



(10) ES	(11) NUMERO 436.398	(10) A 1
	(22) FECHA DE PRESENTACION 8-4-75	

P.- 59.598

PATENTE DE INVENCION

HOE 74/F 114K

(30) PRIORIDADES:	(32) FECHA	(33) PAIS
(31) NUMERO		
P 24 18 218.1	13-4-74	Rep.Fed.AL.
P 24 59 515.1	17-12-74	Rep.Fed.AL.

(47) FECHA DE PUBLICIDAD	(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL A61K	(62) PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
--------------------------	--	--

(54) TITULO DE LA INVENCION

"PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE UN PREPARADO DE INSULINA"

(71) SOLICITANTE (S)

HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT

DOMICILIO DEL SOLICITANTE

6230 Frankfurt/Main 80, República Federal Alemana

(72) INVENTOR (ES)

Dr. Adolf Mager, Dr. Hans-Hermann Schöne, Dr. Rolf Geiger, y
Dr. Wolfgang Burgermeister.

(73) TITULAR (ES)

(74) REPRESENTANTE

D. FERNANDO DE ELZABURU MARQUEZ

Para la producción de preparados de insulina con efecto de liberación retardada se seguían hasta ahora dos caminos; o bien se agregaban a la insulina, además de iones zinc, compuestos con liberación retardada tales como
5 clorhidrato de bis-(4-amino-quinaldin-6-)-N,N'-urea, globi-
na o protamina, o bien se utilizaban suspensiones de insu-
lina cristalina o amorfa.

El efecto de la insulina de las suspensiones cris-
talinas se inicia lentamente y con frecuencia dura demasiado
10 tiempo. Por el contrario, el efecto de una suspensión de
insulina amorfa se inicia rápidamente, pero termina demasia-
do pronto.

Por lo tanto se ha combinado también insulina
cristalizada e insulina amorfa, con el fin de obtener un
15 perfil más favorable de la curva de tiempo-efecto. No obs-
tante, tal combinación no siempre constituye un principio
eficaz de liberación retardada ya que según las costumbres
gastronómicas en los diversos países, frecuentemente, la
actividad inicial de la insulina se inicia con demasiada
20 lentitud y la duración del efecto se mantiene durante dema-
siado tiempo. Con el fin de solucionar este problema, se ha
utilizado entonces también la combinación de insulina cris-
talizada con insulina disuelta, obteniéndose un éxito.

No obstante, en tales combinaciones debe asegurarse
25 se que en el transcurso del almacenamiento no se produzca

ninguna transformación de insulina disuelta en insulina cristalina. Esto se impedía hasta ahora utilizando insulinas de diferentes especies, por ejemplo insulina de vacuno cristalina e insulina de porcino disuelta.

5 Sin embargo, tal combinación posee la desventaja de que provoca también la formación de anticuerpos contra ambas especies. Desde hace algunos años se ha comenzado a utilizar insulinas de una sola especie, ya que entonces, al aparecer una resistencia a la insulina debida a causas
10 inmunológicas, se puede pasar a utilizar otra insulina que hasta entonces no había sido utilizada todavía, por ejemplo puede pasarse de insulina de vacuno a insulina de porcino. Esta posibilidad se suprime en el caso de utilizarse combinaciones de insulinas de diferentes especies.

15 Se ha encontrado ahora que puede mezclarse des-fenilalanin^{B1}-insulina disuelta con cristales de insulina completa de la misma especie para formar una combinación estable, sin que se produzca una transformación de des-fenilalanin^{B1}-insulina (Des-Phe^{B1}-insulina) en estado di-
20 suelto a estado cristalino.

Ya que la des-fenilalanin^{B1}-insulina, excepto la fenilalanina ausente, posee las mismas agrupaciones inmunógenas que la correspondiente insulina completa, ambas insulinas constituyen un sistema estable de dos fases (cristalina/
25 disuelta) con las propiedades inmunológicas de una insulina

de una sola especie.

Para la estabilidad de los preparados tiene importancia decisiva el contenido total de zinc en solución y en suspensión de cristales. Este contenido debe encontrarse
5 entre 25 y 80 mcg/100 U.I. de insulina.

