

P/S-824-1/74
EX-IN-III



Nº 428.283

P A T E N T E D E I N V E N C I O N

por VEINTE años

cuyo privilegio se solicita para España,
sus territorios y plazas de soberanía, a
favor de:

PUSHPA KHANNA, TEJ NARAIN NAG, SATISH
CHANDRA JAIN y SUCHENDRA MOHAN

de nacionalidad hindú, domiciliados en
74, C, Sarojini Marg, C/ Scheme, Jaipur,
India, relativa a:

"PROCEDIMIENTO PARA EL AISLAMIENTO DE IN
SULINA"

= = = = =



C076 / 1961A
MEMORIA DESCRIPTIVA

Hasta la fecha se viene extrayendo la insulina del páncreas de animales pero hasta ahora no se ha informado de su aislamiento de materias vegetales. - - - - -

5. El aislamiento de insulina del páncreas del animal está expuesto a objeciones por las razones siguientes:

i. Se ha de sacrificar 10.000 animales para conseguir tan sólo una libra de insulina pura (aproximadamente 454 gramos). - - - - -

10. ii. Si el páncreas está infectado por algunas enfermedades como el cáncer, etc., siempre hay una probabilidad de que, si es un virus, sea arrastrado con la insulina.

iii. Se puede conseguir cualquier cantidad de insulina cultivando plantas y así sale más barata. - - - - -

15. La finalidad de la presente invención es aislar insulina de materia vegetal para evitar los inconvenientes arriba citados. - - - - -

Se ha encontrado: - - - - -

i. Que la fruta de la Memordica charantia así co



mo los cultivos cuando se someten a extracción con etanol dan insulina; - - - - -

5. (ii. Se utilizaron los cultivos establecidos in vitro sobre medio MS modificado y las frutas para extraer la insulina); - - - - -

10. iii. Que los puntos de fusión de la insulina aislada, el punto de fusión mixto de la insulina aislada y de la muestra de insulina standard usada como blanco, los estudios cromatográficos en papel y en capa fina de los hidrolizados de las muestras aisladas y standard, los estudios especiales con rayos infrarrojos del compuesto aislado y la muestra standard confirmaron la presencia de insulina en Memordica charantia. - - - - -

15. Según la presente invención, se proporciona un procedimiento para el aislamiento de insulina por extracción de un material orgánico con una mezcla de tanol, agua y ácido sulfúrico, con ajuste del pH del extracto a 1,5 - 2,0, por ejemplo añadiendo amoníaco o ácido clorhídrico, precipitación de la insulina por adición de etanol y dietiléter, cristalización con trazas de zinc, purificación por "tlc" seguido de análisis, si se desea, caracterizado porque el material orgánico utilizado para la extracción consiste en cultivos preparados de semilla y también en la fruta de Memordica charantia Linn. - - - - -

25. Se utiliza preferentemente la fruta de M. charantia



recogida del campo en los meses de abril, mayo y junio. - -

Los cultivos se preparan en el medio de Murashige y Skoog (Murashige, T. y Skoog, F., *Physiol. Plantarum*. 1962, 15, 470) (RT) modificado (Khanna, P y Staba, E.J., *Lloydia*, 1968, 31, 180) suplementado con el ácido 2,4-diclorofenoxiacético y el 1% de agar, se transfieren a un medio líquido R.T., y se cosechan para la extracción de la insulina. - - - - -

