

386 162

11



NUMERO 386.162

SECCION TECNICA  
CLASIFICACION I. P. O.  
CLASE CO8  
SUBCLASE B

## MEMORIA DESCRIPTIVA

correspondiente a la solicitud de concesión de una

### PATENTE DE INVENCION

SOLICITANTE: PABST BREWING COMPANY.

RESIDENCIA: 917 West Juneau Avenue, MILWAUKEE,

Wisconsin, U.S.A.

ENUNCIADO: "UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION  
DE LOS POLINUCLEOTIDOS POLI C Y POLI I"

Prioridad: Patente

n.º

del

ES.

386162



1

Esta invención se refiere a la preparación y purificación de polinucleótidos y especialmente a la preparación de ácido poli-inosínico, denominado en adelante "Poli I", y ácido policitidílico, denominado en adelante "Poli C", por

5

polimerización enzimática de inosina 5'-difosfato para producir Poli I y citidina 5'-difosfato para producir Poli C y la purificación posterior de los productos resultantes.

10

En general, los nucleótidos contienen tres componentes en la molécula, a saber, un componente base, un componente azúcar y un componente fosfato, estando unidos separadamente el componente base y el componente fosfato al componente azúcar. La combinación del componente base y el componente azúcar es denominado habitualmente nucleosido. Cuando

15

también se encuentra presente el componente fosfato, el compuesto se denomina un nucleótido. Los nucleosido fosfatos pueden ser polimerizados por la acción de enzimas para producir compuestos de elevado peso molecular conocidos como polinucleótidos en los que los componentes azúcar están

20

conectados entre sí a través de un ligando  $-O-\overset{\text{H}}{\underset{\text{H}}{\text{P}}}-O-\overset{\text{H}}{\underset{\text{H}}{\text{C}}}-$ . En el caso de la inosina difosfato o citidina difosfato, el componente azúcar es un anillo de 5 miembros y la polimerización se produce en las posiciones 3' o 5'.

25

Es sabido que cuando se mezclan entre sí el Poli I y Poli C forman un dúplex de ácido poli-inosínico:policitidílico de doble cordón, denominado en adelante PI:C. También es sabido que cuando se inyecta PI:C en la corriente sanguínea de los animales hace que el organismo produzca una cantidad mayor de interferón que presenta un efecto antivírico, como se describe en Science, Volumen 162, págs. 811-813, 15 de Noviembre de 1968.

30

- 3 -  
386162



M.C. 1970

1            Como la polimerización enzimática de un nucleótido  
es probable que dé lugar a la formación de compuestos de  
peso molecular variable así como de subproductos, es muy  
conveniente efectuar la preparación y purificación de Poli  
5    I y Poli C de tal forma que se controle la composición del  
producto resultante dentro de límites bien definidos y se  
eliminen los subproductos que pueden ser tóxicos o indesea-  
bles por otras razones.

10           Uno de los objetos de la presente invención es pro-  
porcionar un procedimiento de preparación y purificación  
de polinucleótidos por polimerización enzimática de un  
nucleótido como inosina difosfato o citidina difosfato, con  
lo que la composición del producto puede ser controlada den-  
tro de límites bien definidos.

15           Un objeto más específico de la invención es proporcio-  
nar un nuevo y perfeccionado procedimiento para la prepara-  
ción de Poli I.

20           Otro objeto específico de la invención es proporcio-  
nar un nuevo y perfeccionado procedimiento para la prepara-  
ción de Poli C. Otros objetos se pondrán de manifiesto más  
adelante.

25           De acuerdo con la invención, se prepara un polinucleó-  
tido por polimerización enzimática de un nucleótido, v.g.  
inosina difosfato, para obtener Poli I, o citidina difosfa-  
to para obtener Poli C, sometiendo el nucleótido a la ac-  
ción enzimática con un enzima como polinucleótido fosfori-  
30    lasa de Micrococcus lysodeikticus en un medio acuoso regula-  
do a pH alcalino, preferiblemente alrededor de 9,0 y de pre-  
ferencia con tri-hidroximetilaminometano, conteniendo tam-  
bién dicho medio urea, un agente de quelatación, por ejem-

