



371839

CLASSIFICACION  
CLASE 612  
SUCCLASE d

MEMORIA DESCRIPTIVA

correspondiente a la solicitud de una

PATENTE DE INVENCION.

Solicitante: MERCK & CO. INC.

Residencia: 126 East Lincoln Avenue, RAHWAY, New  
Jersey, USA.

Enunciado: "UN METODO PARA AISLAR ACIDO RIBONUCLEICO".

Prioridad: de la solicitud de patente estadounidense  
No. 763.399 del 27 de Septiembre de 1968



1962

1 Este invento se refiere a la producción de  
inductores de interferon y especialmente a un proce-  
dimiento para el aislamiento y recuperación de áci-  
do ribonucleico de doble filamento por células de  
5 Escherichia coli (E. coli) infectadas con colifago  
MS2 u otros fagos afines al MS2 como el mutante  
MU-9.

El hecho de que el ácido ribonucleico de do-  
ble filamento pueda proceder de este origen ha sido  
10 establecido en un artículo titulado "Inducers of In-  
terferon and Host Resistance, IV, Double-stranded Re-  
plicative Form RNA (MS2-RF-RNA) from E. coli infected  
with MS2 coliphage", por A.K. Field, G.P. Lampson,  
A.A. Tytell, M.M. Nemes, y M.R. Hilleman, aparecido  
15 en Proceedings of the National Academy of Sciences  
(U.S.A.), vol. 58, nº 5, págs. 2102-2108 (Noviembre  
1967). En este artículo se indica que cuando se cultiva  
el colifago MS2 en células de E. coli se produce RNA  
de doble filamento durante su ciclo de reproducción.  
20 Este RNA de doble filamento después de aislado y puri-  
ficado resulta ser un inductor excelente de interferon  
cuando se administra a los animales.

El artículo citado describe la forma de cultivar  
E. coli, su infección con colifago MS2, la lisis de las  
25 células, las extracciones repetidas con fenol para sepa-



1 rar la proteína, el tratamiento con ribonucleasa  
pancreática para digerir el ácido ribonucleico de un  
solo filamento, el tratamiento con desoxiribonucleasa  
para degradar el ácido desoxiribonucleico celular, el  
5 tratamiento posterior con bentonita (v.g. Macaloid) o  
un inhibidor similar de la ribonucleasa y el uso de  
un sistema de filtración de geles (v.g. Sephadex G200)  
para recuperar el ácido ribonucleico de doble filamen-  
to en forma purificada. Tal como se describe allí, la  
10 nueva purificación se consigue por cromatografía del  
material de elevado peso molecular (eluido en la frac-  
ción de volumen vacío de la filtración de gel) sobre  
una columna de celulosa que previamente ha sido trata-  
da con dietanol y epiclorhidrina (v.g. celulosa Ecteola).  
15 La celulosa contribuye a la separación parcial de los  
polisacáridos contaminantes y permite también la recu-  
peración del ácido ribonucleico de doble filamento (de-  
nominado en adelante DS-RNA) en un estado más concentra-  
do. El proceso previo de purificación o aislamiento se  
20 encuentra descrito también en las siguientes referen-  
cias adicionales: C. Weissman, P. Borst, R.H. Bardon,  
M.A. Billeter y S. Ochoa, Proc. Nucleic Acid Research,  
51, 682 (1964); M.A. Billeter, C. Weissman, y R.C. War-  
ner, J. Mole. Biol. 17, 145 (1966); M.A. Billeter y C.  
25 Weissman, Proc. Nucleic Acid Research, Harper and Row,



1

New York, 1966.

5

10

15

20

25

El procedimiento de aislamiento descrito en los artículos es satisfactorio para los caldos de fermentación en los que se manipulan concentraciones celulares relativamente diluidas. Sin embargo, un caldo de fermentación que contenga un cultivo considerablemente mayor de células y que, por consiguiente, es bastante concentrado, no se presta al proceso de purificación del artículo citado. Por ejemplo, los recientes progresos en esta técnica realizados por Dr. Bárbara Lago han demostrado que el crecimiento del E. coli en un medio de licor de infusión de maíz y la infección con el mutante MU-9 del colifago MS2, produce un aumento de hasta 10 veces e incluso más en el crecimiento de las células y una cantidad correspondientemente mayor de DS-RNA. En estas circunstancias, el caldo de fermentación resulta tan denso que el primitivo procedimiento de aislamiento resulta inadecuado, antieconómico y difícil de realizar.

