

- 1 -

274839

Memoria Descriptiva

para

una patente de Invención,
por veinte años en España,
a favor de

Sankyo Company, Limited,
- sociedad japonesa -

residente en

Tokio (JAPON)
Nº 1-6, 3-chome, Nihonbashi Hon-cho,
Chyuo-ku.
por:

"PROCEDIMIENTO PARA ESTABILIZAR CITOCROMO C".

INVENTORES: Don Kazuo Nakanishi, Don Hiroshi
Mizushima, Doña Hamako Katano;
todos de nacionalidad japonesa.

PRIORIDAD: Patente japonesa nº 36-6140, del
28 de febrero de 1.961.



274839

El presente invento se refiere a un nuevo y útil procedimiento para estabilizar el citocromo c, y consigue como nuevo compuesto de materia un citocromo c estabilizado contra descomposición óptica y térmica.

5 Como es generalmente conocido, el citocromo c un heme rojo conteniendo proteína, que es un factor esencial para el mecanismo respiratorio de la célula, que forma parte de casi todas las materias vivas en la naturaleza, alcanzando animales, plantas y microorganismos. Bioquímicamente el citocromo c ocupa una importante posición en el sistema de 10 enzimas respiratorias en el organismo y tiene una misión como factor determinante del régimen en el proceso de oxidación de los tejidos en el organismo. A este respecto se efectuaron intentos para aplicar citocromo c terapéuticamente a enfermedades que parecen causadas por insuficiencia en la oxidación 15 respiratoria de la célula. El citocromo c ha indicado ahora su utilidad para la terapia de intoxicaciones de gases y drogas, arterioesclerosis, angina de pecho, disnea de neumatitis, enfermedades del corazón, apoplejía y semejantes.

20 Las preparaciones de citocromo c hasta ahora disponibles bien sea en forma líquida o seca, se decoloran al estar expuestas a la luz y al calor desde el color rojo naranja claro del citocromo c en forma reducida a un color rojo castaño oscuro de la forma oxidada. Además sus actividades 25 enzimáticas se disminuyen durante el almacenaje bajo las influencias de la luz y del calor. Por lo tanto, es necesario y deseable, especialmente en uso medicinal, que requiere gran



pureza tanto como homogeneidad de la calidad, el estabilizar la preparación de citocromo c para matener sin variar la apariencia y la actividad aún después de un almacenaje prolongado.

5 Un objeto de este invento es proveer medios para vencer la antes mencionada inestabilidad del citocromo c para hacer disponible la preparación con apariencia invariada y estabilidad durante un largo periodo de tiempo.

10 Otros objetos, así como aspectos y ventajas del invento resultan aparentes en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas.

Según éste invento los antes mencionados y otros objetos pueden ser conseguidos incorporando sacaruros, pepturos o amino-ácidos básicos en el citocromo c.

15 El ejecutar el procedimiento de este invento, un agente estabilizador del grupo arriba mencionado se añade a una solución acuosa de citocromo c. Si fuera necesario, la solución resultante se esteriliza y se seca en congelación para la preparación final de citocromo c. Es preferible añadir ácido ascórbico antes de la incorporación del
20 estabilizante a una solución acuosa de citocromo c con el fin de convertir el citocromo c, en forma oxidada, contenido o posiblemente presente, a citocromo c en forma reducida, aunque el citocromo c de forma mixta también se estabiliza
25 por la incorporación del estabilizante. La cantidad adecuada de ácido ascórbico incorporado es por lo mínimo de 0,1% por peso de citocromo c, pero preferentemente es desde alrededor



22 FEB 1954
274839

de 0,1% hasta alrededor de 5% por peso de citocromo c. La adición de ácido ascórbico en cantidad superior a 5,0% por peso de citocromo c puede permitirse, pero no produce ningún resultado superior. El agente estabilizador en forma de polvo puede añadirse a la solución de citocromo c, pero es preferible añadir el agente estabilizador en forma de una solución acuosa preparada por anticipado disolviendo el mismo en agua.

