

MINISTERIO DE INDUSTRIA
REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL



ESPAÑA

ES	11	NUMERO	A 1
	21	455.065	
	22	FECHA DE PRESENTACION	
		31-1-77	

PATENTE DE INVENCION

30	PRIORIDADES:	32	FECHA	33	PAIS
31	NUMERO		17-1-76		Inglaterra
	1740/76 (Provisional)				
<i>A61K37/26//B01D13/00, B01J17/02</i>					

47	FECHA DE PUBLICIDAD	51	CLASIFICACION INTERNACIONAL	62	PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
			<i>A61K 37/26</i>		

54	TITULO DE LA INVENCION
PROCEDIMIENTO DE OBTENCION DE INSULINA.	

71	SOLICITANTE (S)
LABORATORIOS LEC, S.A.	

DOMICILIO DEL SOLICITANTE	
Avda. Pio XII, 99 - MADRID 16	

72	INVENTOR (ES)

73	TITULAR (ES)

74	REPRESENTANTE
DON BERNARDO UNGRIA GOLBURU	

OF.

1 Esta invención se refiere a insulina con muy poca o ninguna antigenicidad y a un procedimiento para su producción. Además, se refiere a preparaciones que contienen esta insulina.

5 En general, se supone ahora que la antigenicidad en los preparados de insulina es debida en su mayor parte a las impurezas que contiene. mientras que anteriormente se creía que los anticuerpos insulínicos eran producidos por la propia insulina. Estas impurezas pueden ser proteínas acompañantes del páncreas, distintas de la insulina, preinsulina que es un precursor de la insulina, insulina intermedia, el dímero, arginina-insulina, éster etílico de insulina, desamidoinulina desamidada en diversos grados y otras modificaciones de la insulina.

15 Hasta ahora se han realizado esfuerzos para producir preparados de insulina constituidos por insulina pura, la llamada insulina monocomponente, exenta de impurezas y de sustancias acompañantes de cualquier tipo.

20 Para ese fin, se ha propuesto someter la insulina amorfa o cristalina, preparada de forma convencional, a una extensa purificación, v.g. por filtración de gel y/o por tratamiento de cambio de ion.

25 La insulina altamente purificada resultante presenta una intensa disminución de antigenicidad, pero no una eliminación completa de la misma. No cabe duda de que esto es debido a que, a pesar de las etapas de purificación, los preparados purificados todavía contienen sustancias diferentes de la insulina.

30 La invención se basa en el reconocimiento de que algunas de las impurezas presentes en la insulina se forman du-

1 rante la recuperación propiamente dicha de la insulina, dan-
do lugar los procesos habitualmente utilizados, entre otros
efectos, a una descomposición de la insulina y a la forma-
ción de agregados. La insulina tal como se acumula en las
5 glándulas del páncreas, de la que se recupera la insulina,
es el monómero puro (con un peso molecular de 6000 aproxima-
damente) y es extraída como tal por extracción convencional
con una solución acuosa ácida al 60-80 % de alcohol. En la
posterior transformación convencional, que entre otras cosas
10 comprende una separación de la grasa por destilación a vacío
del extracto a 25-30°C, donde el alcohol es evaporado y se
obtiene un extracto acuoso con un contenido fuertemente re-
ducido de alcohol, el monómero es sin embargo sometido a con-
diciones que producen su descomposición, entre otras cosas
15 debido a la acción perjudicial de las enzimas que pueden des-
plegar su actividad en solución acuosa (soluciones con un
contenido en alcohol inferior al 50 %) mientras que no son
activas en solución alcohólica (más del 50 % de alcohol),
formación de agregados, etc.

20 De acuerdo con la invención, por lo tanto, se propone
efectuar la preparación de insulina de manera que la insuli-
na procedente de la extracción de las glándulas del páncreas
hasta la obtención del producto final sea solamente sometida
a condiciones de tal naturaleza que no cause la formación de
25 productos de descomposición, agregados, etc.

