

SECCION TECNICA
CLASIFICACION I. P. C.
CLASE A61
SUBCLASE K

P.- 42.430

Case No 41546

370345

370345

Memoria descriptiva



21

para solicitar PATENTE DE INVENCION

por 20 años

a nombre de NOVO TERAPEUTISK LABORATORIUM A/S

entidad / ~~de nacionalidad~~ danesa

con domicilio en 115, Fuglebakkevej, Copenhague, Dinamarca.

por: "UN PROCEDIMIENTO PARA FABRICAR UNA PREPARACION INYECTABLE DE INSULINA"

(Clase Internacional)

14.8.69



La presente invención se refiere a un procedimiento de producir preparaciones inyectables de insulina para uso clínico, y a su producción.

5 Durante los primeros años de la terapéutica insulínica con disoluciones inyectables de insulina amorfa, eran comunes las reacciones alérgicas de la piel. Con la introducción de las disoluciones inyectables de insulina cristalizada se redujeron la frecuencia y severidad de las reacciones de la piel, y se eliminaron prácticamente cuando los pacientes fueron sometidos a tratamiento con disoluciones de insulina recristalizada. Hoy día, todas las preparaciones comerciales de insulina para uso clínico son producidas a partir de insulina cristalina.

10 La alergia de la piel antes citada era causada evidentemente por material proteínico pancreático presente en forma de impurezas, en cantidades sustanciales, en la insulina amorfa, en menor grado en la insulina cristalizada, y sólo en proporciones insignificantes, de haberlas, en la insulina recristalizada.

15 No se ha atribuído ningún efecto secundario a las modernas preparaciones de insulina que contienen insulina que ha sido recristalizada, aparte de las que han sido explicadas por la naturaleza de la propia molécula de insulina. Después de un tratamiento durante varios meses, se comprueba que el suero del paciente diabético contiene inmunoglobulinas, que se combinan in vitro e in vivo con la insulina. (Estos sueros, obtenidos a partir de cobayas tratados con insulina, se emplean hoy usualmente para la determinación inmunológica de la insu-

370345



lina). Este efecto secundario es indeseable por varias razones:

- 5 1.- La producción de anticuerpos de insulina indica un estado de continuo antagonismo del cuerpo contra la hormona esencial, la insulina.
- 10 2.- Es probable que este estado sea perjudicial para las células del cuerpo, por ej. para las células beta, son destruídas en conejos por inmunización con insulina y un coadyuvante. Se sospecha que las posteriores complicaciones diabéticas, tales como la angiopatía, pueden empeorar.
- 15 3.- Se ha comprobado que una elevada concentración de anticuerpos insulínicos determina a veces una resistencia a la insulina, es decir, un requerimiento de dosis elevadas y una carencia de control metabólico.
- 20 4.- Se ha calculado que la dosis actualmente requerida por la población diabética excede en mucho el requerimiento que sería necesario si se evitara la formación de anticuerpos.
- 25 5.- En algunos pacientes, los anticuerpos se unen a la insulina de vaca más fuertemente que a la insulina de cerdo, y se han registrado casos de hipoglucemia tras un cambio en la composición de las preparaciones de insulina.
- 30 6.- Cuando los anticuerpos insulínicos se llegan a establecer en los pacientes, hay un aumento simultáneo en la concentración en la insulina.

370345



5

10

15

20

25

30

na de suero exógeno en circulación. Parte de la insulina de suero se une a los anticuerpos. Las concentraciones de la insulina total, e incluso de la insulina libre, pueden llegar a valores que son de 10 a 100 veces la concentración fisiológica normal. Estas altas concentraciones pueden ser perjudiciales para los tejidos. Pueden favorecer o estimular la arterioesclerosis y pueden dañar a las células beta aún existentes. Se ha demostrado que las altas concentraciones de insulina pueden tener un efecto inhibitorio en la secreción de células beta.

El mecanismo del desarrollo de los anticuerpos insulínicos y sus propiedades ha sido estudiado con interés creciente durante los últimos 5 a 10 años. Se ha comprobado que las especies de insulina se muestra como el factor dominante en el desarrollo de los anticuerpos. La insulina de vaca, que difiere más (3 posiciones de aminoácidos) de la insulina humana que la insulina de cerdo (1 posición de aminoácido), es, como es de esperar, más antigénica que la insulina de cerdo. Por otro lado, la insulina de cerdo causa la formación de anticuerpos contra la insulina de cerdo, incluso en los cerdos. Aún no se ha encontrado explicación alguna de esta última observación, aunque se ha sugerido hipotéticamente que las concentraciones anormalmente elevadas de insulina de cerdo en el punto de la inyección pueden excitar el aparato inmunológico del cerdo para que produzca anticuerpos contra su propia insulina.

370345

3 MAY



5 La presente invención constituye una solución
al problema de la intolerancia del cuerpo frente a las
preparaciones conocidas de insulina. Según la invención,
la respuesta antagónica del cuerpo, por ej. produciendo
anticuerpos insulínicos, no tiene lugar, o tiene lugar pe-
ro en grado muy pequeño, cuando se utiliza un nuevo tipo
de preparaciones de insulina que están exentas de ciertas
sustancias siempre presentes en las preparaciones de in-
sulina del tipo conocido, teniendo dichas sustancias un
10 peso molecular superior que el que tiene la insulina. Aun-
que inicialmente se creía que los anticuerpos insulínicos
eran causados por la propia insulina, se ha comprobado,
según la invención, que, sorprendentemente, el agente cau-
sante no es la molécula de insulina misma.

15 En las preparaciones de insulina producidas se-
gún la invención, la insulina está exenta de proteínas de
origen pancreático, que tienen un peso molecular superior
a aproximadamente 6.000, y muestra esencialmente un úni-
co componente cuando se analiza por electroforesis discon-
tínua en un gel de poliacrilamida (EGPA DISC) es decir,
20 insulina pura o sustancialmente pura. El método de análi-
sis referido es descrito por L. Ornstein (Ann. N.Y. Acad.
Sci, 121, 321 (1964)) y B.J. Davis (Ann. N.Y. Acad. Sci.,
121, 404 (1964)), pero usado con adición de urea. Las pre-
25 paraciones han de tener un pH de aproximadamente 7 prefe-
riblemente, con el fin de minimizar la formación de mono-
desamido-insulina durante su almacenamiento.

30 Un procedimiento conocido de separación de mo-
léculas proteínicas de diferente tamaño es disolver la
mezcla de proteínas en un disolvente en el que son diso-

- 5 - 370345



5
- 10
15
20
25
30

ciadas las moléculas, y dejar pasar la disolución a través de un tamiz molecular, por ej. columnas de material orgánico que está reticulado en una red tridimensional de un tamaño definido de poros. Se ha demostrado que la insulina cristalina disuelta en ácido acético 1 M puede ser fraccionada en los componentes (a) y (b) conteniendo ambos proteínas de origen pancreático que tienen un peso molecular de más de 6.000 aproximadamente, y componente (c), respectivamente, sobre una columna de Sephadex G-50. Estos componentes pueden ser aislados a partir de sus disoluciones por métodos convencionales, por ej. por salificación, precipitación con una sal de zinc en un medio de reacción neutra, liofilización etc. La proporción de componente (a) puede ser de 2-5 por ciento en peso de la insulina cristalizada, y menos de 1 por ciento en peso de la insulina recristalizada. La proporción de componentes (b) puede ser, en ambos casos, de 4-8 por ciento. El componente (b) puede ser resuelto además en varias proteínas con casi el mismo tamaño molecular pero que difieren con respecto a la carga. Esto ha sido demostrado con la resina cambiadora de aniones DEAE Sephadex A 50 y una disolución de componente (b) en urea 7M tamponada con TRIS (tris(hidroximetil)aminometano) a pH 7'7 como se muestra en la Fig. 1. Los máximos Nos. 4, 6 y 7 de la figura corresponden a sustancias conocidas, pro-insulina, el compuesto intermedio, y el dímero, respectivamente. Los otros máximos aún no han sido identificados. Todos ellos pueden ser aislados a partir de su disolución por medios conocidos.

También el componente (c), que contiene protei

370345

3 MAY



nas de origen pancreático que tienen un peso molecular de aproximadamente 6.000, puede ser resuelto por cromatografía de cambio de iones. Contiene una fracción principal que es insulina pura, mono-desamido-insulina, y una fracción que es denominada en la Memoria la "arginina-insulina", ya que contiene más arginina que la cantidad presente en la molécula de insulina. La fracción de mono-desamido-insulina del componente (c) es variable, y depende de la historia de la insulina. Comúnmente, es del 3 a 10 por ciento en peso del componente (c). La arginina-insulina puede constituir de 2 a 3 por ciento en peso del componente (c).

