



425 113

Int. Cl. A61K

MEMORIA DESCRIPTIVA

correspondiente a la solicitud de concesión de un

PATENTE DE INTRODUCCION

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

RESIDENCIA: Avd. Pio XII, nº 99 MDRID.-

ENUNCIADO: "UN PROCEDIMIENTO DE OBTENCION DE INSU-
LINA A PARTIR DE LAS GLANDULAS DEL PANCREAS"

Prioridad: Patente n.º del

AR



1 Esta invención se refiere a la preparación de insulina
a partir de glándulas del páncreas. Esta solicitud constitu-
ye una continuación en parte de nuestra solicitud de paten-
te copendiente estadounidense, número de serie 103.956, por
5 Preparación de Insulina a partir de Glándulas del Páncreas,
ahora abandonada.

 En la manufactura comercial de insulina, la práctica
ha consistido en extraer la insulina de las glándulas del
páncreas, utilizando soluciones alcohólicas aciduladas em-
pleando ácido clorhídrico o ácido sulfúrico. En estas opera-
10 ciones de extracción, el pH de la mezcla de extracción se
mantiene normalmente alrededor de 2,0. Las glándulas del pán-
creas son desmenuzadas y, en el procedimiento comercial ha-
bitual, la insulina se extrae de las mismas empleando un di-
solvente constituido por alcohol etílico y ácido clorhídrico,
15 estando el alcohol a una concentración de aproximadamente
65 a 75 %, sobre la base del volumen de extracción después
de haberse alcanzado el equilibrio. Después de ajustar el
pH a 2,0 aproximadamente, la mezcla se agita durante varias
20 horas y se centrifuga, siendo reextraída la carne sólida ba-
jo las mismas condiciones. Los líquidos centrifugados de am-
bas operaciones se alcalinizan después, empleando amoníaco y
se filtran. Los extractos filtrados se concentran y se puri-
fican de nuevo para recuperar la insulina.

25 El procedimiento anterior da un rendimiento que ascien-
de solamente a un pequeño porcentaje de la insulina que cree-
mos que realmente contienen las glándulas. Como la cantidad de
insulina asequible a los pacientes diabéticos es crítica, la
cuestión del rendimiento es de máxima importancia y hemos
30 tratado de descubrir algún método que dé mayores rendimien-



1 tos de insulina en el proceso de extracción y nuevos rendi-
mientos del producto acabado final en estado cristalino o
amorfo para administración clínica. Hemos encontrado que es
5 posible emplear ácido fosfórico en la etapa de extracción y
obtener un rendimiento considerablemente aumentado de insu-
lina a partir de las glándulas del páncreas.

10 Hemos encontrado que el ácido fosfórico posee la propie-
dad única de formar sales que son relativamente insolu-
bles en el disolvente de extracción cuando los extractos
son neutralizados o alcalinizados por adición de una base
adecuada. Esta característica única permite separar las sa-
les así formadas en la operación de filtración y con ello
contribuye considerablemente a aumentar la cantidad de insu-
lina recuperada por nuestro procedimiento.

15 Además del uso de ácido sulfúrico y ácido clorhídrico
como se ha mencionado antes, pueden emplearse ácidos orgáni-
cos, como acético, fórmico y similares. Estos ácidos orgá-
nicos tienen que ser utilizados en tales cantidades que su
empleo no se considera practicable. Además, la presencia de
20 las grandes cantidades de sales solubles de estos ácidos es
indeseable en las posteriores etapas del procedimiento.

25 Hemos encontrado que el ácido fosfórico, a diferencia
del ácido sulfúrico, ácido clorhídrico y los otros ácidos or-
gánicos, posee la propiedad única de formar sales insolubles,
permitiendo así la separación del ácido fosfórico del proce-
so en una etapa de filtración temprana que sigue a la etapa
de extracción.

30 Un objeto de esta invención es proporcionar un procedi-
miento en el que se emplea ácido fosfórico en la etapa de
extracción. Otro objeto de la invención es proporcionar un



1 procedimiento en el que el ácido fosfórico es eficazmente em-
pleado dentro de intervalos de pH que se han encontrado efi-
caces para la recuperación de la insulina con un alto rendi-
5 miento. Todavía otro objeto es proporcionar un procedimiento
en el que las pérdidas de insulina hasta ahora experimenta-
das en la concentración del extracto por destilación a va-
cío son eliminadas y se obtiene una gran recuperación des-
pués de la etapa de concentración o destilación. Otros obje-
tos y ventajas específicas aparecerán a medida que transcua-
10 rra la memoria.

Las glándulas del páncreas extraídas pueden ser de cual-
quier origen. El ganado vacuno, cerdos u otros animales, pe-
ces, cetáceos y similares, todos ellos proporcionan fuentes
de glándulas del páncreas que pueden ser extraídas para la
15 recuperación de insulina.

En una realización de nuestro procedimiento, extraemos
las glándulas del páncreas picadas en un disolvente orgáni-
co de la insulina, como alcohol etílico y en presencia de
ácido fosfórico. Preferiblemente, se emplea ácido fosfórico
20 suficiente para ajustar el pH de la mezcla de extracción
a 3 aproximadamente. Después la mezcla de extracción puede
ser filtrada o centrifugada para separar los sólidos sus-
pendidos. Si se desea, el sólido o el residuo puede ser re-
extraído prácticamente bajo las mismas condiciones y el fil-
25 trado combinado con el primer filtrado.

