

444558

176111

PATENTE DE INVENCION

por VEINTE años

cuyo privilegio se solicita para España,  
sus territorios y plazas de soberanía, a  
favor de:

NORDISK INSULINLABORATORIUM

entidad danesa, domiciliada en Ved Stadion  
2, DK-2820 Gentofte, Dinamarca, relativa  
a:

"PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE UNA  
PREPARACION ESTABLE DE INSULINA"

\*\*\*\*\*

Inventores: Bruno Andre Hansen y Finn Hede  
Andresen

Prioridad: Solicitud de patente en Dinamarca  
nº 83/75 de fecha 15 Enero 1975.

MEMORIA DESCRIPTIVA

Esta invención se refiere a un procedimiento para producir una preparación estable de insulina con efecto prolongado y con baja antigenia por reacción de insulina con un compuesto orgánico que comprenda grupos básicos. -

5.

En el tratamiento de la diabetes mellitus se utilizan en general preparaciones de insulina derivadas de páncreas de cerdo o de buey. Así, aproximadamente el 30% del consumo mundial de insulina se basa en insulina de cerdo y aproximadamente el 70% en insulina de buey. Se ha sugerido la insulina de otros animales, por ejemplo insulina de oveja, pero hasta ahora no ha alcanzado ninguna importancia comercial. - - - - -

10.

La terapia con insulina implicaba antes varios inconvenientes que se manifestaban entre otras cosas con alergias y lipodistrofia. - - - - -

15.

Desde hace largo tiempo se sabe que el tratamiento convencional con insulina originaba, en la mayor parte de los pacientes, la formación de anticuerpos contra la insulina que podían conducir a mayores necesidades de insulina; se sabe también que determinadas cantidades desconocidas de insulina pueden estar relacionadas con los an-

20.

ticuerpos y que, mientras se mantenga esta relación, la insulina será ineficaz como regulador del azúcar de la sangre. - - - - -

5. La causa principal de la formación de anticuerpos y el consiguiente consumo elevado de insulina se supusieron durante largo tiempo relacionados con la presencia de varias impurezas en la insulina comercial normal. - - - -

10. Como ejemplos de tales impurezas pueden mencionarse el dímero de insulina, la proinsulina, la insulina intermedia (la etapa entre proinsulina e insulina), la insulina arginina, la insulina etiléster, la monodesamidoinsulina y la didesamidoinsulina. Los tres primeros de estos compuestos son conocidos como altamente antígenos. Es también conocido que el cuarto o el quinto o ambos de estos compuestos son altamente antígenos, mientras que el 15. sexto y el séptimo compuestos y la molécula de insulina misma o no son antígenos o lo son sólo ligeramente (consultase Schlichterull, "Insulina monocomponente y sus implicaciones clínicas", 16 Marzo 1973). - - - - -

20. Es conocido eliminar dichas impurezas por filtración con gel y/o intercambio iónico, con lo que es posible obtener insulina altamente purificada que sólo contiene substancialmente un único componente. En los años recientes, se han comercializado preparaciones de insulina 25. que estaban libres en algún grado de algunas de dichas impurezas y en muchos casos han originado una menor forma-

ción de anticuerpos en los diabéticos. - - - - -

- Se ha hallado que pueden producirse preparaciones de acción rápida de insulina de cerdo y de insulina de buey tan puras que no causarán formación de anticuerpos contra la insulina o la causarán sólo en muy pequeña cantidad (consúltese Schlichtcrull, "Insulina monocomponente y sus implicaciones clínicas", 16 Marzo 1973). Y se ha demostrado que es posible producir preparaciones con acción prolongada y que tienen una antigénia substancialmente menor si la producción se basa en insulina de cerdo altamente purificada, (consúltese I. Deckert et al., "Diabetologia", vol. 10, páginas 703-3, 1974). Pero se ha hallado también que no se han comercializado aún preparaciones de acción prolongada y con baja antigenia, basadas en insulina de buey altamente purificada, aún cuando se produce insulina de buey con una pureza que, con los presentes métodos analíticos, puede considerarse tan alta como la insulina de cerdo altamente purificada que puede prepararse hoy día y tan pura que, como se ha indicado anteriormente, no cause o en cualquier caso sólo cause en muy pequeño grado formación de anticuerpos cuando se utilice en preparaciones de acción rápida. Esto es una seria desventaja debido a que las preparaciones de acción prolongada basadas en insulina de buey son internacionalmente preferidas. - - - - -
- 5.
- 10.
- 15.
- 20.
- 25.

