

MINISTERIO DE INDUSTRIA Y ENERGIA  
Registro de la Propiedad Industrial



ESPAÑA

PATENTE DE INVENCION

ES

11	NÚMERO	AI
21	478.983	
25	FECHA DE PRESENTACION	
	27 Marzo 1979	

no de acuerdo  
con en la pre-  
según el con-  
junto adjunta.

30	PRIORIDADES:	32	FECHA	33	PAIS
31	NÚMERO				
	P 28 14 154.0		1-4-78		R.F.A.
<b>CADUCADO</b>					

47	FECHA DE PUBLICIDAD	51	CLASIFICACION INTERNACIONAL	62	PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
			E07H19/14//A61K39/00		

64	TITULO DE LA INVENCION
	"PROCEDIMIENTO PARA LA ESTABILIZACION DE NICOTINAMIDO-ADENIN- -DINUCLEOTIDOS"

71	SOLICITANTE (S)
	BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT (HCE 78/B 003)

DOMICILIO DEL SOLICITANTE
D-3550 Marburg/Lahn, República Federal Alemana

72	INVENTOR (ES)
	Dr. Joseph Stärk y Dr. Reinhard Müller-Matthesius

73	TITULAR (ES)

74	REPRESENTANTE
	DON OSCAR DE ELZABURU MARQUEZ (P.-71.331)

La invención se refiere a un procedimiento para estabilizar nicotinamido-adenin-dinucleótidos, especialmente el nicotinamido-adenin-dinucleótido libre en forma reducida u oxidada y su fosfato, igualmente en forma reducida u oxidada.

En la química clínica, en la bioquímica, en la química alimentaria, en la farmacia y en otros sectores se utilizan muchas veces reacciones enzimáticas para fines analíticos. Especialmente en el diagnóstico rutinario químico-clínico se investigan enzimáticamente de modo diario metabolitos y enzimas en muchas muestras de sangre, suero, plasma, líquido y orina. Debido a la inestabilidad de muchos componentes de la reacción se ha hecho usual precisamente en los laboratorios de rutina clínico-químicos emplear envases de combinación fabricados industrialmente, que permiten la preparación de soluciones de reactivos listas para el uso con un mínimo de gasto.

Por consiguiente se establece la misión de proporcionar preparados con un período de utilización lo más grande posible. En el interés de obtener un modo de trabajo sencillo en la utilización de los reactivos se pretende o se está obligado a envasar en un recipiente el mayor número posible de las sustancias necesarias para la realización del ensayo. Se ha manifestado, no obstante, que diferentes sustancias pueden influirse recíprocamente de forma negativa en su estabilidad, aún cuando estén presentes en forma liofilizada o envasada en saco. Por esta

razón tiene gran importancia descubrir sustancias aditivas (estabilizadores) adecuadas, que aumenten el período de utilización de los reactivos.

5                    Productos bioquímicos especialmente inestables, que ya plantean en sí mismos grandes problemas no sólo en forma disueltas, sino también en estado liofilizado o envasado en seco, son nicotinamido-adenin-dinucleótido o fosfato de nicotinamido-adenin-dinucleótido, ambos tanto en su forma reducida como en su forma oxidada. Estas  
10                    sustancias son necesarias como coenzimas en muchísimas determinaciones enzimáticas y constituyen en la forma reducida al mismo tiempo el colorante para la medición fotométrica.

15                    Como consecuencia de la descomposición de las mencionadas coenzimas la sustancia a detectar no puede ser ya medida fotométricamente de forma irreprochable o no puede serlo de ningún modo, dado que la sustancia absorbente esté presente en concentración demasiado pequeña o la velocidad de la reacción a medir es demasiado pequeña  
20                    a causa de la concentración disminuida de la coenzima. En el caso de la determinación de la actividad de lactato-des

                    piruvato +  $\text{NADH}_2$   $\xrightarrow{\text{LDH}}$  L-lactato + NAD  
25                    se añade como complicación adicional el hecho de que la coenzima reducida nicotinamido-adenin-dinucleótido ( $\text{NADH}_2$ )

5 en el curso del almacenamiento forma inhibidores de LDH, que pueden conducir a valores de LDH fálsemente negativos en grado considerable. Estos inhibidores pueden hacerse activos ya en grado intenso, antes de que sea detectable de algún modo una pérdida de concentración de  $\text{NADH}_2$ .