Después de la etapa de extracción, preferimos agregar
una base, como amoniaco acuoso, para llevar el pH a 5,5-8,5
aproximadamente, formando con ello una sal amónica insolu-
30 ble del ácido fosfórico, mientras al mismo tiempo se preci-
pita la materia protéica inerte. La sal y la materia protei-



1 ca inerte pueden ser después separadas por filtración. Puede
emplearse cualquier base adecuada para formar una sal insolu-
ble con el ácido fosfórico. Por ejemplo, puede emplearse hi-
dróxido sódico en lugar de amoniaco. Preferimos emplear una
5 base débil y el amoniaco acuoso es especialmente eficaz en
esta operación.

La insulina en los filtrados alcohólicos puede ser re-
cuperada por procedimientos convencionales. Los filtrados al-
cólicos alcalinos son acidulados y concentrados a vacío a
10 temperaturas reducidas y la materia lipoidal insoluble se sepa-
ra por filtración. La insulina en el concentrado acuoso pue-
de ser precipitada por adición de cloruro sódico y la torta
soluble así obtenida puede ser además purificada solubilizán-
dola en agua y precipitando la insulina en su punto isoeléc-
15 trico. La insulina precipitada recuperada puede ser solubili-
zada y luego cristalizada después de la adición a la misma
de acetato de cinc o cloruro de cinc para obtener así la sal
de insulina de cinc.

En lugar del método de purificación convencional que
20 acabamos de describir, se entiende que pueden utilizarse
otros métodos de purificación conocidos que conducen a la
preparación de composiciones de insulina acabadas, amorfas o
cristalinas.

Preferimos separar la materia lipoidal y que contiene
25 el filtrado después de la anterior etapa de filtración en la
que la sal insoluble y la proteína inerte son separadas y an-
tes de la purificación del filtrado para obtener insulina.
Después de la etapa de filtración, el filtrado obtenido se
ajusta por adición de ácido sulfúrico (o algún otro ácido) a
30 un pH de 3-3,5 y se concentra a presión reducida hasta un



1 contenido en alcohol de 15-25 %, preferiblemente alrededor
del 20 %. La materia lipoidal que entonces se separa puede
ser removida por filtración o centrifugación y el filtrado
5 concentrado de nuevo a presión reducida hasta formar la fase
acuosa. Se produce una nueva precipitación de materia lipoidal
y ésta se separa entonces por filtración o centrifugación.

La materia lipoidal es preferiblemente separada por
eliminación parcial del alcohol a vacío en un calderín. La
temperatura en esta etapa se mantiene preferiblemente lo más
10 baja posible, por lo que el calderín se mantiene a presión
reducida. Hemos obtenido buenos resultados manteniendo unas
temperaturas de 60-70°F (15,5-21°C).

En la precipitación de proteínas inertes, es ventajoso
ajustar el pH en un intervalo de 5,2 a 9,5 aproximadamente,
15 siendo el intervalo preferido de 5,5 a 8,5. Nuestros mejores
resultados se han obtenido en el intervalo de pH de 8 a 8,5.
La materia protéica inerte es eficazmente precipitada y la
separación de este material, junto con las sales insolubles
de ácido fosfórico, ejerce un efecto altamente beneficioso
20 sobre las operaciones subsiguientes.

El disolvente para la insulina puede ser cualquier di-
solvente orgánico miscible con agua de la insulina, como al-
cohol etílico, alcohol metílico, alcohol propílico, alcohol
isopropílico, acetona, etc., o mezclas de los mismos. Pre-
25 ferimos emplear un alcohol alifático de menos de 4 átomos de
carbono y hemos encontrado que el alcohol etílico es el más
conveniente.

La concentración del disolvente orgánico en la mezcla
de extracción debe ser suficientemente alta para evitar una
30 solubilidad sustancial de otras sustancias, tales como los



1 enzimas pancreáticos y no debe ser tan alta que produzca
una insolubilización sustancial de la insulina.

5 Hemos encontrado que es satisfactoria una concentración
de alcohol del 50 al 85 % en volumen en el líquido presente
en la mezcla de extracción. Las concentraciones inferiores
al 50 % permiten la solubilidad de una cantidad indeseable
de enzimas junto con impurezas protéicas y las concentracio-
nes superiores al 85 % producen un rendimiento reducido de
la insulina. Preferimos una concentración de alcohol del 60
10 al 75 %.

15 Cuando nos referimos a "concentración" en esta memoria
y en las reivindicaciones, queremos decir la concentración
global en la mezcla de extracción sobre la base del volumen
total de líquido presente y no la concentración del disol-
vente agregado al proceso.

20 La temperatura a la cual se realiza la extracción puede
variar entre amplios límites, pero preferimos efectuarla a
temperaturas comprendidas entre 0° y 15°C y todavía mejor
alrededor de 10°C.

