



16 MAR

Nº 369.219

SECCION TECNICA	
CLASIFICACION I. P. C.	
CLASE <u>C-12</u>	<u>A-61</u>
SUBCLASE <u>K</u>	<u>N</u>

MEMORIA DESCRIPTIVA

correspondiente a la solicitud de una

PATENTE DE INVENCION

Solicitante: MERCK & CO., INC.

Domicilio: 126 East Lincoln Avenue, RAHWAY, New Jersey, U.S.A.

Enunciado: UN PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE ACIDO RIBONUCLEICO DE DOBLE FILAMENTO.

Prioridad: de la solicitud de patente estadounidense nº 744.687 del 15.7.68.

MGS.-

POOR  
QUALITY



1  
5  
10  
15  
20  
25

Este invento se refiere a la producción de inductores de interferon y especialmente a un procedimiento para la producción de los inductores y recuperación de los mismos con un gran porcentaje de rendimiento y pureza.

Desde hace tres décadas se sabe que la infección por un virus puede limitar o excluir la infección con un segundo virus no relacionado con el primero. Esto se denomina un fenómeno de interferencia. Se despertó un gran interés por la interferencia en 1957 cuando Isaacs y Lindenmann demostraron que en la interferencia intervenía una proteína de pequeño peso molecular, llamada interferón, que era producida por las células infectadas con el virus y que protegía a las nuevas células no infectadas de la infección de los virus.

En aquel tiempo se esperaba que el interferón podría ser producido en células, purificado y utilizado para prevenir o tratar las enfermedades víricas. Esta sustancia despertó grandes esperanzas debido a su amplio espectro y a su actividad contra prácticamente la totalidad de los virus. La sustancia propiamente dicha es específica de las especies en lo que se refiere a su utilización, es decir, el interferón para uso humano debe haber sido preparado en células humanas. Aunque presentaba actividad hasta cierto punto en las pruebas experimentales,



1 el interferón nunca alcanzó importancia práctica debido  
a la falta de una fuente satisfactoria y debido a que  
el coste de la producción de este producto lo hacía pro-  
hibitivo.

5 La solución alternativa reside en estimular al  
organismo, especialmente el de los seres humanos, para  
preparar y distribuir su propio interferon empleando al-  
guna sustancia inductora segura y eficaz. Muchos tipos  
de sustancias, como bacterias, virus, polisacáridos, agen-  
tes mitógenos, endotosina y similares, estimulan la for-  
10 mación de interferon pero ninguna de ellas es prometedo-  
ra en el uso rutinario debido a toxicidad, antigenicidad,  
infectividad y similares.

15 Se han publicado los estudios realizados en un  
artículo titulado "Inducers of Interferon and Host Resis-  
tance, I. Double Stranded RNA from Extracts of Penici-  
llium Funiculosum", por G.P. Lampson et al.; en Procee-  
dings of the National Academy of Sciences, Vol. 58,  
nº 2, pág. 782-789 (Agosto 1967), dirigidos hacia el ha-  
llazgo del estímulo natural para la inducción de inter-  
feron mediante mohos, con la esperanza de que se podría  
encontrar un producto químico inductor adecuado y prac-  
ticable. Se descubrió en este trabajo que el ácido ribo-  
nucleico de filamento doble, pero no el de filamento sen-  
20 cillo, era muy activo en proporciones del orden del mi-

25



1 crogramo en la inducción del interferon y de la resis-  
tencia del huésped en los animales y en las células en  
cultivo. El doble filamento es un requisito necesario  
5 para la multiplicación de los virus del tipo de ácido  
ribonucleico. Este ácido nucleico no es normal para las  
células y fue descrito en el cuarto artículo de la se-  
rie, es decir IV. En las páginas 2102-2108 de la misma  
revista, Vol. 58, nº 5 (Noviembre 1967) A.K. Field et  
10 al., afirman en su artículo Double-stranded Replicative  
Form RNA (MS2-RF-RNA) from *E. coli* infected with MS2-  
coliphage, informan que el MS2-colifago, cuando se cul-  
tiva en células de *E. coli*, produce un RNA de doble fi-  
lamento que resulta ser un inductor excelente del inter-  
feron cuando se administra a los animales.

