



ESPAÑA

PATENTE DE INTRODUCCION

47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL B01D
------------------------	---

54 TITULO DE LA INVENCIÓN

"UN PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE CRISTALES DE INSULINA"

BoID 9/02 // AGIK 37/26

53 PATENTE EXTRANJERA U OTRA FUENTE DE INFORMACION

NOVO TERAPEUSTIK LABORATORIUM A/S, firma de origen danés.

71 SOLICITANTE (S)

LABORATORIOS LEO, S.A.

DOMICILIO DEL SOLICITANTE

Avda. Pio XII, 99. MADRID.

72 INVENTOR (ES)

73 TITULAR (ES)

74 REPRESENTANTE

DON BERNARDO UNGRIA GOIBURU

1 La insulina ha sido preparada por primera vez en
forma cristalina por Abel, véase más adelante Proc. Nat. Acad.
Sci. 12, 132 (1926), empleando una mezcla de acetato de amon-
nio, brucina y piridina como medio de cristalización y más
5 tarde, en 1929, por Harrington y Scott, véase Biochemical J.
23,384 (1929), a partir de insulina amorfa empleando un tam-
pon de acetato de amonio que contiene saporina, cambiando el
valor del pH de la solución de insulina en los dos casos para
aproximarlo al punto isoeléctrico de la insulina con objeto
10 de producir la cristalización. Estos métodos de cristaliza-
ción que dan rendimientos bastante modestos de cristales
bastante impuros, se han abandonado después al preferirse el
método de cristalización desarrollado por Scott, véase Bio-
chem J. 28, 1952 (1934) y la memoria de la Patente Estadouni-
15 dense N° 2,143,590.

El método de cristalización de Scott se basa en la
sorprendente observación de que para obtener una cristaliza-
ción absolutamente reproducible y rendimientos elevados es
necesario que esté presente en el medio de cristalización una
20 cierta cantidad de uno de los metales zinc, cadmio, cobalto
y níquel.

Quando ha habido anteriormente éxito en la crista-
lización de la insulina, la razón ha sido que el medio de cris-
talización contenía por naturaleza zinc, y Scott encontró que
25 era un requisito previo para la cristalización que el medio
de cristalización contuviera $AXO,007$ gramos de uno de los me-
tales mencionados por 100 gramos de insulina seca, donde "A"
representa el peso atómico del metal.

30 La presente invención se refiere a un proceso del
tipo en el cual la insulina se lleva a la cristalización a

1 partir de un medio que contiene cationes como requisito pre-
vio para la cristalización, por cambio del valor del pH del
medio para aproximarlo al punto isoeléctrico de la insulina,
5 se base sobre la observación de que el zinc, cadmio cobalto
y níquel no son solo metales que constituyen requisitos pre-
vios para la cristalización de la insulina, sino que también
los metales como cobre, manganeso y hierro poseen esta propie-
dad cuando están presentes en forma divalente.

10 El procedimiento según la invención se caracteriza
así en que se emplean iones cúpricos, iones manganosos o
iones ferrosos o mezclas de tales iones como cationes que son
requisito previo para la cristalización.

15 Mientras que ha sido necesario hasta ahora crista-
lizar la insulina por medio de los metales mencionados por
Scott , en la práctica exclusivamente el zinc, la presente in-
vención hace posible efectuar la cristalización con otros me-
tales suponiendo un enriquecimiento de esta técnica.

20 Como es bien sabido, los metales mencionados por
Scott se absorben por los cristales de insulina, que así con-
tendrán zinc, cadmio, cobalto o níquel. De manera correspon-
diente los cristales de insulina producidos de acuerdo con
la invención vendrán a contener cobre, manganeso o hierro,
y sobre la base de estos nuevos cristales es posible obtener
preparaciones de insulina con actividad terapéutica modifi-
cada.
25

30 En el supuesto de que la solución de insulina em-
pleada no contenga de antemano cationes, requisito previo
para la cristalización, por ejemplo zinc, que como es sabido
está presente en el páncreas, del que se recoge la insulina,
los iones metálicos empleados según la invención deberán estar

1 presentes en el medio de cristalización en una cantidad por
encima de 0,5% del peso de la insulina. Sin embargo en las
proximidades de este límite inferior la cristalización tiene
5 lugar comparativamente de forma lenta, siendo al mismo tiem-
po el rendimiento de cristales menos satisfactorio. De aquí
que en la práctica sea preferible emplear cantidades consi-
derablemente más grandes de metales.

