



337521

MEMORIA DESCRIPTIVA

que se presenta para unir a la solicitud

d e

P A T E N T E D E I N T R O D U C C I O N

formulada el 3 de Marzo de 1.967, con el núm. 337.521

e n

E S P A Ñ A

por DIEZ años

a nombre de ROUSSEL-UCLAF, sociedad anónima francesa, establecida en 35 Boulevard des Invalides, París, Francia, por:

"UN PROCEDIMIENTO DE PREPARACION DE NUEVOS COMPUESTOS POLIPEPTIDICOS"

---

El presente invento, en cuya realización han participado los Sres. Paul Bellet, Truong van Thuong y Gerard Nominé, tiene como objeto un procedimiento de preparación de nuevos compuestos polipeptídicos.

5 El invento tiene más particularmente como objeto un procedimiento de preparación de nuevos compuestos polipeptídicos, constituidos por nuevos derivados de la insulina, que está caracterizado esencialmente porque se hace reaccionar un compuesto dicarbonilado, especialmente

16.6.67.

23 JUL



un compuesto beta-dicarbonilado, tal como acetilacetona, con insulina o uno de sus derivados directos, tales como los derivados N-acilados.

5 Los derivados de la insulina que resultan del procedimiento anterior, están caracterizados principalmente porque la agrupación guanidilo de su eslabón de arginina ya no está bajo forma libre, como en la insulina, sino que se encuentra bloqueado por combinación con el compuesto dicarbonilado.

10 Entre estos derivados, el invento se refiere más especialmente al derivado de la insulina, obtenido por acción de acetilacetona sobre la insulina y está caracterizado principalmente porque su agrupación guanidilo se encuentra bloqueada por combinación con acetilacetona,  
15 bajo forma de una pirimidina.

Se sabe que la insulina, hormona proteínica producida en el páncreas, presenta notables propiedades fisiológicas. Así es como la misma posee en particular dos tipos de actividad: una actividad hipoglicémica, y  
20 una actividad anabolizante.

La actividad hipoglicémica ha sido aprovechada en la terapéutica para el tratamiento de la diabetes. Por contra, la actividad anabolizante no ha podido ser utilizada hasta ahora, el efecto hipoglicémico de la insulina contrarrestando su utilización en seres humanos  
25 que tienen una glicemia normal.

Ahora bien se ha encontrado ahora por la sociedad solicitante que es posible preparar derivados de la insulina que poseen propiedades fisiológicas diferentes a las de la proteína madre, especialmente derivados  
30

16.6.67.

337521



que ya no presentan efecto hipoglicemico al mismo tiempo que conservan un efecto anabolizante.

5 Se obtienen estos derivados por acción de un compuesto dicarbonilado, muy particularmente un compuesto alfa o beta-dicarbonilado sobre insulina o uno de sus de-  
rivados directos, tales como los derivados N-acilados.

Por compuesto dicarbonilado, hay que entender tanto una dicetona o un dialdehido como, por ejemplo, un éster cetónico, un diester o un ceto-aldehido.

10 Como compuesto beta-dicarbonilado se pueden citar en particular el éster acetyl acético, el nitromalon dialdehido, el dialdehido mesoxálico y la acetilacetona.

15 Así es como, por acción de la acetilacetona so-  
bre la insulina, es posible obtener un compuesto de acuer-  
do con el invento, denominado "compuesto I", que no pre-  
senta ningún efecto hipoglicemico, incluso en una dosis  
10 veces superior a la de la insulina testigo, pero que  
muestra una actividad anabolizante enteramente comparable  
con la de la insulina en las mismas condiciones de ensa-  
20 yo. Se dispone de esta manera de un agente anabolizante  
muy activo y desprovisto de efectos secundarios.

