



18 NO

225087

C E R T I F I C A D O

D E

A D I C I O N

por "MEJORAS INTRODUCIDAS EN EL OBJETO DE LA PATENTE PRINCIPAL N^o 222.411" por "Procedimiento de extracción y de purificación de una hormona pancreática que actúa sobre los centros respiratorios", a favor de Don Jules Pierre Daniel SANTIENOISE, de nacionalidad francesa, domiciliado en PARIS (Francia), 70 Avenue de la Bourdonnais.

MEMORIA DESCRIPTIVA

El presente Certificado de Adición se refiere a mejoras introducidas en el objeto de la patente principal n^o 222.411 por "Procedimiento de extracción y de purificación de una hormona pancreática que actúa sobre los centros respiratorios?"

5.

Este procedimiento consta de tres modos operativos de los que el primero permite la extracción de la hormona activa sobre los centros respiratorios contenida en el páncreas de buey, pero como al mismo tiempo la insulina y la vagotonina se encuentran extraídas con la hormona buscada, el segundo modo operativo está destinado a eliminar del extracto bruto que contiene la hormona buscada toda la vagotonina y, al mismo tiempo, la mayor parte de la insulina; el tercer modo operativo es el que permite eliminar completamente las

10.

15.

225087

18



últimas trazas de insulina y ciertas impurezas constituidas en particular por una substancia hiperglicemiante, según se indicaba en la citada patente principal.

5. Conforme a este certificado de adición, en el tercer modo operatorio se procede desde luego a un fraccionamiento del alcohol del extracto pancreático obtenido en los dos modos operatorios precedentes y dializado; después se procede seguidamente a un fraccionamiento al cloruro de litio de la parte activa aislada por el tratamiento alcohólico, siendo finalmente secado el extracto al alcohol éter y bajo vacío.

10. Según otra particularidad de este certificado de adición, el extracto obtenido es tratado de manera de eliminar la insulina restante utilizando la propiedad que posee esta última de formar un complejo irreversible con el ferrocianuro de potasio en ciertas condiciones de concentración y de pH.

Se da a continuación, a título de ejemplo no limitativo, una descripción del procedimiento.

20. Después de haber sacado el extracto bruto correspondiente a varias toneladas de páncreas y separado de este extracto la mayor parte de la vagotonina así como la mayor parte de la insulina denunciada por electroforesis e igualmente la mayor parte de substancia hiperglicemiante, se procede a un fraccionamiento al alcohol del extracto pancreático precedentemente obtenido.

25. El extracto es disuelto en siete veces su peso de agua, siendo ajustado el pH a los alrededores de 6, y se pone la solución en diálisis durante cuatro horas. Terminada esta operación, el líquido recibe un volumen de
- 30.

225087

18 N^o



- alcohol etílico absoluto tal que el título alcohólico final esté comprendido entre 15 y 20%, siendo el pH ajustado a 4,7. Esta operación debe ser ejecutada a temperatura muy baja, alrededor de los - 5° C., y
5. la adición de alcohol debe hacerse por cantidades muy pequeñas con agitación constante.
- El precipitado que se forma es eliminado por centrifugación. El líquido limpio recogido es llevado cerca de la neutralidad por la sosa a 50% y vertido
10. en 10 volúmenes de alcohol absoluto enfriado a - 5° C. Se recoge el precipitado por centrifugación, se le seca al alcohol éter y bajo vacío. Partiendo de 100 gramos del extracto se viene a parar en 35 gramos, aproximadamente.
15. El extracto pancreático así obtenido sufre seguidamente un fraccionamiento a 3a sal. Es entonces puesto en solución en 10 veces su peso de agua. El pH es ajustado a 3,45. la solución es enfriada a 0° C., y recibe un semi-volumen de una solución al 50% de cloruro de litio. El precipitado formado es eliminado por
20. centrifugación después de una media hora de reposo.
- El líquido recogido es ajustado a un pH igual a 2,7, después el precipitado es dejado en reposo durante una media hora antes de ser centrifugado, redisuelto
25. en un mínimo de alcohol a 60%; esta solución neutralizada es precipitada por 10 volúmenes de alcohol absoluto. El precipitado recogido por centrifugación es secado al alcohol éter y bajo vacío, Se obtienen así de
30. 15 a 20 gramos del extracto activo sobre los centros respiratorios a razón de 20 a 40 unidades por miligra-

225087.18A



mo. Este extracto no contiene nada de substancia hiperglicemiante, pero contiene aun trazas de insulina netamente deunciables por el estudio de la glicemia en el perro antes y después de la inyección del producto.