La razón de la inaplicabilidad del procedimiento primitivo a un caldo de fermentación que contiene grandes cantidades de bacterias parece encontrarse en la formación de una interfase viscosa pesada de proteína desnaturizada durante la primera extracción con fenol que separa la proteína. Esta interfase hace extraor



1 dinariamente difícil la separación entre la fase  
acuosa (que contiene ácido nucleico) y la fase fenó-  
lica. Además, gran parte del ácido nucleico, que com-  
prende el DS-RNA, queda retenido dentro del material  
5 interfacial. El lavado de la interfase, sugerido en  
los procedimientos originales, solo libera parcialmen-  
te el ácido nucleico retenido. Además, la dificultad  
de separación de las fases acuosa y fenólica requiere  
el uso de siete extracciones con fenol en el protocolo  
10 de aislamiento. El resultado es que se requieren muchas  
precipitaciones con alcohol y las consiguientes centri-  
fugaciones para favorecer la separación del fenol de las  
soluciones de ácido nucleico.

Por lo tanto, la reducción o eliminación del ma-  
15 terial de interfase es una mejora evidente en el aisla-  
miento. De acuerdo con el presente invento, esto se con-  
sigue agregando Pronasa o una proteinasa similar a la  
suspensión celular durante la lisis de las células me-  
diante dodecilsulfato sódico. La Pronasa se agrega has-  
20 ta una concentración de 0,25 a 1,0 mg/ml de suspensión y  
se prefiere una concentración de 0,50 mg/ml de suspensión.  
Las proteinasas más o menos activas que se utilizan en  
lugar de la citada requerirán una variación proporcio-  
nal en la concentración en mg/ml.

25 La Pronasa, un enzima proteolítico extraído de



1           Streptomyces griseus, es representativa de enzimas pro  
teolíticas no específicos, extraordinariamente acti-  
vos, que no degradan al ácido nucleico. El tratamien-  
to con Pronasa degrada completamente la proteína en  
5           el lisato y con ello elimina la interfase durante la  
primera extracción con fenol. Tan grande es la reducción  
de la interfase que pueden omitirse todas las extrac-  
ciones con fenol excepto una. Esto a su vez elimina la  
necesidad de dos precipitaciones con alcohol y reduce  
10           el número de centrifugaciones. Las ventajas del proce-  
dimiento con Pronasa, son las siguientes:

- 1) Eliminación de la proteína en la interfase durante la extracción con fenol, que permite la fácil recuperación de la fase acuosa que contiene el DS-RNA;
- 15           2) Aumento del rendimiento final de DS-RNA aislado;
- 3) Reducción del coste del aislamiento por eliminación de seis de las siete fenolizaciones, reducción del número de precipitaciones con alcohol y de centrifugaciones;
- 4) Eliminación de cualquier posible efecto degradante de las ribonucleasas de E. coli sobre el DS-RNA. En el E. coli se han encontrado enzimas capaces de degradar el DS-RNA nativo. El tratamiento con Pronasa destruiría esta actividad (véase Robertson et al., J. Biol. Chem. 243, 82-91, 1968);
- 20           5) Eliminación del uso de inhibidores de ribonucleasa como Macaloid, etc; 6) Facilita
- 25



1962

1 ción de la manipulación de pastas celulares concentra-  
das en pequeños volúmenes de extracción.