Los cultivos están preparados en el medio de Murashige y Skoog (Murashige, T. y Skoog, F., *Physiol. Plantarum*. 1962, 15, 470) modificado (RT: Khanna, P. y Staba E.J., *Lloydia*, 1968, 31, 180) suplementado con 1 ppm de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y 1% de agar. Estos cultivos organizados se crían en frascos de 100 ml que contienen 30 ml del medio durante un período de 36 meses y luego se transfieren a un medio líquido suplementado con 0,1 ppm de 2,4-D sin agar, y se crían los cultivos líquidos en agitadores de vaivén horizontal con carreras de 60 rpm. Todos estos cultivos se cultivan a $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$ en luz incandescente de 1.500 - 1.800 lux. Después de criar los cultivos en medio RT líquido durante 4 - 6 meses con frecuentes tomas de subcultivos en medio RT fresco, se cosechan para la extracción de la insulina. La fruta y los cultivos se extraen por separado en etanol y luego se mezclan con etanol frío y dietiléter, se forman cristales con forma de aguja por adición de trazas de zinc después de 18 horas. Se trituran separadamente la fruta y los cultivos, se homogenizan en agua, etanol y ácido sulfú



- rico concentrado, se ajusta a pH 1,5 - 2,0, se filtra, se ajustan los líquidos filtrados a pH 3,0 con amoníaco, se mezclan con etanol frío y dietiléter, se mantienen a 0,5°C durante 12 horas, se recoge un precipitado floculento blanco, se añaden trazas de zinc, se dejan reposar durante 18 horas, y se forman cristales brutos blancos. Se disuelven los cristales brutos en etanol al 25% y se tamponan con hidróxido amónico y se aísla insulina en forma pura por medio de cromatografía en capa fina. - - - - -
- 5.
10. Se activan a 100°C placas delgadas de vidrio (20 x 20 cm) revestidas (0,4 mm a 0,5 mm de espesor) con gel de sílice G, se aplica la solución de insulina, se revelan las placas en n-butanol, agua y ácido acético (12:5:2), se secan, se visualiza la mancha única correspondiente a la insulina standard pulverizándola con ninhidrina (0,25% en acetona), se aísla junto con gel de sílice G de placas no pulverizadas, se extrae en etanol al 25% y se tampona con hidróxido amónico, se filtra, se seca el filtrado, y se forman cristales blancos puros con forma de aguja. - - - - -
- 15.
20. La fruta contiene un gramo de insulina por 100 gramos de peso en fresco, y los cultivos poseen 1,90 gramos de insulina por 100 gramos de peso en fresco. - - - - -
25. Se realiza el análisis hidrolizando la substancia aislada junto con la insulina standard, aplicadas sobre cromatogramas de papel, que se revelan, y rinden diecisiete aminoácidos en la insulina de plantas contra dieciseis ami-



noácidos en la insulina de animales. La metionina fue el aminoácido hallado de más en la insulina de plantas. - - -

5. Se hidrolizan separadamente la substancia aislada e insulina standard con 6N ClH durante 20 horas, se secan, se reconstituyen en etanol al 30%, se aplican sobre tiras de papel de filtrar Whatman No. 1, éstas se revelan en n-butanol, ácido acético y agua (60:20:20), las tiras reveladas se pulverizan con ninhidrina al 0,25% en acetona. - - - -

10. En el análisis se extraen la fruta y cultivos en etanol dando un producto que tiene el mismo punto de fusión (234°C) y espectro infrarrojo que la insulina standard, como se ilustra en los planos anexos, en los cuales las ordenadas representan Transmitancia (%) y las abscisas Longitud de onda (micras); la línea de trazos corresponde a la insulina standard y la línea continua corresponde a la insulina aislada. - - - - -

Ejemplo I

20. Se recolecta la fruta de M. charantia del campo durante los meses de abril, mayo y junio. Se tritura la fruta fresca en un mortero y se extrae para su contenido en insulina. Se homogenizan 100 gramos de fruta triturada en un mezclador Waring con 10 ml de agua destilada, 45 ml de etanol al 95% y 3,6 ml de ácido sulfúrico concentrado durante 10-15 minutos a baja velocidad y a 25-28°C. A esta mezcla se añaden 60 ml de agua destilada y 250 ml de etanol al 95% y luego se homogeniza durante 10-20 minutos a baja velocidad.



