

204233



204233

Memoria Descriptiva

para

una Patente de Invención,
por veinte años en España

a favor de

la r.s. Novo Therapeutisk Laboratorium A/S.

- sociedad danesa -

residente en

Copenhague (Dinamarca) Fuglebakkevej, 115

por:

**" PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE PREPARACIONES INYECTABLES
DE INSULINA CON EFECTO PROTRAIDO "**

INVENTORES: D. Knud Hallas-Møller,
D. Karl Petersen, y
D. Jørgen Schlichtkrull;
los tres de nacionalidad danesa.

- - - - -



La importancia de la presencia de cinc en diversas preparaciones de insulina para inyección subcutánea e intramuscular ha sido objeto de cierto número de ensayos químicos biológicos y clínicos.

5 Es sabido que puede lograrse un efecto terapéutico protraído mediante inyección subcutánea de insulina disuelta, en los conejos cuando la disolución de insulina contiene grandes cantidades de cinc. De aquí que para obtener un efecto protraído importante sea necesario emplear cantidades tan con-
10 siderables de cinc (aproximadamente 10-20 gamma por unidad de insulina, correspondientes aproximadamente a 40-800 mg de cinc por 100 milímetros con 40 unidades internacionales de insulina por milímetro) que por la inyección en los seres humanos aparecen irritaciones graves por el lado de la inyección, al
15 mismo tiempo que resulta también discutible si tan grandes cantidades de cinc podrán administrarse diariamente al organismo humano con seguridad. La consecuencia ha sido que las preparaciones de insulina constituidas por insulina disuelta con cinc incorporado, no han encontrado aceptación en la prác-
20 tica clínica.

También es sabido que las preparaciones de protamina-insulina con incorporación de cinc poseen un efecto más protraído que el de las mismas preparaciones sin incorporación de cinc. Esta observación se ha demostrado ser de gran impor-
25 tancia y las preparaciones de protamina-insulina con adición

204233



de cinc han encontrado extensa aplicación en la práctica clínica.

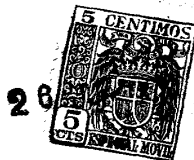
También es sabido que cierto número de metales tienen la propiedad de precipitar la proteína. Por ejemplo para la precipitación de las proteínas puede utilizarse hidróxido de cinc precipitado.

Así la insulina se ha precipitado cuantitativamente agregando un precipitado de hidróxido de cinc obtenido por el sulfado de cinc con sosa cáustica, a una disolución ácida de insulina. El precipitado de insulina y de sal básica de cinc se ha inyectado experimentalmente en animales, dando por resultado un efecto más intenso y protraído de la insulina que el que se logra con la insulina ordinaria. Sin embargo con cantidades algo importantes de cinc parece que el metal neutraliza el efecto de la insulina. Pero el efecto clínico de estos precipitados no se ha ensayado y tampoco se han obtenido preparaciones adecuadas para la aplicación clínica a base de ensayos biológicos realizados.

Finalmente se ha hecho ensayos químicos respecto a la facultad de la insulina precipitada en estado amorfo para fijar el cinc con objeto de proporcionar cinc a la insulina en las glándulas pancreáticas. Como material de partida para estos ensayos se ha utilizado en parte insulina libre de cinc y en parte cristalina.

La insulina libre de cinc se ha producido de la insulina comercial ordinaria mediante cierto número de procesos

- 3 -
204233



5 sucesivos de disolución y precipitación, empleando p. ej. hidróxido amónico o acetato de amonio como tampón en las fases de precipitación lo mismo que p. ej. ácido láctico en las fases de disolución. Así se ha comprobado que gran parte de la insulina exenta de cinc se precipita con diversos valores del p^H en presencia de 9,5 gamma de cinc por unidad de insulina y que gran parte de la insulina exenta de cinc se precipita con un p^H de 7,0 en presencia de diversas cantidades de cinc. Se ha descubierto que con un p^H de 7 como máximo se requería -
15 aproximadamente 10 gamma de cinc por unidad de insulina para lograr la precipitación completa de la insulina y que incluso con este contenido de cinc, con valores del p^H inferiores a 7 y superiores a 4,5 se encontraba en disolución aproximadamente del 5 al 15 % de la insulina.

15 En los ensayos realizados con insulina cristalina, esta insulina cristalina se disolvía en ácido clorhídrico agregando cloruro de cinc en diversas proporciones y luego con sosa cáustica se ajustaba a p^H 6,5, después de lo cual se comprobaba el contenido de cinc del precipitado resultante. Los ensayos demostraron que la insulina amorfa precipitada al ajustar a un p^H de 6,5, contenía cantidades crecientes de cinc al aumentar la concentración del mismo cinc. Ninguna de las suspensiones conteniendo cinc de insulina amorfa, formadas en los
20 ensayos químicos citados, se ha ensayado biológica o clínicamente y ninguna de las suspensiones era adecuada para emplearse en la práctica clínica.
25

El presente invento tiene por objeto la producción de preparaciones inyectables de insulina con efecto protraído y

204233

26 JUL 5



basadas en la insulina precipitada en estado amorfo. El inven
to se funda en la siguientes observaciones químicas:

5 1). La insulina precipitada en estado amorfo no solo
es capaz de fijar cinc, sino también otros metales. Así, si
se reemplaza el cinc por cobalto, níquel, cadmio, cobre, man-
ganeso o hierro, se encontrará que estos metales se fijan por
la insulina amorfa de modo análogo al cinc, dando por resulta-
do correspondientes variaciones en la solubilidad de la insu-
lina y un efecto biológico modificado.

