



168786

168786

EB/.

M E M O R I A D E S C R I P T I V A

para una patente de invención, por veinte años, por: - Procedimiento para la obtención de combinaciones de la hormona del páncreas, que rebaja el azúcar de la sangre - a favor de la r.s. Schering A. G., residente en Berlin N. 65 - Alemania -

=/=/=/=/=/=/=/=/=/=

La obtención de combinaciones retardadora de la hormona del páncreas que rebaja el azúcar de la sangre (insulina), es ya conocida. Por ejemplo mediante reacción de la insulina con una protamina (patente inglesa 456 101), globina (patente norteamericana 2. 161 198) o con una combinación de quinolina, bis-2-metil-4-aminoquinolil-6-carbámidá, llamada "surfen" (Kli. Wo. 1938, p. 443), se obtienen combinaciones de acción fuertemente retardadora. El efecto de estas sustancias puede todavía reforzarse mediante combinación con cinc, como se describe por ejemplo en la patente norteamericana 2. 179 384.

Las combinaciones de la insulina con o sin cinc, con la protamina y globina productos albúminoideos, tienen el inconveniente de que la insulina está unida a una albúmina extraña por su clase al organismo humano y por eso no indiferente. Aún tratando la combinación con "surfen", se han observado después de la inyección fenómenos de irritación más o menos enérgicos.

Ahora bien, se ha descubierto que estos inconvenientes pueden evitarse fácilmente cuando según el invento la insulina se hace reaccionar con derivados básicos de los ácidos gálicos, exentos de albúmi -

168786

168786

2. -



na y que respecto al organismo humano tienen un comportamiento indife-
rente. Se prestan para el caso de modo especial los ácidos, sustitui-
dos por grupos de ácidos aminogálicos, como el ácido 3,7-diaminogáli-
co, 3,7,12-triaminogálico, ácidos monoaciltriaminogálicos y otros, y
5 también los éteres y amidas y otros derivados de estos ácidos.

Preferentemente esta transformación se realiza de modo que se
haga actuar la insulina sobre el derivado en cuestión del ácido gálico
básico, dado el caso en presencia de combinaciones metálicas fácilmen-
te solubles y que con amoníaco forman combinaciones complejas en pre-
10 sencia de iones cloro, por ejemplo combinaciones del cobre, cobalto,
níquel, pero preferentemente de los que no muestran cambios en su va-
lencia, como el cinc o el magnesio, en disolución acuosa o disolven-
tes orgánicos acuosos, por ejemplo en alcohol diluido. También la di-
solución de un derivado de un ácido gálico básico en un disolvente in-
15 soluble en agua puede hacerse actuar sobre la disolución acuosa o acuo-
so-alcohólica de la insulina y precipitarse la combinación originada
de ácido gálico e insulina preferentemente mediante ajuste de la mez-
cla reaccionante a un PH de 6,6-7,2. Aquí al precipitar de la disolu-
ción acuoso-alcohólica pueden aumentarse los rendimientos por adición
20 de un disolvente no miscible con agua, por ejemplo éter, pudiendo tam-
bién entonces mantener para la precipitación una zona más amplia del
PH, y precisamente de PH, 4-8.

El que los productos precipitados no son mezcla, sino combina-
ciones nuevas y precisamente a modo de sales, en que la insulina fun-
25 ciona como ácido, se desprende del hecho de que por ejemplo con un Ph
de 7 son difícilmente solubles tanto en agua como también en alcohol
acuoso de 50-70 %, mientras que en iguales circunstancias la insulina
sola y también los derivados básicos del ácido gálico solos se disuel-
ven bien.

30 Las nuevas combinaciones se emplean preferentemente en forma de
suspensiones con un PH de unos 7, pudiendo utilizarse como medio sus-

168786

168786



3. -

5 pensor, además del agua, también disoluciones acuosas, como disolución fisiológica de sal común, disolución salina de suero, etc.; además líquidos orgánicos, como dietilina (éter glicoldietílico) y aceites, como aceite de hígado de bacalao, aceite de oliva, aceite de cacahuet, de sésamo, de ricino. El pH puede también en disolución acuosa ajustarse en 3,5-4 e inyectarse de este modo la disolución. En el tejido se presenta debido al suero una acción tampón a un pH de próximamente 7 y la precipitación del cuerpo se realiza luego sólo en el tejido.