25 Como ya se ha dicho, en la recuperación de insulina de
las glándulas del páncreas, el tejido pancreático triturado
o macerado se extrae ordinariamente en una solución alcohóli-
ca acidulada que contiene de 60 a 75 % de alcohol. La mezcla
de extracción alcohólica habitualmente es acidulada a un pH
de alrededor de 2,0 con ácido clorhídrico o ácido sulfúrico.
Recientemente otros investigadores han registrado el uso de
ácidos orgánicos débiles, como acético, fórmico, propiónico
y butírico, para este fin.

30 Hemos demostrado que el ácido fosfórico es especialmen-
te adecuado como agente acidulante en la extracción de in-



- 8 APR 1974

1 sulina del tejido pancreático y que se obtienen rendimientos
de insulina considerablemente mayores que los obtenidos me-
diante el uso de ácidos fuertes, como los ácidos clorhídri-
co o sulfúrico. En el uso de ácido fosfórico para este fin,
5 hemos encontrado que la recuperación máxima de insulina se
obtiene cuando la mezcla de extracción se acidula a un pH
de 2,5 ó 3,0 aproximadamente y que se obtienen menores ren-
dimientos a un pH superior a 4,0. Preferimos emplear un pH
de 2,85 a 3,5. No se obtiene ninguna ventaja sustancial re-
10 duciendo el pH por debajo de 2,5 o elevándolo por encima
de 4,0.

Creemos que los rendimientos más altos de insulina obte-
nidos con el uso de ácido fosfórico son debidos a una combi-
nación de propiedades deseables poseídas por este ácido, que
15 lo hacen especialmente adecuado para uso en la extracción de
insulina del tejido pancreático. Esta combinación de propie-
dades deseables consiste en la propiedad del ácido fosfórico
de provocar la máxima solubilización y extracción de la in-
sulina del tejido pancreático sin necesidad de utilizar la
20 acidez excesivamente alta (pH 2,0) requerida cuando se em-
plea ácido clorhídrico o sulfúrico y, en segundo lugar, la
propiedad de que las sales de ácido fosfórico son relativa-
mente insolubles en el disolvente de extracción, de manera
que la alta concentración de sales alcanzada en los extrac-
25 tos cuando se utilizan los ácidos clorhídrico, acético, fór-
mico u otros ácidos de este tipo, es evitada.

En el uso de los ácidos acético, fórmico o clorhídrico
en la extracción de la insulina, es necesario, después de
separar el tejido pancreático grosero una vez realizada la
30 extracción, neutralizar la acidez para clarificar los ex-



1 tractos por filtración. Esto se realiza habitualmente ajustando el pH de los extractos a un valor de 7 a 8,5 mediante la adición de amoniaco acuoso. Esta alcalinización también produce la precipitación y permite la separación de impurezas proteicas indeseables que son precipitadas en este intervalo de pH.

5
10
15
20
25
30

En el uso de los ácidos clorhídrico, acético o fórmico, el ajuste del pH de los extractos a 7,0-8,5 antes de la filtración da lugar a la introducción de cantidades muy grandes de sales amónicas solubles en los extractos. Esto es indeseable y no ocurre cuando se emplea ácido fosfórico para acidular la mezcla de extracción, ya que las sales amónicas del ácido fosfórico son relativamente insolubles en la solución hidroalcohólica de extracción de insulina y son separadas cuando los extractos se filtran después de haber ajustado el pH alrededor de la neutralidad o en el lado alcalino con amoniaco acuoso. Al evitar la introducción de grandes cantidades de sales amónicas solubles en los extractos, se contribuye a una mayor recuperación de la insulina ya que la presencia de estas grandes cantidades de sales aumenta el punto de ebullición de los extractos durante la concentración posterior en el calderín para separar el alcohol y de esta manera es responsable de grandes pérdidas de insulina.

El uso de ácido fosfórico también permite separar otras sustancias indeseables de los extractos, como hierro, cobre o metales más pesados cuyas sales pueden estar presentes en pequeñas cantidades como sales de los metales que pueden haber sido introducidos como contaminantes en los reactivos o materiales o procedentes del equipo empleado en la transformación. Es sabido que la presencia de estos iones metálicos pro-



1 duce pérdidas de insulina. Las sales de estos metales con áci-
do fosfórico son comparativamente insolubles en la solución
de extracción empleada y son separadas cuando los extractos
son neutralizados con amoniaco y filtrados. Estos iones metá-
5 licos no son tan completamente separados cuando se utilizan
los ácidos sulfúrico, clorhídrico, fórmico o acético, ya que
las sales de estos ácidos son relativamente solubles en la
solución de extracción y el ajuste de los extractos en el in-
tervalo alcalino no sirve para separarlas tan completamente
10 ya que los hidróxidos de estos metales son algo más solubles
que sus fosfatos bajo las condiciones reinantes.

Aunque proporcionalmente se requieren cantidades de áci-
do fosfórico, para reducir el pH de la mezcla de extracción,
algo mayores que las requeridas cuando se emplean ácidos fuertes,
15 como clorhídrico o sulfúrico, esto está compensado por el he-
cho de que se obtiene una extracción máxima de la insulina
con el ácido fosfórico a un intervalo de pH de 3,0 a 4,0,
mientras que con los ácidos clorhídrico o sulfúrico general-
mente se admite que el óptimo es un pH alrededor de 2,0. Es-
20 to representa diez veces la concentración de ión H^+ necesaria
con el ácido fosfórico. Creemos que efectuando la extracción
a una acidez más baja, pH 3 a 4, se obtiene una mayor recupe-
ración de la insulina.

