

POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA



URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY

83667

Patent dodatkowy
do patentu _____

MKP C07d 57/38
C07d 51/54

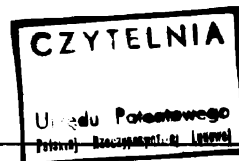
Zgłoszono: 17.06.72 (P. 156078)

Pierwszeństwo: 19.06.71 Republika
Federalna
Niemiec

Int. Cl.². C07G 7/00
C07H 19/16

Zgłoszenie ogłoszono: 25.04.73

Opis patentowy opublikowano: 30.10.1978



Twórca wynalazku: _____

Uprawniony z patentu: Merck Patent Gesellschaft mit beschränkter
Haftung, Darmstadt (Republika Federalna Niemiec)

Sposób wytwarzania biologicznie czynnych kompleksów dwuskładnikowych

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania nowych biologicznie czynnych kompleksów dwuskładnikowych, składających się z kwasu poliryboinozynowego (składnik A), o wzorze 1, w którym k oznacza liczbę całkowitą 1–3, a symbol b oznacza liczbę całkowitą 1–2000 lub też jego soli amonowych lub soli metali i z kwasu polirybo-2-tiocytydylowego (składnik B), o wzorze 2, w którym m oznacza liczbę całkowitą 1–3, a n oznacza liczbę całkowitą 1–2000, lub też jego soli amonowych lub soli metali.

Wyżej wymienione związki kompleksowe mogą być stosowane do ochrony lub do leczenia zwierząt kręgowych przeciw zakażeniom spowodowanym przez wirusy, bakterie i pierwotniaki, przy czym związki te wykazują również zdolności hamowania wzrostu tkanki nowotworowej jak i charakteryzują się zdolnością wzmacniania immunologicznych mechanizmów obronnych. Kompleksy dwuskładnikowe (A + B) lub ich sole amonowe względnie sole metali działają na zwierzęta kręgowie względnie na kultury tkankowe zwierząt kręgowych antymikrobowo, a zwłaszcza antywirusowo, jak również onkostatycznie.

Kompleksy dwuskładnikowe według wynalazku mogą być więc stosowane jako środki lecznicze lub służyć do otrzymywania środków leczniczych.

Kompleksy dwuskładnikowe według wynalazku składają się z kwasu poliryboinozynowego o wzorze 1, lub jego soli amonowej względnie soli metali i z kwasu polirybo-2-tiocytydylowego o wzorze 2, lub jego soli amonowej względnie soli metali.

Korzystne są przede wszystkim kompleksy dwuskładnikowe, w których symbol k oznacza wartość liczbową 1 i kompleksy dwuskładnikowe, w których symbol m oznacza wartość liczbową 1, a zwłaszcza kompleksy dwuskładnikowe, w których $k = m = 1$.

Celowe jest aby w tych wyróżniających się kompleksach dwuskładnikowych wartość liczbowa oznaczona symbolem b była większa od 2, korzystnie większa od 10, a zwłaszcza większa od 100. Równie korzystne jest, gdy symbol n oznacza wartość liczbową większą od 2, a zwłaszcza większą od 10, a przede wszystkim większą od 100. Szczególnie preferowane są więc kompleksy dwuskładnikowe, w których $k = m = 1$, a b oznacza wartość liczbową większą od 10, a zwłaszcza większą od 100, jak również jeśli n oznacza wartość liczbową większą od 10, a zwłaszcza większą od 100.

Stwierdzono, że można wytworzyć kompleksy dwuskładnikowe, składające się z oznaczonego symbolem A kwasu poliryboinozynowego o wzorze 1, lub jego soli amonowej lub soli metali i z oznaczonego symbolem B kwasu polirybo-2-tiocytydylowego o wzorze 2, lub jego soli amonowej lub soli metali, jeśli miesza się roztwory, przede wszystkim roztwory wodne o określonym stężeniu jonowym homopolinukleotydów o wzorze 1 i o wzorze 2, lub też jeden ze składników wytwarza się w roztworze innego składnika. Sposobem według wynalazku mogą być przede wszystkim wytwarzane szczególnie cenne kompleksy dwuskładnikowe.