15 De acuerdo con el presente invento, se ha encon-  
trado que existen dos factores que contribuyen conjunta-  
mente a una producción excepcionalmente grande de un RNA  
de doble filamento obtenido a partir de *E. coli* infecta-  
do con MS2-colifago. Estos dos factores son: primero,  
20 la presencia de licor de infusión de maíz en el medio de  
cultivo en el que está creciendo el *E. coli* y segundo,  
la infección del *E. coli* en desarrollo con un mutante de  
MS2-colifago, MU-9.

25 El licor de infusión de maíz es un producto co-  
mercial y puede obtenerse en diversos orígenes. Las ca-



1 racterísticas generales del licor de infusión de maíz  
están definidas en la página 287 de la séptima edición  
del Índice de Merck. Será utilizado en la puesta en  
práctica de este invento como medio de cultivo para el  
5 desarrollo de E. coli en solución acuosa a concentracio-  
nes, en volumen/volumen, comprendidas entre 5 y 15 %, pero  
pueden utilizarse concentraciones de 2,5 a 20 %. Se observa  
una producción máxima de RNA de doble filamento con  
concentraciones comprendidas entre 8 y 9 % en  
10 volumen/volumen.

El mutante MU-9 de MS2-colifago ha sido descrito por los Drs. C. Weissman y S. Ochoa en un artículo titulado "Replication of Phage RNA", que apareció en "Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology", Vol. 6, págs. 353-399 (Marzo 1967). Se obtuvieron muestras de siembra a partir de los mismos en la Escuela de Medicina de la New York City University.

Como se ha indicado anteriormente, una característica de este invento es que se ha encontrado que se produce una gran cantidad de ácido ribonucleico de doble filamento (denominado en adelante DS-RNA) si las células de E. coli se cultivan en un medio de cultivo de licor de infusión de maíz y se infectan con el mutante MU-9 de MS2-colifago. Esto puede ser explicado por el hecho de que el licor de infusión de maíz permite un cre-



1           cimiento más rápido de las células de E. coli hasta una  
densidad de población mayor. La producción de virus y  
de DS-RNA de doble filamento requiere células que sean  
5           metabólicamente muy activas (en la fase logarítmica del  
crecimiento). Cuando las células se cultivan en un medio  
de triptona rutinariamente utilizado en la mayoría de  
los laboratorios y estas células se emplean para la pro-  
pagación de MS2, la producción del colifago y de DS-RNA  
por unidad de volumen de medio es máxima cuando los cul-  
10          tivos son infectados a una densidad de células de  $5 \times 10^8$ /  
ml. La productividad disminuye para mayores densida-  
des de células. La productividad por célula presente en  
el momento de la infección es óptima a densidades de las  
células inferiores a  $5 \times 10^8$ /ml, pero la menor concentra-  
15          ción de células da lugar a una neta reducción del produc-  
to.

          El uso de licor de infusión de maíz como medio de  
cultivo mantiene el crecimiento de las células de E. coli  
hasta densidades finales mucho mayores y permite la infec-  
20          ción productiva a concentraciones de células superiores  
a  $5 \times 10^8$ /ml. Se ha conseguido un aumento de ocho veces  
sobre la cantidad de DS-RNA producida en un medio de trip-  
tona mediante el uso de licor de infusión de maíz como  
medio de cultivo. Los datos que demuestran el crecimiento  
25          y la productividad de E. coli 3000 (HFR) cultivado en un



1969

1 medio de licor de infusión de maíz están reunidos en la  
Tabla I.

