

374280

SECCION TECNICA	
CLASIFICACION I.P.C.	
CLASE	CO71 A61
SUBCLASE	d KU

31 D



MEMORIA DESCRIPTIVA
para solicitar
P A T E N T E D E I N V E N C I O N
e n
E S P A Ñ A
por VEINTE años

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

"UN PROCEDIMIENTO DE PREPARACION DE NUEVOS DERIVADOS DE LA INSULINA"

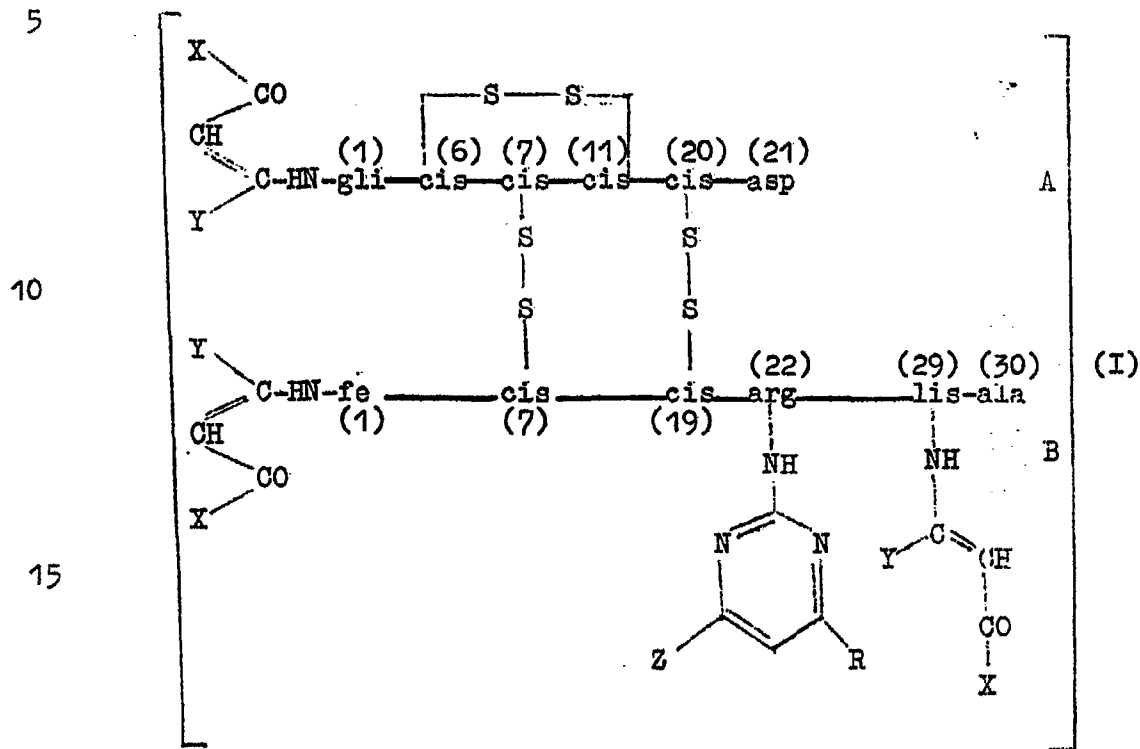
(Clase Internacional CO7d CO7c)

El presente invento tiene como objeto un procedimiento de preparación de nuevos derivados de la insulina.

El invento tiene como objeto, de modo más preciso, un procedimiento de preparación de las sales que forman con las bases las tris-N^{A1}, N^{B1}, N^{B29}-(X-3 oxo-3 Y-1 propen-1 il-1)/ N^d-(Z-4 R-6 pirimidinil-2) ornitina

12.12.69.

B₂₂'-insulinas, existiendo estas sales al estado disocia-
do o débilmente asociado comparable al de la insulina, so-
lubles en agua y cuyo grupo molecular fundamental tiene
como fórmula general esquemática, I



20 en la cual X e Y, idénticos o diferentes, representan un radical alcoholo, aralcoholo o arilo, pudiendo estar es-
tos radicales eventualmente sustituidos, o bien X e Y re-
presentan conjuntamente un grupo polimetileno eventualmen-
te sustituido, Z y R, idénticos o diferentes, representan
25 un radical alcoholo, aralcoholo o arilo, pudiendo estar
estos radicales eventualmente sustituidos, así como
tris-N^{A1}, N^{B1}, N^{B29}-(X-3 oxo-3 Y-1 propen-1 il-1)/ N^ó
-(Z-4 R-6 pirimidinil-2) ornitina B₂₂'-insulinas al esta-
do libre, no salificadas, que existen bajo forma disocia-
da, o débilmente asociada.

30
12.12.69.



1369

Los sustituyentes X e Y, R y Z poseen preferentemente los significados siguientes: X, Y, R y Z representan un radical alcohilo que comprende de 1 a 6 átomos de carbono, tales como metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, sec-butilo, ter-butilo, pudiendo estar estos radicales sustituidos o no, un radical aralcohilo que lleva de 7 a 10 átomos de carbono, tal como bencilo, feniletilo, fenil-3 propilo, etc. pudiendo estar estos radicales sustituidos o no, un radical arilo monocíclico tal como un radical fenilo eventualmente sustituido especialmente por uno o varios radicales metilo, etilo, propilo o isopropilo, por uno o varios radicales metoxi, etoxi, propoxi, isopropoxi, por uno o varios átomos de halógeno, por uno o varios grupos trihalogenometilo, etc., pudiendo X e Y, además, representar conjuntamente un grupo polimetileno tal como dimetileno o trimetileno eventualmente sustituido.

Las sales I, y las proteínas libres correspondientes están dotadas de notables propiedades fisiológicas. Ejercen especialmente, sobre el animal y sobre el hombre, una acción hipoglicémica retardada que se traduce por una disminución de la glicemia un poco más tardía pero mucho más prolongada que la que se observa con la insulina, incluso por inyección intravenosa. Estos compuestos dan prueba igualmente de una actividad anabolizante marcada. Con las sales, I, se dispone de esta manera, por primera vez, de compuestos hipoglicémicos con acción retardada, los cuales, contrariamente a los productos actualmente vendidos en el comercio, son muy solubles en agua, lo cual facilita considerablemente su utilización

30
12.12.69.



terapéutica.

5 La nomenclatura de los compuestos polipeptídicos, de los que se trata aquí y en lo que sigue, está conforme a los principios generales de la nomenclatura de los polipéptidos (véase J. Biol. Chem. 241, 2491 (1966); Biochim. Biophys. Acta, 121, 1 (1966) y a las reglas establecidas, a título experimental, por la I. U. P. A. C. (véase Biochemistry Vol. 6, número 1, 362 (1967) que concierne a las modificaciones sintéticas de los péptidos naturales.

10

Las sales, I, así como las proteínas libres correspondientes, obtenidas por el procedimiento objeto del invento, se diferencian de los compuestos descritos en la patente española 337.521 en que el bloqueo de sus grupos amínicos es total mientras que el bloqueo de los grupos amínicos de los compuestos de dicha patente no es más que parcial y por que, contrariamente a los compuestos de esta patente, que existen al estado de agregados moleculares fuertemente asociados, las sales, I, y las proteínas libres correspondientes existen al estado disociado o débilmente asociado, similar al de la insulina natural.

15

20

Las sales, I, y las proteínas libres correspondientes, débilmente asociadas, se diferencian de los compuestos fuertemente asociados de la patente española antes mencionada, por las características enunciadas a continuación que son la consecuencia de su pequeño grado de asociación.

25

Las sales, I, y las proteínas libres correspondientes presentan en su curva de dicroísmo circular un

30

10.2.70.



máximo negativo hacia 220 m μ que está ligado con la conformación helicoidal parcial de la cadena B de la molécula insulinoide y que no existe en los compuestos de la patente española número 337.521, fuertemente asociados. Las sales, I, y las proteínas libres correspondientes presentan de una manera general, igual que la insulina, una movilidad importante en cromatografía sobre papel mientras que en las mismas condiciones, el Rf de los compuestos de dicha patente es nulo. Finalmente, las sales, I, poseen una fuerte solubilidad acuosa que no existe en los compuestos fuertemente asociados de la patente antes citada, y las proteínas libres que corresponden a las sales, I, débilmente asociadas, son solubilizadas con facilidad por acción de una base mientras que los compuestos descritos en la patente española citada son poco solubles en medio básico y solamente con un pH relativamente elevado del orden de 11 a 12.

El procedimiento de preparación de las sales de tris-N^{A1}, N^{B1}, N^{B29}-(X-3 oxo-3 Y-1 propen-1 il-1)/N⁶-(Z-4 R-6 pirimidinil-2) ornitina B₂₂/-insulinas y de las proteínas libres correspondientes, objeto del invento, está ilustrado por el esquema número 1 anejo. Está caracterizado esencialmente por que se condensa la insulina, II, con una beta-dicetona Z-COCH₂-CO-R, conservando Z y R los significados antes citados, en medio hidroalcohólico débilmente básico, homogéneo, para formar una sal alcalina de tris-N^{A1}, N^{B1}, N^{B29}-(Z-3 oxo-3 R-1 propen-1 il-1)/N⁶-(Z-4 R-6 pirimidinil-2) ornitina B₂₂/insulina, al estado de agregados moleculares fuertemente asociados, insoluble en agua, III, por que se somete, en presencia de un

12.12.69.



hidróxido alcalino, a un pH próximo a 8, a dicho compues-
to III, a la acción disociante del fenol o de uno de sus
derivados sustituidos para obtener la sal de metal alcali
no de las tris- N^{A1} , N^{B1} , $N^{\xi B29}$ -(Z-3 oxo-3 R-1 propen-1
5 il-1)/ N^{δ} -(Z-4 R-6 pirimidinil-2) ornitina B_{22} /-insuli-
na, al estado disociado o débilmente asociado, soluble en
agua, I_A , que se somete eventualmente a una hidrólisis
ácida cuidadosa, y porque después se hace reaccionar, en
medio hidroalcohólico homogéneo o heterogéneo, débilmente
10 ácido o débilmente básico, la sal de la / N^{δ} -(Z-4 R-6 pi-
rimidinil-2) ornitina B_{22} /-insulina disociada o débilmente
asociada, soluble en agua, IV, resultante, con una beta-
dicetona X-COCH₂CO-Y, conservando X e Y los significados
antes citados, para obtener una tris- N^{A1} , N^{B1} , $N^{\xi B29}$ -
15 (X-3 oxo-3 Y-1 propen-1 il-1) / N^{δ} -(Z-4 R-6 pirimidinil-2)
ornitina B_{22} /-insulina, al estado más o menos fuertemente
asociado y que existe bajo forma de sal o de proteína li-
bre según el pH de reacción o de aislamiento, V, que se
trata en presencia de un hidróxido alcalino, a un pH pró-
ximo a 8, con fenol o con uno de sus derivados sustitui-
dos, para obtener una sal alcalina de una tris- N^{A1} , N^{B1} ,
20 $N^{\xi B29}$ -(X-3 oxo-3 Y-1 propen-1 il-1)/ N^{δ} -(Z-4 R-6 pirimi-
dinil-2) ornitina B_{22} /-insulina, al estado disociado o dé-
bilmente asociado, soluble en agua, I_B y porque después
25 se transforman eventualmente los compuestos I_B o I_A por
los métodos usuales, en sales de bases orgánicas o minera-
les, diferentes de las sales de metales alcalinos, o en
proteínas libres no salificadas.

Las sales de las tris-oxoenaminas de las
30 / N^{δ} -pirimidinil-ornitina B_{22} /-insulinas, obtenidas por el
12.12.69.



procedimiento objeto del invento, engloban a la vez las sales homo-sustituídas I_A y las sales heterosustituídas I_B . Las sales, I , corresponden por lo tanto igualmente a las sales de las tris-oxoenaminas de las N^4 -pirimidinil-ornitina B_{22} -insulinas para las que X es idéntica a Z , Y y R , que a aquellas para las cuales estos sustituyentes son diferentes.

En un modo de realización actualmente preferido, el procedimiento del invento puede estar caracterizado especialmente por los puntos enunciados a continuación.

Por aumentar con el pH la velocidad de reacción de la insulina con la beta-dicetona $Z-COCH_2CO-R$, se tiene interés en efectuar esta condensación en medio básico. Por poder llevar un pH demasiado alcalino a una alteración irreversible de las proteínas en juego, se escoge finalmente, en general, un pH próximo a 8, y se efectúa la reacción bien sea en presencia de una mezcla tampón conveniente tal como una mezcla a base de fosfatos dialcalino y monoalcalino en proporciones convenientes, bien sea, preferentemente, en presencia de un bicarbonato alcalino tal como bicarbonato de potasio. En este caso, para evitar la disociación del bicarbonato a carbonato, lo cual conduciría a una elevación del pH del medio de reacción, se trabaja en recipiente cerrado.

La condensación de la insulina con la beta-dicetona se efectúa en medio acuoso en presencia de un disolvente orgánico que facilita la homogeneización del medio de reacción al mismo tiempo que no altera la insulina ni el compuesto de condensación resultante. Como di

30
12.12.69.



solvente que satisface estas condiciones, se utilizan especialmente los alcoholes tales como metanol, etanol, butanol.

5 Las concentraciones del medio en agua, alcohol, dicetona y bicarbonato alcalino deben ser tales que aseguren la homogeneidad del medio. En el caso en que la beta-dicetona es la acetilacetona, se utilizarán, por ejemplo, las mezclas siguientes:

10
15

Bicarbonato de potasio	agua	alcohol	acetilacetona
3 a 5 %	32 %	32 %	32 %
3 a 5 %	38 %	29 %	29 %
3 a 5 %	48 %	24 %	24 %

Para efectuar la condensación de la insulina y de la beta-dicetona se utiliza un exceso muy grande de beta-dicetona sin lo cual la reacción no está completa. Así es como, por ejemplo, para 1 g de insulina se utilizan 20 a 30 g de acetilacetona lo cual representa varios cientos de veces la cantidad estequiométrica.

25 En el caso en que la beta-dicetona utilizada es la acetilacetona, la concentración óptima del medio en insulina es del orden de 1%. A partir de 2%, la velocidad de reacción comienza a disminuir y para una concentración de 5% el cierre de ciclo pirimidínico se bloquea a aproximadamente 90% de la teoría.

30 El tiempo y la temperatura de reacción son función uno de otra. En medio hidroetanólico la temperatura
12.12.69.



óptima es del orden de 20 a 25°C. A + 2°C la reacción se bloquea bastante antes de que esté completo el cierre de ciclo pirimidínico del grupo guanidilo. A + 30°C la alteración de la insulina ya es sensible.

5 A 20-25°C, en medio hidroetanólico, en fase homogénea, en presencia de bicarbonato de potasio, el bloqueo de los grupos amínicos de la insulina es rápido, del orden de algunas horas. Por el contrario, el bloqueo del grupo guanidilo es mucho más lento. En el caso en
10 que se utilice la acetilacetona, llega a aproximadamente 80% de la teoría al cabo de 24 horas, a 90% al cabo de 6 días, y no está prácticamente completo más que al cabo de 20 días.

15 Las tris-oxoenaminas de las /N^δ-pirimidinil-ornitina B₂₂/-insulinas, III, existen al estado de sal alcalina. En general, su concentración en metal alcalino es inferior a la teoría (seis átomos de metal alcalino por molécula), no siendo total la salificación de los seis grupos carboxilo con pH 8 del medio de reacción.

20 La condensación de la beta-dicetona y de la insulina está acompañada por la formación progresiva de un precipitado que ha mostrado ser una mezcla de sal alcalina de tris-oxoenamina de la insulina, VI, (véase esquema número 2) y de sal alcalina de tris-oxoenamina de
25 /N^δ-pirimidinil B₂₂/insulina, III. La reacción avanza verosimilmente por solubilización parcial de la tris-oxoenamina de la insulina que puede reaccionar de esta manera con la beta-dicetona, dando lugar a una reprecipitación de III, hasta que sea total el bloqueo de los grupos amino y guanidilo.