10 No obstante, también en muchas otras determinaciones importantes tales como detección de aspartato-transaminasa, alanin-trensaminasa,  $\alpha$ -hidroxibutirato-deshidrogenasa, creatino-quinasa, glutamato-deshidrogenasa, en la determinación totalmente enzimática de urea, en la determinación enzimática de triglicéridos o en la determinación de glucosa según el procedimiento de hexoquinasa, el nicotinamido-adenin-dinucleótido o el fosfato de nicotinamido-adenin-dinucleótido en forma reducida u oxidada se incluyen entre los componentes sensibles, que limitan el período de utilización del envase de ensayo, para cuya estabilización existe un interés extraordinario.

15 A partir de las memorias de patentes alemanas 12 89 668 y 15 98 157 se conocen el glutatión así como cisteína, cisteín-carbámda y acetil-cisteína como agentes estabilizadores para nicotinamido-adenin-dinucleótidos reducidos. En la memoria de patente 19 30 059 se describe polivinilpirrolidona (PVP) como estabilizador para fosfato de nicotinamido-adenin-dinucleótido reducido y oxidado.

También se consideren como adecuados para ello goma acacia o goma arábiga y manita.

Se han añadido también albúmina y gelatinas ya como materiales de carga a coenzimas estabilizadas (patente alemana 19.30 059).

En la memoria de patente alemana 11 83 629 está descrito un procedimiento para la estabilización de material biológicamente activo tal como bacterias, productos de metabolismo de bacterias, virus, sueros y enzimas. Para ello se emplea una gelatina, degradada hidrolíticamente, reticulada con un diisocianato, preferentemente en combinación con L-glutamato de sodio. Tal como lo muestran especialmente los ejemplos en esta memoria de patente, tal agente estabilizador tiene importancia especialmente para la preparación de vacunas y para la conservación de estructuras antígenas e inmunógenas.

La multiplicidad de los estabilizadores utilizados muestra que su actividad no es todavía satisfactoria en lo que se refiere a nucleótidos.

Sorprendentemente se ha hallado ahora que nicotinamido-adenin-dinucleótidos oxidados y reducidos y también sus fosfatos tienen una estabilidad mejor en reactivos conocidos hasta ahora, si contienen colágeno hidrolíticamente degradado, eventualmente reticulado, preferentemente gelatina tratada de tal manera.

Objeto de la invención es por consiguien-  
te una mezcla estable a base de

5 a) nicotinamido-adenin-dinucleótido en forma reducida u  
oxidada o fosfato de nicotinamido-adenin-dinucleótido en  
forma reducida u oxidada y

b) colágeno hidrolíticamente degradado, eventualmente re-  
ticulado.

Objeto de la invención es además un pro-  
cedimiento para la estabilización de nicotinamido-adenin-  
10 -dinucleótido en forma reducida u oxidada o/y de fosfato  
de nicotinamido-adenin-dinucleótido en forma reducida u  
oxidada, que se caracteriza porque la solución del nucleó-  
tido es mezclada con un colágeno hidrolíticamente degrada-  
do, eventualmente reticulado, después de lo cual la mezcla  
15 es en caso deseado secada, preferentemente liofilizada.

La concentración del producto de coláge-  
no en la solución acuosa así como en el producto seco por  
1 g de nucleótido es de 0,001 hasta 1.200 g, preferente-  
mente de 0,01 hasta 300 g, sobre todo de 0,5 hasta 20 g.

20 Productos de colágeno especialmente ade-  
cuados son los conocidos a partir de la patente alemana  
11 18 792 y de la patente alemana 11 55 134. Estos son pre-  
parados degradando colágeno o sus productos de degradación  
en solución acuosa a una temperatura de 60 hasta 150°C  
25 hasta un peso molecular de 2.000 hasta 20.000, preferente-

mente de 5.000 hasta 10.000, haciendo reaccionar el colágeno degradado con un diisocianato a temperaturas de 0 hasta 100°C en el margen de pH neutro hasta débilmente alcalino, eventualmente en presencia de disolventes orgánicos inertes, siendo la cantidad de isocianato utilizada menor que la que se calcula a partir del número de los grupos amino y guanidino presentes en el colágeno degradado, y siendo preferentemente de alrededor de 20 hasta 80% de esta cantidad, ajustando a continuación el producto de reticulación resultante a un valor de pH de aproximadamente 7,0 haciendo reaccionar productos de degradación de colágeno con diisocianatos a temperaturas de 0 hasta 100°C en el margen de pH neutro o débilmente alcalino, eventualmente en presencia de disolventes orgánicos inertes, siendo la cantidad de isocianato utilizada de 20 hasta 80% de la que se calcula a partir del número de los grupos amino y guanidino presentes, degradando los productos de reticulación resultantes en solución acuosa a temperaturas de 60 hasta 150°C hasta un peso molecular de 10.000 hasta 100.000, y ajustando las soluciones obtenidas a un valor de pH de 7. En forma de solución al 3,5% con un peso molecular medio de 35.000 éstos se presentan en el comercio también como solución para infusión como sustitutivo del plasma.