Como agentes estabilizadores usados en el procedimiento y en la materia de composición según éste invento puede emplearse una amplia variedad de sacaruros, pepturos y amino ácidos básicos. La relación de compuestos que se emplean de acuerdo con el presente invento incluye: entre sacaruros, hexosas, tales como de-glucosa, d-galactosa, d-fructosa, d-manosa y L-sorbose; disacaruros, tales como sucrosa y maltosa; y derivados de hexosa tales como d-sorbita y d-manita; entre amino-ácidos básicos, histidina, lisina y análogos; y entre pepturos, dipepturos tales como glicilglicina y tripepturos tales como glicilglicilglicina, alanilglicilglicina y leucilglicilglicina. Los antes mencionados compuestos, sin embargo, deberá entenderse que no limitan el alcance de los agentes estabilizadores empleados en este invento. Estos agentes estabilizadores pueden emplearse en cantidades entre alrededor de 10% y alrededores de 100% por peso de citocromo c, preferentemente en una cantidad entre alrededor de 50% y alrededor de 100% por peso de citocromo c.



274839

El alto efecto estabilizador de los agentes estabilizadores sobre el citocromo c de acuerdo con el invento puede ser indicado por los datos de las siguientes tablas. Los resultados son aquellos obtenidos por los procedimientos experimentales descritos posteriormente.

A una solución de citocromo c, convertida a la forma reducida por adición de ácido ascórbico en una cantidad de 0,1% por peso de citocromo c, se añade un agente estabilizador en una cantidad por peso de 20%, 50% y 100% de la cantidad de citocromo c respectivamente. La solución resultante es secada en congelación a baja temperatura, seguido por la operación de dejar reposar a 37°C durante 30 días. La preparación de citocromo c desecada en congelación, así madurada, se disuelve después en agua y la solución acuosa se somete a la medición del espectro de absorción a una longitud de onda de 150 m μ (luz visible) por medio de un espectro-fotómetro. Absorciones a la misma longitud de onda, como se ha indicado arriba, de la solución acuosa sometida a reducción forzada con hidrosulfito y una sometida a oxidación forzada con ferricianato se miden coincidentemente para determinar la cantidad remanente (%) de citocromo c en forma reducida. Los resultados están indicados en la Tabla I.

(Sigue Tabla I)



274039

T A B L A I

Estabilización de citocromo c de levadura

Agente estabilizador \ Cantidad incorporada %	20	50	100
d-glucosa	60	68	73
d-galactosa	71	85	85
d-fructosa	65	70	75
<i>l</i> -sorbose	57	68	73
Sucrosa	70	85	88
d-sorbita	58	70	75
Histidina	40	50	55
Lisina	45	65	70
Glicilglicina	58	83	82
Glicilglicilglicina	60	85	85
Alanilglicilglicina	60	85	85
Control (ningún agente estabilizador)	30		

Estabilización de citocromo c de corazón de buey

Agente estabilizador \ Cantidad incorporada %	20	50	100
d-manosa	60	72	75
Maltosa	72	85	90
d-manita	55	61	65
Lisina	65	76	80
Glicilglicina	75	87	92
Leucilglicilglicina	74	85	92
Control (ningún agente estabilizador)	50		



227

274333

A.- Las preparaciones de citocromo c desecadas en congelación obtenidas como en los experimentos arriba descritos se almacenan a 45°C durante 30 días y las resultantes preparaciones de citocromo c se disuelven en agua.

5

B.- Las mismas preparaciones de citocromo c desecadas en congelación, que en A, se almacenan a 0°C durante 30 días y las resultantes preparaciones de citocromo c se disuelven en agua.

10

Las restantes actividades enzimáticas de la solución acuosa de (A) se miden en comparación con las de la solución acuosa de (B) por medio de un manómetro de Warburg, y con Green Brel como la oxidasa de citocromo y ácido ascórbico como el sustrato. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

(Sigue la Tabla II):



T A B L A II 277230

Estabilización de citocromo c de levadura.

Agente estabilizador	Cantidad incorporada		
	%	20	50
d-glucosa	65	66	68
d-galactosa	85	88	89
d-fructosa	75	80	80
<i>l</i> -sorbosa	60	64	66
Sucrosa	85	88	89
d-sorbita	60	65	65
Histidina	75	80	85
Lisina	70	73	80
Glicilglicina	90	90	93
Glicilglicilglicina	90	90	93
Alanilglicilglicina	89	89	90
Control (sin agente estabilizador)		50	

Estabilización de citocromo c de corazón de buey

Agente estabilizador	Cantidad incorporada		
	%	20	50
d-manosa	80	82	84
Maltosa	90	90	94
d-manita	72	75	75
Lisina	83	86	88
Glicilglicina	90	90	95
Leucilglicilglicina	91	91	95
Control (sin agente estabilizador)		70	



274839

EJEMPLO 1.-

5 A 100 ml. de una solución acuosa de citocromo
c de levadura en concentración de 20 mg. por ml., estando me-
dido el contenido de citocromo c por el método óptico, se añade
una solución de 400 mg. de glicilglicina¹ en agua destilada a
un volumen total de 200 ml. La solución resultante se somete
a filtración en un filtro de Chamberland y el producto filtra-
do se divide asépticamente en soluciones de un milímetro, que
se desecan en congelación sin aplicar calor.