En la Figura 2 se da un estudio de los fraccionamientos y de los componentes tal como se observan por electroforesis sobre el gel de depoliacrilamida llevada a cabo según el método descrito por Ornstein y por Davis, empleando 7'5 por ciento de poliacrilamida y un pH de 8'9.

Según la invención, las nuevas preparaciones de insulina son, sorprendentemente, mejor toleradas por el organismo que las preparaciones conocidas de insulina. La explicación es que los componentes (a) y (b) presentes en las preparaciones conocidas de insulina contienen, de modo no esperado, sustancias fuertemente antigénicas y aparentemente diabetogénicas, mientras que, inesperadamente, las nuevas preparaciones de insulina no son antigénicas.

Esto ha sido demostrado por medio de experimentos de toxicidad efectuados en animales. Fueron elegidos conejos porque muestran el mismo tipo de respuesta de los anticuerpos del suero que los seres humanos cuando son tra

- 7 - 370345



5 tados con las preparaciones conocidas de insulina, es decir, características similares del anticuerpo con respecto a la capacidad de unirse a la insulina y de afinidad para la insulina. (Las cobayas producen anticuerpos con mucha mayor afinidad y capacidad. La insulina de conejo difiere de la insulina humana sólo en la posición B 30, que es serina en el conejo y treonina en los seres humanos. La insulina de cobaya, por el contrario, difiere de la insulina humana en 18 posiciones).

10 Los conejos fueron inyectados tres veces a la semana con una dosis constante de proteína, 40 microgramos, disueltos en 1 ml. de un tampón de fosfato de sodio 0,04 M a pH 7,4. En el caso de la insulina, esta proporción corresponde a aproximadamente 0,5 unidades internacionales por kg., que es aproximadamente el valor de la
15 dosis media en la terapéutica de la diabetes. Fueron examinados los niveles de anticuerpos en el suero a intervalos regulares, por técnicas convencionales. El nivel se expresa como el tanto por ciento de ^{125}I -insulina (de
20 vaca) unida a los anticuerpos en el Ejemplo. Algunos de los resultados se muestran en la Figura 3.

 Los dos primeros de los cuatro resultados siguientes son muy sorprendentes, y contrarios a lo esperado:

- 25 1. La preparación de insulina que contiene sólo la insulina pura, no produce anticuerpos contra la insulina.
2. El componente (a) que no es insulina provoca una enorme producción de anticuerpos para
30 la insulina.

370345

La explicación más probable es que contiene algo relacionado químicamente con la insulina de cierta forma no conocida.

5

3. La insulina convencional de alta pureza, es decir la insulina recristalizada, origina anticuerpos, como hace en los seres humanos.

10

4. Las sustancias que pertenecen al componente (b), o sea la N° 3 (véase Fig. 1), el dímero y la proinsulina, son antigénicas, y dan lugar a la producción de anticuerpos contra la insulina.

15

No se muestra en la figura el descubrimiento de que la "arginina-insulina" del componente (c) produjo una pequeña, pero significativa proporción de anticuerpo después de 45 días, mientras que es dudoso saber si la mono-desamido-insulina, es antígena.

20

Durante el experimento de tolerancia, en alguno de los conejos había una tendencia a mostrar elevadas concentraciones de azúcar en sangre, los conejos inyectados con componente (b), y especialmente aquéllos que recibieron una de las fracciones del componente (b): a saber, el dímero. El dímero no produjo el más alto nivel de anticuerpos, pero, por razones desconocidas, las concentraciones de azúcar en sangre eran las más altas en estos animales. Este efecto del componente (b) y el dímero puede llamarse diabetogénico o de tipo anti-insulínico, cuando, de hecho, se pone de manifiesto que los animales se han hecho resistentes a la insulina, como se demuestra en la Figura 4.

30

Después de 14 semanas de tratamiento con el dí-

370345



mero (de vaca, 40 microgramos tres veces a la semana), los conejos fueron sometidos a ayuno durante 16 horas, y después se les administró insulina por vía intravenosa (0,5 unidades internacionales por kg.). El grupo de conejos de control había sido tratado con las preparaciones que contenían insulina pura. De las curvas de glucosa en suero mostradas en la Figura 4, se deduce que los conejos de control reaccionaron a la insulina de la forma esperada, mientras que los conejos tratados con el dímero del componente (b) eran resistentes a la insulina. La resistencia puede explicar la elevación de las concentraciones de azúcar en sangre, pero aún no ha sido explicada la propia resistencia. Parece ser similar a la resistencia que aparece en algunos pacientes en el curso de un tratamiento con las preparaciones conocidas de insulina. Se espera que la resistencia clínica pueda ser evitada empleando preparaciones de insulina exentas de componentes (b) y del dímero.

Para aprovechar los descubrimientos antes descritos, referentes a las propiedades biológicas de las impurezas presentes en la insulina comercial, la insulina es purificada hasta un punto que hasta ahora no ha sido realizado ni a escala científica ni a comercial. En principio, la purificación necesaria puede ser efectuada por una gran variedad de técnicas por las que pueden ser purificadas las proteínas. Pueden emplearse la cristalización, la precipitación fraccionada, la electroforesis, la electroprecipitación y la filtración con membrana, pero el método preferido es una combinación de filtración en gel y por cromatografía en columna, sobre un cambia-

370345



dor de iones o una cromatografía en columna sobre un cambiador de iones, sin empleo de filtración en gel.

5 Como se comprenderá, el objeto fundamental de la purificación según la invención es separar de la insulina empleada como material de partida las proteínas de origen pancreático que tienen un peso molecular superior a aproximadamente 6.000. Esta separación puede conseguirse sometiendo la insulina a filtración con gel. Se prefiere efectuar la filtración con gel en un medio acuoso que puede contener líquidos no acuosos miscibles con el agua, pero también es posible llevar a cabo la filtración con gel en disolventes orgánicos que contienen algo de agua, si se desea. Cuando se emplea un medio acuoso, se prefiere un intervalo de pH de 2 a 4. La estabilidad de la insulina es baja a pH inferior a 2 y superior a 9, de modo que se forman productos de degradación de la insulina durante el tratamiento en estos intervalos de pH. Por tanto, un pH de 4 a 9 puede emplearse si es aumentada la solubilidad de la insulina, por ej. por adición de urea, que también tiene capacidad para destruir los productos de asociación que se pueden formar entre las moléculas de insulina, y entre las moléculas de insulina y las impurezas en los alrededores de reacción neutra. Cuando se trabaja a bajo pH, se prefiere emplear un ácido orgánico tal como el ácido acético para ajustar el pH, pero pueden emplearse también los ácidos minerales fuertes. Es preferida una concentración de 0,5 a 4 M de ácido acético.

20 La temperatura no es crítica para la filtración con gel, y está limitada principalmente por la estabilidad y la solubilidad de la insulina. Así, se prefiere tra

370345



bajar en los alrededores de la temperatura ambiente normal, por ej. de 20 a 25°C. Las fracciones que son eluidas antes que el componente (c) que contiene insulina, son desechadas. Las fracciones del componente (c) que están exentas de material con un peso molecular superior a 6.000 son reunidas, y la insulina puede ser recuperada, por ej., por evaporación, salificación o precipitación con iones de zinc.

Para obtener preparaciones de insulina con la antigenicidad más pequeña posible, es necesario separar también las sustancias similares a la insulina que tienen casi el mismo peso molecular que la insulina, pero que difieren ligeramente de la misma en su composición química, por ej. la conocida mono-desamido-insulina, y lo que parece ser un derivado de arginina de la insulina. La mono-desamido-insulina puede, incluso después de su completa separación, formarse en pequeñas proporciones durante el almacenamiento de las preparaciones farmacéuticas de insulina, y, como su antigenicidad dudosa, su eliminación es de menor importancia. El método preferido para la separación del derivado de arginina y la insulina desamida es por cromatografía en columna sobre un cambiador de iones y recogida de las fracciones correspondientes a la parte central mayor del pico de insulina. Casi todos los cambiadores de iones disponibles en el comercio que permiten la penetración de la molécula de insulina pueden

370345



ser utilizado, siempre que el procedimiento sea efectuado en un medio en el que la insulina no forma agregados consigo, o con las impurezas.

En la tabla siguiente se dan ejemplos de materiales adecuados para la purificación de la insulina.

