



19	ES	11	NUM. REG.	10	A3
		21	451316		
		22	FECHA DE PRESENTACION		
			7-9-1976		

PATENTE DE INTRODUCCION

47	FECHA DE PUBLICIDAD	51	CLASIFICACION INTERNACIONAL
			AGAK
54	TITULO DE LA INVENCIÓN		
	PROCEDIMIENTO PARA PURIFICAR INSULINA.		
58	PATENTE EXTRANJERA U OTRA FUENTE DE INFORMACION		
	ARMOUR AND COMPANY, firma de origen norteamericana.		
71	SOLICITANTE (S)		
	LABORATORIOS LEO, S.A.		
	DOMICILIO DEL SOLICITANTE		
	Avda. Pio XII - 99 MADRID		
72	INVENTOR (ES)		
73	TITULAR (ES)		
74	REPRESENTANTE		
	D. BERNARDO UNGRIA GOIBURU		

1 Esta invención se refiere a la purificación de in-
sulina. Más particularmente, esta invención se refiere a un
método para la precipitación selectiva de insulina a partir
5 de una solución acuosa que contiene insulina y proteínas no
insulínicas. El método de precipitación selectiva de esta
invención tiene su mayor utilidad cuando se incorpora a los
presentes procesos de purificación de insulina inmediatamen-
te después o en lugar de la precipitación isoeléctrica usual.

10 La mayoría de los procedimien-
tos comerciales para extraer y purificar la insulina siguen
un modelo bastante bien definido como el que se emplea para
las etapas generales. Se extrae la insulina de las glándulas
del páncreas con etanol acuoso acidificado, se concentra el
15 extracto de insulina y se elimina el alcohol por destila-
ción a presión reducida. Se extrae la insulina con cloruro
sódico. La torta de sal e insulina se vuelve a tratar a una
baja concentración de cloruro sódico. Por ejemplo, la insu-
lina puede ser primero extraída a una concentración de sal
de 30% y después a una concentración de sal de 15%. Poste-
riormente se purifica la insulina por una precipitación iso-
20 eléctrica a partir de una solución acuosa a un pH de aproxi-
madamente 5,2 (el punto isoeléctrico normal de la insulina).
Generalmente este precipitado isoeléctrico no es suficiente-
mente puro para venderse como insulina amorfa U.S.P. o ser
25 directamente cristalizado para producir insulina cristalina
U.S.P. De aquí que se necesiten posteriores pasos de purifi-
cación.

30 Una de las etapas de purificación que se ha utiliza-
do supone la precipitación de proteínas no insulínicas a par-
tir de acetona acuosa por elevación gradual del pH hasta

1 alrededor de pH 6. Este procedimiento no va bien en la prác-
tica debido a que el preciso PH requerido para el fracciona-
miento varía de carga a carga, mientras que el intervalo de
5 pH en el cual las proteínas no insulínicas pueden precipi-
tarse sin precipitar también la insulina es muy estrecho.
Esto da lugar a una indefinición considerable en el proceso
en este punto y aumenta mucho la dificultad de controlar el
proceso para asegurar tanto los rendimientos elevados como
una buena pureza.

10 Por lo tanto, es un objeto de esta invención pro-
porcionar un nuevo método para purificación de la insulina
después de la precipitación isoeléctrica, lo que resuelve
las dificultades del método anterior mencionado arriba. Es
además un objeto de esta invención proporcionar un proceso
15 por medio del cual pueda purificarse un precipitado isoélec-
trico de insulina en una sola etapa, lo suficientemente para
que pueda venderse como insulina amorfa U.S.P. o para utili-
zarse sin más purificación para preparar insulina cristali-
na U.S.P. Aún otro objeto es proporcionar un método que per-
mita la eliminación de la usual precipitación isoeléctrica
20 y otros pasos de purificación de manera que la torta de sal
e insulina pueda tratarse en una etapa, si se desea, para
producir insulina amorfa U.S.P. o proporcionar una insulina
amorfa que pueda ser cristalizada para producir insulina
25 cristalina U.S.P. Otros objetos y ventajas se verán en el
transcurso de la memoria.

30 Un método de practicar esta invención emplea torta
de insulina como un material de partida. La torta de sal e
insulina contiene preferiblemente insulina que tiene una pu-
reza comparable a la pureza de la insulina en la torta de

1 insulina ordinaria al 15%. Sin embargo no es necesario que
la torta de sal se obtenga por precipitación de la insulina
a la concentración de 15% exactamente de cloruro de sodio, ya
que resulta satisfactoria una torta de sal obtenida dentro
5 del intervalo de concentración de 10 a 20%. También se pue-
de preparar la torta de sal e insulina con otras sales que
no sean el cloruro sódico.

