



P.- 20.912

76.445/NL/Joh

265977

MEMORIA DESCRIPTIVA

que se presenta para unir a la solicitud

de

P A T E N T E D E I N T R O D U C C I O N

formulada el 23 de Marzo de 1.961, con el N^o. 265.977

en

E S P A Ñ A

por DIEZ años

a nombre de APOTEKSVARUCENTRALEN VITRUM APOTEKAREAKTIEBO-
LAGET, entidad sueca, establecida en Franzégatan 9, Esto-
colmo, Suecia, por:

"UN PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR INSULINA"

El presente invento se refiere a un procedimiento
para la preparación de insulina a partir de un extracto
pancreático alcohólico, ácido, que contenga insulina, ob-
tenido, por ejemplo, a partir del páncreas de cerdo, vaca
5 o caballo.

De acuerdo con el presente invento, se logra un pro-
cedimiento para la preparación de insulina a partir de un
extracto pancreático alcohólico, ácido, que contenga in-
sulina, que comprende el contacto de dicho extracto con
10 un cambiador de cation y la elución de la insulina de di-

265977



cho cambiador. Las ventajas principales de este procedimiento son que no hay necesidad de concentrar el extracto alcohólico ácido por evaporación y que la grasa presente queda en la solución cuando el extracto se pone en contacto con el cambiador de catión.

Convenientemente, el extracto se enfría, aproximadamente, a -5° C y se centrifuga para separar la grasa sólida y proteínas del mismo antes de ponerlo en contacto con el cambiador de catión, facilitando, con ello, la adsorción de la insulina. El cambiador de catión empleado es, de preferencia, un material natural o sintético que contenga grupos carboxilo, por ejemplo, el producto conocido como Amberlite IRC 50 (fabricado por la Rohm & Haas, Delaware, EE.UU. de América) ("Amberlite" es una marca registrada) o más convenientemente oxice-lulosa, ácido péctico o ácido alginico. La extracción se lleva a cabo preferentemente existiendo ácido presente en una cantidad tal que el valor final del pH del extracto sea, al menos, 3.

En un procedimiento preferido, se emplea como cambiador de catión una suspensión acuosa de ácido alginico en una cantidad de 40 a 60 g. de ácido alginico por kilogramo del páncreas a partir del cual se ha preparado el extracto. De modo conveniente, el extracto se pone en contacto con el cambiador de catión a temperatura ambiente durante unas 2 horas.

El alcohol utilizado para formar el extracto puede ser un alcohol alifático, que contenga 1 a 4 átomos de carbono, como el metanol o etanol, en la concentración citada en la bibliografía. El valor del pH del extracto,

265977



de preferencia es, por lo menos, 3, es decir, algo más elevado del que ha sido usual hasta ahora, y el extracto puede obtenerse así empleando con el alcohol una cantidad de ácido menor de la ordinaria hasta ahora. Mientras que en los procedimientos usuales que emplean ácido clorhídrico, se utilizan de 35 a 60 ml. de ácido clorhídrico 10 N por kilogramo de páncreas, se prefiere emplear solamente de 12 a 20 ml. de ácido clorhídrico 10 N por kilogramo de páncreas para preparar el extracto utilizado en el procedimiento presente. Se encontró que la centrifugación y filtración del material glandular, dando un extracto transparente, se consigue más fácilmente si el alcohol se acidula con un ácido orgánico, como el ácido acético, ácido cítrico o ácido oxálico, en vez de con un ácido inorgánico. Cuando se utiliza ácido acético glacial, se prefiere una cantidad de unos 40 ml. por kilogramo de páncreas. Empleando esta cantidad, la extracción de las glándulas desmenuzadas, congeladas, se lleva a cabo, convenientemente, a temperatura ambiente durante un período de 4 a 5 horas.

Antes de poner en contacto el extracto con el cambiador de catión carboxílico, se prefiere precipitar las sales neutras y las impurezas proteínicas llevando el extracto hasta la neutralidad o, aproximadamente, a un pH 8 con amoníaco. Cuando se utilizan determinados ácidos orgánicos, una cantidad considerable del ácido se elimina como sal amónica insoluble en alcohol al 70%. Con objeto de eliminar los iones amonio que quedan y evitar la formación de sales cuando se ajusta la solución al pH ácido necesario para la adsorción o concentración de la

265977



insulina bruta por el cambiador de catión carboxílico,
el extracto alcohólico puede ponerse en contacto, de pre-
ferencia en fases, con un cambiador de catión sulfonado,
de elevado entrecruzamiento, como el material conocido
5 como Dowex 50 (fabricado por la Dow Chemical Company)
en una cantidad tal que se obtenga un valor del pH de
3, aproximadamente. Mediante estos procedimientos, se
facilita la adsorción de la insulina por el cambiador
de catión carboxílico, de manera que se obtenga un ren-
10 dimiento considerablemente mejor y pueda utilizarse una
cantidad menor de cambiador de catión carboxílico.

