



SECCION TECNICA
CLASIFICACION I. P. C.
CLASE <u>e 12</u>
SUBCLASE <u>N</u>

P A T E N T E **388725**  
D E  
I N V E N C I O N

a favor de YAMASA SHOYU KABUSHIKI KAISHA, entidad japonesa, domiciliada en 550, 2-Chome, Araoi, Choshi-Shi, Chiba-Ken (Japón), por "PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE POLI-NUCLEÓTIDOS".

- . -

MEMORIA DESCRIPTIVA

Esta invención se refiere a un procedimiento para la producción de polinucleótidos tales como polinosinato (citado en lo sucesivo como "poli I"), poliguanilato (citado en lo sucesivo como "poli G"), policitidilato (citado en lo sucesivo como "poli C"), poliadenilato (citado en lo sucesivo como "poli A"), poliuridilato (citado en lo sucesivo como "poli U"), y diversos copolímeros a partir de difosfatos de nucleósidos tales como difosfato de inosina (citado en lo sucesivo como "IDP"), difosfato de guanosina (citado en lo sucesivo como "GDP"), difosfato de citidina

- 2 -  
388725



- (citado en lo sucesivo como "CDP"), difosfato de adenosina (citado en lo sucesivo como "ADP"), difosfato de uridina (citado en lo sucesivo como "UDP") y una mezcla de cualquiera de estos componentes por la acción de la fosforilasa de polinucleótido de un microorganismo seleccionado de
5. entre el género Pseudomonas, Proteus, Bacillus, Aerobacter, Brevibacterium, Xanthomonas y Serratia.

- Los polinucleótidos han sido sintetizados por Ochoa y otros en una escala limitada. Desde entonces, se
10. ha observado diversas actividades bioquímicas de los mismos. Especialmente su actividad inductora interferométrica promete sus empleos farmacéuticos. Sin embargo, su producción económica en gran escala es muy difícil debido a que sus estructuras son muy complicadas para ser sintetizadas químicamente, y sus síntesis encimáticas no son adecuadas para
15. la industrialización, aún cuando es bien sabido que el polinucleótido es sintetizado a partir del difosfato de nucleósido (o difosfatos de nucleósido) por la acción de fosforilasa de polinucleótido, y que esta encima está ampliamente distribuída en los microorganismos.
- 20.

- Las fosforilasas de polinucleótido denunciadas hasta el momento son encimas intracelulares y no pueden ser extraídas económicamente de las células en gran escala. Además, la solución de encima cruda extractada conocida como
25. la fuente para la fosforilasa de polinucleótido no puede ser empleada para sintetizar un polinucleótido sin purificación, debido a que la misma está contaminada por diversas encimas propensas a degradar los difosfatos de nucleósido

388725



- como el substrato y/o los polinucleótidos sintetizados. Por ejemplo, extractos de Escherichia coli y Azotobacter vinelandii, ambos bien conocidos como fuentes para la fosforilasa de polinucleótido, son muy ricos en nucleasas y encimas propensas a la degradación de difosfatos de nucleósido. Por tanto, los extractos deben ser muy purificados para obtener un polinucleótido con un buen rendimiento. Hasta la preparación de encima purificada obtenible comercialmente de Micrococcus lysodeikticus (producto de P. L. Biochemicals) se mencionó que requería un pretratamiento para retardar la actividad de las nucleasas contaminadas antes de su empleo (cf. F. Rottman y K.L. Johnson; Biochemistry, Vol. 8, 4354, (1969)).
- 5.
- 10.

- Para superar estas dificultades, se separaron microorganismos adecuados para la producción industrial de un polinucleótido y se estudiaron los detalles de las condiciones para la producción. Finalmente, se averiguó que algunos microorganismos que pertenecen al género Pseudomonas, Aerobacter, Proteus, Bacillus, Serratia, Xanthomonas y Brevibacterium eran ricos en actividad de fosforilasa de polinucleótido fácilmente extraíble de las células, y pobres en nucleasas y encimas propensas a degradar los difosfatos de nucleósido, y que se podía sintetizar económicamente un polinucleótido a partir de difosfato de nucleósido (o difosfatos de nucleósido) por el cultivo de la raza seleccionada, las células, o el material derivado de las células sin otra purificación ulterior.
- 15.
- 20.
- 25.

