

COPIA REPRODUCIDA
POR DEFECTO DEL ORIGINAL

174955

P.- 5.153.-

Nº. 58.-

174955



13 SEP 1946

13 SEP. 1946

MEMORIA DESCRIPTIVA

para solicitar

P A T E N T E D E I N V E N C I O N

en

E S P A Ñ A

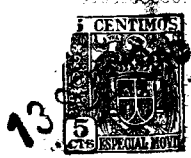
por VEINTE años

a nombre de NOVO TERAPEUTISK LABORATORIUM A/S, entidad danesa, establecida en 115, Fuglebakkevej, Copenhague, DINAMARCA, por:

"UN PROCEDIMIENTO DE PRODUCIR UN DERIVADO DEL HORMON QUE DISMINUYE EL AZUCAR DE LA SANGRE, ASI COMO EL DERIVADO DE INSULINA".-

=====:

En la patente Nº 157.908, se describe un procedimiento de producir un preparado de hormón que disminuye el azúcar de la sangre haciéndolo reaccionar con isocianatos, método que se caracterize porque la reacción de dichas sus-



174955

5 tencias solo se realiza hasta un punto en el cual el hormón retiene todo su efecto disminuidor del azúcar de la sangre, o la parte esencial del mismo, en unidades de insulina, siendo, sin embargo, este efecto alterado de tal manera que el efecto disminuidor del azúcar de la sangre en el organismo del diabético se extingue en un periodo de tiempo más largo, estableciéndose las condiciones de reacción necesarias para producir este resultado, como consecuencia de investigaciones biológicas.

10 Como los isocianatos pueden reaccionar con agua lo mismo que con aminas primarias o secundarias y grupos de hidroxilo del hormón que disminuye el azúcar de la sangre al realizar el procedimiento según dicha patente, hay gran número de maneras en que la reacción pueda tener lugar, razón por la cual no se conoce con certeza cuál es la explicación del efecto observado.

15 Pero, las investigaciones han demostrado ahora que la reacción de los hormones que disminuye el azúcar de la sangre con los isocianatos, según el procedimiento descrito en dicha patente, es principalmente una reacción en la cual interviene los grupos amínicos valorables presentes en el hormón.

20 A consecuencia de esto es posible, según el presente invento, producir derivados del hormón que disminuye el azúcar de la sangre que hayan conservado la totalidad o una parte esencial del efecto disminuidor del azúcar de la sangre que tenía el material de partida, pero estos derivados se distinguen porque su efecto en el interior del or-



174950

5 genismo del diabético se extiende a un periodo de tiempo más largo, sustituyendo el isocianato por otros reactivos que, lo mismo que el isocianato reaccionan con grupos aminos por sustitución de un átomo de hidrógeno o de los dos.

Por via de ejemplo, dichos reactivos pueden ser cloruros acilicos, anhídridos acilicos, cetonas, alquil-halógenos, aldehidos y cetonas, xantidrol etc.

10 En el caso de una acción demasiado fuerte de los reactivos, aparece, como en el caso de los isocianatos, una inactivación total o parcial del hormón. Por consiguiente la acción debe regularse de manera que el efecto disminuidor del azúcar de la sangre, calculado como unidades de insulina, se mantenga total o esencialmente. Esto puede comprobarse según el caso con isocianato, por medio de experimentos biológicos en los cuales se emplean los animales que permiten comparación entre insulinas y derivados que tienen un efecto de insulina más o menos prolongado en el ser humano. Ya es conocida en sí misma esta normalización biológica de los derivados de insulina que tienen un efecto
15
20 prolongado.

Por medio de un control en la forma descrita, o de cualquier otro modo, es posible, en relación con cada uno de los reactivos en cuestión establecer condiciones experimentales por medio de las cuales puede conseguirse el
25 deseado mantenimiento del efecto disminuidor del azúcar de la sangre o la parte esencial del mismo.