10 2). Ajustando una disolución ácida de insulina crista-
lina o amorfa a un p^H aproximadamente de 7, será posible te-
ner la insulina precipitada prácticamente en grado cuantitati-
vo en estado amorfo en presencia de bastante menos cinc que
en los ensayos biológicos arriba mencionados, y en los ensayos
15 químicos en los que como material de partida se empleaba insu-
lina exenta de cinc. Según el invento se ha descubierto de es-
te modo que la precipitación cuantitativa puede lograrse fá-
cilmente cuando se haya presente algo más de 0,6 gamma de cinc
por unidad de insulina. Pueden también obtenerse precipita-
20 ciones correspondientes empleando los metales antes citados
en una cantidad del mismo orden que la cantidad de cinc seña-
lada. Con otras palabras: es un hecho que puede tenerse, por
ajuste a p^H aproximadamente de 7, insulina precipitada en can-
tidad generalmente cuantitativa en estado amorfo, cuando uno
25 o más de los metales citados se encuentra presente en tal can-
tidad que la suspensión resultante de insulina amorfa contenga
más de aproximadamente $2 \times A \times 10^{-5}$ miliequivalentes de

- 5 -

204233



los metales citados por mililitro de suspensión, designando "A" el número de unidades internacionales de insulina por mililitro de suspensión.

5 3). Además los ensayos químicos han demostrado de modo sorprendente que no es posible producir una suspensión de insulina con cinc según el invento por los procedimientos ordinarios conocidos para obtener preparaciones neutras de insulina con efecto protraído. Preparaciones experimentales conteniendo cinc e insulina y además producidas según los métodos
10 conocidos (adición del isotónico, tampón y agente preservador en condiciones asépticas) tienen por regla general el mismo efecto que la insulina ordinaria y además son inestables. Otros experimentos han demostrado que la causa de esto debe atribuirse a los tampones comunes, los cuales se ha descubier
15 to que interfieren con el proceso químico entre el metal y la insulina. En este se requiere para el efecto biológico protraído que la insulina se haga difícilmente soluble con la reacción neutra de la sangre y así es necesario que sea compatible con los posibles factores que influyen o pueden neutralizar
20 completamente la formación de la insulina amorfa difícilmente soluble.

25 El tampón o amortiguador más común, los fosfatos, no puede por tanto utilizarse, a excepción de las preparaciones basadas sobre el níquel. Los tampones de citratos no pueden utilizarse juntamente con algunos metales. Después indicaremos los tampones adecuados.

El proceso químico entre la insulina y el metal que

204233



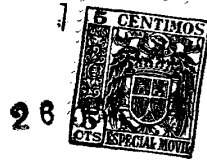
dá por resultado el efecto biológico protraído, es con otras palabras, muy sensible a cantidades incluso pequeñas de otros aditamentos.

5 Al escoger estos aditamentos, como son las sustancias tampón, los agentes isotónicos y preservativos, hay por tanto necesidad de asegurarse de que las sustancias en cuestión no presentan en las concentraciones requeridas mayor afinidad por el metal empleado que la insulina, de suerte que se impida la unión entre la insulina y el ión metálico que se requiere para lograr el efecto biológico retardado.

10 4). Según el invento se ha descubierto además que los precipitados de insulina amorfa en presencia de los metales mencionados son sólo estables dentro de un orden de valores muy definidos del p^H y dependiente de la cantidad con que la insulina se encuentre presente en estado disuelto. Si el p^H no está comprendido dentro de un orden pequeño bien definido y si no se toman precauciones para que haya seguridad de que solo una cantidad muy pequeña de insulina se halla presente en estado disuelto, la insulina precipitada en estado amorfo se transformará constantemente en insulina cristalina. Con objeto de evitar la transformación en insulina cristalina, el p^H debe encontrarse entre aproximadamente 6-6,5 y aproximadamente 8,5. Dentro de este orden de valores del p^H en cualquier proporción se encontrará en disolución menos del 2 % de la insulina presente.

