



INT. CL. **425 112**
BOLD, A 61K

MEMORIA DESCRIPTIVA

correspondiente a la solicitud de concesión de una,

PATENTE DE INTRODUCCION

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

RESIDENCIA: Avd. Pío XII, nº 99 MADRID.

ENUNCIADO: "UN PROCEDIMIENTO PARA PRODUCIR CRIS-
TALES DE INSULINA".

Prioridad: Patente n.º del.....

AR



1 Esta invención se refiere a preparados de insulina, de los cuales pueden obtenerse cristales de insulina con seguridad y buenos rendimientos y al procedimiento de producción de estos cristales.

5 Anteriormente se han obtenido cristales de insulina, primero por Abel y posteriormente por otros. Sin embargo, solamente han conseguido obtener en forma cristalina un pequeño porcentaje de la insulina presente en sus preparados y sus métodos de obtención de cristales eran en gran parte empíricos y de éxito incierto.

10 Hemos descubierto como producir cristales de insulina a partir de insulina no cristalina con certidumbre y con altos rendimientos. Hemos encontrado que para producir cristales de insulina con seguridad y altos rendimientos, es necesario que haya presente un metal del grupo constituido por cinc, níquel, cobalto y cadmio, en gran cantidad.

15 Por lo tanto, la invención consiste fundamentalmente en garantizar la presencia de uno cualquiera de estos metales en amplias cantidades en una solución o suspensión de insulina, de la que puede cristalizarse la insulina.

20 Los cristales de insulina que hemos obtenido contienen este metal en aproximadamente las siguientes proporciones, tomadas como la media de un número de determinaciones:

25 Cristales de insulina obtenidos con cinc - 0,52 % de cinc.

 Cristales de insulina obtenidos con cadmio - 0,77 % de cadmio.

 Cristales de insulina obtenidos con cobalto - 0,44 % de cobalto.

 Cristales de insulina obtenidos con níquel - 0,41 % de níquel.

30 Si el peso molecular de la insulina se toma como aproximadamente 40.000, que es el intervalo comúnmente aceptado para la misma, las cifras que acabamos de dar concuerdan con



1 la presencia en la insulina de 3 átomos de cualquiera de los
metales citados. Sin embargo, aunque creemos que existen in-
dicios de que se produce cierto tipo de combinación entre la
insulina y el metal en la formación de los cristales, no
5 avanzamos aquí ninguna teoría en este aspecto.

En la puesta en práctica de esta invención, se forma
cualquier solución o suspensión deseada de insulina. Conve-
nientemente, se prepara una solución que se encuentra consi-
derablemente al lado ácido del punto isoeléctrico de la in-
10 sulina; por ejemplo mediante la presencia en la solución de
insulina de uno o más agentes reguladores del pH, tales co-
mo acetatos o fosfatos de sodio, potasio o amonio y una
cantidad de ácido, por ejemplo ácido clorhídrico o acético,
como la necesaria para obtener una concentración de ión hi-
15 drógeno que dé un pH de 2 a 4 aproximadamente. Sin embargo,
es posible preparar una solución o suspensión en el lado al-
calino del punto isoeléctrico, si así se desea. Asimismo,
para obtener buenos rendimientos, con frecuencia es conve-
niente, como cuando se utiliza un regulador de sodio o pota-
20 sio, agregar una pequeña cantidad de una sustancia que re-
duzca la tensión superficial de la solución o suspensión,
como por ejemplo acetona, saponina o alcohol propílico, bu-
tílico o amílico, pero esto no es conveniente con algunos
otros reguladores del pH.

25 Entonces, a no ser que haya ya presente una cantidad
suficiente del metal o metales deseados, del grupo formado
por cinc, cobalto, níquel y cadmio, se añade una cantidad
suficiente de los mismos, en el mejor de los casos cinc, pa-
ra que la concentración total de dichos metales en la solu-
30 ción o suspensión, con respecto al peso seco de insulina



1 presente, sea por lo menos del orden de la concentración del
metal en los cristales de insulina y convenientemente de 3 a
5 veces mayor que la citada concentración. Esto significa,
5 en otras palabras, que si solamente está presente uno de di-
chos metales, su concentración en la solución o suspensión
debe ser tal que el número de gramos de metal por 100 gramos
de peso seco de insulina presente sea por lo menos el peso
atómico del metal multiplicado por 0,007-0,008 aproximadamen-
te y que convenientemente sea de 3 a 5 veces esa cantidad.
10 Una aproximación conveniente para las concentraciones míni-
mas de metal antes citadas es alrededor del 0,5 % del peso
seco de la insulina. Si está presente más de uno de dichos
metales, sus concentraciones individuales pueden ser, por
supuesto, proporcionalmente menores.

15 El metal puede ser agregado en forma de cualquier sal
adecuada, como el cloruro o el acetato o puede ser agregado
en forma metálica. Incluso es posible realizar esa adición
y conseguir una cantidad suficiente de metal presente efec-
tuando el procedimiento en vasijas fabricadas o que contengan
20 el metal deseado o haciendo pasar el preparado a través
de tuberías realizadas con dicho metal o que lo contengan.

