

AÑO 1958.

Expediente núm.



242322

REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL

242322

PATENTE DE INVENCIÓN

MEMORIA DESCRIPTIVA

que se acompaña a la solicitud de

una PATENTE DE INVENCIÓN por veinte años, en España

a favor de

La r.s. Novo Terapeutisk Laboratorium A/S, de nacionalidad

danesa domiciliado en Copenhagen (Dinamarca)

calle de Nøglerbakkevej núm. 115

por:

« Procedimiento para tratamiento de los cristales de insulina y para producir con ellos preparaciones de insulina. »

Nº 8097

Agente Sr. D. Guillermo BOHR.



c.g.

- 1 -

242322

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

Copenhagen (Dinamarca)
115, ~~El~~glebakkevej

por:

• PROCEDIMIENTO PARA TRATAMIENTO DE LOS CRISTALES DE INSULINA
Y PARA PRODUCIR CON ELLOS PREPARACIONES DE INSULINA •

Con la prioridad de solicitud patente danesa nº 2020/57,
del día 8 de Junio de 1957.

INVENTOR: Jorgen Schlichtkrull; danés.



242322

Es sabido que la insulina cristalina se produce agregando una substancia tampón a una disolución acuosa de insulina conteniendo uno o varios iones metálicos, requisito previo para la cristalización de la insulina, por ejemplo de cinc, cadmio, cobalto, níquel y cobre, preferentemente de cinc, y ajustando el pH a 5,5-6,5. Para impedir la precipitación temporal de la insulina en estado amorfo pueden agregarse durante la cristalización disolventes orgánicos, por ejemplo acetona, los cuales han de impedir la precipitación de la insulina amorfa, pero no de los cristales.

Como substancias tampón se han empleado fosfatos alcalinos, los cuales tienen, sin embargo, el inconveniente de precipitar una parte de los iones de cinc en forma de fosfato de cinc muy soluble, el cual impurifica los cristales. En una recristalización subsiguiente del precipitado de insulina de una disolución que se ha tamponado con acetato amónico, es posible librarse de la impurificación del fosfato cincico y los cristales así producidos se ha comprobado que contienen 0,52 % de cinc, que incidentalmente corresponden a 3 átomos de cinc en la célula romboédrica de los cristales. Como substancia tampón pueden también emplearse boratos, barbiturato dietílico o maleato dietílico, tampones que no se precipitan ni se unen de otro modo a los iones de cinc de la disolución. Cuando se emplea esta clase de substancias tampón solo debe cuidarse de que no existan presentes muchos iones de cinc o de metal análogo, pues la insulina cuando se une al metal se torna ligeramente soluble



3.-

242322

5 y se dificulta su cristalización. Un tampón muy adecuado es el citrato sódico que fija los iones de cinc en un compuesto muy complejo que posee precisamente tal energía que la cantidad de cinc que se requiere previamente para la cristalización de la insulina (0,35 % o 2 átomos de cinc por unidad celular) se fija a la insulina. Los cristales de insulina producidos con tampón de citrato contienen 0,35 % de cinc o una cantidad equimolecular de los otros metales (Cd, Co, Ni, etc) promotores de la cristalización.

10 La cristalización de la insulina puede ser una fase en la producción aséptica de preparaciones farmacéuticas de insulina, por ejemplo de las suspensiones llamadas de cinc-insulina, siendo estériles las suspensiones de cristales de insulina conteniendo cinc y poseyendo una acción prolongada de la misma insulina. En este caso no habrá que realizar de ordinario el aislamiento de los cristales de las aguas madres, sino que la suspensión cristalina se disolverá de modo adecuado para obtener la composición deseada en la preparación final.

15 En todos los otros casos los cristales de insulina se presentan como un producto intermedio de la fabricación, por cuyo motivo se aíslan, se lavan, si se quiere, y se secan de manera que solo contenga 2-8 % de agua. Los contenidos de cinc y de metales análogos en los cristales de insulina, según se indica antes y después, se han calculado por el peso de los cristales secos.