Hemos encontrado que cuando se utilizan ácidos orgáni-
cos débiles, como acético o fórmico, es necesario emplear una
25 cantidad suficiente de estos ácidos para reducir el pH de la
mezcla de extracción a 3-3,5 aproximadamente, con objeto de
obtener la extracción óptima de la insulina. Estos ácidos or-
gánicos débiles tienen una constante de disociación ácida de
30 $1,8 \times 10^{-4}$ a $1,75 \times 10^{-5}$ y se requiere de 3 a 10 veces el peso



1 de estos ácidos en comparación con la cantidad de ácido fos-
fórico requerida para reducir el pH de la mezcla de extrac-
ción proporcionalmente. Consideramos que el uso de estos áci-
dos débiles no es práctico ya que aumenta considerablemente
5 el coste de la transformación debido a las cantidades excesi-
vas de ácido requeridas. El ácido fosfórico es relativamente
un ácido más fuerte, con una constante de disociación de
1,1 x 10⁻² y encontramos que esta fuerza del ácido es espe-
cialmente adecuada para nuestros fines y no encontramos que
10 los ácidos con una constante de disociación inferior a
1 x 10⁻³ sean adecuados desde un punto de vista práctico para
la extracción de la insulina.

Al ajustar el pH de los extractos centrifugados hacia
arriba con objeto de precipitar y separar las proteínas in-
deseables y las sales insolubles de ácido fosfórico, prefe-
rimos utilizar una base relativamente débil como agente alcali-
15 nante con objeto de evitar puntos locales de alcalinidad
indebidamente alta como puede producirse utilizando una base
fuerte. Hemos encontrado que es adecuada una solución acuosa
20 de amoníaco (hidróxido amónico) y preferimos su empleo. Sin
embargo, pueden utilizarse diversas bases débiles o fuertes
aunque es necesario, para evitar la introducción de grandes
cantidades de sales solubles en los extractos, usar una base
que forme sales relativamente insolubles con el ácido fosfó-
25 rico en el ambiente dado cuando el pH se ajusta a 5,5-9,5.
En el caso del amoníaco o hidróxido sódico, la precipitación
de fosfato amónico o sódico insoluble comienza a pH aproxima-
damente 5, siendo la precipitación más completa al aumentar
la alcalinidad. En el caso del ácido fosfórico, la precipita-
30 ción de fosfato amónico es aproximadamente dos tercios de la



1 completa a pH 6 y alrededor del 90 % de la completa a pH 8,0.

Por lo tanto, la precipitación de sales insolubles y de proteínas indeseables puede efectuarse entre pH 6,0 y 9,5. Sin embargo, preferimos ajustar los extractos entre pH 7,5 y 8,5 antes de la filtración, ya que una gran alcalinidad no es ventajosa y una cantidad mínima de las sales de ácido fosfórico permanecen solubles en este intervalo.

En nuestro procedimiento preferido, se añade a una solución hidroalcohólica, con un contenido en alcohol del 65 al 95 %, una cantidad de ácido fosfórico líquido suficiente para que, después de la adición del tejido pancreático macerado, el pH de la mezcla de extracción sea de 3,0 aproximadamente y el contenido en alcohol alrededor del 60 al 65 % después de haber alcanzado el equilibrio. Después de agitar y dejar un tiempo suficiente para la extracción, la carne sólida se separa por centrifugación y se vuelve a extraer en alcohol al 60-65 % con adición de ácido suficiente para mantener el mismo pH y de nuevo se centrifuga. El pH de los extractos centrifugados se ajusta a 6,0-9,5 con adición de amoníaco acuoso y se filtra a través de un filtro-prensa para separar las sales insolubles y proteínas precipitadas y otro material suspendido. Los extractos filtrados transparentes se vuelven acidular a un pH de 3,5 aproximadamente con ácido sulfúrico y de nuevo se procesan y concentran y purifican de acuerdo con procedimientos convencionales y conocidos.

En la acidulación de la mezcla de extracción alcohólica, no encontramos ventajoso reducir el pH de la mezcla de extracción por debajo de 2,5, ya que obtenemos rendimientos óptimos de insulina en un intervalo de 3,0 a 3,5 aproximadamente y no aumentamos apreciablemente el rendimiento mediante



1 el uso de más ácido. La cantidad de insulina extraída des-
ciende a un pH superior a 3,5 y el rendimiento desciende
bruscamente a un pH superior a 4,0. El intervalo deseado es
de 2,5 a 4,0 y nuestro intervalo preferido es de 2,85 a 3,5.

5 Aunque en el ejemplo anterior hemos señalado la venta-
ja de utilizar amoniaco con ácido fosfórico porque las sa-
les obtenidas son insolubles y pueden ser separadas antes
de la concentración de la etapa de destilación, se sobre-
entiende que la etapa de tratamiento con amoniaco puede ser
10 omitida si se desea y más adelante daremos ejemplos del pro-
cedimiento sin el uso de amoniaco.