Rellenos de columna para la purificación cromatográfica de la insulina

Materiales	Matrices Sintéticos		Derivados de compuestos naturales			
	Poliacrilamida	Poliestireno	Acido poliacrilico	Dextrano	Celulosa	Acido alginico
Materiales de filtración con gel	Bio-Gel P-10			Sephadex G-50		
	Bio-Gel P-30			Sephadex G 75		
Tipos de cambiadores de aniones	Grupos fuertemente básicos		Dowex 1	QAE Sephadex		
	Grupos débiles	Bio-Gel DM		DEAE-Sephadex	DEAE-Celulosa	
Tipos de cambiadores de cationes	Grupos fuertemente ácidos		50 W Dowex	SE-Sephadex		Celulosa fosforilada
	Grupos débiles ácidos	Bio-Gel CM	Amberlite CG 50	CM-Sephadex	CM-celulosa	Acido alginico

370345



El procedimiento de cambio de iones puede ser efectuado con un eluyente de disolvente orgánico que contiene agua, y se prefiere que el disolvente orgánico sea miscible con el agua. Son ejemplos de estos disolventes la tetrametil urea, dimetilformamida, dioxano, cetonas miscibles con el agua, tales como la acetona, y alcoholes inferiores, tales como el metanol, etanol y propanoles. Se prefieren los alcoholes, que pueden ser empleados en una concentración de 30 a 80 por ciento (vol/vol), y preferiblemente de 50 a 70 por ciento (vol/vol).

Cuando el eluyente contiene menos del 50 por ciento (vol/vol) del disolvente orgánico miscible con el agua, puede ser denominado un medio acuoso, y en estos casos el disolvente orgánico puede ser sustituido por urea, empleada en una proporción tal que se obtienen disoluciones de 4 a 8 molares, y preferiblemente aproximadamente 7 molares. Cuando se emplea una disolución de urea, ha de estar exenta de cianato de amonio, porque el ión cianato reacciona con los grupos amínicos de la molécula de insulina.

El eluyente contiene siempre una sustancia tampoadora para controlar el valor del pH del eluyente. Se prefiere trabajar a un valor constante de pH. Cuando se utiliza un cambiador de cationes, el valor de pH del eluyente ha de mantenerse en el intervalo de 3 a 6,5 y preferiblemente de 4 a 6, y cuando se emplea un cambiador de aniones, el valor del pH del eluyente ha de mantenerse en el intervalo de 5,5 a 10, y preferiblemente de 6 a 9.

Los valores de pH citados son medidos con un electrodo de vidrio ajustado frente a un tampón estándar de la manera usual.

370345



En la literatura disponible pueden encontrarse sustancias tamponadoras adecuadas.

Es esencial que la temperatura sea más bien constante durante la operación de cambio de iones. La temperatura puede elegirse en el intervalo de \cdot 10° a 40°C, y preferiblemente 0° a 30°C, excepto cuando el eluyente es una disolución acuosa de urea, en cuyo caso se prefiere mantener la temperatura en menos de 5°C.

Como material de partida de insulina en el procedimiento de purificación, se emplea ordinariamente insulina comercial, es decir insulina amorfa o insulina cristalina, que puede haber sido cristalizada varias veces. No obstante, puede usarse también insulina cruda, tal como la torta de sal que contiene insulina que se forma durante la recuperación de insulina a partir de las glándulas del páncreas, y que usualmente contiene de 10 a 30 por ciento en peso de insulina, pero los altos contenidos de impurezas hacen a este material de partida menos adecuado para la purificación según la invención. Puede obtenerse un mejor material de partida sometiendo una disolución de la torta de sal a una precipitación isoeléctrica, ajustando el valor de pH de la disolución a 5,5, y aislando el precipitado por centrifugación.

El resultado de las operaciones de purificación es siempre una fracción de disolución de insulina purificada, a partir de la cual es recuperada la insulina de la manera usual, por ej. por evaporación, salificación o precipitación, en presencia de iones de zinc. La insu-

370345



lina puede ser cristalizada, si se desea, y formulada en preparaciones inyectables de insulina de la misma manera que la empleada hasta ahora en la técnica.

5 Según la invención, se ha comprobado que es po-
sible obtener la insulina pura por un procedimiento de
una sola operación sin utilización de filtración en gel.
La principal característica específica de este procedimien-
to es que la insulina impura es sometida a un cambio de
aniones oromatográfico en columna, preferiblemente con
10 cambiador de aniones fuertemente básico, un ejemplo típi-
co del cual es el QAE-Sephadex A-25, que ha sido citado
en la Tabla de la página 13. Este cambiador de aniones es
muy estable, y sus cadenas de dextrano no reaccionan ni
con sustancias lábiles. Como eluyentes se emplean un di-
15 solvente orgánico que contiene agua y que es miscible con
el agua, y particularmente un alcohol alifático. Es sor-
prendente que por medio del cambio de aniones sea posible
desposeer a la insulina cruda de las proteínas con un pe-
so molecular superior a 6.000, y que un medio alcohólico
20 acuoso tenga capacidad para romper los enlaces entre las
moléculas de proteínas de la insulina comercial en tal
grado que pueda recuperarse insulina pura, cuando se re-
cogen fracciones correspondientes a la parte mayor cen-
tral del pico de insulina.

25 La purificación de la insulina es ilustrada por
medio de los ejemplos 1 a 7 siguientes.

370345



Ejemplo 1

5 5 kg. de Sephadex G 50, de grado fino (de PHAR
MACIA, Uppsala Suecia) son hinchados en ácido acético 1 M,
y las partículas más finas son separadas por decantación.
El material es empleado para el relleno de una columna
10 con un diámetro de 15 cm. y una altura de 130 cm. La co-
lumna es equilibrada con ácido acético 1 M.

10 gramos de insulina cristalizada una vez a
partir de un tampón de citrato son disueltos en una mez-
cla de 390 ml. de ácido acético 1 M y 8 ml. de ClH 1N.
Esta disolución es aplicada sobre la columna. La elución
15 es efectuada con ácido acético 1 M a una velocidad de
1 litro/hora. Son recogidas fracciones de 200 ml.

Son medidas las extinciones a 0'276 micras, y
representadas gráficamente frente a los números de las
fracciones. Las fracciones que corresponden a la parte
20 central principal del máximo de insulina (el máximo más
grande) son reunidas, y la insulina es precipitada aña-
diendo 200 g. de ClNa por litro de la mezcla. El precipi-
tado es aislado por centrifugación y sometido a una pre-
cipitación isoelectrica y cristalización a partir de un
25 tampón de citrato que contiene acetona, de forma conoci-
da. La producción es de 8 gramos de insulina cristalina
exenta de proteínas de origen pancreático con un peso mo-
lecular superior a aproximadamente 6.000.

370345

3 MAY.



La insulina cristalina purificada obtenida como se ha descrito anteriormente es purificada además por cromatografía de cambio de iones sobre una resina cambiadora de iones de Amberlite. Son preparadas disoluciones
5 7M de urea, y desionizadas haciéndolas pasar a través de columnas de resina cambiadora de iones en lecho mixto (Amberlite MB-1). Esta urea desionizada es empleada después para preparar el tampón: fosfato de sodio 0.13M-urea
10 7M-1% de n-butanol, pH 6.00 a 25°C. El tampón es almacenado y utilizado a 4°C. 1.5 kg. de Amberlite CG 50 Tipo II son tratados con: 1) agua; 2) acetona; 3) agua + NaOH; 4) agua; 5) agua + ClH, y 6) agua. La resina lavada es después agitada con 5 litros del tampón. El pH de la suspensión
15 desciende inmediatamente, y se añaden porciones de aproximadamente 30 ml de NaOH al 40 por ciento (peso/vol), cada pocos minutos, para que el pH se mantenga en 6.0 aproximadamente. Cuando el pH de la suspensión permanece en 6.0 después de 15 minutos de agitación, la mezcla es agitada durante toda la noche a 4°C. La resina es
20 filtrada y lavada con 30 litros del tampón durante un período de 8 horas. El pH del filtrado final ha de ser idéntico al del tampón inicial. El material es utilizado para el relleno de una columna con un diámetro de 7.5 cm. y una altura de 80 cm. La columna es equilibrada con el
25 tampón.

15 gramos de la insulina preparada por el procedimiento del Ejemplo 1 son aplicados sobre la columna, en forma de disolución en el tampón, al 10 por ciento (peso/vol). La elución se lleva a cabo con el tampón a
30 una temperatura de 4°C, y una velocidad de 200 ml/h. Se

370345



recogen fracciones de 100 ml.