20 Los cristales no secados se calcula que contienen aproximadamente 60 % de sustancia sólida.

25 Si los cristales de insulina producidos por los



4.-

242322

métodos de cristalización antes citados se suspenden en agua destilada y la suspensión se inyecta por vía subcutánea, entonces se conseguirá una acción de insulina que no se diferenciará sustancialmente de la breve acción de la insulina disuelta.

5 Durante muchos años ha prevalecido la opinión de que para lograr una acción prolongada de la insulina de importancia práctica era necesario inyectar la insulina juntamente con sustancias auxiliares extrañas al cuerpo humano, por ejemplo protamina, globina, sulfeno, etc. que tienen el efecto de diferir la reabsorción de la insulina.

10 Después se ha comprobado que no es necesario emplear tales sustancias extrañas. Así es posible conseguir una acción prolongada de la insulina por medio de suspensiones acuosas de cristales de insulina con tal composición que si el medio de suspensiones se ajusta a pH 7, los cristales suspendidos de insulina presentan un contenido bastante elevado de los metales arriba citados, superior a 0,25 miliequivalente por gramo, preferentemente por lo menos de 0,25 miliequivalente por gramo, gracias a lo cual los cristales permanecerán prácticamente sin disolverse con este pH.

20 El presente invento tiene por objeto un procedimiento para tratar cristales de insulina, gracias al cual es posible comunicar a los cristales tales propiedades que inyectados por vía parenteral después de suspendidos en un medio acuoso, habrán de tener una acción prolongada de la insulina sin necesidad de incorporar de antemano al medio acuoso cierto contenido mínimo de metales promotores de la cristalización,

25



5.-

242322

y lograr tal composición que los cristales tomen el metal del medio con reacción neutra o sin que sea necesario incorporar de antemano a los cristales de insulina un contenido metálico algo grande.

5 El procedimiento según el invento se caracteriza porque los cristales producidos total o parcialmente de la glándula del páncreas del buey se someten a un tratamiento térmico a tal temperatura y durante tal período de tiempo que, después de suspendidos en un medio acuoso inyectable e inyectados
10 luego por vía subcutánea, dichos cristales presentan una acción de la insulina prolongada en comparación con la acción de cristales no tratados en las mismas condiciones.

La acción prolongada de la insulina será tanto más prolongada cuanto más alta sea la temperatura y más largo haya sido el período de tiempo. Si como material de partida se emplean cristales de insulina del buey, puede lograrse una acción extraordinariamente prolongada de la insulina si los
15 cristales se almacenan a 20° C durante aproximadamente un año o almacenándolos a 45° C durante tres semanas o a 70° C durante
20 veinticuatro horas. Según el invento se prefiere someter los cristales a una temperatura superior a la temperatura del local, preferentemente a 40 - 70° C. Temperaturas superiores a unos 70° C serán normalmente inadecuadas ya que los cristales tienen tendencia a pegarse unos con otros, en tanto que el empleo de temperaturas inferiores a unos 40° requiere un período de tiempo
25 inconvenientemente largo para la producción práctica. Puede fácilmente lograrse cualquier grado deseado de prolongación de la



242322

actividad de la insulina variando la temperatura y el tiempo del tratamiento térmico. Mezclando suspensiones con diversas actividades es posible obtener un número indefinido de diferentes actividades combinadas.

5 Conviene realizar el tratamiento térmico de los cristales según el invento mientras los mismos cristales se encuentran en suspensión por ejemplo cuando se los obtiene por cristalización. En este estado los cristales contienen, como antes se ha dicho, aproximadamente 60 % de sustancia sólida. El efecto del tratamiento térmico se debilita cuando desciende 10 el contenido acuoso de los cristales. Si durante el tratamiento térmico el contenido de agua de los cristales es de unos 20 %, entonces se considera necesario duplicar el tiempo de tratamiento de los cristales con objeto de lograr el mismo efecto protraído como si se tratase cristales no secados, siendo por lo demás 15 idénticas las condiciones. La insulina cristalina seca ordinaria, conteniendo unos 2-8 % de agua no se afectará prácticamente por el tratamiento térmico.

