

(12)

PATENTSCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 2677/88

(51) Int.Cl.⁵ : **C12P 19/34**

(22) Anmeldetag: 31.10.1988

(42) Beginn der Patentdauer: 15.11.1992

(45) Ausgabetag: 26. 7.1993

(30) Priorität:

2.11.1987 GB 8725606 beansprucht.

(56) Entgegenhaltungen: —

DE-OS2056081

(73) Patentinhaber:

SOCIETE DE CONSEILS DE RECHERCHES ET
D'APPLICATIONS SCIENTIFIQUES S.C.R.A.S.
F-75016 PARIS (FR).

(72) Erfinder:

CHABRIER DE LASSAUNIERE PIERRE-ETIENNE
PARIS (FR).
COLOTE ACAYE SOUDHIR
LES ULIS (FR).

(54) VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON POLYNUCLEOTIDEN, SO ERHALTENE PRODUKTE UND DIESE ENTHALTENDE PHARMAZEUTISCHE ZUSAMMENSETZUNGEN

(57) Diese Erfindung betrifft ein Herstellungsverfahren von Polymeren von Nukleotiden, wobei das Lysat einer Bakterienkultur sukzessive durch drei Säulen geleitet wird (Ionenaustauschharz, hydrophobes Harz und Molekularsieb), wodurch eine im wesentlichen reine Polynukleotidphosphorylaselösung erhalten wird.

Weitere Polymerisation mit diesem Mittel führt zu ungiftigen und nicht Fieber erzeugenden Produkten.

Die Erfindung betrifft auch so erhaltene Produkte und therapeutische Zusammensetzungen, die diese enthalten.

AT 396 251 B

Die vorliegende Erfindung betrifft ein verbessertes Verfahren zur Herstellung von Polynucleotiden (Homo- und Copolynucleotiden) und Komplexe derselben; die Erfindung betrifft auch die so erhaltenen, neuen verbesserten Produkte. Verschiedene Polynucleotide wurden durch die bekannten Techniken hergestellt, doch erzeugen bis jetzt die meisten der erhaltenen Produkte im allgemeinen Fieber oder sind mehr oder weniger giftig zufolge der Gegenwart von Verunreinigungen oder Chemikalien, die in der Aufeinanderfolge von Schritten, die zu den gewünschten Produkten führen, auftreten. Diese Verbindungen sind Wirkungsverstärker in verschiedenen therapeutischen Anwendungen, insbesondere bei der Behandlung von Krebs, bei der Behandlung verschiedener von Bakterien oder Viren hervorgerufenen Krankheiten und bei Impfungen. Die Erfindung betrifft schließlich therapeutische Zusammensetzungen, die die verbesserten Polynucleotide als aktive Ingredienz enthalten.

Im allgemeinen werden Polynucleotide durch das Einwirken einer Polynucleotid-phosphorylase auf das passende Monomer des Nucleotids erhalten. Die verschiedenen möglichen Monomere, wie ADP, CDP, IDP und UDP werden durch wohlbekannte Techniken erhalten. Polynucleotid-phosphorylase wird ebenfalls durch wohlbekannte Techniken, ausgehend vom Kultivieren von Bakterien, fortschreitend mit einer Lysis der in der Kultur erhaltenen Bakterien, gefolgt von einer Extraktion der Polynucleotid-phosphorylase die in der Lysis erhalten wird, aus einem komplexen Medium, wobei man verschiedene Enzyme, wie Kinasen, Phosphatasen, Nucleasen, Diesterasen, etc. finden kann, die alle konkurrierende Mittel beim weiteren Schritt der Polymerisation des ausgewählten monomeren Nucleotids durch die Polynucleotid-phosphorylase sind. Die Anwesenheit verschiedener, unerwünschter Enzyme führt zu unerwünschten Parallelreaktionen und einer partiellen Degradation des zu polymerisierenden Monomers ebenso wie des bereits produzierten Polymers.