Por consiguiente, son objeto del invento preparados de insulina a base de insulina cristalina en suspensión acuosa, que están caracterizados porque contienen des-Bl-fenilalanin-insulina disuelta de la misma especie y en total
10 25-80 mcg iones zinc por 100 U.I. de insulina.

La proporción de insulina cristalizada a Des-Phe-insulina disuelta determina el perfil de la curva de tiempo-efecto. Puede encontrarse entre 60:40 y 90:10 y preferiblemente es de 80:20 hasta 90:10. El contenido total de insulina del preparado es convenientemente de 40-100 U.I./ml.
15 La suspensión es ajustada a un valor de pH de 6,8-7,2, preferiblemente pH 6,8-7,0, y contiene 25-80 mcg de iones zinc por 100 U.I.

Objeto del invento es además un procedimiento para
20 la producción del mencionado preparado, que está caracterizado porque se combina una suspensión de cristales de insulina con una solución de Des-Phe-insulina de la misma especie. Este procedimiento se realiza por ejemplo del siguiente modo:

25 1) Para la preparación de la suspensión de cristales de insulina.

(Componente cristalino del preparado terminado) se cristaliza en

primer término insulina a partir de un tampón que contiene iones zinc. De este modo se obtienen cristales de insulina de tamaño uniforme de 15-35 μ , que poseen un contenido de zinc de 0,3 - 1,0%.

5 Los cristales, después de separación de las aguas madres, son suspendidos en una solución tampón, cuyo volumen está dosificado de modo tal que la suspensión es ajustada a un contenido definido de insulina dentro del margen de 40-100 U.I./ml. La solución tampón contiene una cantidad
10 tal de iones zinc, por ejemplo en forma de cloruro de zinc, que el contenido total de zinc de la suspensión de cristales ajustada a 40-100 U.I./ml asciende a 30-80 mcg/100 U.I. La solución tampón contiene, además de ello, también sales,
15 tales como acetato de sodio, convenientemente en una concentración de 0,1 - 0,2%, cloruro de sodio, convenientemente en una concentración de 0,5 - 1%, así como agentes de conservación, tales como éster metílico de ácido 4-hidroxibenzoico, convenientemente en una concentración de aproximadamente 0,1%, y es ajustada con lejía de sosa a un valor de
20 pH dentro del margen de pH 6,8-7,2 preferiblemente de pH 6,8 - 7,0.

25 2) Para la preparación de la solución de Des-Phe insulina de la misma especie (componente disuelto del preparado terminado) se disuelve en un líquido de solución una cantidad de Des-Phe-insulina seca cristalizada que tiene un

contenido de zinc de 0,3 - 0,7% tal que la solución posee un contenido definido de Des-Phe-insulina dentro del margen de 40-100 U.I./ml. El líquido de solución contiene una cantidad de iones zinc, por ejemplo en forma de cloruro de zinc, tal que todo el contenido de zinc de la solución es de 25-40 mcg/100 U.I. El líquido de solución contiene además de ello cloruro de sodio y éster metílico de ácido 4-hidroxibenzoico, así como cantidades de ácido acético y de ácido clorhídrico suficientes para disolver la Des-Phe-insulina. Después de filtración estéril, la solución de Des-Phe-insulina es ajustada con lejía de sosa a un valor de pH dentro del margen de pH 6,8 - 7,2, preferiblemente de pH 6,8 - 7,0. Después de ello la solución tiene los mismos contenidos de cloruro de sodio, acetato de sodio y éster metílico de ácido 4-hidroxibenzoico que la solución tampón descrita en el apartado 1).

3). Para la producción de preparados de insulina de liberación retardada dispuestos para el envasado se mezclan el componente cristalino descrito en el apartado 1) y el componente disuelto descrito en el apartado 2), utilizándose cristales de insulina y Des-Phe-insulina disuelta de la misma especie. La proporción en volumen de componente cristalino: componente disuelto es de 60:40 hasta 90:10, preferiblemente de 80:20 hasta 90:10. El contenido total de insulina es de 40-100 U.I./ml. El contenido de zinc del

preparado terminado depende de la proporción de mezcla de los dos componentes, y asciende a 25-80 mcg/100 U.I.; el valor del pH se encuentra dentro del margen de pH 6,8 - 7,2, preferiblemente de 6,8 - 7,0.