20 25 Cuando el límite inferior del p^H se determina aproximadamente en 6-6,5 debe advertirse que el límite inferior de-

- 7-204233

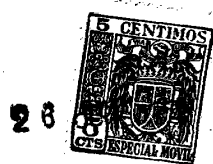


pende de la cantidad presente de los metales citados, de suerte que podrá utilizarse un valor inferior del p^H cuando aumente la cantidad de metal. Si, p. ej. el contenido de cinc es de 5 gamma por unidad de insulina o más, entonces será posible descender a aproximadamente 6 sin peligro de cristalización, mientras que con 2 gamma por unidad de insulina, sólo será posible descender hasta aproximadamente 6,5.

Las sustancias tampón o amortiguadoras pueden emplearse para asegurar el mantenimiento del valor del p^H dentro del orden indicado. Esto se debe tener en cuenta de modo especial cuando se emplea un p^H próximo al límite inferior antes indicado de aproximadamente 6-6,5, ya que toda ligera reducción del p^H supone un peligro de cristalización de la insulina amorfa.

En conformidad con las anteriores observaciones el procedimiento según el invento se caracteriza porque se prepara una suspensión de insulina amorfa en suspensión acuosa en presencia de uno o más de los metales de cinc, cobalto, níquel, cadmio, cobre, manganeso o hierro en tal concentración que la suspensión terminada contenga por encima de aproximadamente $2 \times A \times 10^{-5}$ miliequivalentes de los citados metales por mililitro de suspensión, indicándose por "A" el número de unidades internacionales de insulina por mililitro de suspensión y dándose a la suspensión un p^H de aproximadamente 6 hasta aproximadamente 8,5, al mismo tiempo que se evita la presencia de aquellos iones que con reacción neutra tienen para los indicados metales mayor afinidad que posee la insulina por lo cual debe encontrarse

204233



en estado disuelto menos del 2 % de la insulina presente en la suspensión.

5 Ensayos clínicos han demostrado que de este modo es posible llegar a preparaciones inyectables de insulina que manifiestan un efecto protraído de 24 horas y más, y las cuales en la mayoría de los casos permiten aprovechar mejor la insulina inyectada que lo hacen las preparaciones de insulina conocidas con un grado de protracción correspondiente, lo cual supone un ahorro de insulina.

10 El efecto clínico conseguido puede reproducirse de modo absoluto, aun cuando las preparaciones obtenidas se hayan conservado durante largo tiempo. La razón de esto está relacionada con el p^H de las preparaciones y la pequeña cantidad de insulina en disolución, lo cual impide que la insulina amorfa se transforme en insulina cristalina durante el reposo, con -
15 versión ésta de la insulina amorfa en la insulina cristalina que daría por resultado cambiar considerablemente el efecto protraído de las preparaciones.

20 En la práctica terapéutica de la diabetes es de gran importancia tener preparaciones de insulina que posean un efecto terapéutico que sea suficiente con una inyección por día en la mayoría de los casos de diabetes. Se ha comprobado que la necesidad de estas preparaciones puede atenderse con preparaciones de insulina obtenidas según el presente invento, con
25 un contenido metálico de aproximadamente $3 \times A \times 10^{-5}$ hasta aproximadamente $18 \times A \times 10^{-5}$ miliequivalentes por mililitro, correspondiendo en el caso del cinc desde aproximadamente 1,

-9- 204233



5 hasta aproximadamente 6 gamma por unidad de insulina. Aplicando una inyección por día seña posible con preparaciones de esta composición conseguir un aprovisionamiento adecuado de insulina durante la mañana y mediodía al mismo tiempo que se encontrará suficiente insulina para cubrir el consumo de la misma durante la tarde y la noche.

10 Como lo anteriormente expuesto, el procedimiento según el invento se caracteriza además porque la suspensión acuosa de insulina amorfa lleva un contenido de uno o más de los metales citados de aproximadamente $3 \times A \times 10^{-5}$ hasta aproximadamente $18 \times A \times 10^{-5}$ miliequivalentes por mililitro indicando "A" el número de unidades internacionales de insulina por mililitro de suspensión.

15 Esto hace posible que sin emplear sustancias extrañas al organismo, se llegue a preparaciones de insulina que posean un grado de protección muy adecuado y que sean superiores a las preparaciones conocidas de insulina ya por lo que toca al aprovechamiento de la cantidad inyectada de insulina, ya consiguientemente por lo que toca a la posibilidad de ajustar al paciente respecto a la preparación.

20 Si la insulina empleada como material de partida solo contiene una pequeña cantidad de metal, se emplea un medio acuoso de suspensión que por sí mismo contenga uno o más de los metales en cuestión en una cantidad combinada por mililitro de por encima aproximadamente de $2 \times A \times 10^{-5}$ miliequivalentes.

26 Como reviste importancia que el p^H de las preparacio-

204233



nes obtenidas se mantenga entre aproximadamente 6 y aproximadamente 8,5 incluso cuando se hayan conservado durante algún tiempo algo largo, es conveniente emplear una o más sustancias tampón para mantener el p^H empleado. Al escoger la sustancia
5 tampón hay que asegurarse de que dicha sustancia no ha de llevar el medio acuoso de suspensión aniones que posean para el metal o los metales presentes en la suspensión mayor afinidad que la que posee la insulina. Como ejemplos de sustancias tampón utilizables pueden citarse los tampones de acetato, los de
10 borato, los de barbiturato dietílico y los de maleato, así como los tampones de fosfato, los cuales sin embargo únicamente deberán emplearse cuando el grado de prostración de la preparación esté basado en la presencia de níquel.