5 Son medidas las extinciones a 0 276 micras, y representadas gráficamente en función de los números de las fracciones. Las fracciones correspondientes a la parte central principal del máximo de la insulina (el máximo más grande) son mezcladas, y la insulina es precipitada añadiendo 2 litros de H_2O , 15 ml. de ClH 4N, y 600 gramos de ClNa por litro de la mezcla. El precipitado es 10 aislado por centrifugación, y sometido a precipitación isoelectrica y cristalización a partir de un tampón de citrato que contiene acetona, de manera conocida.

15 La producción es de 10 gramos de insulina cristalina, que contiene sólo un componente, cuando es sometida a electroforesis con gel de poliacrilamida. En otras palabras, la insulina cristalina ha de considerarse insulina pura.

Ejemplo 2

20

Es preparado un tampón de la siguiente composición:

370345



ClNH_4 0'1 M

NH_3 0'02 M

etanol al 60 por ciento (vol/vol)

E_1 pH es de 8'3 a 25°C

5 15 gramos de Dowex 1x2 (malla de 149-297 micras de abertura) son hinchados en el tampón, y las partículas más finas son separadas por decantación. El material es empleado para el relleno de una columna con un diámetro de 1'6 cm y una altura de 25 cm. La columna es equilibrada con el tampón.

10 500 mg. de insulina cristalizada una vez a partir de tampón de citrato, son disueltos en una mezcla de 20 g de sal disódica de ácido etilendiamintetraacético, 5 ml. del tampón, 5 ml. de etanol al 60 por ciento (vol/vol) y 0,04 ml. de NH_3 13'3 M (pH final, 15 8'5). El material insoluble es separado por centrifugación, y la disolución transparente es aplicada a la columna. La elución se lleva a cabo con el tampón a una temperatura de 25°C y una velocidad de 7'5 ml/h. Se recogen fracciones de 5 ml. 20

Son medidas las extinciones a 0'276 micras, y representadas gráficamente en función de los números de las fracciones. Las fracciones correspondientes a la parte principal central del máximo de insulina (el máximo más grande) son mezcladas, y la insulina es precipitada añadiendo 100 ml. de agua, 1'3 ml. de ClH 1 N y 2 ml. de acetato de zinc 1M por cada 100 ml. de la mezcla. El precipitado es aislado por centrifugación, y cristalizado a partir de un tampón de citrato que contiene acetona, de forma conocida. La producción de insu- 25 30

370345



lina pura es de 200 mg.

Ejemplo 3

5 Es preparado un tampón de la siguiente composición:

2'5 litros de urea 7M (desionizada como se explica en el Ejemplo 2)

31'3 gramos de tris(hidroximetil)aminometano

10 36'3 ml. de ClH 6N

El pH es de 7'9 a 25°C.

40 g. de QAE-Sephadex A-25 (de PHARMACIA, Uppsala, Suecia)

15 son hinchados en el tampón, y las partículas más finas son separadas por decantación. El material es empleado para el relleno de una columna con un diámetro de 2'5 cm. y una altura de 25 cm. La columna es equilibrada con el tampón.

20 500 mg. de insulina cristalizada una vez a partir de un tampón de citrato se disuelven en una mezcla de 5 ml. de tampón y 5 ml. de urea 7M, ajustándose el pH a 7'9 con tris(hidroximetil)aminometano sólido. El material insoluble es separado por centrifugación y la disolución transparente es aplicada sobre la columna. La elución se lleva a cabo con el tampón a una temperatura de 25 4°C y una velocidad de 30 ml/h. Se recogen fracciones de 5 ml.

30 Se miden las extinciones a 0'276 micras, y se representan gráficamente frente a los números de las fracciones. Las fracciones correspondientes a la parte central principal del máximo de insulina (el máximo más



5 grande) son mezcladas, y la insulina es precipitada añadiendo un volumen de agua igual al de la mezcla, ajustando el pH a 2'8 con ClH, y añadiendo dos veces el volumen de la mezcla de ClNa saturada. El precipitado es aislado por centrifugación y sometido a precipitación isoeléctrica, y cristalización a partir de un tampón de citrato que contiene acetona, de forma conocida. La producción de insulina pura es de 200 mg.

10

Ejemplo 4

Se prepara un tampón de siguiente composición:
 25 g. de tris(hidroximetil)aminometano
 29'0 ml. de ClH 6N
 15 1'2 litros de metanol.
 Agua hasta completar un volumen total de 2 litros.
 El pH es de 7'3 a 25°C.

20 40 g. de QAE-Sephadex A-25 son hinchados en el tampón, y las partículas más finas son separadas por decantación. El material es empleado para el relleno de una columna con un diámetro de 2'5 cm. y una altura de 25 cm. La columna es equilibrada con el tampón.

25 500 mg. de insulina cristalizada una vez a partir de un tampón de citrato son disueltos en una mezcla de 20 mg. de sal disódica de ácido etilendiamintetraacético, 94 mg. de tris(hidroximetil)aminometano, 10 ml. de metanol al 60 por ciento (vol/vol) y 0'073 ml. de ClH 6N (pH final, 7'3). El material insoluble es separado
 30 por centrifugación, y la disolución transparente es apli-

370345



cada sobre la columna. La elución es efectuada con el tampón a una temperatura de 25°C y a una velocidad de 30 ml/h. Se recogen fracciones de 5 ml.

5 Son medidas las extinciones a 0'276 micras, y representadas gráficamente en función de los números de las fracciones. Las fracciones correspondientes a la parte central principal del máximo de insulina (el máximo más grande) son mezcladas, y la insulina es precipitada añadiendo 100 ml. de agua y 2 ml. de acetato de zinc
10 1M por cada 100 ml. de la mezcla. El precipitado es aislado por centrifugación y cristalizado a partir de un tampón de citrato que contiene acetona, de manera conocida. La producción de insulina pura es de 250 mg.

15

Ejemplo 5

Se prepara un tampón de la composición siguiente:

20 Tris(hidroximetil)aminometano 0'06 M
01H 0'02 N
ClNa 0'075 M
Etanol al 60 por ciento (vol/vol)
pH, 8'3 a 25°C

25 80 gramos de QAE-Sephadex A-25 son hinchados en el tampón, y las partículas más finas son separadas por decantación. El material es empleado para el relleno de una columna con un diámetro de 2'5 cm. y una altura de 50 cm. La columna es equilibrada con el tampón.

30 2'5 g. de insulina cristalizada una vez a partir de un tampón de citrato, son disueltos, a 0°C, en una



mezcla de 450 mg. de tris(hidroximetil)aminometano, 100 mg. de sal tetrasódica de ácido etilendiamintetraacético, 25 ml. de tampón, 25 ml. de etanol al 60 por ciento (vol/vol), y 0'08 ml. de ClH 4 N (pH final a 25°C: 8'4). El material insoluble es separado por centrifugación a 2 a 4°C, y el líquido transparente que sobrenada es aplicado a la columna. La elución se lleva a cabo con el tampón a una temperatura de 4°C y a una velocidad de 26 ml/h. Se recogen fracciones de 20 ml.

Se miden las extinciones a 0'276 micras y se representan gráficamente frente a los números de las fracciones. Las fracciones que corresponden a la parte central principal del máximo de insulina (el máximo más grande) son reunidos, y la insulina es precipitada añadiendo un volumen igual al de la mezcla de acetato de zinc 0'02 M, ClH 0'03 N. El precipitado es aislado por centrifugación y cristalizado a partir de un tampón de citrato que contiene acetona, de manera conocida. La producción es de 1'3 g. de insulina pura.

Ejemplo 6

Se prepara un tampón de la composición siguiente:

14'9 g. de monoclóruo de histidinio
38'7 ml. de NaOH 1 N
16'1 g. de ClNa
3'12 litros de etanol de 96 por ciento (vol/vol) agua, hasta completar un volumen total de 5 litros.

370345



el pH es de 6'5 a 25°C

35 g. de QAE-Sephadex A-25 son hinchados en el
tampón, y las partículas más finas son separadas por de-
cantación. El material es empleado para el relleno de una
5 columna con un diámetro de 2'5 cm. y una altura de 25 cm.
La columna es equilibrada con el tampón.

