

14



P- 31.325

Case A279

32 33 52

ABR. 1966

MEMORIA DESCRIPTIVA

que se presenta para unir a la solicitud

d e

PATENTE D E INVENCION

formulada el 21 de febrero de 1.966, con el N° 323.352

e n

E S P A Ñ A

por VEINTE años

a nombre de THE WELLCOME FOUNDATION LIMITED, entidad británica, establecida en 183-193 Euston Road, Londres, Inglaterra, por:  
"UN METODO PARA LA PREPARACION DE INSULINA"

---

El invento se refiere a la preparación de insulina.

En el procedimiento usual para la preparación de insulina, el tejido pancreático de ganado vacuno o de cerdo es extraído con un alcohol, o acetona, acuosos acidificados. El extracto puede ser concentrado entonces en vacío para separar el disolvente orgánico y también para separar los lípidos así hechos insolubles; alternativamente, el disolvente y los lípidos pueden ser extraídos con un disolvente inmiscible con el agua. La insulina bruta es precipitada entonces con cloruro de sodio desde el concentrado acuoso, y nuevamente purificada por



precipitaciones en su punto isoeléctrico, alrededor del pH 5,3, o por cristalización desde diversos sistemas de tampón en presencia de zinc. Se ha supuesto que aparecen considerables pérdidas particularmente en las etapas primeras del procedimiento, pero los intentos de eliminarlas y mejorar el rendimiento no han logrado hasta ahora un éxito significativo.

Se ha sugerido ya en la patente japonesa nº 6.492/63 que la insulina bruta puede ser purificada por adsorción desde una solución acuosa sobre carboximetilcelulosa a un pH entre 2 y 4, y subsiguiente elución con una solución de ácido o de sal. La adsorción de insulina desde un sistema acuoso sobre carboximetilcelulosa a un pH de aproximadamente 3,3 ha sido descrita también por L.F. Smith, Biochim. Biophys. Acta, 1.964, 82 231-236. Estos métodos, sin embargo, adolecen de la desventaja de que no son capaces de compensar las pérdidas que puedan haber tenido lugar anteriormente en el proceso, y no proporcionan por sí mismos condiciones para una extracción eficaz.

De acuerdo con el presente invento, se crea un método para la preparación de insulina, que comprende las operaciones de poner en contacto un extracto que es una solución parcialmente acuosa de insulina que contiene predominantemente uno o más disolventes orgánicos, tales como un alcohol inferior o acetona, a un pH indicado entre alrededor de pH 4,1 y pH 6,3, con un adsorbente de carboximetilcelulosa pre-ajustado sustancialmente al pH de la solución, poner en contacto el adsorbente, que contiene la insulina y está libre del residuo del extracto, con un disolvente de lípidos y eluir la insulina del adsorbente con una solución

323352

14 ABR 1950



acuosa que contiene ácido o sal. Preferiblemente la puesta en contacto del extracto con el adsorbente se lleva a cabo a un pH indicado entre aproximadamente pH 4,5 y 5,9.

5 Para el fin del presente invento, el pH indicado de una solución que contiene predominantemente disolventes orgánicos es determinado y de esta manera definido midiendo el pH aparente con un electrodo de vidrio frente a un electrodo de preferencia de calomelanos previamente calibrado con tamponadores acuosos normalizados.

10 El presente método se puede utilizar ventajosa - mente para purificar directamente el extracto bruto de insulina del páncreas, que contiene predominantemente un disolvente orgánico, usualmente 60 a 80% de etanol acidificado con ácido clorhídrico, sulfúrico o fosfórico, y está disponible a aproximadamente un pH 3. Antes de poner en contacto el extracto con carboximetilcelulosa, es esencial ajustar el pH, por ejemplo con amoníaco, hasta un valor superior - tal como se especifica anteriormente. Si es necesario filtrar el extracto a un pH incluso superior al pH 6,3 antes -  
20 de la operación de adsorción, la solución transparente ha de ser reajustada subsiguientemente con un ácido apropiado al pH requerido para la adsorción.

