

401832

401831



Int. Cl.: C07D

SECCION TECNICA
CLASIFICACION I. P. C.
CLASE _____
SUBCLASE _____

MEMORIA DESCRIPTIVA

correspondiente a la solicitud de concesión de una...

PATENTE DE INVENCION

SOLICITANTE: Sociedad REPHAMAC A.G., de nacionalidad
suiza.

RESIDENCIA: Brunnernstrasse, 15 -8867 NIEDERURNEN

SUIZA

ENUNCIADO: "PROCEDIMIENTO DE PREPARACION INDUSTRIAL
DE ACIDOS DESOXYRIBONUCLEICOS DE PESO MO
LECULAR ELEVADO".

INVENTOR: Karl Christen, que cede sus derechos a la
empresa solicitante.

Prioridad: Patente suiza n.° 005598/71 del 16 de abril 1971

401831



1 La presente memoria descriptiva tiene como fin la declara-
ción del objeto sobre el que ha de recaer el privilegio de explotación in-
dustrial y comercial exclusivo en el territorio nacional de una Patente
de Invención de acuerdo con la vigente Legislación sobre Propiedad Indus-
5 trial, que, como el enunciado indica, se trata de "PROCEDIMIENTO DE PREPA-
RACION INDUSTRIAL DE ACIDOS DESOXYRIBONUCLEICOS DE PESO MOLECULAR ELEVADO"

El presente invento tiene por objeto un procedimiento indus-
trial de preparación de ácidos desoxyribonucleicos denominados A D N alta-
mente polimerizados.

10 La materia prima utilizada industrialmente más corrientemente
es la lechaza de pescado de la que se conocía desde hace tiempo su elevado
contenido en ácido desoxyribonucleico.

En los espermatozoides, el A D N está combinado con proteínas
básicas, histonas o portaminas de las que es conveniente desembarazarse.
15 Es clásico proceder a la eliminación de los líquidos mediante disolventes
clásicos, tales como alcohol a 90° y acetona y proceder a la degradación
de las proteínas por la sosa caústica o el cloruro de sodio empleado en al-
ta concentración. Ciertos procedimientos industriales han utilizado además
la acción del calor para operar la separación de las proteínas pero se ha-
20 ce entonces difícil evitar los riesgos inherentes a la acción del calor du-
rante la separación de las dos cadenas de la molécula de A D N por ruptura
de las bases que forman los puentes entre ellas e incluso si se procede a
continuación a una refrigeración que tiene por fin provocar un reapareamien-
to (difícil de controlar) de las dos cadenas de la molécula.

25 Se sabe igualmente de una manera general que la presencia del
fenol favorece a la acción separadora de las proteínas con relación a los
ácidos nucleicos y que la obtención de A D N ha sido realizada en laborato-
rio tratando suspensiones nucleoproteídicas por un volumen igual de fenol
puro. Pero las condiciones de tratamiento en estos procedimientos de labo-
30 ratorio no permiten realizar una fabricación en condiciones suficientemente



1 económicas y prácticas para justificar una aplicación industrial.

Los trabajos que han conducido a la presente invención han permitido determinar ciertas condiciones en las que pueden obtenerse rendimientos industriales satisfactorios.

5 Las sustancias tratadas, desembarazadas de sus lípidos y previamente sometidas a la acción del cloruro de sodio, son, según el invento, tratadas por el procedimiento que presenta las características siguientes:

Se utiliza como agente de desproteneización para liberar A D N, fenol no más puro ni en mayor exceso que en ciertos procedimientos de laboratorio, sino solamente en cantidad suficiente para que la masa que contiene la materia nucleoprotéidica en suspensión esté saturada de fenol con un ligero exceso. Un pequeño exceso de fenol añadido voluntariamente al conjunto así saturado, facilita la desnaturalización y la precipitación lenta de la proteína liberada y el paso en solución del A D N.

15 La sustancia tratada es, previamente a la desproteneización por acción del fenol, tratada por una solución de cloruro de sodio 2 molar, preferentemente adicionada con una débil cantidad de fluoruro de sodio inhibidor de las nucleasas. Este tratamiento salino tiene por efecto liberar las moléculas nucleoprotéidicas y favorecer la acción ulterior del fenol.