La formación de anticuerpos en el organismo vivo contra un compuesto químico tal como la insulina puede ser

- debida a diferencias químicas tales en la estructura primaria (consultese Arquilla E.R. et al: "Inmunoquímica de la insulina, Manual de fisiología", Ch. 9, p. 160, 1972), a que el compuesto químico tiene una estructura espacial incompatible con la del organismo y repelida por el mismo (consultese Arquilla, E.R. et al: "Configuración inmunológica y actividad biológica de la insulina", Diabetes, vol. 18, p. 194, 1969) o a que el compuesto químico tiene unas dimensiones totales (agregación) que resulta incompatible con el organismo y repelido por el mismo (consultese Arquilla, E.R. et al: "Inmunoquímica de la insulina, Manual de fisiología," Ch. 9, p. 160, 1972). - - - - -
- 5.
  - 10.

- Además es posible provocar la formación de anticuerpos por administración conjunta, con el compuesto químico, de un componente capaz de activar el mecanismo de inmunidad. - - - - -
- 15.

- Varios ensayos tienden a indicar que el estado físico de la insulina juega un papel esencial en la formación de anticuerpos (Kumar et al: Horm. Metab. Res. 6, (1974) 185-177 y Piers et al: Neth J. Med. 17 (1974), pp. 234-238). - - - - -
- 20.

- La razón por la cual las preparaciones de insulina altamente purificada y de acción rápida no causan una formación de anticuerpos o sólo la causan en un grado limitado es probablemente que en estos casos las insulinas, además de estar altamente purificadas, se hallan presentes
- 25.

en forma monomérica o forman sólo agregados relajados ("loose"), mientras que en las preparaciones de insulina altamente purificada previamente producidas y comercializadas, de acción prolongada, la insulina se hallaba en

5. una forma agregada y con propiedades que originaban la formación de anticuerpos. Este problema es muy pronunciado con respecto a la insulina de buey y probablemente es debido al hecho de que la insulina de buey tiene mayor inclinación a formar agregados que la insulina de cerdo. -

10. Se sabe que la insulina de buey sin aditivos tiene un intervalo o zona de precipitación isoelectrica más amplia que la insulina de cerdo. También se sabe que esta amplia zona de precipitación isoelectrica puede limitarse a la misma anchura que la que se conoce para la insulina de cerdo por la adición de ciertas sustancias tales como fenol o m-cresol (consultese la patente U.K.

15. 1.222.100). Dicha zona más amplia de precipitación isoelectrica de la insulina de buey se supone debida al hecho de que la insulina de buey forma agregados a valores de

20. pH próximos a la neutralidad. - - - - -

La invención se basa en el descubrimiento de que es posible estabilizar insulina altamente purificada de modo que durante la producción o, en las preparaciones de acción prolongada, durante el almacenaje o en uso, no

25. forme agregados que puedan causar la formación de anticuerpos. - - - - -

Este objetivo se ha logrado según la invención, que se caracteriza porque la reacción se realiza con una insulina altamente purificada en forma de monómero estabilizado o de agregados relajados. - - - - -

5. En el procedimiento según la invención, la insulina altamente purificada en forma monomérica o relajadamente agregada estabilizada se hace reaccionar con un compuesto orgánico que comprende grupos básicos, tales como grupos amino o grupos aminosustituídos. Un compuesto preferido que comprende grupos básicos es un polipéptido, por ejemplo poliarginina, somatostatina, protamina o globina o un producto de escisión de tal polipéptido básico. Otro ejemplo de un compuesto básico adecuado es 1,3-bis(4-amino-2-metil-6-quinolil)-urea. Según la invención, la reacción se realiza adecuadamente en presencia de un estabilizante, tal como por ejemplo m-cresol o glucosa. - - -
- 10.
- 15.

- La invención puede emplearse con la insulina procedente de muchas especies diferentes de animales, tales como cerdos, bueyes u ovejas, pero es de importancia particular con respecto a la insulina de buey. - - - - -
- 20.