5 La segunda característica del presente invento  
es el uso de un compuesto de amonio cuaternario conte-  
niendo un radical cetilo unido al nitrógeno cuatriva-  
lente, como agente de precipitación para la purifica-  
ción y concentración finales del ácido ribonucleico  
de doble filamento. Este compuesto se amonio cuaterna-  
rio se utiliza en lugar de la cromatografía en columna  
10 sobre celulosa Ecteola. Las ventajas del procedimiento  
con compuesto cetílico de amonio cuaternario son las  
siguientes:

15 1) Es considerablemente más económico de reali-  
zar debido al bajo coste del compuesto de amonio cua-  
ternario y al coste relativamente elevado de la celu-  
losa Ecteola. 2) El número de hombres-hora necesarios  
para realizar el tratamiento con amonio cuaternario es  
considerablemente menor que en el caso de la cromato-  
grafía. 3) La técnica con amonio cuaternario da lugar  
20 a un producto pulverizado seco con buena estabilidad  
química; el material cromatografiado se encuentra en  
solución y requiere unas operaciones adicionales de  
secado que son laboriosas y costosas. 4) El procedi-  
miento con amonio cuaternario elimina el 100 % de la  
25 endotoxina (medido por la ausencia de material conte-



1963

1 niendo metilpentosa), haciendo que el DS-RNA sea con-  
siderablemente menos tóxico para los animales de la-  
boratorio. La cromatografía con celulosa Ecteola eli-  
mina solamente una fracción del lipopolisacárido con-  
5 taminante (endotoxina) de la preparación de DS-RNA des-  
pués de cromatografía en Sephadex. Esta preparación  
de DS-RNA es tóxica para los animales cuando se inyec-  
ta a dosis elevadas. 5) Antes de la cromatografía con  
Ecteola, es necesaria una operación de diálisis. Con  
10 el compuesto de amonio cuaternario, la diálisis es in-  
necesaria.

Un compuesto cetílico de amonio cuaternario pre-  
ferido es el bromuro de cetiltrimetilamonio (denomina-  
do en adelante CTAB), pero en lugar del trimetilo, los  
15 tres radicales pueden estar seleccionados entre etilo,  
propilo, butilo y bencilo y el anión puede ser cloro en  
lugar de bromo. Por ejemplo, puede tratarse de cloruro  
de cetildietilbencilamonio.

La cantidad de compuesto de amonio cuaternario  
20 a agregar está determinada por la cantidad de DS-RNA  
presente y la forma más sencilla de calcularla es por  
densidad óptica (D.O.) de la suspensión a la que se  
agrega. Para realizar esto, se proyecta una luz mono-  
cromática de 260 m $\mu$  a través de un aparato normal de me-  
25 dida de la densidad óptica y por cada 21 unidades D.O.

374059



1 medidas se agregan de 0,05 a 0,2 ml. (preferiblemente  
0,1 ml) de solución acuosa al 2 % de bromuro de cetil-  
trimetilamonio. Para otras concentraciones, se rea-  
liza el correspondiente ajuste en la cantidad añadida  
5 de forma que se agregue el mismo peso seco de CTAB.  
Esto es aplicable a los compuestos de CTAB equivalen-  
tes antes mencionados, que pueden ser utilizados en lu-  
gar de CTAB.

Un ejemplo representativo es el siguiente proce-  
10 dimiento para el aislamiento de DS-RNA MU-9 a partir de  
E. coli 3000 infectado durante 3 horas en un medio de  
licor de infusión de maíz.

#### EJEMPLO 1

15 1. Se suspenden las células procedentes de 1 li-  
tro de caldo (alrededor de 3 g de peso seco) en 36 ml  
de Tris 0,02 M, pH 7,8 y ácido etilendiaminotetraacé-  
tico (EDTA) 0,001 M. Después de haber obtenido una sus-  
pensión homogénea de células, se añaden 4 ml de lauril-  
(dodecil)sulfato sódico al 10 %, con intensa agitación.  
20 Se agrega Pronasa sólida hasta llegar a 0,5 mg/ml y la  
mezcla se incuba a 37°C durante 7 horas como mínimo.

25 2. Se añaden 40 ml de fenol (equilibrado con  
Tris 0,05 M - EDTA 0,005 M, pH 8, antes de su uso) y  
se sacude fuertemente. Se realiza una centrifugación  
a velocidad suficiente para romper la emulsión y la fa-



1 se acuosa se separa y se introduce en una vasija limpia. La fase acuosa es una suspensión lechosa viscosa en este momento.

