

439569

Int. Cl.²: C 07 G

MEMORIA DESCRIPTIVA

correspondiente a la solicitud de concesión de un...

PATENTE DE INVENCION.-

SOLICITANTE: LABORATORIOS LEO, S.A.

RESIDENCIA: Avda. Pío XII MADRID-16-

ENUNCIADO: UN METODO PARA LA RECUPERACION DE IN-
SULINA.

Prioridad: Patente británica n.º 32.048/74 del 18 Julio 1974

1 El-Estatuto vigente sobre Propiedad Industrial, de
26 de Julio de 1929, en su texto refundido publicado el 30
de Abril de 1930, establece los caracteres de patentabili-
dad de las invenciones de tipo industrial que tienen por
5 objeto obtener ventajas sobre lo ya conocido, admitiendo
por consiguiente como patentables, las nuevas máquinas, a-
paratos, instrumentos, procesos de fabricación, etc. La am-
plitud de conceptos previstos como patentables, ha llevado
al legislador a aclarar (Artº. 46) que la enumeración con-
10 tenida en dicho cuerpo legal es puramente enunciativa y no
limitativa, haciéndola extensiva incluso a los descubrimien-
tos de tipo científico (Artº. 47).

15 El Decreto de 26 de Diciembre de 1947, recogiendo
la Orden de 18 de Noviembre de 1935, confirma el criterio
legal de que también serán patentables los instrumentos, ob-
jetos, o partes de los mismos, que aporten a la función a
que son destinados, un beneficio o efecto nuevo, y en defi-
nitiva que constituyan una mejora sustancial sobre lo ante-
riormente conocido.

20 Pues bien, a tenor de lo expuesto, y en base al ar-
ticulado que recoge los conceptos expresados, debe conside-
rarse, que la invención a que se refiere la presente memo-
ria, constituye una novedad industrial, con características
y ventajas que la hacen merecedora del privilegio de explo-
25 tación exclusiva que por ella se solicita, premiando así
los méritos de quien aporta a la industria del país una me-
jora efectiva y precisamente comprendida entre las enuncia-
das por la Ley como patentables. (Arts. 46 y 47 en relación
con el 171, en su nueva redacción afectada por la Orden de
30 18 de Noviembre de 1.935).

1 La presente invención se refiere a un método para la recuperación de insulina a partir de una materia de insulina y grasa que contiene extracto de páncreas.

5 El método convencional utilizado en la preparación de insulina comprende la extracción de glándulas congeladas y desmenuzadas de páncreas por medio de etanol acidificado acuoso ó de cualquier otro solvente orgánico adecuado, la precipitación de proteínas insolubles distintas de la insulina mediante el ajuste del PH del extracto a un valor aproximado de 8, y la filtración y reducción del PH del filtrado a un valor aproximado de 3. Esto dá como resultado un extracto transparente consistente en un 60 a 65% de etanol acuoso que contiene una pequeña cantidad de ácido, insulina y otras proteínas, enzimas e impurezas en solución, al igual que una cantidad que oscila entre el 5 y el 10% de materia grasa. Esta grasa, estando disuelta en el etanol, es un componente muy desagradable que, desde el punto de vista productivo, causa grandes problemas en las distintas fases de los procedimientos convencionales. El tratamiento posterior usual del extracto consiste en la vacuoevaporación a una temperatura de 25 a 30° C, con el fin de efectuar la separación y recuperación de etanol y para lograr la separación paulatina de la grasa, al tiempo que se desune el solvente del extracto bruto. La grasa se separa después de la vacuodestilación y mediante, por ejemplo, filtración ó centrifugación ó mediante decantación seguida de filtración. El líquido acuoso restante es sometido a un proceso posterior, hasta que se convierte en insulina purificada.

20
25
30 Aparte de que con el método convencional no se logra una completa eliminación de la grasa, esta grasa jun-

1 to con otras sustancias ejerce un efecto de descomposición
sobre la insulina durante la vacuodestilación, especialmen-
te en la fase final de dicha vacuodestilación en que la con-
centración de alcohol es baja. El movimiento violento que -
5 se produce en el líquido durante la vacuodestilación tam-
bién acelera la reacción entre la grasa y la insulina, lo -
que da como resultado un rendimiento más bajo.

