



Int. Cl.: *A61K*

424554

MEMORIA DESCRIPTIVA

correspondiente a la solicitud de concesión de una

PATENTE DE INTRODUCCION

SOLICITANTE: VAMCO, SOCIEDAD CIVIL PARTICULAR
(VAMCO, S.C.P.)

RESIDENCIA: Av. Pio XII nº 99 - Madrid.

ENUNCIADO: UN PROCEDIMIENTO DE PRODUCCION DE UNA
SUSPENSION ACUOSA DE CRISTALES DE INSU-
LINA DE UN TAMAÑO PREDETERMINADO SUS-
TANCIALMENTE UNIFORME

Prioridad: Patente n.º del

MGS.-



1 Se conocen preparados inyectables de insulina que
ejercen un efecto prolongado basado exclusiva o fundamental-
mente en la presencia de cristales de insulina en suspensión
acuosa, véase, por ejemplo, Science, 116, 394-398, 1952 y
5 J. Am. Med. Assoc., 150, 1667-1671, 1952. Como otros prepa-
rados inyectables de insulina, estos preparados son comercia-
lizados en ampollas con una tapa total o parcialmente consti-
tuída por goma de manera que pueda hincharse la cánula de
una jeringa de inyección a través de la goma para tomar la
10 dosis deseada en la jeringa. Habitualmente, una ampolla con-
tiene la suspensión acuosa de cristales de insulina en canti-
dad suficiente para varias dosis.

15 Siempre que hay que sacar una dosis de la ampolla,
es necesario sacudir primero la ampolla de manera que los
cristales de insulina sedimentada se dispersen con objeto de
formar una suspensión en la que los cristales de insulina es-
tén uniformemente distribuidos. Si no se comprueba que los
cristales de insulina están uniformemente distribuidos en el
20 medio acuoso de suspensión antes de recoger la suspensión en
la jeringa de inyección, las diversas dosis no contendrán la
misma cantidad de insulina.

25 Como la administración de insulina habitualmente es
realizada por los propios pacientes, es importante que pueda
obtenerse una suspensión uniforme sin dificultades mediante
un sencillo sacudimiento de una ampolla de manera que uno es-
té absolutamente seguro de que cada dosis contiene la misma
cantidad de insulina.

30 Si la suspensión acuosa de cristales contiene cris-
tales de insulina que, debido a su tamaño, son difíciles de
mantener en suspensión, esta seguridad desaparece. Por lo tan



22 MAR. 1974

1 to, es importante que la suspensión de cristales no contenga
cristales especialmente grandes o, en otras palabras, que los
cristales de insulina mayores tengan un tamaño que no supere
a un valor predeterminado que haría imposible estar seguros
5 de que, después de que el paciente ha sacudido la ampolla y
hasta que se ha tomado la dosis deseada en la jeringa de in-
yección, haya la misma concentración de insulina en toda la
suspensión y que no haya cristales en el fondo de la ampolla.

10 De acuerdo con los procedimientos hasta ahora cono-
cidos de preparación de insulina cristalina, no se ha hecho
nada para ajustar el tamaño de los cristales producidos. Ade-
más, este ajuste no tendría ningún objeto farmacéutico porque
en el pasado no se han utilizado cristales de insulina como
constituyentes de los preparados de insulina para uso clínico.

15 La cristalización de la insulina es muy conocida,
véase, por ejemplo, Biochem. J. 28, 1592-1602 y l.c. 29,
1048-1054, y generalmente se realiza haciendo que la insulina
cristalice en un medio acuoso modificando el pH del medio has-
ta un valor próximo al punto isoeléctrico de la insulina. Si
20 la insulina propiamente dicha no contiene con antelación canti-
dades suficientes de un metal promotor de la cristalización
(cinc, cobalto, níquel, cadmio, cobre, manganeso o hierro, em-
pleándose entre estos metales el cinc en la mayoría de los ca-
sos, por ejemplo en forma de cloruro de cinc), se comunica al
25 medio de cristalización el contenido en metal necesario, que
en el caso del cinc es de 0,4-0,52 % del peso de la insulina,
empleándose sin embargo en la práctica de 2 a 5 veces esta
cantidad, véase por ejemplo la memoria de la patente estado-
unidense nº 2.143.590. Además, en general se hace uso de sus-
30 tancias reguladoras del pH para fijar el valor del mismo duran-



1 te la cristalización. Como ejemplos de estas sustancias regu-
ladoras del pH citaremos los conocidos reguladores de aceta-
to, borato, citrato, fosfato, dietilbarbiturato y maleato.
La insulina cristalina así producida contiene de 20 a 27 uni-
5 dades internacionales por miligramo, según la pureza de los
cristales.