La torta de sal e insulina se disuelve en agua áci-
dulada y se somete a la usual precipitación a pH 5,2. El pre-
10 cipitado a 5,2 es una insulina amorfa sustancialmente libre
de sal que contiene cantidades sustanciales de proteínas no
insulínicas. Esta insulina amorfa parcialmente purificada
es además purificada según el método de esta invención di-
solviéndola en agua a un pH no superior a 4 (preferiblemente
15 por debajo de 3,7). El pH utilizado para disolver la insuli-
na puede ser tan bajo como 2,0 sin seria desventaja, aunque
el pH óptimo aparece alrededor de 3,5. Se pueden emplear di-
versos ácidos inorgánicos y orgánicos para acidular el agua
pero se prefiere el ácido acético por razones que a continua-
20 ción se van a ver. La concentración de insulina en la solu-
ción acuosa acidulada no es particularmente crítica y puede
variar desde 25 hasta 150 unidades de insulina por milíme-
tro.

Esta solución acuosa a un pH por debajo de 4, sus-
25 tancialmente libre de sal pero conteniendo cantidades sus-
tanciales de proteínas no insulínicas, se somete entonces
a un procedimiento de fraccionamiento, que consiste preferi-
blemente en dos etapas. El pH de la solución acuosa se eleva
gradualmente por adición de una base inorgánica, tal como
30 un hidróxido metálico alcalino, hasta que se alcanza un pH

1 de al menos 6,8. Preferiblemente el pH se eleva por encima
de 7,0. Cuando el pH de la solución atraviesa el punto iso-
eléctrico normal de la insulina, se formará un precipitado
pero este precipitado se redisolverá a un pH más alto. De he-
5 cho la redisolución de este precipitado es uno de los princi-
pales propósitos de ir a un pH neutro o alcalino. Se puede
tener una redisolución del precipitado completa y rápida por
ajuste del pH de la solución cuidadosamente hasta pH 7,5 y por
encima, aunque la redisolución es sustancial a aproximadamente
10 pH 6,8 y tiene lugar bastante rápidamente a un pH por encima
de 7,0. Es preferible acompañar el ajuste controlado de pH
con agitación para promover la redisolución del precipitado.
Se puede comprender que el límite superior para el ajuste de
pH alcalino antes mencionado es el pH al cual la actividad
15 insulínica se destruirá en las condiciones del proceso, es
decir, aproximadamente 10.

Como siguiente etapa en el procedimiento de frac-
cionamiento, se reduce el pH por adición de un ácido inorgá-
nico u orgánico hasta que el pH de la solución esté en el in-
20 tervalo de pH 5,9 a 5,3. Preferiblemente se ajusta el pH a un
intervalo de pH de 5,8 a 5,4. Esto hace que la insulina pre-
cipite en forma muy purificada, de manera que pueda separarse
fácilmente del sobrenadante por decantación, centrifugación
y filtración.

25 El procedimiento de fraccionamiento acabado de des-
cribir puede emplearse para precipitar selectivamente la in-
sulina desde cualquier solución acuosa de insulina y protei-
nas no insulínicas, que tienen un pH por debajo del pH isoélec-
trico normal de la insulina. Debe hacerse notar que el proce-
30 dimiento de fraccionamiento señalado no es el equivalente de

1 una precipitación isoeléctrica ordinaria.

Esto se presenta por el hecho de que una segunda precipitación isoeléctrica de un precipitado isoeléctrico de insulina no da por resultado una purificación significativa. Por otra parte, el empleo de un precipitado isoeléctrico, como el material de partida para aplicarle el procedimiento da como resultado un gran incremento en la pureza de la insulina.

Se alcanzan los mejores resultados cuando la solución acuosa de insulina se acidifica con ácido acético. Cuando se emplea ácido acético para este propósito es preferible utilizar hidróxido de amonio para llevar a cabo el ajuste controlado de pH. Este forma el acetato de amonio in situ. Se cree que la acción tampón del acetato de amonio es deseable para facilitar los ajustes de pH, y que la presencia de iones amonio favorece la precipitación de insulina. Sin embargo, es deseable que el acetato de amonio pueda añadirse y no necesite formarse en solución, o que puedan emplearse otros tampones. Se prefiere el ácido acético para el ajuste descendente de pH.

20 Como se ha indicado antes, el precipitado de insulina obtenido por el procedimiento de fraccionamiento de esta invención es mucho más puro que un precipitado isoeléctrico de insulina. Se han obtenido purezas hasta de 0,0060 mg N/unidad. Esto permite que el producto se venda como insulina amorfa, ya que la U.S.P. especifica un máximo de 0,0085 mg N/unidad. También la insulina amorfa puede utilizarse para preparar insulina cristalina de pureza excepcional. Se verá al observar que la especificación U.S.P. para insulina cristalina permite un máximo de 0,007 mg N/unidad. La insulina amorfa obtenida según esta invención tiene ya prácticamente

1 la pureza necesaria para la insulina cristalina y necesita
solamente ser cristalizada según el procedimiento usual con
zinc u otro metal pesado.