- Se ajusta el pH a 1,5-2,0 y se filtra la mezcla bajo vacío.
Se ajusta el pH del filtrado a 3,0 con hidróxido amónico (28%), se mezcla con 1,5 litros de etanol absoluto frío y 2 litros de dietiléter y se mantiene a 0,5° durante 12 horas.
5. Se obtiene un precipitado floculento blanco (ppt) después de decantar el líquido sobrenadante. Se lava el ppt crudo primero con 90 ml de acetona, entonces con 30 ml de éter anhidro, y se disuelve en etanol al 25% y se tampona con hidróxido amónico. Se añaden trazas de zinc a esta solución que
10. entonces se mantiene a temperatura ambiente durante 18 horas. Se forman cristales incoloros con forma de aguja junto con trazas de zinc y otras impurezas. Se disuelven los cristales brutos en etanol al 25% y se tamponan con hidróxido amónico para análisis por "tlc". - - - - -
15. Se activan a 100°C durante media hora placas delgadas de vidrio (20 x 20 cm) revestidas (0,4 mm a 0,5 mm de espesor) con gel de sílice G (Kieselgel G nach Stahl, E. Merck). Se aplica la solución que contiene la sustancia aislada con 1 cm por encima del borde de las placas junto con el blanco
20. (insulina) y se tratan las placas en una mezcla de disolvente orgánico de n-butanol, agua y ácido acético (12:5:2). Se secan las placas reveladas a temperatura ambiente y se pulverizan con ninhidrina al 0,25% en acetona. Se aíslan las manchas positivas de ninhidrina ($R_F = 0,19$) correspondientes a la insulina de aproximadamente 200 placas no pulverizadas junto
25. con el gel de sílice G y se extraen con etanol al 25% y se tamponan con hidróxido amónico. Se filtra el extracto y se seca bajo vacío. Se pesan los cristales incoloros puros así



1974

obtenidos (1 g/100 g de peso en fresco de la fruta). - - - -

Se determinan el punto de fusión del compuesto de purado (232-235°) así como el punto de fusión mixto (254°). Se registra el punto de fusión de la insulina standard en 233°. - - - - -

5.

Se hidrolizan la insulina standar así como el compuesto aislado con reflujo en 6N ClH durante 20 horas por separado. Se filtran los hidrolizados, se secan, se reconstituyen por separado en etanol al 50% y se aplican a tiras de papel Whatman Nº 1. Se tratan las tiras de papel en una mezcla de disolvente orgánico de n-butanol, agua y ácido acético (60:20:20). Se aplican también por separado los hidrolizados de tanto la insulina aislada como la insulina standard junto con los aminoácidos conocidos (hidroxilisina, hidroxiprolina, metionina y triptofano). Se pulverizan los distintos cromatogramas revelados con ninhidrina al 0,25% en acetona. Los aminoácidos del hidrolizado del blanco coinciden casi exactamente con los del hidrolizado del compuesto aislado. Hay presentes diecisiete aminoácidos en la insulina de plantas contra dieciseis aminoácidos en la insulina de animales. La metionina fue el aminoácido hallado de más en la insulina de plantas. Se constata la ausencia de la hidroxilisina, hidroxiprolina y triptofano en el hidrolizado del compuesto aislado así como en el hidrolizado del blanco que da una indicación de que el compuesto aislado es idéntico al compuesto de la insulina. - - - - -

10.

15.

20.

25.



El espectro IR (espectrofotómetro Perkin-Elmer 337 Grating, utilizando $C Cl_4$) del compuesto aislado es superimponible a aquél del blanco. - - - - -

5. La insulina aislada se disuelve (5 mg/ml en agua destilada estéril) en frascos de inyección estériles (2 ml) que se cierran. Se agita bien la suspensión así formada antes de que se administre a conejos. Se recoge sangre normal de los conejos (pesando cada uno 120-130 gramos) y se mantiene en ampollas de fluoruro para analizar la glicemia. Se inyecta por vía intramuscular la insulina aislada (1 ml) en los animales de experimentación y se muestrea la sangre (1 ml) después de cada hora durante 3 horas. - - - - -