Kompleksy dwuskładnikowe według wynalazku mogą być stosowane w postaci preparatów farmaceutycznych zawierających składniki czynne ewentualnie w postaci ich soli amonowych lub soli metali razem z co najmniej jednym stałym, ciekłym, półciekłym i/lub gazowym środkiem pomocniczym, nośnym lub pędym jak i ewentualnie również z co najmniej jednym innym związkiem czynnym.

Zalecane preparaty farmaceutyczne zawierają 0,001 do 200 mg substancji czynnej wytwarzanej sposobem według wynalazku i co najmniej jeden stały, płynny, półpłynny i/lub gazowy środek pomocniczy nośny lub pędny.

Można również osiągnąć działanie antymikrobowe i/lub onkostaticzne u zwierząt kręgowych, za pomocą podania czynnej dawki kompleksu dwuskładnikowego, składającego się ze składnika oznaczonego wyżej symbolem A określonego wzorem 1 i ze składnika określonego symbolem B o wzorze 2 lub ich soli amonowych lub soli metali.

Kompleks dwuskładnikowy, składający się ze składnika A o wzorze 1 i B o wzorze 2 lub ich soli amonowych lub soli metali można stosować jako środek inicjujący interferon. Można również otrzymać interferon, jeżeli kultury komórkowe poddaje się działaniu kompleksów dwuskładnikowych, składających się z kwasu poliryboinozynowego o wzorze 1 i kwasu polirybo-2-tiocytydylowego o wzorze 2 lub ich soli amonowych lub soli metali, po czym z kultur komórkowych izoluje się interferon.

Pod nazwą kompleksu dwuskładnikowego należy rozumieć agregaty utworzone ze związku określonego wyżej symbolem A o wzorze 1 i ze związku określonego symbolem B o wzorze 2, które określa się jako kompleks A + B, przy czym w kompleksie tym składniki mogą występować w różnych proporcjach molowych, a same kompleksy mogą charakteryzować się różną budową. Kompleks może na przykład istnieć w formie podwójnego łańcucha, z których każdy składa się z jednego homopolinukleotydu a oba są jednakowej długości, to znaczy posiadają tę samą liczbę zasad a ponieważ homopolinukleotydy te mają charakter polimeru o nieujednoliconym ciężarze cząsteczkowym, tj. liczba zasad w polimerze o tej samej długości łańcucha może być wartością zmienną, polimery te mogą występować więc również w postaci zespołów o innym składzie.

Liczba zasad dopełniających się wewnątrz jednego kompleksu przy tym może nie być równa. Ze względu na niejednolity ciężar molowy, jeden łańcuch związku oznaczonego symbolem A może wiązać się z dwoma lub kilkoma zbyt długimi lub zbyt krótkimi łańcuchami B albo też może być odwrotnie. Może to zachodzić również i w tym przypadku, gdy stężenia ogólne kwasu inozynowego i 2-tiocytydylowego są równe. Są również możliwe struktury, które mogą być najlepiej przedstawione za pomocą potrójnego łańcucha.

We wszystkich więc przypadkach ze względu na stechiometrię czynnego kompleksu która w obecnej chwili nie jest jeszcze dokładnie znana, obok kompleksu w roztworze reakcyjnym może ewentualnie występować w nadmiarze wolny homopolinukleotyd i w wielu przypadkach nie będzie mógł być od niego oddzielony, co jednak w zasadzie nie wpływa na czynność kompleksu. Szczególnie ważnym aspektem wynalazku jest to, że związki wytwarzane sposobem według wynalazku powodują indukowanie tworzenia substancji w szczególności interferonów, które powstrzymują wzrost wirusów w zwierząt kręgowych względnie w kulturach komórkowych zwierząt kręgowych.

Znaczenie interferonów, które są określone również innymi nazwami, jak „czynnik hamujący wzrost wirusów” i „substancje hamujące działanie wirusów”, jest dyskutowane w literaturze i polega na tym, że są one do dziś jedynym znanym czynnikiem antywirusowym o szerokim spektrum działania.