Es por tanto un objeto de la presente invención

388725<sup>15</sup>



- proporcionar un método de producción de un polinucleótido a partir de difosfato de nucleósido (o difosfatos) mediante el empleo de un microorganismo rico en fosforilasa de polinucleótido extractable y pobre en encimas propensas a degradar los ácidos nucleínicos y/o difosfatos de nucleósido.
- 5.

- Es otro objeto de la presente invención proporcionar un método de producción de un polinucleótido a partir de difosfato de nucleósido (o difosfatos) mediante el empleo de cualquiera de los géneros Pseudomonas, Proteus, Bacillus, Aerobacter, Brevibacterium, Xanthomonas y Serratia.
- 10.

- De acuerdo con la presente invención, se proporciona un procedimiento para la producción de un polinucleótido que comprende las fases de: Cultivar un microorganismo rico en fosforilasa de polinucleótido extractable y pobre en encimas propensas a degradar los ácidos nucleínicos y difosfatos de nucleósido, y seleccionado de entre el grupo que consiste en los géneros Pseudomonas, Proteus, Bacillus, Aerobacter, Brevibacterium, Xanthomonas y Serratia; poner en contacto al menos un difosfato de nucleósido con un material de cultivo seleccionado de entre el grupo que consiste en el cultivo de dicho microorganismo, las células separadas del cultivo, y el material derivado de las células en presencia de al menos un catión divalente; y la recuperación del polinucleótido del medio resultante.
- 15.
- 20.
- 25.

El objeto anterior y otros objetos así como la utilidad de la presente invención se pondrán mejor de manifiesto por la siguiente descripción detallada de la misma

388725



con diversos ejemplos preferidos.

Con el fin de obtener el objeto de la presente invención, es decir, una producción en serie económica de polinucleótidos, se seleccionaron las siguientes razas representativas de microorganismos como resultado de la eliminación:

- 5. Pseudomonas convexa (ATCC 9979)
- Pseudomonas aeruginosa (ATCC 21636)
- Pseudomonas fluorescens (ATCC 21637)
- 10. Pseudomonas R-399 (ATCC 21638)
- Aerobacter aerogenes (ATCC 7256)
- Proteus vulgaris (ATCC 21635)
- Bacillus subtilis (ATCC 14593)
- Bacillus cereus (ATCC 21634)
- 15. Serratia marcescens (ATCC 21639)
- Xanthomonas campestris (ATCC 7381)
- Brevibacterium divariticum (ATCC 2311)

20. De las razas representativas anteriores, la Pseudomona R-399 (ATCC 21628) ha sido aislada por los inventores de la presente invención, y sus características microbiales son las siguientes.

- (1) Observaciones microscópicas:
  - a. Varillas de 0.3 a 0.5 x 1.0 a 1.8 micras con flagelo polar, que se presentan individualmente y en parejas;
  - 25. b. Móvil;
  - c. Gramnegativo.

- (2) Observaciones del cultivo:
  - a. Colonias de gelación: Circulares, amarillentas, se licuan rápidamente.

388725



5. b. Caldo de agar: Crecimiento abundante, amarillenta;  
c. Cultivo: Turbidez marcada con delgada película amarillenta y sedimento grisáceo, fluorescente.  
d. Gelatin stab: licuación infundibuliforme, con sedimento gris, blanquecino a rojizo.  
e. Colonias de patata: gruesa, amarillo pardusco, disseminándose, se vuelve de color marrón sepia claro.
10. (3) Propiedades fisiológicas:  
a. Leche ácida: sin coagulación, se vuelve alcalina;  
b. Indol: no se forma;  
c. Reductividad en los nitratos: reducidos a nitritos y amoníaco;  
d. Demanda de oxígeno: aeróbico;  
e. Temperatura óptima: 20 a 25°C;  
f. Empleo de azúcar: se produce ácido a partir de la glucosa, mannososa, fructosa, xilosa o arabinosa.
15. 20.