Pero se ha descubierto que, si se hace que el

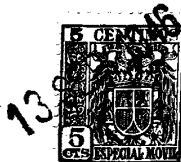


174900

reactivo en cuestión y el hormón reaccionen en una mezcla de reacción inhomogénea, no se puede evitar en todos los casos, para la certeza necesaria para la ejecución práctica del método, que la reacción vaya demasiado lejos, haciendo que el hormón se inactive total o parcialmente lo mismo que en el caso en que se usen isocianatos en condiciones similares. Es, pues, deseable que la reacción se realice en una fase homogénea, si esta fase puede establecerse.

10 Para obtener una fase de reacción homogénea, lo mismo que en el caso de hacer reaccionar isocianato con el hormón que disminuye el azúcar de la sangre, por ejemplo, puede usarse una solución de insulina con una mezcla de agua y un disolvente orgánico que haga el reactivo más o
15 menos soluble, de manera que la reacción pueda tener lugar en la fase de reacción así establecida conteniendo insulina lo mismo que reactivo. Controlando la temperatura, el valor p^H , la proporción a que se añade el reactivo, su concentración, la composición del disolvente y el tiempo de
20 reacción si se desea, es posible regular la reacción para obtener el derivado deseado, y al mismo tiempo la reproducibilidad necesaria para la utilización práctica del método.

25 En vez de establecer las condiciones de reacción requeridas para obtener el producto deseado a base de experimentos biológicos, es también posible establecer estas condiciones a base de investigaciones de carácter puramente químico o físico-químico.



74933

13

De hecho, se ha descubierto que los derivados que han mantenido total o esencialmente al efecto disminuidor del azúcar de la sangre del hormón medido en unidades de insulina, pero en los cuales el efecto disminuidor del azúcar de la sangre es de tal carácter que su acción dentro del organismo del diabético se extiende en un periodo de tiempo relativamente largo, se caracterizan por que un número de grupos aminoácidos valorables en el hormón que disminuye el azúcar de la sangre, que asciende a $1-30 \times 10^{-3}$ mmol/mmol total -N, que en los sucesivos se llamarán más cómodamente $1-30$ amino-grupos han sido atacados por el reactivo.

Debe observarse que hay en conjunto 78×10^{-3} amino-grupos por mmol total -N en el hormón.

15 El deseado efecto prolongado sólo ocurre por la acción de los reactivos sobre los amino-grupos valorables del hormón. Este efecto prolongado se mantiene en reacción continua, pero cuando cierto número de aminogrupos se ponen en reacción surgirá al mismo tiempo una activación progresiva. Esta inactivación es ligera al principio, pero se vuelve más pronunciada cuando la reacción se lleve más adelante y el punto en que comienza a manifestarse está generalmente dispuesto de manera que el ataque de 25 amino-grupos valorables sufre una reducción de actividad de 20 a 25%, el peso que esta reducción aumenta hasta un 50% cuando interviene un 30 amino-grupos valorables. Un derivado cuya actividad se ha reducido de este modo seguirá poseyendo un efecto prolongado, pero por razón del alto valor del

20

25



174955

hormón que disminuye el azúcar de la sangre, no será usualmente ventajoso operar con un grado tan alto de inactividad, y por consiguiente el invento no incluye métodos en que sean atacados más de 30 amino-grupos valorables.

5
10
15
20

Se ha descubierto que bajo las condiciones de reacción a considerar en la producción del derivado, desaparecerá en general cierto número de amino-grupos valorables, probablemente por causa de nueva disposición intramolecular, de manera que una reducción en el número de amino-grupos no puede interpretarse exclusivamente como resultado de la acción de los reactivos. Se ha descubierto que esta nueva disposición molecular sola no tiene influencia sobre la prolongación del efecto disminuidor del azúcar de la sangre, y por tanto, según el presente invento es necesaria distinguir cuidadosamente entre aminogrupos que han sido atacados por el reactivo y amino-grupos valorables que han desaparecido o dejado de ser amino-grupos valorables como consecuencia de las nuevas disposiciones moleculares y si se quiere esto puede efectuarse comparando un derivado dado con un control que se produce en las mismas condiciones, pero sin la adición de los reactivos en cuestión.

El número de aminogrupos valorables que en condiciones dadas son atacados por un reactivo dado, puede determinarse de varias maneras diferentes en principio.