Uno de los objetos de esta invención es proporcio-
nar un procedimiento de producción de cristales de insulina
con un tamaño que no pase de un valor predeterminado, de ma-
10 nera que directamente en el proceso de cristalización se ob-
tenga una carga cristalina que pueda ser utilizada como tal
para fines clínicos y que no necesite ser sometida a sedimen-
tación fraccionada para separar los cristales demasiado grandes.

El procedimiento de acuerdo con esta invención per-
15 tenece a la técnica en la que la insulina se hace cristalizar
en un medio acuoso con un pH entre 5 y 7, en presencia de un
metal promotor de la cristalización y la característica de la
invención es que la cristalización tiene lugar mientras se
siembra con cristales de insulina de una manera predetermi-
20 nada.

Mediante un proceso de siembra de acuerdo con la
invención, es posible producir cristales de insulina con un
tamaño que no supera a un valor predeterminado, según la can-
tidad de cristales de siembra empleada, el tamaño de los cris-
25 tales de siembra y la concentración de insulina durante la
cristalización. En la siguiente descripción, se sobreentiende
por tamaño de los cristales de insulina la longitud en micras
de la diagonal máxima del cristal.

30 Con objeto de determinar la cantidad de siembra cuan-
do los cristales de insulina producidos no tienen que superar



1 un tamaño definido predeterminado, los cristales de siembra
se utilizan en una cantidad que corresponde a la siguiente
ecuación:

$$P = I \times \frac{d_p^3}{d_i^3 - d_p^3}$$

5 donde P es la cantidad en gramos de cristales de siembra a
utilizar, I es el peso en gramos de insulina que ha de ser
cristalizado, es decir, la insulina en el medio de cristaliza-
ción, d_p es el tamaño máximo de los cristales de siembra y
10 d_i es el límite superior deseado del tamaño de cristales de
insulina que han de ser producidos.

15 Si, por ejemplo, se desea que los cristales de in-
sulina no pasen de unas 30 micras y se desea cristalizar 100 g
de insulina, deben emplearse cristales de siembra en una can-
tidad de unos 30 mg si el tamaño de los cristales de siembra
es alrededor de 2 micras o menos y en una cantidad de unos
240 mg si los cristales de siembra tienen un tamaño de unas 4
micras o menos.

20 En los preparados de insulina inyectables, cuyo
efecto prolongado se basa en la presencia de cristales de in-
sulina en suspensión, es además importante que los cristales
de insulina suspendidos tengan principalmente el mismo tamaño,
es decir, que la parte principal de la insulina presente ten-
ga la forma de cristales cuyo tamaño no difiere o solo difie-
25 re ligeramente de uno a otro. Esto garantizará un efecto clí-
nico constante y completamente reproducible.

30 Otro objeto de esta invención consiste en proporcio-
nar condiciones tales durante la cristalización que la parte
principal de la insulina cristalice como cristales cuyo tama-
ño se encuentra en las proximidades del límite superior deseado.



1 Esto puede conseguirse evitando en lo posible la 10
mación de cristales de insulina debida a cristalización espon
tánea y empleando cristales de siembra principalmente del mis
mo tamaño. De esta manera es posible obtener el resultado de
5 que la parte principal de la insulina de una carga de cris-
tales presente prácticamente el mismo tamaño cristalino. Ba-
jo estas circunstancias, d_p indicará aproximadamente el tama-
ño de cristales de siembra en micras y d_i el tamaño de cris-
tal en micras en el cual cristalizará la parte principal del
10 peso de la insulina. Cuando se desea, por ejemplo, que la par-
te principal de los cristales de insulina tenga un tamaño de
aproximadamente 30 micras, será posible de acuerdo con la in-
vención, mediante la supresión de la cristalización espontá-
nea, obtener del 80 al 90 % de la insulina en forma de crista-
15 les de 28 a 36 micras.

 La cristalización espontánea puede ser suprimida ha-
ciendo pequeña la diferencia entre d_i y d_p . Sin embargo, esto
requeriría una serie de cristalizaciones con objeto de llegar
al valor deseado de d_i lo que es indeseable en la práctica.