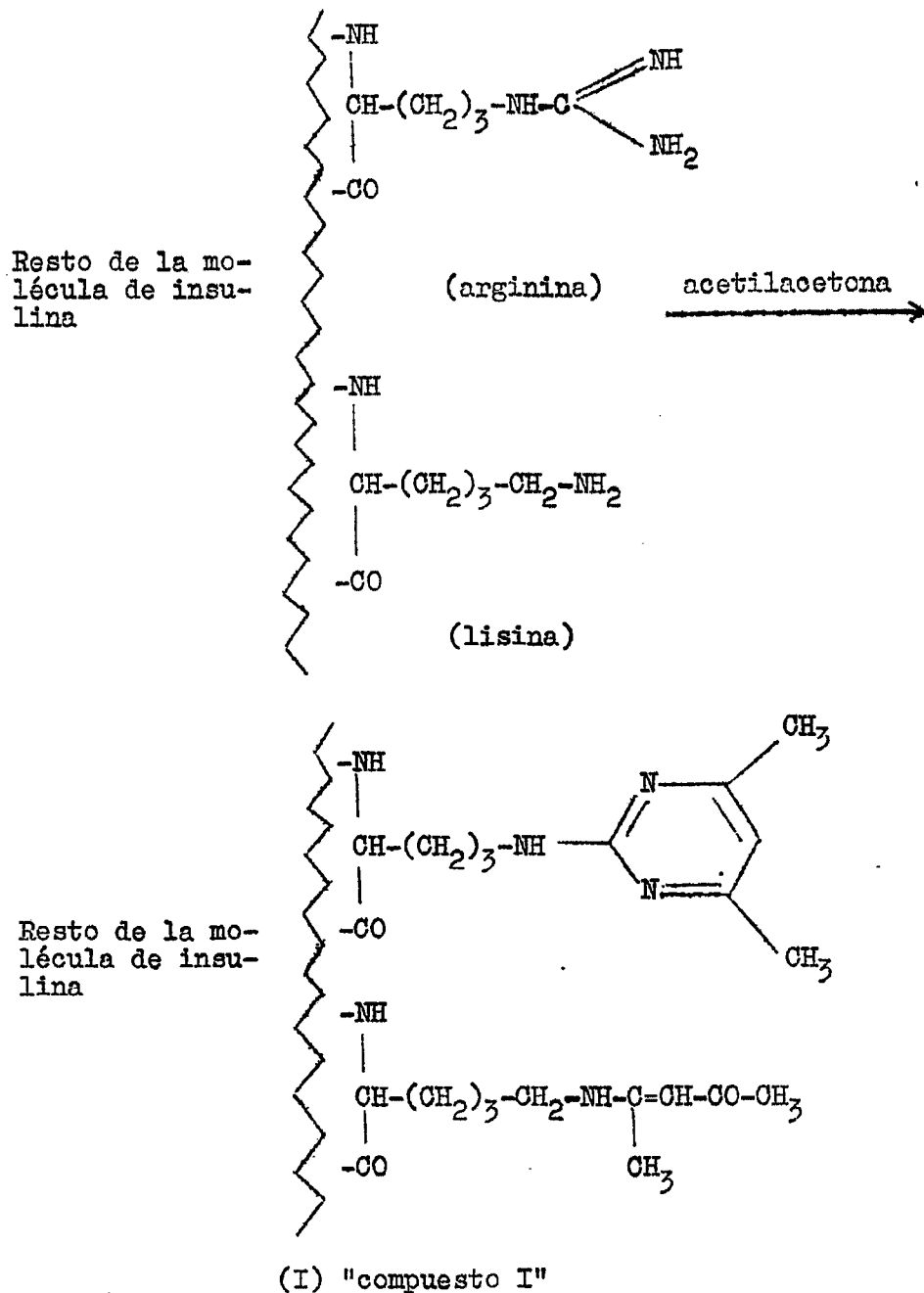
La estructura del "compuesto I", así obtenido, no es conocida todavía con certidumbre. No obstante, los  
25 resultados de toda una serie de ensayos físico-químicos  
permiten pensar que la acetilacetona ha reaccionado por  
una parte sobre el grupo guanidilo del eslabón de argini-  
na para formar un pirimidina trisustituída, y por otra  
parte con un grupo  $NH_2$  libre, probablemente el del esla-  
bón de lisina, para formar una imina o enamina.

30  
16.6.67.

La reacción antes mencionada y la estructura,



I, del "compuesto I" pueden por lo tanto ser representadas esquemáticamente de la manera siguiente.



