

SECCION TECNICA
CLASIFICACION I. P. C.
CLASE H 01
SUBCLASE K



404785

MEMORIA DESCRIPTIVA

correspondiente a la solicitud de concesión de un^a

PATENTE DE INTRODUCCION

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

RESIDENCIA: Avda. Pio XII, 99 - MADRID.-

ENUNCIADO: PROCEDIMIENTO PARA LA SEPARACION DE
GLUCAGON DE LOS EXTRACTOS PANCREATI-
COS.

Prioridad: Patente n.º del

RGC.



1 Esta invención se refiere a un procedimiento para la separación de glucagón de la insulina utilizando una resina de copolímero de estireno-divinilbenceno macrorreticular sulfonatado.

5 Específicamente, esta invención proporciona un procedimiento para la separación de glucagón de los extractos pancreáticos que contienen, además de glucagón, insulina y otros subproductos pancreáticos protéicos, cuyo procedimiento consiste en pasar dicho extracto sobre la forma metálica
10 alcalina o metálica alcalino-térrea de un copolímero de estireno-divinilbenceno macrorreticular sulfonatado, con lo que dicho glucagón es adsorbido sobre la resina y dicha insulina y otros materiales protéicos permanecen en solución y después eluir dicho glucagón con una base diluída.

15 Desde el descubrimiento en 1923 de un factor hiperglicémico en el páncreas, se ha dedicado un considerable esfuerzo de investigación al aislamiento y purificación del factor, denominado glucagón por Kimball y Murlin, J. Biol. Chem. 58, 337 (1923-24). Este esfuerzo investigador culminó
20 en la purificación y cristalización del factor por Staub y colaboradores, Sci., 117, 628 (1953); J. Biol. Chem. 214, 619 (1955). La secuencia de aminoácidos del glucagón, establecida por Bromer y colaboradores, J. Am. Chem. Soc. 79, 2807 (1957), consta de 29 aminoácidos en una cadena lineal.

25 Hasta la fecha, el glucagón ha sido aislado invariablemente de las glándulas del páncreas como subproducto del proceso de obtención de insulina, siendo arrastrado el glucagón con la insulina durante las etapas de purificación iniciales y recuperado como tal hacia el final del proceso insulínico. Sin embargo, durante la extracción de insulina,
30

404785



1 el ambiente químico se mantiene en las condiciones óptimas
para el aislamiento de la insulina, dedicándose poco cui-
2 dado a evitar la pérdida de glucagón. Además, durante cada
etapa del proceso, se pierden pequeñas cantidades de gluca-
5 gón. Separando el glucagón en las primeras fases del proce-
so de purificación de la insulina, pueden reducirse al mí-
nimo estas pérdidas de glucagón.

En la actualidad, la mayoría de los métodos comer-
10 ciales existentes para el aislamiento y purificación de la
insulina son ineficaces en la separación de la insulina y
el glucagón. Además, la separación de glucagón de otros
subproductos pancreáticos protéicos puede afectar a la pu-
reza y al rendimiento de la insulina. Las etapas del proce-
so actualmente utilizadas que afectan adversamente a los
15 rendimientos de glucagón y/o insulina son las siguientes:

(1) La precipitación isoeléctrica de insulina a un
pH de 5-5,5 aproximadamente, descrita por primera vez por
Walden en 1924 (véase la patente estadounidense 1.520.673).

(2) La extracción ácida y el proceso de salificación
20 diferencial para la insulina, descritos por primera vez por
Lautenschager y Linder (véase la patente estadounidense
2.449.076).

(3) El proceso de cambio de ión de Jorpos y colabora-
25 dores (patente estadounidense 2.878.159) que utiliza una re-
sina cambiadora de catión de tipo carboxílico o el proceso
de cambio de ión de Volini y colaboradores (patente estadouni-
dense 3.069.323) que emplea una resina cambiadora de anión
aminocelulósica.

Una ventaja del procedimiento de esta invención es
30 que permite la separación de glucagón en una fase temprana

12 JUL

404785



1 del proceso de separación y purificación de insulina a partir de glándulas del páncreas, con objeto de evitar tanto las pérdidas indebidas de glucagón como cualquier efecto perjudicial sobre el rendimiento o la pureza de la insulina finalmente obtenida.