TABLA I

Crecimiento de E. coli 3000 en licor de infusión de maíz

Medio	Peso seco (g/litro)	Experimento				
		1	2	3	4	5
Licor de infusión de maíz	5,0% (v/v)	3,9	3,6	3,6	4,4	7,2
	7,5%	-	-	-	6,6	10,7
	10,0%	-	-	-	7,8	11,7
	15,0%	-	-	-	-	7,6
Medio de triptona		1,5	1,1	1,1	-	-
Inoculum:		0,1 g/litro de células en fase estacionaria			0, g/litro de células en fase logarítmica	

5  
10  
15  
La Tabla I indica que en solamente 10 horas después de la inoculación, un medio de licor de infusión de maíz produce aproximadamente un crecimiento dos veces mayor que el obtenido en un medio de triptona después de 24 horas.

20  
En otras palabras, el uso de licor de infusión de maíz produce un aumento de dos veces aproximadamente del crecimiento de células en la mitad del tiempo.

25  
En la Tabla II se compara la producción de DS-RNA en los dos medios; las células de E. coli 3000, cultivadas en medio de licor de infusión de maíz y en medio de trip-



1 tona son infectadas con el mutante MU-9. La tabla demues-  
 tra que la presencia de 8,5 % de licor de infusión de maíz  
 en el medio de cultivo da lugar a un aumento de 3 a 5 ve-  
 ces en el rendimiento de DS-RNA en comparación con el ren-  
 5 dimiento obtenido cuando se omite el licor de infusión de  
 maíz.

TABLA II

Producción de DS-RNA en medio de infusión de maíz

10 La concentración del licor de infusión de maíz se  
 expresa como porcentaje (peso/volumen); la concentración  
 de las células se calcula a partir de la densidad óptica.  
 I. Relación de volumen de medio a volumen del matraz = 0,2;  
 matraces sin tabiques.

<u>Medio</u>	<u>Experimento</u>	<u>Células/ml a la infección (nº/ml)</u>	<u>mg DS-RNA/ litro</u>
15 Triptóna	1	5,00 x 10 <sup>8</sup>	35
Infusión de	2	5,20 x 10 <sup>8</sup>	55
maíz 5 %	2	9,50 x 10 <sup>8</sup>	54
	2	2,25 x 10 <sup>9</sup>	75
	2	2,90 x 10 <sup>9</sup>	64

II. Relación de volumen de medio a volumen de matraces =  
 0,08; matraces con tabiques\*

20 Infusión de	1	7,30 x 10 <sup>8</sup>	43
maíz 5%	1	7,70 x 10 <sup>8</sup>	49
	1	1,10 x 10 <sup>9</sup>	74
	1	1,19 x 10 <sup>9</sup>	76
	1	2,00 x 10 <sup>9</sup>	102
	1	2,02 x 10 <sup>9</sup>	99
	2	2,08 x 10 <sup>9</sup>	106
	2	3,24 x 10 <sup>9</sup>	218
	3	3,60 x 10 <sup>9</sup>	154
25	1	3,96 x 10 <sup>9</sup>	176
	3	4,10 x 10 <sup>9</sup>	152



1

TABLA II (continuación)