Muchas de las características anteriores son muy similares a las de la Pseudomonas fluorescens (Bergley's Manual of Determinative Bacteriology; Séptima edición, pp. 105, 1957). Sin embargo, la raza de la presente invención se distingue de las Pseudomonas fluorescens conocidas, en su capacidad de emplear diversos azúcares. Por tanto, esta raza debe ser considerada como una variedad de las Pseudomonas

25.

388725



fluorescens.

- Se puede preparar arbitrariamente cualquier clase de polinucleótido mediante la selección del difosfato de nucleósido adecuado (o difosfatos de nucleósido) como material o materiales de partida. Por ejemplo, se produce un homopolímero "poli I" cuando se emplea únicamente IDP, y se produce un copolímero "poli G-C" cuando se emplea una mezcla de GDP y CDP como substratos. En el último caso, ambos difosfatos de nucleósido deben ser mezclados preferentemente en una proporción igual de los componentes que constituyen el copolímero.
- 5.
- 10.

- Además, se puede emplear cualquier clase de razas ricas en fosforilasa de polinucleótido, fácilmente extraíble de las células y pobres tanto en encimas degradantes de difosfato de nucleósido, como en nucleasas, sin tener en cuenta su posición taxonómica. Especialmente los microorganismos pertenecientes al género Pseudonomas son excelentes para el propósito de esta invención. El cultivo de un microorganismo se realiza en la forma usual en un medio que contiene una fuente adecuada de carbono, fuente de nitrógeno y minerales. El vapor pH óptimo, la aeración y la temperatura pueden ser seleccionados para cada raza.
- 15.
- 20.

- La síntesis de un polinucleótido a partir de un difosfato de nucleósido (o difosfatos de nucleósido) se desarrolla eficazmente sin tener en cuenta la forma del agente sintetizante. Cualquier forma de material cultivado seleccionado de entre todo el cultivo, con las células aisladas del mismo, y el material derivado de las células es
- 25.