Aus diesem Grund sind die meisten so erhaltenen Polynucleotide bezüglich ihrer Giftigkeit und/oder ihrer fiebererzeugenden Eigenschaften schädlich. Obwohl es möglich sein kann, eine akzeptierbare reine Polynucleotidphosphorylase in einer geringen Menge für Analysezwecke und für begrenzte wissenschaftliche Experimente herzustellen, ist dies im industriellen Maßstab und mit akzeptierbaren Kosten nicht leicht erreichbar. Erfindungsgemäß wurde festgestellt, daß es möglich ist, unter industriell annehmbaren Bedingungen im wesentlichen reine Homopolymere oder Copolymere oder Komplexe von Polynucleotiden oder von nahen Analogsubstanzen dieser Nucleotide zu erhalten, wenn man als Polymerisationsmittel anstatt der Polynucleotid-phosphorylasepräparate, wie sie gemäß den verschiedenen vorstehend erläuterten Methoden verwendet werden, ein hochreines Enzym, welches frei von Verunreinigungen ist, die zu unerwünschten Reaktionen führen, verwendet. Enge analoge Verbindungen der Nucleotide können beispielsweise die 6-Hydroxyalkylderivate der ADP oder 5-Halo- bzw. 5-OH- oder 5-Methyl-derivate des UDP sein.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung von Polymeren von Nucleotiden ist durch die folgenden Schritte gekennzeichnet:

- Lysis der Kultur eines Bakterienstammes, insbesondere von *E. coli*, und sukzessives Führen des so erhaltenen Mediums durch drei Säulen, von denen
 - die erste ein Ionenaustauschharz, insbesondere N,N-Diethylaminoethylcellulose (Internationale Registernummer 9013-34-7, Handelsname DEAE Sephacel) oder ein äquivalentes Austauschharz,
 - die zweite ein hydrophobes Harz, insbesondere Phenyl-Sephrose (Internationale Registernummer (RN) 67352-07-2) oder ein äquivalentes Austauschharz und
 - die dritte ein Molekularsieb, insbesondere Sephacryl 5300 (Internationale Registernummer 82785-74-8), Sephadex 200 (Internationale Registernummer 9041-35-4) oder ein äquivalentes Sieb enthält, zur Herstellung einer Polynucleotidphosphorylase-Lösung, die im wesentlichen frei von Substanzen ist, die den weiteren Polymerisationsprozeß beeinträchtigen können,
- Behandeln des eingesetzten Nucleotids, z. B. ADP, CDP, IDP oder UDP mit der erhaltenen Phosphorylase, wobei die Reaktion von 200 bis 750 Phosphorylaseeinheiten in einer Lösung, die die üblichen Puffer und das eingesetzte Mononucleotid in einer Konzentration von 0,06 bis 0,2 mMol/ml enthält, in Gegenwart von $MgCl_2$, das schrittweise zugefügt wird, um den Polymerisationsgrad zu kontrollieren, über eine Dauer von etwa 3 bis etwa 6 Tagen, während denen der pH-Wert zwischen 7,4 und 8,6 gehalten wird, durchgeführt wird,
- Abtrennen und waschen des so erhaltenen Polymers, gegebenenfalls Fortsetzung der Polymerisation mit einem zweiten ausgewählten Nucleotid unter den gleichen vorstehend angegebenen Bedingungen und in diesem Fall zumischen passender Mengen jedes ausgewählten Polymers in Wasser, in Gegenwart von NaCl und schließlich Ausfällung des erhaltenen Komplexes durch Zugabe von Äthanol.

Das aus der dritten Säule abgezogene Produkt weist im wesentlichen, aber nicht ausschließlich Polynucleotid-phosphorylase mit Spuren von Substanzen, die keine Wirkung auf den weiteren Polymerisationsprozeß haben, auf.

Wenn ein Homopolymer gewünscht wird, wird die erhaltene Polynucleotidphosphorylase zur Polymerisation des gewählten Monomers in Gegenwart der üblichen Chemikalien verwendet.

Wenn ein Copolymer gewünscht wird, wird das gewählte Monomer durch eine Mischung der gewählten Monomere in passendem Verhältnis ersetzt. Dieses Copolymer wird als Poly A/Poly U bezeichnet.

Wenn ein Komplex erhalten werden soll, wird die gleiche Polymerisation für jedes der passenden Monomere

durchgeführt und die erhaltenen Homopolymere werden in passendem Verhältnis in Gegenwart von NaCl gemischt und mit Äthanol niedergeschlagen.