25

En algunos casos, será así posible determinar directamente la cantidad de reactivo que ha reaccionado con el hormón y por éste el número de amino-grupos valorables atacados puede calcularse, suponiéndose que sólo son ata-



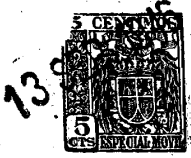
174955

cados dichos grupos. Pero en el caso de un ataque más vigoroso, puede ser necesario corregir una ligera reacción con los fenol-grupos del hormón. Pero esta corrección apenas excederá del 5% de la reacción total.

5 El número de aminogrupos valorables atacados, puede además determinarse valorimétricamente. En este caso el número de aminogrupos atacados se determina como la diferencia entre el número de grupos valorables antes y después de la reacción, corregida por el correspondiente valor del control arriba mencionado, o bien, lo que viene a ser lo mismo, como la diferencia entre el número de aminogrupos valorables en el derivado producido según este invento, y el número de aminogrupos en un control producido sometiendo el material de partida a las mismas condiciones que las empleadas durante la reacción, pero sin la presencia de un reactivo. Se ha descubierto que el número de amino-grupos que escapan a la valoración por razón de la supuesta nueva disposición intramolecular y que son así independientes de la acción del reactivo añadido, oscila entre $30-40 \times 10^{-3}$ mmol/mmol. total - N, de manera que el número total de aminogrupos hechos invalorables según el invento puede ascender a 60-70.

25 El número de aminogrupos atacados puede además determinarse de otras maneras que determinando la cantidad de reactivo consumido por reacción o por valoración, por ejemplo, por medios calorimétricos, y el invento incluye todo método en que se atacan 1-30 amino-grupos valorables de los

MALA REPRODUCCION
POR DEFECTO DEL ORIGINAL



174955

hormonas, sin tener en cuenta cómo se determina dicho número, y dejando fuera de la cuenta el número de amino grupos que no se pueda determinar por otra razón que la acción del reactivo.

5 A continuación se explicará el invento con los siguientes ejemplos de realizar el método.

Ejemplo I.

10 Se disuelven 3,21 g. de insulina en 65 ml. de agua por medio de HCl n/1; se añaden 67 ml. de acetona y se regula el pH con NaOH n/1 a 8.0. A intervalos de 10 minutos se añade 31.5 mg de cloruro de benzoilo en 3 ml. de acetona, en conjunto cuatro veces, restableciéndose el valor de pH después de cada edición con NaOH n/1. La solución se diluye luego con 450 ml. de agua, el derivado de insulina se precipita a pH 4.8, se disuelve en 50% de acetona de pH 7-8 y precipita con acetona en exceso. El precipitado se recoge se lava en acetona y éter y luego se seca.

15 Se produce un control de igual manera pero con la exclusión de cloruro de benzoilo.

20 En el preparado producido según lo anterior por medio de cloruro de benzoilo, el número de amino-grupos que han desaparecido se determina valorimetricamente y asociada a 51, al paso que el número de amino-grupos desaparecido en el control es 31. Así hay 20 aminogrupos atacados.

25 Por experimentos biológicos realizados en la forma ordinaria, por ejemplo, en conejos, el derivado producido resulta contener prácticamente el mismo número de unida-



174955

des de insulina que los 3.21 g de insulina. Los ensayos clínicos han demostrado que hay un adecuado grado de prolongación.

Ejemplo II.

5 Se disuelven 3.21 g. de insulina en 65 ml. de agua por medio de HCl n/1; se añaden 67 ml. de acetona y el valor de p H se regula con NaOH n/1 a 8.0. A esto se añaden a intervalos de 10 minutos 42.8 mg. de éster ben-
10 cílico del ácido cloro-fórmico, en 4 ml. de acetona, en conjunto tres veces, restableciéndose el citado valor pH después de cada adición por medio de NaOH n/1. La solu-
15 ción se diluye luego con 450 mg. de H₂O, el derivado de insulina se precipita a pH 4.8, luego se disuelve en acetona de 50%, a pH 7-8, y se precipita con acetona en exceso. El precipitado se recoge, se lava en acetona y éter y se seca.