5 3. Se añaden dos volúmenes de etanol al 95 % frío, con intensa agitación, después se sacude bien y a continuación se mantiene a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 2 horas como mínimo. Se centrifuga a una velocidad suficiente para producir la separación y el líquido que sobrenada se desprecia.

10 4. El precipitado que contiene el DS-RNA se suspende en 50 ml de Tris 0,05 M, EDTA 0,005 M, pH 8,0. Como los sólidos alcohólicos pueden no disolverse completamente, se centrifuga y se desprecia el sedimento (residuos de células).

15 5. Se agrega acetato potásico (del producto 4 M) en cantidad suficiente para que el líquido que sobrenada resulte 0,2 M y se agita durante 5 minutos. Después se agregan dos volúmenes de etanol frío, se sacude bien la mezcla y se mantiene durante 2 horas como mínimo a  
20  $-20^{\circ}\text{C}$ . Se centrifuga a baja velocidad y el líquido que sobrenada se desprecia.

25 6. El precipitado se suspende en 36 ml de Tris 0,02 M -  $\text{MgCl}_2$  0,005 M, pH 7,2. No se disuelve completamente pero se obtiene una suspensión homogénea. A continuación se añade desoxirribonucleasa de páncreas de



1           buey hasta una concentración de 1 a 20  $\mu\text{g/ml}$  y la pre-  
paración se incuba a  $25^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora, agitando de  
vez en cuando.

5           7. Se agregan 4 ml de 10 X SSC (1 X SSC = NaCl  
0,15 M - citrato sódico 0,015 M, pH 7,0). A continua-  
ción se agrega ribonucleasa A de páncreas de buey has-  
ta 20  $\mu\text{g/ml}$  y la mezcla se incuba durante 1 hora a  
 $37^{\circ}\text{C}$ , agitando de vez en cuando.

10          8. El producto digerido se centrifuga para sepa-  
rar toda la materia insoluble. Se añaden dos volúmenes  
de etanol frío al líquido que sobrenada clarificado y  
se sacude bien. Esta mezcla se mantiene a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante  
2 horas como mínimo. Se centrifuga a baja velocidad y el  
líquido que sobrenada se desprecia.

15          9. El precipitado se seca parcialmente a vacío  
sobre lentejas de KOH. Son necesarias varias horas para  
eliminar la mayor parte del alcohol.

20          10. El precipitado se suspende de nuevo y se di-  
suelve en SSC. Se añade una cantidad de SSC exactamen-  
te suficiente para disolver el precipitado. El objeto  
es mantener este volumen lo más pequeño posible pero  
permitir la disolución completa del precipitado.

25          11. Se aplica la solución a una columna de Sephadex  
G200 (hidratado y equilibrado en SSC). La columna se elu-  
ye con SSC y las fracciones del volumen hueco se reúnen.



1                    12. Se añade NaCl sólido a las fracciones reu-  
nidas de forma que su concentración sea 0,3 M. Se rea-  
liza una medida de la densidad óptica a 260 mμ y por  
5                    cada 21 unidades D.O. se agregan 0,1 ml de bromuro de  
cetiltrimetilamonio al 2 % (CTAB). Se forma inmediata-  
mente un precipitado. Se deja a la temperatura ambiente  
durante 10 minutos y después se centrifuga, desprecian-  
dose el líquido que sobrenada.

10                   13. El precipitado se suspende en NaCl 0,3 M -  
fosfato 0,005 M, pH 7 (se emplea un volumen igual al  
de las fracciones del volumen hueco reunidas). Se agi-  
ta durante 5 minutos exactamente, después se centrifu-  
ga de nuevo y el líquido que sobrenada se desprecia.