20 A escala industrial, se desea obtener el valor reque-
rido de d_i en una sola etapa de cristalización, lo que implica
que la diferencia entre d_i y d_p sea relativamente grande.
En estos casos, la cristalización espontánea puede ser supri-
mida, de acuerdo con la invención, empleando una sustancia
25 reguladora del pH, cuyo anión no se combine con el metal pro-
motor de la cristalización en condiciones de neutralidad. Co-
mo ejemplos de estas sustancias reguladoras citaremos los regu-
ladores de borato, dietilbarbiturato, maleato y acetato, en-
tre los cuales se prefiere el mencionado en último lugar,
30 cuando las suspensiones de cristales producidas han de ser



1 utilizadas directamente en la producción de preparados de insulina inyectables.

5 Puede hacerse uso del procedimiento descrito en la patente danesa nº 78.069, véase también la solicitud de patente estadounidense copendiente número de serie 362.142, presentada el 16 de Junio de 1953. De acuerdo con este procedimiento, la cristalización tiene lugar en presencia de un halógeno (cloro, bromo y yodo), en forma ionogénica, a una concentración superior a 0,2 moles por litro. Es preferible
10 proveer esta concentración de ión halógeno agregando una cantidad suficiente de una sal halogenada de un metal alcalino, amoníaco o uno de los metales alcalino-térreos o una mezcla de estas sales. Con objeto de obtener cosechas cristalinas máximas, no es conveniente utilizar concentraciones de ión halógeno superiores al alrededor de 1 mol por litro.
15

Si la cristalización se realiza de acuerdo con el procedimiento antes mencionado, no es necesario emplear sustancias reguladoras cuyo anión no se combine con el metal promotor de la cristalización en condiciones de neutralidad. También
20 pueden utilizarse otros reguladores como el citrato. Finalmente, debe mencionarse que la agitación intensa durante la cristalización provoca la cristalización espontánea.

En la puesta en práctica del procedimiento de acuerdo con la invención, el medio acuoso de cristalización conteniendo insulina puede ser producido de forma conocida. Lo más
25 corriente es producir una solución acuosa ácida de insulina con el contenido necesario de uno o más metales promotores de la cristalización (cinc, cobalto, níquel, cadmio, cobre, manganeso y hierro, entre los cuales casi siempre se utiliza el
30 cinc) y, si se desea, sustancias reguladoras del pH y ajustar



1 la solución al pH de cristalización, pero también es posible
precipitar la insulina amorfa en un medio acuoso sin el
contenido necesario de metal y después hacer que la insulina
5 cambie a una forma cristalina mediante la posterior adición
de la cantidad necesaria de metal, por ejemplo en forma de
una solución acuosa de una sal metálica. Finalmente, también
es posible aproximarse al pH de cristalización desde el in-
tervalo básico empleando soluciones básicas de insulina.

10 La cantidad satisfactoria mínima del cinc metálico
promotor de la cristalización es alrededor de 0,4 % a 0,52 %
del peso de la insulina. En la práctica de cristalización co-
mercial, habitualmente se emplea de dos a cinco veces la can-
tidad mínima. La concentración de insulina en la cristaliza-
15 ción es generalmente de 0,25 % a 4 %, preferiblemente de
0,5 % a 2 % del peso del medio de cristalización.

Los cristales de siembra se agregan en forma de sus-
pensión acuosa, por ejemplo suspendidos en el medio acuoso en
el que han de producirse los cristales de siembra, o secos,
20 por ejemplo en forma liofilizada. Si la insulina está presen-
te en forma amorfa precipitada sin el contenido necesario de
metal en el medio de cristalización, los cristales de siem-
bra pueden ser agregados junto con el metal que falta, por
ejemplo la suspensión acuosa de los cristales de siembra pue-
de contener el metal necesario.

25 Como se ha mencionado, la cristalización tiene lugar
a un pH comprendido entre 5 y 7 y dentro de este intervalo
lo más ventajoso es utilizar un valor de 5,3 a 6,5, según la
composición del medio de cristalización.