20 Después del tratamiento fenólico, la solución viscosa de A D N que contiene en suspensión la proteína desnaturalizada, es adicionada con una materia tal como la bentonita, la celita, una tierra de infusorios o análogo para facilitar la separación por cualquier medio físico tal como sedimentación, filtración sobre filtro prensa, o centrifugación. Preferentemente se utiliza celita en presencia de bentonita, teniendo este último producto un efecto protector contra las nucleasas.

25 Durante el conjunto del procedimiento, la temperatura es preferentemente inferior a 25°, y en todo caso muy inferior a aquella susceptible de producir la degradación de la molécula (alrededor de 80°).

30



1
5
10
15
20
25
30

A título de ejemplo de fabricación se podrá proseguir como sigue:

EJEMPLO DE FABRICACION

100 kgs de lechaza de arenque congelados a -25° son picados groseramente y tratados por mitad de su volumen con alcohol a 95° . El alcohol elimina una fracción importante de lípidos variable por otra parte con la especie de pescado de la que proviene la lechaza.

El triturado obtenido es dejado en contacto con alcohol a temperatura ambiente durante 24 horas como mínimo, después de lo cual es escurrido y después enjugado sobre filtro-prensa (estando el disolvente enviado hacia la recuperación)

El residuo del enjugado, molido de nuevo más finamente, es puesto en contacto con tres veces su volumen de una solución de cloruro de sodio 2 molar adicionada de 0'045 molar de fluoruro de sodio. El líquido espeso y ya muy viscoso es agitado lentamente durante aproximadamente una hora. Esta agitación es repetida varias veces antes de la fase operatoria siguiente:

Después de 24 a 48 horas a temperatura ambiente, se dobla el volumen con agua destilada, saturada por un fenol recientemente destilado (75 gramos de fenol por litro de agua), a la que se ha añadido el fenol en cantidad suficiente para asegurar una saturación completa del conjunto constituido por la suspensión fenólica, es decir, un exceso de fenol de 25 gramos por litro.

El grado de saturación del agua en fenol, según la temperatura, está dado por las Tablas de Constantes.

La mezcla está entonces cuidadosamente homogeneizada por una agitación de quince minutos que está renovada varias veces en un plazo de 24 horas.

La solución viscosa de A D N teniendo en suspensión las proteínas desnaturalizadas, es a continuación adicionada con un poco de bento



1 nita y una cantidad más importante de celita, lo que tiene por efecto pro
vocar la sedimentación lenta de la fracción proteídica; fundamentalmente
se podrá emplear una mezcla de 1 por ciento de celita y 0'5 por ciento de
bentonita, en suspensión en el agua destilada medida en cantidad suficien
5 te para completar el volumen total de 1.000 litros.

Se deja la mezcla en reposo durante uno o varios días permiti
tiendo así a la proteína desnaturalizada separarse por sedimentación. Se
puede acelerar o completar el proceso por paso a un filtro prensa o centri
fugación.

10 El líquido que sobrenada o el filtrado claro o ligeramente
turbio es vertido en un volumen igual de alcohol a 95°. El A D N polimeri
zado precipita en largas fibras blancas. Estas fibras recogidas son a con
tinuación lavadas con soluciones alcohólicas de título creciente para eli
minar el cloruro de sodio arrastrado y el exceso de fenol. Se termina por
15 un lavado con alcohol a 95° y se seca sobre tamiz ventilado ayudándose
de una calefacción moderada o practicando un vacío parcial.

El rendimiento en A D N polimerizado es excelente; es del or
den de 5 por ciento de la masa tratada. El análisis ha dado los resultados
medios siguientes: 15 por ciento de humedad, 11'50 a 13 por ciento de ni
20 trógeno, 7'1 a 7'8 por ciento de fósforo y menos de 0'5 por ciento de pro
teína residual. La absorción específica ϵ/P en luz ultravioleta es del or
den de 6.400 a 6.800. La hipercromicidad variaba de 28 a 36 por ciento.
La masa molecular determinada por la difusión de la luz era siempre supe
rior a $2'5 \times 10^6$.

25 Descrita suficientemente la naturaleza del presente invento,
así como su realización industrial, sólo cabe añadir que en su conjunto y
partes constitutivas es posible introducir cambios de forma, materia y dis
posición, sin salirse del cuadro del invento, en cuanto tales alteraciones
no supongan variación sustancial del mismo.

30 El solicitante al amparo de los Convenios Internacionales



1 sobre Propiedad Industrial, se reserva el derecho de extender la presente
demanda a los países extranjeros, si fuera posible, reivindicando la misma
prioridad de la presente solicitud.

