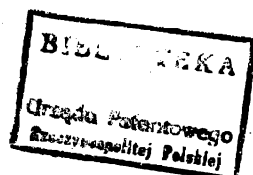


Warszawa, dnia 15 kwietnia 1954 r.



A61k 17/02



POLSKIEJ RZECZYPOSPOLITEJ LUDOWEJ

OPIS PATENTOWY

Nr 35769

Kl. 30 h, 2/10

Novo Terapeutisk Laboratorium A/S

(Kopenhaga, Dania)

Sposób otrzymywania pochodnych insuliny

Udzielono patentu z mocą od dnia 10 listopada 1947 r.

Pierwszeństwo: 26 czerwca 1941 r. dla zastrz. 1—4 (Dania)

Znany jest fakt, że przy leczeniu cukrzycy za pomocą hormonu trzustki, insuliny, zmniejszającej zawartość cukru we krwi, usiłowano w ostatnich latach w różny sposób przedłużyć działanie hormonu w celu otrzymania w organizmie warunków bardziej zbliżonych do normalnych. Proponowano dodawanie do insuliny różnych środków utrudniających wchłanianie, np. oliwy, białka albo środków zwężających naczynia krwionośne jak adrenaliny.

W poszukiwaniu preparatów insuliny o działaniu przedłużonym starano się uzyskać związki trudno rozpuszczalne w osoczu krwi i płynie tkankowym. Znane jest stosowanie insuliny w połączeniu z niektórymi protaminami jak kłupeina (insulina protaminowa), a prócz tego z dodatkiem małej ilości cynku (insulina cynkowo-protaminowa). Insulina w połączeniu z niektórymi rozpuszczalnymi w wodzie solami zasadowymi chinoliny lub z akrydyną tworzy pochodne, które również zostają stosunkowo wolno resorbowane przez organizm.

Zgodnie z licznymi publikacjami (Physiol. Reviews 14, 188, (1934); Nature 134, 290, (1934); Biochem. Jour. 28, 2125, (1934); Biol. Chem. 114, 199, (1936); Biochem. Journ. 30, 1915, (1936)) udało się otrzymać produkty reakcji insuliny i izocyjanianów, które zupełnie albo prawie zupełnie nie powodują zmniejszania zawartości cukru we krwi. Celem tych prac było zdobycie wiadomości o rodzaju grup w cząsteczce insuliny, które są przyczyną fizjologicznego działania, przy czym przyjęto, że izocyjaniany atakują tylko niektóre grupy aminowe w cząsteczce insuliny, nie wywołując głębokich zmian w budowie cząsteczki. Wynalazek opiera się na spostrzeżeniu, iż preparaty insuliny o działaniu przedłużonym można otrzymać za pomocą izocyjanianów, jeżeli traktuje się nimi hormon w sposób odmienny niż dotychczas, otrzymując częściowe związanie dających się miareczkować grup aminowych w cząsteczce hormonu. Stwierdzono, że podobne wyniki otrzymuje się przez zastosowanie innych substancji niż izocyjaniany, o ile substancje te

zdolne są związać grupy aminowe, zastępując w nich atomy wodoru. Przedmiotem wynalazku jest przeto sposób poddania hormonu działaniu izocyjanianów lub innych substancji, zdolnych reagować z grupami aminowymi w sposób podobny do izocyjanianów, stosując takie warunki reakcji, w wyniku której hormon zachowuje całkowicie lub prawie całkowicie swoje właściwości zmniejszania zawartości cukru we krwi, lecz sposób tego działania zostaje tak zmieniony, iż działanie hormonu w organizmie chorego trwa w ciągu znacznie dłuższego okresu czasu.

Nowy związek insuliny różni się od znanych dotychczas, wymienionych wyżej pochodnych insuliny tym, że działa dłużej i jest łatwo rozpuszczalny w osoczu krwi i płynie tkankowym.

Pochodne insuliny według wynalazku otrzymuje się w warunkach zmiennych zależnych od użytej substancji zdolnej zastąpić wodór aminowy w cząsteczce insuliny. Odpowiednie warunki reakcji można określić łatwo za pomocą doświadczeń biologicznych.

Reakcję można również śledzić na podstawie reakcji chemicznej. Reakcję między insuliną i substancją zdolną zastąpić atom wodoru w grupie aminowej insuliny osiąga się, działając na hormon tą substancją w środowisku, w którym jest ona nierozpuszczalna albo tylko słabo rozpuszczalna, np. w wodzie albo w roztworze wodnym. Stwierdzono, że trudno jest zapobiec aby reakcja choć w części nie poszła tak daleko, aby nie nastąpiło znaczne zmniejszenie aktywności końcowego produktu w stosunku do materiału wyjściowego. Otrzymuje się co prawda produkty użyteczne, lecz stanowi to stratę wartościowej insuliny.