15. Se estima que el descenso en el nivel de glicemia es del 20-25% en la primera hora y del 30-35% en cada una de las segunda y tercera horas en comparación con la glicemia normal de los animales de experimentación. Se examinan 50 casos y se sacan los valores medios. - - - - -

Ejemplo 2

20. Se corta una entalladura en las semillas de M. charantia con un bisturí en el extremo micropilar, se esterilizan con una solución al 5,25% de hipoclorito sódico en agua destilada estéril, se agitan durante 5-10 minutos y a continuación se aclaran tres veces con agua estéril. - - - - -

25. Se inoculan las semillas estériles en frascos de 100 ml que contienen 30 ml del medio de Murashige y Skoog


- 6 JUL 1974

- (Murashige, T. y Skoog, F. *Physiol. Plantarum* 1962, 15, 470) modificado (MT; Khanna, P. y Staba, E.J. *Lloydia*, 1968, 31, 180) suplementado con 1 ppm de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y 1% de agar. Se mantienen los frascos inoculados a $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$ en luz incandescente de 1500 - 1800 lux. Las semillas tardan de 4 a 5 días para germinar. Las plantitas, al ser trasladadas a un medio RT fresco, forman espesas raíces con una extensa formación de pelo de raíz. Estos cultivos organizados se mantienen durante un período de 36 meses después de frecuentes tomas de subcultivos en medio RT fresco y luego se transfieren al medio líquido RT suplementado con 0,1 ppm de 2,4-D sin agar. Se crían los cultivos líquidos sobre agitadores de vaivén horizontal con carreras de 60 rpm y se crían durante 6 meses después de frecuentes tomas de subcultivos de 4-6 semanas. Entonces se cosechan los cultivos organizados para extracción de la insulina. - - -
- 5.
- 10.
- 15.

- Se homogenizan 100 gramos de tejido triturado en una mezcladora Waring con 10 ml de agua destilada, 45 ml de etanol al 95% y 3,6 ml de ácido sulfúrico concentrado durante 10-15 minutos a baja velocidad y a $25-28^{\circ}\text{C}$. A esta mezcla se añaden 60 ml de agua destilada y 250 ml de etanol al 95% y entonces se homogenizan durante 15-20 minutos a baja velocidad. Se ajusta el pH a 1,5-2,0 y se filtra la mezcla en vacío. Se ajusta el pH del filtrado a 3,0 con hidróxido amónico (28%), se mezcla con 1,5 l de etanol absoluto frío y 2 l de dietiléter y se mantiene a $0,5^{\circ}$ durante 12 horas. Se obtiene un precipitado floculento blanco (ppt) después de decantar el líquido sobrenadante. Se lava primero el ppt crudo
- 20.
- 25.



con 90 ml de acetona, entonces con 30 ml de éter anhidro y se disuelve en etanol al 25% y se tampona con hidróxido amónico. Se añaden trazas de zinc a esta solución que se mantiene a temperatura ambiente durante 18 horas. Se forman cristales incoloros con forma de aguja junto con trazas de zinc y otras impurezas. Se disuelven los cristales brutos en etanol al 25% y se tampona con hidróxido amónico para análisis con tlc. - - - - -

Se activan a 100° durante media hora placas delgadas de vidrio (20 x 20 cm) revestidas (0,4 mm a 0,5 mm de espesor) con gel de sílice G (Kieselgel G nach Stahl; E. Merck). Se aplica la solución que contiene la substancia aislada 1 cm por encima del borde de las placas junto con el blanco (insulina) y se tratan las placas en una mezcla de disolvente orgánico de n-butanol, agua y ácido acético (12:5:2). Se secan las placas reveladas a temperatura ambiente y se pulverizan con ninhidrina al 0,25% en acetona. Se aíslan las manchas positivas de ninhidrina ($R_F = 0,19$) correspondiente a insulina de aproximadamente 200 placas no pulverizadas junto con el sílice de gel G y se extraen con etanol al 25% y se tamponan con hidróxido amónico. Se filtra el extracto y se seca bajo vacío. Los cristales incoloros puros así obtenidos se pesan (1,90 g/100 g de peso en fresco del tejido). - - - - -