Además de las desventajas claramente decisivas del
método convencional antes mencionado, se han de tener en -
10 cuenta otras desventajas económicas, ya que los equipos de
vacuodestilación son costosos y su operación y mantenimien-
to es caro.

De acuerdo con la presente invención, se utiliza
un método totalmente diferente al antes descrito para efec-
15 tuar la separación de grasa de un extremo de páncreas, que
puede ser, por ejemplo, el extracto preparado de la forma -
explicada a grandes rasgos arriba ó cualquier otro extracto
que contenga insulina y grasa.

El método utilizado según la invención consiste -
20 en que la insulina y la grasa que contienen un extracto bru-
to que puede ser, por ejemplo, un extracto alcohólico acuo-
so, se enfría a una temperatura a la cual toda la grasa se -
congela y se desune, con lo cual el extracto se separa de -
la grasa mediante, por ejemplo, filtración, bajo refrigera-
25 ción continua. El extracto bruto puede refrigerarse a, por -
ejemplo, un PH de valor 2 a 3 después de la precipitación a
PH 8, si bien no existe nada que dificulte el que se efectue
el enfriamiento a PH 8, y, en tal caso, es preferible que -
30 dicho enfriamiento se realice después de la filtración del
precipitado obtenido a PH 8. El rendimiento obtenido median-

1 te este último método será ligeramente inferior, si bien nos habremos ahorrado, en cambio, el ajuste a PH 3.

5 Por medio de este método se retira la grasa de forma fácil y completa ya desde una de las fases iniciales, y se eliminan los efectos nocivos de la grasa sobre la insulina en las siguientes fases del proceso.

10 El enfriamiento ó refrigeración y la separación de la grasa puede llevarse a cabo mediante la simple operación de colocar el extracto transparente en el frigorífico a una temperatura que oscile entre, por ejemplo, -30° C y 35° C. Esto hará que la grasa quede congelada y suspendida en el extracto en forma de partículas cristalinas sólidas. Después de haber dejado el extracto, el cual no ha sido agitado, durante un período de tiempo que puede oscilar entre las 12 a 24 horas en el frigorífico, éste podrá ser filtrado ó centrifugado, depende de la temperatura y de la cantidad de extracto. Si se agita el extracto durante la fase de enfriamiento, el tiempo de permanencia en el frigorífico puede reducirse considerablemente a, por ejemplo, sólo 2 a 3 horas. El filtrado ó centrifugado se lleva a cabo en el frigorífico apropiado, en el cual el dispositivo filtrador ó el separador centrífugo tienen una temperatura tan baja como la del extracto. De esta forma, se separa toda la grasa del extracto. Si la separación se efectúa fuera del frigorífico ó si se lleva el dispositivo filtrador desde el exterior al frigorífico, y dicho dispositivo tiene temperatura ambiente normal, parte de la grasa se derretirá y acompañará al extracto filtrado. Cuando se procede en la forma arriba descrita, frecuentemente se forman, sin embargo, cristales de tamaños bastante diferentes, cuyos cristales a menudo poseen, además, una estructura bastante poco uniforme e incluyen, por tanto, una cantidad re

15

20

25

30

lativamente grande de agua de cristalización.

Es de desear que la cristalización de la grasa se realice de tal forma que se obtengan cristales compactos y uniformes con una relación volumen/superficie relativamente grande. Los cristales que tienen el mismo o aproximadamente el mismo tamaño son más fáciles de separar del agua de cristalización mediante, por ejemplo, filtración, que lo son los cristales de distintos tamaños, y la forma compacta implica el que los cristales han de incluir sólo una cantidad relativamente pequeña de agua de cristalización, la cual se separa de la forma en que se acaba de describir.

La forma de los cristales puede estar afectada, como es bien conocido por los expertos en la materia, por la regulación de las condiciones de enfriamiento y cristalización.

Por consiguiente, en una forma preferente de realización, las condiciones de enfriamiento y cristalización con respecto, por ejemplo, al tiempo de enfriamiento, el valor del PH del extracto y la velocidad de agitación, están reguladas con vistas a la obtención de cristales de grasa compactos y uniformes que posean una relación volumen/superficie relativamente grande.

Los tratamientos efectuados con un extracto alcohólico acuoso han demostrado que un PH de un valor aproximado a 3 durante la fase de enfriamiento, da como resultado la mejor cristalización y el mejor rendimiento.

