



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 183 732**
(21) Número de solicitud: 200101785
(51) Int. Cl.⁷: **C07F 3/06**

(12)

PATENTE DE INVENCIÓN

B1

(22) Fecha de presentación: **30.07.2001**
(43) Fecha de publicación de la solicitud: **16.03.2003**
Fecha de la concesión: **20.05.2004**
Fecha de modificación de las reivindicaciones:
14.02.2003
(45) Fecha de anuncio de la concesión: **16.06.2004**
(45) Fecha de publicación del folleto de la patente:
16.06.2004

(73) Titular/es: **Universidad Autónoma de Madrid
Ctra. Colmenar, Km. 15
28049 Madrid, ES**
(72) Inventor/es: **Navarro Ranninger, Carmen;
García Cañada, Jorge;
Pérez, José Manuel;
Gómez Quiroga, Adoración y
Fuertes Villadangos, Miguel Ángel**
(74) Agente: **Riera Blanco, Juan Carlos**

(54) Título: **Procedimiento para la síntesis de los compuestos de fórmula $[ZnCl_2(isopropilamina)_2]$ y su aplicación como preservador de la actividad enzimática en extractos de la catalasa.**

(57) Resumen:
Procedimiento para la síntesis del compuesto de fórmula $[ZnCl_2(isopropilamina)_2]$ y su aplicación como preservador de la actividad enzimática en extractos de la catalasa, que comprende la preparación del complejo $[ZnCl_2(isopropilamina)_2]$ y su caracterización. También se incluyen los ensayos que demuestran que el compuesto es aplicable como conservante de la actividad de la catalasa en extractos de BLCase (beef liver catalase).

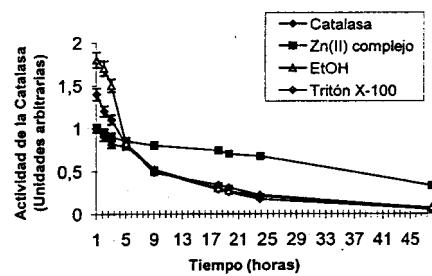


FIG.1

DESCRIPCION

Procedimiento para la síntesis del compuesto de fórmula $[ZnCl_2(isopropilamina)_2]$ y su aplicación como preservador de la actividad enzimática en extractos de la catalasa.

Objeto de la invención

La presente memoria comprende la preparación del complejo $[ZnCl_2(isopropilamina)_2]$ y su caracterización. También se incluyen ensayos del compuesto con el extracto de catalasa BLCCase.

Campo de la invención

Esta invención tiene su aplicación dentro de la industria dedicada a la fabricación de productos de laboratorio e investigación para mantener por largos períodos de tiempo la actividad de extractos de catalasa.

Antecedentes de la invención

Species reactivas tales como: radicales superóxidos, radicales hidroxilo y el peróxido de hidrógeno se generan en las reacciones de reducción del oxígeno molecular a agua. El poder de estas especies para dañar proteínas, lípidos, y ácidos nucleicos requiere la existencia tanto de antioxidantes como de cierto tipo de enzimas [B. Halliwell, J.M.C. y Gutteridge. Methods Enzymol. 186 (1990) 1-90]. Existen dos familias de enzimas capaces de degradar peróxido de hidrógeno que están presentes en todos los organismos aeróbicos: las catalasas y las peroxidases [S. Izawa y col. Biochem. J. 320 (1996) 61-67]. La falta o la función anormal de las catalasas puede tener importantes efectos secundarios tales como: muerte celular por apoptosis, y aumento de la susceptibilidad a daños térmicos [S. Jayanthi y col. Brain Res Mol Brain Res. 72 (1999) 158-65], alta tasa de mutación [J.A. Leff. Inflammation. 17 (1993) 199-20] e incluso inflamaciones en cierto tipo de organismos [B. Halliwell, O.I. Aruoma. FEBS Letters. 281 (1991) 9-19].

La catalasa (EC 1.11.1.6, peróxido de hidrógeno reductasa) está presente en casi todos los organismos aeróbicos y sirve para proteger las células de los efectos tóxicos que produce la reacción (1):



La estructura de la catalasa ha sido determinada por resolución atómica en catalasas aisladas de varios organismos procariotas y eucariotas. A pesar de las dificultades que conlleva la resolución por difracción de rayos X, se ha determinado la estructura de la catalasa BLCCase con un buen grado de resolución [M.R.N. Murthy y col. J. Mol. Biol. 152 (1981) 465.; I. Fita y col. Acta Crystallog. Sect. B. 42 (1986) 497].