25 Cualquier tipo de adsorbente de carboximetilcelulosa, que sea insoluble en agua, puede ser utilizado para la finalidad del presente invento. Una preparación de carboximetilcelulosa, que es vendida como CM.11 (anteriormente conocida como CM.70) Whatman (marca registrada) y fabricada por los Sres. W & R. Balston Ltd. con una capacidad teórica de 0,7 miliequivalentes/g, ha resultado ser satisfacto -  
30 ria. Sin embargo, otras clases o marcas tales como carboxi-



14 APR 1964

metilcelulosa fabricada por Serva Entwicklungslabor. Heidelberg, Eastman-Kodak, o Bio-Rad Laboratories, California (Cellex), pueden resultar igualmente convenientes para su uso.

5                   Es importante que el estado iónico del adsorbente sea pre-ajustado sustancialmente al de la solución o extracto desde el que haya de ser separada la insulina. Usualmente, este ajuste se lleva a cabo suspendiendo el adsorbente en una solución de un ácido en un sistema disolvente similar a, o idéntico a, la solución o extracto de insulina y añadiendo amoníaco hasta que se alcanza el pH deseado. Preferiblemente, el ácido utilizado para este fin es un ácido débil que tiene alguna capacidad de tampón o un ácido polivalente tal como ácido fosfórico o cítrico.

10                   La adsorción de insulina desde la solución se puede llevar a cabo de una manera discontinua utilizando una o varias porciones del adsorbente y separando estas porciones de la solución después que se ha alcanzado el equilibrio. Esto se repite hasta que no se puede detectar más insulina en la solución. Cuando se utiliza la anterior preparación "CM.11", se ha encontrado suficiente el equivalente de aproximadamente 20 a 40 g. (peso en seco) por 100 gramos de páncreas. Alternativamente, el adsorbente puede ser utilizado en la forma de una columna, lámina o capa y la adsorción, la subsiguiente elución, se pueden llevar a cabo con las técnicas apropiadas bien conocidas en el campo de la cromatografía.

25                   Después que la insulina ha sido retenida sobre la carboximetilcelulosa, los lípidos y otras impurezas pueden ser separados ventajosamente por un disolvente de lí-

323352

14 ABR



pidos que sea inocuo para la insulina y no eluya la insulina desde el adsorbente. Ejemplos de tales disolventes - son el cloroformo, dicloroetileno, diclorometano o los alcohales inferiores con o sin algo de agua. Aunque la mayor  
5 parte de estos disolventes son apropiados para el fin, se prefieren los que son miscibles con agua, en particular - el tanol. El contenido en agua del etanol puede ser, por ejemplo, hasta de 35°C.

La masa del disolvente residual es retirada convenientemente por aireación o aclarado con agua.  
10

La elución se puede llevar a cabo por ejemplo - simplemente con una solución de ácido clorhídrico 0,1 N, o con una serie de tratamientos sucesivos con soluciones de ácido o de sal con concentraciones crecientes para obtener fracciones de diversa pureza. Una solución de insulina así obtenida por elución no solamente es fácilmente apropiada para una nueva purificación por métodos convencionales, sino que además el rendimiento o calidad de la insulina cristalina eventualmente recuperada de éstos son, como  
15 media, significativamente más altos o superiores a los logrados hasta ahora. El adsorbente consumido puede ser regenerado y utilizado de nuevo ya que no hay indicación de que la carboximetilcelulosa acumule enzimas que hagan inapropiado al adsorbente para un uso repetido o que necesiten -  
20 el pre-calentamiento del extracto, tal como se conoce para el adsorbente de ácido algínico (E. Jorpes y otros, Acta Chemica Scandinavica 1.960, 14, 1.779). Si el presente invento es aplicado al extracto original que contiene insulina del tejido pancreático, se puede alcanzar una considerable  
25 simplificación y mejora de la economía del procedimiento.  
30



to, comparado con los métodos convencionales utilizados en la industria, además de la anterior ventaja.

Los siguientes ejemplos ilustran el invento.