5 Si se desea, se puede omitir la precipitación iso-
elétrica usual así como otros pasos de purificación entre
la torta de sal e insulina y la insulina cristalina sustituyendo al procedimiento de fraccionamiento descrito antes. Sin embargo es preferible emplear el procedimiento de fraccionamiento de esta invención inmediatamente después de la precipitación isoelectrica usual. Cuando se omite la precipitación isoelectrica, se puede obtener un producto de pureza algo inferior, pero esto se compensa con la ganancia en tiempo y coste por eliminación de un paso extra.

15 La invención se describe además con los siguientes ejemplos específicos.

EJEMPLO I.

20 En su forma preferida, el siguiente procedimiento de fraccionamiento se emplea inmediatamente después de la usual precipitación isoelectrica de la insulina. El precipitado isoelectrico se disuelve empleando ácido acético en agua a una concentración de insulina de aproximadamente 50 unidades por mililitro, el pH se ajusta a 3,5. Se añade ahora hidróxido de amonio a un pH de aproximadamente 7,5 a 8,0. Se añade de nuevo ácido acético a pH 5,6. El precipitado de insulina, que es mucho más puro que la insulina isoelectrica, se separa del sobrenadante.

25 EJEMPLO II.

30 Se pica una carga de 2.265 kg (5.000 libras) de glándulas de páncreas de buey congeladas y se extraen con una solución acuosa acidulada a pH 3,0 con ácido fosfórico

1 y que contiene aproximadamente 65% de etanol. Se separa el
tejido extraído por filtración y se ajusta el pH del extrac-
to a 8,0 por adición de hidróxido amónico después de haber
5 sido de nuevo filtrada la solución. La solución se acidula
por adición de ácido sulfúrico a un pH de 3,5 después de que
el alcohol se separa por destilación para reducir el volumen
a aproximadamente 1000 galones. El material residual tiene
una composición que contiene aproximadamente una concentra-
ción de etanol de un 20%.

10 El concentrado al 20% de etanol se filtra y se vuel-
ve al reposo concentrándose posteriormente a un volumen de
aproximadamente 2520 lt (560 galones). Sustancialmente se se-
para todo el etanol del concentrado por este procedimiento.
A este concentrado se le añaden 630 libras de cloruro de so-
15 dio con lo que se separa de la mezcla por formación de una
torta de sal al 30%. La torta salina se disuelve en agua aci-
dulada a un pH de 2,0 con ácido clorhídrico y se añaden
56,25 kg (125 libras) de cloruro de sodio a la solución. La
torta de sal al 16% resultante se separa y redissuelve en 27
20 galones de agua acidulada (pH 2,0). Se efectúa una precipi-
tación isoeléctrica por elevación del pH a 5,2 por adición
de NaOH 6N.

25 El precipitado isoeléctrico de pH se separa y sus-
pende en 175 l (38 galones) de agua destilada y se ajusta el
pH con ácido acético a pH 3,5. Se eleva entonces el pH entre
7,5 y 8,0 empleando hidróxido de amonio. Se vuelve a justar
el pH a 5,6 por adición de ácido acético. El precipitado for-
mado en esta etapa se separa y trata según procedimientos
convencionales bien conocidos para dar un producto de insu-
30 lina cristalina.

1

EJEMPLO III.

5

El procedimiento de este experimento supone sustancialmente las mismas etapas descritas en el Ejemplo II hasta incluir la preparación y aislamiento de la torta salina al 16 %. Desde este punto, sin embargo, se modifica el procedimiento por emisión de la precipitación isoelectrica descrita aquí.

10

Se suspende la torta salina al 16 % en agua acidulada a un pH de 3,3 con ácido acético. Se hace la mezcla alcalina por adición de suficiente hidróxido de amonio para elevar el pH a aproximadamente 8,0 después de que se ha ajustado de nuevo a pH 5,6 por adición de ácido acético. Se separa el precipitado y se trata con arreglo a métodos bien conocidos para dar un producto de insulina cristalina.

15

Esta solicitud es una divisionaria de la solicitud copendiente nº de serie 345.698 solicitada el 30 de marzo de 1.953, ahora abandonada.

20

Mientras que en la memoria anterior se describe esta invención en cuanto a sus aspectos preferidos y se señalan detalles específicos de los mismos, resultará claro para los especialistas en esta técnica que muchos de los aspectos y detalles pueden variarse considerablemente sin separarse de la idea general de la invención.

