



283360

283360

# Memoria Descriptiva

para

una Patente de Invención  
por veinte años en España

a favor de

la r.e. SANKYO COMPANY LIMITED  
(sociedad japonesa)

residente en

Tokio (Japón)

Nº 1-6, 3-chome, Nihonbashi Hon-cho, Chyuo-ku

por:

"PROCEDIMIENTO PARA ESTABILIZAR UNA SOLUCION ACUOSA  
DE CITOCROMO C"

-----  
INVENTORES

Don Harutada NEGORO, Don Keiji INAMI y Don Seigo UEDA  
(los tres de nacionalidad japonesa)

-----  
P R I O R I D A D

Solicitud Pte. japonesa nº 45561/61, 15 de Diciembre de 1961.  
-----



283360

El presente invento se refiere a un procedimiento para preparar una solución acuosa estable de citocromo c, que es nuevo y útil para la estabilización de citocromo c contra calor y luz.

5                    Como es conocido generalmente, el citocromo c es una proteína roja que contiene heme, que es un factor esencial para el mecanismo respiratorio de la célula, comprendido en casi todas las materias vivas en la naturaleza en el alcance que pasa desde animales y plantas a microorganismos. Bioquímicamente el citocromo c ocupa una importante posición en el sistema de enzimas respiratorias en organismos y representa un papel como factor determinante del régimen en el proceso de oxidación de los tejidos en organismos. A este respecto se ha intentado aplicar terapéuticamente citocromo c a enfermedades, que parecen estar causadas por insuficiencia en oxidación respiratoria de la célula. El citocromo c ha sido indicado ahora como útil para la terapia de intoxicaciones de gas y drogas, arteriosclerosis, angina de pecho, disnea de neumatitis, enfermedades del corazón, apoplejía y análogos.

15  
20                    La luz y el calor pueden tender a descomponer el citocromo c en soluciones acuosas y cambiar el color en un grado sustancial.

                    Por lo tanto, es necesario y deseable, especialmente para uso medicinal, que requiere alta pureza, así como homo-



283551

geneidad de calidad, estabilizar citocromo c en una preparación de modo suficiente para mantener la actividad y el aspecto invariados aún después de un almacenaje prolongado.

5 Un objeto del presente procedimiento es procurar medios para vencer la antes mencionada inestabilidad de una solución acuosa de citocromo c, para hacer posible la preparación con aspecto invariado y estabilidad por un largo período de tiempo. Otro objeto del presente procedimiento es procurar, como un compuesto mejorado de materia, una solución acuosa de  
10 citocromo c estabilizada contra luz y calor.

Según el presente invento, los antes mencionados objetos puede alcanzarse incorporando un agente estabilizador seleccionado del grupo consistente en sulfitos, bisulfitos, hidrosulfitos y metabisulfitos de metal de álcali solos o en combinación con un agente estabilizador auxiliar seleccionado del  
15 grupo consistente en amino-ácidos tales como glicina, serina y oxiprolina y pepturos tales como glicilglicina, glicilglicilglicina, alanilglicilglicina y leucilglicilglicina en una solución acuosa de citocromo c.

20 Al realizar el procedimiento según el presente invento, puede obtenerse una solución acuosa estabilizada de citocromo c por adición del agente estabilizador, descrito arriba, a la solución acuosa (sin medio adicional alguno). Sin embargo es preferible saturar una solución acuosa de citocromo c con un  
25 gas inerte, tal como nitrógeno, antes de la adición del agente estabilizador a la misma. Además, el grado de estabilidad de una solución acuosa de citocromo c puede incrementarse por adi-



283350

ción del agente estabilizador auxiliar, antes mencionado, antes o después de la adición del agente estabilizador. Además, la estabilidad de una solución acuosa de citocromo o puede mantenerse durante un período de tiempo más largo, ajustando el pH de la solución alrededor de 7 con hidróxido de metal de álcali, tal como hidróxido sódico, después de la adición, tanto del agente estabilizador, como del agente estabilizador auxiliar arriba descrito.

Los ejemplos típicos de sulfitos, bisulfitos, hidrosulfitos y metabisulfitos de metal de álcali, que pueden emplearse en este invento, como el antes mencionado agente estabilizador, incluyen sulfito sódico, sulfito potásico, bisulfito sódico, bisulfito potásico, hidrosulfito sódico, hidrosulfito potásico, metabisulfito sódico y metabisulfito potásico.

Estos agentes estabilizadores pueden usarse en una cantidad de lo menos 2 % de peso, basado en la cantidad de citocromo o contenido en la solución, preferentemente en una cantidad entre alrededor de 10 % y alrededor de 20 % de peso. La adición del agente estabilizador en una cantidad superior a 20 % de peso de citocromo o puede permitirse, pero no produce ningún resultado superior. En el caso de que se desee utilizar los antes mencionados agentes estabilizadores auxiliares, pueden añadirse en cantidades entre alrededor de 100 % y alrededor de 300 % de peso, basado en la cantidad de citocromo o contenido en la solución, preferentemente entre alrededor de 150 % y alrededor de 300 % de peso.



