



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY  
A OBJEVY

# POPIS VYNÁLEZU

## K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

261 398

(11)

(B1)

(61)

(23) Výstavní priorita  
(22) Přihlášeno 14 08 87  
(21) PV 5998-87.J

(51) Int. Cl.<sup>4</sup>  
A 61 K 37/18,  
A 61 K 35/50

(40) Zveřejněno 15 06 88  
(45) Vydáno 1.11.1989

(75)  
Autor vynálezu

ŠTOL MIROSLAV ing.,  
ADAM MILAN prof. MUDr. DrSc., PRAHA,  
JANIŠ MILOUŠ, GOTTWALDOV

(54)

Způsob přípravy matrixových proteinů a peptidů

Řešení se týká způsobu přípravy matrixových proteinů a peptidů, kde se výchozí biologický materiál jenž obsahuje značné podíly krve, například placenta, po předběžné mechanické úpravě extrahuje v kyselém prostředí při pH 2 až 4 a při teplotě 42 až 125 °C. Tím se krevní bílkoviny vysrážejí do pevného koagula a příslušné matrixové proteiny či peptidy přejdou do roztoku, který se následně odděluje od pevného zbytku. Vodná součást extraktu se může odstranit úplně nebo jen částečně. Využití produktu se předpokládá v kosmetice, potravinářství, lékařství, biologii a biotechnologiích.

Předmětem vynálezu je způsob přípravy matrixových proteinů a peptidů.

Je popsána řada postupů vhodných pro izolaci kolagenních bílkovin z různých pojivových tkání - extracelulární matrix. Tyto postupy jsou založeny převážně na extrakčních technikách, kde se výchozí surovina, tj. vhodný biologický materiál jako např. kůže, šlacha, kost, vystaví účinku příslušných extrakčních činidel. Těmi jsou obvykle vodné roztoky organických či anorganických kyselin nebo solí, močoviny apod., které, podle své povahy, se používají v širokém rozmezí koncentrace vodíkových iontů; pH 2 až 12.

V některých případech se tyto extrakční techniky kombinují s tzv. limitovanou digescí, při které se výchozí biologický materiál napřed vystaví účinku běžných proteolytických enzymů, např. pepsinu v kyselém prostředí. Takový postup je vhodný zejména pro vyzrálé tkáně s vysokým obsahem příčných vazeb, např. u kloubní chrupavky, cévy, trachey apod. Zde se účinkem proteáz odštěpují malé peptidy na koncích kolagenních molekul, kde jsou hlavně soustředěny zmíněné příčné vazby. Takto celkem neporušené kolagenní řetězce mohou být uvolněny z extrahované tkáně a ve větším výtěžku pak převedeny do roztoku.

V rozmezí teplot  $+4$  až  $40^{\circ}\text{C}$  lze uvedenými postupy izolovat matrixové proteiny víceméně v neporušeném stavu. Naproti tomu extrakce provedená při teplotách kolem  $60^{\circ}\text{C}$  a výše vede zpravidla k nevratné denaturaci bílkovinného materiálu a bývá doprovázena štěpením peptidických vazeb v hlavním řetězci proteinu. To má za následek podstatné snížení molekulové hmotnosti u výsledného produktu extrakce, tj. vznikají zde peptidy o různé velikosti. Takto se běžně připravují želatiny pro technická či potravinářská použití.

Existují však tkáně s rozsáhlou vaskularizací a bohaté krevními bílkovinami i krvinkami, jako je např. tkáň placenty, což značně znesnadňuje izolaci čistých matrixových proteinů či peptidů. Obvyklé vypírání suroviny proudící studenou vodou je velmi zdoluhavé a nákladné. Přitom vznikají velké objemy odpadních vod a vyvstává problém jejich čištění. Navíc zde snadno dochází k bakteriální kontaminaci, a tím se znehodnocuje konečný produkt. Krevní bílkoviny přítomné ve tkáni jsou velmi náchylné k mikrobiálnímu rozkladu a pro četné mikroorganismy jsou přímo ideálním substrátem. Použití inhibitorů, např. azidu sodného nebo organortuťnatých sloučenin, je sice účinné k potlačení růstu mikroorganismů, zato však velice problematické pro nutnost odstranění těchto toxických látek z produktu.

Uvedené obtíže zapříčiňují, že dostupný biologický materiál není dosud využíván a jeho cenné matrixové komponenty přichází nazmar.