20 Según el invento se ha descubierto que el pH del medio con que los cristales están o han estado suspendidos, tiene una influencia decisiva sobre el efecto terapéutico de la acción térmica. Mediante ensayos se ha comprobado que la acción prolongada de los cristales tratados será mayor cuanto menor será el pH dentro del intervalo de 5-8. Si el pH 25 se encuentra en la proximidad del pH de la sangre (7,4), la acción térmica no tendrá prácticamente efecto alguno. Por consiguiente, en la producción de cristales con acción retardada se empleará según el invento un pH inferior a 7, por ejemplo



7.-

242322

de 5,55o 6.

5 Como medio de suspensión de los cristales cuando estos se someten al tratamiento térmico, pueden emplearse por ejemplo las aguas madres de la cristalización. Pueden también utilizarse otros medios, siempre que teniendo en cuenta lo que corrientemente se sabe de la insulina, se tenga cuidado de que los cristales no se disuelvan en el medio, el cual además no debe contener sustancias que perjudiquen la actividad biológica de la insulina. Para fijar el pH del medio conviene emplear una sustancia tampón, de las que a continuación se señalan algunos ejemplos. Debemos advertir que algunas sustancias tampón, como el citrato, que cuando se unen a los iones del cinc pueden anular la acción prolongada de las suspensiones cristalinas de insulina-cinc, no impiden el efecto del tratamiento térmico. El medio puede también contener disolventes que sean miscibles con agua, como la acetona, lo que podrá ocurrir cuando por ejemplo sean las aguas madres de una cristalización por el método del citrato. En la práctica es mucho más conveniente que el medio en que se realiza la acción térmica, tenga una composición adecuada para inyecciones.

15 En tal caso, diluyendo convenientemente etc. y ajustando el pH a 7 es posible convertir la suspensión en una preparación de insulina lista para su empleo, siempre que se trabaje en condiciones estériles.

25 Los cristales de insulina producidos según el invento en nada difieren de los cristales como se encuentran antes del tratamiento térmico, ni en el aspecto ni en la compo-



8.-

242322

5 sición amino-ácida, aunque posean una solubilidad algo menor en una disolución clorhídrica de cloruro sódico y en un tampón neutro de fosfato. La facilidad de cristalización de la insulina se reduce durante el procedimiento térmico, lo cual puede fácilmente comprobarse recristalizando los cristales tratados.

10 Al llevar a la práctica el procedimiento según el invento pueden emplearse cristales de insulina producidos por cualquier método de cristalización. De modo particular puede aplicarse un método especial de cristalización señalado en la patente danesa nº 78069. Teniendo en cuenta la aplicación terapéutica es conveniente que los cristales no sean demasiado gruesos. Para evitar la sedimentación en las ampollas, el tamaño de los cristales no deberá pasar de 40μ . La actividad biológica de las suspensiones cristalinas depende algo del tamaño de los cristales, ya que la prolongación de la actividad aumenta al aumentar dicho tamaño. Por consiguiente es conveniente producir los cristales con la misma distribución en el tamaño de una a otra carga de los mismos cristales.

20 El procedimiento según el invento puede también aplicarse a cristales de insulina con un contenido metálico particularmente elevado (superior a 0,25 miliequivalente por gramo) ya que así se les puede dotar de un efecto más protraído en suspensión acuosa que sin el tratamiento térmico según el invento.

25 El invento se refiere también a la producción de preparaciones de insulina con efecto protraído, siendo dicho procedimiento de la clase en que se suspenden cristales de insu-



9.-

242322

lina estériles en condiciones estériles en un medio acuoso estéril, adecuado para inyección y la nota característica del procedimiento se halla en que se emplean cristales de insulina producidos según el invento y en que el medio acuoso tiene o se dota de un pH de unos 7. (6,5 - 7,5). De lo anteriormente dicho se desprende de estas preparaciones neutras son completamente estables, aún cuando se almacenen durante un largo período de tiempo debido al hecho de que el medio acuoso pesé un pH de unos 7.