5. Para obtener un extracto puro, se procede a la eliminación de estas trazas de insulina utilizando la propiedad que posee esta última de formar un complejo irreversible con el ferrocianuro de potasio en ciertas condiciones de concentración y de pH.
10. El extracto pancreático obtenido en el modo operativo precedente (15 a 20 gramos) es disuelto en una solución al 2 por 1000 de ferrocianuro de potasio. Se necesitan 20 cm³ de esta solución por gramo del extracto a purificar.
15. Se comienza a disolver la substancia en la cuarta parte del volumen de solución a emplear y se ajusta el pH entre 3,8 y 4. Después de diez minutos de reposo se añade el resto de la solución de ferrocianuro de potasio en tres adiciones sucesivas de volumen igual separando cada adición por un tiempo de reposo de diez minutos y se conserva el pH entre 3,8 y 4.
Se deja depositarse el precipitado durante dos horas a 0° C. y se le separa por centrifugación.
25. El líquido límpido recogido es acidificado por el ácido clorhídrico BN hasta un pH = 2,8. En el curso de esta operación se elimina por centrifugación los precipitados que puedan formarse. El líquido acidificado enfriado a 0° C. recibe un semi-volumen de solución al 50% de cloruro de litio. Se deja reposar durante treinta minutos a 0° C. y se recoge el precipitado por cen-
- 30.

225087



trifugación. Se disuelve en el mínimo de alcohol a 60°, siendo luego neutralizada la solución y vertida en 10 volúmenes de alcohol absoluto. El precipitado centrifugado es secado al alcohol éter y bajo vacío.

5. Se obtienen de 8 a 10 gramos de un extracto activo sobre los centros respiratorios a razón de 100 a 200 unidades por milígramo. Este extracto no tiene actividad alguna sobre el parasimpático, ni tiene acción hiperglicemiante ni hipoglicemiante.

10. La electroforesis muestra que la sustancia se ha empobrecido en impurezas y que la parte activa se ha enriquecido.

Diversas modificaciones pueden ser aportadas, por otra parte, a los modos operatorios del procedimiento de extracción y de purificación de la hormona pancreática actuando sobre los centros respiratorios, sin salirse del cuadro de este Certificado de Adición.

15.

N O T A

Hecha la descripción del presente invento se hace constar, que esta solicitud se acoge a los beneficios de prioridad de la solicitud de patente adicional francesa N° P.V. 55.480, depositada en 31 de Mayo de 1955, y que se declaran como nuevas y de propia invención las reivindicaciones siguientes:

25. 1ª.- Mejoras introducidas en el objeto de la patente principal núm. 222.411 por "Procedimiento de ex-

225087

18 NOV



- tracción y de purificación de una hormona pancreática que actúa sobre los centros respiratorios", caracterizadas porque se somete el páncreas de buey al tratamiento de una mezcla alcohólica ácida, obteniéndose
5. después por precipitación global a la sal insulina, vagotonina, y la hormona activa sobre los centros respiratorios, así como diversas impurezas, procediéndose entonces a la separación de la insulina por precipitación de esta última a su punto iso-eléctrico, recuperando
10. después por precipitación al cloruro de litio en medio ácido la vagotonina y la citada hormona activa sobre los centros respiratorios, procediendo seguidamente a la eliminación total de la vagotonina por diálisis y a un fraccionamiento al alcohol del extracto pancreático obtenido, siendo finalmente sometido el extracto
15. a este fraccionamiento al cloruro de litio, secándolo al alcohol éter y bajo vacío.

- 2ª.- Mejoras, según la reivindicación 1ª, caracterizadas porque el extracto obtenido es tratado de manera
20. de eliminar la insulina restante utilizando la propiedad que posee esta última de formar un complejo irreversible con el ferrocianuro de potasio en ciertas condiciones de concentración y de pH.

- 3ª.- Mejoras, según la reivindicación 2ª, caracterizadas porque la solución empleada del ferrocianuro de potasio es de concentración al 2 por 1000.
- 25.

- 4ª.- Mejoras, según la reivindicación 2ª, caracterizadas porque el pH es ajustado entre 3,3 y 4.

- 5ª.- mejoras introducidas en el objeto de la patente principal nº 222.411 por "Procedimiento de extracción
- 30.

2250878 NOV



y de purificación de una hormona pancreática que actúa sobre los centros respiratorios?

Según se describe y reivindica en la presente memoria que consta de siete hojas foliadas y mecanografiadas por una sola cara.

Madrid, a 18 de noviembre de 1955.

Jules Pierre Daniel **SANTENOISE**.

p. a.

JAIME ISERN MIRALLES
P. P.