500 mg. de insulina cristalizada una vez a par-
tir de un tampón de citrato son disueltos en una mezcla
de 20 mg. de sal disódica de ácido etilendiamintetraacé-
10 tico, 6'5 ml. del tampón y 6 ml. de etanol al 60 por cien-
to (vol/vol), ajustándose el pH a 6'8 con NaOH 1N. El ma-
terial insoluble es separado por centrifugación, y la di-
solución transparente es aplicada sobre la columna. La
elución se lleva a cabo con el tampón a una temperatura
15 de 25°C y una velocidad de 30 ml/h. Se recogen fracciones
de 5 ml.

Son medidas las extinciones a 0'276 micras, y
representadas gráficamente frente a los números de las
fracciones. Las fracciones que corresponden a la parte
20 central principal del máximo de insulina (el máximo más
grande) son reunidas, y la insulina es precipitada aña-
diendo un volumen igual al de la mezcla de acetato de
zinc 0'02 M. El precipitado es aislado por centrifuga-
ción y cristalizado a partir de un tampón de citrato que
25 contiene acetona, de manera conocida. La producción de in-
sulina pura es de 210 mg.

Ejemplo 7

30 Es preparado un tampón de la composición si-

- 25 - 370345



guiente:

1,25 kg. de tris(hidroxi metil)aminometano
725 ml. de ClH 12'3 N
62'4 litros de etanol de 96 por ciento (vol/vol)
5 agua hasta completar un volumen total de
100 litros.

El pH es de 7'3 a 25°C

1'3 kg. de QAE-Sephadex A-25 son hinchados en
el tampón, y las partículas más finas se separan por
10 decantación. El material es empleado para el relleno
de una columna con un diámetro de 15 cm y una altura
de 25 cm. La columna es equilibrada con el tampón.

18 gramos de insulina cristalizada una vez
a partir de un tampón de citrato son disueltos en una
15 mezcla de 0'72 g. de sal disódica de ácido etilendiamin-
tetraacético, 10'2 g. de tris(hidroxi metil)aminometano
y 720 ml. de etanol al 60 por ciento (vol/vol). El ma-
terial insoluble es separado por centrifugación. 10'7
20 ml. de ClH 6N son añadidos a la disolución transparen-
te, que después es aplicada a la columna. La elución
es efectuada con el tampón a una temperatura de 25°C
y una velocidad de 1'2 litros/h. Se recogen fracciones
de 0'5 litros.

Son medidas las extinciones a 0'276 micras
25 (E_{276}), y representadas gráficamente frente a los volú-
menes de eluido, como se muestra en la figura 5. Las
fracciones correspondientes a la parte central princi-
pal del máximo de insulina (el máximo más grande) son
reunidas (como se muestra en la figura). La insulina es
30 precipitada de la mezcla añadiendo un volumen de acetato

370345



de zinc 0'02 M igual al de la mezcla. El precipitado es aislado por centrifugación y cristalizado a partir de un tampón de citrato que contiene acetona, de manera conocida. La producción es de 8'2 g. de insulina pura.

5

La insulina es recristalizada a partir de un tampón de la composición siguiente:

2'0 por ciento de insulina

10

0'8 por ciento de Zn^{++} (en forma de cloruro), calculado con respecto al peso de la insulina.

acetato de sodio 0'01 M

7'0 por ciento de cloruro de sodio

ClH hasta pH 5'45 a 5'55.

La insulina es disuelta en agua que contiene

15

ClH y el Cl_2Zn , y después es añadida una disolución de acetato de sodio y cloruro de sodio. La cristalización se lleva a cabo a temperatura ambiente con agitación mecánica. La cristalización se completa en uno o dos días. La insulina es aislada por filtración, lavada con agua y secada en vacío. La producción es de 8'0 gramos.

20

La insulina purificada y la insulina pura según la invención pueden emplearse para la obtención de toda clase de preparaciones farmacéuticas de insulina para uso clínico.

25

Para conseguir una acción rápida de la insulina es conocido el empleo de una disolución acuosa inyectable de insulina. Esta disolución tiene usualmente un valor de pH de aproximadamente 2 a 3, pero existen también preparaciones conocidas de insulina que constan de

30

370345



una disolución de insulina con un valor del pH de aproximadamente 7 a 8. Con respecto a esta disolución de insulina últimamente citada, puede hacerse referencia, por ej. a la Memoria descriptiva de la Patente de los EE.UU. N^o 3.091.573. La insulina purificada y la pura según la invención pueden emplearse para la formulación de ambos tipos de disoluciones inyectables de insulina.

Son conocidos también preparaciones inyectables de insulina, en las que la insulina está combinada con un compuesto que hace a la insulina escasamente soluble al valor de pH de la sangre y los tejidos humanos. Son ejemplos de estos compuestos la protamina, la globina y surfen (bis-2-metil-4-aminoquinoleil-6-carbámid). Una preparación de esta clase muy conocida es una suspensión acuosa de un precipitado amorfo de insulina y protamina en un medio que contiene zinc. Otro ejemplo es una suspensión acuosa inyectable de un compuesto de insulina y protamina en forma cristalina. La insulina purificada y la insulina pura según la invención pueden ser utilizadas también para la formulación de preparaciones inyectables de insulina de estas clases.

Unos tipos de preparaciones inyectables de insulina que han encontrado un amplio uso son suspensiones acuosas que contienen insulina en estado amorfo y/o cristalino. En estas suspensiones de cristales de insulina hay presentes iones de zinc en tal proporción que los cristales de insulina en suspensión contienen al menos 0'35 miliequivalentes de zinc por gramo de los cristales, y las suspensiones tienen un pH de aproximadamente 7.

370345



5

A este respecto puede hacerse referencia, por ej., a la Memoria descriptiva de la Patente de los EE.UU. Nº 2.882.202. La insulina purificada y la insulina pura según la invención pueden ser empleadas para formular este tipo de preparaciones inyectables de insulina.

10

Durante la última década se ha utilizado también una suspensión acuosa inyectable que contiene cristales de insulina bovina que tienen la forma de rombos de aristas vivas unidos por caras cristalinas planas, siendo el ángulo obtuso de cada rombo de entre 114º y 115º. Con respecto a la producción de estos cristales, puede hacerse referencia, por ej. a la Memoria descriptiva de la Patente de los EE.UU. Nº 2.920.014.

15

La suspensión de estos cristales de insulina bovina puede contener también insulina en disolución. La insulina purificada y la insulina pura según la invención pueden ser empleadas también para formular estos tipos de preparaciones de insulina para uso clínico.

20

Finalmente, es sabido que se considera ventajoso que los cristales de insulina empleados en forma cristalina en suspensiones de cristales de insulina para inyección sean de tamaño sustancialmente uniforme. Esto puede conseguirse como se describe en las Memorias descriptivas de las Patentes de los EE.UU. Nos. 2.819.999

25

y 2.799.622. Estos procedimientos de cristalización pueden ser empleados en relación con la formulación de la insulina purificada y la insulina pura según la invención en suspensiones de cristales de insulina para inyección.

30

En los ejemplos siguientes se ilustra cómo

14.8.69



emplear la insulina purificada y la insulina pura para la producción de algunas de las clases de las preparaciones de insulina citadas anteriormente.

5

Ejemplo 8

Inyección de insulina neutra 40 u.i/ml.

160 mg. de insulina pura preparada según el ejemplo 5 son disueltos en 20 ml. de ácido clorhídrico 0,01N. La disolución es esterilizada por filtración, y el filtrado es mezclado asépticamente con 60 ml. de una disolución acuosa estéril que contiene 0'1 g. de p-hidroxibenzoato de metilo. Finalmente se añaden 20 ml. de una disolución estéril que contiene 136 mg. de acetato de sodio, 0'7 g. de cloruro de sodio y 10 mg. de hidróxido de sodio. La preparación final tiene un pH de aproximadamente 7'3. Es introducida asépticamente en ampollas esterilizadas.

20

Ejemplo 9

Inyección de insulina con protamina y zinc.
40 u.i/ml.

1'6 g. de insulina purificada preparada según el Ejemplo 1 son disueltos en 75 ml. de ácido clorhídrico 0'03 N. La disolución es esterilizada por filtración, y el filtrado es mezclado asépticamente con agitación constante con 800 ml. de una disolución estéril que contiene 16 g. de glicerol, cloruro de zinc en cantidad equi

30

3 MAY. 1977



5 valente a 35 mg. de zinc y 1 g. de p-hidroxibenzoato de metilo. A esta disolución se añaden 25 ml. de una disolución estéril de 340 mg. de sulfato de protamina en ácido-clorhídrico 0'08 N y 100 ml. de una disolución estéril de hidróxido de sodio 0'058 N que contiene 1'36 g. de acetato de sodio. La preparación tiene un pH de aproximadamente 7'2. Se envasa asépticamente en ampollas esterilizadas.