Según el invento es también conveniente que el medio
15 acuoso de suspensión tenga o se le dé un p^H de próximamente 7. Esto hace que las preparaciones resultantes tengan la misma acidez que la sangre y los fluidos de los tejidos en el organismo humano. Con este p^H la insulina amorfa es también más difícilmente soluble y consiguientemente son más estables las sus
20 pensiones preparadas.

Por razones clínicas se prefiere emplear medios isotónicos de suspensión. Para obtener estos medios acuosos isotónicos pueden emplearse sustancias como la glucosa, cloruro sódico o glicerina. Sin embargo estas sustancias solo hay que con
25 siderarlas como ejemplos. Otros se encontrarán en la literatura disponible en este campo.

-11-204233



Atendiendo a la estabilidad de las preparaciones de insulina es también conveniente agregar uno o más de los agentes preservadores empleados ordinariamente para líquidos inyectables. Ejemplos de estos agentes preservadores son el p-hidroxibenzoato de metilo (nipagina) y el p-hidroxibenzoato de propilo, como también el acetato fenil-mercúrico.

El procedimiento según el invento puede realizarse mezclando los materiales de partida empleados (insulina amorfa compuesto metálico, agua destilada y si se desea sustancia también, agente isotónico y preservativo) en cualquier orden y ajustando, si es necesario, el valor del p^H de la composición obtenida a aproximadamente 6 hasta aproximadamente 8,5, trabajando en condiciones asépticas si los materiales de partida se encuentran en estado estéril, p. ej. en forma de disoluciones estériles y asegurando si la práctica del proceso diera por resultado una mezcla conteniendo insulina no estéril, que la insulina se encontrará presente en estado disuelto e intercalando una esterilización, p. ej. una filtración retentora de los gérmenes, antes de precipitar la insulina en condiciones asépticas, y utilizando las incorporaciones sucesivas, si las hubiera, en estado estéril.

Como compuesto metálico puede emplearse una sal inorgánica u orgánica, como cloruros, sulfatos, nitratos o acetatos, y también un hidróxido, un óxido o un compuesto metálico complejo, que al incorporarse se hallará presente en tal estado que el metal pueda fijarse por la insulina.

204233



En lugar de insulina amorfa puede emplearse insulina cristalina como material de partida, pero en este caso es un requisito absolutamente necesario que la insulina cristalina se disuelva cuando se realiza el procedimiento.

5 Además es muy ventajoso el utilizar la insulina en forma de una disolución ácida de insulina amorfa o cristalina de suerte que la precipitación de la insulina amorfa se produzca durante la preparación de la misma. Así se obtendrán las propiedades físicas más favorables de los precipitados.

10 En una forma preferida de ejecución del procedimiento se mezcla una disolución ácida de insulina con otra disolución de otro de los materiales de partida, a excepción de las sustancias tampón, después de lo cual se realiza una filtración por filtros microbianos y luego se agrega una disolución esterilizada de sustancias tampón, y, si se quiere sustancias para ajustar el p^H en condiciones asépticas para tener un p^H entre aproximadamente 6 y aproximadamente 8,5.

15 Como ya anteriormente se ha indicado, la insulina amorfa puede fijar cantidades variables de los metales citados. Por consiguiente, en el procedimiento según el invento se procederá de modo que la insulina amorfa se emplee con tal cantidad de los metales en cuestión que el contenido de metal de la suspensión acabada se derive completa o parcialmente de la insulina amorfa utilizada. En este caso la insulina amorfa tendrá evidentemente un contenido metálico de más de 0,4 miliequivalentes por gramo aproximadamente.

20

25

-13- 204233



5 En lugar de insulina amorfa con tal cantidad de metal que el contenido metálico de la suspensión acabada se de rive total o parcialmente de la insulina amorfa empleada, - puede también utilizarse insulina cristalina con un correspon
diente contenido de metal, pero en este caso la insulina cris
talina debe hallarse presente en estado disuelto o debe po
nerse en disolución durante la preparación para su subsiguien
te precipitación en estado amorfo.

10 Para ilustrar más el procedimiento según el invento nos referiremos a los ejemplos siguientes que ilustran varias formas de ejecución aunque el invento no se limita a ellas.

15 Cuando en la práctica del procedimiento según el invento se utilizan disoluciones de diversos materiales de par
tida, será posible proceder preparando cierto número de diso
luciones estériles de reserva, las cuales se utilizan a base
de producir diversas preparaciones por incorporación de la -
disolución básica en condiciones asépticas. Pueden p. ej. ob
tenerse las siguientes disoluciones básicas:

20 Disolución de reserva I: 2,18 g de insulina recristalizada se disuelven en 25 mililitros de . ácido clorhídrico 0,1n y se agrega agua destilada hasta un volumen de 125 mililitros.