Nyní bylo zjištěno a prakticky prověřeno, že vhodnou kombinací kyselého prostředí a tepla lze téměř kvantitativně koagulovat krevní bílkoviny spolu s krvinkami tak, aby nepřecházely do extraktu matrixových proteinů či peptidů. Tyto se pak dají

snadno oddělit od pevného koagula a zbytků výchozí tkáně, např. centrifugací.

Podstata způsobu přípravy matrixových proteinů a peptidů podle současného vynálezu spočívá na empiricky zjištěném poznatku, že krevní a matrixové bílkoviny se chovají zcela rozdílně v kyselém prostředí při současném působení tepla.

Krevní bílkoviny se za těchto podmínek denaturují a přecházejí tak do nerozpustné formy - krevního koagula. Přitom se do vznikajícího koagula strhuje i většina krevních buněk. Zde se zřejmě, alespoň částečně, uplatňují i některé ze známých koagulačních faktorů, jež mají povahu enzymů. Jak známo, ty jsou více aktivní při mírně zvýšených teplotách, např. 37°C až do teplot okolo 56°C; při teplotách vyšších jsou již denaturovány a inaktivovány.

Matrixové proteiny se za uvedených podmínek sice taktéž denaturují, avšak produkty denaturace jsou v kyselém prostředí dobře rozpustné. To prakticky umožňuje jejich extrakci z příslušného biologického materiálu.

Teplota potřebná pro účinnou extrakci matrixových proteinů či peptidů může být zvolena v poměrně širokých mezích. Avšak, spodní hranice má být nejméně 42°C a horní hranice teploty je prakticky omezena na cca 125°C, tj. při použití autoklávu. Obecně zde platí zásada, že čím je teplota při extrakci vyšší, tím hlubší degradační změny probíhají v daném biologickém materiálu. Z proteinových řetězců tak vznikají větší či menší peptidy, jejichž velikostní či hmotová distribuce je závislá nejvíce na zvoleném teplotním režimu.

Dalším faktorem, který se významně uplatňuje v procesech

extrakce, je doba po kterou působí dané prostředí na zpracovávanou surovinu. Empiricky bylo prověřeno, že tato doba má jen malý vliv na výtěžnost extrakce, pokud tato probíhá při mírnějším teplotním režimu, tj. nejvýše do 95°C. Zato však, při teplotách kolem 100°C a výše, kdy dochází ve výchozím materiálu k hlubším degradačním změnám, má býti doba kontaktu suroviny s daným prostředím co nejkratší. Jinak je totiž produkt zatížen nevhodnými a navíc i různě zabarvenými látkami, které zde vznikají rozkladem některých složek krevního koagula, jako např. hemových sloučenin.

Z uvedeného vyplývá, že volba teplotního režimu a doby extrakce jsou rozhodujícími faktory pro jakost výsledného produktu.

Definice kyselého prostředí může být vymezena hodnotou pH; zde v oblasti hodnot 2 až 4. K okyselení prostředí lze použít vhodných anorganických nebo organických kyselin, např. kyselinu chlorovodíkovou, mravenčí, octovou, propionovou, malonovou, mléčnou, citronovou apod. Posledně jmenované látky jsou dobře známy z izolačních technik pro kolagenní bílkoviny. Tyto látky se ke zpracovávané surovině přidávají vhodně zředěné vodou, přičemž poměr vodné fáze k výchozímu množství suroviny volíme výhodně 1:1 až 2:1; větší množství vodné fáze představuje pak vyšší náklady na energii nutnou k jejímu následnému odstranění.

Někdy je výhodné použití těkavých kyselin, např. chlorovodíkové nebo octové, které se dají při dalším zpracování extraktu snadno odstranit. Tak je tomu při sušení vodného extraktu matrixových proteinů či peptidů pomocí mrazové sublimace neboli lyofilizace, nebo odpařením ve vakuu za horka - na vakuové odparce. Není však vždy nutné odstraňovat veškerou vodu a potom stačí jen částečné zahuštění extraktu. V takových a podobných

případech je přítomnost kyselin či jiných vhodných konzervačních prostředků spíše žádoucí. Tyto látky zabraňují mikrobiálnímu napadení a znehodnocení produktu. Kromě zmíněných konzervačních látek je možno k vodnému extraktu matrixových proteinů či peptidů přidávat i jiné ingredience, podle zamýšleného využití produktu.

Ochrana proti mikrobiální kontaminaci platí také pro výchozí surovinu, která musí být zajištěna již od samého počátku, tj. při odběru biologického materiálu. Například u hovězí placenty se konzervace provádí zmrazením na nejméně  $-10^{\circ}\text{C}$ , lépe na  $-18$  až  $-20^{\circ}\text{C}$ . Surovina se takto skladuje až do jejího dalšího zpracování; zmrazená vydrží řadu měsíců bez znehodnocení.