E j e m p l o /1/

10 Se disuelven 50 g de insulina cristalina (con 20 un. int. por mg.) en 19,88 litros de ácido clorhídrico diluido (10 cm³ de ácido clorhídrico normal en un litro). A la disolución se agregan 60 cm³ de tri-cresol y 160 cm³ de una disolución de 17,5 g de diclorhidrato del ácido 3,7-diaminogálico en un litro de agua. Después de mezclar bien se
15 agrega a gotas y agitando enérgicamente lejía de potasa caústica n/10 hasta que se logre un pH de 6,9 hasta 7,2. Si todas estas operaciones se han ejecutado de modo estéril, la suspensión acuosa aquí originada puede introducirse directamente en ampollas esterilizadas con caperuza o casquillo de caucho. Pueden utilizarse inmediatamente.

20 Pero también el precipitado originado, el insulato de ácido diaminogálico, puede separarse del modo usual, secarse y suspenderse con auxilio de aparatos conocidos, por ejemplo en disolventes orgánicos, como dietilina, aceite de hígado de bacalao, etc. Si estos trabajos se realizan de modo estéril, las suspensiones en los indicados
25 disolventes orgánicos, que se distinguen por su especial inalterabilidad por ejemplo en los trópicos, pueden introducirse directamente en ampollas.

30 El diclorhidrato del ácido 3,7-diaminogálico se obtiene del modo siguiente: 16 g del éster metílico del ácido dihidrodesoxicólico (Zeitschr.-physiol.Chemie., t. 123, p. 159 ss.) se disolvieron en 350 cm³ de metanol y al baño maría sirvieron con 6,7 g. de clorhidrato de

168786

168786



4. =

hidroxilamina en 10 cm³ de agua y 15 g de acetato sódico en 25 cm³ de agua, durante 6 horas. Con agua fría se precipita de la disolución como polvo cristalino la dióxima del ácido diaminogálico (punto fusión 118°). 4 g del éster oxímico se disolvieron en 200 cm³ de alcohol iso-
5 amílico y en el espacio de dos horas se trataron poco a poco con 13 g de sodio introducido en pedacitos. Temperatura: 130-140°. Duración de la reducción: 4-5 horas. Después de enfriar se disuelve en agua y se acidula con ácido clorhídrico. La capa de alcohol amílico se lava con ácido clorhídrico diluido en el embudo separador, hasta que la reac-
10 ción con ácido picrico se torna muy débil. Los extractos acuosos se concentran por evaporación al vacío hasta sequedad, se recogen en butanol, la disolución butánolica se concentra fuertemente al vacío y con éter se precipita el diclorhidrato del ácido diaminogálico. (Rendimiento); Rendimiento: 1,3 g. Punto de fusión; con descomposición,
15 256°. El monoclorhidrato (punto de fusión 246°) se obtiene del diclorhidrato calentando su disolución acuosa concentrada con un pH de 8,9. El monoclorhidrato o el diclorhidrato se disuelven en metanol y se introduce ácido clorhídrico, primero en frío y luego durante dos horas calentando al baño maría. Después se concentra al vacío y la masa re-
20 manente se deshace con amoníaco acuoso concentrado. La sustancia al principio untosa se solidifica poco a poco. Punto de fusión de la correspondiente amida ácida: 168°.

Ejemplo /2/

Se trabaja como en el ejemplo /1/, pero agregando 1 g de cloruro de cinc anhidro a la mezcla de insulina y diclorhidrato del ácido
25 diaminogálico antes de ajustar a un pH de 7.