Se determinan el punto de fusión del compuesto depurado (232-235°) así como el punto de fusión mixto (234°). Se registra el punto de fusión de la insulina standard en



233º. -----

Se hidrolizan por separado la insulina standard así como el compuesto aislado bajo reflujo con 6N ClH durante 20 horas. Se filtran los hidrolizados, se secan, se reconstituyen por separado en etanol al 50% y se aplican a tiras de papel Whatman Nº 1. Se tratan las tiras de papel en una mezcla de disolvente orgánico de n-butanol, agua y ácido acético (60:20:20). También se aplican por separado los hidrolizados de tanto la insulina aislada como la insulina standard junto con los aminoácidos conocidos (hidroxilisina, hidroxiprolina, metionina y triptofano). Se pulverizan los distintos cromatogramas revelados con ninhidrina al 0,25% en acetona. Los aminoácidos del hidrolizado del blanco coinciden casi exactamente con los del hidrolizado del compuesto aislado. Hay presentes diecisiete aminoácidos en la insulina de plantas contra dieciseis aminoácidos en la insulina de animales. La metionina fue el aminoácido hallado de más en la insulina de plantas. Se constata la ausencia de la hidroxilisina, hidroxiprolina y triptofano en el hidrolizado del compuesto aislado así como en el hidrolizado del blanco que da una indicación de que el compuesto aislado es idéntico con insulina. -----

El espectro IR (espectrofotómetro Perkin-Elmer 337 Grating, utilizando CCl₄) del compuesto aislado es superponible al espectro del blanco. -----

Las ventajas son las siguientes: -----



- 1. Se evitará el sacrificio de animales. - - - -
- 2. No habrá probabilidad de arrastre de ningún vi
rus con la insulina que pueda perjudicar a los seres huma-
nos. - - - - -
- 5. 3. Se puede conseguir cualquier cantidad de insu-
lina cultivando plantas o cultivos in vitro y así con econo-
mía. - - - - -
- 10. 4. No se formarán anticuerpos por administración
de insulina vegetal en seres humanos aún cuando se da en
elevadas dosis. - - - - -

N O T A

Se declaran de novedad y propiedad para España,
sus territorios y plazas de soberanía, las siguientes: - -

R E I V I N D I C A C I O N E S

- 15. 1.- Procedimiento para el aislamiento de insuli-
na, caracterizado porque -aislándose por extracción de un
material orgánico con una mezcla de etanol, agua y ácido
sulfúrico, con ajuste del pH del extracto a 1,5-2,0 por
ejemplo, por adición de amoníaco o ácido clorhídrico, preci-
pitación de la insulina por adición de etanol fría y dietil
- 20. éter, cristalización con trazas de zinc, purificación por
cromatografía en capa fina, seguida de análisis, si se desea-



1374

el material orgánico utilizado para la extracción consiste en cultivos a partir de semillas y también en la fruta de Memordica charantia Linn. - - - - -

5. 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque se utiliza preferentemente la fruta de M. charantia recogida del campo en los meses de abril, mayo y junio. - - - - -

10. 3.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque los cultivos criados en el medio de Murashige y Skoog modificado y suplementado con ácido 2,4-diclorofenoxiacético y 1% de agar se transfieren a un medio RT líquido, y se cosechan para extracción de insulina. - -

15. 4.- Procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado porque los cultivos se crían en medio (RT) de Murashige y Skoog modificado y suplementado con 1 ppm de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y 1% de agar, se crían estos cultivos organizados en frascos de 100 ml que contienen 30 ml de medio durante un período de 36 meses y entonces se transfieren a un medio RT líquido suplementado
20. con 0,1 ppm de 2,4-D sin agar, se cultivan los cultivos líquidos sobre agitadores de vaivén horizontal con carreras de 60 rpm, se crían todos los cultivos a $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$ en 1550 - 1800 lux obtenidos de una lámpara incandescente y, después de cultivar los cultivos en medio MT líquido durante 4-6 me
25. ses con frecuentes tomas de subcultivos en medio RT fresco, se cosechan para la extracción de insulina. - - - - -

Handwritten signature or initials, possibly 'Rg', located below the number 25.