	<u>Medio</u>	<u>Experimento</u>	<u>Células/ml de la infusión (nº/ml)</u>	<u>mg DS-RNA/litro</u>
5	Infusión de maíz 5 %	1	4,24 x 10 <sup>9</sup>	152
		1	7,40 x 10 <sup>9</sup>	63
		1	7,40 x 10 <sup>9</sup>	66
		4	8,08 x 10 <sup>9</sup>	93
		4	9,10 x 10 <sup>9</sup>	93
		3	9,76 x 10 <sup>9</sup>	193
		3	1,14 x 10 <sup>10</sup>	256
	Infusión de maíz 6 %	4	8,32 x 10 <sup>9</sup>	153
		4	9,30 x 10 <sup>9</sup>	105
	Infusión de maíz 7 %	4	8,00 x 10 <sup>9</sup>	219
		4	9,00 x 10 <sup>9</sup>	218
10	Infusión de maíz 7,5 %	3	3,00 x 10 <sup>9</sup>	63
		3	9,60 x 10 <sup>9</sup>	246
	Infusión de maíz 8 %	4	8,00 x 10 <sup>9</sup>	285
		4	9,00 x 10 <sup>9</sup>	235
15	Infusión de maíz 8,5 %	5	5,40 x 10 <sup>9</sup>	210
		5	6,00 x 10 <sup>9</sup>	220
		5	7,90 x 10 <sup>9</sup>	275
		5	8,20 x 10 <sup>9</sup>	287
		5	1,15 x 10 <sup>10</sup>	191
		5	1,15 x 10 <sup>10</sup>	226
		5	1,40 x 10 <sup>10</sup>	32
		5	1,50 x 10 <sup>10</sup>	22
	Infusión de maíz 9 %	4	7,12 x 10 <sup>9</sup>	277
		4	8,40 x 10 <sup>9</sup>	278
20	Infusión de maíz 10 %	3	3,68 x 10 <sup>9</sup>	28
		2	4,16 x 10 <sup>9</sup>	225
		2	5,60 x 10 <sup>9</sup>	222
		3	7,04 x 10 <sup>9</sup>	104
25	Infusión de maíz 15 %	2	4,04 x 10 <sup>9</sup>	16
		3	5,60 x 10 <sup>9</sup>	8
		3	6,56 x 10 <sup>9</sup>	149
		3	6,96 x 10 <sup>9</sup>	11
		3	9,10 x 10 <sup>9</sup>	21

\* Los tabiques en estos matraces son aletas verticales del tipo comercial.



1 Solamente pueden emplearse ciertas variedades de  
E. Coli como huésped para el crecimiento del mutante  
MU-9 y otras para la producción de DS-RNA. Por lo tanto,  
el invento consta de dos etapas: Acumulación de un núme-  
5 ro adecuado de MU-9 colifago por crecimiento en un medio  
permisible de E. coli (v.g. K-90) (conteniendo supresor,  
es decir, un medio que permite el desarrollo de la varie-  
dad completa de colifago), seguido de infección de una  
variedad restrictiva o no permisible (v.g. 3000). Estas  
10 últimas variedades no contienen supresor que modifiquen  
la maquinaria de síntesis de proteínas de forma que los  
tripletes codificadores sin sentido en el mutante RNA (aque-  
llos que no corresponden a un RNA de transferencia para  
un aminoácido) pueden ser mal traducidos y por lo tanto  
15 conducen a la inserción de un aminoácido en una cadena  
de polipéptido en crecimiento. La formación del colifago  
completo es evitada en estas variedades y con ello se  
acumulan elevados niveles de RNA de doble filamento. Es-  
tas variedades de E. coli pueden obtenerse en la American  
20 Type Culture Collection. Para llevar a cabo este proceso  
en dos etapas, el mutante MU-9 se añade primero al E. coli  
K-90 en el medio de cultivo de licor de infusión de maíz.  
El E. coli se incuba hasta que se produce su escisión,  
lo que requiere de 3 a 4 horas. El colifago desprendido  
25 de E. coli K-90 se utiliza después para infectar E. coli



1

3000 en un medio de cultivo nuevo de licor de infusión de maíz.

5

10

15

20

25

La propagación seriada no controlada de MU-9 en el huésped permisible (K-90) puede conducir a la acumulación de mutaciones inversas al tipo MS-2 original, probablemente debido a una mayor eficacia reproductora del tipo paternal. Las condiciones requeridas para la producción de lisatos MU-9 en el medio de infusión de maíz han sido determinadas y parece que consisten en una agitación y una aireación suficiente para permitir un tiempo de generación de 30 a 40 minutos (conseguido mediante el uso de un volumen de medio no superior a 1/10 del volumen del matraz), así como parece esencial el uso de un lisato MU-9 de E. coli K-90 que contenga menos de 0,08 % de MS2. La cantidad de lisato añadida debe introducir 20 virus por cada célula presente en el momento de la adición. Aumentando la concentración de la infusión de maíz de 5 % a 8,5 % también se puede contribuir considerablemente al mantenimiento de frecuencias de reversión bajas.