Ejemplo /3/

50 g de insulina no cristalizada (correspondientes a 1 mill. un. int.) se disuelven en 200 litros de ácido clorhídrico n/100, que
30 contiene en un litro 3 cm³ de tricresol. En esta disolución se introducen agitando energicamente, 5 g de diclorhidrato, finamente pulveri-

168786

168786



5. -

zado del ácido diaminogálico y la mezcla de reacción se sigue agitando
enérgicamente hasta que se disuelve por completo el polvo. Luego pue
de seguir elaborándose la mezcla de reacción como se ha descrito en
los ejemplos 1/ o 2/. Sin embargo en pH puede también ajustarse a 3,5.
5 4. Y la disolución, si se ha preparado estéril, puede introducirse en
ampollas. Si se inyecta esta disolución, se presenta en el tejido gra
cias al suero un efecto tampón sobre pH de unos 7 y luego se realiza
en el tejido la precipitación del cuerpo depositante.

Ejemplo /4/

10 50 g de insulina se disuelven en 20 litros de ácido clorhídrico
n/100, que contiene 0,3 % de tricresol o 0,3 % de cloretón (alcohol
triclorobutílico) o 0,1 % de "nipagin" (una mezcla de éster metílico
y etílico del ácido p-oxisalicílico) y luego agitando enérgicamente
se incorpora en gotas lejía de potasa caústica n/10 hasta que se logra
15 un pH de 7, presentándose una precipitación con pH 4-6, la cual vuel
ve a disolverse claramente con pH 7. Separadamente se prepara una di
solución de dichlorhidrato del ácido diaminogálico (17,5 g por 1 litro)
y se agrega en gotas lejía de potasa caústica n/10 hasta alcanzar un
pH de 7,1. La disolución permanece clara. De esta disolución de ácido
20 aminogálico se introduce, agitando enérgicamente, 160 cm³ en la diso
lución de insulina. La suspensión entonces originada de la nueva com
binación se sigue tratando según el ejemplo /1/.

Ejemplo /5/

25 200 g de insulina (con 60 un.ro) se disuelven en 20 litros de
alcohol al 70 %, que contiene 10 cm³ de ácido clorhídrico normal por
un litro. Luego agitando enérgicamente se disuelven en esta mezcla 11
g. de clorhidrato del ácido diamonogálico y a continuación, siguiendo
la agitación, se agrega a gotas lejía de potasa caústica n/10, hasta
alcanzar un pH de 6,9 a 7,1. El precipitado entonces originado de la
30 nueva combinación se separa por centrifugación, y en la centrífuga se
lava del modo conocido con una mezcla de alcohol y éter, 1:1, y luego

168786

168786



6. -

con éter seco. Después de secar en el desecador, el precipitado pesa 148 g. Agregando alcohol al 96 %, hasta que la bureta presente un contenido de 90 % de espíritu de vino, y agregando además 1,5 partes en volumen de éter, referidas a un volumen de la mezcla, que contenga 90 % de alcohol, se pueden todavía aislar 62 g de la nueva combinación.

Ejemplo /6/

100 g de insulina (con 18 un./mg) se disuelven en 50 litros de ácido clorhídrico n/100 y la disolución se ajusta con lejía de sosa caústica 1/L_n a PH 7, disolviéndose nuevamente por completo el precipitado entre tanto formado con PH 5 de insulina isoelectrica. Junto -
10 mente se preparó una disolución de 20 g de diclorhidrato del ácido diaminogálico en 15 litros de butanol. El PH de esta disolución era también de 7,0. Ambas disoluciones, que son claras, se echan una sobre otra, pudiéndose observar en el punto de contacto la formación de un
15 precipitado. Agitando bien o sacudiendo en una máquina sacudidora se obtiene un fuerte precipitado de finos grumos, permaneciendo el PH de la mezcla a 7,0. Después de parar la agitación o sacudimiento, se vuelven a separar las dos capas líquidas y el precipitado de la nueva combinación puede aislarse del modo conocido.