5 Gemäß einer wichtigen Eigenschaft des erfindungsgemäßen Verfahrens wird die Polymerisation des gewählten Monomers oder der gewählten Monomermischung in Bedingungen durchgeführt, die von den üblicherweise gewählten Bedingungen abweichen. Im speziellen liegen die verwendeten Konzentrationen weit über den üblichen Werten, (von etwa 30 bis etwa 100 mal, vorzugsweise etwa 50 mal), die Polymerisation wird unter geregelter Zugabe von $MgCl_2$ durchgeführt, bei geregelten pH-Werten zwischen 7,4 und 8,6 und während einer Dauer zwischen etwa 3 und 6 Tagen.

10 Die erhaltenen Polymere oder Copolymere haben einen Molekulargewichtsbereich, der Komplexe mit Molekulargewichten von etwa 250 000 bis etwa 1 500 000 umfaßt, mit einer homogenen Polymerisationsrate und einem Polymerisationsgrad bis zu 90 - 95 %.

Die Erfindung betrifft auch ein Copolymer, das nach dem oben definierten Verfahren erhalten worden ist, dessen Ausgangsnukleotide Adenylsäure und Uridylsäure mit einem Molverhältnis zwischen Polyadenylsäure und Polyuridylsäure von etwa 50/50 sind.

15 Schließlich betrifft die Erfindung auch eine therapeutisch zur Behandlung von Krebs und der Bekämpfung von Krankheiten, die durch Bakterien oder Viren hervorgerufen werden, wirksame Zusammensetzung, die als aktive Komponente ein Copolymer wie oben definiert, enthält.

20 Die Erfindung wird anhand der Beschreibung der aufeinanderfolgenden fünf Schritte näher erläutert, die vom Beginn einer Bakterienkultur (hier E. Coli, doch sind auch andere Bakterien passend) bis zu einem Komplex Poly A/Poly U führt.

Schritt 1:

Wachstum der E. Coli B 1/5.

Die Kultur wird bei Umgebungstemperatur in vertikalen Röhren (Stab-Kultur) gehalten.

25 Das Kulturmedium enthält 10 g NaCl, 10 g Trypticase und 5 g Stärkeextrakt. Nach Sterilisieren während 45 min bei 110 °C wird eine separat sterilisierte Glucoselösung mit 2 g/Liter zugegeben. Vorkulturen von 10 ml werden hergestellt, dann werden 200 ml Medium für eine 10 l Kultur hergerichtet.

30 Rühren bei 470 Umdrehungen/min mit 81 Luft/min. Die Verdopplungszeit bei δ 600 beträgt 30 min und die Bakterien werden zu einer optischen Dichte von 6 bei 600 nm gezogen. Etwa 8 g pro Liter Kultur werden erhalten. Der pH-Wert der Fermentation wird durch Zugabe von 2 n NH_4OH auf 6,5 bis 6,8 gehalten. Wenn sie nicht unmittelbar verwendet wird, wird die Kultur bei -20 Grad gelagert.

Schritt 2:

Lysis der Bakterien.

35

Puffer A: 5 x 10 m Tris HCl, pH 7,9 (bei 25 °C), enthaltend: 2 x 10⁻³ m EDTA, 0,233 m NaCl (13,63 g/l) und 5 % Glycerol (50 ml/l).

Puffer B: 10⁻⁴ m Tris-HCl, pH 7,9, enthaltend 10⁻⁴ m EDTA, 0,2 m NaCl und 5 % Glycerol.

Für 165 g Bakterien (20 l Kultur)

40

45 Unmittelbar vor der Benutzung werden 0,4 ml Dithiothreitol (DTT) 0,1 m (15,4 mg/ml) zu 400 ml Puffer A bei Raumtemperatur zugefügt, gefolgt von 28 µl Mercaptoäthanol, 45 ml Lysozyme und 14 mg Phenylmethylsulphonylfluorid (PMSF), gelöst in 4 ml Äthanol. Die gefrorenen Bakterien (165 g) werden in diesem Medium in einem Mixer (Endtemperatur etwa 10 °C) gelöst, dann läßt man die Suspension auf 15 °C mit gelegentlichem Mischen erwärmen (etwa 20 min), dann werden unter Mischen 272 ml Natriumdeoxycholat zugegeben, gefolgt von 4 mg Deoxyribonuclease (DNAse). Die Lysis-Mischung wird während 20 min mit gelegentlichen Mischen stehengelassen und die Temperatur auf 20 °C gehalten. Dazu werden 400 ml Puffer B mit 0,4 ml 0,1 m DTT unter Mischen zugegeben und die Suspension wird bei 16 000 g (10 000 Umdrehungen/min in einer Sorvall-Zentrifuge) während 1 Stunde bei 5 °C zentrifugiert.