* Według dzisiejszego stanu wiedzy interferony są określane jako białka pochodzenia komórkowego o różnych ciężarach molekularnych. Hamują one rozmnażanie wirusów, który wymaga mechanizmu syntezy kwasu rybonukleinowego i białka, za pomocą wewnątrzkomórkowego. Interferony są specyficzne rodzajowo, to znaczy działają tylko w komórkach tego samego lub blisko spokrewnionego rodzaju zwierząt, z których pochodzą. Są jednak wiruso- niespecyficzne, to znaczy działają przeciw różnym nie spokrewnionym rodzajom wirusów. Nie posiadają żadnego bezpośredniego działania dezaktywującego wirus. Jako białka mogą być one rozkładane przez trypsynę, a więc pozbawione czynności.

Ochrona względnie leczenie zwierzęcia kręgowego zaatakowanego przez infekcję wirusową, może nastąpić przez bezpośrednie podanie kompleksu A + B lub jego soli metali lub soli amonowych, na przykład doustnie, w formie kapsułek lub za pomocą zastrzyków (dożylnie, domięśniowo lub doodbytniczo) ich sterylnego

roztworu lub przez zastosowanie domiejskowe, np. w formie kropli, maści, czy aerozoli. Można też wzbudzać wytwarzanie interferonów w kulturach komórkowych za pomocą kompleksu A + B zwłaszcza w danym rodzaju zwierząt leczonych i ewentualnie podawać interferony otrzymane z tych kultur komórkowych.

Poza tym podawanie kompleksu A + B lub ich soli amonowych lub soli metali powoduje również ochronę przeciw infekcjom, np. wywołanym przez bakterie lub pierwotniaki. Można przy tym przyjąć, że swoiste i nieswoiste mechanizmy obronne organizmu przeciw infekcjom są również wzmocnione. Wzmocnienie swoistych tzn. immunologicznych mechanizmów obronnych opiera się np. na wzmożonym wytwarzaniu przeciwciał. Efekt ten może być wykorzystany również do polepszania efektu szczepienia przy szczepieniach szczepionkami nie zawierającymi zarazków zdolnych do rozmnażania.

Wywołane przez szczepionkę wytwarzanie przeciwciał może być wzmoczone przez równoległe podawanie kompleksów A + B lub ich soli metali lub soli amonowych.

W ten sposób można osiągnąć ten sam efekt przy mniejszej ilości szczepionki, a tym samym przy zmniejszonym ryzyku – lub też przy tej ilości szczepionki może być osiągnięte lepsze działanie szczepionki.

Homopolinukleotydy stosowane do otrzymywania kompleksów A + B lub ich soli amonowych lub soli metali posiadają szkielet pantozanofosforanowy, w którym pentozą jest ryboza. Jako zasady zawierają one hypoksantynę lub 2-tiocytozynę. Są one otrzymywane znanymi metodami np. przez poddawanie dwu- i trójfosforanów nukleozydowych działaniu enzymu polimeryzującego.

Wytwarzanie kompleksów A + B lub ich soli metali lub soli amonowych ze składnika oznaczonego symbolem A o wzorze 1 i ze składnika oznaczonego symbolem B o wzorze 2 odbywa się według znanych metod, np. przez zmieszanie wodnych roztworów obu homopolinukleotydów w temperaturze 10° – 95° .

Na ogół ustawia się przy tym odpowiednie stężenie jonów przez dodanie nieorganicznych i/lub organicznych soli, przede wszystkim halogenków metali alkalicznych, w szczególności NaCl, a które to stężenie korzystnie jest utrzymać między 0,001 a 1,0. Wielkości pH roztworów mogą leżeć między 5,0 a 11,5; najkorzystniej jest pracować przy wielkościach pH między 6,5 a 11.

