



222411

222411

Memoria Descriptiva

para

una patente de Invencion, por 20 años,

a favor de

D. Jules Pierre Daniel SANTENOISE

-frances-

residente en

Paris -Francia-

78, Avenue de la Bourdonnais

por:

-Procedimiento de extraccion y de purificacion
de una hormona pancreatica que actua sobre los centros res-
piratorios-.

Prioridad. Sol.pat.francesa P.V. 671.080 del día 15 Junio 1954.



222411

El presente invento tiene por objeto un procedimiento de extracción y de purificación compuesto de un conjunto de formas operatorias dirigidas a la obtención de una hormona pancreática que actúa sobre los centros respiratorios, siendo esta hormona pancreática totalmente carente de insulina y de vagotonina, hormona pancreática esta última que actúa sobre el parasimpático.

El procedimiento según el presente invento consiste esencialmente en tres operaciones de preparación.

En la primera operación se procede a la extracción de la hormona activa sobre los centros respiratorios, contenida en el páncreas del buey. Al mismo tiempo que esta hormona se extraen la insulina y la vagotonina.

En la segunda operación se elimina del extracto bruto obtenido anteriormente toda la vagotonina y al mismo tiempo una parte de la insulina.

La tercera operación consiste en eliminar totalmente las últimas trazas de insulina y ciertas impurezas, particularmente una sustancia hiperglicemiante.

Para ilustrar el invento se señala después un ejemplo no limitativo del procedimiento de extracción y de purificación de la hormona pancreática.

La primera operación consistente en obtener un extracto bruto, puede realizarse por tres métodos.

En el primer método se hace macerar durante 24 horas páncreas de buey tomados al sacrificar el animal y finamente



222411

5 picados, en un líquido extractivo compuesto de alcohol etílico de 95° y ácido clorhídrico de densidad igual a 1,18 en la proporción de 11 o 12 centímetros cúbicos de ácido por litro de alcohol. Se emplea 1,5 litros de líquido por kilogramo de pán-

5 creas, lo que comunica a la maceración un grado alcohólico próximo a 50° y un pH comprendido entre 3 y 4.

Después de escurrir y prensar la maceración, los cal-

10 dos alcohólicos ácidos reciben una disolución de acetato sódico a 50 % en cantidad suficiente para lograr una iniciación de floculación. Se necesita aproximadamente de uno a cuatro centímetros cúbicos de acetato sódico por litro y el pH debe quedar alrededor de 5. Después de algunas horas de reposo se filtra sobre lienzo.

15 Los líquidos limpios se concentran luego a 1/15 de su volúmen inicial por destilación al vacío sin pasar de la temperatura de 20° C.

20 El líquido concentrado, enfriado a 0° C, recibe el 1/10 de su volúmen de cloroformo enfriado a 0° C y después de agitar se le abandona en reposo a baja temperatura durante una noche. Por sifonado se recoge la capa sobrenadante. El pH de este líquido se ajusta a 2,5 y se satura de cloruro sódico. El precipitado recogido por centrifugación se deshidrata mediante alcohol y se seca al vacío.

25 Un segundo modo de extracción consiste en tratar el páncreas de buey congelado a menos de 30° C después de sacrificado el animal, en los aparatos de secado en frío mediante vacío. El páncreas desecado se pulveriza, se desengrasa por agotamiento mediante tricloretileno. El polvo de páncreas se estabiliza con acetona. Luego se le pone a macerar durante 12



222411

a 18 horas en cinco veces su peso de agua enfriada a 2° C. El pH de la disolución se ajusta a 5. Después de escurrir el líquido de la maceración se ajusta a un pH 4. Se deja en reposo una o dos horas y se centrifuga el precipitado formado. El líquido recogido por centrifugación recibe una disolución de acetato sódico al 50 % en cantidad suficiente para lograr se inicie la floculación, lo que se deja continuar durante algunas horas. El pH es alrededor de 5. Cuando el precipitado comienza a depositarse se filtra sobre tela o lienzo. Se pone el líquido a un pH igual a 2,5 mediante ácido clorhídrico y se satura de cloruro sódico. Se centrifuga el precipitado formado, se deshidrata por alcohol absoluto y se seca al vacío.

Un tercer procedimiento consiste en recoger, en el curso de la preparación de la insulina partiendo de páncreas de buey, las aguas madres proveniente de la separación de la insulina en su punto isoeléctrico en los líquidos de extracción del páncreas. El pH de estas aguas madres se ajusta a 2,5 y se le satura con cloruro sódico. El precipitado recogido se seca con alcohol y al vacío.