Igualmente, se ha demostrado que, por lo general, el tiempo de enfriamiento necesario hasta alcanzar una temperatura final que oscile entre, por ejemplo, 30°C y 35°C, sería de al menos 2 a 3 horas, si se agita el líquido.

Es preferible que el líquido enfriado sea agitado ó removido de algún modo similar. Sin embargo, el ritmo de

1 agitación no debe ser muy elevado, siendo la velocidad má-
xima de, por ejemplo, 50 r.p.m. Si se emplea una agitación
violenta, los cristales formados pueden estallar en peda-
5 zos. El enfriamiento del extracto y disgregación de la gra-
sa y la separación del extracto de la grasa, puede llevarse
a cabo ventajosamente de forma continúa.

Se pueden utilizar aparatos cristalizadores apro-
piados para llevar a cabo este método. Se hace mención, a -
modo de ejemplo, de cilindros refrigeradores verticales u -
10 horizontales que poseen una chaqueta refrigerante y rascado-
res o un refrigerador en forma de cuerpo de revolución, pa-
ra producir la supersaturación y causar la formación de nú-
cleos de cristal que se hallan unidos a uno ó más comparti-
mentos de cristalización, en los que los núcleos de cristal
15 formados crecen hasta lograr el tamaño y forma deseados. Des-
de el compartimento de cristalización o desde el último re-
cinto de cristalización, el cristal que contiene líquido pa-
sa al aparato filtrador ó a la máquina centrífuga.

Se puede recuperar la insulina del extracto libre
20 de grasa mediante cualquier procedimiento apropiado.

Abajo se ofrece un ejemplo no limitativo, llevado
a cabo a nivel de laboratorio, que ilustra el método que se
utiliza en la presente invención.

E J E M P L O

25 Sobre un vaso de boca ancha de 600 ml. se colocan
100 grs. de extracto de páncreas obtenidos según el método -
convencional que incluye la extracción de glándulas demenu-
zadas de páncreas de cerdo mediante etanol acidificado acuo-
so y ácido clorhídrico, la precipitación de proteínas inso-
30 lubles distintas de la insulina por medio del ajuste del PH

1 del extracto a un valor 8 y el filtrado y reducción del PH
a 2'8. El vaso se coloca en un refrigerador y su contenido
se enfría durante 3 horas hasta una temperatura de -35°C ,
5 mientras que se agita a una velocidad de 50 r.p.m. Mediante
estas operaciones se forman agregados cristalinos compactos
que tienen una gran relación volumen/superficie y que se
filtran fácilmente a partir del agua de cristalización. La
filtración se lleva a cabo en un embudo de filtro refrigera
do (-37°C , filtro de 11 cm. - Munktell No. 00) mediante
10 vacío generado por un inyector de chorro de agua.

La enorme ventaja que se obtiene procediendo de -
acuerdo con la presente invención, será inmediatamente obvia
en primer lugar se separa la grasa en una fase muy temprana
y por otra parte se efectua esta separación a una muy baja
15 temperatura que puede oscilar, por ejemplo, entre -30°C y
 -35°C . A tan baja temperatura los componentes nocivos de -
la grasa no producirán un efecto de descomposición sobre la
insulina, y, en el peor de los casos, se producirá un efec-
to de descomposición muy pequeño en comparación con el efec-
to de descomposición que tiene lugar durante la vacuodesti-
lación a una temperatura de aproximadamente 25°C (es de-
cir, existe una diferencia de temperatura de 55 a 60°C en-
tre el método conocido y el método que se describe en esta
20 invención). Es también de indudable importancia que utilizar
do el presente método se efectua la separación de grasa me-
diante refrigeración sin movimientos o con un pequeño movi-
miento del extracto, mientras que en la vacuodestilación la
ebullición causa un movimiento violento que acelera la des-
composición de la insulina.

30 Constituye una ventaja especial del método presen-

1 te el que sea posible, en una fase muy temprana del proceso
de preparación de la insulina, elegir entre los distintos -
procesos recientes de purificación de la insulina, tales co
mo, por ejemplo, la filtración gelatinizada y el intercam-
5 bio de iones, sin caer en el riesgo de que la grasa contami-
ne a los productos caros que hasta ahora se venían emplean-
do. Tales procedimientos de purificación no pueden utilizar-
se en una fase temprana de los procedimientos convencionales
de preparación de insulina, y, en el mejor de los casos, se
10 pueden utilizar en fase temprana con gran dificultad.