Aby osiągnąć utrzymanie odpowiedniej wartości pH pracuje się przeważnie ze zbuforowanymi roztworami homopolinukleotydów. Jako substancje buforujące stosuje się np. organiczne lub nieorganiczne sole metali alkalicznych, przede wszystkim sole sodowe, w szczególności kakodylan sodu. Obok tego można stosować jako substancji buforujących wzgl. w mieszkankach buforujących ogólnie używanych soli, jak np. octanu sodu, KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , kwaśnego winianu potasu lub cytrynianu sodu; i np. również chlorowodoru trój-(hydroksymetylo)-aminometanu. Ewentualnie można również dodawać rozpuszczalników organicznych, mieszających się z wodą np. jedno- lub wielowodorotlenowych alkoholi, jak metanolu, propanolu, glikolu etylenowego lub gliceryny, lub np. aprotycznych rozpuszczalników dwupolarnych jak dwumetylosulfotlenku, formamidu lub dwumetyloformamidu.

Aby osiągnąć pożądane i korzystne dla wytworzenia kompleksu stężenie jonowe, można mieszać jednakowe objętości roztworów, które przede wszystkim zawierają jednakowe stężenia składników (w przeliczeniu na zasady) i w każdym przypadku posiadają pożądane stężenie jonowe. Można jednak również mieszać różne objętości roztworów o różnej koncentracji i różnym stężeniu jonów w taki sposób by mieszanina reakcyjna posiadała w końcu odpowiednie stężenie jonowe. Przede wszystkim należy wtedy zważać na to, by i w tym przypadku istniały w mieszaninie reakcyjnej równomolowe ilości (w przeliczeniu na zasady) obu składników.

Kompleksy można jednak również wytwarzać przy stosowaniu niejednakowych ilości molowych obu składników, przy tworzeniu kompleksów, ponieważ rodzaj tworzących się kompleksów dwuskładnikowych w zasadzie jest niezależny od stosunku molowego składników, a głównie jest określony przez stężenie jonowe i wartość PH środowiska reakcyjnego.

Inny sposób otrzymywania kompleksów A + B lub ich soli metali lub ich soli amonowych polega na tym, że jeden ze składników otrzymuje w mieszaninie reakcyjnej w obecności drugiego. Przykładowo można w wodnym roztworze składnika oznaczonego symbolem A i kwasu polirybo-2,4-dwutiourydylowego ten ostatni homopolinukleotyd przekształcić za pomocą działania jonami siarczynowymi i/lub dwusiarczynowymi w obecności środka utleniającego najkorzystniej przy wartościach pH między 4, 5 a 9, w szczególności przy pH 7 w kwas polirybo-4-sulfo-tiourydylowy, a ten przekształcić działaniem amoniaku i/lub jonów amonowych przy wartościach pH między 7 a 10, a szczególnie przy pH 8,5 w składnik B, który albo natychmiast lub też po ustawieniu odpowiedniego stężenia jonów, względnie pożądanej wartości pH stworzy z drugim już istniejącym w mieszaninie reakcyjnej czynnikiem kompleks dwuskładnikowy według wynalazku.

Jako źródło jonów siarczynowych względnie dwusiarczynowych stosuje się przede wszystkim siarczyn metali alkalicznych i/lub kwaśne siarczyny, a zwłaszcza siarczyn sodu. Jako źródło jonów amonowych można stosować sole amonowe, korzystnie halogenki amonowe, a zwłaszcza chlorek amonu.

Dalszy sposób polega na tym, że roztwór wodny, zawierający już jeden składnik w formie homopolinukleocytydu, natomiast drugi składnik jako monomeryczny dwu- lub trójfosforan nukleozydu zadaje się enzymem polimeryzującym. Także tutaj drugi składnik wytwarzany jest *in situ*, przy czym nie jest bez znaczenia, czy monomeryczne fosforany nukleozydowe są zasocjowane z już istniejącymi składnikami polimerycznymi, np. wodorowymi wiązaniami mostkowymi, czy też nie.

