

SECCION TECNICA  
CLASIFICACION I. P. C.  
CLASE A 61  
SUBCLASE K



404721

404721

# MEMORIA DESCRIPTIVA

correspondiente a la solicitud de concesión de un

## PATENTE DE INTRODUCCION

SOLICITANTE: VAMCO SOCIEDAD CIVIL PARTICULAR  
(VAMCO, S.C.P.)

RESIDENCIA: Avda. Pio XII, 99. MADRID.

ENUNCIADO: "PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION  
DE INSULINA CRISTALINA".

Prioridad: Patente ..... n.º ..... del .....

68

404721



1  
5  
10  
15  
20  
25  
30

Esta invención se refiere a un procedimiento para la preparación de insulina cristalina y más especialmente nuestro procedimiento se refiere al uso de cambiadores de anión aminocelulósicos en la preparación de productos de insulina cristalina.

Para garantizar un rendimiento máximo de insulina y enzimas, el tejido pancreático es extirpado de los animales inmediatamente después de sacrificarlos y congelado hasta que la insulina y los enzimas pueden ser separados del tejido.

Existen varios procedimientos conocidos para separar la insulina del tejido congelado. La patente estadounidense nº 2.826.534 describe uno de estos procedimientos. En este procedimiento, la insulina se extrae del tejido pancreático macerado con etanol acuoso acidulado, el extracto se concentra y el alcohol se separa de la solución por destilación a vacío. La insulina es precipitada de la solución por salificación con cloruro sódico a una concentración del 30 %. La torta salina de insulina se separa de las aguas madres por filtración y se realiza una segunda precipitación salina a una concentración de cloruro sódico del 15 % aproximadamente. Esta segunda torta salina se disuelve en agua y la insulina se precipita de la misma a su punto isoelectrico. Después la insulina se disuelve de nuevo en agua a un pH de 2 a 4 aproximadamente, se eleva gradualmente el pH hasta un valor de 6,8 a 10 aproximadamente y luego se reduce gradualmente hasta un valor de 5,9 a 5,3 aproximadamente. En este punto puede recuperarse una insulina relativamente pura para una nueva cristalización.

Ahora hemos descubierto un procedimiento mediante

404721



1 el cual éste y otros procesos de recuperación pueden ser  
simplificados considerablemente. Nuestro procedimiento con-  
siste en utilizar un cambiador de anión aminocelulósico co-  
mo adsorbente en la recuperación de insulina, eluir la insu-  
5 lina del mismo y recuperarla del medio de elución.

En la puesta en práctica de nuestra invención, se  
pone en contacto una solución acuosa que contiene insulina  
con una aminocelulosa que puede encontrarse en el ciclo  
de base libre o de anión, a un pH de 5,5 a 8,0 aproxima-  
10 damente y todavía mejor a un pH de 6,0 a 7,5 aproximadamen-  
te, durante un periodo de tiempo suficiente para adsorber  
la insulina sobre el cambiador de anión. La adsorción de la  
insulina sobre el cambiador de anión se realiza preferible-  
mente en presencia de aniones. Estos aniones pueden ser re-  
15 gularadores como los aniones del fosfato sódico potásico y  
del acetato amónico o pueden ser cualquier otro anión no  
perjudicial. Preferimos utilizar fosfato potásico sódico co-  
mo ión adicional.

Los cambiadores aminocelulósicos utilizados en nues-  
20 tro procedimiento son los cambiadores celulósicos con radi-  
cales amina unidos químicamente a la celulosa. Estas unio-  
nes pueden ser del tipo éter y éster. Los cambiadores que  
pueden ser utilizados en nuestra invención son, por ejemplo,  
los productos de reacción de  $\alpha$ -celulosa y un compuesto como  
25 ácido 2-aminoetilsulfúrico, 2-cloroetilamina, ácido 3-dime-  
tilaminopropilsulfúrico, 2-cloropropilamina, monohidrato de  
sulfato de 1,3-diamino-2-sulfatopropano, 2-(2-sulfatoetil)-  
piridina, monohidrato de (disulfatoetil)amina potásica, e  
hidrocloruro de sulfatoetilendiamina. Alternativamente, los  
30 cambiadores de ión aminocelulósicos pueden ser los produ-

404721



1       tos de reacción de celulosa, comprendidos los tejidos que con-  
tienen celulosa como algodón, con epicalorhidrina y un amino-  
alcohol como etanolamina. Además, los cambiadores de ión  
5       pueden estar iminizados, por ejemplo puede ser el producto  
de reacción de 2-aminoetoxicelulosa y ácido 2-aminoetilsul-  
fúrico que forma un producto parcialmente iminizado. Inclu-  
so podría utilizarse la aminocelulosa cuaternizada como cam-  
biador de ión en este procedimiento.