10 Si la cristalización se efectúa exclusivamente a
base de cobre, el medio de cristalización habrá de presentar
una concentración de iones cúpricos de al menos 0,01%. La
cifra correspondiente es para los iones manganosos de 0,1%
y para los iones ferrosos de 0,05%.

15 Sin embargo, los mejores resultados se obtienen con
cantidades algo mayores de metales, como 0,05-0,1% de cobre,
0,1-0,2% de hierro y 0,2-0,5% de manganeso respectivamente.
Las concentraciones de iones metálicos que sean mayores a
2-3 veces las últimas mencionadas serán como norma inconve-
nientes. En la práctica, la concentración de cobre no debe-
rá exceder de 0,5%. La cifra correspondiente es 0,8% para
20 el manganeso y 0,5% para el hierro. Suponiendo que más de
uno de los metales en cuestión esté presente en el medio de
cristalización o que éste por naturaleza contenga o que por
su producción haya de contener cationes, requisito previo
para la cristalización, puede, por supuesto, reducirse corres-
pondientemente la cantidad añadida de cada metal.

25 La concentración de insulina puede variar dentro
de amplios límites, aunque sin embargo es más apropiado em-
plear una concentración de insulina entre 0,1 y 1%.

30 No es crítica para la invención la forma en la que
se añaden los metales en cuestión al medio de cristalización

1 si solamente los metales están presentes en forma iónógena
bajo las condiciones de cristalización. Usualmente es más
práctico añadir los metales en forma de sus sales tales como
sulfatos, nitratos, cloruros, acetatos, citratos, etc. Si el
5 medio de cristalización es ácido en el momento de la adición
los metales pueden emplearse también en forma de sus hidróxi-
dos u otros compuestos de los cuales se liberen en forma io-
nógena en un medio ácido. Además deberá hacerse notar que
los metales pueden estar presentes como iones complejos si
10 solo el metal puede ser el absorbido por la insulina durante
la cristalización.

Al llevar a cabo el proceso según la invención, la
solución, que resulta de la recuperación técnica de la insu-
lina, y que hasta ahora se ha empleado para la producción de
15 insulina cristalina en presencia de iones zinc, puede utili-
zarse como solución de insulina. Sin embargo, es también posi-
ble comenzar con insulina amorfa, tal como la que se encuen-
tra en el mercado en cuyo caso la insulina amorfa se disuelve
en la forma usual en una solución acuosa de un ácido, por
20 ejemplo, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico o ácido fosfóri-
co.

Como es bien sabido, las soluciones de insulina
técnicas y la insulina amorfa obtenida de las mismas, contie-
nen pequeñas cantidades de zinc que tiene su origen del pán-
25 creas. Consiguientemente, si es deseable producir cristales
de insulina exentos de zinc, presente por naturaleza, hay
que separarlo primero, por ejemplo por diálisis.

Es preferible que la solución de insulina empleada
tenga un valor de pH por debajo del punto isoeléctrico de la
30 insulina (pH aproximadamente 5,5) pero las soluciones de in-

1 sulina que tienen un valor del pH por encima del punto iso-
eléctrico, por ej. pH 8, también pueden emplearse.

5 Los rendimientos obtenidos por el procedimiento
según la invención dependen del grado de pureza de la insu-
lina empleada. Las soluciones de insulina en las cuales la
insulina exhibe una actividad biológica por debajo de 15 uni-
dades internacionales por milígramo , darán por lo general
un rendimiento menos satisfactorio. Se obtienen mejores ren-
dimientos cuando la insulina es completamente pura, es decir,
10 exhibe una actividad biológica de 22-23 unidades internacio-
nales por milígramo.