25 Además de cerciorarse de que está presente la canti-
dad necesaria de cinc, cobalto, níquel o cadmio, también hay
que cerciorarse de que la concentración final de ión hidró-
geno en el preparado de insulina está comprendida dentro de
los límites de formación de los cristales de insulina. El
mejor intervalo está comprendido habitualmente entre pH 5,8
y 6,5 aproximadamente. Puede obtenerse una concentración fi-
nal de ión hidrógeno dentro del intervalo deseado por cual-
30 quier medio adecuado, por ejemplo mediante selección apropia-



1 da de los reactivos en cuanto a sus características de aci-
dez o basicidad o por adición de un ácido o una base adecua-
dos tales como ácido clorhídrico o acético o hidróxido sódico
5 se ha obtenido la concentración final deseada de ión hidró-
geno, el preparado se deja en reposo durante varias horas,
durante las cuales se forman cristales de insulina. Los cris-
tales así formados pueden ser separados, por filtración, de-
cantación o centrifugación y después lavados con agua, seca-
dos y preservados.
10

A continuación damos un ejemplo de este procedimiento general:

15 Se prepara una solución reguladora de fosfato conte-
niendo 335 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ y 55 g de KH_2PO_4 en 20 litros
de agua destilada. La concentración de ión hidrógeno es tal
que el pH es alrededor de 7,2. Se miden 2500 cc de esta solu-
ción en una vasija de vidrio y a la misma se añade un volu-
men igual de agua destilada junto con 200 cc de HCl 1 N, de
20 manera que la concentración de ión hidrógeno sea de pH 2,3
aproximadamente. Después se añaden 200 cc de una solución de
insulina conteniendo 30 mg de insulina (15 a 20 unidades por
mg) por centímetro cúbico, seguido de 50 cc de una solución
acuosa al 0,5 % de ZnCl_2 y 500 cc de acetona. Entonces se
25 ajusta la acidez de la solución a pH 6,2 aproximadamente por
adición de 150 cc de NH_4OH 1 N. La preparación se deja en re-
poso a la temperatura ambiente durante 4 a 6 horas y después
se introduce en un frigorífico durante unos 2 días. A conti-
nuación, los cristales formados se separan del líquido que
sobrenada por decantación y se centrifugan, se lavan con
30 agua y se secan a vacío. Empleando este procedimiento, se



1 obtienen rendimiento de hasta alrededor del 90 % de la insulina original en forma de cristales.

Si se desea, puede efectuarse una recristalización. Ventajosamente se emplea un regulador de acetato, por ejemplo acetato amónico, con objeto de reducir al mínimo la formación de sales metálicas insolubles indeseables. El preparado de cristales que ha de ser sometido a recristalización se disuelve en ácido acético N/3 suficiente para que cada litro de solución contenga 2,0 g de estos cristales. A cada 500 cc de esta solución se añade un volumen aproximadamente igual de NH_4OH N/3 de forma que la acidez de la mezcla resultante es de pH 6,1 aproximadamente. Esta mezcla se deja en reposo a la temperatura ambiente durante 4 a 6 horas y después en un frigorífico durante unos 2 días y los cristales formados se separan, se lavan con agua y se secan a vacío, como antes.

Los cristales de insulina obtenidos por este procedimiento están prácticamente exentos de proteínas extrañas y de otros contaminantes. Estas impurezas pueden encontrarse presentes en algunos preparados comerciales de insulina y en algunos casos producen efectos indeseables en el paciente, por ejemplo debido a cierta sensibilidad del paciente a estas impurezas. Así, mediante la administración de cristales de insulina en solución o de otra forma, es posible evitar en gran medida y con frecuencia por completo cualquier efecto secundario en estos pacientes sensibles.

Para la inyección, pueden formarse soluciones o suspensiones de los cristales de insulina en cualquier líquido conveniente, tal como simplemente agua, con o sin adición de otras sustancias. La concentración de ión hidrógeno en la solución se mantiene deseablemente en el lado ácido del punto



1 isoelectrico de la insulina, por ejemplo entre pH 2 y 4.

En resumen, la Patente de Introducci3n que se solicita deber3 recaer sobre las siguientes:

REIVINDICACIONES

5 1. Un procedimiento para producir cristales -
de insulina, a partir de una soluci3n o suspensi3n de in-
sulina formada con insulina no cristalina y que contiene in-
sulina y por lo menos un metal del grupo formado por cinc,
cobalto, niquel y cadmio, estando el metal presente en can-
10 tidad suficiente, en proporci3n a la insulina, para producir
con certeza un alto rendimiento de cristales de insulina y
ajustar el preparado a un pH comprendido entre 5,8 y 6,5 para
provocar la formaci3n de cristales de insulina.

15 2. Un procedimiento segun la Reivindicaci3n 1, que con-
siste en formar una soluci3n de insulina y aadir a la misma
una cantidad de un metal del grupo formado por cinc, cobalto,
niquel y cadmio, suficiente para obtener una concentraci3n
de este metal tal que el nmero de gramos del metal por 100
gramos de peso seco de insulina presente sea por lo menos
20 igual al peso at3mico del metal multiplicado por 0,007.