Układ fizjologiczny zwierząt kręgowych charakteryzuje się jak wiadomo szeroką zdolnością buforowania jak i regulowania zawartości soli, a tym samym utrzymywania określonej wartości pH jak i określonego stężenia jonów i dlatego też jest w szerokich granicach obojętne w jakich warunkach otrzymany został kompleks A + B. Działanie i tak zostanie na ogół wywołane przez kompleks najbardziej stabilny w warunkach fizjologicznych. Również inne kompleksy otrzymane ewentualnie w warunkach niefizjologicznych przekształcają się dopiero w organizmie zwierzęcym lub w kulturze komórkowej w kompleks czynny.

Możliwe jest nawet osiągnięcie działania ochronnego przy osobnym podawaniu obu homopolinukleotydów i w ten sposób tworzenie kompleksu następuje dopiero w organizmie, względnie w kulturze komórkowej.

Kompleks A + B może być charakteryzowany albo za pomocą metod fizycznych, jak oznaczenie przesunięcia hyperchromowego w widmie absorpcyjnym w nadfiolecie, widma ORD, stałej Svedberga, T_m , frakcjonowanie gradientu stężeń sacharozy, chromatografii lub także za pomocą metod biologicznych takich jak zdolność indukowania wytwarzania interferonu. W warunkach prób opisanych niżej żaden z pojedynczych łańcuchów polinukleotydów nie wykazuje tej czynności. Wytwarzanie interferonu jest najważniejszą możliwością dla scharakteryzowania kompleksów dwuskładnikowych wytwarzanych sposobem według wynalazku ponieważ czułość metod fizycznych często nie wystarcza do charakteryzacji.

Ponieważ widmo kompleksu w nadfiolecie wykazuje przesunięcie hyperchromowe w stosunku do widma sumarycznego obu składników (na przykład otrzymane przez graficzne sumowanie widm roztworów, które w każdym przypadku posiadają jednakowe stężenia wynoszące jednak tylko 50% stężenia kompleksu obu składników), można tworzenie A + B stwierdzić przez pomiar hyperchromii (w procentach) przy szczególnie wielu długościach fal.

Szczególnie dobrą możliwość charakteryzowania takiego dwuskładnikowego kompleksu jest stwierdzenie jego działania biologicznego, które może być najprościej stwierdzone przez pomiary jego działania ochronnego przeciw infekcji wirusowej, mierzonego w kulturze komórkowej. Przygotowuje się na przykład szereg rozcieńczeń niowy kompleksu w medium podtrzymującym kulturę komórkową i tymi przygotowanymi o różnych rozcieńczeniach roztworami pokrywa się na przykład ścisłą warstwę komórek, drugorzędowych komórek z nerek królika i poddaje się je dojrzewaniu w ciągu około 18–24 godzin w temperaturze 35° – 37° C. Następnie usuwa się ciecz z naczyń z kulturą komórkową, a komórki zakaża odpowiednim wirusem, na przykład wirusem Herpes – simplex i pokrywa agarem i tak długo poddaje dojrzewaniu aż wskutek zakażenia wirusowego występujące zniszczenie komórek w nietraktowanych płytkach kontrolnych nie doprowadzi do widocznych dziur w ściśle warstwie komórek tzw. „plaques”. Po zabarwieniu komórek dziury liczy się i ustala to stężenie kompleksu, które prowadzi do 50% zmniejszenia ilości „dziur” w stosunku do kultur kontrolnych, niepoddanych działaniu kompleksu.

W analogicznym szeregu prób można udowodnić przez zastosowanie różnych rodzajów komórek i różnych rodzajów wirusów, że działanie ochronne kompleksu nie jest związane ani z określonym rodzajem komórek, ani z określonym rodzajem wirusów. Dla udowodnienia indukcji interferonu za pomocą kompleksu A + B pokrywa się ściśle warstwę komórek, na przykład z nerek królika lub z komórek embrjonalnych myszy, roztworem kompleksu A + B w medium podtrzymującym.

W ten sposób komórki są pobudzone do wydzielania interferonu. Ten interferon można znanymi sposobami izolować z wierzchniej warstwy cieczy i scharakteryzować go.