15 El uso de ácido fosfórico produce ventajas definidas
sobre la práctica de utilizar ácido clorhídrico y ácido sul-
fúrico. El ácido clorhídrico produce un hinchamiento y geli-
ficación del tejido pancreático, haciéndolo muy difícil de
separar los sólidos del tejido por filtración sin alcalini-
zar primero el extracto. En la alcalinización del extracto,
se introduce una gran cantidad de sales amónicas solubles,
20 sales que dan lugar a una pérdida considerable de insulina
en etapas posteriores del proceso. El ácido sulfúrico es me-
nos eficaz en la extracción de insulina y es necesario utili-
zar ácido suficiente para reducir el pH a 2,0 ó menos. Esta
concentración de un ácido fuerte produce una grave pérdida
de insulina en etapas posteriores. Una explicación de estas
25 pérdidas es que la materia fuertemente ácida favorece la for-
mación de fibrillas de insulina durante el periodo en que el
material es calentado y puesto en contacto con las paredes
del calderín. Por el contrario, el ácido fosfórico se emplea
eficazmente a un intervalo de pH más alto, de manera que los
30 efectos adversos producidos sobre la insulina por las condi-



1 ciones de pH bajo son evitados. Además, el intervalo de pH
más alto empleado para la extracción evita la formación de
fibrillas de insulina.

5 Se produce una pérdida mucho menor de insulina durante
la etapa de destilación después de la extracción con ácido
fosfórico y esto contribuye considerablemente a los mayores
rendimientos de insulina obtenidos con nuestro procedimiento.

10 A diferencia de los extractos en ácido clorhídrico o
ácido sulfúrico, los extractos en ácido fosfórico pueden ser
alcalinizados con amoniaco para producir sales amónicas inso-
lubles que son separadas en la etapa de filtración antes de
la concentración del extracto por destilación. Esto da lugar
a una reducción en el contenido de sal y de la fuerza iónica
y aumenta la recuperación de insulina evitando las pérdidas
15 de insulina debidas a la formación de fibrillas.

A diferencia del ácido clorhídrico, el uso de ácido
fosfórico permite la centrifugación eficiente y la fácil
filtración de los extractos sin necesidad de alcalinización
previa. A diferencia del ácido sulfúrico, el uso de ácido
20 fosfórico da lugar a una solubilización rápida y extracción
de la insulina del tejido pancreático.

25 El ácido fosfórico carece de las indeseables caracte-
rísticas del ácido sulfúrico y del ácido clorhídrico en las
etapas del proceso importantes anteriores mientras que al
mismo tiempo, en la práctica, la recuperación de insulina me-
diante el uso de ácido fosfórico en el intervalo descrito
produce un rendimiento aproximadamente un 100 % superior al
obtenido en los procedimientos comerciales donde se emplea
ácido clorhídrico o ácido sulfúrico.

30 A continuación damos algunos ejemplos específicos que



1 ilustran nuestro procedimiento:

EJEMPLO 1

5 En una transformación a escala comercial, se trituran y maceran 6090 libras (2762 kg) de glándulas de páncreas de buey congeladas y se extraen por agitación en 1860 galones (7040 l) de alcohol del 82 % conteniendo 153 litros de ácido fosfórico (Farmacopea estadounidense). Después de haber alcanzado el equilibrio por agitación, el pH es 2,85 y la concentración de alcohol es alrededor del 65 %. Las materias insolubles del tejido pancreático se separan por centrifugación y se reextraen bajo las mismas condiciones. Después de centrifugar, el líquido de extracción combinado se alcaliniza a pH 8,2 por adición de amoníaco acuoso y se filtra. Los extractos filtrados se reacidulan a pH 3,5 por adición de H_2SO_4 . La determinación biológica en esta fase indica que el contenido de insulina en los extractos asciende a 1800 U.I. por libra (454 g) de glándulas procesadas. Los extractos reacidulados se concentran después en el calderín de vacío para separar el alcohol y se filtran para separar la materia lipoidal. El concentrado acuoso del calderín en esta fase contiene 1780 unidades de insulina por libra (454 g) de glándulas procesadas. La insulina es purificada además por procedimientos convencionales y convertida en insulina cristalina. El rendimiento de cristales de insulina de cinc obtenido asciende a 1620 unidades por libra (454 g) de glándulas de páncreas procesadas.

EJEMPLO 2

30 Se trituran 40 libras (18,1 kg) de glándulas de páncreas de cerdo congeladas y se extraen por agitación con 45.500 cc de alcohol al 85 % conteniendo 925 cc de ácido fos-



1 fórico. El pH de la mezcla de extracción es de 3,0 y la con-
centración de alcohol es aproximadamente del 65 % después de
haber alcanzado el equilibrio. Los sólidos de la carne pan-
creáticos separados se reextraen de nuevo por agitación en
5 45.000 cc de alcohol al 65 %. El pH de los filtrados combina-
dos se eleva a 8,5 por adición de amoniaco para precipitar
las sales de ácido fosfórico y las proteínas inertes. El só-
lido se separa por filtración y después se añade ácido sul-
fúrico al filtrado para llevar el pH a 3,5. Los extractos
10 acidulados se concentran después a presión reducida hasta
una concentración de alcohol del 20 %. Después el material
lipoidal se separa por filtración y el filtrado que contiene
insulina es biológicamente analizado para determinar la acti-
vidad de insulina. El ensayo biológico indica que la insuli-
na recuperada es equivalente a 1615 unidades internacionales
15 por cada libra (454 g) de glándulas de páncreas procesadas.