30
12.12.69.



El profundo cambio de la estructura de la tris-oxoenamino- N^{δ} -pirimidinil-ornitina B_{22} -insulina, III, con relación a la insulina de partida que se manifiesta por su insolubilidad en medio acuoso entre
5 pH = 1 y pH = 10, se revela igualmente por la medición de su dicroísmo circular. Se comprueba en efecto, sobre la curva de dicroísmo circular de la tris-oxoenamino- N^{δ} -pirimidino-ornitina B_{22} -insulina, III, que ha desaparecido el máximo negativo hacia 222 $\text{m}\mu$, que se podía
10 considerar como característico de la conformación helicoidal de una parte de la cadena B de la insulina de partida. Resulta de esta manera que el bloqueo del grupo guanidilo modifica considerablemente la configuración de la insulina. El compuesto obtenido, III, insoluble en agua,
15 existe al estado de agregados moleculares fuertemente asociados.

La coherencia de este edificio o estructura molecular está asegurada por enlaces no covalentes, enlaces de hidrógeno, enlaces hidrófobos que resultan de la
20 puesta en juego de fuerzas de Van der Waals, fuerzas electrostáticas entre las funciones polares, etc., entre las moléculas constitutivas asociadas.

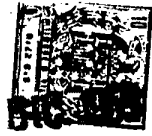
Se ha encontrado, de una manera sorprendente, y esta es una característica importante del invento, que
25 este estado de fuerte agregación molecular de los compuestos, III, era reversible. Se ha comprobado, en efecto, que la acción, en presencia de un hidróxido alcalino, con un pH próximo a 8, del fenol o de uno de sus derivados sustituidos era capaz de disociar los agregados moleculares de la sal alcalina de la tris-oxoenamino de la N^{δ} -pirimidi-
30
12.12.69.



nil-ornitina B₂₂/-insulina, III, y de conducir a la sal
alcalina de una tris-N^{A1}, N^{B1}, N^{C29} -(Z-3 oxo-3 R-1 pro
pen-1 il-1) /N⁶ -(Z-4 R-6 pirimidinil-2) ornitina B₂₂/-in
sulina al estado disociado o débilmente asociado, compara
5 ble al de la insulina natural, soluble en agua, I_A, y cu-
ya curva de dicroísmo circular presenta de nuevo un máxi-
mo negativo hacia 220 mμ, característico de la configura-
ción helicoidal parcial de la insulina de partida.

La disociación de los agregados moleculares
10 de las tris-oxoaminas de las /N⁶ -pirimidinil-ornitina
B₂₂/-insulinas, III, se efectúa a un pH próximo a 8. Este
pH se obtiene por adición de una pequeña cantidad de hidró-
xido alcalino al medio de reacción. La utilización de la
mezcla fenol-agua-solución acuosa 1 N de potasa (75-20-5)
15 permite en general obtener una disociación satisfactoria
en 10 a 15 minutos a 20-25°C. La sal de las tris-oxoena-
minas de las /N⁶ -pirimidinil-ornitina B₂₂/-insulina, I_A,
disociada resultante, es precipitada entonces por un disol-
vente orgánico, miscible con agua, tal como acetona y se
20 aísla sin tardar por centrifugación, el precipitado forma-
do. Los compuestos I_A así obtenidos corresponden teórica-
mente a la sal hexa-alcalina pero pueden contener, en la
práctica, un exceso o un déficit de metal con relación a
la teoría. Son muy solubles en agua y en suero fisiológico,
25 co, lo cual representa un interés práctico muy grande pa-
ra su utilización terapéutica.

Su grado de asociación es pequeño. Es verosí-
mil que estos compuestos correspondan a la asociación de
algunas moléculas fundamentales, o incluso que se trate
30 de una molécula libre no asociada. Este grado de asocia-
12.12.69.



ción no es conocido con certidumbre actualmente. Puede de-
 pender además de diversos factores, tales como especial-
 mente el pH del medio en el cual está disuelto el compues-
 to I_A, y de su concentración en este medio.

5 Bien entendido, las consideraciones preceden-
 tes no limitan en nada el alcance del invento.

En los compuestos I_A, los grupos amino y el
 grupo guanidilo están bloqueados por la misma beta-diceto-
 na Z-COCH₂CO-R. Para obtener compuestos del mismo tipo,
 10 que comprenden un bloqueo de los grupos amino por una be-
 ta-dicetona X-COCH₂CO-Y diferente de la beta-dicetona
 Z-COCH₂CO-R que bloquea el grupo guanidilo, se efectúa
 una hidrólisis ácida cuidadosa del compuesto I_A, preferen-
 temente en presencia de fenol o de uno de sus derivados
 15 sustituidos y después se hace reaccionar en medio débil-
 mente ácido o débilmente básico, la sal de / N⁶ -(Z-4 R-6
 pirimidinil-2) ornitina B₂₂/-insulina resultante, IV, con
 una beta-dicetona X-COCH₂CO-Y.

La hidrólisis cuidadosa de la sal de la tris-
 20 oxoenammina de la / N⁶ -pirimidil ornitina B₂₂/-insulina
 I_A para obtener IV, se efectúa de modo cómodo con una so-
 lución que contiene 75% de fenol y 25% de solución acuosa
 0,1 N de ácido clorhídrico. En estas condiciones, la hi-
 drólisis de los grupos oxoamínicos está completa, en ge-
 25 neral, en algunas horas a 20-25°C y el bloqueo del grupo
 guanidilo permanece sin atacar.

Prácticamente, según una variante indicada
 más adelante, se puede obtener en una sola operación el
 compuesto IV, por hidrólisis directa con disociación si-
 multánea del compuesto III, con una solución de fenol, en

30
 12.12.69.

31 DIC.



ácido clorhídrico 0,1 N (75-25), a pH = 1-2 en algunas horas a 20-25°C.

Si el grado de cenizas sulfúricas de la sal alcalina de la tris-oxoenamina de la /N^δ-pirimidinil-ornitina B₂₂/-insulina disociada I_A pasa de 10%, se procede primeramente a una eliminación de las sales minerales por disolución en agua, y por precipitación en el punto isoelectrico a pH = 5,3, seguido de lavados con agua. El precipitado húmedo es hidrolizado con la mezcla de fenol y de solución acuosa de ácido clorhídrico.

Las sales de /N^δ-pirimidinil-ornitina B₂₂/-insulina, IV, pueden ser transformadas fácilmente en sales solubles en agua de bases minerales u orgánicas, especialmente en sales de metales alcalinos tales como la sal de potasio. Para preparar la sal de potasio, por ejemplo, se neutraliza con potasa a pH = 5,2 en el punto isoelectrico, el clorhidrato de /N^δ-pirimidinil-ornitina B₂₂/-insulina, disuelto en agua, se separa la /N^δ-pirimidinil-ornitina B₂₂/-insulina libre por centrifugación, se la trata con una solución de fenol-agua-solución acuosa 1 N de potasa (75-20-5) y se aísla, por precipitación con acetona, la sal de potasio resultante. Las otras sales solubles de /N^δ-pirimidinil-ornitina B₂₂/-insulinas son preparadas de una manera análoga. Después de precipitación a pH = 5,2 y de lavado, se puede obtener además la /N^δ-pirimidinil-ornitina B₂₂/-insulina libre, no salificada, por centrifugación y después secado.

Lo mismo que la /N^δ-pirimidinil-ornitina B₂₂/-insulina libre, las sales solubles de bases minerales u orgánicas y especialmente las sales de metales alca

30
12.12.69.



linos de las N^{δ} -pirimidinil-ornitina B_{22} -insulinas pueden ser condensadas con la beta-dicetona $X-COCH_2CO-Y$ para proporcionar las tris-oxoenaminas de N^{δ} -pirimidinil-ornitina B_{22} -insulina, V.

5 La condensación de la beta-dicetona $X-COCH_2CO-Y$ con la sal de N^{δ} -pirimidinil-ornitina B_{22} -insulina, IV, se efectúa en medio acuoso, homogéneo o heterogéneo, débilmente ácido o débilmente básico, en presencia de una pequeña cantidad de alcohol.

10 En el caso de la condensación de las sales de N^{δ} -(dimetil-4,6-pirimidinil-2) ornitina B_{22} -insulina con la metil-5-hexanodiona-2,4, por ejemplo, se trabaja a un pH próximo a 8. Para esto, se disuelve una sal tal como el clorhidrato de N^{δ} -(dimetil-4,6 pirimidinil-2) ornitina B_{22} -insulina en una solución acuosa que contiene metil-5 hexanodiona-2,4, etanol y la cantidad de bicarbonato de potasio necesaria para llevar la mezcla a pH = 8. Después de 7 días de agitación a 20°C, la condensación está completa. La sal de potasio de la tris- N^{A1} , N^{B1} , N^{C29} -(metil-5 oxo-4 hexen-2 il-2) N^{δ} -(dimetil-4,6 pirimidinil-2) ornitina B_{22} -insulina resultante es a continuación fácilmente aislada por liofilización después de eliminación de las sales minerales por diálisis.

15

20

25 En el caso de la condensación de las sales de N^{δ} -(dimetil-4,6-pirimidinil-2) ornitina B_{22} -insulina con la ciclohexanodiona-1,3, por el contrario, se trabaja a pH = 6, siendo en este caso la velocidad de reacción mucho más grande a este pH que a pH = 8. Una sal tal como el clorhidrato de N^{δ} -(dimetil-4,6 pirimidinil-2) ornitina B_{22} -insulina es disuelta en una mezcla ajustada a pH = 6

30

12.12.69.



de solución acuosa de bicarbonato de potasio, de ciclohexano-diona-1,3 y de etanol. Al cabo de 5 días de agitación a 25°C, la condensación está completa. La tris-N^{A1}, N^{B1}, N^{C29}-(oxo-3 ciclohexen-1 il-1)/N^δ-(dimetil-4,6 pirimidinil-2) ornitina B₂₂'-insulina precipita espontáneamente y se aísla del medio de reacción por centrifugación.

De una manera general, el margen de pH comprendida entre 5,5 y 8,5 es conveniente para efectuar la condensación de la sal de pirimidinil insulina y de la beta-dicetona X-COCH₂CO-Y. Si el pH es demasiado bajo, por debajo del punto isoelectrico, los grupos oxoaminicos ya no son estables, y si el pH es demasiado elevado se corre el riesgo de una alteración irreversible de las proteínas.

La tris-oxoamino /N^δ-pirimidinil-ornitina B₂₂'-insulina resultante obtenida al estado de agregados moleculares más o menos asociados según el medio de reacción, V, es disociada a continuación por acción del fenol o de uno de sus derivados sustituidos, en presencia de un hidróxido alcalino a un pH próximo a 8, y se obtiene la sal alcalina de la tris-N^{A1}, N^{B1}, N^{C29}-(X-3 oxo-3 Y-1 propen-1 il-1) /N^δ-(Z-4 R-6 pirimidinil-2) ornitina B₂₂'-insulina I_B disociada, soluble en agua, y que lleva sustituyentes X e Y diferentes de los sustituyentes Z o R.

Esta disociación se efectúa en condiciones análogas a las descritas precedentemente para las tris-oxoaminas de las /N^δ-pirimidinil-ornitina B₂₂'-insulinas, III.

Las sales alcalinas de las tris-oxoaminas de las /N^δ-pirimidinil-ornitina B₂₂'-insulinas heterosustituidas I_B así como las sales alcalinas de las tris-oxo

31010-303

naminas de las /N^δ-pirimidinil-ornitina B₂₂/-insulinas
homosustituídas I_A pueden ser transformadas, según los
métodos usuales, en sales de bases orgánicas o minerales
diferentes de las sales de metales alcalinos, o en protei
5 nas libres, no salificadas.

Así es como las sales de metales alcalinos
I_B o I_A son transformadas en proteínas libres disociadas,
no salificadas, correspondientes, por precipitación en el
punto isoelectrico a un pH próximo a 5,2, aisladamente,
10 por filtración con succión o centrifugación del precipita
do formado y por secado. Las proteínas libres así obteni
das correspondientes a las sales I_B o I_A pueden ser trans
formadas entonces en sales solubles en agua de bases mine
rales u orgánicas diferentes de las sales alcalinas, por
15 adición de la base mineral u orgánica deseada a una sus
pensión acuosa de la proteína libre disociada y después
por precipitación de la sal soluble de tris-oxoenamina de
/N^δ-pirimidinil-ornitina B₂₂/-insulina resultante por
adición de un disolvente insolubilizador tal como acetona.

Las sales solubles de las tris-oxoenaminas de
las /N^δ-pirimidinil-ornitina B₂₂/-insulina, I_B, que exis
ten al estado disociado o débilmente asociado, están cons
tituídas verosimilmente como las sales solubles de I_A,
por la asociación de algunas moléculas fundamentales o
25 bien incluso por una única molécula libre, no asociada.
Las proteínas libres que corresponden a I_B o a I_A, es de
cir las tris-N^{A1}, N^{B1}, N^{B29}-(X-3 oxo-3 Y-1 propen-1 il-1)
/N^δ-(Z-4 R-6 pirimidinil-2) ornitina B₂₂/-insulinas o
las tris-N^{A1}, N^{B1}, N^{B29}-(Z-3 oxo-3 R-1 propen-1 il-1)/
30 N^δ-(Z-4 R-6 pirimidinil-2) ornitina B₂₂/insulinas, están

12.12.69.



constituidas por agregados moleculares de igual modo débilmente asociados pero que existen verosimilmente, en un estado de agregación superior al de las sales solubles I_B y I_A . No obstante, estas proteínas libres no están asociadas en el mismo grado que las sales alcalinas de las tris-oxoenaminas de las N^{δ} -pirimidinil-ornitina B_{22} -insulinas, III, dado que por adición de un hidróxido alcalino se obtiene con facilidad su solubilización en medio acuoso bajo forma de sal alcalina tal como con la insulina natural, mientras que las tris-oxoenaminas de las N^{δ} -pirimidinil-ornitina B_{22} -insulinas, III, se resisten a la solubilización con las bases hasta pH = 10 aproximadamente.

Bien entendido, estas consideraciones sobre el grado exacto de asociación de las sales de las trienamino tris-oxoenaminas N^{δ} -pirimidinil-ornitina B_{22} -insulinas I_B o I_A , así como de las proteínas libres correspondientes, no limitan en nada el alcance del invento.

Tal como ya se ha señalado, el conjunto de las sales de tris-oxoenaminas de N^{δ} -pirimidinil-ornitina B_{22} -insulinas hetero-sustituídas I_B , para las cuales X es diferente de Z, e Y es diferente a R, y para las sales de tris-oxoenaminas de N^{δ} -pirimidinil-ornitina B_{22} -insulinas homosustituídas, I_A , para las cuales X es igual a Z e Y es igual a R, es equivalente, bien entendido, a las sales de las tris-oxoenaminas de N^{δ} -pirimidinil-ornitina B_{22} -insulinas, I, tal como se definen al comienzo del invento, y para las cuales X y Z e Y y R pueden ser idénticos o diferentes. Es únicamente por una razón de comodidad en la exposición que se ha efectuado tal distinción.

12.12.69.



Según una variante del procedimiento precedentemente descrito, variante que constituye igualmente parte del invento, se trata la sal alcalina de la tris- N^{A1} , N^{B1} , N^{B29} -(Z-3 oxo-3 R-1 propen-1 il-1) / N^{δ} -(Z-4, R-6 pirimidinil-2) ornitina B_{22} /-insulina que existe bajo forma de agregados moleculares fuertemente asociados, III, con un ácido en solución acuosa, en presencia de fenol o de uno de sus derivados sustituidos, para obtener directamente la sal correspondiente de N^{δ} -(Z-4 R-6 pirimidinil-2) ornitina B_{22} /-insulina, al estado disociado o débilmente asociado, solubles en agua, IV.