15 Como es sabido la cristalización de la insulina
tiene lugar en presencia de una sustancia tampón para mante-
ner el valor del pH más favorable durante la cristalización.
Es ventajoso emplear sustancias tampón también al llevar a
cabo el proceso según la invención. Como ejemplos de sustancias
tampón útiles pueden mencionarse tampón de acetato, tampón
de borato, tampón de citrato, tampón de barbiturato de die-
tilo, tampón de fosfato, tampón de maleato o mezclas de és-
tos. Entre estas sustancias tampón es preferible utilizar
20 tampón de citrato ya que con ello se obtiene una rápida cris-
talización y los cristales de insulina se forman con menor
contenido en cenizas e impurezas orgánicas coloreadas que
con el empleo de otras sustancias tampón.

25 En la cristalización de insulina conocida hasta
ahora se ha hecho uso de la adición de disolventes orgánicos
impulsores de la cristalización, tales como acetona, alcohol
propílico, alcohol butílico o alcohol anílico. Es ventajoso
también en el proceso según la invención la adición de uno
30 o más de tales disolventes orgánicos, preferiblemente aceto-

1 na.

5 En la preparación de solución de insulina que contiene metal los materiales de partida requeridos se mezclan en forma sólida o disueltos, mientras que la necesaria cantidad de una solución básica o ácida, para disolver la insulina, puede añadirse si se desea. Sin embargo, generalmente es más práctico utilizar sustancias de partida en forma disuelta en una proporción tanto más grande cuanto más intervengan los metales y sustancias tampón, lo cual facilita la dosificación de estas sustancias.

10 Cuando una solución de insulina se ha obtenido de manera que contiene uno o más de los iones metálicos mencionados, así como si se desea una sustancia tampón y un disolvente orgánico impulsor de la cristalización, se efectúa la cristalización de la insulina cambiando el pH de la solución para aproximarle al punto isoeléctrico de la insulina. El intervalo del valor del pH en la que la insulina puede cristalizar está situado entre pH 5 y pH 7.

15 En el caso de una solución de insulina con un valor del pH por debajo del intervalo antes mencionado, por ejemplo, un valor de pH 2-4, el valor del pH se incrementa por la adición de una solución acuosa de una sustancia de reacción alcalina, preferiblemente un hidróxido y particularmente un hidróxido de metal alcalino. En el caso de una solución de insulina con un valor del pH por encima del intervalo mencionado antes, el valor del pH de la solución se rebaja por adición de una solución acuosa ácida, por ejemplo de un ácido diluido tal como el ácido acético, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico y ácido fosfórico.

20 Los siguientes ejemplos de la realización sirven

25 30

1 además para aclarar el proceso según la invención.

Ejemplo I

5 Se añaden 300 ml de una solución de cloruro cúprico que contiene 1,34 g de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a 5 g de insulina amorfa (aproximadamente 23 unidades internacionales por miligramo), después de lo cual se disuelve la insulina por adición de 5 ml de ácido clorhídrico 1n, 150 ml de acetona y 500 ml de tampón citrato, con 10 gr de ácido cítrico y se añaden entonces 5,6 g. de hidróxido sódico después de lo cual se
10 ajusta el valor del pH de la solución para aproximarlo a 6,0. Después de algunas horas se completa la cristalización. Se separan los cristales de insulina por succión y se lava primero con agua y después con acetona. Contienen aproximadamente 0,37% de Cu.

15

Ejemplo II

El procedimiento es como en el Ejemplo I, empleando 300 ml de una solución de cloruro de manganeso, que contiene 7,22 g de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, en lugar de la solución de cloruro cúprico. Los cristales de insulina seca contienen aproximadamente 0,38% de Mn.
20

Ejemplo III

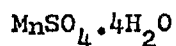
El procedimiento es como en el Ejemplo I, pero empleando 300 ml de un cloruro ferroso que contiene 5,37 g de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ en lugar de una solución de cloruro cúprico. Los cristales de insulina secos contienen aproximadamente 0,30% de Fe.
25

Ejemplo IV

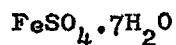
Se obtienen las siguientes soluciones básicas:
A. Una solución acuosa (pH aproximadamente 6,5) de insulina amorfa cruda a partir de páncreas de cerdo, que contiene
30

1 aproximadamente 7,5 g de insulina por litro, 16-17% de acetona y 1,1% de ácido cítrico.