La insulina es muy fácilmente soluble en un extracto
alcohólico ácido de alrededor del 55 al 80 % en volumen de
alcohol y en este extracto, si la insulina se trata rápida-
mente, no se descompone ni forma agregados consigo misma o
30 con las impurezas del extracto alcohólico. En una realización

1 preferida del procedimiento de esta invención, la insulina
se extrae de las glándulas del páncreas con una solución acuosa
2 ácida de alcohol y la insulina se mantiene en estado puro
y disuelto durante la transformación posterior, sin cambio
5 de fase, hasta el aislamiento del producto final, por ejemplo
por precipitación y posible cristalización.

Naturalmente, puede hacerse uso de otros agentes de
extracción distintos del alcohol acuoso ácido, extrayentes en
10 los que la insulina es fácilmente soluble y en los que no
forma agregados consigo misma o con las impurezas del extracto,
v.g. acetona acuosa.

En el procedimiento de que se trata, no es cuestión
de una purificación de la insulina propiamente dicha sino de
15 una purificación del extracto de insulina obtenido que tiene
lugar para separar las impurezas disueltas, las grasas, proteínas
indeseables y derivados de la insulina hasta que queda sola
en el extracto la insulina pura (o en otra fase líquida).

20 El procedimiento puede llevarse a cabo, por ejemplo,
de la siguiente manera:

Se extraen unas glándulas de páncreas congeladas y picadas
con alcohol etílico (60-80 % en volumen), acidulado con
ácido clorhídrico hasta pH aproximadamente 3. Después de separar
25 la masa de páncreas, el pH del extracto se ajusta a 8 aproximadamente
con lo que ciertas proteínas diferentes de la insulina son precipitadas
y separadas. De nuevo se reduce el pH a 3 aproximadamente. En lugar
de utilizar esta llamada "precipitación a pH 8" para separar las
proteínas indeseables, se puede enviar el extracto ácido con un pH
30 de 3 aproximadamente

1 te a través de una planta de ultrafiltración/hiperfiltración
véase más adelante, utilizando una membrana apropiada que
retiene las citadas proteínas, es decir, enzimas.

5 El extracto transparente resultante se enfría en una
planta de congelación de grasas especial, a una temperatura
comprendida aproximadamente entre -30 y -45°C, preferiblemen-
te alrededor de -35° C., con lo que la grasa es cristaliza-
da en cristales compactos de grasa de pequeña superficie. Es
10 tos cristales se separan, v.g. por centrifugación, a la mis-
ma temperatura baja. A esta baja temperatura comprendida en-
tre -30 y -45°C y con el elevado contenido alcohólico constan-
te de 60-80 % en volumen, no tiene lugar ningún efecto perju-
dicial sobre la insulina como en el caso de la separación
convencional de la grasa por destilación a vacío a 25-30°C
15 con reducción del contenido en alcohol del extracto.

Otros detalles relativos a esta separación de la gra-
sa por congelación están descritos en la solicitud de paten-
te británica copendiente n° 32.048/74 (solicitud de patente
estadounidense número 596.478).

20 Después de esta suave separación de la grasa, se dis-
pone de un volumen relativamente grande de extracto exento
de grasa y este gran volumen tiene que ser reducido, también
de una forma que sea inofensiva para la insulina.

25 Puede utilizarse la técnica de filtración de gel y/o
el tratamiento de intercambio de ion pero, de acuerdo con es-
ta invención, se prefiere el siguiente método:

30 Se utiliza una planta de ultrafiltración/hiperfiltra-
ción que trabaja por el método de membrana, el denominado sis-
tema de ósmosis inversa (véase, por ejemplo, la patente esta-

1 dounidense n° 3.623.610).

Utilizando este método, mediante una elección apropiada de los tipos de membrana, se puede obtener, junto con una concentración del volumen de líquido, una separación de la insulina de las impurezas presentes en el extracto, teniendo 5 ambas sustancias una molécula mayor que la insulina así como las sustancias con una molécula menor.