388725

15



- efectivo para sintetizar un polinucleótido. En el caso de emplear todo el cultivo, se añade difosfato de nucleósido al cultivo en desarrollo de una raza junto con un catión (o cationes) divalentes, si es necesario, y se continúa la incubación. El difosfato de nucleósido (o difosfatos de nucleósido) añadido se convierte en un polinucleótido durante la incubación. El difosfato de nucleósido (o difosfatos de nucleósido) se añade usualmente en una sola vez, y la adición divisional a ciertos intervalos de tiempo produce también resultados satisfactorios. En el caso de empleo de células, las mismas son recogidas centrifugando el cultivo desarrollado cuando la actividad de la fosforilasa de polinucleótido alcanza su máximo. Las células son suspendidas en una mezcla de reacción que contiene difosfato de nucleósido (o difosfatos de nucleósido), catión (o cationes) divalente, y un tampón, y son incubadas bajo condiciones apropiadas para sintetizar un polinucleótido. Las células pueden ser substituídas también por el material que se deriva de las mismas. Por ejemplo, se puede emplear células rotas, extractos de células, o una preparación de fosforilasa de polinucleótido purificada parcialmente de los extractos, satisfactoriamente como agentes fosforilasadores de polinucleótido. La destrucción de las células se efectúa por diversos tratamientos tales como técnicas ultrasónicas, prensa Hughes, un reactivo celulítico molido con alúmina o arena de cuarzo, o tratamiento con una disolución de cloruro de sodio altamente concentrada.
5. la incubación. El difosfato de nucleósido (o difosfatos de nucleósido) añadido se convierte en un polinucleótido durante la incubación. El difosfato de nucleósido (o difosfatos de nucleósido) se añade usualmente en una sola vez, y la adición divisional a ciertos intervalos de tiempo produce también resultados satisfactorios. En el caso de empleo de células, las mismas son recogidas centrifugando el cultivo desarrollado cuando la actividad de la fosforilasa de polinucleótido alcanza su máximo. Las células son suspendidas en una mezcla de reacción que contiene difosfato de nucleósido (o difosfatos de nucleósido), catión (o cationes) divalente, y un tampón, y son incubadas bajo condiciones apropiadas para sintetizar un polinucleótido. Las células pueden ser substituídas también por el material que se deriva de las mismas. Por ejemplo, se puede emplear células rotas, extractos de células, o una preparación de fosforilasa de polinucleótido purificada parcialmente de los extractos, satisfactoriamente como agentes fosforilasadores de polinucleótido. La destrucción de las células se efectúa por diversos tratamientos tales como técnicas ultrasónicas, prensa Hughes, un reactivo celulítico molido con alúmina o arena de cuarzo, o tratamiento con una disolución de cloruro de sodio altamente concentrada.
10. En el caso de empleo de células, las mismas son recogidas centrifugando el cultivo desarrollado cuando la actividad de la fosforilasa de polinucleótido alcanza su máximo. Las células son suspendidas en una mezcla de reacción que contiene difosfato de nucleósido (o difosfatos de nucleósido), catión (o cationes) divalente, y un tampón, y son incubadas bajo condiciones apropiadas para sintetizar un polinucleótido. Las células pueden ser substituídas también por el material que se deriva de las mismas. Por ejemplo, se puede emplear células rotas, extractos de células, o una preparación de fosforilasa de polinucleótido purificada parcialmente de los extractos, satisfactoriamente como agentes fosforilasadores de polinucleótido. La destrucción de las células se efectúa por diversos tratamientos tales como técnicas ultrasónicas, prensa Hughes, un reactivo celulítico molido con alúmina o arena de cuarzo, o tratamiento con una disolución de cloruro de sodio altamente concentrada.
15. Las células pueden ser substituídas también por el material que se deriva de las mismas. Por ejemplo, se puede emplear células rotas, extractos de células, o una preparación de fosforilasa de polinucleótido purificada parcialmente de los extractos, satisfactoriamente como agentes fosforilasadores de polinucleótido. La destrucción de las células se efectúa por diversos tratamientos tales como técnicas ultrasónicas, prensa Hughes, un reactivo celulítico molido con alúmina o arena de cuarzo, o tratamiento con una disolución de cloruro de sodio altamente concentrada.
20. La destrucción de las células se efectúa por diversos tratamientos tales como técnicas ultrasónicas, prensa Hughes, un reactivo celulítico molido con alúmina o arena de cuarzo, o tratamiento con una disolución de cloruro de sodio altamente concentrada.
25. sodio altamente concentrada.

De los tratamientos antes indicados, el de cloruro



- de sodio altamente concentrado ha resultado particularmente efectivo para la extracción industrializada de fosforilasa de polinucleótido a partir de una gran cantidad de células. Las células recogidas son suspendidas en una solución de cloruro de sodio de elevada concentración (usualmente se emplea una solución saturada), y se las deja permanecer durante un periodo adecuado (usualmente durante la noche), se recogen otra vez por centrifugación y son vueltas a suspender en una solución tamponada o agua. Por medio de
- 5.
- 10.
- 15.
- 20.

Si es necesario, la fosforilasa de polinucleótido puede ser purificada de los extractos de células después de la extracción de los residuos. Por ejemplo, los extractos son tratados con estreptomycinina para extraer los ácidos nucleínicos, y fraccionados por precipitación con sulfato de amonio y cromatografía de columna empleando dextrano DEAE, etc. En la presente invención, el "material derivado de las células", cubre las células rotas antes descritas, extractos

25.

388725<sup>15</sup>



de célula, y preparaciones de fosforilasa de polinucleótido purificadas parcialmente de los extractos.

5. La presente invención cubre ambos métodos, los que emplean el cultivo de los microorganismos seleccionados y aquellos que emplean células o material derivado de las mismas. Aun cuando las condiciones óptimas de reacción varían según la posición taxonómica del microorganismo empleado, la reacción se realiza usualmente a una temperatura comprendida en la gama de 0 a 60°C y a un pH de 4 a 10. El difosfato de nucleósido (o difosfatos de nucleósido) que permanecen al final de la reacción pueden ser recuperados fácilmente de la mezcla de reacción por medio de un método convencional, y ser usados como una parte de los substratos en el lote siguiente.