El fenol o su derivado sustituido, en cuya presencia se trabaja, permite la disociación de las tris-oxoaminas de las / N^{δ} -pirimidinil-ornitina B_{22} /-insulinas fuertemente asociadas, III, en compuestos solubles en agua y una hidrólisis simultánea de los grupos oxoaminicos. Se realiza de esta manera, en una única etapa sin aislamiento intermedio de las tris-oxoaminas de las / N^{δ} -pirimidinil-ornitina B_{22} /-insulinas solubles, I_A , la misma sucesión de reacción que en el procedimiento expuesto precedentemente para obtener, IV.

La reacción se efectúa cómodamente con ayuda de una mezcla de fenol y de solución acuosa 0,1 N de ácido clorhídrico (75-25). La sal de / N^{δ} -pirimidinil-ornitina B_{22} /-insulina IV, es precipitada a continuación por adición de un disolvente orgánico tal como la acetona. En estas condiciones, por ejemplo, la sal de potasio de la tris- N^{A1} , N^{B1} , N^{B29} -(oxo-4 penten-2 il-2) / N^{δ} -(dimetil-4,6 pirimidinil-2) ornitina B_{22} /-insulina es transformada en clorhidrato de / N^{δ} -dimetil-4,6 pirimidinil-2) orniti-

30
12.12.69.

374280



na B₂₂/-insulina disociado, soluble, después de 3 horas de agitación a 20-25°C.

El procedimiento que se acaba de describir, según el cual la condensación de la insulina y de las beta-dicetonas Z-COCH₂CO-R se efectúa en medio homogéneo, conduce a la obtención de productos, I_A, que contienen una pequeña cantidad de impurezas susceptible de ser descubierta por análisis cromatográfico. Estas impurezas, las cuales en cromatografía sobre papel, con ayuda de una mezcla de butanol-ácido acético-agua (4-1-5) por impregnación con la fase inferior y revelado con azul de bromofenol, son mucho menos móviles que las tris-oxoaminas de /N^δ-pirimidinil-ornitina B₂₂/-insulinas disociadas solubles, I_A, y están constituidas verosimilmente por proteínas irreversiblemente desnaturalizadas.

El invento tiene igualmente como objeto una variante del procedimiento de preparación de los compuestos I_A o I_B, que evita la formación de estas impurezas. Esta variante ilustrada por el esquema número 2 anejo está caracterizado esencialmente por que se hace reaccionar la insulina, II, por agitación en medio acuoso heterogéneo que comprende dos fases no miscibles, con un pH débilmente alcalino, en presencia de fenol o de uno de sus derivados sustituidos, con una beta-dicetona Z-COCH₂CO-R, para obtener en una primera etapa de reacción una mezcla de sal alcalina de tris-N^{A1}, N^{B1}, N^{ξB29}-(Z-3 oxo-3 R-1 propen-1 il-1)-insulina, VI, y de sal alcalina de tris-N^{A1}, N^{B1}, N^{ξB29}-(Z-3 oxo-3 R-1 propen-1 il-1) /N^δ-(Z-4 R-6 pirimidinil-2) ornitina B₂₂/-insulina, III, mezcla que existe al estado de agregados moleculares fuertemente asociados,

12.12.69.



insolubles en agua, se somete a dicha mezcla de VI y de III, con un pH próximo a 8, a la acción disociante del fenol o de uno de sus derivados sustituidos para obtener una mezcla de sal alcalina de tris- N^{A1} , N^{B1} , N^{B29} -(Z-3 oxo-3 R-1 propen-1 il-1)-insulina, VII, y de sal alcalina de tris- N^{A1} , N^{B1} , N^{B29} -(Z-3 oxo-3 R-1 propen-1 il-1) / N^{δ} -(Z-4, R-6 pirimidinil-2) ornitina B_{22} /insulina, I_A , mezcla que existe bajo forma disociada o débilmente asociada, soluble en agua, y después se hace actuar sobre dicha mezcla de los compuestos VII y I_A , en una segunda etapa de reacción, en condiciones idénticas a las de la primera etapa, en medio débilmente alcalino, la beta-dicetona-Z-COCH₂CO-R para obtener una sal alcalina de tris- N^{A1} , N^{B1} , N^{B29} -(Z-3 oxo-3 R-1 propen-1 il-1) / N^{δ} -(Z-4 R-5 pirimidinil-2) ornitina B_{22} -insulina, III, llevada de nuevo al estado de agregados moleculares fuertemente asociados, insolubles en el medio de reacción o en agua entre pH = 1 y pH = 10.

La acción disociante del fenol o de uno de sus derivados sustituidos sobre los compuestos III fuertemente asociados, conduce entonces a sales alcalinas de tris-oxoenaminas de N^{δ} -pirimidino-ornitina B_{22} -insulinas disociadas, I_A , para las cuales el análisis cromatográfico no descubre ya ninguna impureza.

Según un modo de ejecución actualmente preferido, esta variante del procedimiento del invento puede ser caracterizada por los puntos enunciados a continuación.

La condensación de la insulina II con la beta-dicetona se efectúa en medio acuoso heterogéneo en presencia.



5 cia de un alcohol tal como etanol. La basicidad del medio es asegurada por adición bien sea de una mezcla tampón conveniente tal como una mezcla de fosfato dialcalino y de fosfato monoalcalino, bien sea preferentemente de un bicarbonato alcalino tal como bicarbonato de potasio.

10 La insulina introducida en el medio de reacción heterogéneo (agua, fenol, beta-dicetona, disolvente, bicarbonato alcalino), reacciona por una parte con rapidez y casi totalmente al nivel de los grupos aminicos para formar tres grupos oxoenamínicos, y por otra parte con una velocidad considerablemente más lenta sobre el grupo guanidilo del radical de arginina, formando un precipitado mixto de tris-oxoenamina de insulina, VI, y de tris-oxoenamina de N^6 -pirimidinil-ornitina B_{22} -insulina, III, bajo forma de agregados moleculares insolubles en el medio de reacción o en agua entre $\text{pH} = 1$ y $\text{pH} = 10$.

En el caso en que se hace reaccionar la acetilacetona con la insulina, por ejemplo, la condensación se puede efectuar en las mezclas siguientes:

20

Insulina	bicarbonato de potasio	agua	acetilacetona	fenol	etanol
1 a 2 %	3 a 6 %	28 %	24 %	24 %	18 %
1 a 2 %	3 a 6 %	28 %	28 %	28 %	9 %

25

En estas mezclas que proporcionan resultados satisfactorios pero que evidentemente no tienen ningún carácter limitativo, las proporciones relativas de fenol y de alcohol son tales que aseguran una insolubilidad precoz y total del precipitado mixto de tris-oxoenamina de insuli

30
12.12.69.




na VI, y de tris-oxoenamina de N^{δ} -pirimidinil-ornitina B_{22} /-insulina, III.

5 La tris-oxoenamina de la insulina VI y la tris-oxoenamina de la N^{δ} -pirimidinil-ornitina B_{22} /-insulina, III, existen al estado de sales alcalinas. En general, no obstante, su concentración en metal alcalino es inferior a la teoría (6 átomos de metal alcalino por molécula) no siendo total la salificación de los 6 grupos carboxilo a pH = 8 en la mezcla de reacción.

10 La estructura exacta del precipitado mixto de tris-oxoenamina de insulina VI, y de tris-oxoenamina de N^{δ} -pirimidinil-ornitina B_{22} /insulina III, no es conocida con certidumbre. En efecto, se ignora si existen separadamente agregados moleculares de III y agregados moleculares de VI o bien agregados mixtos de III y de VI. De
15 cualquier manera, el precipitado mixto obtenido está constituido por una mezcla de tris-oxoenamina de insulina y de tris-oxoenamina de N^{δ} -pirimidinil-ornitina B_{22} /-insulina, formando el conjunto un precipitado insoluble en
20 agua.

Por efectuarse en fase heterogénea la condensación de la insulina y de la beta-dicetona, se necesita una buena agitación del medio de reacción; una agitación en un mezclador rotativo a la velocidad de 200 a 300 vuel
25 tas por minuto proporciona resultados satisfactorios.

Si se utilizan proporciones de fenol/alcohol de 10/35 (fase única) o a la inversa de 50/5, la solubilidad del precipitado mixto en el medio es más importante y la velocidad de reacción es más grande, pero se comprue
30 ba en los dos casos que la tris-oxoenamina de la N^{δ} -pi-
12.12.69.

310 

rimidinil-ornitina B₂₂/-insulina I_A, resultante finalmente obtenida, está alterada parcialmente. La proporción fenol/alcohol está fijada por lo tanto dentro de límites bastante estrechos si se desea obtener productos exentos de cualquier alteración.

Como en medio homogéneo, la temperatura óptima de reacción se sitúa en las proximidades de 20-25°C. A esta temperatura, la velocidad de reacción con el grupo guanidilo no es grande. En el caso de la acetilacetona, al cabo de 20 horas de agitación de la mezcla heterogénea queda todavía 30% aproximadamente de grupos guanidilo libre.

No obstante, el empleo de una temperatura superior o de mezclas de reacción más solubilizantes para mejorar la velocidad de reacción, conduce a una alteración de los compuestos formados.

Para bloquear el 30% de grupos guanidilo libres, evitando cualquier alteración, no se busca acelerar la velocidad de reacción sino que se procede a la disociación de los agregados moleculares fuertemente condensados de la sal alcalina de la tris-oxoenamina de la insulina VI, y de la sal alcalina de la tris-oxoenamina de la /N^δ-pirimidinil-ornitina B₂₂/-insulina III, por acción, en medio débilmente alcalino, del fenol o de uno de sus derivados sustituidos, y después se procede a realizar una segunda etapa de reacción en condiciones idénticas a las de la primera etapa.

Para realizar prácticamente esta disociación se utiliza de modo cómodo una mezcla de fenol y de agua (75-3). La mezcla de sal alcalina de tris-oxoenamina de

30
12.12.69.



insulina, VI, y de sal alcalina de tris-oxoenamina de δ -pirimidinil-ornitina B₂₂/-insulina III, es introducida en la solución acuosa de fenol alcalinizada a pH = 8 con un bicarbonato alcalino tal como bicarbonato de potasio. Se añade entonces un exceso de bicarbonato alcalino y se agita durante 10 minutos aproximadamente. La condensación ulterior con la beta-dicetona Z-COCH₂CO-R se efectuará seguidamente de modo directo sobre la solución fenólica bicarbonatada precedente, sin aislamiento intermedio en las mismas condiciones que para la primera etapa de la reacción. La mezcla de tris-oxoenamina de insulina, VII, y de tris-oxoenamina de δ -pirimidinil-ornitina B₂₂/-insulina, I_A obtenida, existe al estado de sal alcalina pero la salificación de los seis grupos carboxilo no es total a pH = 8 y la concentración en metal alcalino de los compuestos I_A y VII es en general inferior a la teórica (6 átomos de metal alcalino por molécula). Para alcanzar el cierre de ciclo pirimidínico se hace reaccionar la beta-dicetona con la mezcla de sales alcalinas de tris-oxoenamina de insulina disociada soluble, VII, y de tris-oxoenamina de δ -pirimidinil-ornitina B₂₂/-insulina, disociada, soluble, I_A, en medio acuoso heterogéneo débilmente alcalino, y en presencia de un disolvente tal como un alcohol. Como agente alcalino, se utiliza preferentemente un bicarbonato tal como bicarbonato de potasio. En el caso de la acetilacetona, el cierre de ciclo pirimidínico está terminado en 4 a 5 días a 20-25°C. Las duraciones de las dos etapas de reacción para un cierre de ciclo pirimidínico total son, por ejemplo, los siguientes: 1ª etapa: 15 días; 2ª etapa: 5 días, o 1ª etapa: 10 días; segun

12.12.69:



da etapa: 10 días.

Se obtiene así la sal alcalina de tris-oxoena-
mina de /N^δ-pirimidinil-ornitina B₂₂/-insulina que exis-
te al estado de agregados moleculares fuertemente asocia-
dos, III, que ulteriormente es transformada según el pro-
cedimiento principal más arriba descrito. Las tris-oxoena-
minas de /N^δ-pirimidinil-ornitina B₂₂/-insulinas disocia-
das, solubles, I_A, obtenidas a continuación por disocia-
ción con fenol no contienen, no obstante, ninguna impureza
susceptible de ser descubierta por análisis cromatográfi-
co.

Los ejemplos siguientes ilustran el invento
pero sin limitarlo.

Ejemplo nº 1: Sal de potasio de la tris-N^{A1},
N^{B1}, N^{B29}-(oxo-4 penten-2 il-2) /N^δ-(dimetil-4,6 pirimi-
dinil-2) ornitina B₂₂/-insulina al estado de agregados mo-
leculares débilmente condensados, solubles en agua, I_A,
con R = Z = CH₃ por reacción en medio homogéneo.

Etapa A: Sal de potasio de la tris-N^{A1}, N^{B1},
N^{B29}-(oxo-4 penten-2 il-2) /N^δ-(dimetil-4,6 pirimidinil-
2) ornitina B₂₂/-insulina al estado de agregados molecula-
res fuertemente asociados, insolubles en agua, III, con
R = Z = CH₃

Se disuelven 12 g de insulina en 480 cm³ de
una solución acuosa de bicarbonato de potasio al 7%. Se
añaden 300 cm³ de acetilacetona y 360 cm³ de alcohol de
95%. Bajo agitación en atmósfera inerte y al abrigo de la
luz durante 20 días a 25°C se lleva a pH 8,3. Aparece un
precipitado que se separa por centrifugación. Se lava es-
te precipitado con agua, después con acetona y con éter.

12.12.69.



Se seca bajo vacío a la temperatura ambiente. Se recogen de esta manera 7,73 g de sal de potasio de tris-N^{A1}, N^{B1}, N^{B29}-(oxo-4 penten-2 il-2) / N^D -(dimetil-4,6 pirimidinil-2) ornitina B₂₂/-insulina al estado de agregados moleculares fuertemente asociados, que se presenta bajo forma de un polvo incoloro, insoluble en agua, en ácido acético y en ácido clorhídrico diluido, parcialmente soluble en amoníaco 0,1 N, soluble en solución sódica o potásica a pH = 12 aproximadamente.

10 En cromatografía sobre papel, la movilidad del producto en diferentes sistemas de disolventes, en medio ácido o básico, es nula.

En cromatografía en capa delgada sobre celulosa y gel de sílice, la movilidad del producto es nula.

15 El producto, bajo forma fuertemente asociada está caracterizado igualmente por su absorción dicróica. La curva de dicroismo circular presenta un máximo positivo a 303 mμ y no presenta máximo negativo a 222 mμ.

20 Dicroismo circular. (En solución acuosa de NaCl 0,15M reajustada a 0,003N con NaOH 0,1 N)

ΔE	$\frac{1\%}{1\text{ cm}}$	$\times 10^3$	a 303 mμ	= +15,9
			a 216 mμ	= -435
			a 210 mμ	= -466
			a 195 mμ	= +394

25 Análisis: C₂₇₄H₃₉₃O₇₈N₆₅S₆K₆ = 6.282, 531
 Cenizas sulfúricas: 5,9-6,2% (teoría: 8,35%, para 6 K).
 Solvatación a 100°C bajo vacío: 4,9 %
 Guanidina libre: < 6,7% (valoración colorimétrica por la reacción de Sakaguchi. La cromatografía bi-dimensional so-

30
12.12.69.



bre papel o sobre capa delgada del producto hidrolizado clorhídrico (ácido clorhídrico 6 N, 24 horas a 100°C) muestra la ausencia de arginina (cantidad inferior a 5% de la teoría) y la presencia de hidroxil-2 dimetil-4,6 pirimidina que resulta de la hidrólisis de la función dimetil-4,6 pirimidinil-2 sobre el nitrógeno N^δ-ornitina B₂₂.