Se consigue la separación no solamente de las sustancias indeseables de origen pancreático que están disueltas en el extracto sino también de otras cualesquiera posibles moléculas de origen no pancreático, con un tamaño diferente del de la insulina, que, procedentes del matadero, pueden haber sido 10 incluídas por error o inadvertencia en los suministros de páncreas y por lo tanto también se encuentran en el extracto.

15 La separación en ese momento de con mucho la mayor parte de estas moléculas, tanto de las mayores como de las menores que la molécula de insulina, por ultrafiltración e hiperfiltración es de importancia decisiva para la obtención de la insulina monocomponente, ya que estas impurezas son 20 aquí separadas en un momento en que se encuentran en solución y cuando no han tenido ninguna posibilidad de desempeñar un efecto perjudicial sobre la insulina disuelta, entre otras cosas debido a la baja temperatura reinante durante las precedentes etapas del proceso.

25 El extracto transparente exento de grasas se bombea a través del aparato de ultrafiltración, que está provisto de medios de refrigeración para el extracto, por ejemplo a una temperatura comprendida entre +10°C y -10°C, preferiblemente entre 0°C y -10°C, y a una presión de 2-20 atmósferas, 30 preferiblemente 6 atmósferas, siendo seleccionado el tipo de

1 membrana de manera que se separan las grandes moléculas in-
deseables hasta un tamaño tan próximo al tamaño de la molé-
cula de insulina como sea posible. Como membranas pueden
5 utilizarse, por ejemplo, GRX-6 o GRX-7 (membranas de polisul-
fona manufacturadas por De Danske Sukkerfabriker A/S). Las
grandes moléculas permanecen en el concentrado mientras que
la insulina y las impurezas de menor tamaño molecular que el
de la insulina forman parte del permeado. Este permeado se
10 pasa después a través del aparato de ultrafiltración donde
se selecciona el tipo de membrana de manera que la mayor par-
te de las moléculas indeseables menores que la molécula de
insulina sean separadas, hasta un tamaño tan próximo al ta-
maño de la molécula de insulina como sea posible. Como mem-
branas pueden utilizarse, por ejemplo, la GR8-P o la 930
15 (acetato de celulosa), ambas fabricadas por Danske Sukkerfa-
briker A/S. La insulina permanece en el concentrado. El ex-
tracto puede ser concentrado tanto como se desee, v.g. hasta
1/5-1/40 del volumen original. La relación de concentración
alcohol/agua continúa siendo la misma que en el extracto de
20 partida.

Las membranas utilizadas en la planta de ultrafiltra-
ción/hiperfiltración deben ser capaces de resistir a las solu-
ciones alcohólicas concentradas de por ejemplo el 62 % de
alcohol. Por ejemplo, puede utilizarse, además de las membra-
25 nas de polisulfonas y de las de acetato de celulosa antes men-
cionadas, membranas de otros polímeros como ciertas poliamidas.

En relación con la construcción de la planta de ultra-
filtración/hiperfiltración, podemos referirnos por ejemplo a
las siguientes memorias de patentes: patente estadounidense
30 n° 3.872.015, patente británica n° 1.390.671 y patente suiza

1 n° 542.639, donde se describen realizaciones de la planta
y/o de partes de la misma. La invención, naturalmente, no
está limitada al uso de plantas de ninguna construcción de-
finida.

5 El concentrado producido, que contiene prácticamente
la totalidad de la insulina del extracto crudo, es transpa-
rente pero más intensamente coloreado que el extracto crudo
debido a su concentración. Las sustancias colorantes se se-
10 paran por lavado, por ejemplo con alcohol al 62 %, sobre
membranas que retienen la insulina pero que permiten el pa-
so a su través de las sustancias colorantes. El volumen to-
tal de líquido de lavado pasa junto con dichas sustancias
al permeado, mientras que el volumen del concentrado perma-
nece inalterado.