25 Disolución de reserva II: A 20 mililitros de una disolución acuosa de cloruro cálcico conteniendo 1 % de cinc se agrega agua desti

204233



lada hasta un volúmen de 125 mililitros.

5 Disolución de reserva III: A 10 mililitros de una disolución acuosa de cloruro cúprico conteniendo 1 % de cobre se agrega - agua destilada hasta un volúmen de 100 mililitros.

10 Disolución de reserva IV: A 10 mililitros de una disolución acuosa de cloruro de níquel conteniendo 1% de níquel se agrega agua destilada hasta un volúmen de 100 mililitros.

15 Disolución de reserva V: 1,36 g de acetato sódico con 3 mol de agua de cristalización se disuelven en agua destilada hasta un volúmen de 100 mililitros.

Disolución de reserva VI: 1,16 g de ácido maleico se disuelven en agua destilada hasta un volúmen de 100 mililitros.

20 Disolución de reserva VII: 2,06 g de dietil-barbiturato sódico se disuelven en agua destilada hasta un volúmen de 100 mililitros.

Disolución de reserva VIII: 0,95 g de borax se disuelven en agua destilada hasta un volúmen de 100 mililitros.

25 Disolución de reserva IX: 3,58 g de fosfato sódico secunda-

-15-204233



rio con 12 mol de agua de cristalización se disuelven en agua destilada hasta un volumen de 100 mililitros.

5

EJEMPLO 1

1,3 mililitros de glicerina se mezclan con 0,5 mililitros de una disolución al 25 % de nipagina en etanol y se agregan 50 mililitros de agua destilada. A la mezcla obtenida después de filtración estéril, se agregan 10 mililitros de la disolución de reserva I, 2,5 mililitros de la disolución de reserva II y 10 mililitros de la disolución de reserva V, después de lo cual se incorporan 3,0 mililitros de hidróxido sódico estéril 0,1 n y con agua destilada se completa la mezcla estéril hasta un volumen de 100 mililitros.

10

15

La insulina se precipitará en estado amorfo al agregar el hidróxido sódico y la suspensión producida tendrá un pH de 7. Contendrá aproximadamente 1 gamma de cinc por unidad de insulina.

EJEMPLO 2

Se procede como en ejemplo 1, pero empleando doble cantidad de la disolución de reserva II, con el resultado de que la suspensión formada de insulina amorfa contendrá aproximadamente 2 gamma de cinc por unidad de insulina.

20

EJEMPLO 3

Se procede como en el ejemplo 1, pero empleando 10 mililitros de la disolución de reserva II, y 3,4 mililitros de

25

204233



hidróxido sódico estéril 0,1 n. La suspensión de insulina amorfa así producida tendrá un p^H de 7, pero contendrá aproximadamente 4 gamma de cinc por unidad de insulina.

EJEMPLO 4

5 Se procede como en el ejemplo 3 pero se emplea una mezcla de 2,7 mililitros de hidróxido sódico estéril 0,1 n, con el resultado de que la suspensión obtenida de insulina amorfa tendrá el p^H 6.

EJEMPLO 5

10 1,3 mililitros de glicerina se mezclan con 0,5 mililitros de una disolución al 25 % de nipagina en etanol, y 50 mililitros de agua destilada, a la mezcla obtenida después de filtración estéril se agregan 10 mililitros de la disolución de reserva I, 5 mililitros de la disolución de reserva II y
15 10 mililitros de la disolución de reserva VI, después de lo cual se adicionan 21,4 mililitros de hidróxido sódico estéril 0,1 n y con agua destilada estéril se diluye la mezcla hasta un volúmen de 100 mililitros. La disolución formada de insulina amorfa tiene un p^H de 7 y contiene aproximadamente 2 gamma
20 de cinc por unidad de insulina.

EJEMPLO 6

25 Se procede como se ha indicado en el ejemplo 5, aunque se emplean 10 mililitros de la disolución de reserva VII en lugar de 10 mililitros de la disolución de reserva VI, y 4,5 mililitros de ácido clorhídrico estéril 0,1 n en lugar de 21,4 mililitros de hidróxido sódico.

17-204233



1352

La suspensión producida de insulina amorfa tiene el pH de 7 y contiene aproximadamente 2 gamma de cinc por unidad de insulina.

EJEMPLO 7

5 Se procede como se ha indicado en el ejemplo 5 pero empleando 10 mililitros de la disolución de reserva VIII en lugar de 10 mililitros de la disolución de reserva VI, y 0,9 mililitros de ácido clorhídrico estéril 0,1 n en lugar de 21,4 mililitros de hidróxido sódico.

10 La suspensión producida de insulina amorfa tiene un pH de 7 y un contenido de cinc de próximamente 2 gamma por unidad de insulina.