Los compuestos formados a partir de metales pesados pueden afectar a la actividad de los enzimas y a sus sistemas, a través de la célula. De hecho, tanto una exposición corta de un animal a Ni o Hg, como un tratamiento a largo plazo con Fe producen una estimulación de la oxidación de los lípidos de membrana [R.S. Britton y col. Hepatology 11 (1990) 93.; M.P. Popova y col. Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci. 44 (1991) 53]. Además, se conoce que Cu y Zn pueden inhibir *in vitro* la aminopirina-N-desmetilasa y que, a altas concentraciones, estos metales producen también el

mismo efecto en la actividad de la anilina hidroxilasa [J.J. Moreno y col. Comp. Biochem. Physiol. B. 93 (1989) 355].

Por otro lado, se ha descubierto que compuestos como el etanol y el Tritón X-100 (detergente no iónico) potencian la actividad de la catalasa en varios extractos de tejidos [G. Cohen y col. Anal. Biochem. 34 (1970) 30-38]. El etanol aumenta los niveles observables de catalasa y descompone el Complejo II, el cual se forma espontáneamente en los tejidos como compuesto inactivo de la catalasa por acción del H_2O_2 . El Tritón X-100 también aumenta los niveles de catalasa en extractos de catalasa pero a través de su solubilización del enzima.

Descripción de la invención

En la presente invención se presenta la síntesis y caracterización del nuevo complejo $[ZnCl_2(isopropilamina)_2]$. Este complejo mantiene por largos períodos de tiempo (más de 48 horas) la actividad del extracto de catalasa de hígado de ternera (BLCCase). Además, se presentan datos que sugieren que este efecto de preservación puede ser debido a la disminución de la catalasa precipitada en el extracto.

Descripción de los dibujos

La figura número 1.- Corresponde a un esquema relativo a la variación de la actividad enzimática en extractos de catalasa como función del periodo de incubación a $37^\circ C$ para los compuestos incluidos en la leyenda.

La figura número 2.- Representa gráficamente la electroforesis en gel de SDS-12% PAGE en condiciones desnaturalizantes de las proteínas presentes en alícuotas de los sobrenadantes y precipitados resuspendidos obtenidos de los extractos de la BLCCase incubados durante 5 horas a $37^\circ C$ con $0.10 \mu M$ de $[ZnCl_2(isopropilamina)_2]$, $ZnCl_2$, etanol o Tritón X-100.

Realización preferente de la invención

El procedimiento para la síntesis del compuesto de fórmula $ZnCl_2(isopropilamina)_2$ y su aplicación como preservador de la actividad enzimática en extractos de catalasa, está constituido a partir de lo siguiente:

1. Síntesis de $[ZnCl_2(isopropilamina)_2]$

Se disuelven 0.3 g de $ZnCl_2$ (2.2 mmol) en 4 mL de agua destilada (calidad Millipore), posteriormente se añade, bajo agitación y a temperatura ambiente, un exceso de isopropilamina (6 mL, 70 mmol) A un pH de 14 precipita un precipitado blanco formando una suspensión que se deja evaporar a temperatura ambiente hasta sequedad. El sólido resultante se recristaliza en metanol y posteriormente se disuelve en acetona para finalmente precipitarlo con éter etílico.

Rendimiento: 60% .

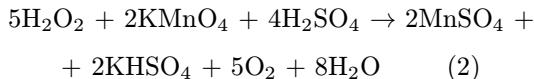
Analisis elemental para $ZnCl_2C_6H_{18}N_2$. Calculado: C 28.32% ; H 7.13% ; N 11.01% Encontrado: C 28.68% ; H 7.27% ; N 11.25% .

1H NMR ($CDCl_3$) (ppm): 1.36 d ($6H$), $2CH_3$; 3.46 sp ($1H$), CH ; 5.31 s.a. ($2H$), NH_2 .

