsou přeneseny do Petriho misky s médiem podle Murashigeho a Skooga, obsahujícím 3% sacharózu s přídavkem vitaminů a hormonů podle Lynsmeyera a Skooga, jako 2,4-dichlorfenoxyoctovou kyselinou a naftyloctovou kyselinou. Produkty jsou inkubovány 20 dní ve tmě při teplotě 23 °C. Na konci tohoto období jsou získány drobné kalusy, které se snadno pěstují a jsou souvisle převáděny formou subkultur ve stejných podmínkách, neboť je lze použít pro rozmnožování v kapalném médiu. Tyto kalusy jsou použity k zaočkování Erlenmeyerových baněk, obsahujících 200 ml média podle Murashigeho a Skooga s přídavkem kyseliny naftyloctové a 6-(γ,γ -dimethylamino)-purinu, vitaminů podle Lynsmeyera a Skooga a 3% sacharózy jako zdroje uhlíku. Baňky jsou za míchání inkubovány při stálém osvětlení po dobu 4 dnů a poté je buněčná biomasa shromážděna k extrahování glykoproteinů.

25

Příklad 2

Příprava glykoproteinů z buněk *Gingko biloba*

30

5 litrů kultury, získané podle Příkladu 1, se odstředí malou rychlostí a shromážděné buňky (1,5 kg vlhké hmotnosti) se extrahují 1,5 l 70% ethanolu, obsahujícího 1% kyselinu sírovou. Extrakce se opakuje dvakrát pro kvantitativní vyzískání bazických glykoproteinů. Po neutralizaci jsou extrakty filtrovány k odstranění jakéhokoli zákalu a zahušťovány ve vakuu při 50 °C až do úplného odstranění ethanolu. Vodný koncentrát se zahřívá 30 minut při 85 °C a znovu je pak odstředěn k odstranění sraženiny, která se vyhazuje. Výsledný čirý roztok se ultrafiltruje pomocí membrány Centricon®, odděluje látky do 40 000, k vyloučení vyšších molekulových hmotností.

35

Zfilmovaný produkt se potom ultrafiltruje pomocí membrány z dutých vláken, odděluje hmotnosti do 10 000, k odstranění látek s nízkou molekulovou hmotností, nemajících povahu glykoproteinů. Filtrát se poté podrobí dialýze a zhuští se k 1% pevnému zbytku. Získá se tak 1,5 litru slabě viskózního produktu, který lze použít bez další úpravy v kosmetických prostředcích. Pokud se týká elektroforetické analýzy, produkt obsahuje 6 proužků, z nichž čtyři vykazují molekulové hmotnosti 16 000, 22 000, 33 000 a 36 000.

45

Příklad 3

Příprava glykoproteinů z *Lycopersicum esculentum*

50

Podle postupu, popsaného v Příkladu 1, se buněčná masa sterilních pupenů *Lycopersicum esculentum* připraví ve fermentoru (v kvasném tanku) o obsahu 14 litrů, obsahujícím 10 litrů média podle Murashigeho a Skooga, doplněného kyselinou naftyloctovou a 6-(γ,γ -dimethylamino)-purinem, vitaminy podle Lynsmeyera a Skooga a 3% sacharózou jako zdrojem uhlíku. Kvašení probíhá 5 dní při teplotě 23 °C, za míchání rychlostí 150 otáček za minutu, v přítomnosti kvasnič-

55

- 5 něho extraktu v 0,05% koncentraci a za přibližně 70% koncentrace rozpuštěného kyslíku. Na konci kvašení se shromáždí kvasný bujón a mikrofiltruje se přes 0,2 µm keramickou membránu k zahuštění buněk. K takto získané buněčné pastě se přidá určité množství isopropanolu, obsahujícího 0,5% kyselinu chlorovodíkovou, a na extrakt se aplikuje postup, popsáný v Příkladu 2. Získá se 3,5 litrů roztoku s 0,5% pevným zbytkem. Analýza lyofilizovaného roztoku vykazuje obsah 10 % prolinu a 31 % hydroxyprolinu.

Příklad 4

10

Kosmetický prostředek

100 g emulze typu olej/voda obsahuje:

roztok podle Příkladu 2 nebo 3	10,0 g
acetylovaný lanolin-alkohol PEG-10	2,0 g
cetylstearylalkohol	1,5 g
cetylpalmitát	2,0 g
kyselina stearová	7,0 g
oktyloktanoát	7,5 g
cetylfosforečnan draselný	0,5 g
konzervační látky	dle potřeby
parfém	dle potřeby
přečištěná voda	dle potřeby do 100 g

15

Příklad 5

Kosmetický prostředek

20

100 g emulze typu olej/voda obsahuje:

roztok podle Příkladu 2 nebo 3	10,0 g
cetylstearylglukosid	5,0 g
jojobový olej	10,0 g
isopropylmyristát	8,0 g
dimethicon	0,5 g
antioxidační látky	dle potřeby
konzervační látky	dle potřeby
parfém	dle potřeby
přečištěná voda	dle potřeby do 100 g

25

PATENTOVÉ NÁROKY

- 5 1. Glykoproteiny bohaté hydroxyprolinem, připravitelné alkoholovou extrakcí v kyselém prostředí z *Gingko biloba*, *Lycopersicum esculentum*, nebo z jejich buněčných kultur, způsobem při němž:
- 10 a) se buňky *Gingko biloba* a *Lycopersicum esculentum* kultivují v kapalném médiu po dobu 3 až 12 dnů;
- b) masa buněk se v přítomnosti zředěných minerálních kyselin extrahuje alkoholy mísitelnými s vodou;
- 15 c) extrakty se neutralizují, zahušťují a zahřívají při teplotách mezi 70 °C a 100 °C; a
- d) podrobí se odstředění s odstraněním precipitátu, frakční ultrafiltraci a dialýze supernatantu,
- 20 přičemž uvedené glykoproteiny bohaté hydroxyprolinem mají průměrnou molekulovou hmotnost 20 000, s intervalem variability od 12 000 do 38 000, stanovovanou gelovou filtrací a elektroforézou.
- 25 2. Kosmetické a farmaceutické prostředky, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že obsahují glykoproteiny podle nároku 1 jako aktivní složku, mající účinky hydratační, tonizační, hojivé a vytvářející povrchový film.
3. Prostředky podle nároku 2, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že jsou ve formě vodných sprejů, pleťové vody, roztoků, emulzí, gelů, mastí, krémů a léčebných gáz.

30

Konec dokumentu

35