15 Simultáneamente con el lavado de las sustancias colo-
rantes, las sales presentes en el extracto que tienen su
origen en la extracción del páncreas son también eliminadas
por lavado.

20 Las impurezas disueltas relativamente escasas, que to-
davía permanecen en el extracto insulínico, pueden ser sepa-
radas adecuadamente mediante cambiadores de ion, cambiadores
de cation así como cambiadores de anion. La separación tam-
bién puede ser efectuada mediante tamices moleculares, v.g.
25 Sephadex G-50 manufacturado por Pharmacia Fine Chemicals,
Uppsala, Suecia y otros métodos de separación adecuados co-
nocidos, pero se prefiere el uso de cambiadores de ion.

30 Los procesos de cambio de ion para la purificación de
la insulina por el método de cromatografía en columna así
como por el método discontinuo son conocidos, especialmente
el método de cromatografía en columna.

1 Sin embargo, hasta ahora se desconocía la aplicación
de estos métodos a un extracto insulínico crudo alcohólico
concentrado exento de grasas. Los extractos insulínicos
5 alcohólicos crudos convencionales, con toda la grasa disuel-
ta en ellos, contaminarían a los cambiadores de ion, espe-
cialmente a la columna cromatográfica, con las impurezas -
las sustancias colorantes y la grasa - hasta tal punto que
después de adsorber y eluir una o dos veces, los cambiadores
10 de ion estarían tan contaminados que sería extraordina-
riamente difícil purificarlos y regenerarlos para ser utiliza-
dos de nuevo en la separación de insulina.

Cuando se utilizan los procesos de cambio de ion o de
tamices moleculares, una condición es que el extracto en
tratamiento haya sido liberado de las grasas y parcialmente
15 también de las sustancias colorantes, de las proteínas inde-
seables así como de otras impurezas hasta tal punto que los
cambiadores de ion y las sustancias tamices moleculares pue-
dan ser regenerados y purificados de manera que sean totalmen-
te aplicables durante un periodo sustancial de tiempo ya que
20 su uso de otra forma sería económicamente prohibitivo.

Esta purificación suficiente y necesaria se obtiene
exactamente por el método antes descrito para la prepurifi-
cación del extracto insulínico alcohólico crudo que compren-
de la cristalización de la grasa a una temperatura tan baja
25 como unos -40°C y la separación por ultrafiltración a través
de un sistema de ósmosis inversa de parte de las sustancias
colorantes así como de una parte esencial de las moléculas
que son mayores y menores que la molécula de insulina, has-
ta próximas al tamaño de la molécula de insulina.

30 Pueden utilizarse la mayoría de los tipos existentes

1 de cambiadores de ion, incluidos los cambiadores de ion sobre una resina y una base celulósica así como los cambiadores de ion Sephadex SP y QAE ya conocidos, que son cambiadores de catión y cambiadores de anión, respectivamente, y están
5 modificados por cadenas de dextrano reticuladas con una red tridimensional de polisacárido, manufacturados por Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Suecia). Los cambiadores de ion SP-Sephadex C-25 (cambiador de cation) y QAE-Sephadex A-25 (cambiador de anion) son los preferidos.

10 Se puede elegir entre efectuar la cromatografía en columna o la separación discontinua sobre cambiadores de ion o posiblemente ambos métodos.

15 Se ha encontrado que el método discontinuo presenta enormes ventajas cuando se utiliza en las operaciones industriales de mayor magnitud como medio para un proceso de purificación fina e insertado entre la separación y la concentración por ósmosis inversa y una purificación cromatográfica utilizando una columna cambiadora de ion. La separación discontinua es una técnica muy rápida y el método no introduce ninguna dificultad técnica como consecuencia de hinchamientos o contracciones del cambiador de ion. La separación sobre un cambiador de ion puede llevarse a cabo combinando las impurezas y permitiendo que solamente la insulina permanezca en solución. Después de que el cambiador de ion
20 ha sido equilibrado en el tampón adecuado, elegido en el punto isoeléctrico de la insulina, pH 5,2, el extracto de insulina crudo prepurificado a pH 5,2 se pone en contacto con el cambiador de ion y la mezcla se agita por ejemplo durante 2 horas, después de lo cual se filtra la mezcla. Todas
25 las impurezas quedan unidas al cambiador de ion mientras que
30

1 la insulina pura se encuentra en estado disuelto en el filtrado alcohólico, ya que la insulina en su punto isoeléctrico no es combinada con el cambiador de ion.