2. Ensayo de actividad de la catalasa

La actividad de la catalasa fue determinada por procedimiento redox [D. Keilin y E.F. Hartree. Biochem. J. 60 (1955) 310-325]. Como sustrato de la enzima fue utilizada una disolución de 0.4% de H_2O_2 . Se incuba 1 mL de extracto de BCLase

(0.075 mg/mL) ó 0.05 μ M de BCLase cristalina con 10 ml de una disolución de 0.4 % of H_2O_2 durante 5 minutos. Dicha reacción se detiene con 10 mL de una disolución de H_2SO_4 1M. La catalasa descompone el H_2O_2 de acuerdo con la reacción 2, donde $KMnO_4$ actúa como oxidante y H_2O_2 como reductor.



$KMnO_4$ fue añadido con una bureta a la muestra hasta que se observa color rosa. Este cambio de color indica que todo el H_2O_2 que había en la disolución se ha sido oxidado por el $KMnO_4$. La cantidad inicial de H_2O_2 fue valorada en una muestra sin enzima y la cantidad de H_2O_2 descompuesto, de cada muestra que contiene la enzima, fue calculado restando la cantidad inicial de H_2O_2 en la muestra sin enzima de la cantidad de H_2O_2 obtenida en cada muestra con catalasa. Los resultados fueron expresados en porcentaje de cambio en la actividad de la enzima, asumiendo que bajo las condiciones experimentales ensayadas, la descomposición de H_2O_2 por la catalasa sigue una cinética de primer orden [G. Cohen y col. Anal. Biochem. 34 (1970) 30-38]. La actividad de la catalasa fue también determinada espectroscópicamente a 480 nm.

3. Efecto del $[ZnCl_2(isopropylamina)_2]$ en la actividad de la catalasa

Las disoluciones stock $[ZnCl_2$ (isopropilamina)₂], $ZnCl_2$, $ZnSO_4$, $Zn(NO_3)_2$, $CuCl_2$, $CdCl_2$, $CrCl_3$, isopropilamina y etanol fueron preparadas en agua destilada y a una concentración de 1 mg/mL. Estos compuestos fueron incubados con el extracto de BCLase (0.075 mg proteína/mL) o BCLase cristalina (0.05 μ M) en 50 mM de una disolución tampón de fosfato pH 7.0 adicionando la cantidad necesaria de disolución de enzima para obtener las concentraciones de compuesto final: 0.05, 0.10 y 0.25 μ M.

Tritón X-100, como se recibió del proveedor, se adicionó directamente de la botella a la disolución de la enzima tamponada hasta obtener una concentración final de 1 % (v/v). Despues de varios periodos de incubación (1 h, 2.5 h, 5 h, 9 h, 18 h, 19,5 h 24 h and 48 h) a 37°C, la actividad de la enzima se determinó por adición de disoluciones 0.4 % de H_2O_2 a las muestras. La reacción se dejó durante 5 minutos a temperatura ambiente y se detuvo con una disolución de H_2SO_4 1M. Bajo estas condiciones, la reacción de la catalasa sigue una cinética de orden lineal.

4. Electroforesis en gel de poliacrilamida del extracto de catalasa

El complejo $[ZnCl_2$ (isopropilamina)₂] fue incubado con extracto de BCLCase (0.075 mg proteína/mL) en 50 mM de una disolución tampón fosfato pH 7.0. La concentración final de $[ZnCl_2$ (isopropilamina)₂] fue de 0.10 μ M. Despues de 24 y 48 horas de incubación, las muestras se centrifugaron a 12000 r.p.m. Los sobrenadantes se separaron en alícuotas de 10 μ L y se sometieron a electroforesis en un gel de SDS-12% poliacrilamida (PAGE) bajo condiciones desnaturalizantes [M.W. Fraaije y col. Eur. J. Biochem. 235 (1996) 192-198]. El precipitado fue resuspendido en 50

mM de una disolución tampón de fosfato pH 7.0 y sometido a electroforesis en gel SDS-12% PAGE en alícuotas de 10 μ L en condiciones desnaturalizantes.

5 Ejemplo 1

Actividad frente a la catalasa

En la presente patente se presentan también los resultados que ponen de manifiesto como el complejo $[ZnCl_2(isopropylamina)_2]$ retarda de una manera eficaz el decaimiento de la actividad enzimática en extractos de catalasa de hígado de ternera en comparación con el extracto, utilizado como control, sin tratar con el complejo de Cinc.