50

DNAase 50 679 Dornase Einheiten/mg

Lysozyme 25 000 Einheiten/mg

55

Die bei der Zentrifugation aufschwimmende Flüssigkeit (etwa 900 ml) wurde mit destilliertem Wasser auf 1 Liter verdünnt und Protein wurde durch Zugabe von 280 g Ammoniumsulfat (45 % gesättigt) niedergeschlagen, bei 4 °C und unter Rühren. Die Mischung wurde während zwei Stunden bei 4 °C stehengelassen. Protein wurde durch Zentrifugieren bei 16 000 G während 30 min bei 5 °C erhalten. Der Niederschlag (aufschwimmende Substanzen wurden verworfen), wurde in 150 ml 10 m Tris HCl pH 7,8 gelöst und die Lösung während 20 min bei 16 000 g zentrifugiert, um unlösliches Material zu entfernen. Aufschwimmende Substanzen wurden gegen 4 60 Chargen von 21⁻⁵ x 10⁻² m Tris HCl pH 7,8 bei 4 °C über 18 Stunden dialysiert, dann wurde die Lösung für

eine Stunde bei 16 000 g zentrifugiert, um unlösliches Material zu entfernen 300 ml, pH 7,8, Leitfähigkeit < 7,0 mS.

Schritt 3:

5 Reinigung der Polynucleotid-Phosphorylase coli B 1/5 (PNPase)

1. Die erhaltenen aufschwimmenden Substanzen rannen durch eine 280 ml DEAE Sephacel Kolonne (40 x 3 cm), ins Gleichgewicht gebracht mit 0,1 m Tris HCl pH 7,4 bei 4 °C, und die Kolonne wurde mit einem Gradienten von 1 Liter 0,1 m Tris HCl pH 7,4 bis 1 Liter 0,1 m Tris HCl in 0,4 m NaCl, pH 7,4 gespült, wobei 10 ml Fraktionen gesammelt wurden. Eine Spitze der Diesterase-Aktivität wird ausgespült, gefolgt von einer zweiten Spitze der Polynucleotidphosphorylase-Aktivität, lokalisiert in den Fraktionen 105 bis 125 ausgespült mit 0,2 1 m NaCl 0,1 m Tris HCl.

Volumen 210 ml : 107 Einheiten/ml, Total 22 470

15 2. Diese Lösung wurde auf 0,5 m in Ammoniumsulfat durch Zugabe von 28 g unter Rühren eingestellt und lief dann durch eine Kolonne (19 x 2 cm) mit 60 ml Phenylsepharose, ins Gleichgewicht gebracht mit 0,5 m (NH₄)₂SO₄ 0,05 m Tris HCl pH 7,4. Die Säule wurde mit etwa 20 ml 0,5 m (NH₄)₂SO₄ in 0,1 1 m Tris HCl pH 7,4 gewaschen, dann durchgespült mit einem inversen Gradienten von 250 ml 0,4 m Tris HCl pH 7,8 in 0,1 m (NH₄)₂SO₄ bis 3 x 10⁻³ m Tris HCl pH 7,8 bei 4 °C. Ungefähr 10 ml Fraktionen wurden gesammelt. Aktive Fraktionen wurden gruppiert.

20 Volumen 55 ml : 355 Einheiten/ml Total 19 525

25 3. Ammoniumsulfat (20 g) wurde unter Rühren (55 % Sättigung) zugefügt, um das Protein niederzuschlagen, der Niederschlag wurde bei 4 °C für 1 Stunde gelassen und dann 15 min bei 16 000 g zentrifugiert. Der Rückstand wurde in sowenig 0,1 m NaCl 0,05 m Tris HCl pH 7,4 wie möglich gelöst (etwa 10 ml), die Lösung einer 350 ml Sephacryl S300 Kolonne (50 x 3 cm), im Gleichgewicht mit 0,1 NaCl 0,05 m Tris HCl, pH 7,4 zugeführt und das Enzym mit dem gleichen Puffer (etwa 10 ml Fraktionierung) gespült. Aktive Fraktionen (13-17) wurden gruppiert.