5 El procedimiento de esta invención permite el aislamiento de glucagón de las soluciones que contienen glucagón e insulina y posiblemente otras sustancias polipeptidas similares. La invención es especialmente útil en la separación de glucagón en el proceso inicial de insulina exenta de grasas para concentrados crudos que contienen glucagón, insulina y otros polipéptidos similares a la insulina. De acuerdo con el procedimiento de esta invención, el pH de la solución que contiene insulina-glucagón, por ejemplo el concentrado de insulina exenta de grasa inicial, es ajustado a 7-8 aproximadamente con una base y la solución resultante es pasada sobre una resina cambiadora de ión constituida por la forma metálica alcalina o alcalino-térrea de un copolímero de estireno-divinilbenceno macrorreticular sulfonatado. El glucagón es adsorbido preferentemente mientras que la insulina y otros enzimas pancreáticos, así como otros materiales proteicos, permanecen en el eluato. El glucagón es eluido lavando la resina con una base diluida, por ejemplo hidróxido amónico acuoso.

25 Los metales alcalinos o alcalino-térreos útiles en la conversión del copolímero de estireno-divinilbenceno macrorreticular sulfonatado en la forma salina son sodio, potasio, calcio, estroncio, bario o magnesio. Naturalmente, pueden utilizarse otros cationes adecuados en lugar de los cationes alcalinos o alcalino-térreos en la forma salina de la resina.

30

404785



916

1 como resultará evidente para los expertos en la técnica.

En la práctica real, el nuevo procedimiento de esta invención se lleva a cabo preferiblemente de la siguiente forma:

5 Se prepara un extracto alcohólico acuoso ácido de glándulas de páncreas poniendo en contacto las glándulas molidas con etanol acuoso ácido a pH 2 y después separando el extracto de cualquier materia insoluble por filtración. Los ácidos adecuados para uso en la preparación del etanol ácido son fosfórico, clorhídrico o sulfúrico. Aunque se es-
10 pecifica el etanol como disolvente de extracción, resultará evidente para los expertos en la técnica que pueden utilizar- se otros disolventes volátiles miscibles con agua. La solu- ción ácida resultante se concentra por evaporación a vacío para eliminar el etanol. Se separa algo de grasa en este mo-
15 mento y el extracto alcohólico se separa de la misma por de- cantación y/o filtración. La solución acuosa ácida así pre- parada contiene insulina y glucagón. El pH de esta solución se ajusta a 7-8 y la solución se aplica a un copolímero de
20 estireno-divinilbenceno macrorreticular sulfonatado en for- ma metálica alcalina, preferiblemente en forma de sal potá- sica (existente en el mercado como Amberlite 200). Antes de su empleo, la resina es equilibrada frente a una sal potási- ca, por ejemplo, tal como fosfato potásico a pH 7,5 o próxi-
25 mo a este valor, con objeto de convertir la resina en la for- ma salina. El concentrado crudo se aplica al lecho de resina a una temperatura inferior a unos 5°C. La solución de con- centrado crudo que atraviesa la columna es procesada de nue- vo para recuperar la insulina por los métodos industriales habituales. La resina con glucagón adsorbido sobre la misma
30

404785



1 es lavada de nuevo con una solución reguladora adecuada, pre-
feriblemente una solución de fosfato a pH 7-8. Estas aguas
de lavado se agregan a las soluciones para el procesado de
insulina. El lavado de la resina con la misma solución regu-
5 ladora se prosigue hasta que ya no queda ninguna cantidad
apreciable de proteína en las aguas de lavado, como indica
la ausencia de adsorción ultravioleta a 280 mμ. El glucagón
es después eluido de la resina con hidróxido amónico o con
otra base, como hidróxido sódico, hidróxido potásico, hidróxi-
10 do de litio, hidróxido de trimetilamonio o similares. A con-
tinuación el pH del eluato es ajustado en el intervalo de
2 a 3 y el glucagón es precipitado por adición de cloruro
sódico. El precipitado se separa por filtración y la torta
salina resultante se utiliza como material de partida para
15 cualquier proceso de purificación normal del glucagón, por
ejemplo véase Staub y colaboradores, supra.

Otras resinas adsorbentes, tal como SE-Sephadex,
CM-celulosa, IR-120, XE-89, IRC-50, etc., no son tan satis-
factorias como el Amberlite 200 y no pueden ser utilizados
en su lugar sin afectar al rendimiento o a la pureza del
20 glucagón finalmente obtenido.