Acetilacetona ácido-liberable: 3,8% (o sea 2,24 moles/mol) (valoración colorimétrica con ortofenilendiamina a 500 mμ después de hidrólisis con ácido clorhídrico 2 N, en tubo cerrado a la lámpara a 100°C durante 20 minutos). Las valoraciones de acetilacetona ácido-liberable proporcionan valores más pequeños que los valores teóricos a causa de la dificultad de liberar completamente la acetilacetona sin destruirla parcialmente.

Zinc: 0,30% (por polarografía)

Espectro U.V. (en solución acuosa NaCl 0,15 M NaOH 0,003 N).

	Inflexión hacia 240 mμ	E 1 %	= 78
		1 cm	
20	máximo a 309 mμ	E 1 %	= 91
		1 cm	

Por lo que se sabe, este compuesto no está descrito en la bibliografía.

Etapa B: sal de potasio de la tris-N^{A1}, N^{B1}, N^{B29}-(oxo-4 penten-2 il-2) / N^δ-(dimetil-4,6 pirimidinil-2) ornitina B₂₂/-insulina al estado disociado o débilmente asociado, soluble en agua.

En 350 cm³ de una solución de fenol-agua-potasa 1 N, (75-20-5) a pH = 8, se introducen a 20°C, bajo agitación y en atmósfera inerte, 7 g del compuesto obtenido

30
12.12.69.



903

en la etapa A del ejemplo número 1, trabajando al abrigo de la luz; se continúa la agitación durante 10 minutos y se vierte la mezcla de reacción en 3 litros de acetona a 20°C. Se deja decantar durante 15 minutos al abrigo de la luz, se elimina el máximo de líquido sobrenadante; el resto de la suspensión es centrifugado; se lava el precipitado con acetona y después con éter y se seca con una corriente de argón, y después bajo vacío durante una noche, a la temperatura ambiente; se recogen 6,80 g de producto bruto que se lava con acetona, después con éter y después se seca; se obtienen 6,38 g de sal de potasio de tris-N^{A1}, N^{B1}, N^{B29}-(oxo-4 penten-2 il-2) /N^d-(dimetil-4,6 pirimidinil-2) ornitina B₂₂/-insulina, al estado de agregados moleculares débilmente asociados, soluble en agua (rendimiento: 91%).

Análisis:

Pérdida bajo vacío a 100°C: 4,6%. Cenizas sulfúricas: 9,6-9,9% (teoría: 8,35% para 6 átomos de K).

Guanidina libre: 3%.

Acetilacetona ácido-liberable: 4,25% (2,9 moles/mol, teniendo en cuenta la solvatación).

Zinc: 0,27% (valoración polarográfica)

Espectro: U.V.

En solución acuosa NaCl 0,15 M:

25	Inflexión hacia 279 mμ	E	1 %	= 29
			1 cm	
	Inflexión hacia 285 mμ			= 36
	Máximo a 311 mμ			= 86

En solución acuosa NaCl 0,15 M NaOH 0,1 N c.s. para tener 0,003 N.

12.12.69.

374280



Máximo a 239 m μ E 1 % = 104
 máximo a 309 m μ 1 cm = 91

Dicroísmo circular. (En solución acuosa NaCl 0,15 M).

5 ΔE 1 % x 10³
 1 cm a 222 m μ = -166
 a 210-209 m μ = -246
 a 195-193 m μ = +426

Aspecto característico de una configuración parcialmente helicoidal como la insulina.

10 Cromatografía sobre papel impregnado con ácido acético al 10% o de la fase inferior de la mezcla siguiente: n-butanol-ácido acético-agua (4-1-5), sirviendo la fase superior como disolvente de migración. Se revela con azul de bromofenol y se observa un Rf. igual al de la insulina. Se comprueba la presencia de vestigios de impurezas Rf= 0, que resultan de una ligera desnaturalización irreversible de la insulina.

15 La cromatografía bidimensional sobre papel del producto hidrolizado clorhídrico (ácido clorhídrico 6 N, 24 horas a 100°C) muestra la presencia de todos los ácidos amínicos de la insulina salvo la arginina, la presencia de hidroxí-2-dimetil-4,6-pirimidina.

Por lo que se sabe, este compuesto no está descrito en la bibliografía.

25 Ejemplo número 2: Sal de potasio de la tris-N^{A1}, N^{B1}, N^{B29}-(oxo-4 penten-2 il-2) / N^B-(dimetil-4,6 pirimidinil-2) ornitina B₂₂/-insulina al estado de agregados moleculares débilmente asociados, soluble en agua, I_A, con R = Z = CH₃ por reacción en fase heterogénea.

30 Etapa A: (1ª etapa) Mezcla de sal de potasio de tris-N^{A1}, N^{B1}, N^{B29}-(oxo-4 penten-2 il-2)-insulina, VI,
 12.12.69.



con $R = Z = CH_3$ y de sal de potasio de tris- N^{A1} , N^{B1} , N^{B29} -(oxo-4 penten-2 il-2) / N^{δ} -(dimetil-4,6 pirimidinil-2) ornitina B_{22} /-insulina, III, con $R = Z = CH_3$, al estado de agregados moleculares fuertemente asociados, insoluble en agua.

5

Se introducen 2,5 g de insulina en una mezcla de dos fases no miscibles, compuestas por: 12,5 g de bicarbonato de potasio, 75 cm³ de agua, 75 cm³ de acetilacetona, 75 cm³ de fenol y 25 cm³ de alcohol de 95%, bajo agitación, en atmósfera inerte y al abrigo de la luz; el pH es de 8,6; se continúa la agitación durante 15 días a 25°C; al cabo de este tiempo, el pH permanece invariable, se centrifuga la emulsión obtenida, se elimina el líquido sobrenadante y se tritura el residuo de centrifugación con la espátula; se elimina de nuevo el líquido sobrenadante, se añade agua al precipitado para disgregarlo, se centrifuga durante 10 minutos, a + 20°C, se elimina el líquido sobrenadante; se lava el precipitado con agua por trituración y se centrifuga de nuevo.

10

15

20

Se obtiene así una mezcla de sal de potasio de tris- N^{A1} , N^{B1} , N^{B29} -(oxo-4 penten-2 il-2)-insulina y de sal de potasio de tris- N^{A1} , N^{B1} , N^{B29} -(oxo-4 penten-2 il-2) / N^{δ} -(dimetil-4,6 pirimidinil-2) ornitina B_{22} /-insulina al estado de agregados moleculares fuertemente asociados, insolubles en agua, que se pueden aislar y secar.

25

Etapa B: (disociación). mezcla de sal de potasio de tris- N^{A1} , N^{B1} , N^{B29} -(oxo-4 penten-2 il-2)-insulina, VII, con $R = Z = CH_3$ y de sal de potasio de tris- N^{A1} , N^{B1} , N^{B29} -(oxo-4 penten-2 il-2) / N^{δ} -(dimetil-4,6 pirimidinil-2) ornitina B_{22} /-insulina, I_A con $Z = R = CH_3$ al estado diso-

30
12.12.69.

374280



ciado o débilmente asociado, soluble en agua.

Al residuo húmedo obtenido en la etapa A del ejemplo número 2, se añade una solución de 75 cm³ de fenol y de 3 cm³ de agua llevada a + 20°C, y se agita durante 5 minutos en atmósfera inerte y al abrigo de la luz; se obtiene una solución transparente a pH = 7 a la cual se añaden 2,5 g de bicarbonato de potasio y se continúa la agitación durante 10 minutos; el pH es de 8,2; se obtiene así en solución una mezcla de sal de potasio de tris-N^{A1}, N^{B1}, N^{B29}-(oxo-4 penten-2 il-2)-insulina y de sal de potasio de tris-N^{A1}, N^{B1}, N^{B29}-(oxo-4 penten-2 il-2) / N^B-(dimetil-4,6 pirimidinil-2) ornitina B₂₂/-insulina al estado disociado o débilmente asociado, que se puede aislar eventualmente según un método apropiado.

15 Etapa C: (2ª etapa) sal de potasio de la tris-N^{A1}, N^{B1}, N^{B29}-(oxo-4 penten-2 il-2) / N^B-(dimetil-4,6 pirimidinil-2) ornitina B₂₂/insulina al estado de agregados moleculares fuertemente asociados, insolubles en agua, III, con R = Z = CH₃.

20 A la solución obtenida en la Etapa B del ejemplo número 2 se añade, en atmósfera inerte y bajo agitación, una solución de 50 cm³ de agua, 10 g de bicarbonato de potasio, 25 cm³ de alcohol de 95% y 75 cm³ de acetilacetona y se continúa la agitación durante 7 días a 25°C; el pH es entonces de 8,6; se centrifuga, se lava el residuo de centrifugación por trituración en agua y se elimina el líquido sobrenadante; se lava el precipitado con agua, con acetona, después con éter y se seca con una corriente de nitrógeno, y después bajo vacío durante una noche, a la temperatura ambiente; se obtienen 2,37 g de sal de potasio

30
12.12.69.



de tris-N^{A1}, N^{B1}, N^{B29}-(oxo-4 penten-2 il-2) /N^δ-(dime-
 til-4,6 pirimidinil-2) ornitina B₂₂/-insulina, bajo forma
 de agregados moleculares fuertemente asociados, insolubles
 en agua, (rendimiento: 90%).

5 El producto se presenta bajo forma de un pol-
 vo blanco, insoluble en agua y en la mayor parte de los.
 disolventes orgánicos, soluble en sosa 0,1 N a pH = 11-12.
 Valoraciones:

10 Acetilacetona ácido-liberable: 3,9% (o sea 2,3 moles/ mol)
 Guanidina libre: 3,7 %.
 Solvatación: 3,2 %.
 Cenizas sulfúricas: 6,6% (teoría para 6 átomos de potasio:
 8,3%).

Espectro U. V. (en solución acuosa NaCl 0,15 M NaOH 0,003 N)

15 Inflexión hacia 238 mμ E 1 % = 92
 1 cm
 Máximo a 308 mμ E 1 % = 90
 1 cm

Dicroísmo circular: (en solución acuosa NaCl 0,15 M sosa
 0,1 N c.s. para pH = 11)

20 $\Delta E \frac{1\%}{1\text{ cm}} \times 10^3$ a 320 mμ = -39,7
 a 296 mμ = +16,6
 a 216 mμ = -473
 a 195 mμ = +957

25 La curva de dicroísmo no presenta máximo nega-
 tivo a 222 mμ.

Cromatografía sobre papel: revelado con azul de bromofenol.

disolvente: butanol secundario-ácido acético al 10% (1-1).
 Rf = 0

disolvente: n-butanol-ácido acético-agua (4-1-5) fase su-
 perior;

30
 12.12.69.

374280



papel impregnado con la fase inferior, Rf. = 0.

Por lo que se sabe, este compuesto no está descrito en la bibliografía.

5 Etapa D: (disociación) sal de potasio de la tris-N^{A1}, N^{B1}, N^{B29}-(oxo-4 penten-2 il-2) /N^U-(dimetil-4,6 pirimidinil-2) ornitina B₂₂/-insulina al estado disociado o débilmente asociado, soluble en agua.

10 Se introducen 2,30 g de agregados moleculares fuertemente asociados obtenidos en la etapa C del ejemplo número 2, en 156 cm³ de una solución de fenol-agua-solución acuosa 1 N de potasa (75-20-5), de pH = 8; se agita en atmósfera inerte, al abrigo de la luz, a 20°C, durante 15 minutos; se filtra, se añaden 1560 cm³ de acetona bajo agitación y bajo nitrógeno, se deja reposar durante 15 minutos y se elimina al máximo el líquido sobrenadante, se separa el precipitado por centrifugación, se lava con acetona, después con éter, y se seca con una corriente de nitrógeno, y después bajo vacío durante una noche; se obtienen 2,27 g de sal de potasio de tris-N^{A1}, N^{B1}, N^{B29}-(oxo-4 penten-2 il-2) /N^U-(dimetil-4,6 pirimidinil-2) ornitina B₂₂/-insulina, al estado disociado o débilmente asociado, soluble en agua (rendimiento ponderal: 96%). Rendimiento ponderal global: 86% a partir de la insulina.

25 El producto se presenta bajo forma de un polvo blanco, soluble en agua y en el suero fisiológico en concentraciones superiores a 20%, e insoluble en la mayor parte de los disolventes orgánicos usuales.

Análisis:

Solvatación: 6,7%

Guanidina libre: < 3,7%.

30
12.12.69.

374280



Acetilacetona ácido-liberable: 4,1% (2,45 moles/mol)

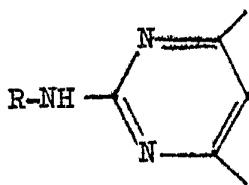
Cenizas sulfúricas: 8-8,2 % (teoría: 8,35 % para 6 átomos de K).

Espectro U. V. (En solución acuosa NaCl 0,15 M NaOH 0,1 N, c.s. para tener 0,003 N).

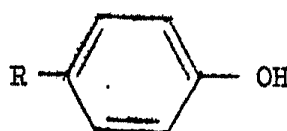
Inflexión hacia 231 mμ E $\frac{1\%}{1\text{ cm}}$ = 108

Máximo a 308 mμ = 87

El espectro U. V. indica la presencia de grupos R-NH-C=C-COCH₃,



y



Dicroísmo circular:

1ª. Solución acuosa NaCl 0,15 M NaOH 0,1 N c.s. para pH = 11,4:

$\Delta E \frac{1\%}{1\text{ cm}} \times 10^3$ a 317 mμ = +3,9
a 218 mμ = -185
a 207 mμ = -473
a 194 mμ = +296

2ª. Solución acuosa NaCl 0,15 M, pH = 8,5.

$\Delta E \frac{1\%}{1\text{ cm}} \times 10^3$ a 262 mμ = -4
a 220 mμ = -205
a 208 mμ = -280
a 195 mμ = +622

La meseta hacia 220 mμ es característica de la

12.12.69.

- 34 - 374280



configuración parcialmente helicoidal comparable a la de la insulina natural.

Por lo que se sabe, este compuesto no está descrito en la bibliografía.

5 Control del bloqueo bajo forma de oxoaminas de los grupos amínicos N^{A1} de la glicina, N^{B1} de la fenilalanina y N^{B29} de la lisina, por la N-dansilación/ B.S. Hartley y V. Massey, Biochim, Biophys, Acta, 21, 58. (1956); W. R. Gray y B. S. Hartley, Biochem. J., 89, 59 P (1963)/.

10 Se trata el derivado I, en solución acuosa bicarbonatada, con el cloruro de dansilo en solución acetonica a 20°C, durante 20 horas, y después se dializa y se concentra hasta sequedad bajo vacío. El residuo es hidrolizado con ácido clorhídrico 6 N, a 100°C durante 17
15 horas.

El producto hidrolizado es cromatografiado sobre placa Merck de gel de sílice. Disolvente: acetato de metilo - isopropanol - amoníaco (45-35-20). Se revela, por fluorescencia en U.V.: presencia de menos de 5% de
20 $N\epsilon$ DNS-lisina, ausencia de N-DNS-glicina y de N-DNS-fenilalanina, mientras que, en el caso de la insulina tratada de la misma manera, se ven aparecer de modo muy neto estos tres derivados.