5 Igualmente, el solicitante se reserva el derecho de solicitar
los adecuados Certificados de Adición en la forma señalada por la Ley, al
introducir en el presente invento cuantos perfeccionamientos se deriven
del mismo.

NOTA

10 La Patente de Invención que se solicita por veinte años para
España, de acuerdo con la vigente Legislación sobre Propiedad Industrial,
deberá recaer sobre "PROCEDIMIENTO DE PREPARACION INDUSTRIAL DE ACIDOS
DESOXYRIBONUCLEICOS DE PESO MOLECULAR ELEVADO", en todo de acuerdo con
las siguientes

REIVINDICACIONES

15 1ª.- Procedimiento de preparación industrial de ácidos desoxy
ribonucleicos de peso molecular elevado, caracterizado porque, estando
realizado a partir de sustancias vivas tales como lechaza de pescado pre-
viamente desembarazadas de lípidos y sometidas a un tratamiento por sal al-
calina, se utiliza como agente de desproteneización para liberar el A D N,
20 el fenol en solución acuosa, siendo la cantidad de fenol suficiente para
que la masa que contiene la materia nucleoproteídica en suspensión esté sa-
turada de fenol más un ligero exceso.

25 2ª.- Procedimiento de preparación industrial de ácidos desoxy
ribonucleicos de peso molecular elevado, en todo de acuerdo con la ante-
rior reivindicación, caracterizado porque la solución acuosa del fenol con-
tiene alrededor de setenta y cinco gramos de fenol por litro de agua.

30 3ª.- Procedimiento de preparación industrial de ácidos desoxy
ribonucleicos de peso molecular elevado, en todo de acuerdo con las ante-
riores reivindicaciones, caracterizado porque la suspensión total de mate-
ria nucleoproteídica en la solución acuosa del fenol es adicionada con apr



1 ximadamente veinticinco gramos de fenol por litro.

4^a.- Procedimiento de preparación industrial de ácidos desoxyribonucleicos de peso molecular elevado, en todo de acuerdo con las anteriores reivindicaciones, caracterizado porque el tratamiento previo alcali
5 no está operado en medio de una solución de cloruro de sodio preferentemente adicionada con fluoruro de sodio.

5^a.- Procedimiento de preparación industrial de ácidos desoxyribonucleicos de peso molecular elevado, en todo de acuerdo con las anteriores reivindicaciones, caracterizado porque el tratamiento alcalino está
10 operado por medio de una solución de, aproximadamente, dos molar de cloruro de sodio y alrededor de cuarenta y cinco milésimas molar de fluoruro de sodio por litro.

6^a.- Procedimiento de preparación industrial de ácidos desoxyribonucleicos de peso molecular elevado, en todo de acuerdo con las anteriores reivindicaciones, caracterizado porque después del tratamiento fe-
15 nólico, la solución viscosa de A D N, que contiene en suspensión a la proteína desnaturalizada, es adicionada con un ayudante de separación por vía física tal como la bentonita, la celita o tierra de infusorios.

7^a.- Procedimiento de preparación industrial de ácidos desoxyribonucleicos de peso molecular elevado, en todo de acuerdo con las anteriores reivindicaciones, caracterizado porque el ayudante de separación es
20 celita adicionada con una menor cantidad de bentonita.

8^a.- Procedimiento de preparación industrial de ácidos desoxyribonucleicos de peso molecular elevado, en todo de acuerdo con las anteriores reivindicaciones, caracterizado porque el ayudante de separación
25 está constituido por aproximadamente uno por ciento de celita y cero coma cinco por ciento de bentonita.

9^a.- Procedimiento de preparación industrial de ácidos desoxyribonucleicos de peso molecular elevado, en todo de acuerdo con las anteriores reivindicaciones, caracterizado porque durante el conjunto del proce
30

Be

401831



-8-

1 dimiento, la temperatura es preferiblemente inferior a veinticinco grados
centígrados y en todo caso mantenida por debajo de ochenta grados centí-
grados.

5 10a.- "PROCEDIMIENTO DE PREPARACION INDUSTRIAL DE ACIDOS
DESOXYRIBONUCLEICOS DE PESO MOLECULAR ELEVADO".

Según queda sustancialmente descrito en la presente memoria
descriptiva que consta de de ocho hojas mecanografiadas por una sola cara

Madrid, a 17 ABR. 1972

El Agente Oficial

MIGUEL FERNANDEZ LOAYSA PINZON
P. P.

10

15

20

25

30