386162



1970

1 plo la sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético, y  
cloruro magnésico, efectuando la polimerización a tempera-  
turas ordinarias, por ejemplo 25°C, hasta que se obtiene  
la viscosidad máxima y después deteniendo la polimerización  
5 enzimática y purificando el producto resultante mediante  
una serie de etapas que consisten en mezclar la mezcla de  
reacción enzimática con un agente tensoactivo, un adsorben-  
te sólido finamente dividido y fenol líquido concentrado,  
dejar que la mezcla resultante sedimente, recuperar el lí-  
quido que sobrenada, separar del líquido que sobrenada cual-  
10 quier partícula sólida en suspensión, precipitar el polinu-  
cleótido por adición de una solución acuosa salina satura-  
da y alcohol etílico al líquido que sobrenada, preferible-  
mente a temperaturas bajas del orden de 3-5°C, recuperar el  
18 polinucleótido precipitado, disolver de nuevo el precipita-  
do en agua, dializar la solución acuosa del polinucleótido  
sucesivamente contra una solución de un agente de quelata-  
ción, por ejemplo ácido etilendiaminotetraacético, una so-  
lución salina y agua, filtrar a través de un filtro Milli-  
20 pore y papel de filtro (preferiblemente papel de 8 micras)  
y liofilizar hasta que se obtiene un producto sólido.

En este procedimiento, la adición del agente tensoac-  
tivo y del adsorbente separa los enzimas nucleasas, inte-  
rrompiendo con ello la acción enzimática posterior. Aunque  
25 pueden utilizarse cualquiera de los agentes tensoactivos co-  
nocidos, por ejemplo sulfatos de alcoholes, es preferible  
utilizar dodecilsulfato sódico. El adsorbente es preferible-  
mente bentonita aunque pueden utilizarse tierra de diato-  
meas y otros tipos de adsorbentes. El fenol líquido es pre-  
feriblemente una solución al 90 % de fenol en agua que está  
30



1 regulada al pH de la mezcla de reacción enzimática, preferiblemente utilizando el mismo regulador empleado en la realización de la reacción enzimática.

5 El fenol extrae las proteínas del producto de reacción y hace posible la obtención de una solución transparente. La extracción con fenol se repite preferiblemente dos o tres veces y después la totalidad de la fase acuosa que ha sido separada del fenol se centrifuga preferiblemente, recuperándose el líquido que sobrenada.

10 La precipitación con alcohol y solución salina del polinucleótido se efectúa preferiblemente empleando una solución saturada de cloruro potásico y un alcohol desnaturalizado conocido comúnmente por SDA, constituido por 95 % de etanol y 5 % de metanol. En lugar de cloruro potásico, pueden utilizarse otras sales que sean solubles en solución hidroalcohólica, por ejemplo cloruro sódico, acetato potásico o acetato sódico. El polinucleótido obtenido en la precipitación con alcohol-sal se redisuelve preferiblemente en agua y se precipita de nuevo una segunda vez con alcohol-sal. El precipitado final se disuelve después en agua y se dializa sucesivamente, de preferencia a temperatura baja del orden de 3-5°C, contra una solución de un agente de quelatación como ácido etilendiaminotetraacético capaz de eliminar el cloruro magnésico, una solución de una sal como acetato potásico capaz de eliminar el difosfato que no ha reaccionado y finalmente contra agua destilada, preferiblemente 5 o 6 veces, hasta que se obtiene un producto puro de composición constante.

25 Después es preferible filtrar la solución dializada antes de liofilizar. En la etapa de liofilización, la solu-  
30

386162



DEC. 1970

1 ción dializada filtrada se coloca en bandejas y se separa el agua por secado por congelación.

5 Las etapas de proceso utilizadas en la preparación de Poli I y Poli C son las mismas a excepción del nucleótido utilizado como material de partida y también con la excepción de que en la purificación del Poli I, después de la precipitación final con alcohol-sol e inmediatamente antes de la diálisis, el Poli I se disuelve en agua y se agrega una solución de acetato potásico a un pH de 7,6 aproximadamente, siendo la concentración de la solución de acetato potásico tal que da una solución final con una concentración que es la cuarta parte de la saturación con respecto al acetato potásico. De esta forma precipita Poli I quedando el difosfato que no ha reaccionado en solución. El Poli I se disuelve en agua de nuevo y se purifica otra vez dializándolo en la forma previamente descrita.