Después de ponerlo en contacto con el extracto,
el cambiador de catión carboxílico, en un procedimiento
típico, se recoge sobre un filtro con succión y la insu-
15 lina se eluye del mismo con un ácido mineral diluido,
como el ácido sulfúrico o el ácido clorhídrico. Si se
utiliza ácido algínico como cambiador de catión, la
elución puede llevarse a cabo a temperatura ambiente,
utilizando unos 100 ml. de ácido clorhídrico 0,3 N por
20 10 g de ácido algínico. La insulina puede entonces pre-
cipitarse el eluato por saturación con cloruro sódico y,
después de esto, someterse a una purificación posterior
por los métodos usuales.

Los ejemplos siguientes se indican con objeto de
25 aclarar el invento:

EJEMPLO I

EXTRACCION

Un kilogramo de páncreas de ternera se tritura en
30 1,8 litros de alcohol etílico al 95%, al que se han aña-



5 dido 200 ml. de agua y 12 ml. de ácido clorhídrico 10 N.
La extracción se lleva a cabo a temperatura ambiente du-
rante 4 horas con agitación. El residuo sólido de las
glándulas se separa por centrifugación y el líquido se
filtra hasta ser transparente por un filtro con succión,
después de añadirle una pequeña cantidad de la tierra de
diatomeas, conocida como Hyflo-supercel. (Las palabras
"Hyflo" y "Supercel" son marcas registradas). El valor
del pH de la solución es de 4,8.

10 Se lleva a cabo, a continuación, una nueva extrac-
ción del residuo sólido de las glándulas en 1,5 litros
de alcohol etílico al 70%, que contenga 4 ml. de ácido
clorhídrico 10 N, agitando durante una hora, después
de lo cual, la mezcla se centrifuga y se filtra trans-
15 parente. Los filtrados se combinan. El volumen total es
de 3.300 ml. y el valor del pH es de 4,7.

CONCENTRACION EN EL CAMBIADOR DE CATION Y ELUCION

20 El cambiador de catión empleado es ácido alginico
lavado primeramente con ácido clorhídrico 0,2 N y, a con-
tinuación, repetidas veces con agua destilada, y seco,
finalmente, con alcohol. Al extracto se le añaden 60 g.
del polvo seco en suspensión en agua destilada, agitando
durante 2 horas a temperatura ambiente. El ácido alginico
25 se recoge sobre un filtro con succión y se eluye con
una cantidad total de 600 ml. de ácido clorhídrico 0,3
N, agitando durante 20 minutos a temperatura ambiente.

La insulina se precipita saturando el eluato con
cloruro sódico.

30



EJEMPLO II

EXTRACCION

5 Un kilogramo de páncreas de caballo se tritura en
1,8 litros de alcohol etílico al 95% al que se han aña-
10 dido 200 ml. de agua y 40 ml. de ácido acético glacial.
La extracción se lleva a cabo a temperatura ambiente du-
rante 4 horas con agitación. El residuo sólido de las
glándulas se separa por centrifugación o filtración -
después de comprimirlo con gasa. El valor del pH es,
aproximadamente, de 4,8.

15 El residuo sólido de las glándulas se vuelve a
extraer durante una hora en 1,5 litros de alcohol etí-
lico al 70%, que contenga 5 ml de ácido acético glacial,
después de lo cual, la mezcla se centrifuga y se fil-
tra. Los filtrados se combinan. El valor del pH de los
filtrados combinados es, aproximadamente, de 4,8. El
extracto obtenido se enfría a -5° C, y el precipitado,
así formado se separa por filtración empleando una pe-
20 queña cantidad de Hyflo-supercel. El volumen total as-
ciende a unos 3.300 ml.

CONCENTRACION EN EL CAMBIADOR DE CATION Y ELUCION

25 El cambiador de catión utilizado es ácido algíni-
co que se ha lavado con ácido clorhídrico 0,2 N y des-
pués, repetidas veces, con agua destilada y, finalmen-
te, secado con alcohol. 60 g del polvo seco se ponen en
suspensión en agua, se añaden al extracto y se agitan
durante 2 horas a temperatura ambiente. El ácido algíni-
30 co se recoge por succión en un filtro y se eluye con unos



55577
600 ml de ácido clorhídrico 0,3 N, agitando durante 20 minutos.

La insulina se precipita saturando el eluato con cloruro sódico.

5

EJEMPLO III

EXTRACCION

10 5 kg. de páncreas de ternera o de vaca se trituran con 8 litros de alcohol etílico al 95% al que se ha añadido un litro de agua y 375 g. de ácido cítrico o 150 g. de ácido oxálico ($H_2C_2O_4 \cdot 2H_2O$) disueltos en un litro de agua. La mezcla se agita durante 5 horas a temperatura ambiente, y se filtra por una tela. El material glandular sólido se vuelve a extraer con 7.500 ml. de alcohol
15 etílico al 70% y, a continuación, se filtra por una tela. Se combinan los dos extractos. El valor del pH de la solución es, aproximadamente, de 3,4.