EJEMPLO 8

15 1,3 mililitros de glicerina se mezclan con 0,5 mililitros de una disolución al 25 % de nipagina en etanol y se agregan 50 mililitros de agua destilada.

20 Se agregan 10 mililitros de la disolución de reserva I, 10 mililitros de la disolución de reserva III y 10 mililitros de la disolución de reserva VII a la mezcla producida después de filtración estéril y luego se incorporan 3,4 mililitros de ácido clorhídrico estéril 0,1 n y la mezcla se diluye con agua destilada estéril hasta un volumen de 100 mililitros.

25 La suspensión así producida de insulina amorfa tiene el pH 7 y contiene aproximadamente 2,5 gamma de cobre por unidad de insulina.

204233



EJEMPLO 9

1,3 mililitros de glicerina se mezclan con 0,5 mililitros de una disolución al 25 % de nipagina en etanol, y se agregan 50 mililitros de agua destilada. Se incorporan luego 10 mililitros de la disolución de reserva I, 10 mililitros de la disolución de reserva IV y 10 mililitros de la disolución de reserva IX a la mezcla producida después de puesta en autoclave, y luego se agregan 0,5 mililitros de ácido clorhídrico estéril 0,1 n, y la mezcla se diluye con agua destilada estéril hasta un volumen de 100 mililitros.

La suspensión producida de insulina amorfa tiene el pH 7 y contiene aproximadamente 2,5 gamma de níquel por unidad de insulina.

EJEMPLO 10

174 mg de insulina cristalina se suspenden en 2,5 mililitros de una disolución de cloruro cálcico conteniendo 0,16 % de Zn^{++} , y se disuelven en una mezcla de 10 mililitros de HCl 0,02 n. Luego se agregan 1,3 mililitros de glicerina con isotónico y 0,5 mililitros de alcohol al 25 % de nipagina como agente preservativo, después de lo cual se diluye con agua hasta un volumen de 87 mililitros y se filtra la disolución estéril. 10 mililitros de un tampón puesto en autoclave conteniendo 1,36 % de acetato sódico $3, H_2O$, se agregan luego, después de lo cual se ajusta el pH a 7 con 3 mililitros de NaOH estéril 0,1 n. El producto resultante es una suspensión de insulina amorfa de la misma composición que en el ejemplo 1.

-19- 204233



EJEMPLO 11

174 mg de insulina cristalina se disuelven en 10 mililitros de HCl 0,02 n. Luego se agrega la siguiente disolución:

1,3 mililitros de glicerol.

0,5 mililitros de alcohol o espíritu al 25 % de nipagina.

8 miligramos de Zn (como cloruro),
más agua destilada hasta 80 mililitros.

La mezcla se filtra estéril, después de lo cual se obtiene en el autoclave una mezcla constituida por:

3,0 mililitros de NaOH 0,1 n.

136 miligramos de acetato sódico 3 H₂O,
más agua hasta 10 mililitros.

La suspensión de insulina amorfa así producida tiene la misma composición que la suspensión obtenida según el ejemplo 2.

EJEMPLO 12

174 mg de insulina cristalina se disuelven en 10 mililitros de HCl 0,02 n conteniendo 16 miligramos de Zn como cloruro y la disolución se filtra estéril. Luego se prepara una disolución conteniendo:

136 miligramos de acetato sódico, 3 H₂O

1,3 mililitros de glicerol,

0,5 mililitros de espíritu de nipagina al 25 %

3,4 mililitros de NaOH 0,1 n,
más agua hasta 90 mililitros.

204233



1957

Esta disolución también se filtra estéril, después de lo cual se mezclan las dos disoluciones filtradas estériles en condiciones asépticas.

La preparación así obtenida tiene la misma composición que la del ejemplo 3.

EJEMPLO 13

4.000 unidades internacionales de insulina amorfa se suspenden en 10 mililitros de disolución de cloruro de cinc conteniendo 0,16 % de Zn^{++} : luego se la disuelve por incorporación de 10 mililitros de HCl 0,1 n. Como isotónico se agregan 1,3 mililitros de glicerol y como agente preservativo 0,5 mililitros de espíritu de nipagina al 25 %. Diluyendo con agua hasta 90 mililitros, se realiza luego la filtración estéril después de lo cual, se incorporan en el autoclave 10 mililitros de NaOH 0,1 n conteniendo 136 miligramos de acetato sódico, con 3 H_2O .

Finalmente se ajusta el pH a 6 con 0,07 mililitros de NaOH 1 n estéril.

Por este procedimiento se obtiene una preparación de la misma composición que la del ejemplo 4.

EJEMPLO 14

4.000 unidades internacionales de insulina amorfa se suspenden en 5 mililitros de una disolución de cloruro cincico conteniendo 0,16 % de cinc y se disuelven con 3 mililitros de HCl 0,02 n y 10 mililitros de disolución de ácido maleico al 1,16 %. Luego se agregan 1,3 mililitros de glicerol, 0,5

-21- 204233



mililitros de espíritu de nipagina al 25 % y agua hasta 80 mililitros. La disolución se filtra estéril y después el p^H se ajusta a 7 con 20 mililitros de NaOH estéril 0,1 n.