Volumen 60 ml 312,5 Einheiten/ml Total 18 750. 540 Einheiten. 8 280

30 Das Enzym wurde durch Zugabe von 26 g (NH₄)₂SO₄ (65 % Sättigung) niedergeschlagen, die Suspension wurde bei -30 °C gelagert.

Schritt 4:

Herstellung der Polymeren

35 100 g ADP Na₂ (oder 100 g UDP Na₃) wurden in etwa 600 ml Wasser gelöst und zu:

200 ml m Tris HCl pH 8,3
250 ml m Ammoniumacetat
20 ml 0,1 m EDTA pH 8,0
100 ml m MgCl₂

40 in einer 2 Liter-Flasche zugegeben. Das Volumen wurde mit Wasser auf 2 Liter ergänzt und der pH-Wert bei Zimmertemperatur mit 5 n NH₄OH auf 8,6 gestellt. Die Oberfläche wurde mit einer Toluolschicht bedeckt. Die verwendeten Nucleotiddiphosphate sollen frei von verunreinigenden Metallen, wie Fe³⁺ oder Cu²⁺ sein.

45 Einem Aliquot der obigen Mischung (80 ml) wurden 200 Einheiten Enzyme und 2 ml eines vorhandenen Präparats von Poly A (oder Poly U) als Starter zugegeben und die Lösung wurde bei 37 °C für zwei Stunden inkubiert, dann in die Hauptmenge eingebracht, die bei 37 °C gehalten wurde. Nach 4 Stunden wurden weitere 300 Einheiten Enzym zugegeben und die Inkubation fortgesetzt. Der pH-Wert sinkt nach 24 Stunden auf etwa 8,3 und wird in der Folge durch Zugabe von 5 n NH₄OH bei 8,0 bis 8,3 gehalten.

Totaleinheiten der Enzyme - 500 I.E. 5 Einheiten/g. Wenn während 24 Stunden die Polymerisation zu weniger als 25 % erfolgt, kann mehr Enzym zugefügt werden, um die Rate in passenden Zeiten zu erhöhen.

50 Zusätzliche Mengen von 25 ml m MgCl₂ werden unter kräftigem Rühren bei etwa 30 %, 55 % und 75 % Polymerisation zugegeben (insgesamt 175 mmol Mg für 200 nmol ADP oder UDP). Der pH-Wert wird (gemessen bei 37 °C) auf 8,0 bis 8,3 gehalten. Die Polymerisation soll am Ende von 3 bis 4 Tagen 80 bis 90 % erreichen.

55 Schrittweise Zugabe von MgCl₂ hält das Verhältnis freier ADP (UDP) zu Mg bei etwa 2 bis den oben erwähnten Polymerisationsniveaus.

Am Ende der Inkubation wird die Mischung zentrifugiert, um das niedergeschlagene Ammoniummagnesiumphosphat zu entfernen. Der Niederschlag wird mit etwas Wasser gewaschen und die vereinten aufschwimmenden Substanzen verwendet, um den Poly A - Poly U-Komplex zu bilden.

Optimale Bedingungen der Polymerisation liegen bei einem pH-Wert zwischen 8,0 und 8,3 mit schrittweiser

Zugabe von $MgCl_2$ und genügend Enzym, um eine Polymerisationsrate von etwa 30 % pro Tag zu erreichen. Höherer Inkubations-pH-Wert (8,3 - 8,6) ergibt kleinere Polymere. Zugabe des gesamten Mg zu Beginn der Inkubation gibt ebenfalls kleinere Polymere.

5 **Schritt 5:**

Herstellung des Poly A - Poly U Komplexes

Der gesamte Nucleotidgehalt der Lösungen wird durch Hydrolyse der Inkubationsmischung in 0,1 n NaOH bei 100 °C während 5 Minuten unter Verwendung einer Verdünnung von 1000 für Poly A und 500 für Poly U (beispielsweise 10 µl Poly A oder 20 µl Poly U in 10 ml 0,1 n NaOH oder präziser durch Zwischenlösung von 100 µl A und 200 µl U) bestimmt. Absorption bei 260 nm wird gemessen und die Molarität unter Verwendung der folgenden Werte bestimmt.