Ejemplo 1

5 Carboximetilcelulosa (CM.11, Whatman, 100 g) fué suspendida en agua, dejada sedimentar, y los "finos" fueron separados por decantación repetida. El adsorbente fue pue  
to en ciclo entonces a través de sus formas de sodio y de hidrógeno, suspendiéndolo alternativamente en hidróxido -  
10 de sodio 0,1 N y ácido clorhídrico 0,1 N. El exceso de - ácido fue separado entonces por lavado con agua destilada hasta la neutralidad. Subsiguientemente fue suspendido en etanol neutro al 62,5% v/v, y fué dejado equilibrar duran  
te aproximadamente 30 minutos. El alcohol fue separado por  
15 filtración sobre un embudo de vidrio sinterizado y el ad - sorbente fue suspendido en etanol al 62,5% v/v, que con - tenía ácido fosfórico a un pH 3,1. La suspensión fue cui - dadosamente ajustada a un pH 5,9 (electrodo de vidrio fren  
te a un electrodo de referencia de calomelanos) por adi -  
20 ción de amoníaco acuoso 5N. Fué dejada reposar hasta que el pH permaneció constante, siendo reajustado el pH con - amoníaco 5N ocasionalmente, si es necesario. El adsorben - te tamponado fue entonces separado por filtración, secado primeramente por aireación y después a 45°C durante 30 mi  
25 nutos, y almacenado en un recipiente cerrado.

Pancreas de ganado vanuno fué extraído con eta -  
nol al 80% v/v que contenía ácido fosfórico (peso especí -  
fico 1,65, 6,3 ml/l) que dió un extracto (175 ml para ca -  
da 50 g de páncreas) que tenía un pH de aproximadamente 3,3.  
30 Este fué ajustado a un pH de 5,9 con amoníaco 5N y fue fil -

323352



trado. A cada una de las porciones de 225 ml de la solución así obtenida (equivalente a 25 g de páncreas) se añadió adsorbente tamponado (que contenía 12 g de peso seco de CM.11) y la mezcla fue agitada periódicamente durante 90 minutos y filtrada entonces a través de un filtro de vidrio sinterizado.

El adsorbente recogido sobre el filtro fue lavado con etanol absoluto (3 veces 100 ml) y fue secado por aireación a la temperatura ambiente.

Mientras estaba todavía sobre el filtro, el adsorbente seco fue eluido con ácido clorhídrico 0,1 N (3 veces 100 ml), los eluatos fueron combinados y la insulina bruta fué recuperada en la forma de picrato, fue convertida en el clorhidrato y precipitada en su punto isoeléctrico, pH 5,3. El producto fué entonces secado y analizado por cromatografía en papel.

Los rendimientos obtenidos de 24 experimentos similares, utilizando en todos 6 muestras diferentes de páncreas, fueron comparados cada uno con el rendimiento obtenido por el procedimiento testigo, que comprendía una extracción del extracto etanólico acuoso con dietil éter seguido por una precipitación isoeléctrica y un análisis como anteriormente (véase S.S. Randall, Biochim. Biophys. Acta, 1964, 90, 472), En el mejor caso, el rendimiento de insulina era 60% superior al del procedimiento testigo, y en el peor caso 47% superior, siendo el incremento medio de 56% con un error normalizado estimado de la media de  $\pm 2,2\%$ .

#### Ejemplo 2

En una serie de nuevos experimentos el extracto etanólico fue tratado de acuerdo con el método descrito en



el ejemplo 1, solo que el adsorbente fue suspendido en alcohol al 62,5% v/v, ajustado a un pH 5,9 con ácido clorhídrico, después de poner en ciclo a través de sus formas de sodio e hidrógeno y separación del ácido en exceso.

5 Los rendimientos obtenidos de 28 experimentos, utilizando 6 muestras de páncreas, fueron de 11 a 31% superiores a los obtenidos por los procedimientos testigos.

### Ejemplo 3

10 En una serie de nuevos experimentos el extracto etanólico fue tratado como en el método descrito en el ejemplo 1, solo que la insulina bruta obtenida por precipitación en su punto isoeléctrico fue nuevamente purificada por cristalización en un tampón de citrato a un pH 5,8 en presencia de zinc.

15 La insulina cristalina obtenida de 6 experimentos, utilizando dos muestras de páncreas, tenía una potencia media de 23,5 U.I./mg comparada con la media de 22,1 U.I./mg para el procedimiento testigo. Los rendimientos fueron 40 a 47% superiores a los del procedimiento testigo.