W celu uniknięcia tej niedogodności, zgodnie z wynalazkiem, reakcję insuliny i substancji podstawiającej wodór aminowy przeprowadza się w fazie jednorodnej.

Rozpuszczalnikiem hormonu oraz substancji podstawiającej wodór aminowy insuliny jest w wielu przypadkach mieszanina acetonu i wody. Regulując temperaturę, wartość pH, ilość i stężenie izocyjanianu, skład rozpuszczalnika oraz o ile to jest pożądane, czas reakcji, można otrzymać różne pochodne insuliny.

Jako substancje podstawiające wodór aminowy insuliny można stosować zamiast izocyjanianu, np. chlorowcokwasy, bezwodniki kwasowe, ketony, chlorowcoalkyle, aldehydy i ketony, ksantylidrol itd. Pochodne insuliny otrzymane za pomocą tych związków nie różnią się pod względem aktywności i ogólnych właściwości od produktów otrzymanych za pomocą izocyjanianów.

Stwierdzono, iż przedłużenie aktywności preparatu nie występuje, o ile użyty związek nie

reaguje z grupą aminową insuliny dającą się miareczkować. W miarę jak grupy aminowe insuliny reagują z izocyjanianem lub innym związkiem aktywności preparatu na razie zostaje zachowana. Zanik aktywności rozpoczyna się powoli i staje się bardziej wyraźny gdy przereaguje 25×10^{-3} milimoli grup aminowych (w dalszym ciągu opisu podawane jako 25 grup aminowych na milimol całkowitego azotu obecnego w hormonie, przy czym spadek aktywności wynosi 20—25%, a po związaniu około 30 grup aminowych dających się miareczkować, spadek ten wynosi około 50%. Cząsteczka insuliny zawiera 78 grup aminowych dających się miareczkować, czyli 78×10^{-3} milimoli grup aminowych na milimol całkowitego azotu. Pochodna, w której związane 30 grup aminowych dających się miareczkować, posiada jeszcze aktywność o działaniu przedłużonym, nie jest jednak wskazane stosowanie preparatu, w którym do tego stopnia zanikła aktywność i zgodnie z wynalazkiem stosuje się preparaty, w których nie więcej niż 30 grup aminowych zostało związanych. Najniższa granica, przy której występuje zmiana właściwości hormonu, jest przy związaniu 1 grupy aminowej. Zgodnie z wynalazkiem przebieg reakcji kontroluje się sposobem chemicznym. Liczba grup aminowych insuliny dających się miareczkować, która zostaje związana, leży w granicach $1 - 30 \cdot 10^{-3}$ milimoli na milimol całkowitego azotu. Stwierdzono, iż w warunkach reakcji stosowanych do otrzymywania tych pochodnych, niektóre grupy aminowe dające się pierwotnie miareczkować zanikają prawdopodobnie w wyniku międzycząsteczkowego przegrupowania, tak iż zmianie liczby grup aminowych nie można przypisywać wyłącznie aktywności preparatu. Samo przegrupowanie nie powoduje przedłużenia działania zmniejszającego zawartość cukru we krwi preparatu, tak iż zgodnie z wynalazkiem, konieczne jest rozróżniać związane grupy aminowe dające się miareczkować i grupy aminowe, które zanikają wskutek przegrupowania, co osiąga się przez porównanie pochodnej insuliny otrzymanej zgodnie z wynalazkiem z preparatem kontrolnym otrzymanym w tych samych warunkach, lecz bez substancji, które podstawiają atomy wodoru w grupie aminowej insuliny.

Liczbą uchwytynych drogą miareczkowania grup aminowych, które przereagowały z substancją podstawiającą atomy wodoru, określa się za pomocą kilku różnych sposobów. W pewnych przypadkach można określić ilość substancji związanej przez insulinę bezpośrednio i na tej podstawie obliczyć liczbę przereagowanych grup aminowych dających się miareczkować, przyjmując, że tylko te grupy są atakowane.

Liczba przereagowanych grup aminowych dających się miareczkować, można również określić przez miareczkowanie, lecz w tym przypadku należy uwzględnić grupy aminowe, które znikają wskutek przegrupowania w cząsteczce. Liczbą przereagowanych grup aminowych określa się w tym przypadku jako różnicę między ilością grup dających się miareczkować przed i po reakcji, przy uwzględnieniu poprawki na podstawie preparatu kontrolnego, albo co na jedno wychodzi, na podstawie różnicy między grupami aminowymi dającymi się miareczkować w preparacie pochodnym, otrzymanym zgodnie z wynalazkiem oraz w preparacie kontrolnym, otrzymanym przez traktowanie materiału wyjściowego w takich samych warunkach jak podczas samej reakcji, ale bez stosowania substancji podstawiającej atomy wodoru w grupie aminowej. Stwierdzono, iż liczba grup aminowych nie dających się miareczkować wskutek przypuszczalnego przegrupowania międzycząsteczkowego — niezależnie od działania substancji podstawiającej atomy wodoru — wynosi $30 - 40 \cdot 10^{-3}$ milimoli na milimol całkowitego azotu, tak iż całkowita liczba grup aminowych, które stają się nieuchwytnie przez miareczkowanie zgodnie z wynalazkiem wynosi 60 — 70.