EJEMPLO 2.-

10 A 50 ml de una solución acuosa de citocromo
c en una concentración de 40 mg por ml, midiéndose el conteni-
do de citocromo c por el mismo método que en el ejemplo ante-
rior, se añade una solución acuosa conteniendo 2 mg de ácido
ascórbico, seguido de buena agitación y de reposo durante al-
15 gún tiempo. A la solución resultante se añade después una so-
lución acuosa conteniendo 1.000 mg de glucosa a un volumen to-
tal de 100 ml. La solución resultante es tratada de la misma
manera que en el ejemplo 1.

EJEMPLO 3.-

20 Como en el ejemplo anterior, una solución
acuosa conteniendo 100 mg. de ácido ascórbico se añade a 100
ml de una solución acuosa de citocromo c de levadura en una
concentración de 20 mg por ml, seguido de adición a una solu-
ción acuosa conteniendo 2.000 mg. de lisina a un volumen total
25 de 200 ml. La solución resultante es tratada de la misma mane-
ra que en el ejemplo 1.



274839

EJEMPLO 4.-

A 100 ml. de una solución acuosa de citocromo c de levadura en una concentración de 40 mg. por ml., midiéndose el contenido de citocromo c por el método óptico, se añade una solución acuosa conteniendo 4 mg de ácido ascórbico, seguido de buena agitación y de reposo durante algún tiempo. A la solución resultante se agrega después una solución acuosa conteniendo 800 mg de sucrosa a un volumen total de 200 ml. La solución resultante se trata de la misma manera que en el ejemplo 1.

EJEMPLO 5.-

A 50 ml. de una solución acuosa de citocromo c de levadura en una concentración de 20 mg. por ml., midiéndose el contenido de citocromo c por el mismo método que en el ejemplo anterior, se agrega una solución de 500 mg. de glicilglicilglicina en agua destilada a un volumen total de 100 ml. La solución resultante es tratada de la misma manera que en ejemplo 1.

EJEMPLO 6.-

A 100 ml. de una solución acuosa de citocromo c de corazón de buey en una concentración de 20 mg. por ml., midiéndose el contenido de citocromo c por el método óptico, se añade una solución acuosa conteniendo 20 mg. de ácido ascórbico, seguido de buena agitación y de reposo durante algún tiempo. A la solución resultante se añade después una solución acuosa conteniendo 2.000 mg. de d-sorbita a un volumen total de 200 ml. y la solución resultante se



274839

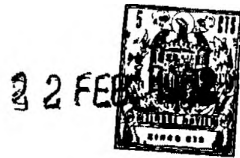
trata de la misma manera que en el ejemplo 1.

EJEMPLO 7.-

A 50 ml. de una solución acuosa de citocromo c de levadura en una concentración de 40 mg. por ml., midiendo el contenido de citocromo c por el método óptico, se añade una solución de 2.000 mg. de d-fructosa en agua destilada a un volumen total de 100 ml. La solución resultante se trata de la misma manera que en el ejemplo 1.

5

...



274839

N O T A

La presente patente comprende las siguientes reivindicaciones:

5 1.- Procedimiento para estabilizar citocromo c, caracterizado por incorporar en una solución acuosa del mismo un agente estabilizador seleccionado del grupo consistente en un sacaruro, un pepturo y un amino-ácido básico.

10 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el sacaruro se selecciona del grupo consistente en d-glucosa, d-galactosa, d-fructosa, d-manosa, l-sorbosa, sucrosa, maltosa, d-sorbita y d-manita.

15 3.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el amino-ácido básico se selecciona del grupo consistente en histidina y lisina.

20 4.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el pepturo está seleccionado del grupo consistente en glicilglicina, glicilglicilglicina, alanilglicilglicina y leucilglicilglicina.

5.- Procedimiento para estabilizar citocromo c.

Según se describe y reivindica en la presente memoria descriptiva, que consta de doce hojas foliadas y escritas a máquina por una sola de sus caras.

Madrid 22 FEB. 1962

CARLOS ROEB
P. A.