283303

Los altos efectos estabilizadores del agente estabilizador, solo y en combinación con el agente estabilizador auxiliar, sobre solución acuosa de citocromo c, de acuerdo con el presente invento, se indican por los datos de la tabla siguiente:

ninguna materia extraña detectada por el método descrito bajo 15. Inyecciones en Reglas Generales para Preparaciones en la Séptima Revisión de la Farmacopea Japonesa

†: Materia extraña apenas detectada, si es que existe, por el mismo método.

†††: Materia extraña muy marcadamente detectada por el mismo método.

El aspecto correspondiente hasta el grado de puede permitirse para uso como medicina.

203360



Número experimento	Citocromo C (mg./ml.)	Agente estabilizador (mg./ml.)	Agente estabilizador auxiliar (mg./ml.)	Centersido de Citocromo c.			PH
				Aspecto después de 4 semanas a 45° C.	Actividad espectrofotométrica después de 4 semanas a 45° C.	Actividad enzimática después de 4 semanas a 45° C.	
1	15			†††			7
2	4			†††			7
3	3			†††	40	27	7
4	15	NaHSO <sub>3</sub> 2		†	96	100	7
5	4	NaHSO <sub>3</sub> 0.8		†	100	100	7
6	15	Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> 2		†	100	100	7
7	10	Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> 1		†	100	100	7
8	10	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>4</sub> 1		†	100	100	7
9	4	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>4</sub> 0.8		†	100	100	7
10	4	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>4</sub> 0.2		†	100	100	7
11	10	NaHSO <sub>3</sub> 1	Glycina 15	-	98	100	7
12	4	NaHSO <sub>3</sub> 0.8	Glycina 12	-	100	100	7
13	4	NaHSO <sub>3</sub> 0.8	Serina 15	-	100	100	7
14	4	NaHSO <sub>3</sub> 0.8	Oxidrolina 12	-	100	100	7
15	4	NaHSO <sub>3</sub> 0.8	Glycylglycine 15	-	96	100	7
16	4	NaHSO <sub>3</sub> 0.8	Glycylglycylglycine 15	-	100	100	7
17	4	NaHSO <sub>3</sub> 0.8	Alanyl-glycylglycine 15	-	98	100	7
18	4	NaHSO <sub>3</sub> 0.8	Leucylglycylglycine 15	-	100	100	7



1962

283360

En la tabla anterior, la medición del contenido de citocromo c por ensayo espectrofotométrico se realizó de la siguiente manera. La solución a comprobar se deja reposar a 45° C durante 4 semanas y la solución resultante se somete a medición del espectro de absorción a una longitud de onda de 550 m  $\mu$  (luz visible) por medio de un espectrofotómetro. Las absorciones de la solución sometida a reducción forzada de citocromo c con ácido ascórbico y de una solución sometida a oxidación forzada de citocromo c con ferricianato, se miden en paralelo con la misma longitud de onda que arriba. El contenido de citocromo c se calcula entonces, basado en la comparación de estas mediciones. La medición del contenido de citocromo c por el método enzimático se ejecutó de la siguiente manera. La solución a comprobar se dejó reposar a 45° C durante 4 semanas, la solución resultante se sometió a reducción forzada de citocromo c con ácido ascórbico y después se midió la recepción de oxígeno de la solución tratada en presencia de oxidasa de citocromo c por medio del manómetro de Warburg y el contenido de citocromo c se calculó del valor de recepción de oxígeno.

Los siguientes ejemplos se citan para ilustrar el presente invento, pero no deben entenderse como limitadores del alcance del mismo.

EJEMPLO - 1

100 ml. de una solución acuosa de citocromo c en una concentración de 30 mg. por ml., midiéndose el contenido de citocromo c por el método óptico, se diluye con agua destilada a 190 ml. mientras se satura la solución con gas de nitrógeno.



283360

Después de disolver 0,4 g de bisulfito de sodio en la solución diluida, se ajusta el pH de la solución a alrededor de 7 y se añade agua destilada a la solución resultante a un volumen total de 200 ml. La solución resultante se somete a filtración a través de un filtro de Chamberland y el filtrado se llena asepticamente en ampollas en una cantidad de 1 ml. por ampolla.

EJEMPLO - 2

A 100 ml. de una solución acuosa de citocromo c en una concentración de 20 mg. por ml., midiéndose el contenido de citocromo c por el mismo método que en el Ejemplo 1, se añade una solución preparada disolviendo 3 g. de glicilglicina en 50 ml. de agua destilada y ajustando el pH de la solución a alrededor de 7 con solución de hidróxido de sodio. Después de saturar la solución resultante con gas de nitrógeno, se disuelve 0,2 g. de bisulfito sódico en la solución, se añade agua destilada a la solución hasta un volumen total de 200 ml. y la solución así obtenida se llena en ampollas de la misma manera que en el ejemplo 1.