15 La invención será ilustrada mediante los siguientes ejemplos en los que las cantidades se dan en peso salvo indicación en contrario.

20 EJEMPLO 1

Preparación de Poli C

25 Se disuelven 260 g de citidina 5'-difosfato en agua destilada para formar un total de 4 litros de solución y el pH se ajusta a 9,0 con hidróxido potásico. Se añaden 2,6 litros de una solución acuosa 1 M de tri-hidroximetilaminometano. Además se agregan 1040 ml de una solución acuosa 8 M de urea, 1300 ml de una solución acuosa 0,02 M de la sal disódica de ácido etilendiaminotetraacético y 338 ml de una solución acuosa 0,2 M de cloruro magnésico. A esta mezcla se añade después el enzima polinucleótido fosforilasa de

30

386162



1970

1 Micrococcus lysodeikticus. Esta adición se realiza a partir  
de tres lotes diferentes de enzima constituidos por una so-  
lución acuosa de 300 ml con una actividad de 12,6 unidades  
5 por litro, 400 ml con una actividad de 28 unidades por li-  
tro y 150 ml con una actividad de 31 unidades por litro,  
siendo por lo tanto la actividad total de 17,68 unidades  
gramo. Se agrega agua adicional para llegar a un volumen to-  
tal de 26 litros y se inicia la reacción a la temperatura  
ambiente (25°C). Se toman muestras de la mezcla de reacción  
10 en un tubo a intervalos de media hora y se observa la vis-  
cosidad determinando el número de segundos necesarios para  
que la mezcla salga del tubo. La viscosidad máxima se obtie-  
ne al cabo de 4 horas y 45 minutos pero la reacción se pro-  
sigue durante media hora más, al final de la cual se obser-  
va que la viscosidad ha comenzado a disminuir.

15 En este momento se añaden 260 ml de una solución acuo-  
sa al 10 % de dodecilsulfato sódico a la mezcla de reacción,  
que después se agita durante 20 minutos. Después se agregan  
65 ml de una suspensión al 4 % de bentonita en agua y la mez-  
20 cla se agita durante 20 minutos. A continuación la mezcla  
se transfiere a un tanque de doble pared, forrado de vidrio,  
de 30 galones (113,6 litros).

25 En una vasija distinta, provista de una salida en su  
fondo, se mezclan 610 ml de una solución acuosa 2 M de tri-  
hidroximetilaminometano (pH 9,0) con 5000 ml de agua y 27 li-  
tros de fenol líquido constituido por 90 % de fenol y 10 %  
de agua. Esta mezcla se agita y después se agrega a la mez-  
cla de reacción enzimática. Después de agitar durante 1 ho-  
ra, la mezcla resultante se deja separar durante un periodo  
30 de 17 horas aproximadamente. A continuación se separa la ca

386 162



C. 1970

1 pa fenólica.

5 La solución residual se trata con 260 ml de una solución acuosa al 10 % de dodecilsulfato sódico, se agita durante 15 minutos y después se trata con 65 ml de una suspensión al 4 % de bentonita y se agita durante 15 minutos. A la mezcla resultante se agrega una solución regulada de fenol, preparada mezclando por separado 27 litros de fenol líquido conteniendo 90 % de fenol y 10 % de agua, 610 ml de una solución acuosa 2 M de tri-hidroximetilaminometano y 5000 ml de agua. Después de la adición de la solución de fenol, la mezcla se agita durante 1 hora y se deja que se separe. Se separa la solución de fenol; se repite la extracción y la mezcla se deja sedimentar durante la noche. Después de la sedimentación, se extrae la solución de fenol.

15 A la solución residual se añaden 130 ml de una solución acuosa al 10 % de dodecilsulfato sódico seguido de agitación durante 15 minutos y 35 ml de una suspensión al 4 % de bentonita en agua seguido de agitación durante 15 minutos. En una vasija distinta se mezclan 13,5 litros de fenol líquido, conteniendo 90 % de fenol y 10 % de agua, con 2500 ml de agua y 305 ml de una solución acuosa 2 M de tri-hidroximetilaminometano. Esta solución fenólica se agrega a la solución que contiene el Poli C y la mezcla resultante se agita durante 1 hora, después de lo cual se deja que se separe y se elimina la solución fenólica. Se repite este mismo proceso.