Para obtener un crecimiento rápido inmediato y continuado, el medio de infusión de maíz debe ser inoculado con cultivos que se encuentren en la fase logarítmica de crecimiento. Un inoculum en fase estacionaria se duplicará y después cesará la multiplicación durante 4 a 6 horas aproximadamente. El aumento final en crecimiento



969

1

de un inoculum en fase estacionaria, indicado por un aumento en la densidad óptima después de la inoculación, es normalmente de 25 a 30 % más bajo que cuando se utilizan células en fase logarítmica de crecimiento.

5

Los experimentos relativos a los efectos de la velocidad de aireación y de la multiplicidad de la infección (virus/célula) sobre la fracción de MS2 (revertante) en lisatos de infusión de maíz están resumidos en la Tabla III.

10

-----

15

20

25

-----



TABLA III

Exp. No.	Tipo de matraz de 250 ml.	Cantidad de medio (ml)	Tipo *	Células/ml a la infección (n <sub>0</sub> /ml)	Multipli- cación de la infección	% de MS2 en el lisato infectante	Virus producido Total	% MS-2
1	sin tabique	50	GS-5%	6,20 x 10 <sup>8</sup> 9,70 x 10 <sup>8</sup> 2,04 x 10 <sup>9</sup>	4 5 5	0,08	4,5 x 10 <sup>11</sup> 1,2 x 10 <sup>12</sup> 8,0 x 10 <sup>11</sup>	0,31 0,27 0,71
2	con tabique	50	GS-5%	1,34 x 10 <sup>9</sup>	11	0,05	7,8 x 10 <sup>11</sup> 8,4 x 10 <sup>11</sup> 8,9 x 10 <sup>11</sup>	0,83 0,42 0,80
3	con tabique	20	GS-5%	1,08 x 10 <sup>9</sup>	9	0,05	7,6 x 10 <sup>11</sup> 9,6 x 10 <sup>11</sup> 8,6 x 10 <sup>11</sup>	0,22 0,14 0,31
	con tabique	20	GS-8,5% GS-8,5% T	5,00 x 10 <sup>8</sup> 3,75 x 10 <sup>8</sup> 6,60 x 10 <sup>8</sup>	23 23 21	0,06	6,1 x 10 <sup>11</sup> 1,3 x 10 <sup>12</sup> 9,4 x 10 <sup>11</sup>	0,08 0,09 0,08

\* GS = licor de infusión de maíz (% = v/v); T = medio de triptona.

TABLA III

Exp. No.	Tipo de matraz de 250 ml.	Cantidad de medio (ml)	Tipo*	Células/ml a la infección (nº/ml)	Multipl. cidad d. infecci
5	1	50	CS-5%	6,20 x 10 <sup>8</sup>	4
				9,70 x 10 <sup>8</sup>	5
				2,04 x 10 <sup>9</sup>	5
10	2	50	CS-5%	1,34 x 10 <sup>9</sup>	11
				20	CS-5%
15	3	20	CS-8,5%	5,00 x 10 <sup>8</sup>	23
			CS-8,5%	3,75 x 10 <sup>9</sup>	23
			T	6,60 x 10 <sup>8</sup>	21

\* CS = licor de infusión de maiz (% = v/v); T = medio de triptona.