10

Ejemplo 10

INYECCION DE INSULINA BIFASICA. 40 u.i./ml.

15

20

25

30

Para la obtención de esta preparación farmacéutica de insulina se usa una insulina pura que ha sido recristalizada a partir de una disolución tampón de acetato-sal. 1'6 g. de insulina pura (de vaca) preparada según el Ejemplo 7 son disueltos en 75 ml. de ácido clorhídrico 0,04N que contiene cloruro de zinc en cantidad equivalente a 1'1 mg. de zinc. La disolución es esterilizada por filtración, y el filtrado es mezclado asépticamente, con agitación constante, con 25 ml. de una disolución estéril que contiene 1'36 g. de acetato de sodio, 7 g. de cloruro de sodio, e hidróxido de sodio suficiente para producir un pH de 5'4 a 5'5 en la mezcla. La agitación es continuada durante veinte horas aproximadamente, o hasta que el precipitado de insulina es convertido en cristales romboédricos. La suspensión es añadida después asépticamente a 800 ml. de una disolución acuosa estéril que contiene 1 gramo de p-hidrox-

370345



benzoato de metilo, y la mezcla es diluida con 100 ml. de una disolución de hidróxido de sodio suficiente para obtener una preparación con un pH de aproximadamente 7. A esta preparación se añade una disolución neutra estéril de insulina pura que contiene 1'6 mg. de insulina pura por ml., hasta que la cuarta parte de la insulina está presente en forma soluble. La suspensión es envasada asépticamente en recipientes esterilizados.

La disolución estéril de insulina pura es preparada por el método siguiente. 0'4 g. de insulina pura (de cerdo) preparada según el Ejemplo 7, son disueltos en 25 ml. de ácido clorhídrico 0,02N que contiene cloruro de zinc en cantidad equivalente a 0,25 mg. de zinc. La disolución es esterilizada por filtración, el filtrado es diluido asépticamente con 200 ml. de una disolución acuosa estéril que contiene 0'25 gramos de p-hidroxibenzoato de metilo y 25 ml. de una disolución estéril que contiene 0'34 gramos de acetato de sodio, 1'75 gramos de cloruro de sodio, e hidróxido de sodio suficiente para producir un pH de aproximadamente 7 en la disolución final.

Ejemplo 11

25

SUSPENSION DE INSULINA Y ZINC. 40 u.i./ml.

Primero, la fracción cristalina de la preparación es obtenida por el método siguiente. 1'6 g. de insulina pura preparada según el Ejemplo 2 son disueltos en 75 ml. de ácido clorhídrico 0,02N que contiene cloruro de

30

370345

3 MAY 1971

zinc en cantidad equivalente a 10 mg. de zinc. La diso-
lución es esterilizada por filtración, y el filtrado es
mezclado asépticamente, con agitación simultánea, con 25
5 ml. de una disolución estéril que contiene 1'36 g. de ace-
tato de sodio, 7 g. de cloruro de sodio, e hidróxido de
sodio suficiente para producir un pH de 5'4 a 5'5 en la
mezcla. La agitación es continuada durante veinte horas
aproximadamente, o hasta que el precipitado de insulina
pura es convertido en cristales romboédricos. La suspen-
10 sión es añadida después asépticamente, con agitación con-
tinua, a 900 ml de una disolución estéril que contiene
cloruro de zinc en cantidad equivalente a 70 mg. de zinc,
1 gramo de p-hidroxibenzoato de metilo, e hidróxido de
sodio suficiente para producir un pH de aproximadamente
15 7'3 en la fracción cristalina.

La fracción amorfa es preparada por el método
siguiente: 1'6 g. de insulina preparada según el Ejemplo
4 son disueltos en 100 ml. de ácido clorhídrico 0,02N
que contiene cloruro de zinc en cantidad equivalente a
20 10 mg. de zinc, la disolución es esterilizada por fil-
tración, y el filtrado diluido asépticamente con 800 ml.
de una disolución estéril que contiene cloruro de zinc
equivalente a 70 mg. de zinc, y 1 gramo de p-hidroxiben-
zoato de metilo. 100 ml. de una disolución estéril que
25 contiene 1'36 g. de acetato de sodio, 7 gramos de clo-
ruro de sodio e hidróxido de sodio suficiente para pro-
ducir un pH de aproximadamente 7'3 en la fracción amor-
fa final, son añadidos después asépticamente con agita-
ción continua.

30 La suspensión de insulina y zinc es preparada

- 33 - 370345



mezclando asépticamente 7 volúmenes de la suspensión cris-
talina y 3 volúmenes de la suspensión amorfa. La mezcla
es envasada asépticamente en ampollas esterilizadas.

5 Esta solicitud que corresponde a la presentada
en Gran Bretaña, con fecha 9 de Agosto de 1.968, bajo el
Nº 38081/68, (provisional), se acoge a los beneficios del
artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Indus-
trial.

10

REIVINDICACIONES

15

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

20

1.- Un procedimiento para fabricar una prepa-
ración inyectable de insulina para uso clínico, caracte-
rizado por el hecho de que es purificada insulina cruda
o comercial, preferiblemente por filtración en gel y cro-
matografía en columna, en tal extensión que esté exenta
de proteínas de origen pancreático que tienen un peso mo-
lecular superior a 6.000, aproximadamente, y muestra esen-
25 cialmente un único componente cuando es analizada por
electroforesis en gel de poliacrilamida, y porque la in-
sulina así purificada se formula como una preparación in-
yectable de una manera en sí conocida.

25

30

2.- Un procedimiento según la reivindicación 1,
caracterizado por someter primeramente insulina comercial

370345



o cruda a una filtración en gel y a continuación a cromatografía en columna sobre un cambiador de iones, recoger en ambos casos las fracciones correspondientes a la parte mayor central del pico de insulina, de manera que después de la cromatografía en columna las fracciones recogidas muestren esencialmente un componente único cuando se analiza por electroforesis en gel de poliacrilamida, recuperar la insulina de las fracciones recogidas y formular la insulina así purificada en una preparación de insulina inyectable.

3.- Un procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por someter insulina comercial o cruda a cromatografía en columna sobre un cambiador de aniones, de preferencia fuertemente básico y utilizar un disolvente orgánico miscible en agua, que contiene agua, preferiblemente un alcohol alifático, como eluyente, recoger las fracciones correspondientes a la parte mayor central del pico de insulina y que muestran esencialmente un componente único cuando se analizan por electroforesis en gel de poliacrilamida, recuperar la insulina de las fracciones recogidas y formular la insulina así purificada en una preparación de insulina inyectable.

4.- Un procedimiento para fabricar una preparación inyectable de insulina.