15 No se considera necesario hacer más extensa esta
descripción para que cualquier persona perita en la materia
comprenda perfectamente la idea que se desea patentar, así
como las ventajas que de su realización industrial han de -
derivarse.

20 Por todo ello, y para evitar posibles imitaciones,
se presenta esta solicitud, pidiendo la explotación exclusi-
va de la idea descrita, de acuerdo con las consideraciones
y puntos que se desean reivindicar, que se concretan en las
páginas siguientes:

25

30

1 Hecha la descripción a que se refiere la memoria
que antecede, es preciso insistir en que los detalles de
realización de la idea expuesta, pueden variar, es decir,
que pueden sufrir pequeñas alteraciones, basadas siempre
5 en los principios fundamentales de la idea, que son en esen-
cia los que quedan reflejados en los párrafos de la descrip-
ción hecha. En efecto, el Artículo 48 del Estatuto vigente
sobre Propiedad Industrial, establece como no patentables,
en su apartado tercero, "los cambios de forma, dimensiones,
10 proporciones y materias de un objeto ya patentado" fijando
así el criterio del legislador en el sentido de que paten-
tada una idea que pueda dar lugar a una realidad práctica
e industrializable, nadie podrá apoyarse en ella para, a
pretexto de haber introducido ligeras modificaciones, pre-
15 sentarla como nueva y propia.

Este principio, en cuanto al alcance de la protec-
ción del objeto patentado se refiere, se halla confirmado
por numerosas Sentencias del Tribunal Supremo, y entre -
ellas, como más terminantes, en las de fechas 16 de octubre
20 de 1954, 23 de enero de 1959, 20 de marzo de 1964 y otras.

Establecido el concepto expresado, en cuanto a la
amplitud que debe darse a la protección solicitada, se re-
dacta a continuación la Nota de Reivindicaciones, de acuer-
do con lo que se establece en el último párrafo del apar-
25 tado tercero del Artículo 100 de la Ley, sintetizando así
las novedades que se desean reivindicar:

NOTA DE REIVINDICACIONES

30 En resumen, el privilegio de explotación exclusi-
va que se solicita, recaerá sobre las reivindicaciones si-
guientes:

1 1a.- UN METODO PARA LA RECUPERACION DE INSULINA
a partir de una materia de insulina y grasa que contiene ex-
tracto de páncreas, caracterizado porque se enfría el ex-
tracto a una temperatura tal que la grasa se congela y se -
5 disgrega, tras lo cual se separa el extracto de la grasa -
bajo continua refrigeración.

2a.- UN METODO PARA LA RECUPERACION DE INSULINA
según la reivindicación 1, caracterizado porque se aplica a
un extracto alcohólico-acuoso en bruto que ha sido sometido
10 a una precipitación de proteínas a un PH de valor 8 y -
que posiblemente se ajusta, más tarde, a un PH aproximado -
de valor 3.

3a.- UN METODO PARA LA RECUPERACION DE INSULINA
según la reivindicación 2, caracterizado porque el extracto
15 se enfría a una temperatura que oscila entre -30° C y -35° C.

4a.- UN METODO PARA LA RECUPERACION DE INSULINA
según la reivindicación 1, caracterizado porque las condi-
ciones de refrigeración y cristalización con respecto al -
tiempo de enfriamiento, el valor del PH del extracto y la -
20 velocidad de agitación, se regulan con vistas a la obten-
ción de cristales de grasa compactos y uniformes que tienen
una relación volumen/superficie relativamente grande.

5a.- UN METODO PARA LA RECUPERACION DE INSULINA -
según la reivindicación 4, caracterizado porque el tiempo -
25 de enfriamiento hasta llegar a una temperatura final que -
oscila entre -30° C y -35° C es de al menos 2 a 3 horas.

6a.- Se reivindica por último como objeto sobre el
que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita:
30 UN METODO PARA LA RECUPERACION DE INSULINA.

1

Todo conforme queda descrito y reivindicado en la presente memoria descriptiva que consta de doce páginas mecanografiadas y dibujos adjuntos.

5

Madrid, 17 Julio 1.975

BERNARDO UNGRIA

P.P.



10

15

20

25

30