5. 5.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque se extraen la fruta y los cultivos en etanol y luego se mezclan con etanol frío y dietiléter, formándose cristales agujiformes por adición de trazas de zinc. - - - - -

10. 6.- Procedimiento según las reivindicaciones 1 y 5, caracterizado porque la fruta y los cultivos se trituran y se homogenizan por separado en agua, etanol y ácido sulfúrico concentrado, se ajusta el pH a 1,5-2,0, se filtran, se ajusta el filtrado a pH 3,0 con amoníaco, se mezcla con etanol frío y dietiléter y se mantiene a 0,5°C durante 12 horas, se recoge un precipitado floculento blanco y se añaden trazas de zinc para formar cristales brutos blancos. - - -

15. 7.- Procedimiento según las reivindicaciones 1, 5 y 6, caracterizado porque los cristales brutos se disuelven en etanol al 25% y se tamponan con hidróxido amónico y se aísla insulina en forma pura por cromatografía en capa fina.

20. 8.- Procedimiento según las reivindicaciones 1 y 7, caracterizado porque se activan placas delgadas de vidrio (20 x 20 cm) revestidas (0,4 mm a 0,5 mm de espesor) con gel de sílice G, se aplica la solución de insulina, se revelan las placas en n-butanol, agua y ácido acético (12:5:2), se secan, se aísla la mancha única correspondiente a insulina standard junto con gel de sílice, se extrae en etanol al 25% y se tampona con hidróxido amónico, se filtra, se seca el filtrado y se forman cristales blancos puros con forma de

25. *Ry*



1974

aguja. - - - - -

5. 9.- Procedimiento según las reivindicaciones 1 y 8, caracterizado porque la fruta contiene 1 gramo de insulina por 100 gramos de peso en fresco, y los cultivos contienen 1,90 gramos de insulina por 100 gramos de peso en fresco. - - - - -

10. 10.- Procedimiento según la reivindicación 8, caracterizado porque se realiza el análisis y se hidroliza la substancia aislada junto con el standard, se aplica sobre cromatogramas de papel y se revelan, para rendir diecisiete aminoácidos en la insulina de plantas contra dieciseis aminoácidos en la insulina de animales, siendo la metionina el aminoácido hallado de más en la insulina de plantas. - - -

15. 11.- Procedimiento según la reivindicación 10, caracterizado porque se realiza el análisis, se hidrolizan separadamente la substancia aislada y la insulina standard en 6N ClH durante 20 horas, se secan, se reconstituyen en etanol al 50%, se aplican sobre tiras de papel de filtrar Whatman Nº 1, se revelan en n-butanol, agua y ácido acético

20. (60:20:20), se revelan las tiras, se secan, se pulverizan con ninhidrina al 0,25% en acetona, rindiendo diecisiete aminoácidos en la insulina de plantas contra dieciseis aminoácidos en la insulina de animales, siendo la metionina el aminoácido hallado de más en la insulina de plantas. - - -

25. *[Handwritten signature]*

12.- Procedimiento según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque se realiza el análisis y se



1974

extraen la fruta y los cultivos en etanol, para dar un producto que tiene el mismo punto de fusión (234°C) y espectro infrarrojo de la insulina standard. - - - - -

5. 13.- "PROCEDIMIENTO PARA EL AISLAMIENTO DE INSULINA". - - - - -

Todo ello conforme se describe y reivindica en la presente memoria que consta de diecisiete hojas, foliadas y mecanografiadas por una sola de sus caras, y de una lámina de dibujos que la ilustra.