25 Después la totalidad de la fase acuosa conteniendo el Poli C se centrifuga y a continuación el líquido que sobrenada se introduce en un recinto frío a una temperatura de 4°C aproximadamente.

30



1           Entonces se añaden al líquido que sobrenada 3700 ml  
de agua saturada con cloruro potásico, seguido de 60 litros  
de una mezcla de 95 % de alcohol etílico y 5 % de alcohol  
metílico. La mezcla resultante se deja sedimentar durante  
5       la noche. El líquido que sobrenada se separa por sifonación  
y el precipitado se centrifuga, se recoge y se disuelve en  
18 litros de agua destilada.

          A la solución resultante se añaden 2810 ml de agua sa-  
turada con cloruro potásico y 40 litros de una mezcla de 95%  
10       de alcohol etílico y 5 % de alcohol metílico.

          Se recoge el precipitado resultante y se disuelve en  
18 litros de agua, dejándolo permanecer durante toda la no-  
che a una temperatura de 4°C. En este momento la solución  
tiene un pH de 7,2. Esta solución se introduce después en  
15       una pluralidad de tubos dializantes fabricados con celulosa  
regenerada, con un diámetro de 47 mm y una capacidad de al-  
rededor de 1 litro cada uno. Los tubos, conteniendo cada  
uno de ellos alrededor de 1 litro de solución, son dializados  
después contra 200 litros de una solución acuosa 0,01 M de  
20       ácido etilendiaminotetraacético, a un pH de 7,5, en un re-  
cinto frío a una temperatura de unos 4°C durante 24 horas,  
después son dializados contra la misma cantidad de una solu-  
ción acuosa 0,1 M de acetato potásico a un pH igual y en las  
mismas condiciones de temperatura durante otras 24 horas y  
25       a continuación son dializados sucesivamente durante periodos  
de 6-24 horas, en las mismas condiciones de temperatura, con-  
tra la misma cantidad de agua destilada.

          A continuación se sacan las soluciones de los tubos  
dializantes y se filtran por un filtro Millipore y papel de  
30       filtro de 8 micras y se lava hasta una solución final de

386162



1970

1 22 litros. A continuación se recupera el producto (Poli C) por liofilización, es decir, la solución se coloca en bandejas y el agua se elimina por secado por congelación.

5 El Poli C en forma de su sal potásica neutra tiene las siguientes propiedades:

Valores de la extinción relativos al contenido en fósforo:

$\Sigma_p$ , 260 m $\mu$ , pH 7  $5,0 \pm 1,0 \times 10^3$

Relaciones espectrales a pH 7:

10 250/260  $0,86 \pm 0,03$   
280/260  $0,80 \pm 0,03$

Contenido en fósforo:

Micromoles/mg Porcentaje de P  
 $2,7 \pm 0,5$   $8,4 \pm 1,5$

Coefficiente de sedimentación:

15 S<sub>20,w</sub>  
8-13

Impurezas de bajo peso molecular:

Ultracentrífuga no detectadas  
Cromatografía de papel no detectadas

20 Homogeneidad con respecto a la base Purina o Pirimidina:

Degradar con ribonucleasa no se detectan contaminantes.  
y examinar por electroforesis en papel

25 EJEMPLO 2

Preparación de Poli I

30 El procedimiento es el mismo que en el Ejemplo 1, a excepción de que se utiliza inosina 5'-difosfato en lugar de citidina 5'-difosfato y en el proceso de recuperación, después de la precipitación final con alcohol-sal e inmedia



1 tamente antes de dializar, el Poli I se disuelve en agua y  
 se añade una solución de acetato potásico a pH 7,6 aproxima-  
 5 damente, siendo la concentración de la solución de acetato  
 potásico tal que da una solución final cuya concentración  
 es la cuarta parte de la saturación con respecto al aceta-  
 to potásico. De esta forma precipita el Poli I que se disuel-  
 ve de nuevo en agua destilada y se purifica otra vez diali-  
 zando en la forma descrita en el Ejemplo 1.