20

25

30



TABLA III

ad o	Tipo*	Células/ml a la infec ción (nº/ml)	Multipli- cidad de la infección	% de MS2 en el lisato infectante	Virus producido	
					Total	% MS-2
	CS-5%	6,20 x 10 <sup>8</sup>	4	0,08	4,5 x 10 <sup>11</sup>	0,31
		9,70 x 10 <sup>8</sup>	5		1,2 x 10 <sup>12</sup>	0,27
		2,04 x 10 <sup>9</sup>	5		8,0 x 10 <sup>11</sup>	0,71
	CS-5%	1,34 x 10 <sup>9</sup>	11	0,05	7,8 x 10 <sup>11</sup>	0,83
					8,4 x 10 <sup>11</sup>	0,42
					8,9 x 10 <sup>11</sup>	0,80
	CS-5%	1,08 x 10 <sup>9</sup>	9	0,05	7,6 x 10 <sup>11</sup>	0,22
					9,6 x 10 <sup>11</sup>	0,14
					8,6 x 10 <sup>11</sup>	0,31
	CS-8,5%	5,00 x 10 <sup>8</sup>	23	0,06	6,1 x 10 <sup>11</sup>	0,08
	CS-8,5%	3,75 x 10 <sup>9</sup>	23		1,3 x 10 <sup>12</sup>	0,09
	T	6,60 x 10 <sup>8</sup>	21		9,4 x 10 <sup>11</sup>	0,08

; (% = v/v); T = medio de triptona.



1

5

Los experimentos de la Tabla III demuestran que las condiciones del experimento 3, que implican una gran velocidad de aireación y una cantidad de mutante MU-9 relativamente mayor con respecto a las células de E. coli, producen un mayor rendimiento de virus y una reversión mínima a la forma paternal, MS-2.

Son ejemplos representativos del invento los siguientes:

10

15

20

25

Se prepara un medio de licor de infusión de maíz disolviendo 60 g de sosa en lentejas en 1 litro de agua, agregando 1 litro de licor de infusión de maíz nuevo bien mezclado (50 % de sólidos) y agitando durante 15 minutos. El pH debe ser ajustado a 7,0 en caso de que no tenga este valor. La mezcla se centrifuga en frío pero, también puede ser filtrada mediante un auxiliar de filtración con objeto de separar los sólidos. Esta solución de material al 50 % (volumen/volumen) se diluye con agua destilada para obtener la concentración final deseada y se lleva a ebullición o se trata en autoclave brevemente, se deja enfriar y se centrifuga (o filtra) con objeto de separar todos los sedimentos. Según el grado de dilución, el medio final contendrá entre 5 y 15 % (volumen/volumen) de licor de infusión de maíz o entre 2,5 y 7,5 % de sólidos de infusión de maíz, respectivamente.



1                   A 20 ml de esta mezcla, contenidos en un matraz  
con tabiques de 250 ml, se añade E. coli, variedad  
K-90, en la fase logarítmica en cantidad suficiente  
para que se encuentren presentes  $2 \times 10^8$  células/cc.  
5                   Se permite que se produzca la incubación a  $37^\circ\text{C}$  duran-  
te  $2\frac{1}{2}$  horas y durante este tiempo se sacude el matraz.  
Un ensayo indica que se ha producido el crecimiento  
hasta  $3,8 \times 10^9$  células/cc. Entonces se añaden 3,7 cc  
de un lisato MU-9 conteniendo un total de  $1,7 \times 10^{12}$   
10                   colifagos, de los cuales solamente 0,06 % son MS2, al  
E. coli y se permite que se produzca el crecimiento a  
 $37^\circ\text{C}$  durante 4 horas. Al cabo de este tiempo, se enfría  
el lisato. Este lisato contiene  $1,3 \times 10^{12}$  fagos to-  
tales/cc, de los cuales 0,09 % son MS2. Si se va a con-  
15                   servar un lisato durante periodos de tiempo prolongados,  
se añade cloroformo hasta una concentración final del  
1 % (volumen/volumen). Si se desea, las células pueden  
ser separadas del colifago por centrifugación. La pro-  
ducción de RNA de doble filamento es iniciada en un cul-  
20                   tivo de E. coli 3000 que ha sido desarrollado después de  
la inoculación con un cultivo en fase logarítmica a  
 $37^\circ\text{C}$  durante 3 horas en un medio de infusión de maíz.  
Durante este tiempo, el E. coli 3000 aumentará de  
 $4 \times 10^8$ /cc a  $8 \times 10^9$ /cc. Ahora se añade lisato MU-9 de  
25                   E. coli K-90 en cantidad suficiente para introducir más



1 de 6 bacteriofagos/célula. La incubación de estas cé-  
lulas de E. coli 3000 se deja transcurrir durante 3 ho-  
ras a 37°C después de la infección.