30 Si la diferencia entre d_i y d_p es pequeña, la can-
tidad de cristales de siembra en gramos será relativamente



1 grande. A título de ejemplo, siendo $d_i = 30$ micras y $d_p = 20$
micras, será necesario utilizar una cantidad en gramos de
cristales de siembra igual a aproximadamente el 40 % de la
cantidad de insulina que ha de ser cristalizada. Como por ra-
5 zones económicas y de otro tipo no es apropiado utilizar es-
tas grandes cantidades de cristales de siembra, se prefiere
que d_p sea considerablemente menor que d_i , de manera que la
cantidad de cristales de siembra sea solamente una pequeña
fracción de la cantidad de insulina a cristalizar. Así, si
10 $d_i = 30$ micras y $d_p = 10$ micras, la cantidad requerida de
cristales de siembra será solamente alrededor del 4 % de la
cantidad de insulina a cristalizar.

Se prefiere utilizar cristales de siembra pequeños,
por ejemplo de un tamaño de alrededor de 1 micra, pero tam-
15 bién pueden emplearse cristales de siembra mayores según el
tamaño de los cristales de insulina finales. Cuando se desea
producir cristales de insulina con un tamaño de unas 30 micras,
se obtendrán buenos resultados empleando cristales de siembra
con un tamaño de 1 a 7 micras aproximadamente, de preferencia
20 alrededor de 1 a 4 micras.

Los cristales de siembra pueden producirse sometien-
do la cosecha cristalina de insulina obtenida por métodos de
cristalización convencionales a una sedimentación fracciona-
da y seleccionando la fracción que contiene los cristales del
25 tamaño deseado. Sin embargo, los cristales de siembra pueden
producirse ventajosamente en la forma descrita en nuestra so-
licitud de patente estadounidense número de serie 468.542, .
presentada el 12 de Noviembre de 1954, basada en nuestra so-
licitud de patente danesa n° 3691/53, presentada el 13 de No-
30 viembre de 1953. De acuerdo con el método descrito en esta so



1 llicitudes de patente, se producen suspensiones de cristales
pequeños de insulina, cristales que se separan unos de otros
y forman cuerpos cristalinos individuales (libres) con propie-
dades de siembra, dejando que la insulina cristalice en un
5 medio acuoso en presencia de insulina liofilizada producida
de forma conocida, por ejemplo como la descrita en la obra
de Ear W. Flosdorf: Freeze-Drying, New York, 1949. Por lo de-
más, el proceso de cristalización se lleva a cabo de forma
conocida en presencia de un metal promotor de la cristaliza-
10 ción, preferiblemente cinc. Los cristales de insulina produ-
cidos de acuerdo con el método descrito en las solicitudes de
patente antes citadas son de un tamaño prácticamente unifor-
me, preferiblemente de alrededor de 1 a 7 micras.

15 Para ilustrar mejor el procedimiento de acuerdo con
la invención remitimos a los siguientes ejemplos:

EJEMPLO 1

Se disuelven 500 mg de insulina cristalina de pán-
creas de buey en 50 ml de agua conteniendo 0,6 ml de HCl 1N.
Después se añaden 50 ml de una solución reguladora contienien-
20 do 7 g de NaCl y 10 ml de una solución acuosa conteniendo
10 % de ácido cítrico, 0,4 % de cinc (como cloruro de cinc)
y NaOH suficiente para dar a la solución un pH de 6,3 apro-
ximadamente. Cuando sea necesario, el pH se ajusta a 6,0
aproximadamente. Antes de que comience la cristalización es-
25 pontánea, se añaden 2 ml de una suspensión de cristales de
siembra, cuya suspensión tiene la siguiente composición:
0,03 % de cristales de insulina de un tamaño de 3 micras o
menos, 2,5 mg por 100 ml de cinc (como cloruro de cinc), 2,5
mg por 100 ml de ácido cítrico, 0,08 % de p-oxibenzoato de
30 metilo y NaOH para dar un pH de 7,2 a 7,4. Después de agitar



1 moderadamente durante 10 a 20 horas, la cristalización es com-
pleta y los cristales tienen un tamaño de 4 a 25 micras apro-
ximadamente. Sin el proceso de siembra, se obtendrían unos
cristales con un tamaño comprendido entre unas 5 y 50 micras.
5 Por lo tanto, el proceso de siembra ha evitado la formación
de cristales de insulina entre 25 y 50 micras.