10       En lo que antecede resulta evidente que en el tér-  
mino "aminocelulosa" pretendemos incluir la celulosa a la  
que se ha unido un radical nitrogenado que comunica propie-  
dades cambiadoras de ión a la celulosa.

15       De las muchas aminocelulosas cambiadoras de ión,  
preferimos utilizar los cambiadores celulósicos sustituidos  
con una amina terciaria, especialmente los cambiadores de  
dialquil(inferior)aminoalcoxi(inferior)celulosa. Se prefie-  
re utilizar especialmente el cambiador conocido por dietil-  
aminoetilcelulosa.

20       Después de la adsorción de la insulina, la aminoce-  
lulosa se separa de las aguas madres por cualquiera de los  
procesos de separación conocidos como, por ejemplo, decan-  
tación, filtración o centrifugación. Es preferible separar  
la mayor cantidad de disolvente posible del cambiador de  
anión con objeto de que cualquier ión contenido en la solu-  
25       ción de la que está siendo adsorbida la insulina no reaccio-  
ne con el agente eluyente de la insulina.

30       Para eluir la insulina, la celulosa se pone en con-  
tacto con un ácido a un pH de 1 a 5 aproximadamente y de  
preferencia a un pH comprendido entre 3,5 y 4 aproxima-  
mente. También cabe la posibilidad de poner en contacto la

404721



1 insulina con la aminocelulosa en presencia de una base,  
a un pH de 8,5 a 11 aproximadamente y de preferencia a un  
pH de 8,5 a 9 aproximadamente. El ácido empleado puede ser  
5 cualquier ácido que dé la concentración de ión hidrógeno  
deseada como, por ejemplo, ácido sulfúrico, clorhídrico,  
fosfórico, acético y glutámico. Las bases que son útiles  
como eluyentes son amoniaco, hidróxido sódico, hidróxido  
cálcico, es decir una base que proporcione un ión hidroxilo.  
10 Preferimos utilizar amoniaco como eluyente básico y  
ácido clorhídrico como eluyente ácido. Como la insulina debe  
ser soluble en el medio eluyente, cualquier ácido eluyente  
en el que la insulina sea insoluble debe ser diluido con  
un disolvente en el que la insulina sea soluble. Entre estos  
15 disolventes se prefiere el uso de agua.

Una vez que la insulina ha sido eluida de la dietil  
aminoetilcelulosa, puede ser fácilmente cristalizada por  
procedimientos conocidos. Preferimos recuperar la insulina  
cristalina por precipitación de la misma del eluyente ácido  
20 mediante adición de una sal soluble de cinc para precipitar  
la insulina como insulinato de cinc. No obstante, pueden  
utilizarse otras sales de metales pesados solubles como  
precipitantes, de acuerdo con métodos conocidos. Alternativamente,  
preferimos precipitar la insulina con la sal de un hidróxido  
25 de metal alcalino, incluido el amoniaco, de un hidrohaleuro,  
preferiblemente cloruro sódico, antes de precipitar finalmente  
la insulina como sal de cinc. En la realización de la etapa  
final de cristalización, es ventajoso utilizar un regulador de  
pH como citrato sódico, fosfato sódico potásico o acetato  
30 amónico. Sin embargo, no es impres-

404721



1

cindible.

5

Los siguientes ejemplos ilustran con más detalle la invención pero no se pretende que esta quede limitada a los procedimientos, reguladores, ácidos, etc. exactos utilizados. Más bien se pretende que todos los equivalentes evidentes para los expertos en la técnica queden incluidos dentro del alcance de la invención.