El Poli I tiene las siguientes propiedades:

10 Valores de la extinción relativos al contenido en fósforo:

$\Sigma_p, 260 \text{ m}\mu, \text{pH } 7$   $6,0 \pm 1,0 \times 10^3$

Relaciones espectrales a pH 7:

250/260  $1,63 \pm 0,05$

280/260  $0,28 \pm 0,02$

15 Contenido en fósforo:

Micromoles/mg

Porcentaje de P

2,2  $\pm$  0,5

6,8  $\pm$  1,5 %

Coefficientes de sedimentación:

S<sub>20,w</sub>

20 10-15

Impurezas de bajo peso molecular:

Ultracentrífuga no detectadas

Cromatografía de papel no detectadas

Homogeneidad con respecto a la base Purina o Pirimidina:

25 Degradar con álcali y exa- no se detectan conta-  
 minar por electroforesis minantes  
 de papel

30 El Poli C preparado como en el Ejemplo 1 y el Poli I  
 preparado como en el Ejemplo 2 pueden ser mezclados a con-  
 centraciones equimoleculares en solución salina regulada



386162

1 con fosfato 0,01 M a pH 7,2, conteniendo  $5 \times 10^{-3}$  moles por litro de cloruro magnésico para formar P1:C y ser utilizados en la forma descrita en Science, Volumen 162, páginas 811-813.

5 La invención tiene la ventaja de que permite la preparación y purificación de polinucleótidos, por ejemplo Poli I y Poli C, de forma que se puede controlar la composición del producto resultante dentro de límites bien definidos y eliminar los subproductos que pueden ser tóxicos o indeseables por alguna otra razón.

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

REIVINDICACIONES

15 1. Un procedimiento para la preparación de los polinucleótidos Poli C y Poli I que consiste en someter atidina 5'-difosfato o inosina 5'-difosfato, respectivamente, disuelto en agua y regulado a un pH de 9 aproximadamente, a polimerización enzimática con polinucleótido fosforilasa procedente de Micrococcus lysodeikticus, conteniendo también dicha solución urea, sal disódica de ácido etilendiaminotetraacético y cloruro magnésico, realizando la polimerización enzimática hasta que se obtiene una viscosidad máxima y después recuperando el producto por las siguientes etapas:

- 25 (a) mezclar la mezcla de reacción enzimática acuosa con un agente tensoactivo y un absorbente sólido finamente dividido para detener la reacción enzimática y separar las nucleasas;
- 30 (b) extraer repetidas veces la solución residual con fenol líquido regulado al pH de la mezcla de reacción enzimá-

386162



1 ABR. 1973

1

tica para separar la proteína;

(c) precipitar el polinucleótido por adición de una solución salina acuosa y alcohol etílico al líquido obtenido en (b);

5

(d) recuperar el precipitado de (c) y disolverlo de nuevo en agua;

10

(d') cuando se utiliza inosina 5'-difosfato, mezclar la solución de la etapa (d) con una solución de acetato potásico en agua a un pH de 7,6 aproximadamente y a una concentración suficiente para dar una solución final cuya concentración es la cuarta parte de la saturación con respecto al acetato potásico, recogiendo el polinucleótido precipitado y disolviéndolo en agua otra vez antes de la siguiente etapa;

15

(e) dializar la solución acuosa de (d) contra una solución de un agente de quelatación capaz de separar los iones metálicos;

(f) dializar la solución de (e) contra una solución salina capaz de separar el nucleótido que no ha reaccionado;

20

(g) dializar repetidas veces la solución de (f) contra agua destilada y

(h) recuperar el polinucleótido resultante.

25

2. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que se repite la etapa (c).

3. Se reivindica por último como objeto sobre el que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita:

"UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE LOS POLINUCLEOTIDOS POLI C Y POLI I".

30

386<sup>14</sup>162



ABR. 1978

1  
Todo conforme queda descrito y reivindicado en la presente Memoria descriptiva, que consta de catorce páginas mecanografiadas.

5  
Madrid, 4 de diciembre de 1970.

BERNARDO UNGRIA

P.P.

10

15

20

25

30