5 El preparado según el invento posee un efecto de liberación retardada de insulina de mayor duración y equilibrado. Está inalterado en lo que se refiere a su estado físico y al efecto biológico incluso después de almacenamiento durante un año a 4-8°C y a 25°C.

10 El preparado encuentra utilización como insulina de liberación retardada en el tratamiento de la Diabetes mellitus. Es especialmente indicado para reacondicionar pacientes cuando debe impedirse que se formen anticuerpos contra varias especies de insulina.

15 Los siguientes ejemplos explican la producción de los preparados según el invento.

Ejemplo 1.

20 A. Preparación de la suspensión de cristales de insulina de vacuno.

25 16 g de insulina cristalina pura de vacuno con una actividad mínima de 25 U.I./mg calculado sobre sustancia seca son disueltos en 750 ml de ácido clorhídrico 0,02 N, que contienen 0,0133 de iones zinc en forma de cloruro de zinc. A esta solución de insulina se agregan 250 ml de una

solución, que contiene 0,95% de ácido acético glacial y 2,8% de cloruro de sodio. Luego, la mezcla transparente es dejada libre de bacterias (esterilizadas) por filtración de modo estéril mediante una capa de membrana. A la solución
5 filtrada de modo estéril se agrega una cantidad de una lejía de sosa 4 N estéril tal que se alcanza un valor de pH entre 5,4 y 5,8. La suspensión de insulina amorfa obtenida es agitada durante corto tiempo en condiciones estériles a la temperatura ambiente y después de ello es ajustada en la nevera a ± 4 hasta $\pm 7^{\circ}\text{C}$ para la cristalización.
10

Después de 36 a 40 horas como máximo se han formado cristales romboédricos estructurados de un modo uniforme con un tamaño homogéneo entre 15 y 35 μ . Los cristales son separados por centrifugación en vasos estériles con bajo número de vueltas, siendo separadas las pequeñas porciones amorfas eventualmente existentes todavía. Luego el producto
15 cristalizado separado por centrifugación es suspendido de nuevo en 7 litros de una solución de dilución de insulina neutra, tamponada y estéril (para su composición véase la
20 Tabla 1) (suspensión de base).

Tabla 1.

Composición de la solución de dilución de insulina:

En 10 litros de solución están contenidos:

25 10 g de éster metílico de ácido 4-hidroxibenzoico = 0,1%

14 g de acetato de sodio . $3H_2O$	= 0,14%
75 g de cloruro de sodio	= 0,75%
105 mg de cloruro de zinc ($ZnCl_2$)	= 5,0 mcg de Zn^{++}/ml

5

Lejía de sosa hasta pH 6,9

La solución es filtrada de modo estéril.

Determinación del contenido de cristales de insulina en la suspensión de base.

10

Para la determinación del contenido de cristales de insulina en la suspensión de base se toma la suspensión de cristales, después de un mezclado intenso con ayuda de un agitador magnético, 4 veces cada vez en cantidad de 10 ml (pipeta llena) y el contenido de insulina se determina según los siguientes métodos:

15

- 1) Por gravimetría después de secado con acetona y éter y pesada.
- 2) Después de disolver los cristales, por espectrofotometría en U.V. a 280 nm
- 3) Por determinación del contenido de N.

20

Preparación del componente de liberación retardada que contiene 40 U.I./ml.

25

De acuerdo con el contenido determinado de insulina en la suspensión de base, ésta es ajustada luego, por adición de más cantidad de solución de dilución estéril, al deseado contenido de insulina de 40 U.I./ml. Rendimiento má-

ximo 10 litros.

B. Preparación del componente disuelto de Des-Phe-insulina de vacuno.

5 6,304 g de Des-Phe-insulina de vacuno cristalizada se disuelven en 3,5 litros de un líquido de solución con la composición indicada en la Tabla 2.

Tabla 2.

Composición del líquido de solución de Des-Phe-insulina

10 En 5 litros de solución están contenidos:

5 g de éster metílico de ácido 4-hidroxibenzoico	= 0,1%
2,85 ml de ácido acético (proporciona 0,14% de acetato de sodio. $3H_2O$)	
37,5 g de cloruro de sodio	= 0,75%
15 21 mg de cloruro de zinc (anhidro)	= 20 mcg Zn ⁺⁺ /ml

5 ml de ácido clorhídrico 4 N.