Příprava matrixových proteinů či peptidů, způsobem podle současného vynálezu, se vyznačuje těmito kroky:

- (a) rozřezání zmrazené suroviny na menší kousky,
- (b) mletí suroviny na masovém stroji za chladu,
- (c) mísení suroviny s vodným roztokem kyseliny,
- (d) botnání suroviny za chladu a její homogenizace,
- (e) tepelná extrakce v kyselém prostředí,
- (f) oddělení extraktu od pevných součástí materiálu,
- (g) případné zahuštění extraktu a/nebo přidavek ingrediencí,
- (h) případné vysušení extraktu na pevný produkt.

Způsobem podle vynálezu mohou býti připraveny matrixové proteiny či peptidy v poměrně čisté formě a ve vysokém výtěžku. Podle zvolených fyzikálních a fyzikálněchemických podmínek lze připravovat uvedené látky v široké škále molekulových hmotností. Tyto látky mohou nalézt významné uplatnění v různých oborech, např. kosmetice, potravinářství, lékařství, biologii a biotechnologiích.

Dále uvedené příklady zde slouží pro ilustraci vynálezu a nikterak nevymezují počet možných kombinací, látkových poměrů a podmínek pro přípravu matrixových proteinů a peptidů.

#### Příklad 1

Hovězí placenta, skladovaná při  $-18^{\circ}\text{C}$ , byla mechanicky rozřezána na kousky přibližně ve tvaru hranolků  $3 \times 3 \times 5$  cm, které byly následně pomlety na nožovém masovém stroji s ocelovým sítem s otvory  $\varnothing$  2 mm. Získáno tak ca 5 kg rozmělněné suroviny, která byla bezprostředně promíchána se třemi litry vodného roztoku kyseliny octové o koncentraci 1%-objem. Celkový objem byl pak upraven na deset litrů přidavkem studené vody. Materiál ponechán botnat v chladu při  $+4^{\circ}\text{C}$  po dobu 15 hodin; směs byla občas promíchána dřevěnou kopistí.

Zbobotnalý materiál byl pak krátce promíchán a z něho byly odebírány vzorky o objemu 200 ml; ty byly umístěny ve skleněných infuzních lahvích obsahu 1/4 litru, které byly opatřeny pryžovou zátkou a kovovým šroubovým uzávěrem.

Vlastní tepelná extrakce v kyselém prostředí (pH 3,85) byla prováděna zahříváním nádob při teplotě  $42^{\circ}\text{C}$ , nebo  $60^{\circ}\text{C}$ , nebo  $90^{\circ}\text{C}$ , nebo  $100^{\circ}\text{C}$  - vše po dobu 2, nebo 4, nebo 6 hodin; nebo při  $120^{\circ}\text{C}$  po dobu 1, nebo 2, nebo 3 hodin. Ohřev na  $42^{\circ}\text{C}$  byl realizován ve vodním termostatu; na 60 až  $100^{\circ}\text{C}$  v horkovzdušné cirkulační sušárně; na  $120^{\circ}\text{C}$  ve sterilizačním autoklávu.

Po ochlazení nádob na teplotu místnosti byl jejich obsah převeden do centrifugačních kyvet a provedeno odstředění při 10.000 ot./min. po dobu 30 minut při teplotě  $20^{\circ}\text{C}$ ; materiál za chladu snadno geluje.

Čiré supernatanty byly následně odděleny od pevného zbytku materiálu odlitím do dalších infuzních lahví obsahu 1/2 litru. V nich pak, po zmrazení na cca  $-60^{\circ}\text{C}$  v lázni líhu a pevného oxidu uhličitého, byla provedena jejich lyofilizace. Pevné zbytky materiálu byly vysoušeny pomocí horkovzdušné sušárny při teplotě  $105^{\circ}\text{C}$  až do konstantní hmotnosti. Pro kontrolu byl vzat vzorek původního rozemletého materiálu, u kterého byla stanovena sušina stejným způsobem; zde 8,3%-hmot. .