25 Ejemplo nº 3: Clorhidrato de $N\delta$ -(dimetil-4,6 pirimidinil-2) ornitina B_{22} /-insulina, al estado disociado o débilmente asociado, clorhidrato, IV, con $Z = R = CH_3$, a partir de la tris- N^{A1} , N^{B1} , N^{B29} -(oxo-4 penten-2 il-2) $N\delta$ -(dimetil-4,6 pirimidinil-2) ornitina B_{22} /-insulina, sal de potasio, soluble en agua.

30
12.12.69.

Se disuelven 2,489 g de sal de potasio de la



tris-N^{A1}, N^{B1}, N^{B29}-(oxo-4 penten-2 il-2) /N^δ -(dimetil-
 4,6 pirimidinil-2) ornitina B₂₂/-insulina, obtenida en la
 etapa D del ejemplo número 2, en 30 cm³ de agua; la solu-
 ción está a pH = 9 aproximadamente; se lleva el pH a 5,2
 5 por adición de ácido clorhídrico 1 N, se centrifuga a la
 temperatura ambiente, se elimina el líquido sobrenadante,
 se lava el precipitado con agua y se centrifuga; se añade
 al residuo de centrifugación una solución de 12,1 cm³ de
 agua, 124 cm³ de fenol y 4,1 cm³ de ácido clorhídrico 1 N;
 10 la solución obtenida está a pH = 1 aproximadamente; se
 agita a 25°C, durante 3 horas, se filtra, se añaden 1650
 cm³ de acetona, se centrifuga, se lava el residuo con ace-
 tona, después con éter y se seca con una corriente de ni-
 trógeno, y después bajo vacío durante una noche; se ob-
 15 tienen 2 g de clorhidrato de /N^δ -(dimetil-4,6 pirimidinil
 -2) ornitina B₂₂/-insulina, al estado disociado o débil-
 mente asociado, bajo forma de un polvo incoloro, soluble
 en agua, insoluble en los disolventes orgánicos (rendimien-
 to: >83%).

20 Análisis: C₂₅₉H₃₈₇O₇₅N₆₅S₆Cl₆ = 6016,33
 Cl % : 4,2 (teoría: 3,5%). Pérdida bajo vacío a 100°C: 5,6%.

Espectro U. V.

1º.- Solución acuosa NaCl 0,15 M + NaOH, 0,1 N c.s. para
tener 0,003 N.

25	Max. a 235 mμ	E 1 % = 105 1 cm
	Max. a 292 mμ	E 1 % = 26,2 1 cm

2º.- Solución acuosa ClH 0,1 N después de aproximadamente
 30 15 minutos de contacto a 20°C.

12.12.69.



1969

5 Inflexión hacia 272 - 273 m μ E $\frac{1\%}{1\text{ cm}}$ = 14,6
 Max. a 277 m μ E $\frac{1\%}{1\text{ cm}}$ = 15,8
 Inflexión hacia 283 - 284 m μ E $\frac{1\%}{1\text{ cm}}$ = 13,1
 Max. a 307 - 308 m μ E $\frac{1\%}{1\text{ cm}}$ = 9,4 (después de
 3 horas,
 máximo a 308 m μ E $\frac{1\%}{1\text{ cm}}$ = 9,1 aproximadamente)

10 lo cual muestra la ausencia de función oxoenammina y la presencia de un grupo pirimidinilo por mol.

Dicroísmo circular:

1^o.- En solución acuosa NaCl 0,15 M NaOH 0,003 N. (pH = 10,9)

15 $\Delta E \frac{1\%}{1\text{ cm}} \times 10^3$ a 219 - 220 m μ = -277
 a 206 - 207 m μ = -431
 a 193 m μ = +493

2^o.- En solución acuosa HCl 0,1 N (pH = 2)

20 $\Delta E \frac{1\%}{1\text{ cm}} \times 10^3$ a 272 m μ = -4,98
 a 220 m μ = -204
 a 208 m μ = -261
 a 195 m μ = +535

Por lo que se sabe, este compuesto no está descrito en la bibliografía.

25 Ejemplo n^o 4. Clorhidrato de N ^{δ} -(dimetil-4,6 pirimidinil-2) ornitina B₂₂/-insulina al estado disociado o débilmente asociado, IV; con Z = R = CH₃, a partir de sal de potasio de tris-N^{A1}, N^{B1}, N^{B29}-(oxo-4 penten-2 il-2) N ^{δ} -(dimetil-4,6 pirimidinil-2) ornitina B₂₂/-insulina al estado de agregados moleculares fuertemente asociados, in-

30 12.12.69.

solubles en agua.

Se disuelven 600 mg de sal de potasio de la tris-N^{A1}, N^{B1}, N^(B29)-(oxo-4 penten-2 il-2) /N^δ -(dimetil-4,6 pirimidinil-2) ornitina B₂₂/-insulina fuertemente asociada, obtenida en la etapa C del Ejemplo núm. 2, en 40 cm³ de una solución de fenol-ácido clorhídrico 0,1 N (75-25) de pH = 0,5; se lleva la solución a pH = 2 por adición de ácido clorhídrico 1 N, se purga bajo atmósfera inerte y se agita durante 3 horas a 25°C; se filtra, se añaden 400 cm³ de acetona, se deja al precipitado depositarse durante 15 minutos, se elimina el máximo del líquido sobrenadante y se centrifuga; se lava el precipitado con acetona, después con éter y se seca con una corriente de nitrógeno, y después bajo vacío a la temperatura ambiente; se obtienen 547 mg de clorhidrato de /N^δ -(dimetil-4,6 pirimidinil-2) ornitina B₂₂/-insulina al estado disociado o débilmente asociado, bajo forma de un polvo incoloro, soluble en agua, insoluble en los disolventes orgánicos (rendimiento ponderal: 91%).

Análisis: C₂₅₉H₃₈₇O₇₅N₆₅S₆Cl₆ = 6 016,33
 Calculado: C % 51,8 H % 6,5 Cl % 3,5
 Encontrado: 51,9 ... 6,8 4,1
 Pérdida bajo vacío: a 100°C: 4,8%.

Dicroísmo circular: (en solución acuosa NaCl 0,15 M NaOH 0,1 N, c.s. para tener 0,003 N).

ΔE	$\frac{1\%}{1\text{ cm}} \times 10^3$	a 222 mμ	= -174
		a 207 - 208 mμ	= -378
		a 194 mμ	= +435

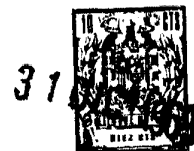
30
12.12.69.

El máximo negativo a 222 mμ caracteriza la

configuración parcialmente helicoidal como en la insulina.

Espectro U. V. (en ClH 0,1 N)

	Inflexión hacia 271 m μ	E 1 %	= 13,8
	Máximo a 275 m μ	1 cm	= 15,4
5	Inflexión hacia 282 m μ		= 12,6
	Máximo a 306 m μ		= 8,4



Espectro U.V. (En solución acuosa NaCl 0,15 M NaOH 0,1 N c.s. para tener 0,003 N).

	Max. a 234 m μ	E 1 %	= 99
10	Max. a 293 - 294 m μ	1 cm	= 25,9

Cromatografía sobre papel:

- 19.- Con disolvente: n-butanol-ácido acético - agua (4-1-5) (fase superior). Impregnación del papel con la fase inferior. Rf casi idéntico al de la insulina.
- 15 20.- Con disolvente: Butanol secundario - ácido acético al 10% (1-1). Impregnación del papel con ácido acético al 10%. Rf. ligeramente inferior al de la insulina.

20 Ejemplo número 5. Sal de potasio de la N⁶-(dimetil-4,6 pirimidinil-2) ornitina B₂₂/-insulina, soluble en agua.

Se disuelven 300 mg del clorhidrato obtenido en el Ejemplo número 3, en 30 cm³ de agua; el pH de la solución es de 2,66; se lleva el pH a 5,2, por adición de 1,5 cm³ de sosa 0,1 N, bajo agitación y bajo atmósfera inerte, a 20°C. Se centrifuga durante 3 minutos, se elimina el líquido sobrenadante, se lava el precipitado con agua y se centrifuga; se disuelve el residuo de centrifugación en una solución de 15 cm³ de fenol y 1 cm³ de potasa 1 N, bajo agitación y en atmósfera inerte; se añaden 200 cm³ de acetona, se lava el precipitado con acetona,

25
30
12.12.69.

después con éter y se seca con una corriente de nitrógeno, después bajo vacío, durante una noche; se obtienen 276 mg de sal de potasio de la N^{δ} -(dimetil-4,6 pirimidinil-2) ornitina B₂₂-insulina, bajo forma de un polvo incoloro, soluble en agua y en el suero fisiológico, e insoluble en los disolventes orgánicos (rendimiento: 92%).

Análisis:

Cenizas sulfúricas: 7,3 - 7,6 % (teoría para 6 K = 8,6%).

Pérdida bajo vacío a 100°C: 5,7%.

10 Espectro U. V. (solución acuosa NaCl 0,15 M NaOH 0,1 N c.s. para tener 0,003 N).

Max. a 237 m μ E $\frac{1\%}{1\text{ cm}}$ = 89

Max. a 294 m μ E $\frac{1\%}{1\text{ cm}}$ = 19,5

15 En ClH 0,1 N max. a 307 m μ E $\frac{1\%}{1\text{ cm}}$ = 9,7 aproximadamente.

Este espectro muestra la ausencia de función oxoenamina y la presencia de un grupo pirimidinilo por mol.

Dicroísmo circular.

20 1º. En solución acuosa NaCl 0,15 M NaOH 0,1 N c.s. para tener 0,003 N (pH = 11)

$\Delta E \frac{1\%}{1\text{ cm}} \times 10^3$ a 220 m μ = -253
a 208 m μ = -384
a 193 m μ = +425

25 2º. En solución acuosa ClH 0,1 N (pH = 2):

$\Delta E \frac{1\%}{1\text{ cm}} \times 10^3$ a 270 m μ = -4,4
a 221 m μ = -180
a 208 m μ = -217
a 195 m μ = +498

30
12.12.69.

374280

3º. En solución acuosa ClNa 0,15 M. (pH = 7,35).

$$\Delta E \frac{1\%}{1 \text{ cm}} \times 10^3 \quad \begin{array}{l} \text{a } 267 \text{ m}\mu = -6,0 \\ \text{a } 220 \text{ m}\mu = -203 \\ \text{a } 208 \text{ m}\mu = -281 \end{array}$$



1969

5 Curvas de la misma forma que la de la insulina natural con la inflexión hacia 222 m μ .

Cromatografía sobre papel.

Revelado con azul de bromofenol

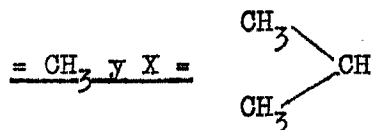
10 1º. Disolvente: butanol-ácido acético-agua (4-1-5) (fase superior). Impregnación del papel con la fase inferior. Mancha única de Rf igual al de la insulina.

2º. Disolvente: Butanol secundario - ácido acético al 10% (1-1). Mancha única de Rf igual al de la insulina.

15 Por lo que se sabe, este compuesto no está descrito en la bibliografía.

Ejemplo número 6: Sal de potasio de tris-N^{A1}, N^{B1}, N^{B29}-(metil-5 oxo-4-hexen-2 il-2) /N⁶-(dimetil-4,6 pirimidinil-2) ornitina B₂₂/-insulina al estado disociado o débilmente asociado, soluble en agua: I_B, con Y = Z = R

20



25

Etapa A: tris-N^{A1}, N^{B1}, N^{B29}-(metil-5 oxo-4 hexen-2 il-2) /N⁶-(dimetil-4,6 pirimidinil-2) ornitina B₂₂/-insulina al estado más o menos fuertemente asociado, V, con Y = Z = R = CH₃ y Z =

$$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \diagdown \\ \text{CH} \\ \diagup \\ \text{CH}_3 \end{array}$$

30 Se introducen 0,3 g del clorhidrato obtenido en el Ejemplo número 3, en una mezcla de 1,5 g de bicarbonato de potasio, 9 cm³ de agua, 7,5 cm³ de fenol, 6 cm³ de

12.12.69.



1960

etanol de 95° y 7,5 cm³ de metil-5 hexano diona-2,4 bajo
agitación, en atmósfera inerte y a la temperatura ambien-
te; se obtiene una solución en dos fases y se continúa la
agitación durante 7 días a 25°C; el pH (7,8) permanece in-
5 variable; se añaden 10 volúmenes de acetona, se centrifu-
ga, se lava el precipitado con acetona, después con éter
y se seca, con una corriente de nitrógeno; se recoge el
precipitado con 30 cm³ de agua, se obtiene una solución
opalescente de pH = 8,5-8,7 que se dializa, durante una
10 noche, a 20°C, con 30 litros de agua desmineralizada; la
solución de pH = 7,5-7,7 es filtrada, liofilizada bajo
0,1 mm de mercurio, después se seca el residuo bajo vacío
durante una noche; se obtienen 226 mg de tris-N^{A1}, N^{B1},
N^{B29}-(metil-5-oxo-4 hexen-2 il-2) /N⁶-(dimetil-4,6-piri-
15 midinil-2) ornitina B₂₂/-insulina, bajo forma parcialmen-
te salificada, al estado más o menos fuertemente asocia-
do.

Etapa B: sal de potasio de tris-N^{A1}, N^{B1}, N^{B29}-(metil-5 oxo-4 hexen-2 il-2) /N⁶-(dimetil-4,6 piri-
20 midinil-2) ornitina B₂₂/-insulina al estado disociado o
débilmente asociado, soluble en agua.

Se disuelven 155 mg del producto obtenido en
la Etapa A del Ejemplo número 6 en 10,3 cm³ de una solu-
ción de fenol-agua-potasa 1 N (75-20-5) a pH = 8, en at-
25 mósfera inerte y a 20°C, se añaden 103 cm³ de acetona, se
centrifuga el precipitado, se lava con acetona, después
con éter y se seca con una corriente de nitrógeno, y des-
pués bajo vacío; se obtienen 135 mg de sal de potasio de
tris-N^{A1}, N^{B1}, N^{B29}-(metil-5 oxo-4 hexen-2 il-2) /N⁶-(di-
30 metil-4,6 pirimidinil-2) ornitina B₂₂/-insulina al estado
12.12.69.



DIC 1969

disociado o débilmente asociado, bajo forma de un polvo incoloro, soluble en agua y en el suero fisiológico. (Rendimiento: 87%).

Análisis: $C_{280}H_{405}O_{78}N_{65}S_6K_6 = 6\ 356,5$

5 Cenizas sulfúricas: 6,4% (teoría para 6 K: 8,24)

Solvatación: 5,1%

Espectro U. V. (en solución acuosa NaCl 0,15 M NaOH 0,1 N c.s. para tener 0,003 N).

10 Inflexión hacia $237\ m\mu$ $E \frac{1\%}{1\ cm} = 89$

Máximo a $311\ m\mu = 75$

Dicroísmo circular:

1º. En solución acuosa NaCl 0,15 M.

15 $\Delta E \frac{1\%}{1\ cm} \times 10^3$

a $320\ m\mu$	= -4,5
a $306\ m\mu$	= -4,9
a $217\ m\mu$	= -211
a $208\ m\mu$	= -314
a $195\ m\mu$	= +361

20 2º. En solución acuosa NaCl 0,15 M NaOH 0,1 N c.s. para tener 0,003 N.

25 $\Delta E \frac{1\%}{1\ cm} \times 10^3$

a $320\ m\mu$	= -4,6
a $222\ m\mu$	= -179
a $208\ m\mu$	= -294
a $195\ m\mu$	= +681

Presencia del máximo negativo hacia $222\ m\mu$ que muestra la configuración parcialmente helicoidal.

Cromatografía sobre papel.

30 Disolvente: n-butanol-ácido acético-agua (4-1-5). Fase
12.12.69.



superior. Impregnación del papel con la fase inferior:

Disolvente: butanol secundario-ácido acético al 10%

(1-1). Revelado con azul de bromofenol.