Se produce un control de igual manera, pero sin la adición de éster bencilico del ácido cloro-fórmico.

20 Valorando el producto producido por medio de éster bencilico del ácido cloro-fórmico se comprueba que en conjunto han desaparecido 50 aminogrupos al paso que en el control desaparecen 31 amino-grupos, de lo cual resulta que han sido atacados 19 amino-grupos.

25 Por experimentos biológicos realizados en conejos, se comprueba que el preparado contiene el mismo número de unidades de insulina que los 3.21 g. de insulina empleados como material de partida. Por ensayos clínicos se ve que el derivado tiene un adecuado grado de prolongación.



1355

174955

Ejemplo III.

2 g. de insulina se disuelven en 85 ml. de agua por medio de HCl n/l. Se regula el pH a 7.0 por medio de NaOH n/l, y en el curso de 20 minutos se añade a 5 gotas una solución de 63.4 mg. de anhidrido acético en 4 ml. de acetona. Añadiendo al propio tiempo una cantidad equivalente de NaOH n/10, se mantiene el pH a 7.0. El derivado de insulina así formado se precipita con acetona en exceso, se recoge, se lava en acetona y éter y se se- 10 ce. Los ensayos clínicos muestran que tiene un grupo adecuado de prolongación.

Esta solicitud que corresponde a la presentada en Dinamarca el 13 de diciembre de 1943, bajo el número 3.216/43 se recoge a los beneficios del artículo 51 del vi- 15 giente Estatuto de Propiedad Industrial.

- o - N O T A - o -

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

20 12.- Un procedimiento de producir un derivado del hormón que disminuye el azúcar de la sangre, en el cual este hormón se hace reaccionar por medio de reactivos que, similarmente a los isocianatos atacan los amino-grupos de tal manera que un átomo o átomos de hidrógeno de dichos grupos 25 sean sustituidos, cuidándose en la elección de las condiciones de reacción habituales tales, como tiempo, temperatura



174955

y concentración de los componentes empaados en la reacción, de que la reacción sólo proceda hasta un punto en que el hormón mantenga todo su efecto disminuido del, azúcar de la sangre o una parte esencial del mismo, pero de carácter alterado en forma que el efecto sobre el organismo del diabético se extienda en un periodo de tiempo más largo.

2º.- Un procedimiento según se reivindica en el punto 1º, en el cual la reacción sobre el hormón del reactivo capaz de sustituir aminogrupos se realiza en un sistema homogéneo.

3º.- Un procedimiento según se reivindica en el punto 2º, en el cual se emplea una mezcla de acetona y agua para el disolvente común.

4º.- Un procedimiento según se reivindica en el punto 1º, en el cual se emp. se un cloruro acílico.

5º.- Un procedimiento según se reivindica en el punto 1º, en el cual se emplea un anhídrido acílico.

6º.- Un procedimiento según se reivindica en el punto 1º, en el cual el punto final de la reacción se determina de manera que haya atecado $1-30 \times 10^{-3}$ mmol aminogrupos valorables por mmol Total N en el hormón que disminuye el azúcar de la sangre.

7º.- Un procedimiento según se reivindica en el punto 6º, en el cual el número de amino-grupos atecados se determina por la cantidad de reactivo que ha reaccionado con el hormón.

8º.- Un procedimiento según se reivindica en el punto 6º, en el cual el número de amino-grupos atecados se determina valorimétricamente como la diferencia entre el número de amino-grupos valorable en el derivado producido según

MALA REPRODUCCION
POR DEFECTO DEL ORIGINAL



174955

13

el invento, y en un control que se produce sometiendo el material de partida a las mismas condiciones que las empleadas durante la reacción, pero con exclusión del reactivo.

5 9º.- Un procedimiento según se reivindica en el punto 1º, virtualmente como se describe en la Memoria y en los ejemplos.

10 10º.- Un procedimiento de producir un derivado del hormón que disminuye el azúcar de la sangre, así como el derivado de insulina.

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

Esta Memoria consta de doce hojas escritas por una sola cara.

Madrid, 13 SEP. 1946

P. A.

Alberto de Eizaburu

Por Feder