EJEMPLO 3

Se trituran 1500 libras (680 kg) de glándulas de pán-
creas de buey congeladas y se extraen mediante el uso de áci-
do fosfórico en la etapa de extracción descrita en el Ejem-
plo 1. La mezcla se acidula a pH 3,5 con ácido fosfórico. Des-
pués de la extracción, los sólidos suspendidos se separan
por filtración en un filtro-prensa. El filtrado conteniendo
la insulina se ajusta después a pH 8 por adición de amoniaco
acuoso y las sales amónicas precipitadas de ácido fosfórico
y las proteínas inertes se separan por filtración a través
de un filtro-prensa. Después se acidula el filtrado a pH 3,5
con ácido sulfúrico. La masa de la materia lipoidal se sepa-
ra por destilación a presión reducida hasta un contenido en
30 alcohol de aproximadamente el 20 %, seguido de filtración



1 y de nueva concentración a presión reducida hasta formar la
fase acuosa. La insulina en el filtrado se recupera entonces
por el procedimiento convencional, empleando cloruro sódico,
etc. El rendimiento de insulina cristalina asciende a 1400
5 unidades internacionales por libra (454 g) de glándulas ori-
ginales empleadas.

Se trituran unas cantidades similares de glándulas de
páncreas de cerdo congeladas y se extraen como se ha descri-
to en el Ejemplo 3, obteniéndose resultados similares. El
10 rendimiento de la insulina final en forma cristalina o amorfa
representa un considerable aumento sobre los rendimientos
obtenidos en los procedimientos que utilizan el proceso con-
vencional con ácido clorhídrico.

EJEMPLO 4

15 Se trituran 100 libras (45 kg) de glándulas de páncreas
de buey congeladas en 118 litros de alcohol al 82 % conte-
niendo 2200 cc de ácido fosfórico y se extraen con agitación.
El pH de la mezcla de extracción es 3,1 y la concentración
de alcohol es del 65 % después de haber alcanzado el equili-
20 brio. La carne sólida se separa por centrifugación y se vuel-
ve a extraer en 100 litros de alcohol al 65 %. Los extractos
centrifugados combinados se ajustan a pH 8,2 con amoniaco
acuoso y se filtran. Los extractos filtrados se vuelven a
acidular a pH 3,5 por adición de ácido sulfúrico y se concen-
25 tran a vacío y se filtran para separar los lipoides. El en-
sayo biológico del concentrado acuoso indica que la insulina
recuperada asciende a 1876 unidades por libra (454 g) de
glándulas procesadas. Después la insulina en el concentrado
acuoso es expulsada por salificación mediante adición de
30 cloruro sódico y la torta salina de insulina obtenida se



1 solubiliza en agua y la insulina se precipita en su punto
isoelectrico. El precipitado de insulina se solubiliza des-
5 pués en agua conteniendo un regulador y la insulina se con-
vierte en cristales de insulina de cinc por adición de aceta-
to de cinc. El rendimiento de cristales secos de insulina de
cinc recuperada, determinada por pesada y ensayo biológico,
es de 1526 unidades por libra (454 g) de glándulas de pán-
creas .

EJEMPLO 4-A

10 Se trituran 2000 libras (907 kg) de unas glándulas de
páncreas de buey congeladas, excepcionalmente buenas, del
mismo lote procesado en el Ejemplo 4, en 600 galones (2271
litros) de alcohol al 93 % conteniendo 30.000 cc de ácido
15 clorhídrico y se extrae por agitación. El pH de la mezcla
de extracción es de 2,0 y la concentración de alcohol es del
70 %. La carne sólida se separa por centrifugación y se vuel-
ve a extraer en 600 galones (2271 litros) de alcohol al
70 %. Los extractos centrifugados combinados se ajustan a
20 pH 7,6 por adición de amoniaco acuoso y se filtra. Los ex-
tractos filtrados se vuelven acidular a pH 3,5 por adición
de ácido sulfúrico y se concentran a vacío y se filtran para
separar los lipoides. La determinación biológica indica que
el contenido en insulina del concentrado acuoso es de 1000
25 unidades por libra (454 g) de glándulas de páncreas procesa-
das. La insulina se salifica del concentrado acuoso y se pu-
rifica y cristaliza por el mismo procedimiento empleado en
el Ejemplo 4. El rendimiento de cristales secos de insulina
de cinc recuperados, determinado por pesada y ensayo bioló-
30 gico, asciende a 835 unidades por libra de glándulas de
páncreas.



