



410357

1 Esta invención se refiere a un método para la pre-
paración en gran escala de partículas de virus en hongos -
huéspedes.

5 Se conoce en la actualidad que los ácidos ribonu-
cleicos de doble cadena y sus sales (que designaremos aquí
en lo sucesivo como RNA d.c.) son potentes inductores de -
interferones y son en consecuencia valiosos en la profila-
xis de amplio espectro de las infecciones y, en menor exten-
sión, en el tratamiento de tales infecciones. El RNA d.c., -
10 tanto de origen sintético como natural, ha mostrado poseer
actividad interferón-inductora. Entre las fuentes específi-
cas de RNA d.c. natural interferón-inductor que han sido -
descritas están las partículas de virus encontradas en al-
gunas variedades de Penicillium chrysogenum, P. funiculosum
15 y P. stoloniferum. Nosotros hemos encontrado también virus
con RNA d.c. en otras especies de hongos, incluyendo algu-
nas variedades de Aspergillus niger y A. foetidus.

20 Cuando se hacen crecer hongos infectados por virus
para aislar subsiguientemente el RNA d.c. viral ha sido -
usualmente necesario encontrar el hongo en la naturaleza -
ya infectado con virus y el rendimiento obtenido de partí-
culas de virus con RNA d.c. después del cultivo depende di-
rectamente de la combinación hongo huésped/virus encontra-
da en particular. Si fuera posible infectar deliberadamen-
25 te hongos previamente libres de virus con los virus que -
conviniere, podría elegirse entonces la variedad de hués-
ped más apropiada para producir resultados óptimos, por
ejemplo, rendimientos altos, preparaciones más puras y si-
milares. Adicionalmente, si unas especies de RNA d.c. viral
30 en particular, resultaran ser preferibles como interferón-

410357



1 inductoras, podría ser posible infectar el hongo huésped
más apropiado y obtener altos rendimientos del virus deseado sin necesidad de una búsqueda inicial, larga y altamente incierta, de la variedad de hongo huésped ya infectado con el virus deseado. P. Lhoas (Nature, 230, 248(1971),
5 ha descrito un método para llevar a cabo la infección de un hongo, no infectado previamente, por medio de anastomosis hifal, pero el método es muy limitado y tiene escaso valor para la producción a escala comercial de partículas
10 de virus. Una técnica más versátil se describe en nuestra Patente Belga No. 780226, en la que la infección se lleva a efecto en protoplastos del hongo huésped, los cuales se hacen entonces crecer para producir las colonias de hongos infectados.

15 La presente invención está basada en el descubrimiento de otro método de infectar hongos previamente libres de virus con partículas de virus conteniendo RNA d.c.

De acuerdo con la presente invención se aporta un proceso para la preparación de un hongo que es infectado
20 con partículas de virus conteniendo ácido ribonucleico de doble cadena, proceso que comprende poner en contacto células de hongos con caracteres sexuales opuestos o poner en contacto gametos opuestos con partículas de virus conteniendo ácido ribonucleico de doble cadena infectando con
25 secuentemente al menos algunos de los cigotos resultantes con dichas partículas de virus, y seguidamente cultivar los cigotos infectados para producir un hongo que está infectado con dichas partículas de virus.

Aunque es posible disponer de células con caracteres sexuales opuestos o dos gametos morfológicamente dife
30

410357



1 reñciados o indiferenciados, y ponerlos en contacto con par
tículas de virus de acuerdo con la presente invención, noso
tros preferimos, por razones de conveniencia, poner en con-
tacto las células de hongo de una colonia viviente conte-
5 niendo células con caracteres sexuales opuestos, o gametos
diferenciados o indiferenciados, con partículas de virus.
Cuando se utiliza este método más conveniente, se prepara
primeramente una colonia en crecimiento del hongo huésped
deseado. Esto puede lograrse mezclando células de hongos -
10 de dos colonias separadas con caracteres sexuales opuestos
en un adecuado medio de cultivo. Otra posibilidad es utili-
zar un hongo silvestre o un mutante el cual contenga ya cé-
lulas con caracteres sexuales opuestos.

Las células de la colonia en crecimiento se ponen
15 entonces en contacto con partículas de virus. Esto se lle-
va usualmente a la práctica en un medio de cultivo líquido
conteniendo las células de hongo en crecimiento, al cual se
añade una suspensión de las partículas de virus en el mis-
mo medio de cultivo o en un medio líquido diferente que no
20 afecte de manera adversa el crecimiento del hongo o al me-
nos al proceso de conjugación, por ejemplo agua destilada
conteniendo buffer fosfato (pH alrededor de 7). Con el fin
de asegurar un alto grado de infección, preferimos utilizar
una suspensión de partículas de virus de elevada densidad.
25 La mezcla resultante conteniendo células de hongos y par-
tículas de virus en un medio de cultivo, se incuba enton-
ces por un período de tiempo que oscila entre unos pocos
minutos y varios días, para asegurar la infección durante
la formación de al menos alguno de los cigotos producidos
30 por las células que se conjugan o los gametos que se conju

410357



1 gan. En general será suficiente incubar la mezcla célula
de hongo/partícula de virus a temperatura ambiente duran-
te unas pocas horas. Al final del período de infección, -
el paso subsiguiente en el proceso de la presente inven-
5 ción es el cultivo de los cigotos infectados.