5 La preparación así obtenida tiene la misma composición que la del ejemplo 5.

EJEMPLO 15

4.000 unidades internacionales de insulina amorfa estéril se suspenden en el medio de suspensión filtrado estéril a continuación indicado:

- 10 8 miligramos de cinc (como cloruro).
206 miligramos de dietil-barbutirato sódico.
1,3 mililitros de glicerol
0,05 mililitros de espíritu de nipagina al 25 %.
6,5 mililitros de HCl 0,1 n,
15 más agua hasta 100 mililitros.

La suspensión de insulina amorfa así obtenida tiene el p^H7 y contiene aproximadamente 2 gamma de cinc por unidad de insulina.

EJEMPLO 16

20 4.000 unidades internacionales de insulina amorfa estéril se suspenden en el medio de suspensión filtrado estéril a continuación indicado:

- 25 8 miligramos de cinc (como cloruro).
95 miligramos de bórax.
1,3 mililitros de glicerol
0,5 mililitros de espíritu de nipagina al 25 %.

204233



2,9 mililitros de HCl 0,1 n,
más agua hasta 100 mililitros.

La preparación así obtenida tiene la misma composición que la del ejemplo 7.

EJEMPLO 17

4.000 unidades internacionales de insulina amorfa se disuelven en una disolución constituida por:

10 miligramos de cobre (como cloruro).

5,4 mililitros de HCl 0,1 n.

1,3 mililitros de glicerol.

0,5 mililitros de espíritu de nipagina al 25 %, más agua hasta 90 mililitros.

Se filtra estéril la disolución y después se agregan 10 mililitros de una disolución estéril de dietil-barbiturato sódico al 2,06 %.

La suspensión resultante de insulina amorfa tiene la misma composición que la del ejemplo 8.

EJEMPLO 18

174 mg de insulina cristalina se suspenden en 10 mililitros de una disolución de cloruro de níquel conteniendo 0,1 % de níquel, y se disuelven con 2,5 mililitros de HCl 0,1 n. Se agregan luego 1,3 mililitros de glicerol y 0,5 mililitros de espíritu de nipagina al 25 % y se diluye con agua hasta 95 mililitros. Se filtra estéril la disolución y luego se incorporan 5 mililitros de tampón contenidos en autoclave con teniendo 358 mg de Na_2HPO_4 con 12 H_2O .

23-204233



La preparación obtenida tiene la misma composición que la del ejemplo 9.

EJEMPLO 19

200 mg de insulina amorfa (20 unidades internacionales por milígramo.) conteniendo 2,3 % de cinc, se mezclan con:
2,5 mililitros de disolución de $ZnCl_2$ conteniendo 0,16 % de Zn.

3 mililitros de HCl 0,02 n.

1,3 mililitros de glicerol.

0,5 mililitros de espíritu de nipagina al 25 %.

10 mililitros de ácido maleico al 1,16 %, más agua hasta 80 mililitros.

La disolución se filtra estéril, después de lo cual se ajusta el p^H a 7 con 20 mililitros de NaOH estéril 0,1 n.

La preparación tiene la misma composición que la de los ejemplos 14 y 15:

EJEMPLO 20

200 mg de insulina amorfa (20 unidades internacionales por milígramo) conteniendo 5 % de Cu^{++} se mezclan con:

5,4 mililitros de HCl 0,1 n.

1,3 mililitros de glicerol.

0,5 mililitros de espíritu de nipagina, más agua hasta 90 mililitros.

La disolución obtenida de insulina se filtra estéril, se ajusta luego el p^H con 10 mililitros de una disolución estéril de dietil-barbiturato sódico a 2,06 %, con lo que se ha-

204233



ce que la insulina se precipite amorfa.

La preparación tiene la misma composición que la de los ejemplos 17 y 8.

EJEMPLO 21

5 174 mg de insulina cristalina conteniendo 2,7 % de Zn,
se disuelven en:

10 mililitros de ácido maleico al 1,16 %.

1,3 mililitros de glicerol.

0,5 mililitros de espíritu de nipagina al 25 %.

10 0,8 mililitros de HCl 0,1 n,

más agua hasta 80 mililitros.

Se filtra la disolución estéril, después de lo cual el
15 p^H se eleva a 7 con 20 mililitros de NaOH estéril 0,1 n, con
lo que la insulina se precipita amorfa. La suspensión de insu-
lina producida tiene el p^H 7 y contiene aproximadamente 1 ga-
mma de cinc por unidad de insulina.

.....