PURIFICACION DE LOS EXTRACTOS

20

Se añade a los extractos combinados una cantidad de amoníaco suficiente para dar un valor del pH de 8,5. El precipitado, así producido, se separa por filtración. El exceso de iones amonio se separa por adición, con agitación, se un cambiador de catión sulfonado, de elevado
25 entrecruzamiento, por ejemplo, el cambiador de catión conocido como Dowex 50 en la forma de hidrógeno, siendo la cantidad utilizada tal que dé un pH final de 3, aproximadamente.

25

CONCENTRACION EN EL CAMBIADOR DE CATION Y ELUCION

30

El cambiador de catión sulfonado se separa y se lava

5077



con alcohol etílico al 70%. Al extracto y al líquido de lavado se le añaden 75 g. de ácido algínico húmedo, que se ha lavado con agua y ácido clorhídrico. La concentración en el cambiador de catión carboxílico se lleva a cabo agitando a temperatura ambiente durante la noche. El ácido algínico se deja sedimentar y se separa en un embudo con succión. Se recoge en un filtro, se lava con alcohol etílico al 95% y éter, después de lo cual, el éter se separan por aireación. Las últimas trazas de insulina se separan de las aguas madres por adsorción en una cantidad de ácido algínico igual a la empleada en la primera concentración. Los precipitados de ácido algínico se eluyen separadamente, cada uno con un litro de ácido clorhídrico 0,3 N agitando durante dos a tres horas a temperatura ambiente. Los eluatos se combinan y la insulina se precipita saturando el eluato con cloruro sódico.

La insulina se purifica, a continuación, por los procedimientos usuales.

20

- N O T A -

Los puntos de invención propia, no nueva, pero no establecida, practicada ni divulgada en España, que se presentan para que sean objeto de esta Patente de Introducción, por DIEZ años, son los siguientes:

1º. - Un procedimiento para preparar insulina a partir de un extracto pancreático alcohólico ácido que contiene insulina, que comprende poner dicho extracto en

30

265977



contacto con un permutador catiónico y eluir insulina - desde dicho permutador.

5 2º. - Un procedimiento según el punto 1º, en el cual el extracto se enfría a unos 5º C y se centrifuga para separar grasa sólida y proteínas del mismo antes de ponerlo en contacto con el permutador catiónico.

3º. - Un procedimiento según los puntos 1º o 2º, en el cual dicho extracto tiene un pH de por lo menos 3.

10 4º. - Un procedimiento según cualquiera de los - puntos 1º a 3º, en el cual el permutador catiónico es un material que contiene grupos carboxilo.

15 5º. - Un procedimiento según el punto 4º, en el cual el permutador catiónico es oxixelulosa, ácido pectínico o ácido algínico.

6º. - Un procedimiento según el punto 4º, en el cual el permutador catiónico es ácido algínico que se emplea en una cantidad de 40 a 60 gramos por kilogramo del páncreas, del cual se ha preparado el extracto alcohólico.

20 7º. - Un procedimiento según cualquiera de los puntos 4º a 6º, en el cual el permutador catiónico es ácido algínico y la elución se efectúa con un ácido mineral diluido.

25 8º. - Un procedimiento según el punto 7º, en el cual el ácido mineral es ácido sulfúrico o ácido clorhídrico.

30 9º. - Un procedimiento según cualquiera de los - puntos 1º a 8º, en el cual dicho extracto se obtiene - extrayendo páncreas con un alcohol alifático, que contiene de 1 a 4 átomos de carbono y acidificado con un ácido

265977



orgánico.

10^o. - Un procedimiento según el punto 9^o, en el cual el ácido orgánico es ácido acético glacial que se emplea en una cantidad de unos 40 ml. por kilo de páncreas.

5 11^o. - Un procedimiento según cualquiera de los puntos 1^o a 8^o, en el cual dicho extracto se obtiene extrayendo páncreas con un alcohol alifático que contiene de 1 a 4 átomos de carbono acidificado con de 12 a 20 ml. de ácido clorhídrico 10 N por kilo de páncreas.

10 12^o. - Un procedimiento según cualquiera de los puntos 1^o a 11^o, en el cual, antes de que el extracto se ponga en contacto con el permutador catiónico se precipitan las sales neutras e impurezas proteínicas haciendo el extracto neutro o llevándolo a pH 8 aproximadamente
15 con amoniaco.

13^o. - Un procedimiento según el punto 12^o, en el cual el extracto contiene un ácido orgánico y el líquido que queda después de la precipitación de las sales neutras y de las impurezas proteínicas se pone en contacto
20 con un permutador catiónico muy reticulado y sulfonado hasta que su pH se reduce a 3 aproximadamente y, después de la eliminación del permutador catiónico sulfonado, el líquido es luego puesto en contacto con un permutador -
25 catiónico carboxílico del cual se eluye luego la insulina.

14^o. - Un procedimiento para preparar insulina.

Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede y con los fines que se han especificado.

30

265977



Esta Memoria consta de once hojas escritas a máquina por una sola de sus caras.

Madrid,

P. A.

Arle

MIG/