Aún cuando el valor de pH de la solución estabilizada de nucleótido no tiene ninguna importancia de-

5 -cisiva para el efecto de estabilización, se recomienda evitar valores de pH extremados, en consideración a las sustancias sensibles. El margen de pH preferido de la solución se encuentra por consiguiente entre pH 5 y 11. Se observaron efectos de estabilización especialmente buenos con valores pH comprendidos entre 7 y 9.

10 Para el ajuste del valor de pH pueden emplearse las sustancias tampón usuales. Ejemplos de sustancias tampón adecuadas son mezclas de diferentes sales de metales alcalinos de ácidos débiles o de fuerza media tales como ácido fosfórico o ácido bórico, mezclas de ácidos débiles o de fuerza media con sus sales de metales alcalinos (por ejemplo ácido ftálico, ftalato de metal alcalino) o tampones a base de determinados compuestos orgánicos tales como tris-hidroximetilaminometano o similares, tal como se emplean generalmente en reacciones bioquímicas.

15 El agente, estabilizado según el procedimiento, manifiesta su excelente estabilidad especialmente en forma seca, preferentemente liofilizada. La proporción en peso del producto de colágeno o nucleótido en el producto seco corresponde a la de la solución acuosa.

20 Objeto de la invención es además la utilización de un colágeno hidrolíticamente degradado, eventualmente reticulado, para la estabilización de nicotina-

mido-adenin-dinucleótido o/y de fosfato de nicotinamido-adenin-dinucleótido, en cada caso tanto en forma reducida como también en forma oxidada.

5 Los nicotinamido-adenin-dinucleótidos secos estabilizados conforme a la invención, o sus mezclas con el producto de colágeno, son fácilmente solubles en agua. El estabilizador conforme a la invención posee a las longitudes de onda de Hg 334 nm, Hg 366 nm ó 340 nm una extinción propia muy pequeña, de tal manera que no se hace  
10 apreciable de forma perturbadora en la medición fotométrica por elevación de la extinción de fondo. Aquél carece de influencia sobre la actividad de las enzimas empleadas usualmente como reactivo o que han de detectarse, por ejemplo de alanin-transaminasa, aspartato-transaminasa, lactato-deshidrogenasa, glutamato-deshidrogenasa, malato-deshidrogenasa y ureasa.

Los nicotinamido-adenin-dinucleótidos estabilizados conforme a la invención pueden ser liofilizados o bien por sí solos o juntamente con otros componentes, que son necesarios para la realización del ensayo. Ejemplos de tales componentes son sustratos (por ejemplo alanina, aspartato, glutamato, piruvato, 2-oxobutirato, 2-oxoglutarato), enzimas auxiliares (por ejemplo, malato-deshidrogenasa, lactato-deshidrogenasa, ureasa, glutamato-deshidrogenasa), otras coenzimas tales como difosfato de  
20  
25

adenosina o trifosfato de adenosina, o sustancias tampón usuales en la enzimología tales como tris-hidroximetilaminometano - HCl y otras tales como las citadas anteriormente. El efecto estabilizador, especialmente favorable, del agente conforme a la invención sobre nicotinamido-adenin-dinucleótidos se deduce de los siguientes ejemplos. A este respecto hay que hacer observar que las comprobaciones de estabilidad se realizan con drásticas sollicitación de temperatura a + 37°C, con el fin de reconocer más rápidamente el efecto estabilizador. Normalmente, los preparados son almacenados no obstante a + 2°C hasta + 6°C, resultando estabilidades esencialmente mayores.