5 El DS-RNA se recupera por el procedimiento des-  
crito en el artículo IV antes mencionado. Se utiliza co-  
mo inductor de interferón en seres humanos, por ejemplo,  
pulverizándolo en la nariz durante la estación fría nor-  
mal. Se forma una preparación adecuada agregando el  
10 DS-RNA al agua para formar una preparación pulveriza-  
ble que se introduce en un recipiente de pulverización  
para aspiración. La concentración debe ser tal que una  
o dos pulverizaciones dispense de 1 a 100 mg, pero más  
probablemente de 5 a 10 mg, del DS-RNA purificado a las  
membranas nasales y orales. Esta pulverización debe  
15 realizarse una vez cada 2 ó 3 días.

De lo que antecede se deducen otros ejemplos  
del invento. Por ejemplo, puede añadirse otro material  
nutritivo comúnmente presente en el medio de cultivo  
al licor de infusión de maíz diluido en agua utilizado  
20 en este invento. La incubación después de la adición  
del colifago puede realizarse durante un periodo de  
tiempo tan corto como 1 hora aproximadamente, pero con  
ello se desperdiciaría el E. coli y la incubación puede  
prolongarse más de 3 horas, pero con una velocidad de  
25 producción decreciente de DS-RNA. También pueden agre-



1 garse menos de 6 colifagos/célula pero con una produc-  
ción menos eficiente de DS-RNA y si se emplean más de  
24 colifagos/célula, se desperdician inútilmente.

5 Otros ejemplos del invento implican la omisión  
del crecimiento preliminar del mutante MU-9 en una va-  
riedad permisible de E. coli; en este caso, la semilla  
de mutante MU-9 se añade inicialmente a la variedad no  
permisible de E. coli, pero pueden esperarse rendimien-  
10 tos relativamente menores de DS-RNA. Las variedades de  
E. coli específicas citadas en los ejemplos anteriores  
pueden ser sustituidas por otras variedades permisibles  
y no permisibles.

En resumen la Patente de Invención que se soli-  
cita deberá recaer sobre las siguientes:

15 -----  
-  
-  
-  
-  
-  
-  
-  
-  
-  
20 -----  
-  
-  
-  
-  
-  
-  
-  
-  
-  
25 -----



16 M

REIVINDICACIONES

1  
  
  
  
5  
  
  
10  
  
  
15  
  
  
20  
  
  
25

1. Un procedimiento para la producción de ácido ribonucleico de doble filamento que consiste en cultivar E. coli en un medio de cultivo de licor de infusión de maíz acuoso, diluido y después infectar el E. coli con un mutante de MS2 colifago, MU-9.

2. Un procedimiento según la Reivindicación 1, en el que se emplea un medio de cultivo de licor de infusión de maíz al 2,5-20 % en volumen/volumen.

3. Un procedimiento según la Reivindicación 1, en el que se emplea un medio de cultivo de licor de infusión de maíz al 5-15 % en volumen/volumen.

4. Un procedimiento según la Reivindicación 1, en el que el colifago se añade al E. coli en la fase logarítmica del crecimiento de este último.

5. Un procedimiento según la Reivindicación 1, en el que el colifago se agrega al E. coli cuando este último alcanza una densidad de población mayor de  $5 \times 10^8$  células/ml.

6. Un procedimiento según la Reivindicación 1, en el que el colifago ha sido cultivado previamente en una variedad permisible de E. coli

7. Un procedimiento según la Reivindicación 1, en el que se emplea una variedad no permisible de E. coli.

16



1

8. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que la infección transcurre durante unas 3 horas.

5

9. Se reivindica por último como objeto sobre el que ha de recaer la patente de invención que se solicita: UN PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE ACIDO RIBO NUCLEICO DE DOBLE FILAMENTO.

10

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

Madrid, 7 julio 1.969

BERNARDO UNGRIA

P.P.

15

20

25