EJEMPLO - 3

A 50 ml. de una solución acuosa de citocromo c en una concentración de 20 mg. por ml., midiéndose el contenido de citocromo c por el mismo método que en el Ejemplo 1, se añade una solución preparada disolviendo 3 g. de glicina en 25 ml. de agua destilada y ajustando el pH de la solución a alrededor de 7 con solución de hidróxido sódico. Después de saturar con gas de nitrógeno la solución resultante, se disuelve 0,2 g. de



DIC. 1962

283360

bisulfito de sodio en la solución, se añade agua destilada a la solución a un volumen total de 200 ml. y la solución así obtenida es llenada en ampollas de la misma manera que en el Ejemplo 1.

5

E J E M P L O - 4

10

A 50 ml. de una solución acuosa de citocromo c en una concentración de 20 mg. por ml., midiéndose el contenido de citocromo c por el mismo método que en el Ejemplo 1, se añade una solución preparada disolviendo 3 g. de l-serina en 25 ml. de agua destilada y ajustando el pH de la solución a alrededor de 7 con solución de hidróxido sódico. Después de saturarse la solución resultante con gas de nitrógeno, 0,2 g. de bisulfito sódico se disuelve en la solución, se añade agua destilada a la solución a un volumen total de 200 ml. y la solución se llena en ampollas de la misma manera que en el Ejemplo 1.

15

E J E M P L O - 5

20

100 ml. de una solución acuosa de citocromo c en una concentración de 30 mg. por ml., midiéndose el contenido de citocromo c por el método óptico, se diluyen con agua destilada a 190 ml. mientras se satura la solución con gas de nitrógeno. Después se disuelve 0,4 g. de metabisulfito de sodio en la solución, el pH de la solución se ajusta a alrededor de 7 y se añade agua destilada a la solución resultante a un volumen total de 200 ml. La solución resultante se somete a filtración a través de un filtro de Chamberland, y el filtrado se llena asépticamente en ampollas en una cantidad de 1 ml. por ampolla.

25

13



EJEMPLO - 6

283360

A 50 ml. de una solución acuosa de citocromo c en una concentración de 20 mg. por ml., midiéndose el contenido de citocromo c por el mismo método que en el Ejemplo 5, se añ

5 de una solución preparada disolviendo 3 g. de glicina en 25 ml. de agua destilada y ajustando el pH de la solución a alrededor de 7 con solución de hidróxido sódico. Después de saturar la solución resultante con gas de nitrógeno, se disuelve 0,15 g. de hidrosulfito de sodio en la solución, se añade agua destila

10 da a la solución a un volumen total de 200 ml. y la solución así obtenida se llena en ampollas de la misma manera que el Ejemplo 5.

EJEMPLO - 7

A 50 ml. de una solución acuosa de citocromo c en una concentración de 20 mg. por ml., midiéndose el contenido de

15 citocromo c por el mismo método que en el Ejemplo 5, se añade una solución preparada disolviendo 3 g. de l-serina en 25 ml. de agua destilada y ajustando el pH de la solución a alrededor de 7 con solución de hidróxido sódico. Después de saturarse con

20 gas de nitrógeno la solución resultante, se disuelve 0,2 g de sulfito sódico en la solución, se añade agua destilada a la solución a un volumen total de 200 ml. y la solución se llena en ampollas de la misma manera que en el Ejemplo 5.

-----

-----

283360



N O T A

La presente patente de invención comprende las siguientes reivindicaciones.

5 1.- Procedimiento para estabilizar una solución acuosa de citocromo c, caracterizado porque comprende la operación de incorporar un agente estabilizador, seleccionado del grupo consistente en sulfitos de metal de álcali, bisulfitos de metal de álcali, hidrosulfitos de metal de álcali y metabisulfitos de metal de álcali, en una solución acuosa de citocromo c.

10 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque comprende la operación de incorporar un agente estabilizador, seleccionado del grupo consistente en sulfitos, bisulfitos, hidrosulfitos y metabisulfitos de metal de álcali en combinación con un agente estabilizador auxiliar seleccionado del grupo consistente en glicina, alanina y oxiprolina en una solución acuosa de citocromo c.

15 3.- Procedimiento según las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque comprende la operación de incorporar un agente estabilizador, seleccionado del grupo consistente en sulfitos, bisulfitos, hidrosulfitos y metabisulfitos de metal de álcali juntamente con un agente estabilizador auxiliar seleccionado del grupo consistente en glicilglicina, glicilglicilglicina, alanilglicilglicina y leucilglicilglicina, en una solución acuosa de citocromo c.

20 25



283360

4.- Procedimiento para estabilizar una solución acuosa de citocromo c.

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

Madrid, a 15 de Diciembre de 1962.

CARLOS ROEB  
R.R.