EJEMPLO 1

10

Para determinar la eficacia de la dietilaminoetilcelulosa como agente de recuperación de insulina, se añade una mezcla de etanol al 85 % y ácido fosfórico al 85 % a un páncreas molido y rápidamente congelado, formando un extracto alcohólico al 65 % con un pH de 2,8. El tejido pancreático, después de agitar considerablemente, se separa por centrifugación y se extrae de nuevo con etanol y ácido fosfórico adicionales. Se combinan los extractos, se ajusta a pH 8,3 con hidróxido sódico y se filtra. El filtrado se acidula a pH 6 con ácido sulfúrico.

15

20

Se regenera una cantidad de dietilaminoetilcelulosa (0,5 miliequivalentes/g) con un exceso de hidróxido sódico 0,1 N y se lava hasta pH 7,0 con agua destilada antes de su empleo.

25

30

Después se mezclan seis porciones de 500 ml de extracto alcohólico ácido conteniendo una actividad estimada de 0,96 unidades de insulina por ml con 10, 15, 20, 25, 30 y 50 g de la dietilaminoetilcelulosa regenerada que ha sido equilibrada con regulador de fosfato sódico potásico 0,1 N a pH 7 y secada hasta el punto de agrietamiento antes de su uso. Después las partes alícuotas de extractos alcohólicos de insulina que contienen cantidades variables de

404721



1 dietilaminoetilcelulosa se agitan a fondo, se dejan en reposo durante algunos minutos y se filtran. De la actividad total de la insulina, se adsorben respectivamente sobre la dietilaminometilcelulosa el 66 %, 75 %, 81 %, 86 % y 95 %

5 de las partes alícuotas del extracto alcohólico ácido, a medida que la cantidad de cambiador mezclada con los 500 ml de parte alícuota aumenta desde 10 hasta 50 g de dietilaminoetilcelulosa.

EJEMPLO 2

10 Se tratan 4000 ml del extracto alcohólico del Ejemplo 1 con 144 g de dietilaminoetilcelulosa como en el Ejemplo 1, para obtener una adsorción del alrededor del 75 % de la insulina de la solución alcohólica. La dietilaminoetilcelulosa sobre la que se ha adsorbido la insulina se seca

15 hasta el punto de agrietamiento, se retira del filtro y se suspende en ácido clorhídrico 0,1 N para eluir la insulina de la dietilaminoetilcelulosa. La mezola se agita a fondo, se deja en reposo durante varios minutos y se filtra. El cambiador de ión se lava de nuevo con ácido clorhídrico diluido en la medida necesaria para asegurar una elución completa. Después de filtrar, los diversos lavados con ácido clorhídrico diluido se ajustan a pH 3,5 con hidróxido sódico. Los eluatos turbios se clarifican por centrifugación a

20 pH 7,1. La distribución de la insulina obtenida en los lavados ácidos se encuentra en la siguiente tabla:

25

<u>Eluato</u>	<u>Unidades/ml</u>	<u>Actividad de insulina, unidades totales</u>	<u>% (a)</u>
I	3,78	3370	98
II	0,11	100	3
30 III	0,005	50	1



1 (a) Basado sobre 3456 unidades tomadas como 100 %. Este valor representa el 75 % de la insulina total en el extracto alcohólico ácido.

EJEMPLO 3

5 La insulina contenida en un eluato ácido acuoso, conteniendo alrededor de 2530 unidades de insulina y preparada por los procedimientos de los Ejemplos 1 y 2, se precipita por adición gradual de cloruro sódico al eluato para formar una solución salina al 20 %. La torta salina de  
10 insulina precipitada se disuelve en una cantidad mínima de ácido clorhídrico 0,01 N y la insulina es reprecipitada de la solución ácida con una concentración del 12 % de cloruro sódico. La segunda torta salina se separa de la solución y se vuelve a disolver en agua y la insulina se precipita  
15 ajustando el pH a 5,2. Esta insulina isoelectricamente precipitada se disuelve en una pequeña cantidad de ácido clorhídrico diluido y finalmente se precipita como sal de cinc cristalina por adición de 16,5 ml de acetona, 4 ml de regulador citrato sódico 1,2 M (pH 5,6) y 0,8 ml de cloruro de  
20 cinc (20 % en peso) por cada 100 ml de solución acuosa ácida de insulina. El pH de la solución se ajusta a 5,9 y se deja aparte a 2°C para permitir la formación de cristales. Los cristales así obtenidos se separan por decantación y se lavan dos veces con agua destilada y dos veces con acetona  
25 y se secan a vacío para dar 22 mg de cristales con una actividad de 25 unidades/mg. Este producto se compara favorablemente con el patrón de referencia de la Farmacopea de Estados Unidos que requiere 24,2 unidades/mg.