Después de la etapa de infección, las células de
hongo (las cuales naturalmente incluyen los cigotos infec-
tados) pueden recolectarse por centrifugación y resuspen-
derse en agua destilada. Si se desea, la centrifugación y
10 resuspensión pueden repetirse para lavar las células y -
eliminar partículas de virus libres. En la etapa de infec-
ción, es extremadamente improbable que todos los cigotos
producidos por conjugación en presencia de las partículas
de virus resulten infectadas. Consecuentemente las células
15 de hongo obtenidas después de la etapa de infección com-
prenden células o gametos no conjugados y no infectados,
cigotos no infectados y cigotos infectados. Realmente, la
preparación de partículas de virus en gran escala a partir
de una mezcla de células de estas características, sería
20 relativamente ineficiente. En consecuencia, preferimos -
aislar los cigotos infectados a partir de la mezcla de cé-
lulas producida después de la etapa de infección, y hacer
crecer las colonias procedentes de estos cigotos infecta-
dos. El problema está entonces en aislar los cigotos in-
25 fectados a partir de la mezcla de células.

Esto puede lograrse tomando la mezcla de células
obtenida al término de la etapa de infección, sembrando
placas de una muestra de la mezcla de células en un medio
de cultivo, dejando crecer placas de una sola célula has-
30 ta convertirse en una colonia de células y examinando mues



410357

1 tras de las colonias de células resultantes al microscopio electrónico para localizar las colonias infectadas -
 (es decir, aquellas que se han formado a partir de cigotos infectados). Esta técnica es, no obstante, algo laboriosa,
5 por lo que sería deseable algún método más conveniente.

 El colorante azul de metileno tiene la útil propiedad de teñir las células de hongo muertas, dejando inalteradas las células vivas. Hemos notado que, si se hacen crecer colonias de cigotos infectados en un medio de cultivo que contiene azul de metileno, una porción de las colonias muestran una zona central de células muertas, teñidas de azul por el colorante. Esta observación conduce a un método conveniente para la identificación de los cigotos infectados en ciertos casos especiales.
10 La técnica general en tales casos es la siguiente :-

 En algunas ocasiones, hongos con caracteres sexuales opuestos son incapaces de producir por separado algún nutriente esencial, pero después de la conjugación, los cigotos resultantes y su descendencia pueden producir el nutriente esencial. En consecuencia, si un hongo de este tipo, se infecta según el proceso de esta invención, y la mezcla de células resultante se siembra en placas en un medio carente del nutriente esencial, sólo los cigotos y su descendencia podrán sobrevivir. Si este medio contiene también colorante azul de metileno, una proporción de las colonias resultante de cigotos infectados tendrá una zona central de células muertas, probablemente matadas por el virus y teñidas de azul por el colorante.
20
25
30

410357



1 Pueden prepararse placas con estas colonias "azules" sobre
medio de cultivo fresco y las colonias resultantes contenen-
drán una alta concentración de partículas de virus. Este
procedimiento puede repetirse tantas veces sean necesarias
5 para permitir la selección de una colonia azul la cual, -
previo crecimiento y resiembra en placas, conduce consis-
tentemente a la más alta proporción de colonias azules. -
La colonia escogida se multiplica para servir como colonia
de reserva a partir de la cual puede hacerse una prepara-
ción a escala comercial de hongos infectados.

Aunque el procedimiento que se acaba de describir
es uno especial, debe hacerse énfasis en que puede seguir-
se un procedimiento análogo cuando se utiliza la microscopía
15 electrónica para localizar las colonias infectadas re-
sultantes de cigotos infectados después de la etapa ini-
cial de infección de acuerdo con la presente invención.
De esta manera, pueden prepararse cultivos de reserva a
partir de colonias las cuales, previos sub-cultivos repe-
tidos, indican consistentemente altas concentraciones de
20 partículas de virus cuando se examinan al microscopio elec-
trónico.

Análogamente, podría utilizarse el ensayo de elec-
troforesis en gel para determinar la concentración de las
partículas de virus producidas por una colonia, con el fin
25 de seleccionar las mejores colonias para cultivos de reser-
va.

Esta invención es aplicable a hongos que se repro-
ducen al menos parcialmente por fusión de células con ca-
racteres sexuales opuestos o por fusión de gametos.