EJEMPLO 2

10 Se disuelven 500 mg de insulina amorfa de páncreas
de cerdo en 50 ml de agua conteniendo 6 ml de HCl 0,1N, se
añaden 15 ml de acetona y después 10 ml de una solución regu-
ladora conteniendo 10 % de ácido cítrico, 0,4 % de Zn (como
cloruro de cinc) y NaOH suficiente para dar a la solución re-
guladora un pH de 6,3 aproximadamente. Después se añade agua
15 hasta un volumen total de 100 ml. El pH se ajusta a 6,2 aproxi-
madamente con HCl. Antes de que comience la cristalización es-
pontánea, se añaden 2 ml de una suspensión de cristales de
siembra (2 a 3 micras), teniendo dicha suspensión la misma
composición que en el Ejemplo 1. Después de agitar cuidadosa-
mente durante 10 a 20 horas, la cristalización es completa y
20 la parte principal de la insulina ha cristalizado en forma de
cristales con un tamaño de 20 a 25 micras.

EJEMPLO 3

25 Se disuelven 1,12 g de insulina cristalina proceden-
te de páncreas de buey en 50 ml de agua conteniendo 10 mg de
Zn (como cloruro de cinc) y 2 ml de HCl 1N. Después se añaden
50 ml de una solución que contiene 7 g de NaCl y 1,7 ml
de NaOH 1N. Inmediatamente después se añaden 2,5 ml de una
suspensión de cristales de siembra con la misma composición
30 que en el Ejemplo 1. El pH se ajusta a 5,4-5,6. Después de agi-
tar durante 15 a 20 horas, la cristalización es completa. El



1 tamaño de los cristales es inferior a 30 micras y la parte principal de la insulina se encuentra en forma de cristales de este tamaño aproximadamente.

EJEMPLO 4

5 Se disuelven 1,6 g de insulina cristalina de páncreas de buey en 50 ml de agua conteniendo 10 mg de Zn (como cloruro de cinc) y 2 ml de HCl 1N. Después se añaden 50 ml de una solución reguladora que contiene 1,36 g de $\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 7 g de NaCl y 1 ml de NaOH 1N. Inmediatamente después se añaden 3,5 ml de una suspensión de cristales de siembra como la descrita en el Ejemplo 2. El pH se ajusta a 5,4-5,6. Después de agitar durante 15 a 20 horas, la cristalización es completa y la parte principal de la insulina ha cristalizado en forma de cristales de un tamaño de unas 30 micras.

15 EJEMPLO 5

Se disuelven 1,12 g de insulina cristalina de páncreas de buey en 50 ml de agua conteniendo 10 mg de Zn (como cloruro de cinc) y 2 ml de HCl 1N. Después se añaden 50 ml de una solución acuosa que contiene 1,36 g de $\text{ZH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 11,9 g de KBr y 1 ml de NaOH 1N. Inmediatamente después se añaden 2,5 ml de una suspensión de cristales de siembra como la descrita en el Ejemplo 2. El pH se ajusta a 5,4-5,6. Después de agitar durante 15 a 20 horas, la cristalización es completa. La parte principal de la insulina ha cristalizado en forma de cristales de un tamaño de unas 30 micras.

25 EJEMPLO 6

30 Se disuelven 1,6 g de insulina cristalina en 500 ml de agua conteniendo 100 mg de Zn (como cloruro de cinc) y 20 ml de HCl 1N. Después se añaden 500 ml de una solución reguladora que contiene 13,6 g de $\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 70 g de NaCl



1 y 10 ml de NaOH 1N. Después se añaden 1,8 ml de una suspen-
sión de cristales de siembra como la descrita en el Ejemplo 2.
El pH se ajusta a 5,4-5,6. Después de agitar durante 15 a 20
horas, la cristalización es completa. La parte principal de
5 la insulina ha cristalizado en forma de cristales de un ta-
maño de unas 40 micras.

EJEMPLO 7

Se disuelven 3,2 g de insulina cristalina en 50 ml
de una solución acuosa que contiene 20 mg de Zn (como cloru-
10 ro de cinc) y 3 ml de HCl 1N. Después se añaden 50 ml de una
solución acuosa que contiene 1,36 g de $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 7 g de
NaCl y 2 ml de NaOH 1N. Después se añaden 5 ml de una suspen-
sión de cristales de siembra que es, respecto a todos los consti-
tuyentes, diez veces más concentrada que la citada en el
15 Ejemplo 2. Después de unas 20 horas, la cristalización es com-
pleta. La parte principal de la insulina ha cristalizado en
forma de cristales de un tamaño de unas 15 micras.