20 La solución transparente de la Des-Phe-insulina es luego liberada de bacterias (esterilizada) mediante un filtro de membrana y, por adición de 400 ml de líquido de solución que había sido hecho pasar después de la filtración de insulina a través del mismo filtro estéril, es llevada hasta un volumen de 3,9 litros. Por adición de lejía

25 de sosa estéril 4 N se ajusta un valor de pH de 6,9 (consumó aproximadamente 13 ml). Añadiendo 34 ml más de una solu-

ción de dilución de insulina, neutra y estéril (para su composición véase la Tabla 1) se ajusta un volumen final de 3,947 litros y un contenido de insulina de 40 U.I./ml, estableciéndose como base una actividad de la Des-Phe-insulina de 25 U.I./mg.

5

C. Producción del preparado dispuesto para el envasado.

Mezclando el componente de liberación retardada preparado de acuerdo con A, que contiene cristales de insulina de vacuno, con el componente preparado de acuerdo con B, que contiene Des-Phe-insulina de vacuno disuelta, en la proporción en volumen 80:20, se obtiene un preparado que contiene 32 U.I./ml de insulina cristalina y 8 U.I./ml de Des-Phe-insulina disuelta, es decir en total 40 U.I./ml de insulina. La suspensión es envasada de modo estéril en frasquitos cada uno de 10 ml.

10

15

Ejemplo 2.

A. Preparación de la suspensión de cristales de insulina de porcino

20

Una suspensión estéril con 16 g de cristales de insulina de porcino con un tamaño de 15-35 μ , que habían sido cristalizados a pH 5,4 - 5,8 a partir de un tampón apropiado, de un modo análogo al Ejemplo 1, es centrifugada.

25

Después de decantación de la porción sobrenadante, los cris-

tales son suspendidos de nuevo en 7 litros de solución de dilución de insulina neutra, tamponada y estéril (suspensión de base) (para su composición véase la Tabla 3).

5 Tabla 3.

Composición de la solución de dilución de insulina.

En 10 litros de solución están contenidos:

	10 g de éster metílico de ácido 4-hidroxibenzoico	= 0,1%
	14 g de acetato de sodio . $3H_2O$	= 0,14%
10	75 g de cloruro de sodio	= 0,75%
	210 mg de cloruro de zinc ($ZnCl_2$)	= 10 mcg de Zn^{++} /ml

Lejía de sosa hasta pH 6,9.

La solución es filtrada de modo estéril.

15 Determinación del contenido de cristales de insulina en la suspensión de base.

Para la determinación del contenido de cristales de insulina en la suspensión de base, la suspensión de cristales es tomada, después de mezclado intenso con ayuda de un agitador magnético, 4 veces cada vez en cantidad de 10 ml (pipeta llena) y el contenido de insulina es determinado de acuerdo con los siguientes métodos:

1. Por gravimetría después de secado con acetona y éter, y pesada.
- 25 2. Después de disolución de los cristales, por espectrofotometría.

metría en U.V. a 280 nm.

3. Por determinación del contenido de N.

Preparación del componente de liberación retardada que contiene 40 U.I./ml.

5 De acuerdo con el contenido determinado de insulina en la suspensión de base, ésta es ajustada luego, añadiendo más cantidad de la solución de dilución estéril, hasta el deseado contenido de insulina de 40 U.I./ml. Rendimiento: máximo 10 litros.

10 B. Preparación del componente disuelto de Des-Phe-insulina de porcino.

6,304 g de Des-Phe-insulina cristalizada de porcino se disuelven en 3,5 litros de un líquido de solución con la composición reproducida en la tabla 2.

15

Tabla 2. Composición del líquido de solución de Des-Phe-insulina.