30 Entre los Ascomicetos las levaduras son un ejemplo

410357



1 de un grupo de hongos los cuales se reproducen al menos en
parte por fusión de células con caracteres sexuales opues-
tos. Sin embargo, la gran mayoría de los hongos classifica-
dos como Ascomicetos se reproducen parcialmente por fusión
5 de gametos morfológicamente diferenciados o indiferenciados.
Entre los Ficomicetos, los hongos acuáticos clasificados co-
mo Saprolegniales se reproducen también parcialmente por -
fusión de gametos al igual que los hongos terrestres clasi-
ficados como Mucorales y Peronosporales.

10 Esta invención permite infectar con partículas de
virus de RNA d.c. a especies previamente no infectadas. De
esta manera, mediante una elección adecuada del hongo hués-
ped, pueden hacerse máximos los rendimientos comerciales -
de partículas de virus. Adicionalmente, pueden hacerse cre-
cer partículas de virus conteniendo especies de RNA d.c. -
15 particularmente preferidas, en el huésped deseado, indepen-
dientemente de que el huésped pueda o no encontrarse en la
naturaleza infectado con tales partículas de virus. A modo
de ilustración, pueden hacerse crecer en una levadura, par-
tículas de virus aisladas a partir de un miembro de las -
20 especies Penicillium o Aspergillus.

Los siguientes ejemplos ilustran la presente inven-
ción:

25

EJEMPLO 1

Infección de parejas conjugables de Saccharomyces cerevisiae
con virus con RNA Doble-Cadena procedentes de Aspergillus -
niger y Penicillium funiculosum.

30

Se prepararon suspensiones de virus con RNA de do-
ble-cadena obtenidos a partir de A. niger cepa IMI 146891



410357

1 y P. funiculosum cepa IMI 163167. Cada suspensión se hizo
en agua conteniendo buffer fosfato (pH 7'2) y conteniendo
del orden de 10^9 partículas/ml. Se utilizaron dos cepas -
adenina-requirientes de S. cerevisiae : ad-1c y ad-2.1.a
5 (descrito en Woods, D.R., y Bevan, E.A., J. gen. Microbiol.,
51, 115 (1968) y Somers, J.M. y Bevan, E.A., Genet. Res.,
Camb., 13, 71 (1969), Todos los medios se han descrito en
Somers. J.M. y Bevan, E.A., Genet. Res., Camb., 13, 71 -
10 (1969). La incubación se llevó a cabo a 28°C. Se consiguió
la infección mezclando en un medio agar completo a pH 5'8
(ACM) un asa de cada tipo conjugable y añadiendo a la -
mezcla 0'01 ml. de la suspensión de virus (10^9 partículas/
ml.). Las placas se incubaron durante 3 horas, al término
de las cuales las células se recolectaron y se lavaron -
15 dos veces por centrifugación (800 g.) y resuspensión en
agua destilada. Se prepararon placas en medio completo -
(MBCM) o medio mínimo (MBMM) con azul de metileno, a pH
5'8 para recuperar respectivamente cigotos y células no-
conjugadas o, puesto que los marcadores ad son comple-
20 mentarios, cigotos solamente. Después de incubar durante
15 días, del 1 al 5% de las colonias desarrolladas a par-
tir de los cigotos, muestran una zona central azul oscu-
ra con células muertas. Se hará referencia a estas colo-
nias designándolas como colonias azules, a diferencia de
25 las colonias normales blancas diploides. Cinco de ellas
se sembraron en placas en MBCM. Se desarrollaron siempre
colonias azules, pero su proporción varió entre el 10 y
el 70%. A partir de estas, se hicieron tres aislamientos
sucesivos de células únicas y, en cada siembra en pla-
30 cas, más del 95% de las colonias fueron azules. Se pre-

410357



1 pararon suspensiones de virus a partir de 3 colonias azu-
les de cada siembra en placas y se examinaron por electro-
foresis de gel y microscopía electrónica. En todas se en-
contraron virus. Veinte colonias diploides blancas exami-
5 nadas se encontraron libres de virus. Uno de los diploides
infectados se hizo crecer en ACM y se prepararon seccio-
nes delgadas para microscopía electrónica. Se encontraron
muchas partículas en el citoplasma de las células.

10

EJEMPLO 2

Infección de parejas conjugables de Saccharomyces cerevisiae
con virus de RNA con doble-cadena procedente de Penicillium
chrysogenum y P. stoloniferum.