$\delta_{260\text{ nm}} \times 10^{-3}$ für molare Lösungen

	pH 7,0	0,1 n NaOH (Hydrolyse)
Ap	15,3	15,3
Poly A	9,8	15,3
Up	10,0	7,7
Poly U	9,5	7,7

25 Polymerkonzentrationen werden durch die gesamten Nucleotide und den Polymerisationsprozentatz bestimmt. Volumina für ein stöchiometrisches Verhältnis A/U = 1 : 1 werden dann berechnet. Zu Poly U in einer 10 l Flasche werden 200 ml 25 %-ige wässrige NaCl zugegeben, anschließend daran die Lösung von Poly A, worauf die Lösungen eingehend gemischt werden (Endkonzentration von NaCl etwa 0,18 m) dann für mindestens 3 Stunden bei 4 °C stehengelassen.

30 Ein gleiches Volumen Äthanol wird unter Rühren zugeführt, um Poly A - Poly U niederschlagen, die Mischung wird während einer Stunde bei 4 °C gelassen. Der Komplex wird durch Zentrifugation in einem Sorvall 3 B (1 Liter-Töpfe) bei 5000 U/min für drei Minuten gesammelt, dann mit 2 Liter 55 %-igem Äthanol gewaschen. Der Rückstand wird in etwa 4 Liter reinem Wasser gelöst und zentrifugiert, um jede Spur von Ammoniummagnesiumphosphat zu entfernen. Den klaren aufschwimmenden Substanzen werden 200 ml 25 %-ige NaCl zugefügt und die Lösung wird für mindestens 3 Stunden bei 4 °C gelassen.

35 Der Komplex wird wieder durch Zugabe eines gleichen Volumens Äthanol unter Rühren niedergeschlagen, durch Zentrifugation gesammelt, mit 55 % Äthanol (etwa 2 Liter), 75 % Äthanol und zweimal mit 96 % Äthanol gewaschen und dann unter Vakuum getrocknet.

Ausbeute 110 - 120 g

40 Als Regel kann gesagt werden, daß zum Niederschlagen des Komplexes mit 50 % Äthanol NaCl (0,15 m bis 0,02 m) anwesend sein muß. Zum Waschen darf keine wässrige Äthanolösung unter 55 % verwendet werden (der niedergeschlagene Komplex wird durch 50 %-iges Äthanol gelöst).

Toxizität

LD₅₀ wurde durch IP und IV-Verabreichung an Mäusen und Raten bestimmt.

45 Weder bei Mäusen noch bei Raten wurde bei der maximalen IV-Verabreichung Letalität festgestellt.

An Raten wurde bei IP-Verabreichung keine Letalität festgestellt, bei Mäusen wurde der LD₅₀-Wert zu 3 g/kg bestimmt.

Übliche fiebererzeugende Tests waren vollständig negativ.

Verabreichung und Dosierung

50 Bevorzugte Verabreichung erfolgt IV einer isotonischen Lösung, die 0,01 - 0,1 g aktive Substanz enthält. Eine Injektion pro Woche wird während 6 Wochen wiederholt.

Pharmakologie

55 Da die erfindungsgemäß erhaltenen Polymere und Copolymere im allgemeinen bekannt sind, die jedoch bis jetzt niemals industriell in einem genügend reinen Zustand erhalten worden sind, wurden über die Jahre mit Proben speziell gereinigter Produkte, die jedoch unter vernünftigen ökonomischen Bedingungen niemals erreichbar waren pharmazeutischer Experimente verschiedenster Art durchgeführt.

Die Bedeutung der Erfindung kann aus der existierenden Bibliographie festgestellt werden, beispielsweise den folgenden Artikeln:

60

- MODULATION OF THE IMMUNE SYSTEM BY SYNTHETIC POLYNUCLEOTIDES - A.G. JOHNSON - Springer Semin. Immunopathol., 2, pp 149-168 (1979),
- 5 • REGULATION OF THE IMMUNE SYSTEM BY SYNTHETIC POLYNUCLEOTIDES - I. Characteristics of Adjuvant Action on Antibody Synthesis - J.R. SCHIDTKE and A.G. JOHNSON - J. Immunol., 106, pp 1191-1200 (1971),
- 10 • CHANGES IN LYMPHOCYTE SUBPOPULATIONS IN MICE RECEIVING A SINGLE INJECTION OF POLY A - POLY U - M. DONNER, D. VALLIER and F. LACOUR - Ann. Immunol. (Inst. Pasteur) 128C, pp 1039-1052 (1977),
- 15 • SPECTRUM AND MODE OF ACTION OF POLY A - POLY U IN THE STINULATION OF IMMUNE RESPONSES - V. BRAUN, M. ISHIZUKA, U. YAJIMA, D. WEBB and R. WINCHURCH in : BEERS R.F., BRAUN W., "Biological effects of polynucleotides" New-York : Springle-Verlag, pp 139-156 (1971),
- REDUCED INCIDENCE OF SPONTANEOUS MAMMARY TUMORS IN C₃H/He MICE AFTER TREATMENT WITH POLYADENYLATE-POLYRIDYLATE - F. LACOUR, G. DELAGE and C. CHIANALE - Science, 187, pp 256-257 (1975),
- 20 • POLY A - POLY U AS AN ADJUNCT TO SURGERY IN THE TREATMENT OF SPONTANEOUS MURINE MAMMARY ADENOCARCINOMA - F. LACOUR, J. LACOUR and A. SPIRA - Recent Results in Cancer Research, vol. 47, pp 352-356,
- 25 • POLYADENYLIC-POLYURIDYLIC ACID : BIOLOGICAL RESPONSE-MODIFYING ACTIVITIES IN MICE. IN VIVO ORGAN DISTRIBUTION AND PHARMACOKINETICS IN RABBITS - F. LACOUR - J. Biol. Resp. Modif., 4, pp 490-494 (1985)
- 30 • A PHASE I CLINICAL TOLERANCE STUDY OF POLYADENYLIC-POLYURIDYLIC ACID IN CANCER PATIENTS - J.P. DUCRET, P. CAILLE, H. SANCHO-GARNIER, J.L. AMIEL, M. MICHELSON, R.G. HOVANESSIAN, J.K. YOUN and F. LACOUR - J. Biol. Resp. Modif., 4, pp 129-133 (1985).

35

PATENTANSPRÜCHE

40

1. Verfahren zur Herstellung von Polymeren von Nucleotiden, durch die folgenden Verfahrensschritte gekennzeichnet:

- 45 - Lysis der Kultur eines Bakterienstammes, insbesondere von E. coli, und sukzessives Führen des so erhaltenen Mediums durch drei Säulen, von denen
 - die erste ein Ionenaustauschharz, insbesondere DEAE Sephacel oder ein äquivalentes Austauschharz,
 - die zweite ein hydrophobes Harz, insbesondere Phenyl-Sepharose oder ein äquivalentes Austauschharz, und
 - 50 • die dritte ein Molekularsieb, insbesondere Sephacryl S300, Sephadex 200 oder ein äquivalentes Sieb enthält, zur Herstellung einer Polynucleotidphosphorylaselösung, die im wesentlichen frei von Substanzen ist, die den weiteren Polymerisationsprozeß beeinträchtigen können,
- 55 - Behandeln des eingesetzten Nucleotids, z. B. ADP, CDP, IDP oder UDP mit der erhaltenen Phosphorylase, wobei die Reaktion von 200 bis 750 Phosphorylaseeinheiten in einer Lösung, die die üblichen Puffer und das ausgewählte Mononucleotid in einer Konzentration von 0,06 bis 0,2 mMol/ml enthält, in Gegenwart von MgCl₂, das schrittweise zugefügt wird, um den Polymerisationsgrad zu kontrollieren, über eine Dauer von etwa 3 bis etwa 6 Tagen, während denen der pH-Wert zwischen 7,4 und 8,6 gehalten wird, durchgeführt wird,
- 60 - Abtrennen und waschen des so erhaltenen Polymers, gegebenenfalls Fortsetzung der Polymerisation mit einem zweiten ausgewählten Nucleotid unter den gleichen vorstehend angegebenen Bedingungen und in diesem Fall Zumischen passender Mengen jedes ausgewählten Polymers in Wasser, in Gegenwart von NaCl und schließlich Ausfällung des erhaltenen Komplexes durch Zugabe von Äthanol.

2. Ein Copolymer, das nach dem Verfahren gemäß Anspruch 1 erhalten worden ist, dessen Ausgangsnukleotide Adenylsäure und Uridylsäure mit einem Molverhältnis zwischen Polyadenylsäure und Polyuridylsäure von etwa 50/50 sind.
- 5 3. Therapeutisch zur Behandlung von Krebs und der Bekämpfung von Krankheiten, die durch Bakterien oder Viren hervorgerufen werden, wirksame Zusammensetzung, enthaltend als aktive Komponente ein Copolymer gemäß Anspruch 2.