15                   14. El precipitado se disuelve en NaCl 0,5 M -  
fosfato 0,005 M, pH 7, utilizando 1/10 a 1/5 del volu-  
men de las fracciones del volumen hueco reunidas ori-  
ginales. Sobre esta solución se añaden tres volúmenes  
de etanol frío y la mezcla se sacude bien. Se mantie-  
ne a -20°C durante 2 horas, después de lo cual se cen-  
trifuga y se desprecia el líquido que sobrenada.

20                   15. El precipitado se lava una vez con etanol al  
95 % frío y después otra vez con etanol absoluto frío.

16. A continuación se seca el precipitado en un  
desecador de vacío sobre lentejas de KOH.

25                   El DS-RNA purificado obtenido por este procedi-



1 miento mejorado de aislamiento es esencialmente idéntico al obtenido por el procedimiento antiguo. Este material presenta una relativa resistencia a la ribonucleasa y una curva de transición térmica elevada con  
5 una temperatura de fusión ( $T_f$ ) de 105-107°C en SSC. Cuando se administra a los animales en cantidades del orden de microgramos, desencadena la formación de interferon y por lo tanto protege a los animales contra las infecciones víricas.

10 Una tercera característica del invento es que si se requiere o se desea una purificación adicional del DS-RNA MU-9, puede conseguirse por cromatografía sobre hidroxilapatita en polvo (HTP). El procedimiento se realizará sobre el producto del Ejemplo 1 y consiste en lo siguiente:

#### EJEMPLO 2

1. Preparación de la columna HTP. Se agrega 1 parte de HTP, con ligera agitación, sobre 4 partes de solución reguladora de fosfato 0,005 M, pH 6,7, y se deja  
20 hinchar durante la noche. Después de varias decantaciones y suspensiones en solución reguladora de fosfato para eliminar los finos, la suspensión de HTP se vierte en una columna de 3 cm de diámetro hasta una altura de 7,5 cm. La columna se lava con cuatro o cinco veces su volumen de solución reguladora de fosfato 0,005 M.



24 SEP. 1969

1 2. Cromatografía sobre la columna de HTP. Se disuel-  
ven 40 mg de DS-RNA MU-9 seco en 20 ml de solución  
reguladora de fosfato 0,005 M y se hace pasar por la  
columna, seguido de un volumen igual de solución regu-  
5 ladora. Las impurezas se lavan de la columna pasando  
cinco veces su volumen (1 volumen de la columna = 50 ml)  
de solución reguladora de fosfato 0,13 M, pH 6,7-6,8,  
a través de la columna. El DS-RNA se eluye de la colum-  
na mediante la adición de dos veces su volumen de fosfa-  
to 0,2 M, pH 6,7-6,8.

10 3. Recuperación de DS-RNA a partir de la solu-  
ción reguladora de fosfato 0,2 M. Se añaden 0,1 ml de  
CTAB al 2 % por cada 21 unidades de D.O. Después de  
10-20 minutos de reposo a la temperatura ambiente, el  
15 precipitado de RNA-CTAB se centrifuga durante 20 minu-  
tos a baja velocidad. El precipitado de CTAB se lava  
una vez con agua destilada y se disuelve en un pequeño  
volumen (5-10 ml) de NaCl 0,5 M - fosfato, 0,005 M, pH 7.  
El DS-RNA se precipita por adición de dos volúmenes de  
20 etanol absoluto frío. El precipitado se lava una vez  
con etanol al 95 % y otra vez con etanol absoluto y  
se seca sobre lentejas de KOH en un desecador de vacío.

25 Debe entenderse que las condiciones del Ejem-  
plo 2 no son absolutamente críticas, ya que una desvia-  
ción en más o en menos del orden de 5 % de las cifras

579059



1

dadas permitirá la práctica del invento.

5

Los ejemplos anteriores son indicadores de otras variaciones que pueden introducirse dentro de los límites y equivalentes antes mencionados. Así, la cantidad relativa de Pronasa o de una proteínasa equivalente puede variar dentro de los límites establecidos anteriormente. De forma similar, la canti- dad relativa del compuesto de amonio cuaternario o del compuesto equivalente conteniendo un radical ce- tílico puede variar dentro de los límites antes indi- cados.