Liczbę przereagowanych grup aminowych można też określić innym sposobem, np. kolorymetrycznie.

Poniższe przykłady służą do objaśnienia wynalazku.

Przykład I. 3,21 g insuliny rozpuszcza się w 83,5 cm³ wody zakwaszonej $\frac{n}{1}$ HCl, po czym dodaje się 47 cm³ acetonu i roztwór nastawia za pomocą $\frac{n}{1}$ NaOH do wartości pH = 7,3. Następnie dodaje się kroplami 90 mg izocyjanianu fenylu w 10 cm³ acetonu w ciągu 13 minut, utrzymując przy tym wartość pH = 7,35 — 7,25. Następnie oznacza się zawartość CO₂ w roztworze, co jest miarą ilości rozłożonego izocyjanianu przez rozpuszczalnik. Z ilości izocyjanianu zużytego podczas reakcji z insuliną oblicza się liczbę przereagowanych grup aminowych dających się miareczkować, która wynosi 21. Pochodną insuliny wytrąca się przy pH = 5, następnie rozpuszcza się ją w 50% acetonie przy pH = 7 — 8 i wytrąca ponownie nadmiarem acetonu. Otrzymany produkt zbiera się na filtrze, przemycza acetonem oraz eterem i suszy.

W zupełnie taki sam sposób bez dodatku izocyjanianu otrzymuje się produkt kontrolny.

W tak otrzymanym produkcie stwierdzono przez miareczkowanie nieobecność 51 grup ami-

nowych, podczas gdy w produkcie kontrolnym stwierdzono ubytek 31 grup. To odpowiada 20 grupom aminowym, które przereagowały, co zgodne jest z liczbą oczekiwaną na podstawie ilości użytego izocyjanianu.

Dzięki doświadczeniom biologicznym wykonanym na królikach stwierdzono, że produkt otrzymany zawiera praktycznie biorąc taką samą liczbę jednostek insuliny, jaką zawiera 3,21 g insuliny użytej jako materiał wyjściowy. Kliniczne doświadczenia z produktami według wynalazku wykazały, że posiadają one zdolność przedłużonego działania zmniejszającego zawartość cukru we krwi.

Przykład II. 3,21 g insuliny rozpuszcza się w 65 cm³ wody zakwaszonej $\frac{n}{1}$ HCl, po czym dodaje się 67 cm³ acetonu i roztwór nastawia ostatecznie do wartości pH = 9,5 za pomocą $\frac{n}{1}$ NaOH. Następnie dodaje się kroplami 120 mg izocyjanianu fenylu w 10 cm³ acetonu w ciągu 13 minut. Równocześnie dodaje się stopniowo taką ilość $\frac{n}{1}$ NaOH, aby wartość pH utrzymać w granicach 9,5 — 9,4. Dalej postępuje się jak w przykładzie I.

Liczba przereagowanych grup aminowych obliczona z ilości użytego izocyjanianu wynosi 29. Stwierdzono w otrzymanym preparacie zanik 59 grup aminowych, podczas gdy w preparacie kontrolnym zanik 31 grup aminowych, co odpowiada 28 grupom aminowym, które uległy reakcji.

Doświadczenia biologiczne na królikach wykazały, że otrzymany preparat zawiera praktycznie biorąc taką samą liczbę jednostek insuliny jaką zawiera 3,21 g insuliny użytej jako materiał wyjściowy. Kliniczne próby wykazały, że otrzymane pochodne wykazują odpowiednią zdolność przedłużonego działania zmniejszającego zawartość cukru we krwi.

Przykład III. 3,21 g insuliny rozpuszcza się w 65 cm³ wody zakwaszonej $\frac{n}{1}$ HCl, po czym dodaje się 67 cm³ acetonu i pH roztworu reguluje do wartości 8,0 za pomocą $\frac{n}{1}$ NaOH. W odstępach 10-minutowych dodaje się 31,5 mg chlorku benzoilu w 3 cm³ acetonu, przy czym równocześnie doprowadza się po każdym dodaniu chlorku benzoilu wartość pH do 8,0 za pomocą $\frac{n}{1}$ NaOH. Następnie dodaje się roztworu reakcyjnego 450 cm³ wody, wytrąca pochodną insuliny przy pH = 4,8, rozpuszcza ją w 50% acetonie przy pH = 7 — 8 i ponownie wytrąca

nadmiarem acetonu. Osady zbiera się, przemywa acetonem i eterem i wreszcie suszy.