En 5 litros de solución están contenidos:

5 g de éster metílico de ácido 4-hidroxibenzoico = 0,1%
20 2,85 ml de ácido acético (proporciona 0,14% de acetato de sodio $\cdot 3H_2O$)
37,5 g de cloruro de sodio = 0,75%
42 mg de cloruro de zinc (anhidro) = 4,0 mcg de
5 ml de ácido clorhídrico 4 N Zn^{++}/ml

25 La solución transparente de la Des-Phe-insulina es

luego liberada de bacterias (esterilizada) mediante un filtro de membrana, y mediante adición de 400 ml de líquido de solución, que había sido hecho pasar después de la filtración de insulina, a través del mismo filtro estéril, es llevada a un volumen de 3,9 litros. Por adición de lejía de sosa estéril 4 N se ajusta a un valor de pH 6,9 (consumo aproximadamente 13 ml). Añadiendo 34 ml más de una solución de dilución de insulina neutra estéril (para su composición véase la Tabla 1) se ajusta a un volumen final de 3,947 litros y un contenido de insulina de 40. U.I./ml, estableciéndose como base una actividad de la Des-Phe-insulina de 25 U.I./mg.

G. Producción del preparado dispuesto para el envasado.

Por mezcla del componente de liberación retardada preparado según A, que contiene cristales de insulina de porcino, con el componente preparado de acuerdo con B, que contiene Des-Phe-insulina de porcino disuelta, en la proporción en volumen 80:20, se obtiene un preparado que contiene 32 U.I./ml de insulina cristalina y 8 U.I./ml de Des-Phe-insulina disuelta, es decir en conjunto 40 U.I./ml de insulina. La suspensión es envasada de modo estéril en frasquitos de 10 ml cada uno.

Ejemplo 3.

Se mezclan 75 partes del componente de liberación retardada preparado de acuerdo con A, que contiene cristales de insu-

lina, con 25 partes del componente preparado según B, que contiene Des-Phe-insulina disuelta de la misma especie, y se obtiene un preparado que contiene 30 U.I./ml de insulina cristalina y 10 U.I./ml de Des-Phe-insulina disuelta, es decir en total 40 U.I./ml de insulina. La suspensión es envasada de modo estéril en frasquitos de 10 ml cada uno.

Ejemplo 4

Se mezclan 70 partes del componente de liberación retardada preparado de acuerdo con A, que contiene cristales de insulina, con 30 partes del componente preparado de acuerdo con B, que contiene Des-Phe-insulina disuelta de la misma especie, y se obtiene un preparado que contiene 28 U.I./ml de insulina cristalina y 12 U.I./ml de Des-Phe-insulina disuelta, es decir en total 40 U.I./ml de insulina. La solución es envasada de modo estéril en frasquitos de 10 ml cada uno.

Ejemplo 5

Se mezclan 90 partes del componente de liberación retardada preparado de acuerdo con A, que contiene cristales de insulina, con 10 partes del componente preparado de acuerdo con B, que contiene Des-Phe-insulina disuelta de la misma especie, y se obtiene un preparado que contiene 36 U.I./ml de insulina cristalina y 4 U.I./ml de Des-Phe-insulina disuelta, es decir en total 40 U.I./ml de insulina. La suspensión

es envasada de modo estéril en frasquitos de 10 ml cada uno.

5

- REIVINDICACIONES -

10

Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los que se recogen en las reivindicaciones siguientes:

15

1ª.- Procedimiento para la producción de un preparado de insulina a base de insulina cristalizada y des-fenilalanin^{Bl}-insulina disuelta de la misma especie, caracterizado porque se ajusta con lejía de sosa a pH 6,8-7,2 una suspensión acuosa estéril de cristales de insulina de tamaño uniforme de 15-35 micras, que contiene, además de un agente de conservación, tampón de acetato de sodio, sal común hasta isotonía y 30-8! mcg de zinc⁺ ⁺, y se reúne la suspensión de cristales resultante, que contiene 40-100 U.I. de insulina por ml, con una solución acuosa estéril de des-fenilalanin^{Bl}-insulina de la misma especie, que contiene

20

25

40-100 U.I./ml y que contiene, además de un agente de conservación, tampón de acetato de sodio, sal común hasta isotonía y 10-40 mcg de zinc⁺ ⁺, y que se había ajustado previamente a pH 6,8-7,2, encontrándose la proporción de insulina cristalina a des-fenilalanin^{Bl}-insulina disuelta entre 60:40 y 90:10, ascendiendo el contenido de zinc a 25-80 mcg/100 U.I. y reajustándose eventualmente el pH a 6,8-7,2.

2^a.- Procedimiento para la producción de un preparado de insulina.

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

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

Madrid, 15. NOV. 1975

P.A.

Fernando de Elizaburu
Por Poderes