En la figura 1 se muestra la variación de la actividad enzimática en extractos de catalasa (en unidades arbitrarias) como una función del periodo de incubación del extracto de BLCCase con $[ZnCl_2(isopropylamina)_2]$ a su concentración óptima (0.10 μ M). Disoluciones de etanol (0.10 μ M) y Tritón X-100 (1 % v/v) fueron usadas como controles positivos, ya que son compuestos, de los que se conoce que aumentan considerablemente la actividad de la catalasa en extractos de tejidos. Se observa que la actividad de la catalasa en el extracto sin tratar utilizado como control decae en función del tiempo desde 0 a 24 horas incubando a 37°C. El mayor decaimiento en la actividad (desde el 80 % al 50 % con respecto a la actividad inicial) se observa entre las 5 y 9 horas de incubación. La actividad de la BLCCase es de sólo el 17 % de la inicial después de 24 horas de incubación, mientras que la actividad del extracto de BLCCase control es de sólo el 5 % del inicial.

Por el contrario, la incubación del extracto de la catalasa a 37°C con 0.10 μ M de $[ZnCl_2$ (isopropilamina)₂] da lugar a un gran retraso en la disminución de la actividad enzimática en extractos de catalasa, por eso después de 24 dicha actividad es del 67 % con respecto del inicial. Incluso después de 48 horas de incubación la actividad de la catalasa se mantiene en un 33 % de la inicial. Es importante resaltar (figura 1) que $[ZnCl_2$ (isopropilamina)₂] no aumenta la actividad de la catalasa por enzima del valor de la actividad encontrada para el extracto BCLCase control incubado 1 hora a 37°C. Por el contrario, tanto el etanol como el Tritón X-100 aumentan la actividad de la catalasa a cortos periodos de incubación (intervalos entre 1 y 2.5 horas). Así pues, en la figura 1 se muestra que después de una hora de incubación a 37°C del extracto de la BLCCase tanto con 0.10 μ M etanol como con 1 % (v/v) Tritón X-100, la actividad de la catalasa es de 1.8 veces y 1.4 veces, respectivamente, más alta que la del extracto control. Sin embargo, después de 5 horas de incubación del extracto de BLCCase tanto con etanol como con Tritón X-100, la actividad de la catalasa decae de una forma similar a la encontrada en el control.

Estos resultados indican que tanto el etanol como el Tritón X-100 potencian la actividad catalasa a cortos periodos de incubación. Por el contrario, $[ZnCl_2(isopropylamina)_2]$ induce un efecto protector en la actividad de la catalasa en el extracto de BLCCase sobre un rango amplio de periodos de incubación pero no produce potenciación de la actividad enzimática en extractos de catalasa. Se han incubado, además, la BLCCase cristalina con $[ZnCl_2(isopropylamina)_2]$, etanol o

Tritón X-100 en un amplio rango de concentraciones y periodos de incubación, no observándose ningún tipo de efecto sobre la actividad del enzima. Por lo tanto, todos estos datos indican que el compuesto $[ZnCl_2(isopropilamina)_2]$ tiene aplicación como conservante de la actividad catalasa en muestras de extractos comerciales de BLCCase en las que no se vaya a determinar la actividad catalasa durante las primeras 24 horas.

Ejemplo 2

Efecto de $[ZnCl_2(isopropilamina)_2]$ en el extracto catalasa de hígado de ternera (BLCCase)

Como se ha discutido en el ejemplo 1, $[ZnCl_2(isopropilamina)_2]$ no produce ningún cambio en la actividad de la BLCCase cristalina y, además $[ZnCl_2(isopropilamina)_2]$ no enlaza covalentemente a la enzima. Por eso, es razonable asumir, que la conservación de la actividad enzimática en extractos de catalasa por $[ZnCl_2(isopropilamina)_2]$ en el extracto de BLCCase debe ser consecuencia de un efecto indirecto sobre la catalasa. Sorprendentemente, durante el curso de los experimentos sobre la actividad de la catalasa, nosotros observamos que la turbidez de las disoluciones de extracto de catalasa incubadas con $[ZnCl_2(isopropilamina)_2]$ aumenta con el tiempo.