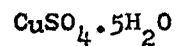
B. Una solución acuosa que contiene 0,56% de



5 C. Una solución acuosa que contiene 0,70% de



D. Una solución acuosa, que contiene 0,63% de



E. Una solución acuosa, que contiene 4% de ácido cítrico,

10 y se ajusta el pH a aproximadamente 7 con hidróxido sódico.

(1) Se añaden 4 ml de acetona, 20 ml de solución B y 7 ml de solución E a 50 ml de solución A. Se reduce el valor del pH a aproximadamente 6,4 con ácido clorhídrico y la mezcla se mantiene durante 15 horas a aproximadamente 4°C.

15 Los cristales de insulina que se forman se separan por succión, se lavan primero con agua y después con acetona y se secan.

(2) Se añaden 4 mililitros de acetona, 20 mililitros de solución C y 7 ml de solución E a 50 ml de solución A. El valor de pH de la solución se reduce a 6,05 con ácido clorhídrico y se deja reposar el compuesto durante 15 horas a 4°C.

20 Se separan los cristales de insulina así formados, se lavan con agua y después con acetona y se secan.

(3) Se añaden 4 ml de acetona, 20 ml de solución D y 7 ml de solución E a 50 ml correspondientes a la solución A pero obtenidos a base de insulina amorfa libre de zinc. Se reduce el valor del pH de la solución a 6,03 con ácido clorhídrico y se deja reposar el compuesto durante 15 horas a aproximadamente 4°C. Se separan los cristales de insulina así formados, se lavan primero con agua y después con acetona y se secan.

25
30

1 Los cristales de insulina contienen aproximadamente 0,34%
de cobre y nada de zinc.

Ejemplo V

5 Se añaden 2000 ml de agua destilada y 200 ml -
de ácido clorhídrico normal a 2500 ml de un tampón fosfa-
to producido por disolución de 335 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ y
10 55 gr de KH_2PO_4 en 20 l de agua destilada después de lo -
cual se añaden 200 ml de una solución de insulina, que con-
tiene 30 mg de insulina por ml y 500 ml de una solución de
cloruro cúptico, obtenida por disolución de 26,8 g de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en 1 L de agua destilada y 500 ml de acetona. El -
valor del p^{H} del compuesto se ajusta entonces a 6,2 por -
15 adición de aproximadamente 230 ml de NH_4OH normal. La cris-
talización de la insulina tiene lugar en unas pocas horas
y los cristales se separan después de pocos días.

En resumen, la Patente de Introducción que se
solicita deberá recaer sobre las siguientes.

REIVINDICACIONES:

20 1ª.- UN PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE -
CRISTALES DE INSULINA, esencialmente caracterizado porque
consiste en la preparacion de un medio acuoso que contie-
ne insulina en forma no cristalina e iones divalentes de,
por lo menos, uno de los metales seleccionados del grupo
compuesto por cobre, manganeso y hierro, y en el ajuste -
25 del PH de dicho medio acuoso a un valor dentro del interva
lo de 5 a 7, estando presentes los referidos iones divalen
tes en dicho medio acuoso en una cantidad superior al 0,5%
en peso de insulina, tal que los cristales de insulina que
contienen dichos metales se precintan al ajustar dicho P^{H}
30 del aludido medio al citado valor; habiendose previsto que

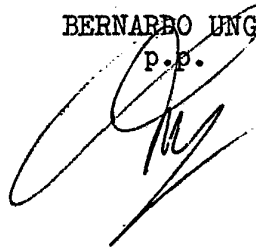
1 el medio acuoso tenga un contenido de 0,01 a 0,5% en peso,
de ión cúplico; de 0,1 a 0,8% en peso, de ión manganesa y
de 0,05 a 0,5% en peso, de ión ferroso.

5 Se reivindica por último como objeto sobre el
que ha de recaer la Patente de Introducción que se solici-
ta: "UN PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE CRISTALES DE -
INSULINA".

10 Todo conforme queda descrito y reivindicado en
la presente Memoria descriptiva que consta de once páginas
mecanografiadas.

Madrid, 7 de Septiembre 1.976

BERNARDO UNGRIA
P.P.



15

20

25

30