15

Se prepararon suspensiones de virus a partir de P.
stoloniferum ATCC 14586 y a partir de P. chrysogenum ATCC
10111 al igual que en el Ejemplo 1. Se utilizaron dos cepas
de S. cerevisiae : ad₁ - α y una variedad silvestre "a".
El proceso de infección se desarrolló tal como en el Ejem-
plo 1. Pero, en esta ocasión, al sembrar en placas sobre -
20 MBMM, se obtuvo la cepa haploide silvestre tipo "a"(blanca),
así como las colonias diploides blancas y las colonias di-
ploides azules. Las colonias desarrolladas a partir de ci-
gotos son de tamaño ligeramente mayor que las originadas a
partir de células haploides y pueden distinguirse cuando se
25 tiene suficiente experiencia. Después de incubar durante -
dos semanas, del 1 al 5% de las colonias desarrolladas a -
partir de los cigotos eran colonias "azules". Se sembraron
en placas cinco colonias azules sobre MBMM realizando, igual
que en el caso anterior, tres aislamientos sucesivos de cé-
30 lulas únicas. De nuevo, sólo se encontraron virus en las -

410357



1 colonias azules.

El número de colonias haploides silvestres de tipo "a" desarrolladas en las placas de dilución sobre MBMM (es decir, después de sembrar en placas la resuspensión -
5 de células a continuación de la conjugación) puede reducirse, si es necesario, utilizando un exceso considerable, digamos 10 veces, de la cepa haploide marcada (deficiente nutricional). De esta forma, la variedad silvestre resulta -
10 diluída al comienzo de las diluciones seriadas en las placas de MBMM.

DISCUSION

Se mantiene la hipótesis de que la conjugación es necesaria para la infección y esto está justificado por -
15 dos observaciones. En la siembra en placas sobre MBMM, las células parentales no-conjugadas no muestran la zona central de células muertas, la cual se observa en haploides después de la esporulación de diploides infectados. Por otra parte, 5 cigotos obtenidos a partir de una conjugación en ausencia de virus, se hicieron crecer en presencia
20 de virus en las condiciones bajo las cuales se habían infectado las parejas conjugables. No se obtuvieron colonias azules. A partir de cada cigoto, se seleccionaron 5 colonias al azar y después de sembrarlas en placas se examinaron para detectar virus, encontrándose que estaban exentas
25 de virus.

Los datos ya disponibles dan alguna indicación de cómo debe tener lugar la infección de parejas conjugables. El pequeño porcentaje de cigotos infectados y la proporción
30 variable de células infectadas desarrolladas a partir de -



410357

1 cigotos que acaban de ser infectados, indican que solo -
unas pocas partículas penetran las parejas, posiblemente
cuando parte de la pared celular sobre la cual se han ab-
sorbido se rompe durante la conjugación. Un número de cé-
5 lulas que se subdividen pronto después de la conjugación
no recibirán partículas de virus, pero en cada célula in-
fectada el número de partículas alcanzará finalmente el -
nivel capaz de inducir la muerte de la célula.

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

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para la preparación de un hongo que
está infectado con un virus con ácido ribonucleico de do-
15 ble cadena, proceso que comprende poner en contacto célu-
las de hongo con caracteres sexuales opuestos, o poner en
contacto gametos opuestos, con partículas de virus con áci-
do ribonucleico de doble cadena de origen fúngico, de for-
ma que se produzca la infección de al menos algunos de -
20 los cigotos resultantes con dichas partículas de virus, y
a continuación cultivar los cigotos infectados, para pro-
ducir un hongo que está infectado con dichas partículas de
virus.

2. Un proceso de acuerdo con la Reivindicación 1
25 en el que, después de poner en contacto las células de -
hongos de caracteres sexuales opuestos o gametos opuestos
con las partículas de virus, se hace crecer una pluralidad
de colonias separadas de hongos, de forma que la mayoría -
de dichas colonias deriva cada una de una célula cigoto -
30 única, y una o mas de las colonias resultantes las cuales

410357



1 se encuentra que están infectadas con partículas de virus,
se cultiva posteriormente para producir la cantidad desea-
da de hongos infectados.

3. Un proceso de acuerdo con las Reivindicaciones
5 1 ó 2 en el que las partículas de virus de origen fúngico
derivan de un miembro infectado de las especies Penicillium
o Aspergillus.

4. Un proceso de acuerdo con la Reivindicación 1
en el que las partículas de virus de origen fúngico deri-
10 van de una cepa infectada de Penicillium chrysogenum, Pe-
nicillium stoloniferum, Penicillium funiculosum, Aspergi-
llus niger o Aspergillus foetidus.

5. Un proceso de acuerdo con cada una de las Rei-
vindicaciones precedentes en el que las células de hongos
15 de caracteres sexuales opuestos son células de levadura.

6. Se reivindica por último como objeto sobre el
que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita:
"UN PROCESO PARA LA PREPARACION DE UN HONGO QUE ESTA INFE^C
TADO CON UN VIRUS".

20 Todo conforme, queda descrito y reivindicado en la presen
te Memoria descriptiva que consta de trece páginas mecano-
grafiadas.

Madrid, 4 de Enero de 1.973

BERNARDO UNGRIA

D.P.

25

30