10. Los siguientes ejemplos se proporcionan para fines ilustrativos y pueden incluir características particulares de la invención, sin embargo no deben ser considerados como limitativos de la invención, siendo posible efectuar variaciones de la misma sin separarse del espíritu y alcance de la invención.

E J E M P L O 1.

20. Se cultivó Pseudomonas R-399 (ATCC 21638) con agitación a 37°C durante 24 horas en 600 ml de un medio de caldo que contiene 20 g/l de polvo de caldo. El cultivo fue transferido a un fermentador que contenía 30 litros del medio, e incubado con aeración forzada a 30°C durante 7 horas. El pH fue mantenido entre 6 y 8,5 durante la incubación. Se recogieron 140 g de células húmedas del cultivo.

388725



- Las células fueron suspendidas en 14 litros de solución salina saturada y se las dejó durante una noche. La suspensión fue centrifugada y el resultado precipitado fue vuelto a suspender en 700 ml de un tampón de 0,01 M Tris-HCl (pH 7,6) y dializada durante 24 horas contra 10 litros del mismo tampón. Se llevó a cabo otra diálisis durante 24 horas contra 10 litros de tampón nuevo. A la fracción no dializada, se agregaron gota a gota 100 ml de una solución de 10% de sulfato de estreptomina dihidrática regulada a pH 7,6 con agitación, y el precipitado formado fue extraído por centrifugación. Lo sobrenadante fue dializado contra el tampón anterior. La solución interior (casi 1 litro) fue empleada como una solución de encima cruda. Se disuelve 100 g de CDP (sal sódica) y 34 g de cloruro de magnesio en 500 de solución salina 0,1 M (pH 9,0) y mezclados con 500 ml de la solución de encima cruda.
5. HCl (pH 7,6) y dializada durante 24 horas contra 10 litros del mismo tampón. Se llevó a cabo otra diálisis durante 24 horas contra 10 litros de tampón nuevo. A la fracción no dializada, se agregaron gota a gota 100 ml de una solución de 10% de sulfato de estreptomina dihidrática regulada a pH 7,6 con agitación, y el precipitado formado fue extraído por centrifugación. Lo sobrenadante fue dializado contra el tampón anterior. La solución interior (casi 1 litro) fue empleada como una solución de encima cruda. Se disuelve 100 g de CDP (sal sódica) y 34 g de cloruro de magnesio en 500 de solución salina 0,1 M (pH 9,0) y mezclados con 500 ml de la solución de encima cruda.
10. Se disuelve 100 g de CDP (sal sódica) y 34 g de cloruro de magnesio en 500 de solución salina 0,1 M (pH 9,0) y mezclados con 500 ml de la solución de encima cruda.
15. Se disuelve 100 g de CDP (sal sódica) y 34 g de cloruro de magnesio en 500 de solución salina 0,1 M (pH 9,0) y mezclados con 500 ml de la solución de encima cruda.

- La mezcla de reacción fue incubada a 37°C durante 50 horas. La solución se fue volviendo viscosa conforme pasaba el tiempo mostrando una formación de "poli C" de elevado peso molecular. Después de la incubación se agregó con agitación un litro de etanol a la mezcla de reacción y el "poli C" fue purificado por un método convencional del precipitado resultante. El peso del "poli C" finalmente purificado fue de 55 g. El CDP que quedó en la mezcla de reacción después de la incubación fue recuperado por medio de un método convencional. Seguidamente, 100 g de IDP (sal sódica), 17 g de cloruro de magnesio fueron disueltos con 500 ml de la disolución de encima cruda e incubados duran-
20. Después de la incubación se agregó con agitación un litro de etanol a la mezcla de reacción y el "poli C" fue purificado por un método convencional del precipitado resultante. El peso del "poli C" finalmente purificado fue de 55 g. El CDP que quedó en la mezcla de reacción después de la incubación fue recuperado por medio de un método convencional. Seguidamente, 100 g de IDP (sal sódica), 17 g de cloruro de magnesio fueron disueltos con 500 ml de la disolución de encima cruda e incubados duran-
25. Seguidamente, 100 g de IDP (sal sódica), 17 g de cloruro de magnesio fueron disueltos con 500 ml de la disolución de encima cruda e incubados duran-