5 .La ventaja de este procedimiento es que la insulina no tiene que ser eluída del cambiador de ion y que el extracto de insulina, inmediatamente después de la filtración, puede pasar a la siguiente etapa del proceso.

Los cambiadores de ion son regenerados por los métodos convencionales.

10 Inversamente, la insulina y las otras proteínas también pueden ser combinadas al cambiador de ion y posteriormente ser eluídas en fracciones volviendo a suspender la mezcla en un tampón de una mayor fuerza iónica o un valor diferente del pH. Mediante este último método, se obtiene
15 una pérdida de insulina menor que por el primer método, por cuya razón se prefiere el último método.

El método puede ser realizado, por ejemplo, esencialmente de la siguiente manera:

20 Se hinchan durante 48 horas 300 g de SP-Sephadex C-25 en 1000 ml de un tampón, ácido acético 0,1M (HAc) en etanol al 62 %, pH 3,0. El tampón se intercambia varias veces. El peso del SP-Sephadex hinchado es de 720 g.

25 Se ajustan a pH 3,0 1000 ml de extracto, concentrado diez veces de la ósmosis, con un contenido de 18.000 unidades internacionales de insulina y se agita en una vasija rotatoria (12 revoluciones por minuto) durante hora y media junto con la mitad del intercambiador de ion hinchado para su adsorción. Después de filtrar a vacío, se prosigue la adsorción del filtrado sobre la segunda mitad del cambiador
30 de ion (360g hinchados) también durante hora y media. El líquido

1 do que sobrenada presenta un contenido en insulina de 288
unidades internacionales, correspondientes a una pérdida
del 1,6 % durante la adsorción. Esta doble adsorción redu-
ce la pérdida a un tercio de la pérdida producida en una
5 sola adsorción.

Ahora se realiza un cambio de tampón: 1000 ml de áci-
do acético 0,1M en etanol al 62 %, pH 3,0, conteniendo
0,075 moles de NaCl. Las impurezas se eluyen agitando du-
rante 2 horas mientras que la insulina no es eluída.

10 Después de filtrar se cambia de tampón: 1000 ml de
tri(hidroximetil)aminometano (Tris) 0,1M en 62 % de etanol,
pH 8,0, con lo que la insulina es eluída del cambiador de
ion SP; el contenido en insulina es de 17.000 unidades in-
ternacionales, la pérdida durante el proceso de elución es
15 del 4 % y la pérdida total es del 5,6 %.

El cambiador de ion se lava dos veces para separar
la insulina residual ligada al cambiador.

En la electroforesis en gel de poliacrilamida (con
15 % de poliacrilamida) se encuentran cuatro bandas (parcial-
20 mente más débiles) por encima de la banda de insulina mien-
tras que no se encuentra ninguna banda por debajo de la ban-
da de insulina. Esto significa que la insulina parcialmente
purificada no ha sido desamidada durante el proceso de pro-
ducción. Está exenta de monodesamidoinsulina, lo que cons-
tituye una característica totalmente nueva en la producción
25 de insulina.

Después de eluir y lavar el cambiador de ion, se trata
con lenta agitación durante 2-3 horas con etanol al 62 % al
que se han agregado 0,2-0,3 moles de NaCl. Posteriormente se
30 regenera el cambiador de ion con un tampón equilibrador a

1 pH 3 y ahora está perfectamente limpio, blanco gredoso y pre-
parado para el siguiente lote.