20

### Ejemplo 4

25 Carboximetilcelulosa (C.M.11, Whatman, 100 g) fue suspendida en hidróxido de sodio acuoso 0,1 N (3 litros) y fué agitada durante aproximadamente 15 minutos. Después de filtrar y lavar con agua, el adsorbente fue resuspendido en ácido fosfórico 0,3 M, agitado durante otros 15 minutos, y nuevamente filtrado y lavado con agua. El adsorbente, ahora en la forma ácida, fue suspendido en etanol al 64% v/v y la suspensión fue ajustada a un pH 4,5 con ácido fosfórico. Esta fue dejada reposar hasta que el pH no necesitó más reajuste

323352

14 AB



y el adsorbente tamponado fue separado por filtración y -  
secado en aire durante la noche.

El adsorbente así preparado fue agitado con el  
extracto etanólico al 65% v/v (5 litros) del páncreas de  
5 buey (750 g) que contenía ácido fosfórico (aproximadamen-  
te 24 g) después de la separación de un precipitado a un  
pH 5,9 y reajuste a un pH 4,5. Cuando no se pudo detectar  
más polipéptido por la adición de ácido pícrico a la so -  
lución sobrenadante, el adsorbente fue filtrado, lavado -  
10 con etanol y contenía 5% de metanol (3 veces 500 ml) y se  
cado en aire durante la noche.

La insulina fue eluida desde el adsorbente con  
ácido clorhídrico 0,1 N (3 veces un litro). El eluato fue  
tratado entonces con una solución saturada de ácido pícrico  
15 co (4,5 litros) y el picrato separado fue convertido en el  
clorhidrato con ácido clorhídrico en acetona. El clorhidrat  
to de insulina fue entonces nuevamente purificado por la  
precipitación convencional en el punto isoelectric  
talización en presencia de cloruro de zinc, ambos métodos  
20 bien conocidos en la técnica. El rendimiento obtenido fue  
de 4.700 U.I . de insulina cristalina/kg de páncreas.

Cuando se evaporó otra muestra del mismo extracto  
etanólico bajo presión reducida, seguido por filtración de  
grasa, picración y cristalización de insulina como anterior  
25 mente, el rendimiento fue de 3.100 U.I. de insulina crista-  
lina/kg de páncreas.

#### Ejemplo 5

En una serie de nuevos experimentos el extracto  
etanólico fue tratado de acuerdo con el método descrito en  
30 el ejemplo 4 con solamente la diferencia de que el adsorben  
te y la solución fueron ajustados ambos a un pH 3,5 y 7,5



respectivamente, y los rendimientos fueron de 80% y de 85% sobre el rendimiento obtenido por el procedimiento testigo convencional descrito en la segunda parte del ejemplo 4.

#### Ejemplo 6

5                   En una serie de nuevos experimentos el extracto etanólico fue tratado de acuerdo con el método descrito en el ejemplo 4, con solo la diferencia de que el disolvente de lípidos utilizado para labar el adsorbente era cloroformo, diclorometano, dicloroetileno, metanol, n-propanol o  
10                   iso-propanol, respectivamente. Los rendimientos obtenidos fueron todos ellos superiores al obtenido por el procedimiento testigo convencional descrito en la segunda parte del ejemplo 4.

#### Ejemplo 7

15                   En una serie de experimentos comparativos, extractos de 100 g de páncreas con etanol al 80% v/v que contenía ácido fosfórico como en el ejemplo 1, fueron divididos en 2 porciones iguales. Las primeras porciones fueron tratadas y los productos analizados en cuanto a la insulina por  
20                   cromatografía en papel de acuerdo con el método descrito en el ejemplo 1.

                  Las segundas porciones fueron ajustadas individualmente a un pH 5,9 con amoníaco 5 N después de la adición de un equivalente de 20 g de peso seco de carboximetilcelulosa (C.M.11) previamente equilibrada a un pH 3,1  
25                   y la mezcla fue dejada reposar durante 90 minutos con ocasional agitación y reajuste al pH 5,9. Las mezclas fueron entonces filtradas, lavadas, eluidas, etc., tal como se describe en el ejemplo 1.