388725

15



te 100 horas. Después de la incubación el "poli I" fue precipitado de la mezcla de reacción agregando 1 litro de etanol. El peso del "poli I" finalmente purificado fue de 40 g. El IDP que permaneció en la mezcla de reacción después de la incubación fue recuperado por medio de un método convencional.

5.

E J E M P L O 2.

Se cultivó células de Pseudomonas convexa (ATCC 9979) en 1 litro del mismo medio y esencialmente bajo las mismas condiciones que las empleadas en el ejemplo 1. A partir del cultivo se obtuvieron 30 ml de solución de encima cruda por el mismo método que el descrito en el ejemplo 1. Se disolvió 5 g de CDP (sal sódica) y 250 g de cloruro de manganeso en 30 ml de un tampón de 0,1 M Tris-HCl (pH 9,0) La mezcla fue incubada con 30 ml de la solución de encima cruda a 50°C durante 15 horas, y se añadieron 60 ml de etanol a la mezcla de reacción. A partir del precipitado formado, se aisló el "poli C" que purificado por un método convencional. El peso del "poli C" purificado fue de 2 g.

10.

15.

20.

E J E M P L O 3.

Se obtuvieron 30 ml de solución de encima cruda a partir del cultivo de Pseudomonas aeruginosa (ATCC 21636). El cultivo y la extracción se realizaron tal como se ha descrito en el ejemplo 2. Después de incubación con 5 g de ADP (sal sódica) bajo las condiciones empleadas en el ejemplo 2, el "poli A" formado fue aislado y purificado. El peso del "poli A" purificado fue de 3 g.

25.

E J E M P L O 4.

388725

15



5. Una solución de encima cruda, obtenida del cultivo del Proteus vulgaris (ATCC 21635) por el método descrito en el ejemplo 2, fue incubada con CDP (sal sódica) bajo las condiciones mostradas en el ejemplo 2, y se obtuvieron 2 g de "poli C".

E J E M P L O 5.

10. Mediante la incubación de CDP (sal sódica) con una solución de encima cruda, obtenida del cultivo de Aerobacter aerogenes (ATCC 7256) por el método descrito en el ejemplo 2, se obtuvieron 2,5 g de "poli C".

E J E M P L O 6.

15. Por medio de la incubación de CDP (sal sódica) con una solución de encima cruda, obtenida del cultivo de Brevibacterium divariticum (ATCC 2311) por el mismo método descrito en el ejemplo 2, se obtuvieron 2 g de "poli C".

E J E M P L O 7.

20. Por medio de la incubación de CDP (sal sódica) con una solución de encima cruda, obtenida del cultivo de Xanthomonas campestris (ATCC 7381) por el método descrito en el ejemplo 2, se obtuvieron 2,5 g de "poli C".

E J E M P L O 8.

25. Mediante la incubación de CDP (sal sódica) con una solución de encima cruda obtenida del cultivo de Serratia marcescens (ATCC 21639) por el método descrito en el ejemplo 2, se obtuvieron 1,5 g de "poli C".

E J E M P L O 9:

Se desarrollaron células de Pseudomonas R-399 (ATCC 21638) con agitación a 30°C y durante una noche, en 10 ml de un medio de caldo que contenía 20 g/l de polvo de

388725

15



- caldo. 1 ml del cultivo obtenido fue transferido a un frasco que contenía 100 ml del medio de caldo, y fue incubado con agitación a 30°C durante 7 horas. Al cultivo fueron añadidos, en forma de polvo, 2 g de CDP (sal sódica) y 0,5 g de cloruro de magnesio y se continuó la incubación. Después de 45 horas, se extrajeron las células mediante centrifugación, y se agregaron 200 ml de etanol a lo sobrenadante. El "poli C" se purificó del precipitado formado por un medio convencional. Se obtuvieron 1,2 g de "poli C" purificado.