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

370345

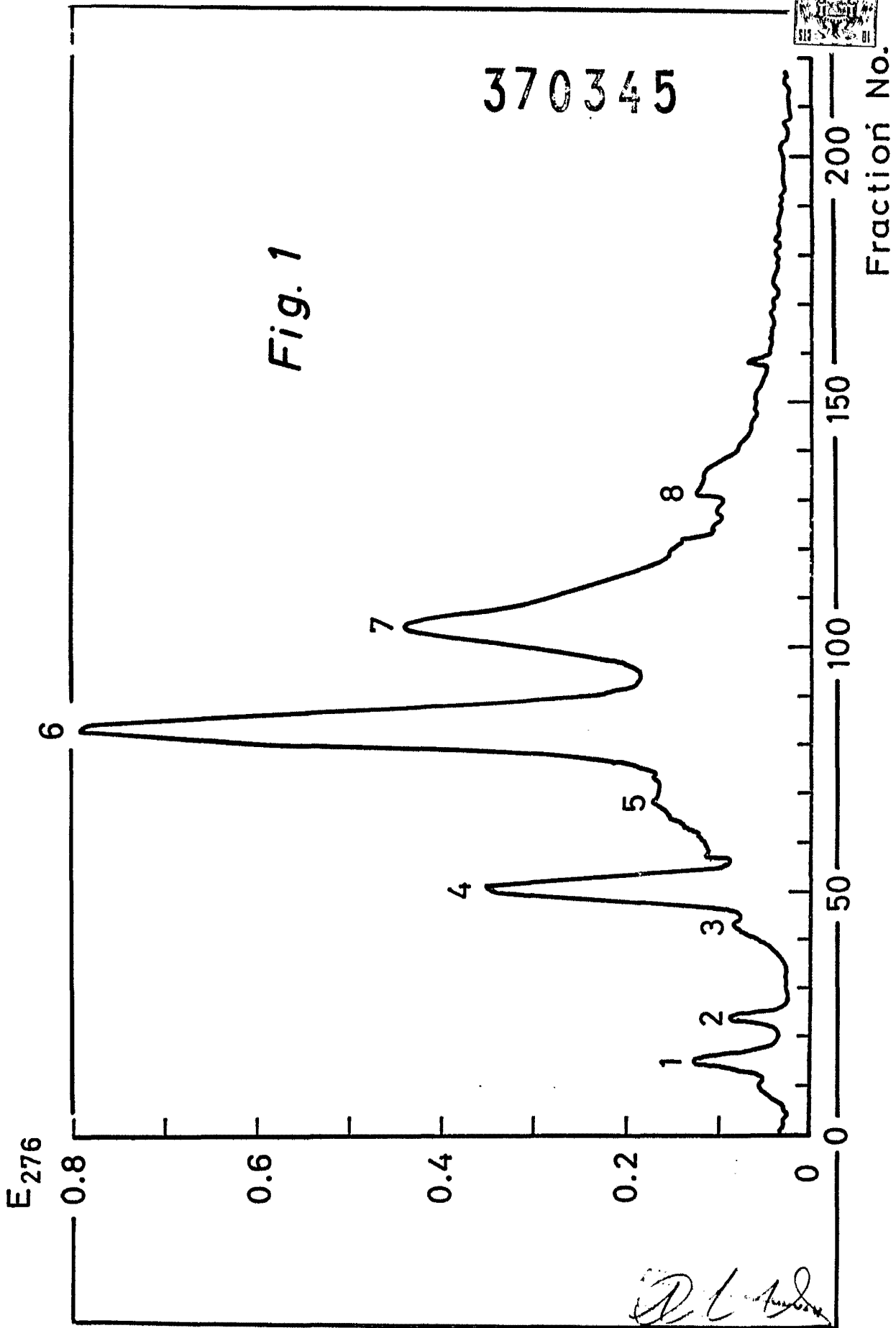


Esta Memoria consta de treinta y cinco hojas y la presente escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, **3 MAY. 1971**
P.A.

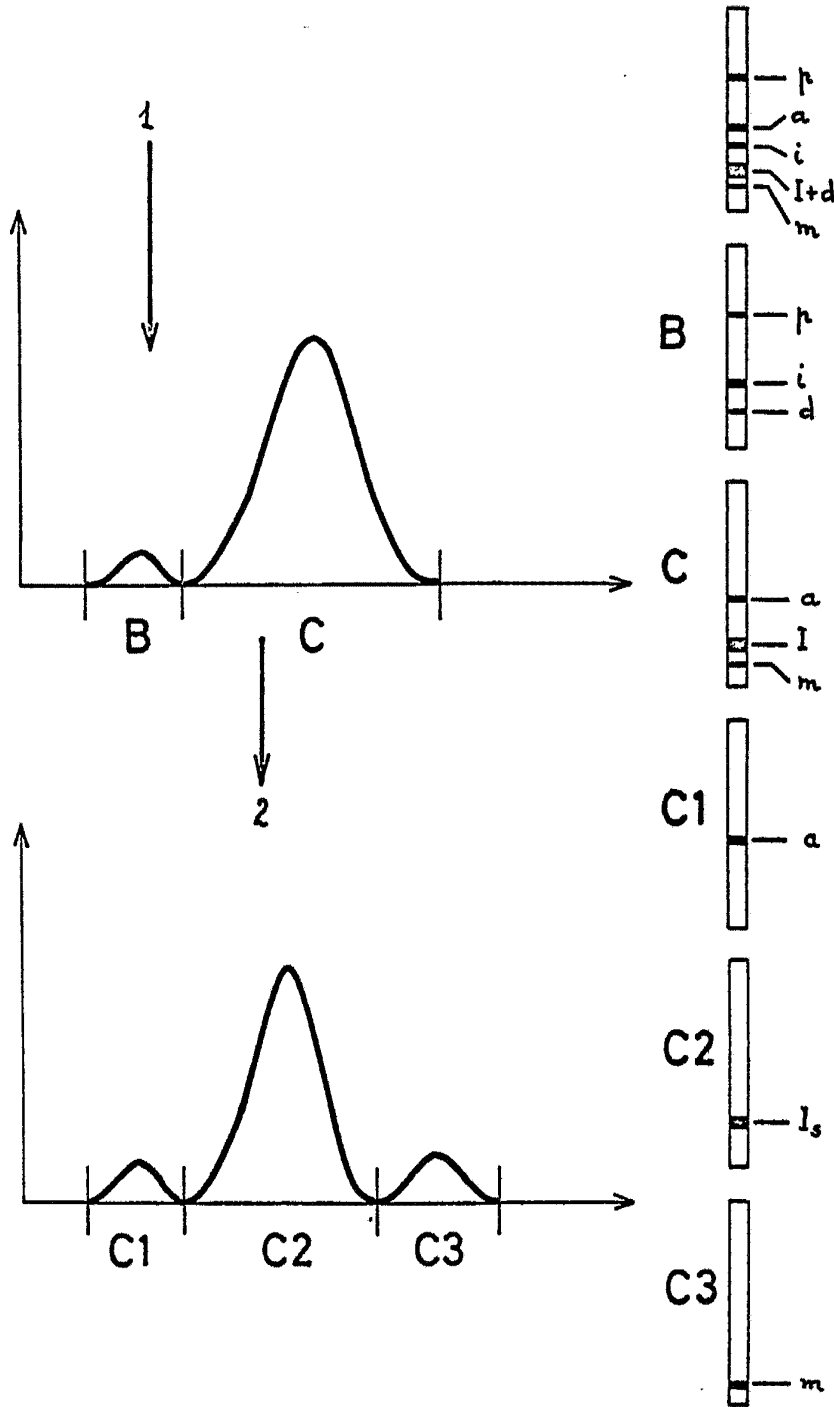

Adolfo Suárez
Por Poderes

370345





370345
Fig. 2

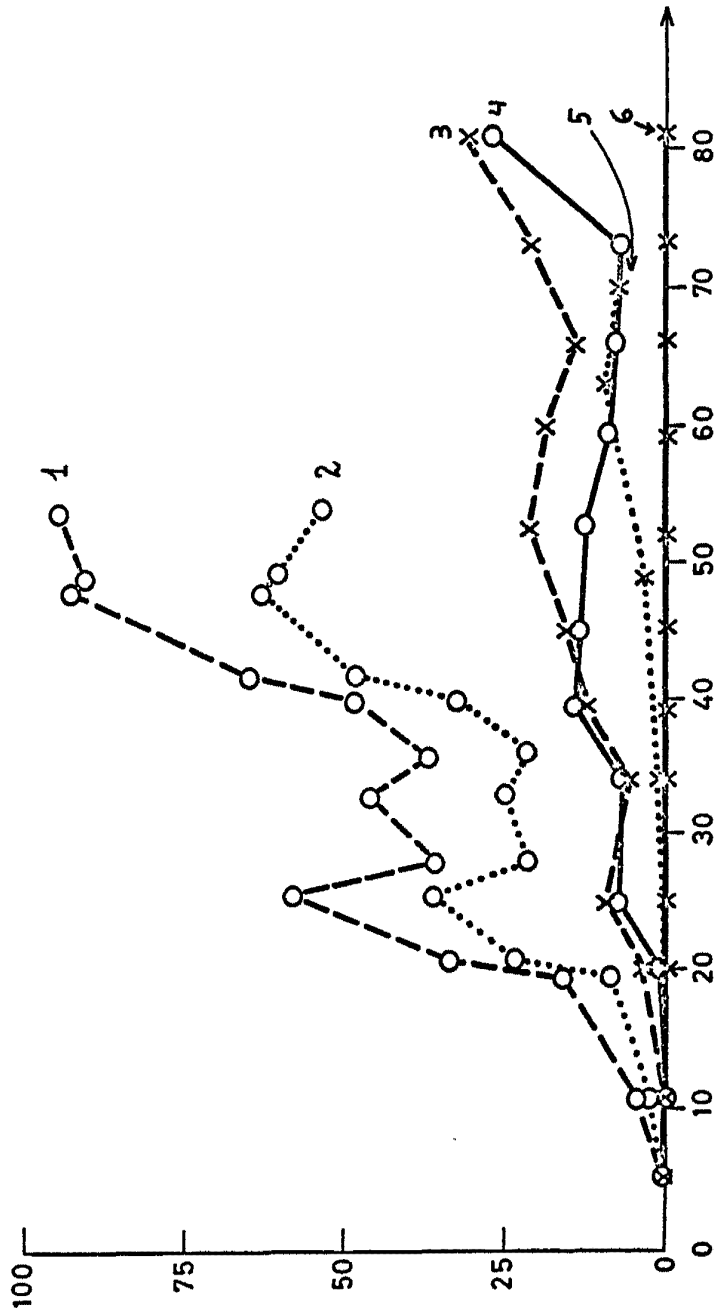


[Handwritten signature]