5 El procedimiento discontinuo puede ser realizado ven-
tajosamente en un aparato de diseño especial, en forma de Y
y con un número ajustable de revoluciones por minuto. Con
ello se consigue un tratamiento muy efectivo y suave del cam-
biador de ion durante la adsorción y elución mientras que
al mismo tiempo se reduce al mínimo la pérdida tanto durante
10 la adsorción como durante la elución. Todo el proceso puede
tener lugar sin sacar el cambiador de ion del aparato, que
está provisto de un dispositivo de filtración y un tanque
a vacío para la filtración rápida del líquido del cambiador
de ion.

15 El procedimiento está constituido por los siguientes
procesos parciales:

- 1) Adsorción sobre el cambiador de ion, pH 3, de la insulina
y posiblemente de otras proteínas procedentes del extrac-
to insulínico crudo concentrado, en dos etapas con una
filtración a vacío intermedia.
- 20 2) Filtración a vacío y retirada del extracto exento de pro-
teína.
- 3) Lavado por dos veces del cambiador de ion con tampón en
etanol al 62 %, pH 3 y retirada por filtración de los lí-
quidos de lavado.
- 25 4) Elución de las impurezas con tampón a pH 3, fuerza iónica
0,075M de NaCl, 2 horas, 12 rpm;
- 5) Filtración del líquido eluyente con su contenido de impu-
rezas.
- 30 6) Lavado por dos veces del cambiador de ion con tampón en
etanol al 62 %, pH 3; filtración.

- 1 7) Elución de la insulina con tampón Tris 0,1M en etanol al 62 %, pH 8; la mezcla completa, líquido eluyente y cambiador de ion, ha de ser ajustada a pH 8 con Tris; el pH del cambiador de ion es 3.
- 5 8) Filtración del líquido eluyente que contiene la insulina.
- 9) Lavado por dos veces del cambiador de ion para separar la insulina residual unida al cambiador de ion.
- 10) Purificación y regeneración del cambiador de ion.

El ciclo total de producción 1-9 requiere 12 horas y la purificación y regeneración del cambiador de ion requiere 4 horas, totalizando así 16 horas.

El extracto eluido de la fase 7, después de ajustar el pH y la fuerza iónica, puede ser aplicado directamente a cambiadores de catión o de anión de acuerdo con los métodos en columna ya conocidos. Este procedimiento se lleva a cabo preferiblemente en columnas programadas que utilizan fraccionamiento automático, donde se retira la parte central de la curva de insulina que ahora contiene la insulina pura que presenta solamente una banda en electroforesis en poliacrilamida con un 15 % de poliacrilamida.

Del eluato concentrado que contiene la insulina procedente de la última columna puede ser recuperada la insulina de forma convencional, es decir, por dilución de la solución y subsiguiente precipitación, por ejemplo por adición de iones cinc.

De acuerdo con esta invención, sin embargo, se ha encontrado que no es necesario realizar una dilución del extracto hidroalcohólico altamente concentrado antes de la precipitación. El extracto puede ser precipitado directamente, por ejemplo con iones cinc, cuando la adición de los mismos se

1 efectúa en condiciones de enfriamiento, por ejemplo entre
-30° y -45°C.

5 Así, puede agregarse al filtrado una solución de acetato de cinc, dejando posteriormente la solución en reposo durante 24 horas en un recinto frío a -35°C. Con ello la insulina precipita cuantitativamente, por ejemplo de la solución alcohólica al 62 %. La insulina precipitada se separa por centrifugación, se lava, v.g. con acetona y se seca. Si se desea, puede ser posteriormente cristalizada.

10 Como se ha mencionado, la insulina producida por el procedimiento de esta invención es una insulina monocomponente pura que presenta solamente un único componente cuando se analiza por electroforesis en gel de poliacrilamida (DISC PAGE) mediante el uso de una concentración del 15 % de la poliacrilamida. (En relación con el principio general de este método, remitimos a Ann.N.Y. Acad. Sci., 121, págs. 321-349 y 407-427 (1964)).