Si en las preparaciones no se utilizan sustancias auxiliares que ahora son superfluas, como la protamina, zinc, etc., pueden mezclarse con disoluciones de insulina ordinaria de acción rápida, conservando la acción rápida de la insulina ordinaria y la acción prolongada de los cristales. Es también posible, al obtener las preparaciones, dotarlas de cierto contenido de insulina disuelta de acción rápida con objeto de lograr un efecto inicial enérgico. En tales casos puede emplearse en la fracción disuelta insulina de cerdo, y que posee una solubilidad relativamente elevada a reacción neutra. Finalmente pueden obtenerse preparaciones compuestas produciendo cristales con varios grados diferentes de actividad, de modo que existe prácticamente un número ilimitado de posibilidades de lograr actuaciones polifásicas adecuadas. De este modo el nuevo descubrimiento y los métodos de preparación desarrollados según el invento no solo representan un nuevo modo de obtener una acción prolongada de la insulina, sino que constituyen también la base de una terapéutica de la insulina mucho más flexible.



10.-

242322

xible y que puede acomodarse individualmente en un grado mucho más amplio de lo que antes era posible y, lo que es digno de recordarse, sin emplear sustancias auxiliares.

5 Nada se opone a que las citadas suspensiones se provean de un contenido de iones por ejemplo de cinc, con lo que puede lograrse una acción de insulina todavía más prolongada, pero esto no es necesario ya que dentro del objeto del invento puede llegarse a las suspensiones cristalinas de insulina con una acción de esta mucho más prolongada de lo que antes se podía lograr con los cristales de insulina hasta ahora conocidos en suspensiones conteniendo cinc en concentraciones adecuadas para fines terapéuticos.

10 Los ejemplos después citados servirán para ilustrar más el procedimiento según el invento.

15 En los siguientes ejemplos se ha empleado una suspensión normal (S_1) con la siguiente composición:

40 unidades por mililitro de cristales de insulina de la glándula del pancreas del buey.

1,4 mg de Zn^{++} por 100 mililitros (como cloruro),

20 0,01 M de acetato sódico,

0,7% de NaCl,

0,1% de metil-p-hidroxi-benzoato y,

HCl hasta pH=5,5.

25 La suspensión se obtiene diluyendo 1 volumen de suspensión cristalina concentrada con 9 volúmenes de disolución de metil-p-hidroxi-benzoato conteniendo 0,11% de metil -p-hidroxi-benzoato.



11.-

242322

La suspensión cristalina concentrada se obtiene mezclando las siguientes disoluciones A y B y agitando luego mientras cristaliza la insulina:

- 5 A. 3,48 gramos de cristales de insulina de buey conteniendo 0,78 % de Zn se suspenden en 100 mililitros de agua y se disuelven agregando 4 ml de HCl 1 n. La disolución se filtra estéril y se diluye hasta 150 mililitros.
- 10 B. 1/50 mol de acetato sódico y 14 gramos de NaCl se disuelven en agua hasta 50 mililitros, conteniendo tanto NaOH que la mezcla de A con B de un pH=6,5.

EJEMPLO 1

La suspensión S₁ se almacenó a 45° C durante 2 semanas. Por inyección en conejos se observará un efecto protraído similar al de la insulina-protamina-zinc. Los cristales se separan por aspiración y se secan.

15

EJEMPLO 2

Los cristales secados del anterior ejemplo se suspendieron en un medio inyectable estéril con la misma composición que aquella en que los cristales se sometieron a la acción térmica. Después de suspender, los cristales, el pH se ajustó a 7,0 con NaOH 1 n. La preparación tiene en general el mismo efecto que la insulina-protamina-zinc. La acción prolongada de la preparación no cambia en las condiciones usuales de almacenaje para las preparaciones de insulina.

20

25

EJEMPLO 3

242322

La suspensión S_1 se almacenó a $45^{\circ} C$ durante cuatro semanas. Gracias a esto la actividad de los cristales resultó tan protraída que después de la subsiguiente inyección de la suspensión en conejos pudo observarse una acción bastante enérgica durante las primeras ocho horas después de la inyección. Por el contrario, la actividad biológica de la insulina queda intacta, lo cual puede probarse disolviendo los cristales en ácido clorhídrico y realizando una determinación de la potencia biológica.