5 En los dos casos, el producto muestra una mancha única con el mismo Rf que la insulina.

Por lo que se sabe, este compuesto no está descrito en la bibliografía.

10 Ejemplo número 7: sal de potasio de la tris-N^{A1}, N^{B1}, N^{B29}-(oxo-3 ciclohexen-1 il-1) /N^δ-(di- metil-4,6 pirimidinil-2) ornitina B₂₂/-insulina, bajo forma disociada o débilmente asociada soluble en agua,

I_B con X + Y = CH₂-CH₂-CH₂ y Z = R = CH₃

15 EtapA A: tris-N^{A1}, N^{B1}, N^{B29}-(oxo-3 ciclohexen-1 il-1) /N^δ-(dimetil-4,6 pirimidinil-2) ornitina B₂₂ /-insulina bajo forma de agregados moleculares más o menos fuertemente asociado, V, con X + Y = CH₂-CH₂-CH₂ y Z = R = CH₃

20 En una mezcla formada por 16 cm³ de una solución de bicarbonato de potasio al 7% y 2 cm³ de etanol de 95%, (pH de la solución: 6,1) se disuelven 2 g de ciclohexano diona - 1,3, se añaden a esta solución 0,2 g de clorhidrato de /N^δ-(dimetil-4,6 pirimidinil-2) ornitina B₂₂/-insulina (obtenida en el Ejemplo nº 4) bajo agitación, se pone bajo atmósfera inerte y se agita durante 5
25 horas a 25°C. Se centrifuga la suspensión durante 5 minutos, se lava el residuo con agua, después con acetona y finalmente con éter, se seca con una corriente de nitrógeno y después bajo vacío. Se obtienen 177 mg de tris-N^{A1}, N^{B1}, N^{B29}-(oxo-3 ciclohexen-1 il-1) /N^δ-(dimetil-4,6 pirimidinil-2) ornitina B₂₂/-insulina bajo forma de agre-

30
12.12.69.



C. 1969

gados moleculares más o menos fuertemente asociados (rendimiento: 84%).

Dicroísmo circular: (en solución acuosa NaCl 0,15 M NaOH 0,003 N).

$$\begin{aligned} 5 \quad \Delta E \frac{1\%}{1 \text{ cm}} \times 10^3 & \text{ a } 292 \text{ m}\mu = -3,8 \\ & \text{ a } 215 \text{ m}\mu = -216 \\ & \text{ a } 209 \text{ m}\mu = -383 \end{aligned}$$

10 Etapa B: Sal de potasio de la tris-N^{A1}, N^{B1}, N^{B29}-(oxo-3 ciclohexen-1 il-1) / N^S-dimetil-4,6 pirimidinil-2) ornitina B₂₂/-insulina bajo forma disociada o débilmente asociada, soluble en agua.

15 Se disuelven en atmósfera inerte 140 mg del compuesto obtenido anteriormente en 9,3 cm³ de una solución de fenol-agua-potasa 1 N (75-20-5) a pH = 8; al cabo de 3 minutos, la disolución es total; se precipita entonces el compuesto insulínico por adición de 10 volúmenes de acetona, se centrifuga, se lava el residuo con acetona, después con éter y se seca con una corriente de gas inerte, y después bajo vacío; se obtienen 135 mg de sal

20 de potasio de tris-N^{A1}, N^{B1}, N^{B29}-(oxo-3 ciclohexen-1 il-1) / N^S-(dimetil-4,6 pirimidinil-2) ornitina B₂₂/-insulina al estado disociado o débilmente asociado, bajo forma de un polvo blanco, soluble en agua (rendimiento: 96%).

25 Análisis: C₂₇₇H₃₉₃O₇₈N₆₅S₆K₆ = 6308,44

Cenizas sulfúricas: 7,7 - 7,5 % (teoría: 8,3%).

Control del bloqueo de las funciones amínicas por N-dansilación:

30 Se hace actuar el cloruro de dansilo sobre 30 mg del compuesto obtenido anteriormente y se obtienen 21

12.12.69.



mg de derivado dansilado; se hidrolizan 10 mg de este de
 rivado por calentamiento a 100°C con 1 cm³ de ácido clor
 hídrico 6 N, durante 17 horas; se cromatografía el pro-
 ducto hidrolizado y se eluye con la mezcla de acetato de
 5 metilo-alcohol isopropílico-amoniaco (45-35-20); se com-
 prueba la ausencia de derivados dansilados de la glicina,
 de la fenilalanina y de la lisina; el bloqueo de los gru-
 pos amino terminales es por lo tanto completo.

Dicroísmo circular:

10 1º. En solución acuosa NaCl 0,15 M NaOH 0,1 N c.s. para
 tener 0,003 N.

$$\Delta E \frac{1\%}{1 \text{ cm}} \times 10^3 \text{ a } 220 \text{ m}\mu = -181$$

$$\text{a } 204 - 205 \text{ m}\mu = -358$$

2º En solución acuosa ClH 0,1 N.

15 $\Delta E \frac{1\%}{1 \text{ cm}} \times 10^3 \text{ a } 287 \text{ m}\mu = -11,6$

$$\text{a } 221 \text{ m}\mu = -210$$

$$\text{a } 207 \text{ m}\mu = -280$$

$$\text{a } 195 \text{ m}\mu = +483$$

20 Presencia del máximo a 222 m μ aproximadamen-
 te característico de la forma helicoidal.

Espectro U. V.

1º. ClH 0,1 N.

Inflexión hacia 223 m μ E $\frac{1\%}{1 \text{ cm}}$ = 123

25 Máximo a 284 m μ E $\frac{1\%}{1 \text{ cm}}$ = 109

2º. En solución acuosa NaCl 0,15 M NaOH 0,1 N, c.s. para
 tener 0,003 N.

Máx. a 238 m μ E $\frac{1\%}{4 \text{ cm}}$ = 89

Máx. a 289 m μ E $\frac{1\%}{1 \text{ cm}}$ = 136

30
 12.12.69.

374280



1969

Cromatografía sobre papel:

Disolvente: butanol secundario - ácido acético al 10% (1-1)

Impregnación del papel con ácido acético al 10%. Mancha
única de Rf ligeramente inferior a la de la insulina.

5 Por lo que se sabe, este compuesto no está
descrito en la bibliografía.

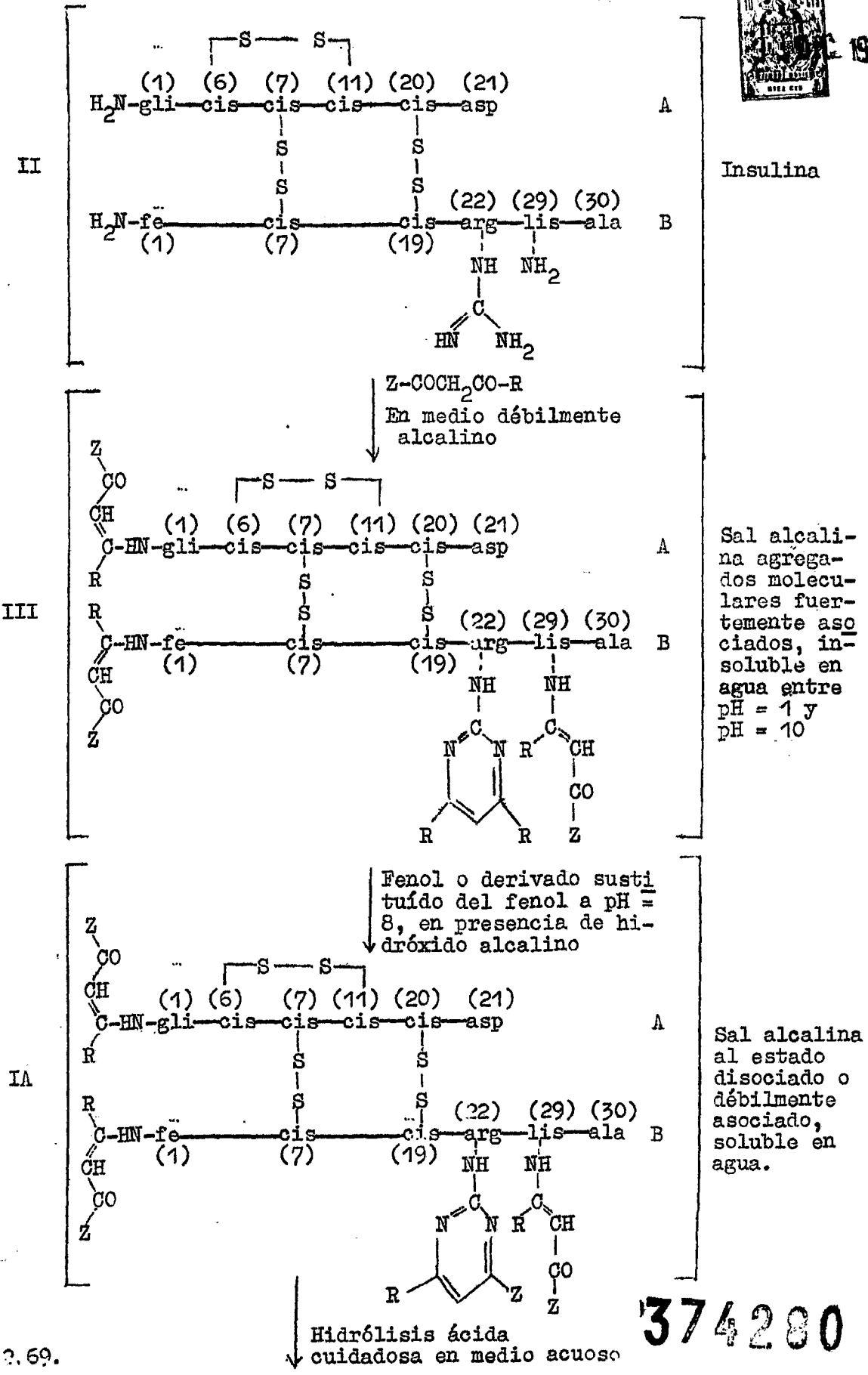
12.12.69.

ESQUEMA 1

(Reacción en fase homogénea)



1959

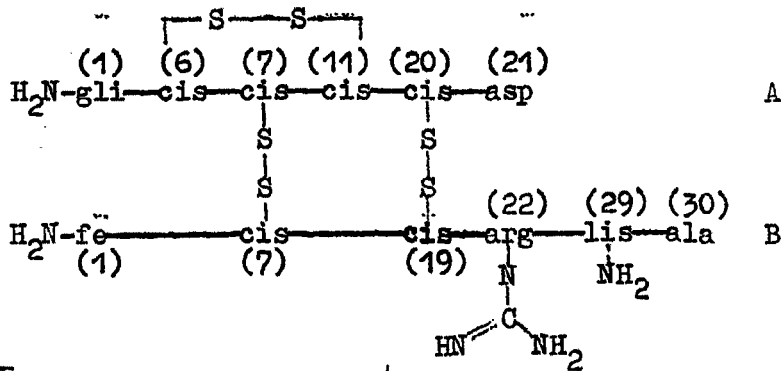


ESQUEMA 2

(Reacción en fase homogénea)



II

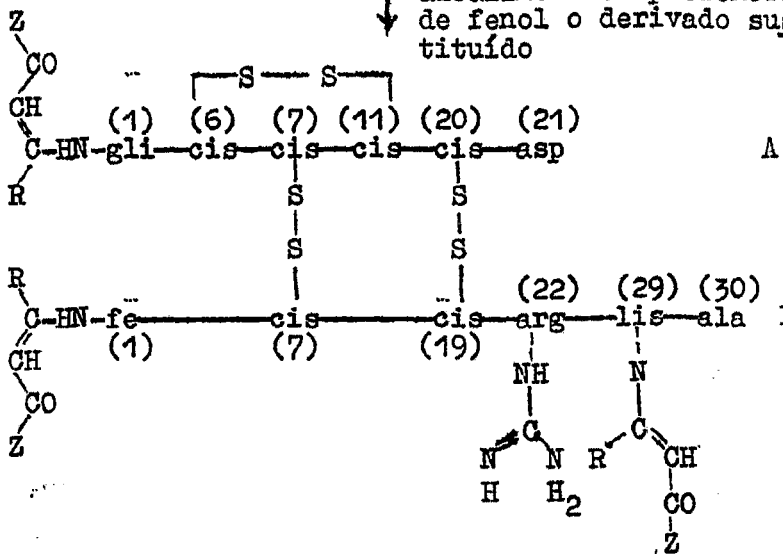


Insulina

(Primera etapa)

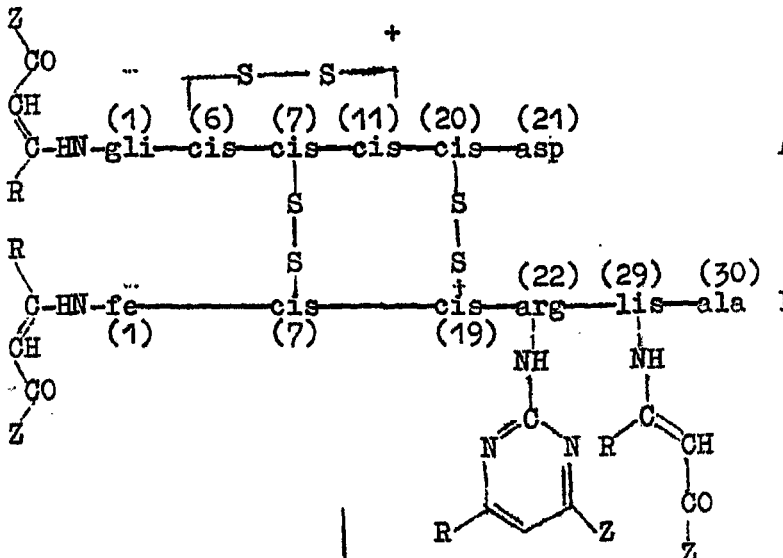
Z-COCH₂CO-R en medio heterogéneo, débilmente alcalino o en presencia de fenol o derivado sustituido

VI



Sal alcalina, agregados moleculares fuertemente asociados, insoluble en agua entre pH = 7 y pH = 10 y en el medio de reacción.

III



Disociación

Acción a un pH próximo a 8, del fenol o de uno de sus derivados sustituidos.