370345



Fig. 3



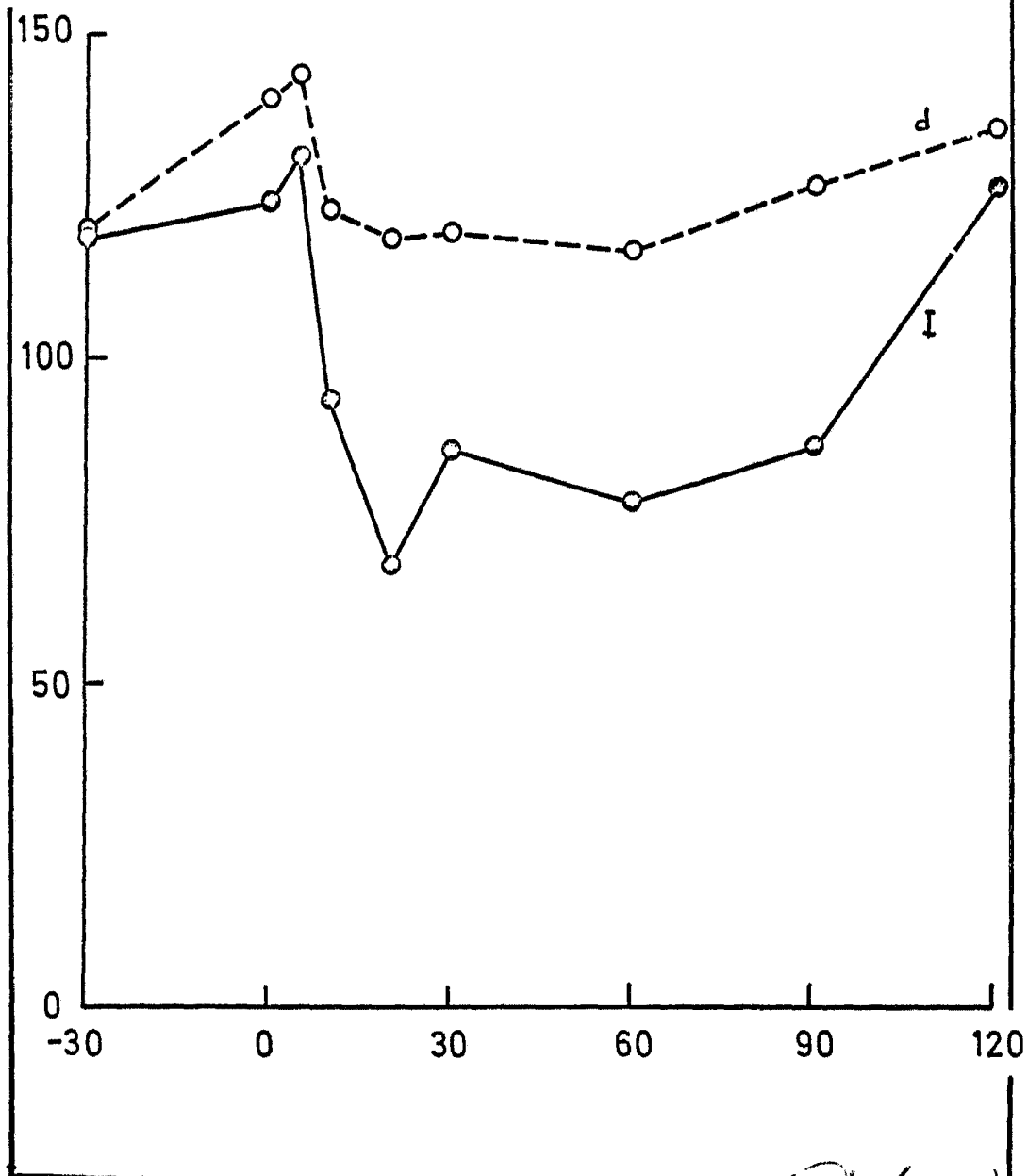
[Handwritten signature]

370345



Fig. 4

mg / 100 ml



Handwritten signature or initials at the bottom right of the page.

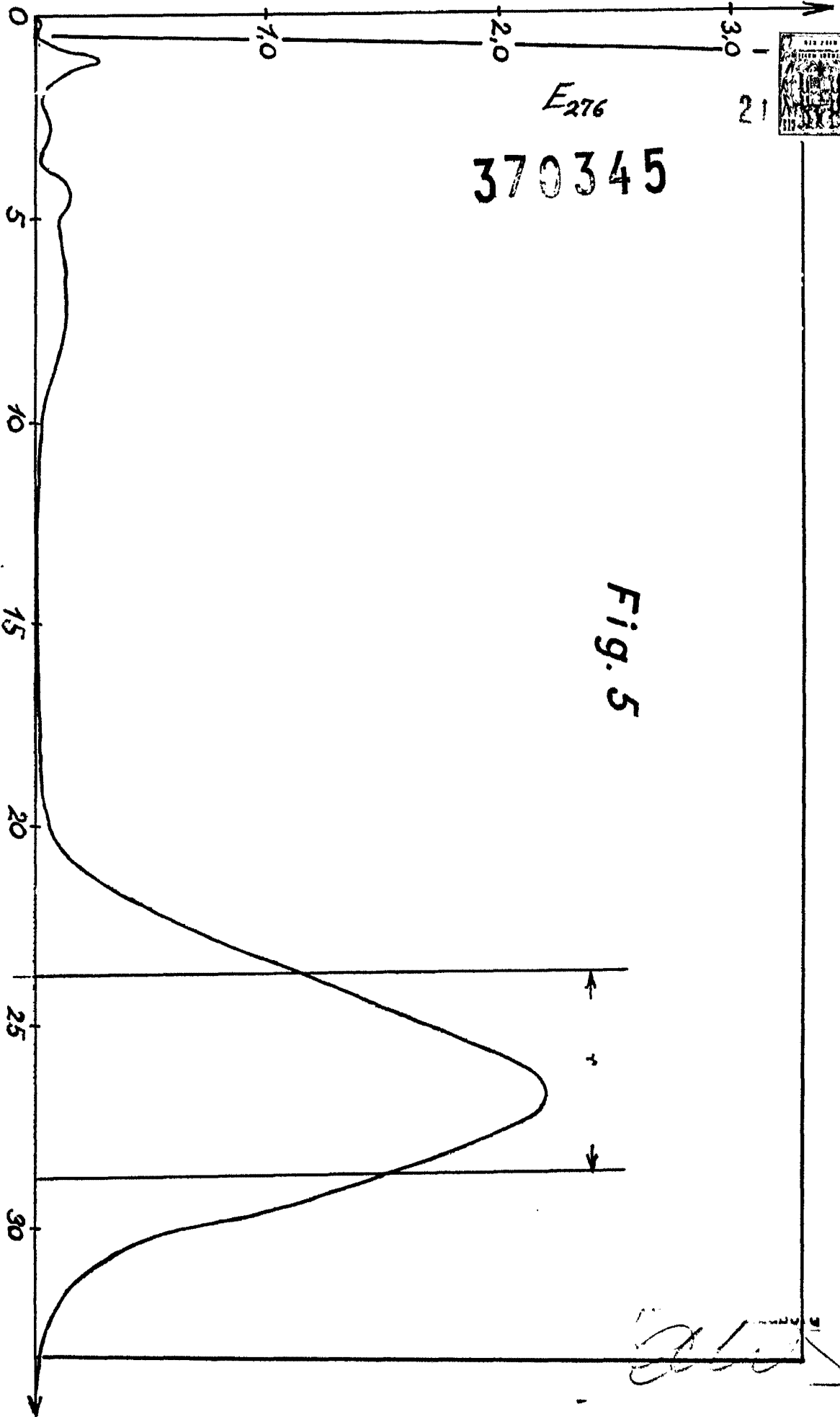


Fig. 5