La sustancia pancreática obtenida por uno de estos métodos de extracción se somete luego a las operaciones de purificación que eliminan totalmente la vagotonina y la insulina que pueden comprobarse en el extracto mediante reactivos o ensayos adecuados.

Los ensayos o test biológicos que se emplean para controlar la depuración progresiva de la hormona buscada, permiten determinar el aumento de actividad respiratoria del extracto y la desaparición total de la actividad sobre el parasimpático; al mismo tiempo la electroforesis permite apreciar si desapare-



222411

ce progresivamente la insulina en el transcurso de la purificación. También se eliminan las otras impurezas proteídicas.

5 La actividad respiratoria se mide por medio del test descrito más abajo que se practica sobre las cobayas no anestesiados y no sometidos a contención. Se les hace inhalar una mezcla de aire y de CO₂ conteniendo dosis progresivamente crecientes de CO₂. La dosis de CO₂ que provoca un aumento de la ampliación torácica, fenómeno que puede registrarse gráficamente, es aquélla por la que se alcanza el umbral de la excitabilidad de los centros respiratorios.

10 Después de inyectar en los cobayas el extracto pancreático purificado conteniendo la hormona respiratoria, el aumento de la ampliación torácica aparece para dosis menores de CO₂ en la mezcla inhalada, manifestando un aumento de la excitabilidad química de los centros respiratorios.

15 En el decurso de la purificación del extracto pancreático se puede seguir el enriquecimiento de este último en hormona respiratoria, por el hecho de que se necesitan cada vez pesos menores de extracto para aumentar la excitabilidad de los centros respiratorios. De este modo se puede graduar con grandísima precisión la acción de los extractos pancreáticos sobre la excitabilidad química de los centros respiratorios.

20 La actividad sobre el parasimpático se pone de manifiesto por el test del reflejo óculo-cardíaco en el conejillo no anestesiado.

25 El estudio experimental y estadístico ha demostrado que bastan 5 gamma por kilogramo de conejo en inyección subcutánea, de vagotonina muy purificada para obtener un aumento importante y duradero del efecto cardio-moderador consecutivo a



228411

la compresión de los globos oculares, y siguiendo este método es fácil verificar que una cantidad dada de extracto pancreático contiene menos de 5 gamma de hormona vagotonizante.

5 Se ha comprobado que en ciertas condiciones de concentración y de pH las sales de los metales pesados precipitan la vagotonina de disoluciones de extractos pancreáticos. En este procedimiento se ha escogido como sal al cloruro de cinc que se hace actuar sobre una disolución muy diluída de extracto pancreático bruto, del que se precipita la vagotonina. La cantidad
10 de cloruro de cinc que se ha de emplear, para eliminar totalmente la vagotonina puede variar con los extractos brutos que se han de purificar. Por consiguiente para un lote importante de extracto pancreático bruto se determinan las diferentes cantidades de cloruro de cinc a partir de pruebas tomadas del lote
15 de extracto pancreático bruto.

El segundo modo de operar en el procedimiento consiste en determinar primeramente las cantidades necesarias de sales y proceder luego a la purificación del lote total. Para realizar esto se toma una prueba correspondiente a 50 kg de páncreas,
20 se le somete a las operaciones de purificación después descritas, empleando p. ej. un centímetro cúbico de disolución al 20 % de cloruro de cinc.

Entonces se realiza el test del reflejo óculo-cardíaco.

Si mediante inyección al conejo del producto obtenido,
25 a razón de 50 mg por kg de animal, se observa todavía un aumento de la reflectividad parasimpática, se deduce de ello que no se ha eliminado toda la vagotonina.

Se vuelve otra vez a purificar otras pruebas del mismo peso aumentando la cantidad de disolución de cloruro de cinc



222411

al 20 % de dos o tres décimas de centímetro cúbico hasta que se obtenga un producto purificado totalmente inactivo sobre el parasimpático.

5 Esta investigación mediante ensayos sucesivos de la cantidad de cloruro de cinc mínima necesaria para la eliminación total de la vagotonina, es indispensable, pues se corre el riesgo al emplearse una vez una gran cantidad de cloruro de cinc que evidentemente precipitaría toda la vagotonina, de arrastrar con esta última una parte o incluso la totalidad de la hormona respiratoria que se quiere aislar.

10 A continuación se señala un ejemplo numérico que permite purificar un lote de extracto bruto correspondiente a varias toneladas de páncreas. Se comprende que las cantidades de sales de cinc empleadas en esta purificación solo tienen validez para el lote de extracto pancreático considerado.