La hipótesis establecida en cuanto a la estructura del "compuesto I" no limitaría de ninguna manera el alcance del presente invento.

La sociedad solicitante tiene muchas razones para pensar que el bloqueo del grupo guanidilo de la arginina de la insulina, bajo forma de una pirimidina, es



5 esencialmente responsable de la modificación de las propiedades de la hormona, y que cualquier compuesto dicarbonilado susceptible de reaccionar con una guanidina, podría conducir entonces a derivados de la insulina análogos al "compuesto I".

Esta descripción de un procedimiento de bloqueo del grupo guanidilo, llevado por la molécula de insulina, representa una de las características principales del presente invento.

10 No obstante, en la realización del procedimiento del invento, es esencial proteger a la molécula de insulina de cualquier degradación irreversible. Es por esto que la reacción con el compuesto dicarbonilado se efectúa en un medio de  $\text{pH} \leq 8,5$ , especialmente en un medio ligeramente básico con un pH comprendido entre 7,5 y 8,5.

15 Para efectuar esto, se puede trabajar en medio acuoso en presencia de un bicarbonato alcalino o de una solución tampón del tipo de fosfato o borato. También se puede conducir la reacción en un medio hidroalcohólico, y de una manera más general, en medio acuoso en presencia de otro disolvente soluble en agua, tal como los disolventes mono- y poli-hidroxisilados, la dimetilformamida, la acetona, el dimetil sulfóxido, etc.

20 En un modo de ejecución actualmente preferido, en el caso en que el compuesto dicarbonilado es la acetilacetona, se trabaja a una temperatura comprendida entre  $0^{\circ}\text{C}$  y  $25^{\circ}\text{C}$ , es decir próxima a la temperatura ambiente, en presencia de un gran exceso de reactivo.

30 La desaparición progresiva o total de la agrupación guanidilo de la insulina puede ser puesta en evi-

16.6.67



dencia por diferentes métodos. Así, la reacción coloreada denominada de Sakagushi, [Dumazert y Poffi, Bull. Ste. Chim. Biol. 21, (1939) 1380], específica del grupo guanidilo libre de los derivados de la arginina, permite apreciar si este grupo ha reaccionado con el reactivo dicarbo-  
5 nilado y después, en este caso, determinar el momento en que la reacción está completa.

Además, la hidrólisis ácida del producto de la reacción, por ejemplo con ayuda de ácido clorhídrico  
10 concentrado, conduce a una degradación completa de las cadenas polipeptídicas, y a la liberación de los diferentes ácidos aminados a partir de los cuales se forman las mismas. La cromatografía bidimensional de este hidrolizado permite detectar entonces cualquier modificación de es-  
15 tructura debida a la reacción.

Por ejemplo, la comparación del cromatograma del hidrolizado de la insulina y del cromatograma del hidrolizado del "compuesto I", muestra netamente en este último la ausencia de una mancha de "arginina", la presencia de una mancha de "lisina" más importante que la mancha correspondiente de la insulina testigo, y la presencia de una mancha debida a la 2-hidroxi 4,6-dimetil pirimidina. Esta última puede ser valorada directamente además de manera colorimétrica en el hidrolizado.

25 La determinación de las actividades hipoglucémicas y anabolizantes de los derivados preparados, efectuada comparativamente con la de las actividades de la insulina, permite controlar también la eficacia del tratamiento con el compuesto dicarbonilado.

30 El efecto hipoglucémico es medido de la mane-  
16.6.67.



ra usual en conejos por disminución del grado de la glicemia, provocada por una inyección del producto a ensayar. Por ejemplo, la insulina en la dosis de 0,5 U.I./kg provoca una disminución de 40%.

5                    En cuanto al efecto anabólizante, el mismo puede ser medido por la velocidad de incorporación "en vivo" de la glicocola  $C_{14}$  en las proteínas del diafragma del ratón. En las condiciones de trabajo de este ensayo, la insulina, en la dosis de 5 U.I./kg, provoca un aumento de  
10 50% de la velocidad de incorporación.