30                   Los resultados fueron los siguientes:

323352

14 AB



Rendimientos (unidades internacionales de insulina/g de páncreas)

5	Experimento nº	Rendimientos (unidades internacionales de insulina/g de páncreas)	
		Procedimiento como en el ejemplo 1	Procedimiento sin fil - tracción a pH 5,9
	1	5,8	7,1
	2	4,7	6,7
	3	5,0	7,5
	4	5,1	9,0
10	Rendimiento medio $\pm$ error medio normalizado	5,1 $\pm$ 0,17	7,6 $\pm$ 0,50
15	Potencia media del producto - bruto (U.I./mg)	11,8 $\pm$ 0,7	6,3 $\pm$ 0,6

### Ejemplo 8

Carboximetilcelulosa (C.M.11, 10 g) que había sido tratada para separar los "finos" fue suspendida en una solución de hidróxido de sodio 0,1 N (250 ml). La suspensión fue vertida en una columna cromatográfica (diámetro 25 mm) teniendo cuidado de evitar la formación de capas agitando la suspensión con una barra de vidrio en la columna.

La solución en exceso de hidróxido de sodio fue evacuada de la columna en todo lo posible y se hicieron pasar ácido fosfórico 0,3 M (250 ml) y subsiguientemente un tampón de fosfato de amonio alcohólico (500 ml) a través de la columna a una velocidad de 10 ml/minuto.

El tampón de fosfato de amonio alcohólico había sido preparado acidificando etanol al 65% peso/volumen con ácido fosfórico a una molaridad de 0,03 M, ajustando el pH a 4,5



con unas pocas gotas de amoníaco al 35% por 500 ml de solución, y agitando la solución para desairear durante 30 minutos.

5 Un extracto alcohólico de páncreas (1 litro, que contenía aproximadamente 4,8 g de ácido fosfórico) fue reajustado a un pH 4,5 con solución de ácido fosfórico al 10%, después de la separación de insolubles a pH 5,9.

10 El extracto fue hecho pasar a través de la columna anteriormente preparada a una velocidad de 1,5 ml/minuto. El adsorbente fue lavado entonces con alcohol neutro al 65% (250 ml), alcohol absoluto industrial (250 ml), que contenía 5% de metanol, y agua destilada (500 ml), a una velocidad de aproximadamente 10 ml/minuto.

15 La insulina fue eluida de la columna con ácido clorhídrico 0,1 N a una velocidad de 1,5 ml/minuto, siendo recogido el eluato en porciones de 5 ml y medido el contenido en proteínas por medio de adsorción U.V. a una longitud de onda de 280 mμ. El pico ocupó un margen de elución de 20 ml. Las soluciones combinadas de este margen fueron tratadas con una solución saturada de ácido pícrico (30 ml) y el picrato precipitado fue transformado en insulina cristalina de acuerdo con el método descrito en el ejemplo 4. El resultado mostro que aproximadamente el 80% de la insulina contenida en el extracto alcohólico estaba presente en el eluato.

25

En un nuevo experimento el extracto y la columna fueron ajustados a un pH 5,0, pero por lo demás la adsorción y la elución se llevaron a cabo tal como se describe anteriormente. el 90% de la insulina contenida en el extracto alcohólico estaba presente en el eluato.

30

323352



Ejemplo 9

Carboximetilcelulosa (4 kg) que había sido tratada para separar los "finos", fue suspendida en hidróxido de sodio 0,1 M (30 litros). Después de agitar, la suspensión fue  
5 vertida en una columna (de 150 mm de diámetro y de 1,5 metros de alto). La solución de hidróxido de sodio fue evacuada entonces hasta el nivel del adsorbente, y se hizo pasar ácido fosfórico 0,03 M (60 litros) a una velocidad de circulación de 25 litros/hora.

10 Etanol a 65% en peso/volumen (150 litros), acidificado con ácido fosfórico para obtener una concentración 0,03 M, fue ajustado con amoníaco al 35% a pH 4,8. La solución tampón así obtenida fue hecha pasar a través de la columna a una velocidad de 25 litros/hora. El pH de la solución tampón efluente debía ser de 4,8 al final.  
15

Un extracto alcohólico de páncreas (300 litros) como se obtiene en el ejemplo 8, fue ajustado a un pH 4,8 con ácido fosfórico después de la separación del precipitado de pH 5,9, y fue hecho pasar a través de la columna a  
20 una velocidad de 25 litros/hora. Entonces la columna fue lavada sucesivamente con etanol al 65% (50 litros), etanol al 85% (50 litros) y agua (100 litros) todos a una velocidad de 25 litros/hora.