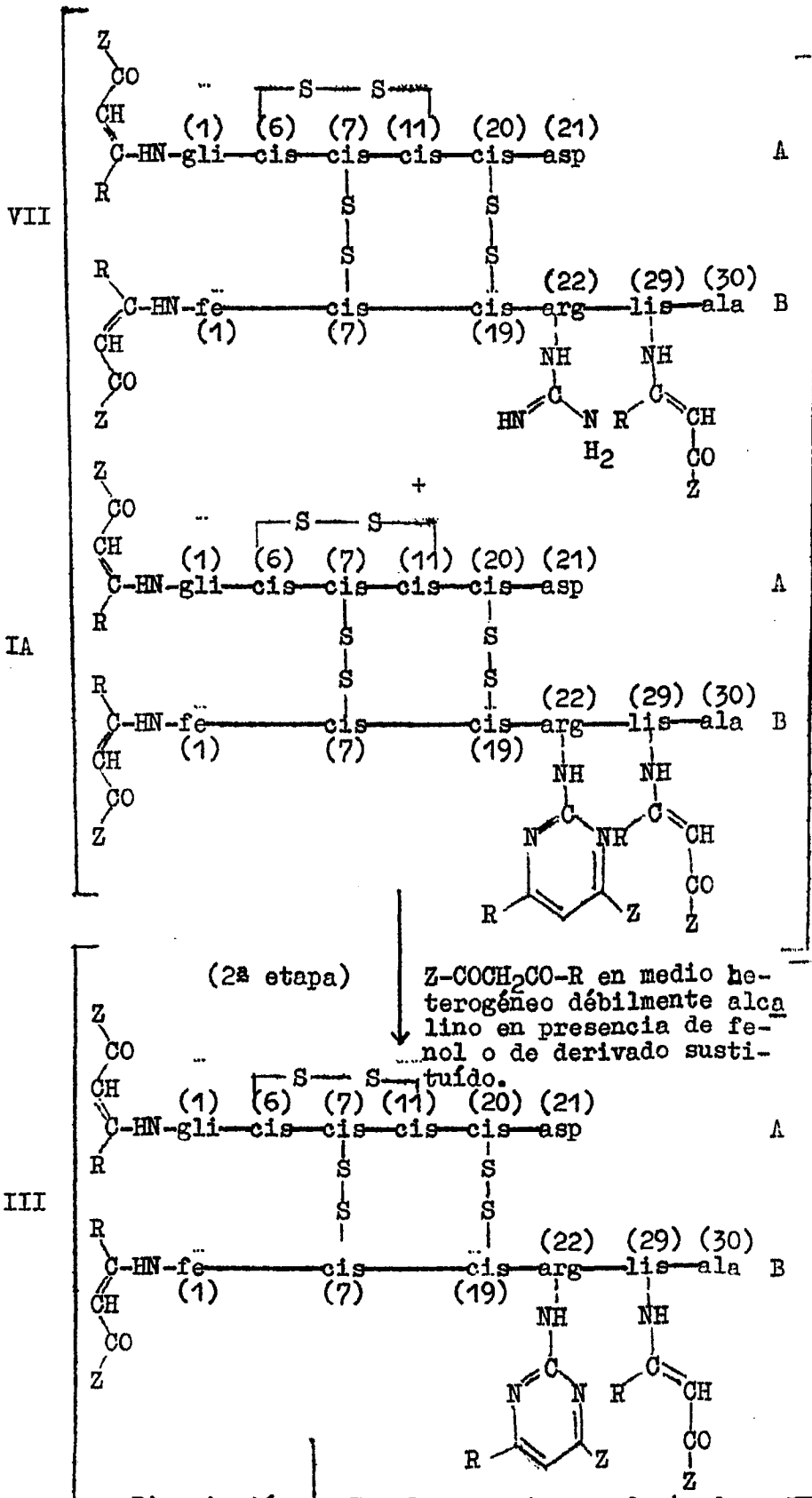
12.12.69.

374280

ESQUEMA 2 (continuación)



1969



A Sal alcalina al estado disociado o débilmente asociado, soluble en agua.

A

B

A

B

Sal alcalina agregados moleculares fuertemente asociados, insoluble en agua entre pH = 1 y pH = 10 e insoluble en el medio de reacción

Fenol o uno de sus derivados sustituidos a un pH próximo a 8.

12.12.69.

IA

374280



La presente solicitud que corresponde a las presentadas en Francia, el 9 de Diciembre de 1.968, bajo el número P.V. 177.227 y 7 de Marzo de 1.969, número P.V. 183.273, se acoge a los beneficios del artículo 51 del
 5 vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

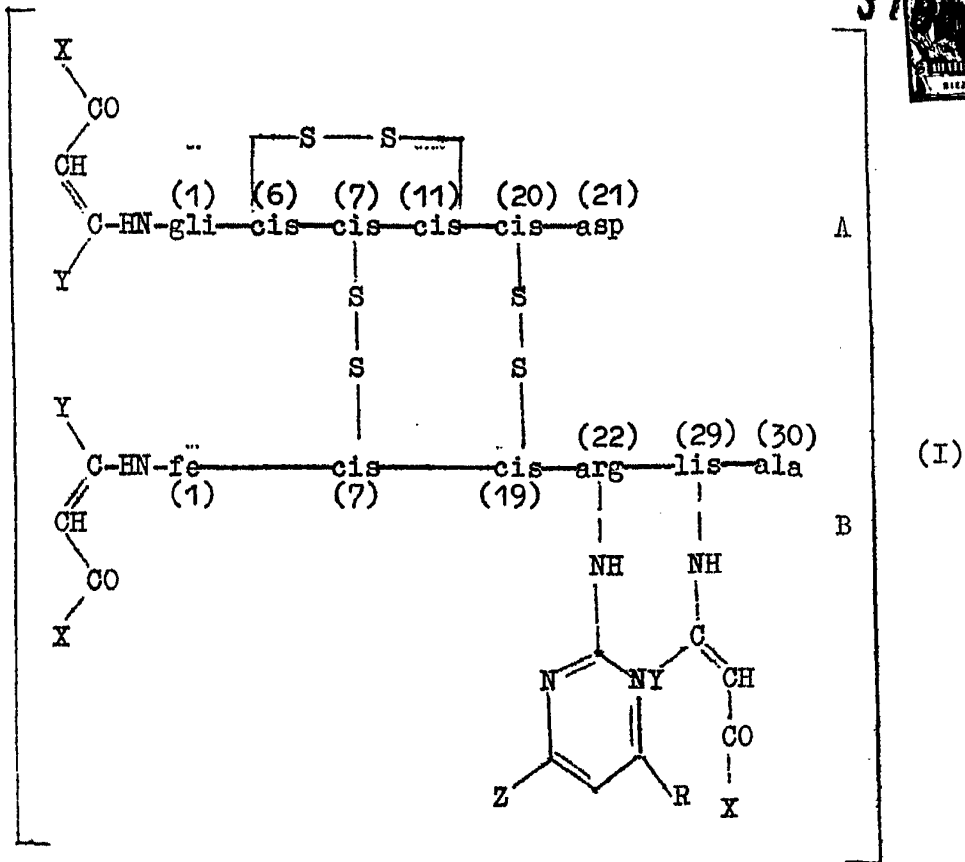
REIVINDICACIONES

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 si-
 guientes:

- 10 1.- Un procedimiento de preparación de nuevos derivados de la insulina, a saber las sales que forman con las bases las tris-N^{A1}, N^{B1}, N^{B29}-(X-3 oxo-3 Y-1 propen-1 il-1) /N⁶-(Z-4 R-6 pirimidinil-2) ornitina B₂₂/-
 15 insulinas, existiendo estas sales al estado disociado o débilmente asociado comparable con el de la insulina, solubles en agua y cuyo grupo molecular fundamental tiene como fórmula general esquemática, I,

12.12.69.

374280



en la cual X e Y, idénticos o diferentes, representan un radical alcoholo, aralcoholo o arilo, pudiendo estar estos radicales eventualmente sustituidos, o bien X e Y representan en conjunto un grupo polimetileno eventualmente sustituido, Z y R, idénticos o diferentes, representan un radical alcoholo, aralcoholo o arilo, pudiendo estar estos radicales eventualmente sustituidos, así como las tris-N^{B1}, N^{B1}, N^{B29}-(X-3 oxo-3 Y-1 propen-1 il-1) /N^B-(Z-4 R-6 ; rimidinil-2) ornitina B₂₂/-insulinas, al estado libre, no salificadas, que existen bajo forma disociada o débilmente asociada, caracterizado porque se condensa la insulina con una beta-dicetona Z-CO CH₂COR, conservando Z y R los significados antes citados, en medio hidroalcohólico, débilmente básico, homogéneo, para formar una sal alcalina

14
12.12.69.



de tris- N^{A1} , N^{B1} , $N^{\zeta B29}$ -(Z-3 oxo-3 R-1 propen-1 il-1)
/ N^{δ} -(Z-4 R-6 pirimidinil-2) ornitina B_{22} /-insulina, al
estado de agregados moleculares fuertemente asociados,
insoluble en agua, se somete a dicho compuesto, en pre-
5 sencia de un hidróxido alcalino, a un pH próximo a 8, a
la acción disociante del fenol o de uno de sus derivados
sustituídos, para obtener la sal de metal alcalino de la
tris- N^{A1} , N^{B1} , $N^{\zeta B29}$ -(Z-3 oxo-3 R-1 propen-1 il-1) / N^{δ}
-(Z-4 R-6 pirimidinil-2) ornitina B_{22} /-insulina, al es-
10 tado disociado o débilmente asociado, soluble en agua,
 I_A , que se somete eventualmente a una hidrólisis ácida
cuidadosa, y después se hace reaccionar, en medio hidro-
alcohólico homogéneo o heterogéneo, débilmente ácido o
débilmente básico, la sal de la / N^{δ} -(Z-4 R-6 pirimidi-
15 nil-2) ornitina B_{22} /-insulina, disociada o débilmente aso-
ciada, soluble en agua, resultante, con una beta-diceto-
na $XCOCH_2COY$, conservando X e Y los significados antes ci-
tados para obtener una tris- N^{A1} , N^{B1} , $N^{\zeta B29}$ -(X-3 oxo-3
Y-1 propen-1 il-1) / N^{δ} -(Z-4 R-6 pirimidinil-2) ornitina
20 B_{22} /-insulina, al estado más o menos fuertemente asocia-
do y que existe bajo forma de sal o de proteína libre,
según el pH de reacción o de aislamiento que se trata en
presencia de un hidróxido alcalino, a un pH próximo a 8,
con fenol o con uno de sus derivados sustituídos, para
25 obtener una sal alcalina de una tris- N^{A1} , N^{B1} , $N^{\zeta B29}$ -(X-3
oxo-3 Y-1 propen-1 il-1) / N^{δ} -(Z-4 R-6 pirimidinil-2) or-
nitina B_{22} /-insulina, al estado disociado o débilmente
asociado, soluble en agua, I_B , y después se transforman
eventualmente los compuestos I_B o I_A , por los métodos
usuales, en sales de base orgánica o mineral, diferentes
30

12/12.69.



de las sales de metales alcalinos, o en proteínas libres no salificadas.

2.- Un procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque se condensa la insulina con una beta-dicetona Z-COCH₂COR, conservando Z y R los significados antes citados, en medio acuoso débilmente básico, homogéneo, en presencia de bicarbonato de potasio y de etanol para formar la sal de potasio de la tris-N^{A1}, N^{B1}, N^{ξB29}-(Z-3 oxo-3 R-1 propen-1 il-1)/N^δ-(Z-4 R-6 pirimidinil-2) ornitina B₂₂/-insulina, al estado de agregados moleculares fuertemente asociados, insoluble en agua, se somete a dicha sal de potasio, en presencia de una solución acuosa de potasa, a un pH próximo a 8, a la acción disociante del fenol para obtener la sal de potasio de la tris-N^{A1}, N^{B1}, N^{ξB29}-(Z-3 oxo-3 R-1 propen-1 il-1)/N^δ-(Z-4 R-6 pirimidinil-2) ornitina B₂₂/-insulina, al estado disociado o débilmente asociado, soluble en agua, que se somete eventualmente a una hidrólisis ácida cuidadosa, por adición de una solución acuosa diluida de ácido clorhídrico, y después se hace reaccionar bajo agitación en medio homogéneo o heterogéneo, débilmente ácido o débilmente básico, en presencia de bicarbonato de potasio y de etanol, la /N^δ-(Z-4 R-6 pirimidinil-2) ornitina B₂₂/-insulina, al estado disociado o débilmente asociado, soluble en agua, resultante, con una beta-dicetona XCOCH₂COY, conservando X e Y los significados antes citados, para obtener una tris-N^{A1}, N^{B1}, N^{ξB29}-(X-3 oxo-3 Y-1 propen-1 il-1) /N^δ-(Z-4 R-6 pirimidinil-2) ornitina B₂₂/-insulina, al estado más o menos fuertemente asociado y que existe bajo forma de sal de potasio o de proteína libre,

30
12.12.69.



según el pH de reacción, que se trata en presencia de hidróxido de potasio, a un pH próximo a 8, con fenol, para obtener una sal de potasio de una tris- N^{A1} , N^{B1} , $N^{\zeta B29}$ -(X-3 oxo-3 Y-1 propen-1 il-1) / N^{δ} -(Z-4 R-6 pirimidinil-2) ornitina B_{22} /-insulina, al estado disociado o débilmente asociado, soluble en agua, y después se transforma eventualmente la sal de potasio de la tris- N^{A1} , N^{B1} , $N^{\zeta B29}$ -(Z-3 oxo-3 R-1 propen-1 il-1) / N^{δ} -(Z-4 R-6 pirimidinil-2) ornitina B_{22} /-insulina o la sal de potasio de la tris- N^{A1} , N^{B1} , $N^{\zeta B29}$ -(X-3 oxo-3 Y-1 propen-1 il-1) / N^{δ} -(Z-4 R-6 pirimidinil-2) ornitina B_{22} /-insulina así obtenidas, por los métodos usuales, en sales de bases orgánicas o minerales, diferentes de la sal de potasio, o en proteínas libres, no salificadas.

3.- Un procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque se somete una sal alcalina de tris- N^{A1} , N^{B1} , $N^{\zeta B29}$ -(Z-3 oxo-3 R-1 propen-1 il-1) / N^{δ} -(Z-4 R-6 pirimidinil-2) ornitina B_{22} /-insulina una tris- N^{A1} , N^{B1} , $N^{\zeta B29}$ -(X-3 oxo-3 Y-1 propen-1 il-1) / N^{δ} -(Z-4 R-6 pirimidinil-2) ornitina B_{22} /-insulina o una sal alcalina de esta proteína, compuesto que existe al estado más o menos fuertemente asociado o al estado de agregados moleculares fuertemente asociados, insoluble en agua, a la acción disociante del fenol o de uno de sus derivados sustituidos, en presencia de un hidróxido alcalino, a un pH próximo a 8, para formar respectivamente una sal alcalina de tris- N^{A1} , N^{B1} , $N^{\zeta B29}$ -(Z-3 oxo-3 R-1 propen-1 il-1) / N^{δ} -(Z-4 R-6 pirimidinil-2) ornitina B_{22} /-insulina o una sal alcalina de una tris- N^{A1} , N^{B1} , $N^{\zeta B29}$ -(X-3 oxo-3 Y-1 propen-1 il-1) / N^{δ} -(Z-4 R-6 pirimi-

30
 12 FEB 1970

374280



dinil-2) ornitina B₂₂'-insulina, que existe bajo forma disociada o débilmente asociada, soluble en agua.

4.- Un procedimiento según la reivindicación 1, para la preparación de una tris-N^{A1}, N^{B1}, N^{ξB29}-(X-3 oxo-3 Y-1 propen-1 il-1) /N^δ-(Z-4 R-6 pirimidinil-2) ornitina B₂₂'-insulina, al estado más o menos fuertemente asociado, insoluble en agua y que existe bajo forma de sal o de proteína libre según el pH de reacción, caracterizado porque se hace reaccionar bajo agitación, en medio acuoso homogéneo o heterogéneo, débilmente ácido o débilmente básico, en un margen de pH comprendido entre 5,5 y 8,5, una sal de /N^δ-(Z-4 R-6 pirimidinil-2) ornitina B₂₂'-insulina, al estado disociado o débilmente asociado, soluble en agua, con una beta-dicetona XCOCH₂COY, conservando X e Y los significados antes citados.

5.- Un procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque se hace reaccionar, en medio homogéneo, la insulina con acetilacetona a pH próximo a 3,3 en medio acuoso, en presencia de bicarbonato de potasio y de etanol, a las proximidades de 25°C, para obtener la sal de potasio de la tris-N^{A1}, N^{B1}, N^{ξB29}-(oxo-4 penten-2 il-2) /N^δ-(dimetil-4,6-pirimidinil-2) ornitina B₂₂'-insulina, al estado de agregados moleculares fuertemente asociados, insoluble en agua, que se somete, a un pH próximo a 8, a la acción disociante de una mezcla de fenol-agua-solución acuosa 1 N de potasa (75-20-5), y se aísla la sal de potasio de la tris-N^{A1}, N^{B1}, N^{ξB29}-(oxo-4 penten-2 il-2) /N^δ-(dimetil-4,6-pirimidinil-2) ornitina B₂₂'-insulina, al estado disociado o débilmente asociado, soluble en agua.