EJEMPLO

Se extraen 100 libras (45,4 kg) de páncreas de res
molido con etanol acuoso ácido al 65 % a pH 3,2 (ácido fos-
fórico 0,02 M) durante 2 horas, después de cuyo tiempo la
25 materia sólida se separa por filtración. El pH del extracto
se ajusta a 8,2 con NH₄OH, precipitando así sales de fosfato
amónico que son también separadas por filtración. Después se
ajusta el pH del filtrado a 3,6 con ácido sulfúrico diluido
y la solución resultante se concentra por evaporación a va-
30

404785



1 cío. La grasa que se separa de la solución por evaporación
del alcohol se separa por decantación. El volumen del con-
centrado resultante es de 41 litros. El pH del concentrado
se ajusta a 7,5 con hidróxido potásico 5 N y después se pasa
5 sobre dos columnas de 4 litros de resina de copolímero de
estireno-divinilbenceno macrorreticular sulfonatado en forma
de sal potásica (las columnas fueron previamente equilibra-
das frente a solución reguladora de fosfato potásico 0,005 M
a pH 7,5), a una temperatura inferior a 5°C. El concentrado
10 se pasa sobre las columnas a una velocidad de 200 ml/minuto.
A continuación las columnas se lavan con 16 litros de solu-
ción reguladora de fosfato 0,005 M a pH 7,5 y las aguas de
lavado se dejan aparte para uso en el proceso de purifica-
ción de la insulina. El glucagón adsorbido se eluye de la
15 resina haciendo pasar 8 litros de hidróxido amónico 0,1 N
a través del lecho de resina, después permitiendo que el
eluyente y la resina se equilibren durante 2 horas y final-
mente completando la elución haciendo pasar 16 litros de hi-
dróxido amónico 0,1 N a través del lecho de resina. El pH
20 del eluato se ajusta a 2,5 con un ácido fuerte y la concen-
tración de cloruro sódico se lleva al 15 % por adición de
cloruro sódico sólido, precipitando así el glucagón. En el
eluato de hidróxido amónico 0,1 N se recupera hasta el 97 %
del glucagón encontrado en el concentrado crudo.

25 En resumen, la Patente de Introducción que se solicita
deberá recaer sobre las siguientes:

404785¹²



1

REIVINDICACIONES

1. PROCEDIMIENTO PARA LA SEPARACION DE GLUCAGON DE
LOS EXTRACTOS PANCREATICOS que contienen, además del gluca-
gón, insulina y otros subproductos pancreáticos protéicos,
5 cuyo procedimiento está caracterizado por hacer pasar el ex-
tracto sobre la forma metálica alcalina o alcalino-térrea de
un copolímero de estireno-divinilbenceno macrorreticular sul-
fonatado, con lo que dicho glucagón es absorbido sobre la re-
sina y dicha insulina y otros materiales protéicos permane-
10 cen en solución y después eluyendo dicho glucagón con una ba-
se diluída.

2. PROCEDIMIENTO PARA LA SEPARACION DE GLUCAGON DE
LOS EXTRACTOS PANCREATICOS, según la Reivindicación 1, carac-
terizado porque el extracto que contiene insulina-glucagón
15 se hace pasar sobre la forma potásica de un copolímero de es-
tireno-divinilbenceno macrorreticular sulfonatado, a una tem-
peratura inferior a unos 50C y a un pH de 7,5, absorbiendo
con ello dicho glucagón sobre la resina, quedando en solu-
ción la insulina y otros materiales protéicos y después elu-
20 yendo dicho glucagón con hidróxido amónico 0,1 N.

3. PROCEDIMIENTO PARA LA SEPARACION DE GLUCAGON DE
LOS EXTRACTOS PANCREATICOS, según la Reivindicación 1, carac-
terizado porque el glucagón es eluído de la resina haciendo
pasar hidróxido amónico 0,1 N a través del lecho resinoso,
25 permitiendo que se equilibren la resina y el eluyente duran-
te 2 horas y después pasando sobre el lecho resinoso hidróxi-
do amónico 0,1 N suficiente para eluir sustancialmente la to-
talidad del glucagón.

4. Se reivindica por último, como objeto sobre el que
30 ha de recaer la Patente de Introducción que se solicita: PRO

404785



1 CEDIMIENTO PARA LA SEPARACION DE GLUCAGON DE LOS EXTRACTOS
PANCREATICOS.

5 Todo conforme queda descrito y reivindicado en la pre
sente memoria descriptiva, que consta de nueve páginas meca
nografiadas.

Madrid, 12 de Julio de 1.972

BERNARDO UNGRIA
p.p.

10

15

20

25

30