25 3. Un procedimiento segun la Reivindicaci3n 1, que con-
siste en formar una soluci3n de insulina, aadir a la misma
una cantidad de un metal del grupo formado por cinc, cobalto,
niquel y cadmio, suficiente para obtener una concentraci3n de
dicho metal tal que el nmero de gramos de metal por cada
100 gramos de peso seco de insulina presente sea por lo me-
nos igual al peso at3mico del metal multiplicado por 0,007
y ajustar la soluci3n a pH 5,8 a 6,5 aproximadamente para pro-
vocar la formaci3n de cristales de insulina.

30 4. Un procedimiento segun la Reivindicaci3n 1, que con





- 8 APR

1 siste en formar con insulina no cristalina una solución o
suspensión que contiene insulina y una cantidad por lo me-
nos suficiente de un metal del grupo formado por cinc, co-
balto, níquel y cadmio, para ser igual al 0,5 % del peso se-
5 co de la insulina.

5. Un procedimiento según la Reivindicación 1, que
consiste en formar una solución o suspensión de insulina no
cristalina, que contiene insulina y una cantidad de un metal
del grupo formado por cinc, cobalto, níquel y cadmio, por lo
10 menos suficiente para ser igual al 0,5 % del peso seco de la
insulina y ajustar la solución a un pH de 5,8 a 6,5 aproxima-
damente para provocar la formación de cristales de insulina.

6. Un procedimiento según la Reivindicación 1, que con-
siste en formar con insulina no cristalina una solución o
15 suspensión a pH regulado, cuya concentración de ión hidróge-
no se encuentra en el lado ácido del punto isoelectrico de
la insulina y que contiene insulina y por lo menos una can-
tidad de un metal del grupo formado por cinc, cobalto, ní-
quel y cadmio suficiente para ser igual al 0,5 % como mínimo
20 del peso seco de la insulina.

7. Un procedimiento según la Reivindicación 1, que con-
siste en formar con insulina no cristalina una solución o
suspensión a pH regulado, cuya concentración de ión hidróge-
no se encuentra en el lado ácido del punto isoelectrico de la
25 insulina y que contiene insulina y una cantidad de un metal
del grupo formado por cinc, cobalto, níquel y cadmio por lo
menos suficiente para ser igual al 0,5 % como mínimo del pe-
so seco de la insulina y ajustar la solución a pH 5,8 a 6,5
aproximadamente para provocar la formación de cristales de
30 insulina.



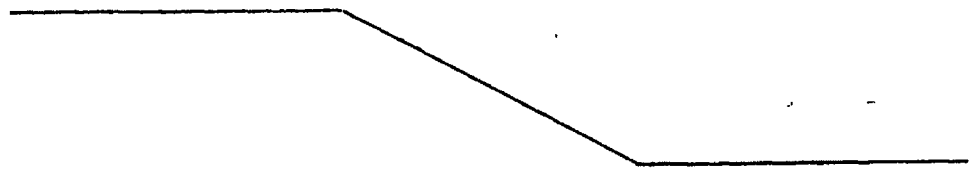


1 8. Un procedimiento según la Reivindicación 1, que
consiste en formar con insulina no cristalina una solución o
suspensión de pH regulado, cuya concentración de ión hidró-
5 geno se encuentra en el lado alcalino del punto isoeléctrico
de la insulina y que contiene insulina y una cantidad de un
metal del grupo formado por cinc, cobalto, níquel y cadmio,
por lo menos suficiente para ser igual al 0,5 % como mínimo
del peso seco de la insulina.

10 9. Un procedimiento según la Reivindicación 1, que con-
siste en formar con insulina no cristalina una solución o
suspensión a pH regulado, cuya concentración de ión hidró-
geno se encuentra en el lado alcalino del punto isoeléctrico
de la insulina y que contiene insulina y una cantidad de un
15 metal del grupo formado por cinc, cobalto, níquel y cadmio,
por lo menos suficiente para ser igual al 0,5 % como mínimo
del peso seco de la insulina y ajustar la solución a pH 5,8
a 6,5 aproximadamente para provocar la formación de crista-
les de insulina.

20 10. Un procedimiento según la Reivindicación 1, que
consiste en formar una solución de insulina y añadir a la
misma una cantidad suficiente de un metal del grupo formado
por cinc, cobalto, níquel y cadmio para producir cristales
de insulina con seguridad.

25 11. Se reivindica por último como objeto sobre el
que ha de recaer la Patente de Introducción que se solicita:
"UN PROCEDIMIENTO PARA PRODUCIR CRISTALES DE INSULINA".





1 Todo conforme queda descrito y reivindicado en
la presente Memoria descriptiva que consta de diez páginas
mecnografiadas.

Madrid, 8 de Abril de 1.974

5 BERNARDO UNGRIA

P.P.

10

15

20

25

30