1

EJEMPLO 5

5

Se extraen 40 libras (18,1 kg) de glándulas de páncreas de cerdo congeladas trituradas, por agitación en 47 litros de alcohol al 82 % conteniendo 800 cc de ácido fosfórico. El pH de la mezcla de extracción es de 3,1 y la concentración de alcohol es del 65 % después de que se ha alcanzado el equilibrio. El residuo de carne se separa por centrifugación y después se vuelve a extraer en 40 litros de alcohol al 65 %. Los centrifugados combinados se ajustan a pH 8,5 por adición de amoniaco acuoso y se filtran.

10

Se toma una muestra de los filtrados conteniendo la insulina alcohólica y se ensayan biológicamente. El contenido en insulina del filtrado asciende a 2090 unidades por libra (454 g) de páncreas procesada.

15

Los extractos filtrados se concentran después a vacío y se filtran para separar los lipoides. El contenido en insulina del concentrado filtrado acuoso, demostrado por ensayo biológico, es de 1760 unidades por libra (454 g) de glándulas de páncreas procesadas.

20

EJEMPLO 5-A

25

Se trituran 40 libras (18,1 kg) de páncreas de cerdo congelado, constituido por una muestra representativa del mismo lote de glándulas procesadas en el Ejemplo 5, en 47 litros de alcohol al 82 % conteniendo 9,2 libras de ácido fórmico líquido. El pH de la mezcla de extracción es 3,2 y la concentración de alcohol es aproximadamente del 65 %. El residuo de carne se separa por centrifugación y se vuelve a extraer en 40 litros de alcohol al 65 %. Los extractos centrifugados combinados se ajustan después a pH 8,5 con amoniaco acuoso y se filtran.

30



1 Una muestra de los extractos alcohólicos filtrados se-
parada y ensayada biológicamente indica que el contenido en
insulina de los extractos es de 1680 unidades por libra de
glándulas procesadas.

5 Los extractos filtrados son después acidulados de nue-
vo y concentrados y filtrados por un procedimiento idéntico
al empleado en el Ejemplo 5. El rendimiento de insulina en
el concentrado acuoso por ensayo biológico es de 870 unidades
por libra (454 g).

10 Los Ejemplos 4 y 4-A y los Ejemplos 5 y 5-A demuestran
el efecto perjudicial de la presencia de grandes cantidades
de sales amónicas solubles de ácidos como el ácido clorhídri-
co y el ácido fórmico, cuyas sales amónicas no son precipi-
tadas y separadas en el disolvente de extracción empleado.
15 Como se observa en los Ejemplos 5 y 5-A, la pérdida de insu-
lina durante la concentración y filtración de los extractos
es mucho menor cuando se emplea ácido fosfórico, cuyas sales
amónicas son insolubles y son separadas.

20 EJEMPLO 6

Se extraen 40 libras (18,1 kg) de glándulas de pán-
creas de buey congeladas y trituradas por agitación en 47 li-
tros de alcohol al 91 % conteniendo 575 cc de ácido fosfóri-
co. El pH de la mezcla de extracción es 3,5 y la concentra-
ción de alcohol del 70 % después de haber alcanzado el equi-
librio. El tejido pancreático sólido se separa por centri-
fugación y se extrae de nuevo bajo las mismas condiciones.
25 Después de centrifugar, los extractos se clarifican por fil-
tración antes de concentrar en el calderín a vacío. El ensa-
yo biológico indica que los extractos filtrados contienen
30 1400 U.I. por libra (454 g) de glándulas procesadas.



1 Los extractos filtrados se concentran después en el
calderín a vacío sin ajuste previo a pH alcalino. El concen-
trado acuoso del calderín procedente de los extractos se tra-
ta con un disolvente no miscible para separar los lipoides y
5 se separa la fracción lipoidal. La determinación del concen-
trado acuoso indica que la insulina presente asciende a
1295 U.I. por libra (454 g) de glándulas procesadas.

EJEMPLO 7

10 Se maceran y extraen 40 libras (18,1 kg) de glándulas
de páncreas de buey congeladas en 45.000 cc de alcohol al
82 % conteniendo 800 cc de ácido fosfórico. Después de agitar
durante hora y media, el pH de la mezcla de extracción es al-
rededor de 3,0 y la concentración de alcohol es del 65 % en
volumen.

15 Los sólidos del tejido pancreático se separan por cen-
trifugación y se vuelven a extraer bajo las mismas condicio-
nes. Después los extractos combinados se filtran sin altera-
ción del pH y se ensayan. El contenido en insulina por deter-
minación biológica en esta etapa asciende a 2200 U.I. por
20 libra (454 g) de glándulas.

Después los extractos clarificados se concentran di-
rectamente en el calderín a vacío hasta un contenido en al-
cohol del 20 %. Los extractos concentrados se enfrían después
y se filtran para separar los lipoides y se concentran de
25 nuevo hasta la fase acuosa. El contenido en insulina por va-
loración en esta fase resulta ser de 1890 U.I. por libra
(454 g) de glándulas procesadas.

EJEMPLO 7-A

30 Se procesan de forma idéntica al procedimiento del
Ejemplo 7, a excepción de que la mezcla de extracción se



1 ajusta a pH 2,0 con ácido sulfúrico en lugar de hacerlo con
ácido fosfórico, 40 libras (18,1 kg) de glándulas de páncreas
de buey procedente del mismo lote que las del Ejemplo 7. El
5 ensayo indica que los extractos alcohólicos contienen 1540
U.I. por libra de glándulas y el concentrado del calderín
920 U.I.