La tabla 1 muestra los valores de densidad óptica a 300 nm obtenida en el control del extracto de BLCCase incubado con 0.10 μM de $[ZnCl_2(isopropilamina)_2]$, $ZnCl_2$, etanol y 1% (v/v) de Tritón X-100 durante 1 hora y 24 horas. Se puede observar que después de 24 horas de incubación a 37°C, la turbidez en el extracto de la BLCCase y en el extracto de la BLCCase tratado con $ZnCl_2$, etanol o Tritón X-100 aumenta hasta 5 veces en un periodo de 1 hora. Sin embargo la turbidez en el extracto de la BLCCase incubada con $[ZnCl_2(isopropilamina)_2]$ durante 24 horas aumenta 10 veces en relación con la turbidez del control del extracto incubado durante 1 hora.

Estos resultados indican que después de 24 horas de incubación a 37°C, la precipitación de los componentes proteínicos del extracto de BLCCase tratado con $[ZnCl_2(isopropilamina)_2]$ es dos veces más alto que el del control del extracto de la BLCCase o de los incubados con $ZnCl_2$, etanol o Tritón X-100.

La Figura 2 muestra los resultados obtenidos cuando las alícuotas de los sobrenadantes y precipitados resuspendidos obtenidos de los extractos de la BLCCase incubados durante 5 horas a 37°C con 0.10 μM de $[ZnCl_2(isopropilamina)_2]$ fueron sometidos a electrofóresis en gel SDS-12% PAGE

bajo condiciones desnaturizantes.

Se observa que la cantidad de proteínas que precipita es dos veces más alta en los residuos precipitados del extracto tratado con $[ZnCl_2(isopropilamina)_2]$ (carril 9) que en el control del extracto de la BLCCase (carril 6). Además, es importante puntualizar que en los sobrenadantes del extracto tratado con $[ZnCl_2(isopropilamina)_2]$ la banda correspondiente a los monómeros de la BLCCase (PM= 57.500, ver carril control 2) está libre de algunas fracciones de proteína con menor peso molecular, que sin embargo están presentes en el extracto control (carriles 8 y 5, respectivamente). La figura 4B muestra el resultado obtenido cuando las alícuotas de los sobrenadantes del extracto incubado con 0.10 μM de $[ZnCl_2(isopropilamina)_2]$ y incubados durante 48 horas a 37°C fueron sometidos a electrofóresis en gel SDS-12% PAGE bajo condiciones desnaturizantes. En este gel se puede observar que la banda correspondiente al monómero de BLCCase (carril 2) tiene mayor intensidad en el sobrenadante obtenido del extracto incubado con $[ZnCl_2(isopropilamina)_2]$ (carril 3) que en el control que del extracto (carril 4).

Sorprendentemente, encontramos que la actividad de la catalasa en los sobrenadantes procedentes del extracto de BLCCase incubados con $[ZnCl_2(isopropilamina)_2]$ es similar al del extracto de BLCCase entero (dato no mostrado). Este resultado sugiere que el compuesto $[ZnCl_2(isopropilamina)_2]$ favorece la precipitación de una gran cantidad de proteínas presentes en el extracto de la BLCCase pero sin inducir precipitación de la catalasa, por lo que limpia la muestra de catalasa de proteínas contaminantes.

TABLA 1

Valores de densidad óptica a 300 nm para extractos de BLCCase (0.075 mg de proteína/ml) incubados 1 hora y 24 horas con 0.10 μM de $[ZnCl_2(isopropilamina)_2]$, $ZnCl_2$ ó etanol y 1% (v/v) de Tritón X-100. SD= desviación estándar

	OD _{300nm} (valor \pm SD)	
	1 hora	24 horas
Catalasa control	0.012 \pm 0.07	0.064 \pm 0.06
$[ZnCl_2(isopropilamina)_2]$	0.010 \pm 0.04	0.126 \pm 0.04
$ZnCl_2$	0.012 \pm 0.05	0.066 \pm 0.04
Etanol	0.011 \pm 0.04	0.067 \pm 0.05
Tritón X-100	0.012 \pm 0.05	0.060 \pm 0.03

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la síntesis del compuesto de fórmula $[\text{ZnCl}_2(\text{isopropilamina})_2]$ y su aplicación como preservador de la actividad enzimática en extractos de catalasa, **caracterizado** por comprender:

- Una primera etapa en la que se prepara a temperatura ambiente una mezcla de reacción (suspensión) por adición de isopropilamina a una disolución que se encuentra bajo agitación de ZnCl_2 en agua destilada.
- Una segunda etapa en la que se forma un precipitado blanco cuando el pH de la mezcla de reacción cambia de 4 a 12.
- Una tercera etapa en la que la suspensión de la mezcla de reacción se filtra a vacío y el precipitado blanco se deja secar a temperatura ambiente.
- Una cuarta etapa en la que el precipitado blanco se disuelve en metanol y se precipita con éter etílico.