EJEMPLO 8

20 La cristalización de la insulina se realiza como se
ha descrito en el Ejemplo 4, pero en lugar de agregar 3,5 ml
de una suspensión de cristales de siembra, se añade una canti-
dad equivalente en forma de polvo liofilizado. Mediante este
procedimiento, se obtiene el mismo tamaño de cristales que en
el Ejemplo 4.

25 El procedimiento de la invención puede emplearse en
conexión con los procedimientos para producir preparados de
insulina inyectables con efecto prolongado citados en la soli-
citud de patente estadounidense copendiente número de serie
219.127 y también descritos en la patente belga nº 502.327.
30 En este caso, el procedimiento de la invención se lleva a ca-



2 MAR. 1974

1 bo de manera que se obtienen suspensiones estériles con un
contenido de insulina predeterminado por unidad de volumen,
preferiblemente 20, 40 u 80 unidades por mililitro, un conte-
5 nido suficiente de isotónicos y un agente preservativo y,
además, con un contenido de uno o más metales promotores de
la cristalización superior al límite inferior citado en la
solicitud de patente estadounidense nº de serie 219.127, es
decir, como mínimo $11 \times A \times 10^{-3}$ miliequivalentes por litro,
donde A es el número de unidades internacionales de insulina
10 por mililitro de suspensión. Finalmente, como regulador de la
cristalización no debe hacerse uso de sustancias cuyos anio-
nes se combinen con los metales promotores de la cristaliza-
ción en condiciones neutras. El preparado inyectable de insu-
lina obtenido por este método comprende un medio acuoso con
15 cristales de insulina suspendidos en el mismo, conteniendo di-
cho medio y dichos cristales en cantidades no tóxicas por lo
menos un metal seleccionado entre el grupo formado por cinc,
cobalto, níquel, cadmio, cobre, manganeso y hierro, siendo
el contenido de metal de los cristales suspendidos de 0,25 mi-
20 liequivalentes como mínimo por gramo de cristales cuando di-
cho preparado tiene un pH de 7 aproximadamente y siendo la
parte principal en peso de dichos cristales de un tamaño sus-
tancialmente uniforme.

25 Entre los metales citados antes, el cinc es el metal
preferido y los cristales suspendidos de insulina contienen
preferiblemente alrededor de 1 a 2,7 % de cinc cuando el pre-
parado tiene un pH de 7 aproximadamente.

30 El siguiente ejemplo ilustra como puede ponerse en
práctica el procedimiento de acuerdo con la invención:



1

EJEMPLO 9

5

10

15

20

25

30

Se disuelven 1,6 g de insulina cristalina en 50 ml de agua conteniendo 10 mg de cinc (como cloruro de cinc) y 2 ml de HCl 1N. La solución se filtra estérilmente y el material filtrado se lava con 25 ml de agua. A los 75 ml del filtrado se añaden 25 ml de una solución reguladora preparada en condiciones asépticas y conteniendo 1,36 g de $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 7 g de NaCl y 1 ml de NaOH 1N. Después se añaden 3,5 ml de una suspensión de cristales de siembra preparada en condiciones asépticas y con la misma composición que en el Ejemplo 2. El pH se ajusta a 5,5. Después de agitar durante 15 a 20 horas, la cristalización es completa. La parte principal de la insulina ha cristalizado en forma de cristales de un tamaño de unas 30 micras.

La suspensión de cristales se transfiere a un preparado inyectable, listo para uso, diluyéndola con 900 ml de una solución, preparada en condiciones asépticas y conteniendo 70 mg de cinc (como cloruro de cinc), 0,11 % de p-oxibenzoato de metilo y 2,7 ml de NaOH 1N. El pH debe ser alrededor de 7,3, y la suspensión se ajusta a este valor del pH mediante NaOH o HCl 0,1N.

El preparado final contiene 40 unidades internacionales de insulina por mililitro y los cristales suspendidos de insulina contienen alrededor de 2,6 % de cinc.

Por el procedimiento de acuerdo con la invención es posible producir cristales de insulina con un tamaño prácticamente uniforme dentro de un amplio intervalo. Sin embargo, como el objeto principal de la invención es producir cristales de insulina especialmente adecuados como constituyentes de preparados terapéuticos que comprenden suspensiones acuo-



1 sas de cristales de insulina y como esto implica que los cris-
tales no deben sedimentarse tan rápidamente que las dosis de
insulina tomadas de una ampolla después de un intervalo de
sacudida esta última no contengan la cantidad prescrita de
5 insulina por mililitro debido a la sedimentación de algunos
de los cristales, es conveniente que los cristales sean ma-
yores de unas 40 micras. Por otra parte, parece que los cris-
tales muy pequeños de insulina producen un efecto prolongado
reducido. Por lo tanto, no es apropiado utilizar cristales
10 menores de unas 10 micras. A la vista de ello, se prefiere
que la parte principal en peso de los cristales de insulina
tenga un tamaño sustancialmente uniforme comprendido entre
10 y 40 micras cuando los cristales han de ser utilizados
en suspensiones acuosas inyectables de cristales de insulina.