E J E M P L O 10.

- Al mismo cultivo empleado en el ejemplo 9, se agregaron 2 ml de agua que contenía 2 g de ADP (sal sódica) y 0,5 g de cloruro de magnesio. Después de la subsiguiente incubación durante 45 horas, se aisló el "poli A" del cultivo que fue purificado mediante un método convencional. Se obtuvo 1,0 g de "poli A" purificado.

E J E M P L O 11.

- Se desarrollaron células "Pseudomonas aeruginosa" (ATCC 21636) bajo las condiciones descritas en el ejemplo 9. Se disolvió 3 g de IDP (sal sódica) y 150 mg de cloruro de manganeso en 10 ml de agua y se agregaron al cultivo, y se continuó con la incubación. Después de 24 horas las células fueron extraídas por centrifugación, y se agregaron 200 ml de etanol a lo sobrenadante. Del precipitado formado se purificó "el poli I" por medio de un método convencional. Se obtuvieron 1,2 g de "poli I" purificado.

E J E M P L O 12.

388725



5. Se desarrollaron células Bacillus subtilis (ATCC 14593) bajo las condiciones empleadas en el ejemplo 9. El cultivo fue vuelto a incubar con GDP (sal sódica) y cloruro de manganeso tal como se describe en el ejemplo 9. Después de 24 horas, se aisló el "poli C" del cultivo. El peso del "poli C" purificado fue de 200 mg.

- . -

N O T A

Se reivindica como objeto de la presente patente de invención:

10. 1. Procedimiento para la obtención de polinucleótidos, caracterizado por el hecho de comprender las fases de: Cultivar un microorganismo rico en fosforilasa de polinucleótido extraíble y pobre en enzimas propensas a degradar los ácidos nucleínicos y difosfatos de nucleósido, y seleccionado de entre el grupo, que consiste en los géneros
15. Pseudomonas, Proteus, Bacillus, Aerobacter, Brevibacterium, Xanthomonas y Serratia; poner en contacto al menos un difosfato de nucleósido con un material cultivado seleccionado de entre el grupo que consiste en el cultivo de dicho microorganismo, las células aisladas del cultivo y el material
20. derivado de las células, en presencia de al menos un catión divalente; y la recuperación del polinucleótido del medio resultante.

2. Procedimiento para la obtención de polinucleó-

ME

388725<sup>15</sup>



tidos, según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que el microorganismo es una raza que pertenece al género Pseudomonas.

- 3. Procedimiento para la obtención de polinucleótidos, según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que la raza de dicho microorganismo está seleccionada de entre el grupo consistente en:

	Pseudomonas convexa	(ATCC 9979)
	Pseudomonas aeruginosa	(ATCC 21636)
10.	Pseudomonas fluorescens	(ATCC 21637)
	Pseudomonas R-399	(ATCC 21638)
	Ae Aerobacter aerogenes	(ATCC 7256)
	Proteus vulgaris	(ATCC 21635)
	Bacillus subtilis	(ATCC 14593)
15.	Bacillus cereus	(ATCC 21634)
	Serratia marcescens	(ATCC 21639)
	Xanthomonas campestris	(ATCC 7381)
	Brevibacterium divariticum	(ATCC 2311)

- 4. Procedimiento para la obtención de polinucleótidos, según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que el material cultivado es el cultivo de una raza que pertenece al género Pseudomonas.

- 5. Procedimiento para la obtención de polinucleótidos, según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que el material cultivado son las células aisladas del cultivo de una raza que pertenece al género Pseudomonas.

- 6. Procedimiento para la obtención de polinucleótidos, según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho

ME



388725

de que el catión divalente es uno seleccionado del grupo consistente en magnesio y manganeso.

7. Procedimiento para la obtención de polinucleótidos.

La presente memoria descriptiva consta de diecisiete hojas foliadas escritas a máquina por una sola cara.

Barcelona, 15 de febrero de 1971

YAMASA SHOYU KABUSHIKI KAISHA

p.a.

ME