EJEMPLO 4

30 En un procedimiento de cristalización alternativo,

404721



1

se añaden 4 ml de regulador citrato sódico 1 M y 0,8 ml de cloruro de cinc (20 % en peso) per cada 100 ml de eluato acuoso ácido a una porción del eluato ácido obtenido por el procedimiento de los Ejemplos 1 y 2. La solución se ajusta a pH 5,9 aproximadamente y se mantiene a 2°C hasta que la cristalización es completa. Los cristales resultantes se separan por decantación y se secan al aire sin lavarlos para dar una insulina cristalina con una actividad de 17 unidades/mg aproximadamente.

5

10

EJEMPLO 5

Para poner en práctica un procedimiento continuo de recuperación de insulina, se hace reaccionar ácido dimetilaminoetilsulfúrico con una cinta de algodón tratada con hidróxido sódico. La cinta aminizada se cose después para formar una correa continua y se dispone, mediante unos rodillos, de forma que entre y salga de un tanque de regeneración que contiene hidróxido potásico 0,1 N, un tanque de lavado con agua desionizada, un tanque de regulador que contiene fosfato sódico potásico 0,1 N, un tanque de adsorción que contiene la solución con la insulina y un tanque de elución que contiene ácido fosfórico 0,1 N. La correa se pasa a través de unos rodillos dispuestos para escurrir una importante proporción del líquido de la correa después de que ésta ha atravesado cada uno de los tanques de regulador, adsorción y elución. Para conseguir una eficacia máxima, el líquido en cada uno de los tanques se hace fluir contra la correa y en contracorriente con la dirección de la misma. El eluyente recuperado es cristalizado continuamente por el procedimiento del Ejemplo 4.

15

20

25

30





REIVINDICACIONES

1

1. PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE INSULINA CRIS  
TALINA a partir de soluciones que contienen insulina, ca-  
racterizado porque las etapas consisten en poner en contac-  
to una solución conteniendo insulina con una aminocelulosa,  
separar la aminocelulosa de la solución y poner en contac-  
to la aminocelulosa con un ácido.

5

2. PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE INSULINA CRIS  
TALINA a partir de soluciones conteniendo insulina, según 1,  
caracterizado porque las etapas consisten en poner en contac-  
to una solución que contiene insulina con una aminocelulo-  
sa, a un pH comprendido entre 5,5 y 8,0 aproximadamente, se-  
parar la aminocelulosa de la solución y poner en contacto  
la aminocelulosa separada con un eluyente seleccionado entre  
el grupo formado por un ácido, a un pH comprendido entre 1  
y 5 aproximadamente y una base a un pH comprendido entre  
8,5 y 11 aproximadamente.

10

15

3. PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE INSULINA CRIS  
TALINA, a partir de soluciones que contienen insulina, según  
1, caracterizado porque las etapas consisten en poner en  
contacto una solución conteniendo insulina con una aminoce-  
lulosa, a un pH de 6,0 a 7,5 aproximadamente, separar la  
aminocelulosa de la solución y poner en contacto la amino-  
celulosa con un eluyente seleccionado entre el grupo for-  
mado por un ácido, a un pH comprendido entre 3,5 y 4,5 apro-  
ximadamente, y una base a un pH comprendido entre 8,5 y 9,0  
aproximadamente.

20

25

4. PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE INSULINA CRIS  
TALINA a partir de soluciones que contienen insulina, según  
1, caracterizado porque las etapas consisten en poner en

30

*mlc*

404721



1 contacto una solución conteniendo insulina con un cambiador  
de anión de dialquilaminoalcoxicelulosa, a un pH de 5,5 a  
2 8 aproximadamente, separar el cambiador de la solución y  
3 poner en contacto el cambiador con un eluyente selecciona-  
4 do entre el grupo formado por una solución de un ácido mi-  
5 neral, a un pH de 1 a 5 aproximadamente, y una solución de  
6 hidróxido seleccionado entre el grupo formado por hidróxi-  
7 dos de metales alcalinos y alcalino-térreos, a un pH de  
8 8,5 a 11 aproximadamente.