EJEMPLO 4

A la suspensión S_1 se agregaron 1,8 miligramos de Zn^{++} por 1000 unidades en la forma de cloruro de cinc y el pH se ajustó a 5,0 con HCl 1 n, sin aumentar esencialmente el volumen. Después de un reposo durante un año a 20 grados centígrados el efecto protraído de la suspensión es enorme y posee una acción mucho más lenta que la insulina-protamina-cinc.

EJEMPLO 5

A la suspensión S_1 se agregaron fosfato sódico y ácido clorhídrico sin aumentar esencialmente el volumen, de suerte que la suspensión posee 0,01 M por lo que se refiere al fosfato y tiene un pH = 5. Después de reposar durante dos semanas a $45^{\circ} C$, los cristales adquirieron una actividad altamente protraída y pueden aislarse y secarse si se quiere.

EJEMPLO 6

242322

5 A la suspensión S_1 se agregó HCl i n hasta un pH=5,0. Después de reposar durante siete horas a 70° C, los cristales sufrieron un cambio tal que la suspensión adquirió una actividad grandemente protraída.

EJEMPLO 7

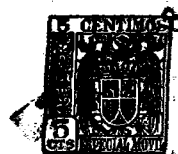
Se obtuvo una mezcla de cristales de la siguiente composición:

- 10 0,8% de insulina de buey
 0,04% de Zn^{++} (como cloruro)
 0,05 M de citrato sódico
 15% de acetona y
 HCl hasta un pH = 6,0

15 La cristalización tiene lugar mientras se agita durante algunas horas, después de lo cual se evapora la acetona, continuando la agitación durante veinticuatro horas a 45°C. Luego la disolución se diluye con una disolución de cloruro sódico y metil-p-hidroxi-benzoato, con lo que se obtiene la siguiente composición:

- 20 40 unidades de cristales de insulina por mililitro,
 97 gamma de Zn^{++} por mililitro,
 0,01 M de citrato sódico,
 0,7% de NaCl,
 0,1% de metil-p-hidroxi-benzoato.

25 Se ajusta después el pH a 5,5 con HCl i n. Después de un almacenado durante dos semanas a 45°C la suspensión presentará una acción altamente protraída de la insulina y los cris-



tales, se separan.

242322

EJEMPLO 8

Se obtiene una cristalización como en el anterior ejemplo, pero los cristales se separan por aspiración, se lavan con acetona al 60% y se secan antes del tratamiento térmico. Los cristales secados se suspenden en un medio de modo que se obtenga una suspensión de la misma composición química que S_1 . Después de un reposo durante dos semanas a 45°C la suspensión presenta una actividad grandemente protraída y se separan los cristales, o se ajusta la suspensión a pH 7, con lo que se obtiene directamente una preparación de insulina con un efecto protraído.

EJEMPLO 9

Se obtiene una suspensión (S_2) siguiendo el procedimiento descrito para S_1 con la excepción de que se omite la adición de NaCl. Después de un reposo durante dos semanas S_2 parece poseer una acción de la insulina altamente protraída.

EJEMPLO 10

Se obtiene una cristalización como se ha descrito con relación a S_1 , pero en lugar de diluir la suspensión cristalina, se separan los cristales y se secan. Luego se suspenden los cristales secados en un medio acuoso de manera que se obtenga una suspensión con la misma composición química de S_1 . Después de un reposo durante dos semanas a 45°C, la suspensión presentará un efecto altamente protraído y luego pueden sepa-



rarse los cristales.

242322

En los anteriores ejemplos se han empleado cristales de cinc-insulina. El procedimiento segun el invento puede, sin embargo, aplicarse también a cristales de insulina con otros metales, por ejemplo cobalto, cadmio, niquel o sobre. Para explicar esto aúnciremos los siguientes ejemplos, en los que se han utilizado cristales de cobre-insulina.