5 - Una quinta etapa en la que el precipitado blanco se recristaliza en acetona dejando evaporar lentamente.

10 2. Aplicación del compuesto $[\text{ZnCl}_2(\text{isopropilamina})_2]$, como preservador de la actividad enzimática en extractos de catalasa.

15 3. Composiciones químicas que contengan como principio activo el compuesto $[\text{ZnCl}_2(\text{isopropilamina})_2]$ y una disolución tampón fosfato (pH 7.0).

15 4. Procedimiento para preservar la actividad enzimática en extractos comerciales de catalasa con composiciones químicas descritas en la tercera reivindicación, que comprende:

20 una primera etapa en la que se prepara la composición química descrita en la reivindicación 3 con la disolución de proteína total de extracto de catalasa.

20 una segunda etapa en la que a distintos tiempos de incubación comprendidos entre 1 hora y 24 horas se determina a 37°C la actividad catalasa de la mezcla de reacción mediante la adición de H_2O_2 a una concentración final 0.4% (v/v)

25

30

35

40

45

50

55

60

65

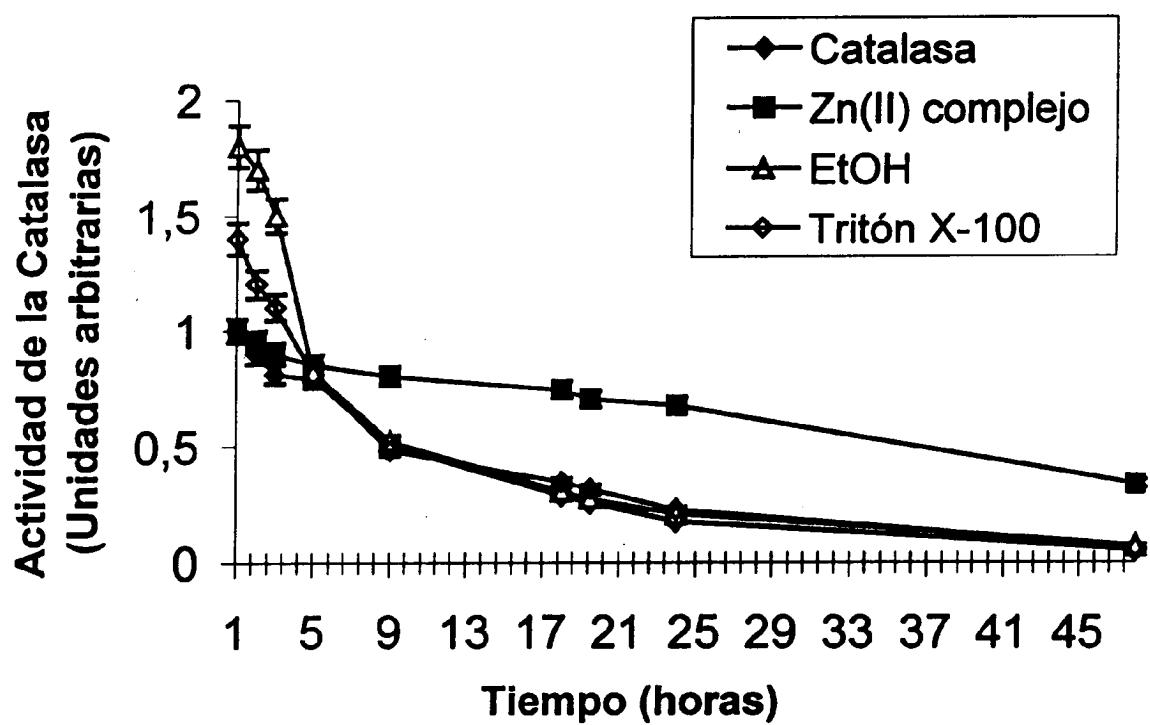


FIG.1

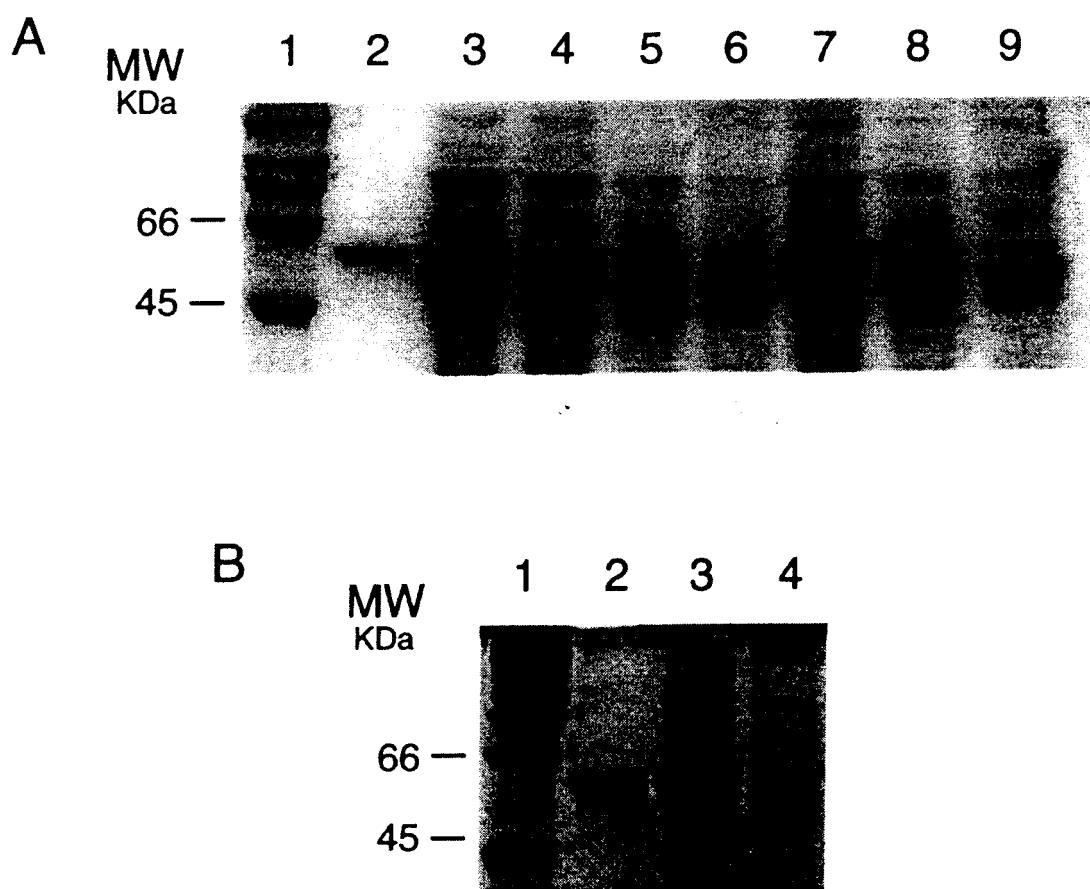


FIG.2



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

(11) ES 2 183 732
(21) Nº de solicitud: 200101785
(22) Fecha de presentación de la solicitud: 30.07.2001
(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

(51) Int. Cl.7: C07F 3/06

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	BERNARD, M.A. y col. Composés de solvatation des halogénures de Zinc par quelques amines. I.- Préparation et stabilité thermique. Bulletin Society Chim. Fr., 1972, Vol. 11, páginas 4100-4102. Página 4100, párrafo "I. Préparation et analyses".	1
A	BERNARD, M.A. y col. Composés de solvatation des halogénures de Zinc par quelques amines. II.- Enthalpies standards de formation. Bulletin Society Chim. Fr., 1972, Vol. 12, páginas 4523-24.	1
A	BERNARD, M.A. y col. HALOGENURES DE ZINC, CADMIUM ET MERCURE (II) SOLVATES PAR DES AMINES ALIPHATIQUES. CONCLUSION SUR LA STABILITE THERMIQUE ET L'ETUDE THERMOCHIMIQUE DES CES COMPOSES. Thermochim. Acta, 1979, Vol. 33, páginas 249-257. ISSN: 0040-6031.	1

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

O: referido a divulgación no escrita

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

A: refleja el estado de la técnica

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe 17.02.2003	Examinador E. Albarrán Gómez	Página 1/1
--	---------------------------------	---------------