Este ejemplo demuestra no solamente la eficacia solubi-
lizante y extractiva relativamente menor del ácido sulfúrico
en comparación con el ácido fosfórico, sino también el mucho
10 mayor porcentaje de insulina perdida en la concentración de
los extractos alcohólicos para separar el alcohol.

El procedimiento anterior para la extracción y re-
cuperación de insulina de las glándulas del páncreas puede
ser variado entre amplios límites, siendo opcionales muchas
15 de las operaciones empleadas aquí. Preferimos extraer con
el disolvente de la insulina conteniendo un ácido fosfórico
y a continuación de esta etapa añadir una base para formar
sales insolubles del ácido fosfórico. Después de separar las
20 sales, pueden emplearse varios procedimientos opcionales pa-
ra recuperar la insulina del extracto. Hemos indicado algu-
nas de nuestras operaciones preferidas, pero se sobreentien-
de que estas operaciones no son esenciales al procedimiento
tal como se ha descrito aquí y se dan simplemente como un
procedimiento preferido. Después de que el ácido fosfórico
25 ha sido separado del proceso en forma de sales amónicas de
ácido fosfórico, se encuentra que el extracto resultante pue-
de ser tratado mucho más eficazmente para la recuperación de
la insulina que contiene.

Aunque en la memoria anterior algunas de las etapas del
30 procedimiento han sido descritas con considerable detalle



1 con fines de ilustración de las realizaciones del invento,
se sobreentiende que todos estos detalles pueden ser modi-
ficados entre amplios límites por los expertos en la técni-
ca sin apartarse del espíritu de nuestra invención.

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

REIVINDICACIONES

10 1.- UN PROCEDIMIENTO DE OBTENCION DE INSULI-
NA A PARTIR DE LAS GLANDULAS DEL PANCREAS, caracterizado -
porque consiste en someter dichas glándulas a extracción a
un pH de 2,5-4,0 con una mezcla de ácido fosfórico en un -
disolvente orgánico para la insulina que sea compatible --
con el ácido fosfórico y recuperar la insulina en el extrac-
to.

15 2.- UN PROCEDIMIENTO DE OBTENCION DE INSULINA
A PARTIR DE LAS GLANDULAS DEL PANCREAS, según reivindica--
ción 1ª, caracterizado porque consiste en someter dichas -
glándulas a extracción a un pH de 2,5-3,5 aproximadamente
con una mezcla de ácido fosfórico y un disolvente orgánico
20 para la insulina que sea compatible con el ácido fosfórico,
separar el sólido de las porciones líquidas y recuperar la
insulina en la porción líquida.

25 3.- UN PROCEDIMIENTO DE OBTENCION DE INSULINA
A PARTIR DE LAS GLANDULAS DEL PANCREAS, según reivindica--
ción 1ª, caracterizado porque consiste en someter dichas -
glándulas a extracción a un pH de 2,5-4,0 aproximadamente
con una mezcla de ácido fosfórico y alcohol etílico y recu-
perar la insulina del extracto.

30 4.- UN PROCEDIMIENTO DE OBTENCION DE INSULINA
A PARTIR DE LAS GLANDULAS DEL PANCREAS, según reivindica--





1

ciones anteriores caracterizado porque consiste en extraer dichas glándulas a un pH de 3,0 aproximadamente con ácido fosfórico y un disolvente orgánico para la insulina que sea compatible con el ácido fosfórico, separar la porción sólida de la porción líquida y recuperar la insulina de la porción líquida.

5

5.- UN PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE INSULINA A PARTIR DE LAS GLANDULAS DEL PANCREAS, según reivindicaciones anteriores caracterizado porque consiste en someter dichas glándulas a extracción a un pH comprendido -- entre 2,85 y 3,5 con una mezcla de ácido fosfórico y alcohol etílico y recuperar la insulina del extracto.

10

15

6.- UN PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE INSULINA A PARTIR DE LAS GLANDULAS DEL PANCREAS, según reivindicación 1ª, caracterizado porque comprende las operaciones de extraer dichas glándulas a un pH de 2,5-4,0 aproximadamente con ácido fosfórico y un disolvente orgánico para la insulina que sea compatible con el ácido fosfórico, separar el líquido de las porciones sólidas y concentrar el líquido por destilación.

20

25

7.- UN PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE INSULINA A PARTIR DE LAS GLANDULAS DEL PANCREAS, según reivindicación 2ª, caracterizado porque comprende las operaciones de extraer dichas glándulas a un pH comprendido entre 2,85 y 3,5 con ácido fosfórico y un disolvente orgánico para la insulina que sea compatible con el ácido fosfórico, separar el líquido de las porciones sólidas y concentrar el líquido por destilación a vacío.

30



1

8.- Se reivindica por último como objeto sobre el que ha de recaer la Patente de Introducción que se solicita por: UN PROCEDIMIENTO DE OBTENCION DE INSULINA - A PARTIR DE LAS GIANDULAS DEL PANCREAS.

5

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

10

Madrid, 8 de abril de 1.974

BERNARDO UNGRIA

P.P.
BU

15

20

25

30