Ejemplo /7/

200 g de insulina (con 18 un./mg) se disuelven en 5 litros de agua clorhídrica con PH 2,5 a 3 y la disolución se ajusta con lejía de sosa caústica a PH 7, volviéndose a disolver la insulina isoelectrica que entre tanto se había precipitado con PH 5.6. Por adición de
25 15 litros de alcohol se obtuvo una disolución acuoso-alcohólica de unos 75 %. Para ello la disolución de 20 g. de clorhidrato del ácido diamonogálico se introdujo en 2-3 litros de etanol o en 15 litros de butanol o propanol. El PH de la disolución de ácido gálico era también de 7,0. Al mezclar las dos disoluciones claras, se origina un precipitado, que se sedimenta en gruesos grumos. La precipitación se completó
30 agregando 30 litros de éter. La nueva combinación se separa del mo-

H/V.

168786

168786



7. -

de usual y se seca. Rendimiento: 190 g.

Ejemplo /8/

Se disuelven 50 g de insulina crist. (con 20 U. int./mg) en 19,88 litros de ácido clorhídrico diluido (10 cm³ de ácido clorhídrico normal por 1 litro); a la disolución se agregan 60 cm³ de tri-
5 cresol y 160 cm³ de una disolución de 30 g de clorhidrato de diamino-
colestanol en 1 litro de agua. Después de mezclar bien se incorpora a
gotas lejía de potasa cáustica n/10 agitando enérgicamente hasta que
se alcance un pH de 6,9-7,2. Si todas estas operaciones se realizan
10 estérilmente, la suspensión acuosa así originada puede llenarse di-
rectamente en ampollas esterilizadas con caperuzas de goma y quedan
entonces aptas para emplearse inmediatamente. Pero también el preci-
pitado originado, el insulinato de diaminocolestanol, puede separarse
del modo usual, secarse y con auxilio de aparatos conocidos, suspen-
15 derse por ejemplo en disolventes orgánicos, como dietilina, aceite de
hígado de bacalao, etc. Si estos trabajos se realizan estérilmente,
estas suspensiones en disolventes orgánicos que se distinguen por su
gran inalterabilidad por ejemplo en los trópicos, pueden introducir-
se directamente en ampollas.

20 Ejemplo /9/.

Como en el ejemplo 8, pero agregando 1 g de cloruro de cinc an-
hidro a la mezcla de insulina y clorhidrato del diaminocolestanol
antes de ajustar a pH 7.

Ejemplo /10/.

25 50 g de insulina no crist. (correspondientes a un millón de
unidades internacionales) se disuelven en 20 litros de ácido clor-
hídrico n/100, que por 1 litro contiene 3 g de fenol. Agitando enér-
gicamente se incorporan a esta disolución 5 g de clorhidrato del
diaminocolestanol finamente pulverizado y se agita enérgicamente la
30 mezcla de reacción hasta disolver completamente el polvo. Dicha mez-
cla puede seguirse trabajando como se ha descrito en el ejemplo 8 o
9. Sin embargo el pH puede ajustarse también a 3,5-4 y la disolución

168786

168786



1945

8.

si se ha preparado estérilmente, introducirse en ampollas. Si se inyecta esta disolución, entonces se presenta en el tejido gracias al suero una actuación sobre el pH para hacerlo de unos 7 y la precipitación del cuerpo depot tiene entonces lugar en el tejido.

5 Ejemplo /11/.

50 g de insulina se disuelven en 20 litros de ácido clorhídrico n/100, que contiene 0,5 % de tricresol o fenol o clorotón (alcohol triclorobutílico), o 0,1 % de nipagin (un p-oxisalicilato de metilo y mezcla de esteres etílicos) y luego agitando enérgicamente se agrega lejía de sosa cáustica n/10 gota a gota hasta que se alcance un pH de 7, presentándose entretanto una precipitación con pH 4-6, la cual vuelve a disolverse claramente con pH 7. Separadamente de esto se prepara una disolución de clorhidrato de diaminecolestanol (30 g por litro) y se incorpora a gotas lejía de sosa cáustica n/10 hasta tener un pH de 7,1. La disolución permanece clara. De esta disolución de clorhidrato de diaminecolestanol se incorporan 160 cm³ a la disolución de insulina agitando enérgicamente. La suspensión originada de la nueva combinación se sigue tratando como en el ejemplo 8.