EJEMPLO 11

Se prepara una mezcla de cristalización con la siguiente composición:

0,8% de insulina de buey exenta de cinc,

0,040% de Cu^{++} (como cloruro),

0,05 M de citrato sódico,

15% de acetona

HCl hasta un pH = 6,0

La cristalización tiene lugar mientras se agita hasta el siguiente día, después de lo cual se evapora la acetona y la suspensión se diluye como se ha descrito en el ejemplo 7. Así la suspensión tiene la siguiente composición:

40 unidades de cristales de insulina por mililitro

87 gamma Cu^{++} por mililitro,

0,01 M de citrato sódico,

0,7% de NaCl,

0,1% de metil-p-hidroxi-benzoato,

después de lo cual con HCl 1 n se ajusta el pH a 5,5. Después



242322

de reposar durante dos semanas a 45°C, la suspensión presentará una acción grandemente protraída de la insulina.

En lugar de someter los cristales de insulina al tratamiento térmico en suspensión, los cristales pueden también como tales someterse al tratamiento teniendo cuidado de que dichos cristales no se sequen demasiado durante el tratamiento. Esto puede realizarse recogiendo los cristales separados en un recipiente, por ejemplo en un desecador, en el que mediante por ejemplo una disolución salina acuosa se mantiene tal presión del vapor que el contenido de agua de los cristales se conserve constante, por ejemplo en el intervalo de 20 a 40%.

En la práctica del procedimiento según el invento puede procederse por ejemplo como sigue:

EJEMPLO 12

Se separan por aspiración los cristales de la suspensión S_1 y se pesan sobre un filtro de cristal tarado, después de lo cual se colesan en un desecador al vacío (1-2 mm Hg) conteniendo una disolución de cloruro sódico al 5%. Después de 3 días a la temperatura del local, se alcanza el equilibrio y el desecador se mantiene a 45°C durante dos semanas. Así el equilibrio solo se altera ligeramente y se comprueba que los cristales contienen aproximadamente 20% de agua. Los cristales se suspenden en un medio de modo que la suspensión tenga la misma composición que S_1 . La suspensión presenta una actividad algo prolongada.

- - - - -



1955

17.-

242322

N O T A.-

La presente patente de Invención comprende las siguientes reivindicaciones:

5 1.- Procedimiento para el tratamiento de cristales de insulina, caracterizado porque los cristales de insulina obtenidos total o parcialmente de la glándula del páncreas del buey se someten a un tratamiento térmico a tal temperatura y durante tal período de tiempo que después de suspenderlos en un medio acuoso inyectable y de inyectarle subsiguientemente por vía subcutánea, los cristales presentan una acción de la insulina protraída en comparación con la acción que en las mismas condiciones tienen los cristales no tratados.

10 2.- Procedimiento según lo reivindicado en el punto 1, caracterizado porque los cristales se someten a una temperatura superior a la temperatura del local, preferentemente de 40 - 70°C.

15 3.- Procedimiento según lo reivindicado en los puntos 1 o 2, caracterizado porque los cristales se someten al tratamiento térmico mientras están suspendidos en un medio acuoso.

20 4.- Procedimiento según lo reivindicado en el punto 3, caracterizado porque el medio acuoso tiene un pH inferior a 7.

25 5.- Procedimiento según lo reivindicado en los puntos 3 o 4, caracterizado porque el medio acuoso tiene una composición adecuada para inyecciones.



18.-

242322

5 6.- Procedimiento para la obtención de preparaciones de insulina con una acción protraída, en el cual se suspenden cristales estériles de insulina en condiciones estériles y en un medio acuoso también estéril y adecuado para inyecciones, caracterizado porque se emplean cristales de insulina tratados según lo reivindicado en cualquiera de los puntos precedentes y porque el medio acuoso tiene o se le comunica un pH de unos 7 (6,8-7,5).

10 7.- Procedimiento para tratamiento de los cristales de insulina y para producir con ellos preparaciones de insulina.

Según se describe y reivindica en la presente memoria descriptiva.

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

Madrid, a 7 de Junio de 1958.