- Una realización preferida de la invención se caracteriza porque una disolución de insulina que contiene un estabilizante se somete a intercambio iónico por elución con un eluyente que contiene un estabilizante que mantiene la insulina en forma monomérica o relajadamente agregada estabilizado, después de lo cual se añade una
- 25.

fracción que contiene insulina liberada de impurezas a una disolución que contiene un polipéptido básico o un producto de escisión de un polipéptido básico y se aísla el complejo precipitado de insulina. Este proceso proporciona una efectiva seguridad contra la agregación porque la insulina altamente purificada no se aísla primero como a tal, con el consiguiente peligro de agregación. Además, dicho procedimiento es muy simple porque la preparación de insulina de acción prolongada es precipitada directamente en forma estable. - - - - -

La invención se ilustrará en detalle por medio de los siguientes ejemplos. - - - - -

EJEMPLO 1

Se disolvieron 250 mg de insulina de buey recristalizada en 5,2 ml de disolución tampón estabilizada, compuesta por 7 M (molar) de urea desionizada y 0,02 M de tris que tenía un pH de 8,1. La disolución se mezcló con 5,2 ml de 7 M de urea. El pH de la mezcla se ajustó a 8,1. Se relleno una columna de un diámetro de 5 cm con una capa de celulosa DEAE de una altura de 2,1 cm (Whatmann DE 52) y se equilibro con una disolución tampón de la anterior composición. La disolución de insulina se introdujo en la columna y se realizo la elución a un caudal de 75 ml por hora en las siguientes condiciones: - - - - -

2,5 horas con un tampón de la composición defi

nida anteriormente, - - - - -

5. 3 horas con un tampón de la composición definida anteriormente al que se le había añadido 0,0045 mol de cloruro sódico por litro, - - - - -

12 horas con un tampón de la composición definida anteriormente al que se le había añadido 0,011 mol de cloruro sódico por litro.

10. El eluato se dividió en fracciones, Se recogieron las fracciones altamente purificadas y se determinó el contenido de insulina. En una disolución de 7 M de urea del mismo volumen que la mezcla de las fracciones altamente purificadas se disolvió protamina en la cantidad necesaria para obtener la relación isofénica de insulina altamente purificada respecto a protamina. - - - - -

20. La disolución de insulina se añadió lentamente y gota a gota a la disolución de protamina mientras se agitaba y, eventualmente después de dilución hasta una concentración de urea de 1 M, precipitó un complejo de protamina-insulina en estado amorfo. - - - - -

25. El precipitado se aisló por centrifugación y presentaba sólo una banda prácticamente cuando 300 µg se sometían a concentración isoelectrica en gel de poliacrila mida y utilizando 2% de amfolina (pH 3-10) en 6 M de urea desionizada. - - - - -

EJEMPLO 2

5. Se repitió el proceso del Ejemplo 1 y en la di-  
solución de protamina se introdujo cloruro de zinc co-  
rrespondiente a 0,5% de iones de Zn calculados sobre la  
cantidad de insulina y 0,3% de m-cresol basado en el volu-  
men de la mezcla. El complejo de protamina-insulina se  
precipitó entonces en estado cristalino. - - - - -

10. El precipitado se aisló por centrifugación y pre-  
sentaba prácticamente sólo una banda cuando 300 µg se so-  
metieron a concentración isoeléctrica en gel de poliacri-  
lamida utilizando 2% de safolina (pH 3-10) en 6 M de urea  
desionizada. - - - - -

EJEMPLO 3

15. Se repitió el proceso del Ejemplo 1 pero se uti-  
lizó como material de partida insulina de buey recrista-  
lizada y purificada por filtración con gel sobre Sephadex  
G-50. - - - - -

El producto preparado era de la misma pureza que  
el producto descrito en el Ejemplo 1. - - - - -

20. EJEMPLO 4

Se repitieron los procesos de los Ejemplos 1 y 2  
pero se utilizó como material de partida insulina de cer-  
do preparada por salificación de un extracto bruto acuoso

formado en la producción de insulina por adición de sal para obtener 3,5 M a pH 8,5. La torta de sal obtenida se desaló de manera convencional antes del intercambio iónico. -----

5. El producto preparado era de la misma pureza que el producto descrito en el Ejemplo 1. -----

EJEMPLO 5

10. Se repitió el proceso del Ejemplo 4 y la torta de sal obtenida se sometió a filtración con gel sobre Sephadex G-50. -----

El producto era de la misma pureza que el producto descrito en el Ejemplo 1. -----

EJEMPLO 6

15. Se repitieron los procesos de los Ejemplos 1-3, pero se utilizó insulina de cerdo en vez de insulina de buey. -----

El complejo formado de protamina-insulina de cerdo era tan puro como al complejo preparado en el Ejemplo 1. -----

20. EJEMPLO 7

Se repitió el proceso del Ejemplo 1 pero en vez de protamina se utilizó poli-L-arginina, con un grado de

polimerización de 295. El precipitado se aisló de la manera descrita en el Ejemplo 1. - - - - -

EJEMPLO 8

5. Se repitió el proceso del Ejemplo 1 pero a las fracciones combinadas de insulina altamente purificada se les añadió una disolución acuosa al 0,2% de hidrocloreuro de bis-(4-amino-2-metilquinolil-6)-urea en una cantidad equivalente a 10% en peso de la cantidad de insulina presente en dichas fracciones. Con ello, eventualmente después de la dilución hasta una concentración de urea de 1 M con 0,025 M de tampón de fosfato sódico, pH 7,3, se precipitó un complejo de insulina que se dejó reposar durante algún tiempo y que luego se aisló por centrifugación.