15 En resumen, la Patente de Introducción que se solici-
ta deberá recaer sobre las siguientes:

REIVINDICACIONES

20 1. Un procedimiento de producción de una suspen-
sión acuosa de cristales de insulina de un tamaño predetermi-
nado sustancialmente uniforme, que consiste en establecer
un medio acuoso que contiene insulina disuelta en el mismo y
que puede contener opcionalmente un ión halógeno seleccionado
entre el grupo formado por cloruro, bromuro y yoduro a una
25 concentración superior a 0,2 moles por litro o un metal se-
leccionado entre el grupo formado por cinc, cobalto, níquel,
cadmio, cobre, manganeso y hierro, siendo el contenido de me-
tal de los cristales suspendidos como mínimo de 0,25 miliequi-
valentes por gramo de cristales cuando dicha suspensión está
a un pH de aproximadamente 7; y ajustar el pH de dicho medio
a un valor comprendido entre 5 y 7 mientras se siembra el me-

30

22 MAR. 1974

1 dio con cristales de insulina en una cantidad correspondiente a la ecuación:

$$P = I \times \frac{d_p^3}{d_i^3 - d_p^3}$$

5 donde P es la cantidad en gramos de los cristales de siembra añadidos, I es la cantidad en gramos de insulina que ha de ser cristalizada, d_p es el tamaño en micras de los cristales de siembra y d_i es el tamaño predeterminado sustancialmente uniforme en micras, con el que la principal proporción de los cristales de insulina cristaliza del medio.

10

2. Un procedimiento según la Reivindicación 1, donde el tamaño de los cristales producidos oscila aproximadamente entre 10 micras y 40 micras.

15

3. Un procedimiento según la Reivindicación 1, donde los cristales del medio contienen cinc en cantidades no tóxicas y el contenido de cinc de los cristales suspendidos es alrededor de 1 a 2,7 % en peso cuando la suspensión tiene un pH de 7 aproximadamente.

20

4. Un procedimiento según la Reivindicación 1, caracterizado por disolver en condiciones asépticas insulina cristalina en un medio acuoso acidulado, conteniendo cinc, con un pH inferior a 5, agregar una solución reguladora estéril que contiene acetato sódico y cloruro sódico, siendo agregado el cloruro sódico en una cantidad tal que la concentración de ión cloro es superior a 0,2 moles por litro, ajustar el pH de la mezcla a un valor de 5,3-6,5 y agregar a dicha mezcla, antes de que comience la cristalización y en condiciones asépticas, cristales de insulina de un tamaño sustancialmente uniforme no superior a 10 micras y en una cantidad correspondiente a la ecuación:

25

30



22 MAR. 1974

1

$$P = I \times \frac{d_p^3}{d_i^3 - d_p^3}$$

5

donde P es la cantidad en gramos de los cristales de siembra
añadidos, I es la cantidad en gramos de insulina que ha de
ser cristalizada, d_p es el tamaño en micras de los cristales
de siembra y d_i es el tamaño predeterminado sustancialmente
uniforme en micras, con lo que la mayor proporción de la in-
sulina cristaliza del medio, no pasando d_p de 10 micras y
siendo d_i alrededor de 30 micras.

10

5. Un procedimiento según la Reivindicación 1,
donde la insulina procede de glándulas de páncreas de cerdo.

15

6. Se reivindica por último como objeto sobre
el que ha de recaer la patente de introducción que se soli-
cita: UN PROCEDIMIENTO DE PRODUCCION DE UNA SUSPENSION ACUO
SA DE CRISTALES DE INSULINA DE UN TAMAÑO PREDETERMINADO SUS
TANCIALMENTE UNIFORME.

20

Todo conforme queda descrito y reivindicado en la
presente memoria descriptiva que consta de dieciocho páginas
mecanografiadas.

Madrid, 22 marzo 1.974

BERNARDO UNGRIA
p.p.

25

30