20 Ejemplo /12/.

200 g de insulina con 60 U/gamma se disuelven en 20 litros de alcohol al 70 % que contiene por litro 10 cm³ de ácido clorhídrico normal. Luego agitando enérgicamente se diluyen en esta mezcla 11 g de clorhidrato de diaminecolestanol y después siguiendo la agitación se agregan a gotas lejía de potasa cáustica n/10 hasta alcanzar un pH de 6,9-7,1. El precipitado entonces originado de la nueva combinación se separa por centrifugación y en la centrífuga se lava del modo conocido con una mezcla de alcohol y éter 1:1 y luego con éter seco. Después de secar en el secador pesa el precipitado 148 g. Del filtrado por adición de alcohol al 95 % hasta que señale el areómetro por lo menos un contenido de 90 % y por nueva incorporación de 1,5 partes en volumen de éter, referidas a una parte en volumen de la

168786

158786



9. -

mezcla que contiene 90 % de alcohol, pueden todavía aislarse 62 g de la nueva combinación.

Ejemplo /13/.

100 g de insulina con 18 u/mg se disuelven en 50 litros de ácido clorhídrico n/100 y la disolución se ajusta con lejía de sosa cáustica n/1 a pH 7, volviéndose a disolver por completo el precipitado de insulina isoelectrica que se forma entretanto con pH 5. Juntamente se prepara una disolución de 20 g de clorhidrato de diamino-colestanol en 15 litros de butanol. El pH de esta disolución es también de 7,0. Ambas disoluciones que están claras, se ponen una sobre otra, pudiéndose observar en el punto de contacto la formación de un precipitado. Agitando o sacudiendo bien en una máquina sacudidora se obtiene un fuerte precipitado de finos grumos, permaneciendo en 7,5 el pH de la mezcla. Después de detener la agitación o sacudimiento se separan de nuevo las dos capas de líquido y puede aislarse del modo conocido el precipitado de la nueva combinación.

Ejemplo /14/.

200 g de insulina con 18 u/mg se disuelven en 5 litros de agua clorhídrica con pH 2,5-3 y la disolución se ajusta con lejía de sosa cáustica a pH 7, disolviéndose de nuevo entretanto la insulina isoelectrica precipitada con pH 5-6. Por adición de 15 litros de alcohol se obtuvo una disolución acuoso-alcohólica de unos 75 %. A esta se incorpora la disolución de 20 g de clorhidrato de diamino-colestanol en 2-3 litros de alcohol etílico e en 15 litros de alcohol butílico e propílico. El pH de la disolución de aminosterina era también de 7,8. Al mezclar las dos disoluciones claras se presenta un precipitado que se sedimenta en gruesos grumos. La precipitación se completó agregando 20 litros de éter. La nueva combinación se separa del modo usual y se seca. Rendimiento: 190 g.

De modo completamente análogo al indicado en los ejemplos con di-clorhidrato del ácido diaminogálico, pueden realizarse combinacio-

168786

168786



1945

10. -

nes con monoclóridato de dicho ácido y amida del mismo ácido diaminogálico.

Puede también emplearse, en lugar de los derivados del ácido diaminogálico, el clorhidrato del ácido triaminogálico y el ácido monoamiltriaminogálico. Estas combinaciones se obtienen como sigue:

5 15 g de trioxima del éster metílico del ácido dehidrocólico (Berichte der deutsch.chem.Ges., t. 52, p. 1252-1259) se disolvieron en 900 cm³ de alcohol amílico exento de piridina e hirviendo constantemente la disolución (al baño de aceite), se trató con 60 g de sodio en el de-

10 curso de dos horas. El caldeo se continuó hasta la disolución completa del sodio. Después de enfriar, se diluye el amilato sódico con agua al salir del balón y se acidula con ácido clorhídrico. La capa de alcohol amílico se lava repetidas veces con ácido clorhídrico diluido, hasta que no se presente ningún precipitado con ácido pícrico.