Ejemplo 1:

En soluciones con 1,56 % del estabilizador obtenido según la patente alemana 11 18 792 o con 2,1 % de polivinilpírrrolidona (PVP), fueron disueltos en cada caso 1,14 milimoles/litro de nicotinamido-adenin-dinucleótido reducido (NADH<sub>2</sub>). La mezcla resultante fue envasada en porciones iguales en frascos de vidrio, y liofilizada. Los frascos de vidrio fueron almacenados a + 37°C. En diferentes momentos fueron utilizadas muestras del liofilizado para la determinación de la lactato-deshidrogenasa o fue determinada la cantidad de NADH<sub>2</sub> que había quedado en el liofilizado.

La determinación de la actividad de LDH

se efectuó conforme a las recomendaciones de la Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie, Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 10, 182 (1972).

5

Los inhibidores formados durante el almacenamiento del liofilizado se harían apreciables en la determinación de la actividad de LDH por una disminución de los valores.

10

La cantidad de NADH<sub>2</sub> remanente en el liofilizado fue determinada según W. Gerhardt y otros, Scand. J.Clin.Lab.Invest. 33, 1 (1974).

15

Almacenamiento a + 37° C	Actividad de LDH en estabilizador conforme a la invención	PVP como estabilizador	Cantidad de NADH <sub>2</sub> en estabilizador conforme a la invención	PVP como estabilizador
Valor de partida	100%	100%	100%	100%
3 días	98%	88%	100%	94%
7 días	100%	81%	100%	95%
14 días	96%	65%	100%	89%
21 días	100%	56%	98%	82%
28 días	100%	45%	99%	72%

20

Ejemplo 2:

(Reactivo para urea)

25

Una solución con 40 g/litro del agente obtenido según la patente alemana 11 55 134, 4,54 milimoles/litro de NADH<sub>2</sub>, 357 milimoles/litro de 2-oxoglutarato y 18 unidades/ml de

glutamato-deshidrogenasa fue liofilizada en frascos de vidrio. Los frascos de vidrio fueron almacenados a  $+ 37^{\circ}\text{C}$ . En determinados momentos, reproducidos en la tabla, fueron disueltas muestras del liofilizado en tampón de tris-hidroximetilaminometano, pH 8,0, mezcladas con un exceso de iones de amonio, y sometidas a una determinación del contenido de  $\text{NADH}_2$  por vía fotométrica a 340 nm. La siguiente tabla muestra el resultado:

10	Almacenamiento a 37° C	Concentración de $\text{NADH}_2$
	Valor de partida	100 %
	14 días	93 %
	28 días	91 %
	54 días	88 %
15	84 días	87 %

De igual manera pueden ser estabilizados otros reactivos que contienen nucleótidos. Se obtienen resultados similarmente buenos, si se mezclan 1 - 3 g de nucleótido con 2 hasta 20 g de producto de colágeno.

Ejemplo 3:

Cada vez en 55 ml de agua fueron disueltos 0,86 g del estabilizador obtenido según la patente alemana 11 18 792 ó

0,86 g de

25 polivinilpirrolidona (PVP). En ambos líquidos fueron disuel

tos a continuación en cada caso 54,6 mg de fosfato de nicotinamido-adenin-dinucleótido reducido (NADPH<sub>2</sub>), la mezcla resultante fue envasada en porciones iguales en frascos de vidrio y liofilizada. Los frascos de vidrio fueron almacenados a + 37°C. En determinados momentos, reproducidos en la table, fueron abiertos los frascos y el contenido de NADPH<sub>2</sub> del contenido liofilizado fue medido fotométricamente por medio de la reacción



Resultados:

Almacenamiento a + 37°C	Contenido de NADPH <sub>2</sub>	
	Estabilizador conforme a la invención	PVP como estabilizador
Valor de partida	100 %	100 %
7 días	100 %	98 %
15 días	98 %	93 %
21 días	97 %	90 %
28 días	94 %	80 %

5

10

15

20

25

REIVINDICACIONES

5

Los puntos de invención propia y nueva, que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los que se recogen en las reivindicaciones siguientes:

10

1ª.- Procedimiento para la estabilización de nicotinamido-adenin-dinucleótidos, caracterizado porque se mezcla una solución del nucleótido con un colágeno hidrolíticamente degradado, eventualmente reticulado, en la proporción de 1:0,001 a 1:1200, se ajusta el pH a un valor comprendido entre 5 y 11, y se seca la solución, preferiblemente por liofilización.

15

2ª.- Procedimiento para la estabilización de nicotinamido-adenin-dinucleótidos.

Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede y con los fines que se han especificado.

20

Esta Memoria consta de trece hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 26. MAR 1930

P.A.

25

Oscar de Elizaburu  
Por Poder.



30