15 Anteriormente no se había producido nunca insulina de la pureza aquí descrita.

20 En la memoria de las patentes británicas 1.285.023 y 1.285.024, se describe la producción de insulina de gran pureza. Se afirma que la insulina purificada en una electroforesis en gel de poliacrilamida presenta esencialmente un solo componente. Sin embargo, esta insulina todavía contiene una cantidad más pequeña de desamidoinsulina y en la electroforesis en gel de poliacrilamida, utilizando un gel con un
25 15 % de poliacrilamida, presentará dos bandas, es decir, además de la banda de monoinsulina, una banda de la desamidoinsulina.

30 Por otra parte, un contenido menor de desamidoinsulina

1 no será detectable en la electroforesis en gel de poliacril-
amida utilizando 7,5 % de poliacrilamida. A este contenido,
no se obtiene una separación completa de los componentes in-
dividuales sino, entre otras cosas, una integración de la
5 insulina y de la monodesamidoinsulina en una sola banda cuan-
do con poliacrilamida al 15 % aparecerían dos bandas.

La insulina producida por el procedimiento de esta
invención ha resultado ser extraordinariamente estable, con-
trariamente a las insulinas altamente purificadas, donde, por
10 ejemplo, durante el almacenamiento se producen frecuentemen-
te pequeñas cantidades adicionales de desamidoinsulina; se
desconoce la causa de que esto ocurra pero quizá pueda ser
que las insulinas producidas, a pesar de su extensiva puri-
ficación, todavía contienen trazas de sustancias que ejercen
15 un efecto de descomposición sobre la insulina.

La insulina producida por el procedimiento de esta
invención no presenta ningún tipo de descomposición, lo que
puede ser debido por lo tanto a una separación más completa
de todas las sustancias de un tamaño molecular diferente al
20 de la insulina.

A partir de la insulina pura antes descrita, pueden
obtenerse preparados de insulina por cualquier método cono-
cido, por ejemplo por disolución y/o suspensión de la insuli-
na, en forma amorfa y/o cristalina, en un medio acuoso adecua-
do para inyección, infusión o implantación.
25

Las etapas hasta ahora desconocidas del procedimiento
antes descrito, a saber, la separación de impurezas de un ex-
tracto conteniendo insulina exento de grasa mediante ósmosis
inversa y precipitación de insulina de una solución alcohóli-
ca altamente concentrada en condiciones de refrigeración,
30

1 pueden ser naturalmente utilizadas no solo en la combina-
ción descrita de etapas del proceso. El fundamento: separa-
ción de impurezas de un extracto conteniendo insulina exento
de grasa por ósmosis inversa puede ser utilizado en cual-
5 quier combinación y naturalmente no es necesario que el di-
solvente sea alcohol acuoso muy concentrado sino que puede
ser cualquier disolvente adecuado para la insulina. La pre-
cipitación en condiciones refrigeradas puede ser aplicada -
a cualquier extracto de insulina en un disolvente orgánico,
10 altamente concentrado, independientemente de la forma en -
que haya sido obtenido.

Por lo tanto, la invención reside no solamente en
la combinación de etapas del proceso aquí descrito sino -
también en las dos etapas citadas hasta ahora desconocidas,
15 consideradas independientemente.

En resúmen, la Patente de Invención que se solici-
ta deberá recaer sobre las siguientes:

REIVINDICACIONES

20 1ª.- PROCEDIMIENTO DE OBTENCION DE INSULINA, caracte-
rizado porque consiste en preparar un extracto conteniendo
insulina a partir de glándulas pancreaticas, cuyo extrac-
to se trata hasta la insulina pura, caracterizado porque -
el tratamiento se realiza de tal forma que la insulina se -
25 mantiene en estado disuelto durante todo el proceso, sin -
cambio de fase, hasta la recuperación final de la insulina,
siendo separadas las sustancias no deseadas, desde el prin-
cipio al fin del proceso, de los disolventes utilizados.