Stwierdzono metodą miareczkową zanik 51 grup aminowych, podczas gdy w preparacie kontrolnym liczba grup zanikłych wynosiła 31. A zatem przereagowało 20 grup aminowych.

Doświadczenia biologiczne na królikach wykazały, że preparat zawiera praktycznie taką samą liczbę jednostek insuliny jaką zawiera 3,21 g insuliny użytej jako materiał wyjściowy. Kliniczne doświadczenia wykazały, że preparat posiada odpowiednią aktywność biologiczną.

Przykład IV. 3,21 g insuliny rozpuszcza się w 65 cm³ wody zakwaszonej $\frac{n}{1} HCl$, po czym dodaje się 67 cm³ acetonu i roztwór nastawia się do wartości $pH = 8,0$ za pomocą $\frac{n}{1} NaOH$. W odstępach 10-minutowych dodaje się trzykrotnie 43,8 mg estru benzylowego kwasu chloromrówkowego w 4 cm³ acetonu, utrzymując wartość $pH = 8,0$ za pomocą $\frac{n}{1} NaOH$. Następnie dodaje się do roztworu reakcyjnego 450 cm³ wody, po czym postępuje się jak w przykładzie III.

Stwierdzono za pomocą miareczkowania nieobecność 50 grup aminowych podczas gdy w kontrolnym preparacie było tylko 31 grup, czyli 19 grup aminowych przereagowało.

Przykład V. 2 g insuliny rozpuszcza się w 85 cm³ wody zakwaszonej $\frac{n}{1} HCl$, przy czym pH reguluje się do wartości 7,0 za pomocą $\frac{n}{1} NaOH$ i następnie w ciągu 20 minut dodaje się kroplami roztworu 63,4 mg bezwodnika kwasu octowego w 5 cm³ acetonu. Przez jednoczesny dodatek $\frac{n}{1} NaOH$ utrzymuje się wartość $pH = 7,0$. Tak otrzymaną pochodną insuliny wytrąca się nadmiarem acetonu, zbiera, przemywa acetonem i eterem i wreszcie suszy.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób otrzymywania pochodnych insuliny obniżających zawartość cukru we krwi, zna-

mienny tym, że insulinę poddaje się działaniu izocyjanianów lub innych substancji, które zdolne są reagować z jej grupami aminowymi podstawiając w nich atomy wodoru, w takich warunkach temperatury, środowiska, stężeń składników użytych do reakcji oraz czasu działania, iż w wyniku reakcji produkt końcowy posiada całkowitą zdolność zmniejszania zawartości cukru we krwi, albo dużą część tej zdolności jaką posiada insulina, jednak wspomniana zdolność zmienia się w tym sensie, iż działanie w organizmie trwa w ciągu stosunkowo dłuższego okresu czasu.

2. Sposób według zastrz. 1, znamienny tym, że reakcję przeprowadza się w układzie jednorodnym.
3. Sposób według zastrz. 2, znamienny tym, że jako rozpuszczalnik insuliny i substancji podstawiającej wodór w grupach aminowych stosuje się mieszaninę acetonu i wody.
4. Sposób według zastrz. 1-3, znamienny tym, że stosuje się izocyjanian fenylu.
5. Sposób według zastrz. 1-3, znamienny tym, że stosuje się chlorowcokwasy.
6. Sposób według zastrz. 1-3, znamienny tym, że stosuje się bezwodnik kwasowy.
7. Sposób według zastrz. 1-6, znamienny tym, że koniec reakcji określa się na podstawie próby biologicznej.
8. Sposób według zastrz. 1-6, znamienny tym, że zakończenie reakcji następuje kiedy przereaguje 1-30.10⁻³ milimoli grup aminowych dających się oznaczyć przez miareczkowanie, na milimol całkowitego azotu.
9. Sposób według zastrz. 8, znamienny tym, że liczbę reagujących grup aminowych określa się za pomocą miareczkowania jako różnicę między liczbą grup aminowych dających się miareczkować w preparacie otrzymanym oraz w preparacie kontrolnym.
10. Sposób według zastrz. 8, znamienny tym, że liczba grup aminowych określa się na podstawie ilości użytej substancji podstawiającej atom wodoru w grupie aminowej.

Novo Therapeutisk Laboratorium A/S
Zastępca: Kolegium Rzeczników Patentowych