V následující tabulce jsou uvedeny podmínky extrakce a příslušné výtěžnosti; hmotnost suchého extraktu + zbytku = 100%.

| Podmínky extrakce:                |                | Výtěžek extrakce:    |                     | Vlastnosti produktu:                      |
|-----------------------------------|----------------|----------------------|---------------------|-------------------------------------------|
| teplota<br>( $^{\circ}\text{C}$ ) | doba<br>(hod.) | extrakt<br>(%-hmot.) | zbytek<br>(%-hmot.) | přibližná Mw, event.<br>zbarvení produktu |
| 42                                | 2              | 16,8                 | 83,2                | proteiny, $10^5$                          |
| 42                                | 4              | 18,1                 | 81,9                | dtto                                      |
| 42                                | 6              | 18,6                 | 81,4                | dtto                                      |
| 60                                | 2              | 27,4                 | 72,6                | peptidy, $10^{3-4}$                       |
| 60                                | 4              | 28,3                 | 71,7                | dtto                                      |
| 60                                | 6              | 29,9                 | 70,1                | dtto                                      |
| 90                                | 2              | 52,7                 | 47,3                | peptidy, $10^{3-4}$                       |
| 90                                | 4              | 54,3                 | 45,7                | dtto                                      |
| 90                                | 6              | 56,5                 | 43,5                | dtto                                      |
| 100                               | 2              | 67,8                 | 32,2                | peptidy, $10^{2-4}$                       |
| 100                               | 4              | 69,1                 | 30,9                | dtto                                      |
| 100                               | 6              | 70,2                 | 29,8                | dtto, zbarv. prod.                        |
| 120                               | 1              | 69,7                 | 30,3                | peptidy, $10^{2-4}$                       |
| 120                               | 2              | 72,1                 | 27,9                | dtto, zbarv. prod.                        |
| 120                               | 3              | 75,2                 | 24,8                | dtto, zbarv. prod.                        |

## Příklad 2

261 398

Mrazem konzervovaná hovězí placenta byla mechanicky upravena postupem uvedeným v příkladu 1; získáno 5,3 kg rozmělněné suroviny. K té bylo za míchání přidáno 5,5 litrů studené vody, spolu s 55 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové. Směs byla ponechána v chlazeném boxu při  $+4^{\circ}\text{C}$  po dobu 24 hodin; kyselá zbobtnalá hmota měla pH 2,18.

Tepelná extrakce materiálu umístěného ve smaltované nádobě byla provedena jeho zahříváním na vroucí vodní lázni. Asi po 3/4 hodiny bylo v promíchávaném materiálu dosaženo teploty 95 až  $96^{\circ}\text{C}$  a při tomto ohřevu pokračováno ještě jednu hodinu. Směs pak byla za horka zcezena přes dvě vrstvy gázy, přičemž bylo shromážděno cca 7,5 litrů tekutého podílu a zbytek likvidován. Extrakt byl vyčištěn centrifugací za dříve uvedených podmínek. Část produktu, tj. 2,5 litru bylo vysušeno lyofilizací a zbývající roztok byl skladován v chladu při  $+4^{\circ}\text{C}$ ; sušina 2,4%-hmot. .

## Příklad 3

Matrixové peptidy o přibližné  $M_w 10^{2-4}$ , připravené lyofilizací kyselého extraktu placenty jak uvedeno v příkladu 2, byly pokusně použity ve formulaci pleťového krému s lanolinovým základem. V předběžných aplikačních testech se projevovaly příznivé nutriční účinky krému pro suchou a starší pleť.

## Příklad 4

Tekutý produkt matrixových peptidů, vyrobený podle příkladu 2, byl neutralizován přidavkem 1M-NaOH a dále použit k přípravě kultivačních podložek pro králičí endotheliální buňky izolované z aorty. Adherence a růst těchto buněk byly stimulovány tkáňově specifickými peptidy z bazálních membrán placenty.

## PŘEDMĚT VYNÁLEZU

261 398

1. Způsob přípravy matrixových proteinů a peptidů, vyznačený tím, že výchozí biologický materiál jenž obsahuje značné podíly krve, jako je placenta, se po předběžné mechanické úpravě extrahuje v kyselém prostředí pH 2 až 4 a při teplotě 42 až 125°C, přičemž se krevní bílkoviny vysrážejí do pevného koagula a příslušné matrixové proteiny či peptidy přejdou z extrahované tkáně do roztoku, který se následně odděluje od pevného zbytku, např. centrifugací.
2. Způsob podle bodu 1, vyznačený tím, že k okyselení prostředí se použije vhodná vodou zředěná anorganická či organická kyselina, např. chlorovodíková nebo octová, přičemž podíl vodné fáze k výchozímu materiálu volíme výhodně 1:1 až 2:1 dílů obj.
3. Způsob podle bodů 1 a 2, vyznačený tím, že vodná součást výsledného extraktu matrixových proteinů či peptidů se odstraňuje částečně či úplně, např. vakuovým odpařením nebo lyofilizací.