10 5. PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE INSULINA CRIS-  
11 TALINA, a partir de soluciones que contienen insulina, según  
12 1, caracterizado porque las etapas consisten en poner en  
13 contacto una solución conteniendo insulina con un cambiador  
14 de anión de dialquilaminoalcoxicelulosa, a un pH compendi-  
15 do entre 6 y 7,5 aproximadamente, separar el cambiador de  
16 la solución y poner en contacto el cambiador con un eluyen-  
17 te seleccionado entre el grupo formado por una solución de  
18 un ácido mineral, a un pH de 3,5 a 4,5 aproximadamente, y  
19 una solución de hidróxido seleccionado entre el frupo for-  
20 mado por hidróxidos de metales alcalinos y alcalino-térreos,  
a un pH de 8,5 a 9 aproximadamente.

25 6. PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE INSULINA CRIS-  
26 TALINA, a partir de soluciones que contienen insulina,  
27 según 1, caracterizado porque las etapas consisten en poner  
28 en contacto una solución conteniendo insulina con un cambia-  
29 dor de anión de dietilaminoetilcelulosa, a un pH compendi-  
do entre 5,5 y 8 aproximadamente, separar el cambiador de  
dietilaminoetilcelulosa de la solución y poner en contacto  
el cambiador de dietilaminoetilcelulosa con un eluyente se-  
leccionado entre el grupo formado por una solución de un



404721

1 ácido mineral, a un pH de 1 a 5 aproximadamente, y una solución de hidróxido seleccionado entre el grupo formado por hidróxidos de metales alcalinos y alcalino-térreos, a un pH de 8,5 a 11 aproximadamente.

5 7. PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE INSULINA CRISTALINA, a partir de soluciones que contienen insulina, según 1, caracterizado porque las etapas consisten en poner en contacto una solución conteniendo insulina con un cambiador de anión de dietilaminoetilcelulosa a un pH de 6 a 7,5 aproximadamente, separar el cambiador de dietilaminoetilcelulosa de la solución y poner en contacto el cambiador de dietilaminoetilcelulosa con un eluyente seleccionado entre el grupo formado por una solución de un ácido mineral, a un pH de 3,5 a 4,5 aproximadamente, y una solución de hidróxido seleccionado entre el grupo formado por hidróxidos de metales alcalinos y alcalino-térreos, a un pH de 8,5 a 9,0 aproximadamente.

15 8. PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE INSULINA CRISTALINA, a partir de soluciones que contienen insulina, según 1, caracterizado porque las etapas consisten en poner en contacto una solución conteniendo insulina con un cambiador de anión aminocelulósico en el ciclo de base libre o de anión, separar el cambiador aminocelulósico de la solución y poner en contacto la aminocelulosa separada con un eluyente seleccionado entre el grupo formado por una solución acuosa de un ácido mineral y una solución básica seleccionada entre el grupo formado por una solución acuosa de un hidróxido de metal alcalino y una solución acuosa de un hidróxido de metal alcalino-térreo.

20 9. PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE INSULINA CRISTALINA, a partir de soluciones que contienen insulina, según 25 30

404721



1 1, caracterizado porque las etapas consisten en poner en  
contacto la solución conteniendo insulina con un cambiador  
de anión aminocelulósico en el ciclo de base libre o de  
anión, a un pH comprendido aproximadamente entre 5,5 y 8,0  
5 separar el cambiador de anión aminocelulósico de la solución  
y poner en contacto el cambiador de anión aminocelulósico  
separado con un eluyente seleccionado entre el grupo forma  
do por una solución ácida, a un pH de 1 a 5 aproximadamen-  
te, y una solución básica seleccionada entre el grupo forma  
10 do por una solución de un hidróxido de metal alcalino y una  
solución de un hidróxido de metal alcalino-térreo, a un pH  
de 8,5 a 11 aproximadamente.

10. PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE INSULINA  
CRISTALINA a partir de soluciones que contienen insulina,  
15 según 1, caracterizado porque las etapas consisten en poner  
en contacto una solución conteniendo insulina con una amino  
celulosa en el ciclo de base libre o de anión, a un pH com-  
prendido entre 6 y 7,5 aproximadamente, separar la aminoce-  
lulosa de la solución y poner en contacto la aminocelulosa  
20 separada con un eluyente seleccionado entre el grupo forma-  
do por un ácido, a un pH comprendido entre 3,5 y 4,5 apro-  
ximadamente, y una base a un pH comprendido entre 8,5 y 9,0  
aproximadamente.

11. PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE INSULINA CRIS  
25 TALINA a partir de soluciones acuosas que contienen insu-  
lina, según 1, caracterizado porque las etapas consisten en  
poner en contacto una solución conteniendo insulina con un  
cambiador de anión de dialquilaminoalcoxiceululosa, en el  
ciclo de base libre o de anión, a un pH comprendido apro-  
ximadamente entre 5,5 y 8, separar el cambiador de la solu-  
30

404721



1 ción y poner en contacto el cambiador con un eluyente selec  
cionado entre el grupo formado por una solución acuosa de  
un ácido mineral, a un pH de 1 a 5 aproximadamente y una so-  
lución acuosa de un hidróxido seleccionada entre el grupo  
5 formado por soluciones acuosas de hidróxidos de metales alcal  
linos y de metales alcalinos-térreos, a un pH de 8,5 a 11  
aproximadamente.

12. PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE INSULINA CRIS  
TALINA, a partir de soluciones que contienen insulina, según  
10 1, caracterizado porque las etapas consisten en poner en  
contacto una solución conteniendo insulina con un cambiador  
de anión de dialquilaminoalcoxicelulosa, en el ciclo de ba-  
se libre o de anión, a un pH comprendido entre 6,5 y 7,5  
aproximadamente, separar el cambiador de la solución y po-  
15 ner en contacto el cambiador con un eluyente seleccionado en  
tre el grupo formado por una solución acuosa de un ácido  
mineral, a un pH de 3,5 a 4,5 aproximadamente, y una solu-  
ción acuosa de hidróxido seleccionada entre el grupo forma-  
do por soluciones acuosas de hidróxidos de metales alcali-  
20 nos y de metales alcalino-térreos, a un pH comprendido en-  
tre 8,5 y 9,0 aproximadamente.

13. PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE INSULINA  
CRISTALINA a partir de soluciones que contienen insulina,  
según 1, caracterizado porque las etapas consisten en poner  
25 en contacto una solución conteniendo insulina con un cam-  
biador de anión de dietilaminoetilcelulosa, en el ciclo de  
base libre o de anión, a un pH comprendido entre 5,5 y 8  
aproximadamente, separar el cambiador de la solución y poner  
en contacto el cambiador con un aluyente seleccionado entre  
30 el grupo formado por una solución acuosa de ácido mineral,



1 a un pH de 1 a 5 aproximadamente, y una solución acuosa  
de hidróxido seleccionada entre el grupo formado por solu-  
ciones acuosas de hidróxidos de metales alcalinos y de me-  
tales alcalino-térreos, a un pH comprendido entre 8,5 y 11  
5 aproximadamente.

14. PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE INSULINA  
CRISTALINA, a partir de soluciones que contienen insuli-  
na, según 1, caracterizado porque las etapas consisten en  
poner en contacto una solución conteniendo insulina con un  
10 cambiador de anión de dietilaminoetilcelulosa, en el ciclo  
de base libre o de anión, a un pH comprendido aproxima-  
damente entre 6,0 y 7,5, separar el cambiador de la solución  
y poner en contacto el cambiador con una solución acuosa  
de un ácido mineral, a un pH de 3,5 a 4,5 aproximadamente.

15 15. PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE INSULINA  
CRISTALINA, a partir de soluciones que contienen insulina,  
según 1, caracterizado porque las etapas consisten en po-  
ner en contacto una solución conteniendo insulina con un  
cambiador de anión de dietilaminoetilcelulosa, en el ciclo  
20 de base libre o de anión, a un pH comprendido aproxima-  
damente entre 5,5 y 8, separar el cambiador de dietilamino-  
etilcelulosa de la solución, poner en contacto el cambia-  
dor de dietilaminoetilcelulosa separado con una solución  
acuosa de un ácido mineral, a un pH de 1 a 5 aproxima-  
25 damente, y poner en contacto el eluyente que contiene insu-  
lina con una sal soluble de cinc, a un pH de 5,9 aproxima-  
damente, para precipitar insulinato de cinc.