30 2ª.- PROCEDIMIENTO DE OBTENCION DE INSULINA, según
la reivindicación 1, caracterizado porque el extracto con-
teniendo insulina se somete a un tratamiento para la sepa-

1 ración de grasas que consiste en enfriar el extracto a una
temperatura inferior a -25°C seguido de la separación de
la grasa cristalizada.

5 3a.- PROCEDIMIENTO DE OBTENCION DE INSULINA, según
las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado porque el extrac-
to después de la separación de la grasa, se concentra, por
ósmosis inversa, la insulina se separa simultáneamente de
impurezas presentes en el extracto, tanto sustancias con
moléculas de mayor tamaño que la insulina, como moléculas
10 de menor tamaño que la insulina.

15 4a.- PROCEDIMIENTO DE OBTENCION DE INSULINA, según
la reivindicación 3, caracterizado porque el concentrado
conteniendo insulina de la ósmosis inversa se lava en una
planta de ósmosis inversa para la separación de sustancias
colorantes y sales de concentrado.

20 5a.- PROCEDIMIENTO DE OBTENCION DE INSULINA, según
la reivindicación 4, caracterizado porque el concentrado
purificado se someta a posterior purificación mediante in-
tercambio iónico en condiciones en las cuales la insulina
permanece en fase líquida.

25 6a.- PROCEDIMIENTO DE OBTENCION DE INSULINA, según
la reivindicación 5, caracterizado porque se realiza un pri-
mer tratamiento por intercambio de iones como procedimiento
por etapas.

30 7a.- PROCEDIMIENTO DE OBTENCION DE INSULINA, según
la reivindicación 6, caracterizado porque la fase líquida
conteniendo insulina del método por etapas de intercambio
de iones, se somete a una o más purificaciones adicionales
mediante columna de cromatografía por intercambio de iones
en condiciones en la cual la insulina permanece en fase

1 líquida.

5 8a.- PROCEDIMIENTO DE OBTENCION DE INSULINA, según las reivindicaciones 6 ó 7, caracterizado porque la insulina se recupera de la solución purificada concentrada por precipitación con iones metálicos, preferiblemente iones de zinc, bajo frío intenso, e.g. -30°C a -45°C.

10 9a.- PROCEDIMIENTO DE OBTENCION DE INSULINA, purificada a partir de un extracto de insulina de disolvente orgánico libre de grasa, caracterizado por la etapa que consiste en la separación del extracto de sustancias tanto con un número de moléculas mayor que la insulina como de un número de moléculas menor que la insulina mediante ósmosis inversa.

15 10a.- PROCEDIMIENTO DE OBTENCION DE INSULINA, en el que se obtiene la recuperación de insulina a partir de una solución altamente concentrada de la misma en un disolvente orgánico caracterizado porque se enfría la solución concentrada a una temperatura de alrededor de -30°C a -45°C y se precipita la insulina a partir del extracto enfriado por adición de iones metálicos, preferiblemente iones de zinc.

20 11a.- PROCEDIMIENTO DE OBTENCION DE INSULINA, caracterizado porque se obtiene una preparación de insulina que contiene mono insulina según la reivindicación 1a, en forma amorfa y/o cristalina, disuelta y/o suspendida en un medio isotónico acuoso adecuado para fines de inyección, infusión o implantación, la cual mono insulina es purificada en tal grado que presenta solamente un único componente al ser analizada por electroforesis del gel de poliacrilamida utilizando un gel que contiene 15% de poliacrilamida.

30

1

12ª.- Se reivindica por último como objeto sobre el que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita:
PROCEDIMIENTO DE OBTENCION DE INSULINA.

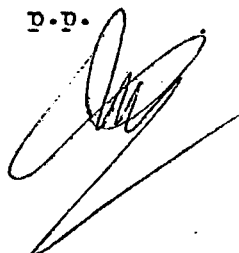
5

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

Madrid, 14 Enero 1.977

BERNARDO UNGRIA

D.P.



10

15

20

25

30