Es evidente que estos ensayos pueden ser aplicados de manera análoga en todos los casos en que el reactivo dicarbonilado seleccionado reacciona con la agrupación guanidilo de la insulina para formar un compuesto de  
15 finido.

El presente invento se extiende igualmente a los derivados de la insulina obtenidos por acción de un compuesto dicarbonilado sobre una insulina N-acilada, tal como la tri-N-acetil-insulina. En este caso, al estar bloqueado el grupo  $NH_2$  de la lisina bajo forma de derivado  
20 N-acetilado, el reactivo dicarbonilado no podrá reaccionar más que con la agrupación de guanidilo.

Una hidrólisis ácida controlada de los compuestos del invento puede permitir liberar los grupos  $NH_2$ ,  
25 bloqueados eventualmente por el compuesto dicarbonilado bajo forma de iminas o enaminas, sin que el resto de la molécula sea modificado.

Los nuevos derivados así obtenidos no poseen la agrupación guanidilo del eslabón de arginina bajo forma libre y están considerados igualmente por el presente  
30

4.4.67.



invento.

Ocurre esto con el derivado de la insulina obtenido por hidrólisis controlada del "compuesto I", bajo la acción, por ejemplo, de ácido clorhídrico diluido.

5 Los ejemplos siguientes ilustran el invento, pero sin limitarlo.

Ejemplo I.- Preparación del "compuesto I"

A una solución limpida de 0,5 g de insulina en 40 cm<sup>3</sup> de una solución de bicarbonato de potasio al 7% en agua, se añaden, bajo agitación, 5 cm<sup>3</sup> de acetilacetona. Se prosigue la agitación de la mezcla de reacción durante 6 días a la temperatura ambiente (aproximadamente 20°C). El precipitado formado es separado por centrifugación, es lavado con agua ligeramente ácido (pH = 5,5 a 6), después con acetona y es secado. El rendimiento es de 87% aproximadamente de "compuesto I". Este se presenta bajo forma de un polvo blanco amorfo, soluble en las soluciones ligeramente alcalinas, tales como amoníaco N/10, es insoluble en los ácidos diluidos acuosos y en los disolventes orgánicos usuales.

La reacción de Sakagushi, ensayada sobre el "compuesto I", da un resultado negativo.

Análisis : C<sub>264</sub>H<sub>387</sub>O<sub>76</sub>N<sub>65</sub>S<sub>6</sub> = 5 879,64

Calculado : C % 53,90 H % 6,64 N % 15,48

25 Encontrado: 54,1 6,5 15,5

Espectro U.V.:

- en amoníaco N/100 :

inflexión a 280 mμ E 1% = 20  
lcm

30 máximo a 288 mμ E 1% = 23  
lcm

16.6.67.

337521



máximo a 305 m $\mu$

$$E \frac{1\%}{1 \text{ cm}} = 27$$

- en ácido clorhídrico N/10 :

máximo a 276 m $\mu$

inflexión a 281 m $\mu$

5 máximo a 308 m $\mu$

La hidrólisis ácida total del "compuesto I" se efectúa con ayuda de ácido clorhídrico 6 N, por calentamiento a 110°C durante 24 horas. Después de la eliminación del ácido clorhídrico, el hidrolizado es sometido a una cromatografía bidimensional en las condiciones siguientes:

Primera dirección: disolvente ácido compuesto de n-butanol-ácido acético - agua en la proporción 4:1:5.

Segunda dirección: disolvente básico compuesto por colidina-agua en la proporción 1:1.

Revelador: Ninhidrina-colidina.

Este cromatograma, comparado con el que procede del hidrolizado de la insulina, presenta varias características importantes, a saber:

- 20 - ausencia de la mancha de arginina;  
- presencia de una mancha de lisina, aumentada al doble con relación a la de la insulina testigo y ligeramente menos desplazada en el sentido horizontal;  
- presencia de una mancha amarilla que corresponde a la  
25 2-hidroxi 4,6-dimetil pirimidina.

La hidrólisis ácida controlada del "compuesto I", se efectúa con ayuda de ácido clorhídrico 2N, por calentamiento en baño María durante 10 minutos. Después de neutralización del ácido clorhídrico, se puede aislar el nuevo derivado de la insulina así formado, y también

30  
4.4.67.