30 16. PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE INSULINA  
CRISTALINA, según 15, caracterizado porque la insulina es  
absorbida sobre el cambiador de anión de dietilaminoetil-

4047210 JUN 1972



1 celulosa a un pH de 6,0 a 7,5 aproximadamente y eluida del  
cambiador a un pH de 3,5 a 4,5 aproximadamente.

5 17. PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE INSULINA  
CRISTALINA, a partir de soluciones que contienen insulina,  
según 1, caracterizado porque las etapas consisten en poner  
en contacto una solución acuosa de un alcohol alifático in-  
ferior que contiene insulina con un cambiador de anión de  
10 dietilaminoetilcelulosa, en el ciclo de base libre o de  
anión, a un pH comprendido entre 5,5 y 8,0 aproximadamente,  
separar de la solución el cambiador de dietilaminoetilcelu-  
losa, poner en contacto el cambiador de dietilaminoetilce-  
lulosa separado con un eluyente seleccionado entre el grupo  
formado por una solución acuosa de un ácido mineral, a un  
15 pH de 1 a 5 aproximadamente y poner en contacto el eluyen-  
te que contiene la insulina con una sal soluble de cinc, a  
un pH de 5,9 aproximadamente, para precipitar insulinato de  
cinc.

20 18. PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE INSULINA  
CRISTALINA, según 17, caracterizado porque la insulina es  
absorbida sobre el cambiador de anión de dietilaminoetilce-  
lulosa a un pH de 6,0 a 7,5 aproximadamente y eluida del  
cambiador a un pH de 3,5 a 4,5 aproximadamente.

25 19. PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE INSULINA  
CRISTALINA, a partir de soluciones que contienen insulina,  
según 1, caracterizado porque las etapas consisten en poner  
en contacto una solución acuosa de un alcohol alifático in-  
ferior que contiene insulina con un cambiador de anión de  
30 dietilaminoetilcelulosa, en el ciclo de base libre o de  
anión, a un pH comprendido entre 5,5 y 8,0 aproximadamente,  
separar de la solución el cambiador de dietilaminoetilcelu-

404721



1 losa, poner en contacto el cambiador de dietilaminoetilce-  
lulosa separado con un eluyente seleccionado entre el gru-  
po formado por una solución acuosa de un ácido mineral, a  
un pH de 1 a 5 aproximadamente, y una solución acuosa de  
5 hidróxido seleccionada entre el grupo formado por una solu-  
ción acuosa de hidróxidos de metales alcalinos y una solu-  
ción acuosa de hidróxidos de metales alcalino-terreos, a  
un pH de 8,5 a 11,0 aproximadamente, poner en contacto el  
eluyente ácido que contiene insulina con una cantidad sufi-  
10 ciente de una sal de un ácido mineral y un hidróxido de me-  
tal alcalino, comprendido el amoniaco, para precipitar la  
insulina, separar de la solución el precipitado salino que  
contiene insulina, disolver de nuevo en agua la insulina  
precipitada con sal, precipitar otra vez la insulina  
15 con una sal de ácido mineral y un hidróxido de metal alca-  
lino, incluido el amoniaco, separar el precipitado salino  
que contiene insulina, disolver la sal reprecipitada que  
contiene insulina en un disolvente acuoso, precipitar la  
insulina de dicho disolvente acuoso ajustando el pH de la  
20 solución al punto isoeléctrico de la insulina, disolver  
la insulina isoeléctricamente precipitada en solución acuo-  
sa diluida de ácido clorhídrico, poner en contacto la in-  
sulina disuelta con una sal soluble de cinc para formar in-  
sulinato de cinc y precipitar este último.

25 20. PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE INSULINA  
CRISTALINA, según 19, caracterizado porque la insulina es  
absorbida sobre el cambiador de anión de dietilaminoetil-  
celulosa a un pH de 6,0 a 7,5 aproximadamente y eluida del  
cambiador a un pH de 3,5 a 4,5 aproximadamente.

30 21. Se reivindica por último como objeto sobre el

404721



1

que ha de recaer la Patente de Introducción que se solicita: "PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE INSULINA CRISTALINA".

5

Todo conforme queda descrito y reivindicado en la presente Memoria descriptiva, que consta de diecinueve páginas mecanografiadas.

Madrid, 10 de julio de 1972.

BERNARDO UNGRIA

P.p.

10

15

20

25

30