La insulina fue eluida de la columna con ácido  
25 clorhídrico 0,1 M a una velocidad de circulación de 8 litros/hora, y la banda que contenía proteínas fue detectada por adsorción U.V. a la longitud de onda de 280 m $\mu$ , y fue recogida.

El eluato fue analizado y se mostró que el 92 al  
30 100% de la insulina originalmente presente en el extracto había sido recuperada en el eluato.



La presente solicitud que corresponde a la pre -  
sentada en Gran Bretaña, con fecha 22 de Febrero de 1965,  
bajo el Nº 7466/65, se acoge a los beneficios del artículo  
51 del vigente "statuto sobre Propiedad Industrial.

5

- N O T A -

Los puntos de invención propia y nueva que se -  
presentan para que sean objeto de esta solicitud de Paten  
te de Invención en España, por VEINTE años, son los siguien  
tes:

10

1.- Un método para la preparación de insulina,  
que comprende las operaciones de poner en contacto un ex-  
tracto que es una solución parcialmente acuosa de insulina,  
que contiene predominantemente uno o más disolventes orgá -  
nicos, tales como un alcohol inferior o acetona, a un pH -  
15 indicado entre alrededor de pH 4,1 y pH 6,3 con un adsor -  
bente de carboximetil celulosa preajustado sustancialmente  
al pH de la solución, poner en contacto el adsorbente, que  
contiene la insulina y está libre del residuo del extracto,  
con un disolvente de lípidos y eluir la insulina del adsor-  
20 bente con una solución acuosa que contiene ácido o sal.

20

2.- Un método según la reivindicación 1, en el -  
cual la carboximetil celulosa tiene una capacidad teórica -  
de alrededor de 0,7 miliequivalentes por gramo.

25

3.- Un método según cualquiera de las reivindi-  
caciones precedentes, en el cual el establecimiento de con  
tacto del extracto con el adsorbente es llevado a efecto a

323352

14 ABR.



un pH indicado de entre alrededor de  $\bar{p}H$  4,5 y pH 5,9.

4.- Un método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el cual el extracto contiene 60 a 80% de etanol.

5 5.- Un método según la reivindicación 4, en el cual el extracto alcohólico contiene alrededor de 0,5 a 1% de sal fosfórica.

6.- Un método según la reivindicación 4, en el cual el extracto alcohólico es ajustado a pH 5,9 antes de la adsorción y los insolubles precipitados son separados.

10 7.- Un método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el cual el disolvente de lípidos es etanol, o un etanol acuoso que contiene hasta alrededor de 35% v/v de agua.

15 8.- Un método según la reivindicación 7, en el cual el disolvente es secado al aire después del tratamiento con el disolvente de lípidos.

9.- Un método según cualquiera de las precedentes reivindicaciones en el cual el adsorbente es preajustado al pH del extracto por equilibrado en una solución parcialmente acuosa, que es similar en composición a la usada para la extracción y es ajustada al pH de la adsorción.

20 10.- Un método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el cual la adsorción es llevada a efecto de una manera discontinua.

11.- Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el cual la adsorción o la elución es llevada a cabo con el adsorbente preparado en la forma de una columna, lámina o capa cromatográfica.

12.- Un método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el cual la elución es llevada a efecto

323352

14 ABR.



con una solución acuosa de un ácido fuerte de concentra -  
ción aproximadamente 0,1 N.

13.- Un método según cualquiera de las preceden  
tes reivindicaciones, en el cual el eluato es tratado con  
5 ácido pícrico, y el picrato de insulina precipitado es con  
vertido en el clorhidrato.

14.- Un método para la preparación de insulina.

Tal y como se ha descrito en la Memoria que an-  
tecede y para los fines que se han especificado.

10 La presente Memoria consta de dieciseis hojas,  
escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 14 ABR. 1966

Alberto de Elizaburu  
Por Poder.

PPR.

*mm elj*