23 Jun. 1957



condensar la acetilacetona liberada con ortofenilenodiami  
na. Esta última reacción, que permite una valoración colo  
rimétrica de la acetilacetona, indica la liberación de  
aproximadamente una molécula de acetilacetona por molécu-  
5 la de "compuesto I".

Ejemplo II: Preparación del "Compuesto I"

Se disuelven 0,5 g de insulina en 20 cm<sup>3</sup> de  
tampón de fosfato de pH = 8; se añaden entonces 20 cm<sup>3</sup> de  
etanol y 15 cm<sup>3</sup> de acetilacetona, y después se deja en re  
10 poso la mezcla de reacción durante 10 días a la temperatu  
ra ambiente.

Al cabo de este tiempo, se acidifica hasta  
pH = 5 con ácido clorhídrico 1 N; el precipitado que se  
forma es entonces centrifugado, lavado con agua y con ace  
15 tona, y es secado.

Se obtiene así el "compuesto I" con un rendi-  
miento de aproximadamente 78%.

N O T A

Los puntos de invención propia, no nueva, pe-  
ro establecida, practicada ni divulgada en España, que se  
20 presentan para que sean objeto de esta Patente de Intro-  
ducción, por DIEZ años, son los siguientes:

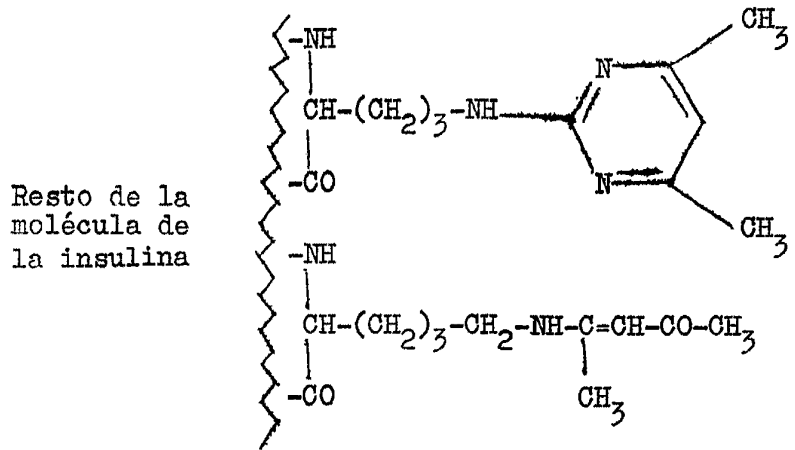
1.- Un procedimiento de preparación de nuevos  
compuestos polipeptídicos, más particularmente nuevos de-  
24 rivados de la insulina, caracterizado esencialmente porque  
4.4.67.



se hace reaccionar un compuesto dicarbonilado con la insulina o uno de sus derivados directos, tales como los derivados N-acilados.

2.- Un procedimiento de preparación de nuevos derivados de la insulina, según la reivindicación 1, en el cual se hace reaccionar un compuesto beta-dicarbonilado con la insulina o con un derivado N-acilado de la insulina.

3.- Un procedimiento de preparación de un nuevo derivado de la insulina, según las reivindicaciones 1 y 2, en el cual se hace reaccionar acetilacetona con la insulina y se obtiene el derivado de la insulina, denominado "compuesto I", de fórmula supuesta, I:



4.- Un procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado por los puntos siguientes, tomados aisladamente o en combinaciones diversas: a) la reacción se efectúa en medio acuoso o hidro-alcohólico con un pH comprendido entre 7,5 y 8,5; b) la reacción se efectúa a una temperatura comprendida entre 0°C y 25°C; c) la reacción se efectúa en presencia de un gran exceso de acetilacetona.

20  
4.4.67.



na.

5.- Un procedimiento de preparación de nuevos compuestos polipeptídicos.

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

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

Madrid,

23 JUN. 1957

P. A.

Alberto de Ezabara  
Por Poderes

337521

G.D.S.  
4.4.67.