15 300 g de extracto bruto se disuelven en 900 ccm de agua. Mediante sosa cáustica o ácido clorhídrico (que son los únicos agentes alcalinos o ácidos empleados en el decurso de la purificación) se ajusta el pH de la disolución a unos 6. La disolución se somete a la diálisis durante una noche a la temperatura de unos 15° C, habiendo demostrado la experiencia que las diálisis a baja temperatura no permiten eliminar ciertas sustancias de acción antirrespiratoria o tóxica.

20 La disolución privada de sales se filtra, se completa el volumen a 4 litros mediante agua destilada y el pH se ajusta a 5. Se añaden 9 cm³ de disolución de cloruro de cinc al 20 %. Se deja reposar media hora a 15° C, habiéndose comprobado ser ineficaz la operación a baja temperatura. Se eleva el pH hacia el estado neutro hasta que aparece un precipitado. Se deja reposar durante 2 horas a 15° C. El precipitado formado

30



222411

que contiene la vagotonina bajo forma de vagotonina-cinc compleja, se separa por centrifugación.

5 El pH de la disolución se pone a 2,6 y se le agrega cloruro sódico a saturación, agitando para facilitar la disolución de la sal. Se centrifuga el precipitado formado después de 3 horas de reposo a muy baja temperatura, inferior a 0° C.

Las tortas de centrifugación se disuelven en 300 cm³ de agua; el pH de la disolución se pone a unos 6 y ésta se somete a una diálisis durante una noche a unos 15° C.

10 El líquido privado de sales se pone progresivamente a un pH igual a 2,6 observando si se forma algún enturbiamiento o floculado con un pH comprendido entre 5 y 4,7, en cuyo caso hay que eliminar los cuerpos insolubles formados. Cuando el pH se vuelve a 2,6, la disolución refrigerada a 0° C recibe medio
15 volúmen de disolución de cloruro de litio al 50 % enfriada a 0° C. Se deja reposar en frío durante 2 horas. Por centrifugación se separa el precipitado formado, se disuelve luego en el mínimo de alcohol a 70°; la disolución alcohólica se pone a un
20 pH igual a unos 6 y se vierte en 10 volúmenes de alcohol absoluto enfriado a 0° C. El precipitado recogido por centrifugación se seca al vacío.

25 El extracto purificado obtenido que es del orden de 30 a 35 g por 350 kg de páncreas tratado no debe contener ya vagotonina, pero puede contener todavía insulina patentizable, por electroforesis, y una sustancia hiperglicemiante. Su actividad sobre los centros respiratorios que se determina por el test de CO₂ sobre el cobaya, es del orden de 10 unidades respiratorias por miligramo de extracto.

Inmediatamente se procede a la tercera operación con-



222411

sistente en eliminar las últimas trazas de insulina al mismo tiempo que las otras impurezas existentes en pequeña cantidad.

Se disuelve el extracto purificado en 10 veces su peso de agua. El pH de la disolución se ajusta a unos 6. Por centrifugación se elimina todo enturbiamiento o floculado que se forme después de algunas horas de reposo en frío. El pH de la disolución que es igual a 5, se mantiene después diluyendo progresivamente mediante agua hasta que se forme un enturbiamiento o floculación que se separa por centrifugación. Si por disolución hasta un volumen triple de su volumen inicial no se produce nada, el pH de la disolución se ajusta a 4,7. Se elimina la fluidez o floculado que se forma con el reposo en frío; esta fluidez o floculado está constituida por la sustancia hiperglicemiante.

La disolución, privada de todos los elementos insolubles, comprendida entre un pH igual a 5 y un pH igual a 4,7, se somete a la diálisis durante 5 horas a 15° C.

Después de la diálisis y de verificar nuevamente la ausencia de insolubles con un pH igual a 4,7 y un pH igual a 5 (insoluble que se elimina por centrifugación en el caso de producirse), la disolución se ajusta a un pH igual a 4,7 y recibe 15 % de su volumen de alcohol absoluto. Por centrifugación se separa el precipitado formado. El líquido limpio y claro se vierte en una mezcla de 5 volúmenes de alcohol absoluto y 3 volúmenes de éter enfriada a 0° C. El precipitado se recoge por centrifugación y se seca al vacío.