15 La disolución acuosa se concentra a sequedad. Se recoge con metanol y calentando al baño - maría, se esterifica introduciendo ácido clorhídrico. La sal común separada se elimina por filtración, se concentra a sequedad la disolución al vacío, el residuo se recoge con metanol y se precipita con éter el triclóridato del éster metílico

20 del ácido triaminogálico. (Punto de fusión, superior a 320°). Rendimiento; 11,20 g.

El éster metílico del ácido monobenciltriaminogálico se prepara del éster del ácido triaminogálico por el método de Schotten-Baumann del modo usual, con la cantidad calculada de cloruro de bencilo.

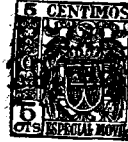
25

En tanto que la reacción del tricloruro del ácido monobenciltriaminogálico con insulina puede realizarse de modo completamente análogo al indicado en los anteriores ejemplos con dicloruro del ácido diaminogálico, el ácido triaminogálico, como clorhidrato o éster con pH 7, disuelto con la disolución clara de insulina con pH 7, no da precipitado alguno. Pero si las dos disoluciones se preparan con pH 2,5-3 o se ajustan después a él y luego se agrega a gotas le-

30

168786

168786



945

11. -

5 jía de potasa cáustica, entonces primero con pH 5-6 se obtiene el precipitado, que forma también con insulina sin ácido aminogálico (insulina isoceléctica). Mientras que en el último caso se vuelve a disolver el precipitado siguiendo las gotas de lejía de potasa cáustica hasta pH 7, dando una disolución clara, en el caso de agregarse ácido triaminogálico (triclórhidrato) en la misma proporción porcentual en que se emplea el ácido diaminogálico, el precipitado permanece aún con pH 7 y ahora contiene la nueva combinación de ácido triaminogálico e insulina.

10 Del mismo modo y con igual resultado pueden utilizarse otras combinaciones básicas de la serie esteroídica, por ejemplo ácidos o-nicotinogálicos y éteres o ésteres aminoalquílicos de los ácidos gálicos y también aminoesterinas, o-nicotinoilesterinas, éteres básicos de las esterinas y otros.

15 Así por el método de los anteriores ejemplos se obtiene por ejemplo sulfato de insulina-colestonepyridinium.

En los ejemplos 8 a 14 el clorhidrato de diaminocolestano puede reemplazarse por ejemplo por clorhidrato de aminocolestano o diaminocolestano o por otras esterinas básicas.

20 **N O T A.-**
 =====

La presente patente de invención, comprende las siguientes reivindicaciones:

25 1.- Procedimiento para la obtención de combinaciones de la hormona del páncreas, que rebaja el azúcar de la sangre, con acción retardadora, caracterizado porque la hormona se hace reaccionar con derivados básicos de la serie esteroídica y en especial de la serie del ácido gálico, dado el caso en presencia de combinaciones metálicas que con amoníaco forman cuerpos complejos y se disuelven fácilmente en presencia de iones cloro, por ejemplo de cobre, cobalto,
 30 níquel, pero preferentemente de los metales que no presentan cambios

168786

12. -



945

de valencia, como el cinc.

2.- Procedimiento según lo reivindicado en el punto 1, caracterizado porque la reacción se verifica en disolución acuosa o acuoso-alecohólica.

5 3.- Procedimiento según lo reivindicado en los puntos 1 y 2, caracterizado porque como combinación metálica se emplea cloruro cincico.

4.- Procedimiento según lo reivindicado en los puntos 1 a 3, caracterizado porque se emplean ácidos aminogálicos.

10 5.- Procedimiento según lo reivindicado en los puntos 1 a 4, caracterizado porque para disolver los derivados de un ácido gálico básico, se emplean disolventes insolubles en agua.

6.- Procedimiento para la obtención de combinaciones de la hormona del páncreas, que rebaja el azúcar de la sangre.

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

Madrid, a 29 de Enero de 1945.