10. El producto preparado era de la misma pureza que el producto descrito en el Ejemplo 1. - - - - -

EJEMPLO 9

20. Se repitió el proceso del Ejemplo 8 pero se utilizó como material de partida insulina de buey recristalizada y purificada por filtración con gel sobre Sphadex G-50. El producto preparado era de la misma pureza que el producto descrito en el Ejemplo 1. - - - - -

EJEMPLO 10

Se repitieron los procesos de los Ejemplos 8 y 9

pero se utilizó insulina de cerdo en vez de insulina de  
buey. - - - - -

El complejo formado de insulina de cerdo era tan  
puro como el complejo preparado en el Ejemplo 1. - - - -

5.

EJEMPLO 11

Se repitió el proceso del Ejemplo 8, pero se uti-  
lizó como material de partida insulina de cerdo, produci-  
da por salificación de un extracto bruto acuoso formado  
en la producción de insulina por adición de sal para obte-  
ner 3,5 E a pH 3,5. La torta obtenida de sal se desaló de  
manera convencional antes del intercambio iónico. - - - -

10.

El producto preparado era de la misma pureza que  
el producto descrito en el Ejemplo 1. - - - - -

EJEMPLO 12

15.

Se repitió el proceso del Ejemplo 11 y la torta  
obtenida de sal se sometió a filtración con gel sobre  
Sephadex. - - - - -

El producto era de la misma pureza que el produ-  
to descrito en el Ejemplo 1. - - - - -

20.

N O T A

Se declaran de novedad y propiedad para España,  
sus territorios y plazas de soberanía, las siguientes: -

REIVINDICACIONES

5. 1.- Procedimiento para la producción de una preparación estable de insulina, con acción prolongada y baja antigenia por reacción de insulina con un compuesto orgánico que comprende grupos básicos, caracterizado porque la reacción se realiza con insulina altamente purificada en forma monomérica o relajadamente agregada estabilizada.

10. 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la insulina utilizada es insulina de buey. - - - - -

3.- Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque el compuesto orgánico que comprende grupos básicos es un polipéptido básico o un producto de escisión de un polipéptido básico. - - - - -

15. 4.- Procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado porque el polipéptido básico es una protamina.

5.- Procedimiento según las reivindicaciones 1-4, caracterizado porque la reacción se realiza en presencia de un estabilizante. - - - - -

20. 6.- Procedimiento según la reivindicación 5, caracterizado porque el estabilizante es un fenol. - - - -

7.- Procedimiento según la reivindicación 5, caracterizado porque el estabilizante es glucosa. - - - -

5. 8.- Procedimiento según la reivindicación 1, ca  
 racterizado porque una disolución de insulina que contie  
 ne un estabilizante se somete a intercambio iónico por  
 elución con un eluyente que contiene un estabilizante que  
 mantiene la insulina en forma monomérica o relajadamente  
 agregada estabilizada, después de lo cual se añade una  
 fracción que contiene insulina liberada de impurezas a  
 una disolución que contiene un polipéptido básico o un  
 producto de escisión de un polipéptido básico y se aísla  
 10. el complejo precipitado de insulina. - - - - -

9.- Procedimiento según la reivindicación 3, ca  
 racterizado porque el eluyente contiene urea como estabi  
 lizante. - - - - -

15. 10.- Procedimiento según la reivindicación 5, ca  
 racterizado porque el polipéptido básico es poliarginina,  
 somatostatina, protamina o globina. - - - - -

11.- "PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE UNA  
 PREPARACION ESTABLE DE INSULINA". - - - - -

20. Todo ello conforme se describe y reivindica en  
 la presente memoria que consta de quince hojas foliadas  
 y mecanografiadas por una sola de sus caras.

BARCELONA, 15 ENE. 1976

P. A. M. CURELL SUÑOL

*Alcubuerca*

mcm.