Handwritten signature and date: 12.12.69

30
12.12.69



6.- Un procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque se hidroliza con ácido clorhídrico, a pH = 2, la sal de potasio de la tris- N^{A1} , N^{B1} , $N^{\{B29}$ -(oxo-4 penten-2 il-2) / N^{δ} -(dimetil-4,6-pirimidinil-2) ornitina B_{22} /-insulina, al estado disociado o débilmente asociado, soluble en agua, y se aísla el clorhidrato de / N^{δ} -(dimetil-4,6 pirimidinil-2) ornitina B_{22} /-insulina.

7.- Un procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque se hace reaccionar, a las proximidades de 25°C, a un pH próximo a 8, en medio acuoso, en presencia de bicarbonato de potasio, de fenol y de etanol, la metil-5 hexano diona-2,4 con el clorhidrato de / N^{δ} -(dimetil-4,6 pirimidinil-2) ornitina B_{22} /-insulina (obtenido según la reivindicación 6), para formar la sal de potasio de la tris- N^{A1} , N^{B1} , $N^{\{B29}$ -(metil-5 oxo-4 hexen-2 il-2) / N^{δ} -(dimetil-4,5-pirimidinil-2) ornitina B_{22} /-insulina, al estado más o menos fuertemente asociado, que se somete a un pH próximo a 8, a la acción disociante de una mezcla de fenol-agua-solución acuosa 1 N de potasa (75-20-5), y se aísla la sal de potasio de la tris- N^{A1} , N^{B1} , $N^{\{B29}$ -(metil-5 oxo-4 hexen-2 il-2) / N^{δ} -(dimetil-4,6 pirimidinil-2) ornitina B_{22} /-insulina, al estado disociado o débilmente asociado, soluble en agua.

8.- Un procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque se hace reaccionar, a un pH próximo a 6, a las proximidades de 25°C, en medio acuoso, en presencia de bicarbonato de potasio y de etanol, la ciclohexanodiona-1,3 con el clorhidrato de / N^{δ} -(dimetil-4,6 pirimidinil-2) ornitina B_{22} /-insulina (obtenida se-

12.12.69.

-1 ABR. 1971



5 según la reivindicación 6) para formar la tris- N^{A1} , N^{B1} , N^{EB29} -(oxo-3 ciclohexen-1 il-1) / N^{δ} -(dimetil-4,6 pirimidinil-2) ornitina B_{22} /-insulina, al estado más o menos fuertemente asociado, que se somete, a un pH próximo a 8, a la acción disociante de una mezcla de fenol-agua-solución acuosa 1 N de potasa (75-20-5) y se aísla la sal de potasio de la tris- N^{A1} , N^{B1} , N^{EB29} -(oxo-3 ciclohexen-1 il-1) / N^{δ} -(dimetil-4,6 pirimidinil-2) ornitina B_{22} /-insulina, bajo forma disociada o débilmente asociada, soluble en agua.

10 9.- Un procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque se trata la sal alcalina de la tris- N^{A1} , N^{B1} , N^{EB29} -(Z-3 oxo-3 R-1 propen -1 il-1) / N^{δ} -(Z-4 R-6 pirimidinil-2) ornitina B_{22} /-insulina, que existe bajo forma de agregados moleculares fuertemente asociados, con un ácido en solución acuosa, en presencia de fenol o de uno de sus derivados sustituidos, para obtener directamente la sal correspondiente de / N^{δ} -(Z-4 R-6 pirimidinil-2) ornitina B_{22} /-insulina, al estado disociado o débilmente asociado, soluble en agua.

15 20 25 30 10.- Un procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado esencialmente porque se hace reaccionar la insulina, por agitación, en medio acuoso heterogéneo que comprende dos fases no miscibles, a un pH débilmente alcalino, en presencia de fenol o de uno de sus derivados sustituidos, con una beta-dicetona $ZCOCH_2COR$, para obtener en una primera etapa de reacción una mezcla de sal alcalina de la tris- N^{A1} , N^{B1} , N^{EB29} -(Z-3 oxo-3 R-1 propen-1 il-1)-insulina VI, y de sal alcalina de la tris- N^{A1} , N^{B1} , N^{EB29} -(Z-3 oxo-3 R-1 propen-1 il-1) / N^{δ} -

29-3-72

- 59 -

374280



(Z-4 R-6 pirimidinil-2) ornitina B₂₂/-insulina, III, mezcla que existe al estado de agregados moleculares fuertemente asociados, insolubles en agua, se somete a dicha mezcla de VI y de III, a un pH próximo a 8, a la acción disociante del fenol o de uno de sus derivados sustituidos, para obtener una mezcla de sal alcalina de tris-N^{A1}, N^{B1}, N^{ξB29}-(Z-3 oxo-3 R-1 propen-1 il-1)-insulina, VII, y de sal alcalina de tris-N^{A1}, N^{B1}, N^{ξB29}-(Z-3 oxo-3 R-1 propen-1 il-1) /N^δ-(Z-4 R-6 pirimidinil-2) ornitina B₂₂/-insulina I_A, mezcla que existe bajo forma disociada o débilmente asociada, soluble en agua, y después se hace actuar sobre dicha mezcla de los compuestos VII y IA, en una segunda etapa de reacción en condiciones idénticas a las de la primera etapa, en medio débilmente alcalino, la beta-dicetona ZCOCH₂COR, para obtener una sal alcalina de tris-N^{A1}, N^{B1}, N^{ξB29}-(Z-3 oxo-3 R-1 propen-1 il-1) /N^δ-(Z-4 R-6 pirimidinil-2) ornitina B₂₂/-insulina, llevada nuevamente al estado de agregados moleculares fuertemente asociados, insoluble en el medio de reacción o en agua, entre pH = 1 y pH = 10.

11.- Un procedimiento según la reivindicación 10, caracterizado porque se hace reaccionar la insulina, por agitación, en un medio heterogéneo que comprende dos fases no miscibles, a un pH débilmente alcalino, en presencia de fenol, de bicarbonato de potasio y de etanol, con una beta-dicetona ZCOCH₂COR para obtener una mezcla de sal de potasio de tris-N^{A1}, N^{B1}, N^{ξB29}-(Z-3 oxo-3 R-1 propen-1 il-1)-insulina y de sal de potasio de tris-N^{A1}, N^{B1}, N^{ξB29}-(Z-3 oxo-3 R-1 propen-1 il-1) /N^δ-(Z-4, R-6 pirimidinil-2) ornitina B₂₂/insulina, mezcla que existe al

30
12.12.69.



1969

estado de agregados moleculares fuertemente asociados, insoluble en agua, se somete a dicha mezcla a la acción disociante del fenol, en medio acuoso, a un pH próximo a 8, para obtener, en solución, una mezcla de sal de potasio de tris- N^{A1} , N^{B1} , $N^{\xi B29}$ -(Z-3 oxo-3 R-1 propen-1 il-1)-insulina y de sal de potasio de tris- N^{A1} , N^{B1} , $N^{\xi B29}$ -(Z-3 oxo-3 R-1 propen-1 il-1) / N^{δ} -(Z-4 R-6 pirimidinil-2) ornitina B_{22} /-insulina, mezcla que existe bajo forma disociada o débilmente asociada, soluble en agua, se somete, en medio débilmente alcalino, a dicha mezcla, a la acción de la beta-dicetona $ZCOCH_2COR$, en presencia de bicarbonato de potasio y de etanol, para obtener la sal de potasio de la tris- N^{A1} , N^{B1} , $N^{\xi B29}$ -(Z-3 oxo-3 R-1 propen-1 il-1) / N^{δ} -(Z-4 R-6 pirimidinil-2) ornitina B_{22} /-insulina, al estado de agregados moleculares fuertemente asociados, insoluble en agua.

12.- Un procedimiento según la reivindicación 10, caracterizado porque se hace reaccionar la insulina en un medio acuoso heterogéneo que comprende dos fases no miscibles, a un pH próximo a 8,6, en presencia de bicarbonato de potasio, de fenol y de alcohol, con la acetilacetona, para obtener una mezcla de sal de potasio de tris- N^{A1} , N^{B1} , $N^{\xi B29}$ -(oxo-4 penten-2 il-2)-insulina y de sal de potasio de tris- N^{A1} , N^{B1} , $N^{\xi B29}$ -(oxo-4 penten-2 il-2) / N^{δ} -(dimetil-4,6 pirimidinil-2) ornitina B_{22} /-insulina al estado de agregados moleculares fuertemente asociados, insoluble en agua, que se somete a la acción disociante del fenol, en medio acuoso, para obtener, en solución, una mezcla de sal de potasio de tris- N^{A1} , N^{B1} , $N^{\xi B29}$ -(oxo-4 penten-2 il-2)-insulina y de sal de potasio de tris- N^{A1} ,

25
30
12.12.69.



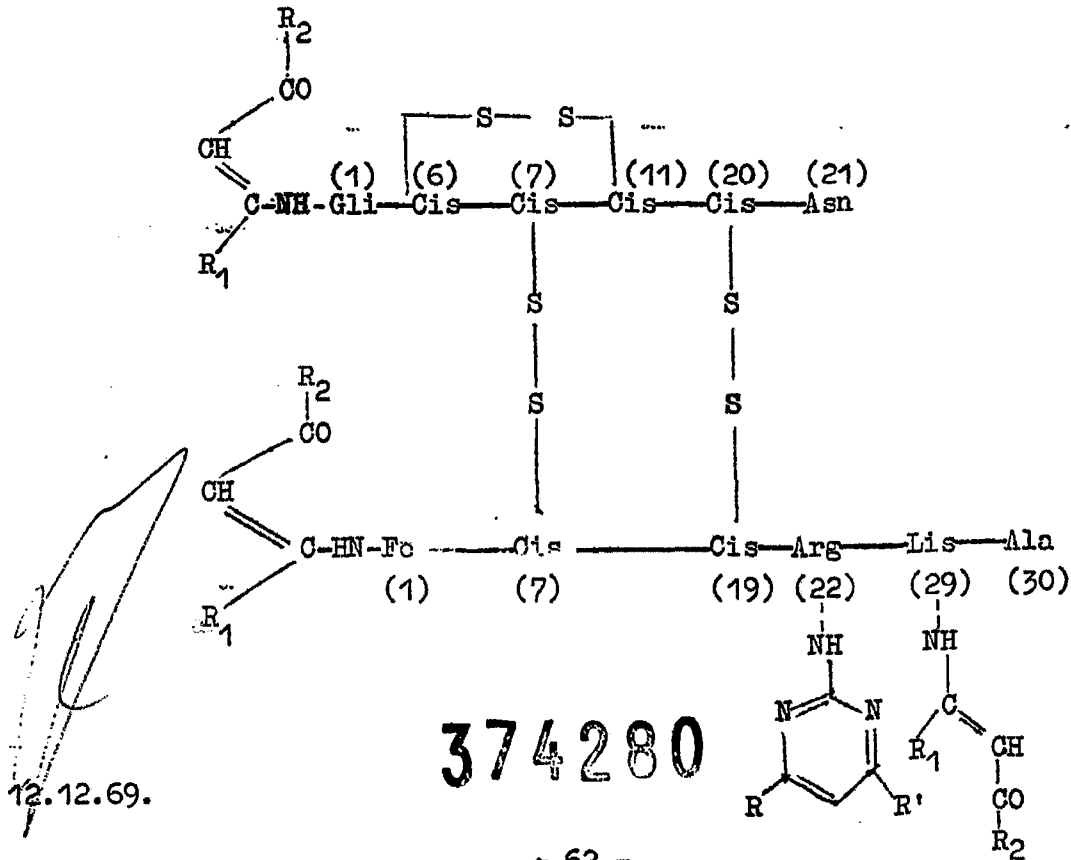
1969

5 N^{B1}, N^{B29} -(oxo-4 penten-2 il-2) / N^{δ} -(dimetil-4,6 pirimidinil-2) ornitina B_{22} /-insulina, al estado disociado o débilmente asociado, se somete, a un pH próximo a 8,6, a dicha mezcla a la acción de la acetilacetona, en presencia de bicarbonato de potasio, de fenol y de alcohol, en medio heterogéneo, para obtener la sal de potasio de la tris- N^{A1}, N^{B1}, N^{B29} -(oxo-4 penten-2 il-2) / N^{δ} -(dimetil-4,6 pirimidinil-2) ornitina B_{22} /-insulina, bajo forma de agregados moleculares fuertemente asociados, insoluble en

10 agua.

13.- Un procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque se preparan las sales de metales alcalinos de las tris-oxoenaminas de las (N^{δ} -pirimidinil-ornitina B_{22})-insulinas, solubles en agua, cuyo grupo molecular fundamental tiene como fórmula general esquemática:

15





C. 15

en la cual R y R', idénticos o diferentes, representan un radical alcohilo que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, un radical arilo monocíclico, un radical aralcohilo que tiene de 7 a 10 átomos de carbono, R₁ y R₂, iguales o diferentes de R y R', representan un radical alcohilo, aralcohilo o arilo o forman en conjunto un grupo alcohileno.

5

14.- Un procedimiento según la reivindicación 13, caracterizado porque se condensa la insulina con una beta-dicetona en medio alcalino para formar una tris-oxoenamina de la (N^δ-pirimidinil-ornitina B₂₂)-insulina bajo forma de agregado molecular, insoluble en agua, se disocia este último por acción de fenol hidratado en medio alcalino, y se obtiene una tris-oxoenamina de la (N^δ-pirimidinil-ornitina B₂₂)-insulina, soluble en agua.

10

15

15.- Un procedimiento según la reivindicación 13, caracterizado porque se condensa la insulina con una beta-dicetona en fase heterogenea en presencia de fenol para formar una mezcla de derivados de la insulina bajo forma de agregados moleculares, insolubles en agua, que se disocia con fenol en medio alcalino, se obtiene una mezcla de tris-oxoenaminas disociadas que se somete a la acción de una beta-dicetona para formar un derivado de la insulina bajo forma de agregado molecular insoluble en agua, se somete este último a la acción del fenol en medio alcalino, y se obtiene una tris-oxoenamina de (N^δ-pirimidinil-ornitina B₂₂)-insulina, soluble en agua.

20

25

16.- Un procedimiento según las reivindicaciones 14 ó 15, caracterizado porque la tris-oxoenamina de (N^δ-pirimidinil-ornitina B₂₂)-insulina obtenida es hidrolizada en medio ácido para formar una (N^δ-pirimidinil-or

30

12.12.69.



1969

nitina B₂₂)^o-insulina, bajo forma de clorhidrato, de base libre, o de sal de metal alcalino según que el aislamiento se efectúe en medio ácido, en el punto isoelectrico (pH alrededor de 5,2) o en medio alcalino.

5 17.- Un procedimiento según las reivindicaciones 14 ó 15, caracterizado porque se somete una tris-oxoamina de (N^δ-pirimidinil-ornitina B₂₂)^o-insulina, bajo forma de agregado molecular, a una hidrólisis por la acción de un ácido mineral, en solución en fenol acuoso, se obtiene una (N^δ-pirimidinil-ornitina B₂₂)^o-insulina que es combinada con una beta-dicetona para formar una tris-oxoamina de (N^δ-pirimidinil-ornitina B₂₂)^o-insulina que se trata con el fenol en medio alcalino para hacerla soluble en agua, bajo forma de sal de metal alcalino.

15 18.- UN PROCEDIMIENTO DE PREPARACION DE NUEVOS DERIVADOS DE LA INSULINA.

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

20 Esta Memoria consta de sesenta y cuatro hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 31 Dic. 1969

P. A.

Alberto de Eizaburu
Por Poder

374280

G.D.S.
12/12.69.