- 25 - 204233



N O T A

La presente patente de Invención comprende las siguientes reivindicaciones:

5 1.- Procedimiento para la obtención de preparaciones inyectables de insulina con efecto protraído, caracterizado porque se produce una suspensión de insulina amorfa en un medio acuoso de suspensión en presencia de uno o más de metales como cinc, cobalto, níquel, cadmio, cobre, manganeso y hierro, en tal concentración que la suspensión acabada contenga por encima de aproximadamente $2 \times A \times 10^{-5}$ miliequivalentes de los
10 metales citados por mililitro de suspensión, indicando "A" el número de unidades internacionales de insulina por mililitro de suspensión y porque a la suspensión se le dá un pH de aproximadamente 6 hasta aproximadamente 8,5, al mismo tiempo que se evita la presencia de iones que con reacción neutra tienen para
15 los metales citados mayor afinidad que la insulina, dando por resultado que menos de 2 % de la insulina presente en la suspensión se encuentre en estado disuelto.

20 2.- Procedimiento según lo reivindicado en el punto 1, caracterizado porque la suspensión acuosa recibe un contenido de 1 o más de los metales citados de aproximadamente $3 \times A \times 10^{-5}$ hasta aproximadamente $18 \times A \times 10^{-5}$ miliequivalentes por mililitro.

25 3.- Procedimiento según lo reivindicado en los puntos 1 o 2, caracterizado porque se emplea un medio acuoso de suspensión que contiene 1 o más de los metales en cuestión en una

204233



cantidad combinada por mililitro superior aproximadamente a $2 \times A \times 10^{-5}$ miliequivalentes.

5 4.- Procedimiento según lo reivindicado en cualquiera de los puntos 1 a 3, caracterizado porque para mantener un p^H definido de la suspensión se utiliza una mezcla de una o más sustancias tampón.

5.- Procedimiento según lo reivindicado en cualquiera de los puntos precedentes, caracterizado porque el medio acuoso de suspensión tiene o se le dá un p^H de aproximadamente 7.

10 6.- Procedimiento según lo reivindicado en cualquiera de los puntos precedentes caracterizado porque se emplea un medio isotónico de suspensión.

15 7.- Procedimiento según lo reivindicado en cualquiera de los puntos precedentes, caracterizado porque se emplea un medio de suspensión al que se ha incorporado un agente preservador.

20 8.- Procedimiento según lo reivindicado en cualquiera de los puntos precedentes, caracterizado porque se emplean los materiales de partida, (insulina amorfa, compuesto metálico, agua destilada y sustancia tampón, agente isotónico y preservativo si los hay, se mezclan en cualquier orden y porque si es necesario, el valor p^H del compuesto producido se ajusta aproximadamente a 6 y hasta aproximadamente 8,5, trabajando en condiciones asépticas si los materiales de partida se encuentran en estado estéril, p. ej. en forma de disoluciones estériles y caso de que la práctica del proceso diese por resultado una mez-

25

204233

-27-



5 cla conteniendo insulina no estéril, asegurando que la insulina se habrá de encontrar presente en estado disuelto e insertando luego una esterilización, p. ej. por filtros microbianos, antes de precipitar dicha insulina en condiciones asépticas, y empleando, si hubiere lugar, en forma estéril las incorporaciones subsiguientes.

10 9.- Procedimiento según lo reivindicado en el punto 8 caracterizado porque se emplea insulina cristalina en lugar de insulina amorfa, disolviéndose la insulina cristalina durante la práctica del procedimiento.

10.- Procedimiento según lo reivindicado en el punto 8, caracterizado porque se emplea una disolución ácida de insulina amorfa o cristalina.

15 11.- Procedimiento según lo reivindicado en cualquiera de los puntos precedentes caracterizado porque una disolución ácida de insulina se mezcla con una disolución de otros materiales de partida a excepción de la sustancia tampón, después de lo cual se efectúa una filtración bacteriana y luego se agrega una disolución esterilizada de la sustancia de tampón en condiciones asépticas, y si es necesario, se incorporan 20 sustancias para ajustar el p^H con objeto de obtener un valor del mismo entre aproximadamente 6 y aproximadamente 8,5.

25 12.- Procedimiento según lo reivindicado en cualquiera de los puntos precedentes, caracterizado porque se emplea insulina amorfa con tal cantidad de los metales en cuestión que el contenido metálico de la suspensión acabada se deriva

204233



completa o parcialmente de la insulina amorfa empleada.

5 13.- Procedimiento según lo reivindicado en el punto 11, caracterizado porque se emplea insulina amorfa con un contenido metálico de por encima aproximadamente de 0,4 miliequivalentes por gramo.

14.- Procedimiento según lo reivindicado en los puntos 12 y 13, caracterizado porque en lugar de insulina amorfa se emplea insulina cristalina que se transforma en estado amorfo por disolución y subsiguiente precipitación.

10 15.- Procedimiento para la obtención de preparaciones inyectables de insulina con efecto protraído.

Según se describe y reivindica en la presente memoria descriptiva.

15 Consta esta memoria de veintiocho hojas foliadas y escritas a máquina por una sola de sus caras.

Madrid, a 26 de Junio de 1952.

GUILLERMO ROEB
P. P.