25

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

REIVINDICACIONES

30

1.- Procedimiento para purificar insulina, en el que se obtiene un precipitado isoelectrico de insulina, caracterizado por las etapas de preparación de una solución

1 acuosa de dicho precipitado isoeléctrico de insulina con
un pH de 2 a 4 elevando el pH de dicha solución acuosa a
5 un pH por encima de 6,8 pero por debajo del pH destructor
de la insulina, en donde cualquier precipitado formado du-
rante el ajuste de pH se redisuelve, y rebajando entonces
el pH de dicha solución que contiene aún el precipitado de
insulina disuelto y las impurezas proteínicas no insulíni-
cas a un pH dentro del intervalo de 5,9 a 5,3 para precipi-
tar selectivamente la insulina.

10 2.- Procedimiento para purificar insulina en el
que se obtiene un precipitado isoeléctrico según la reivin-
dicación 1, caracterizado por las etapas de disolución de
dicho precipitado isoeléctrico de insulina en agua acidula-
da para producir una solución acuosa del mismo con un pH
15 de 2,0 a 3,7 ajuste del pH de la solución en forma crecien-
te hasta un pH de 7,0 a 8,0 mientras se agita la solución
para redissolver completamente cualquier precipitado forma-
do durante el ajuste de pH, y rebajar después el pH de di-
cha solución que aún contiene el precipitado de insulina
20 disuelta y las impurezas proteínicas no insulínicas a un
pH dentro del intervalo de 5,9 a 5,3 para precipitación se-
lectiva de la insulina.

25 3.- Procedimiento para purificar insulina, según
la reivindicación 2 en el que el pH de dicha solución que
contiene aún el precipitado de insulina disuelto y las impu-
rezas proteínicas no insulínicas se ajusta decrecientemente
a un pH que está en el intervalo de 5,8 a 5,4 para precipi-
tar selectivamente la insulina.

30 4.- Procedimiento para purificar insulina, en el
que se obtiene un precipitado isoeléctrico de insulina, se-

1 gún reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el
 método de posterior purificación de la insulina comprende
 las etapas de disolución de un precipitado isoeléctrico de
5 insulina en agua acidulada con ácido acético para producir
 una solución acuosa de la misma que contiene un pH de 2
 a 4, elevando el pH de dicha solución a un pH por encima de
 6,8 pero por debajo del pH al cual se destruye la insulina,
 por adición de hidróxido de amonio al mismo, y después re-
10 bajar el pH de dicha solución que contiene aún el precipi-
 tado de insulina disuelto y las impurezas proteínicas no in-
 sulínicas a un pH dentro del intervalo de 5,9 a 5,3 para
 precipitar selectivamente la insulina.

15 5.- Procedimiento para purificar insulina en el
 que se obtiene un precipitado isoeléctrico de insulina, se-
 gún la reivindicación 2, caracterizado por las etapas de
 disolución de un precipitado isoeléctrico de insulina en
 agua acidulada a un pH de 2,0 a 3,7 con ácido acético, ele-
20 vando el pH de dicha solución a un pH de 7,0 a 8,0 por adi-
 ción de hidróxido amonio al mismo, y después rebajamiento
 del pH de dicha solución que contiene el precipitado de in-
 sulina disuelto y las impurezas proteínicas no insulínicas
 a un pH dentro del intervalo de 5,8 a 5,4 para precipitar
 selectivamente la insulina.

25 6.- Procedimiento para purificar insulina, median-
 te precipitación selectiva de la insulina a partir de una
 solución acuosa de insulina y proteínas no insulínicas con
 un pH de 2 a 4, según las reivindicaciones 1, 2 y 3, carac-
 terizado por las etapas de elevación del pH de dicha solu-
 ción a un pH de 7,0 a 8,0 al que se disuelve cualquier pre-
30 cipitado que se forme durante el ajuste de pH, y después re-

PR
30

1 bajar el pH de dicha solución que contiene aún dicha insulina y proteínas no insulínicas a un pH dentro del intervalo de 5,8 a 5,4 para precipitar selectivamente la insulina.

5 7.- Procedimiento para purificar insulina, según la reivindicación 6, en que dicha primera solución mencionada se acidula a un pH de 2 a 4 con ácido acético y en el que dicho ajuste de pH se hace por adición de hidróxido amónico a dicha solución.

10 8.- Se reivindica por último como objeto sobre el que ha de recaer la Patente de Introducción que se solicita: PROCEDIMIENTO PARA PURIFICAR INSULINA.

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

15

Madrid, 7 septiembre 1.976

BERNARDO UNGHIA

p.p.



20

25

30

129