BARCELONA, - 6 JUL, 1974

P. A. M. CURELL SUÑER

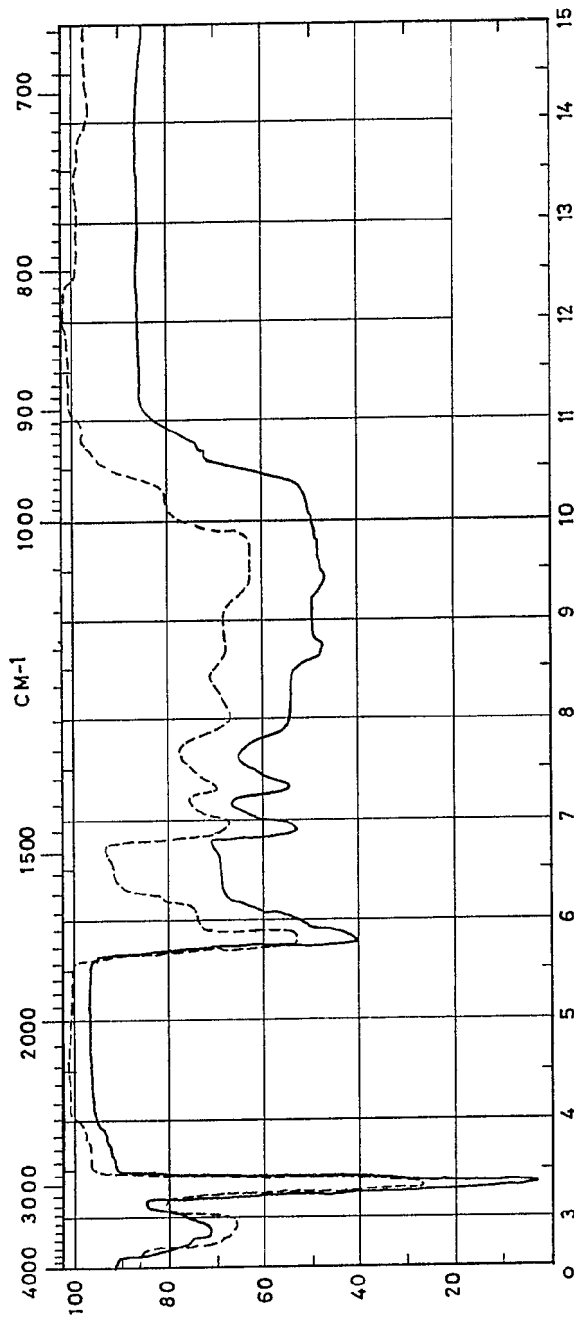
Alvrentuñ

Rg

maf.