Este precipitado seco se redissuelve en 10 veces su peso de agua. Se elimina todo lo insoluble que se forma en la zona de pH comprendida entre 4,7 y 5,5. Se diluye al doble del



222411

volúmen y se elimina todavía todo lo insoluble entre un pH de 4,7 y 5,5.

5 El líquido enfriado a 0° C recibe la mitad de su volúmen de una disolución de cloruro de litio al 50 % enfriada a 0° C, después de haber ajustado el pH a 2,7.

10 El precipitado se centrifuga después de 2 horas de reposo en frío. Se le disuelve en el mínimo de alcohol de 70° enfriado a 0° C. La disolución se pone a un pH igual a 6 y se vierte en 10 volúmenes de alcohol absoluto enfriado a 0° C. El precipitado centrifugado se seca al vacío.

15 Se redisuelve este precipitado en 10 veces su peso de agua. El pH de la disolución se ajusta a unos 6. Se somete a la diálisis durante 3 o 4 horas. La disolución privada de sales se vierte en 10 volúmenes de alcohol absoluto enfriado a 0° C. El precipitado centrifugado se tritura en una nueva cantidad de alcohol absoluto enfriado, se vuelve a centrifugar y a secar al vacío.

20 Por pulverización se obtiene un polvo blanco a razón de 5 centigramos por kg de páncreas tratado.

Los test de actividad y de pureza practicados sobre este extracto purificado revelan la presencia de una actividad respiratoria del orden de 10 unidades por lo menos, por 0,5 mg de producto, la ausencia total de vagotonina, de insulina y de toda sustancia hiperglicemiante.

=0=0=0=0=0=0=



115

N O T A
=====

222411

La presente patente de invención comprende las siguientes reivindicaciones:

5 1.- Procedimiento de extracción y de purificación de una hormona pancreática que actúa sobre los centros respiratorios, caracterizado porque se procede a la extracción de la hormona activa sobre los centros respiratorios contenida en el páncreas de buey y como al mismo tiempo que la hormona buscada se extraen la insulina y la vagotonina, la segunda operación se destina a eliminar del extracto bruto conteniendo la hormo-
10 na buscada, toda la vagotonina y simultáneamente la mayor parte de la insulina, permitiendo la tercera operación eliminar totalmente las últimas trazas de insulina y ciertas impurezas constituidas particularmente por una sustancia hiperglicemian-
te.

15 2.- Procedimiento de extracción y de purificación de una hormona pancreática que actúa sobre los centros respiratorios, caracterizado porque la primera operación consiste en la extracción de la hormona a partir de páncreas fresco de buey mediante un líquido compuesto de alcohol etílico y de ácido
20 clorhídrico, tratándose en seguida los caldos obtenidos por acetato sódico, cloroformo, cloruro sódico y recogiendo finalmente por centrifugación, se secan mediante alcohol al vacío.

25 3.- Procedimiento de extracción y de purificación de una hormona pancreática que actúa sobre los centros respiratorios, caracterizado porque el extracto bruto obtenido partiendo de un polvo de páncreas estabilizado por acetona disuelta en agua, se escurre y después se trata por acetato sódico, por



222411

ácido clorhídrico, por cloruro sódico y se centrifuga el precipitado formado, se deshidrata por alcohol absoluto y se seca al vacío.

5 4.- Procedimiento de extracción y de purificación de una hormona pancreática que actúa sobre los centros respiratorios, caracterizado porque el extracto bruto se obtiene a partir de la preparación de insulina recogiendo las aguas madres provenientes de la separación de la insulina en su punto isoelectrico, tratándose estas aguas madres por cloruro sódico para obtener un precipitado que se seca al alcohol y bajo vacío.

10 5.- Procedimiento de extracción y de purificación de una hormona pancreática que actúa sobre los centros respiratorios, caracterizado porque la eliminación de la vagotonina se realiza tratando el extracto bruto por sales de metales pesados.

15 6.- Procedimiento de extracción y de purificación de una hormona pancreática que actúa sobre los centros respiratorios, caracterizado porque como sal de metal pesado se utiliza la sal de cloruro de cinc.

20 7.- Procedimiento de extracción y purificación de una hormona pancreática que actúa sobre los centros respiratorios, caracterizado porque la insulina se separa del extracto semipurificado por tratamiento con alcohol por diálisis y por centrifugación.

25 8.- Procedimiento de extracción y de purificación de una hormona pancreática que actúa sobre los centros respiratorios.

Según se describe y reivindica en la presente memoria descriptiva.

30 Consta esta memoria de doce hojas foliadas y escritas a máquina por una sola de sus caras.

14 JUN 1950