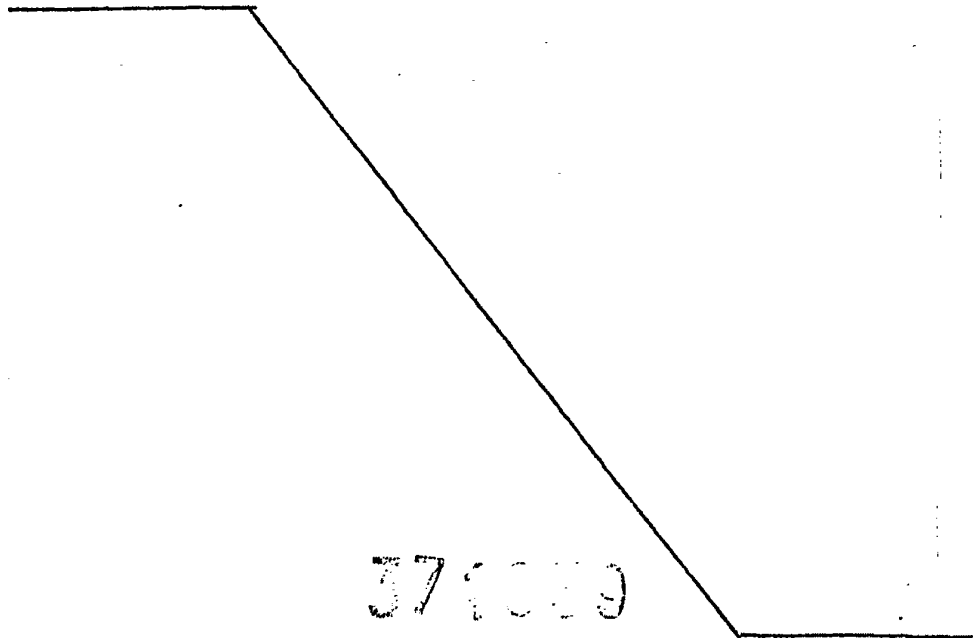
10

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

15

20

25



371089



REIVINDICACIONES

1

1. Un método para aislar ácido ribonucleico de  
doble filamento (DS-RNA) de un caldo de fermentación de  
células de E. coli que han sido infectadas con colifago  
MS2 o con el mutante MU-9 de este colifago, cuyo método  
5 incluye la operación de dializar las células para libe-  
rar el DS-RNA, añadir un enzima proteolítico que no de-  
grade al ácido nucleico, incubar la mezcla para degradar  
la proteína, agregar fenol para extraer la proteína degra-  
10 dada y centrifugar y recuperar la fase acuosa que contie-  
ne el DS-RNA; opcionalmente, separar de nuevo el DS-RNA  
crudo de dicha fase acuosa mediante las operaciones que  
incluyen la adición de un compuesto de amonio cuaterna-  
rio conteniendo un radical cetílico a una preparación  
15 conteniendo DS-RNA crudo para precipitar con ello el DS-  
RNA y recuperar el precipitado; y, opcionalmente absor-  
ber el DS-RNA sobre hidroxilapatita, eluir las impurezas  
de la misma y posteriormente eluir el DS-RNA en forma  
purificada.

10

15

20

2. Un método según la reivindicación 1, en el que  
dicho enzima se agrega para dar una concentración de 0,25  
1,0 mg/ml.

25

3. Un método según la reivindicación 1, en el que  
dicho enzima se agrega para dar una concentración de 0,50  
mg/ml.



1 4. Un método según la reivindicación 1, en el que la adición del compuesto de amonio cuaternario se realiza en la proporción de 0,05 a 0,2 ml de una solución acuosa al 2% por cada 21 unidades D.O., medidas con una luz monocromática de 360 mμ.

5 5. Se reivindica por último como objeto sobre el que ha de recaer la patente de invención que se solicita:  
UN METODO PARA AISLAR ACIDO RIBONUCLEICO.

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

Madrid, 24 setiembre 1.969

BERNARDO UNGRIA

P.P.



15

20

25

371039