PUSHPA KHANNA, TEJ NARAIN NAG,
SATISH CHANDRA JAIN Y
SUCHENDRA MOHAN

HOJA UNICA

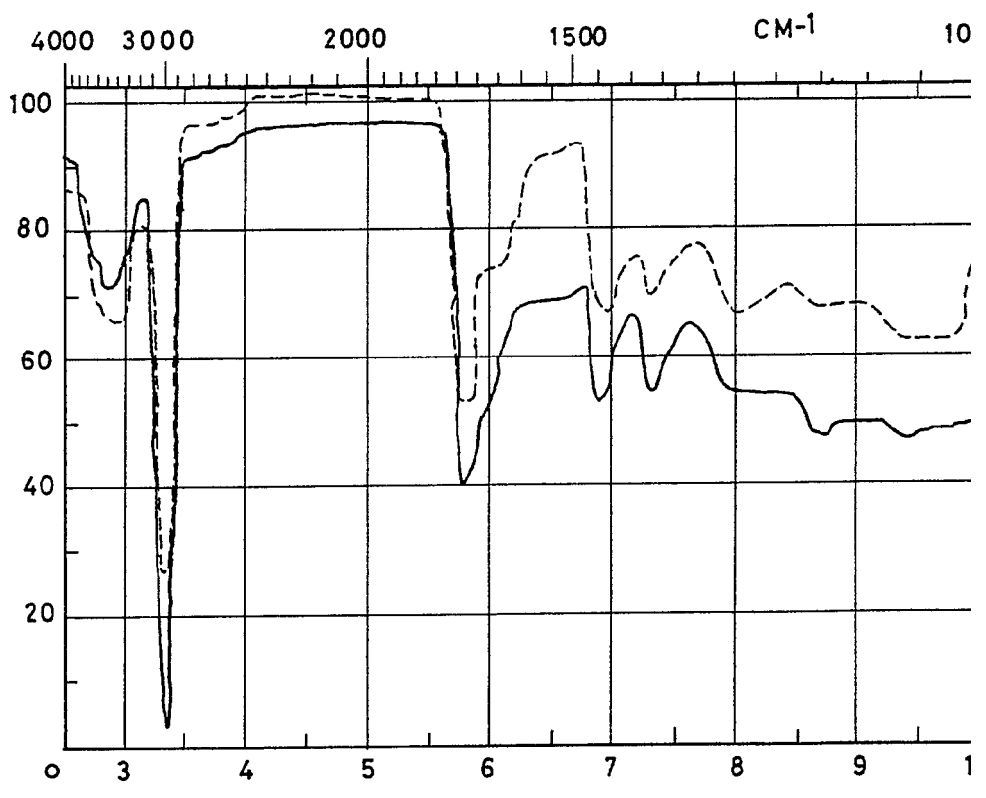


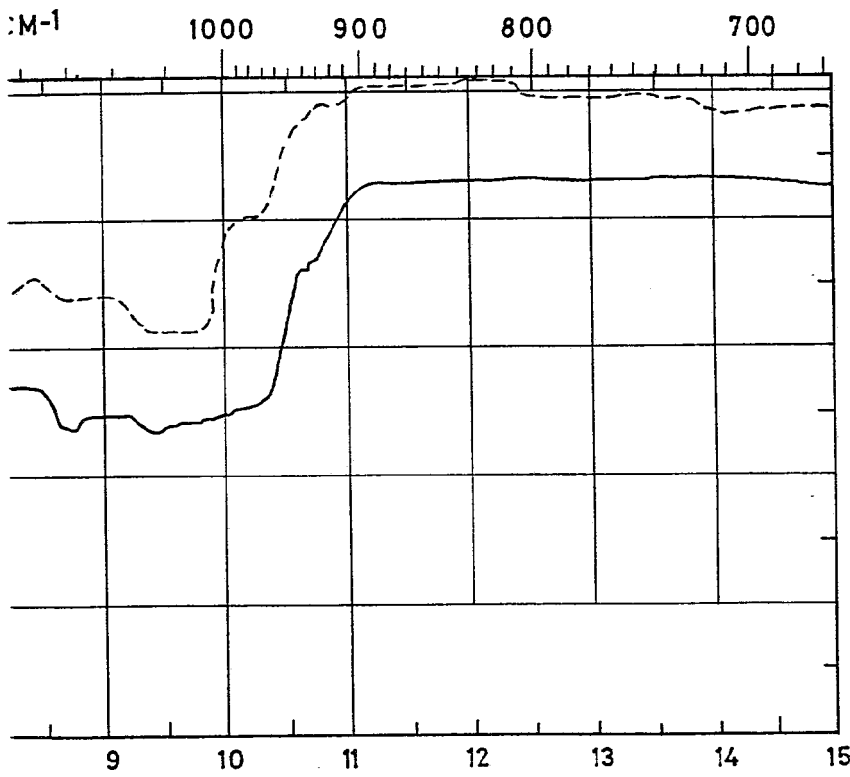
BARCELONA, - 6 JUL. 1974

P. A. M. CURELL SUÑOL

N. S. S. S.

PUSHPA KHANNA, TEJ NARAIN NAG,
SATISH CHANDRA JAIN Y
SUCHENDRA MOHAN





BARCELONA, - 6 JUL. 1974

P. A. M. CURELL SUÑOL