Dla stwierdzenia hamującego działania interferonu na wirusy poddaje się np. dojrzewaniu warstwy komórek z komórek nerkowych królika z interferonem króliczym przez noc, a następnie zakaża wirusem. Dalszy przebieg próby jest identyczny z opisany poprzednio testem redukcyjnym „plaques”. Tym sposobem można zmierzyć zawartość interferonu. Przez stosowanie różnych rodzajów wirusów np. Herpes-simplex, Vaccinia, Vesicular-Stomatitis ustala się brak swoistości wirusa.

Specyficzność rodzajowa jest udowodniona gdy np. komórki embrjonalne myszy poddaje się działaniu interferonu króliczego. W tej próbie nie jest hamowane rozmnażanie wirusa. Można również wykazać że interferon, potraktowany trypsyną przestaje działać ochronnie.

Zależność działania interferonu od syntezy RNA i protein komórkowych można udowodnić np. w ten sposób, że poddaje się działaniu interferonu komórki, w których aparat syntezy został zablokowany aktynowymy-cyną D. W komórkach tych na przykład rozmnażanie wirusa Vesicular-Stomatitis nie jest hamowane.

Uwalnianie interferonu u zwierząt kręgowych względnie u człowieka po podaniu kompleksu A + B można np. udowodnić przez dożylny wstrzyknięcie królikowi lub myszy roztworu kompleksu w rozpuszczalniku fizjologicznym np. roztworze buforowym Hanks'a, następne pobranie krwi u zwierzęcia np. po upływie 2–6 godzin i scharakteryzowaniu interferonu w surowicy krwi według metod wyżej podanych. Dowód działania ochronnego kompleksu A + B przeciw wirusom można przeprowadzić również bezpośrednio w próbie na zwierzętach, gdy np. myszy podaje się dootrzewnowo roztwór kompleksu A + B w rozpuszczalniku fizjologicznym, a następnego dnia zakaża np. wirusem Herpes-simplex. W zależności od dawki leczenie prowadzi do przedłużenia czasu przeżycia, podczas gdy nie leczenie myszy kontrolne giną na skutek zakażenia. Podobnie można wykazać działanie ochronne kompleksu w stosunku do znacznej liczby wirusów jak Vaccinia, Vesicular-Stomatitis, czy wirus grypy.

Analogicznie można stwierdzić działanie ochronne przeciw innym infekcjom np. spowodowanym przez drożdże jak *Cryptococcus neoformans*, przeciw bakteriom, jak penumokokki lub przeciw pierwotniakom jak *Plasmodium berghei* lub *Eperythrozoon coccoides*.

Szczególną własnością kompleksu A + B jest podwyższenie specyficznych procesów obronnych. Stwierdzono np. przy zaszczepianiu morskich świnek szczepionką wirusa grypy, że jeśli część zwierząt leczy się kompleksem A + B, wówczas w surowicy krwi zwierząt leczonych przeciwciiała są wykrywane wcześniej i osiągają wyższe miano niż u zwierząt kontrolnych. Przeciwciała mierzy się znanym sposobem za pomocą reakcji hamowania hemaglutynacji lub reakcji wiązania dopełniacza.

Podwyższenie ochrony przy szczepieniu może być udowodnione również bezpośrednio, np. za pomocą zaszczepienia myszy szczepionką wirusa grypy i następnie poddanie leczeniu części zwierząt za pomocą kompleksów A + B i np. po 14 dniach od szczepienia zakażenie wszystkich zwierząt wirusem grypy. Spośród zwierząt leczonych kompleksem A + B przeżywa zakażenie większy procent niż spośród zwierząt nie leczonych.

Kompleks A + B wykazuje działanie nie tylko przy zakażeniach lecz również i przy nowotworach. Można to wykazać np. na myszach, którym wszczepiono komórki nowotworowe Ehrlich-Ascites. Zwierzęta leczone kompleksami A + B żyją w tej próbie dłużej niż nie leczone. Kompleks A + B lub jego sole metali lub amonowe można podawać drogą pozajelitową lub domięscowo, szczególnie na śluzówkę, jak donosowo, dospójówkowo i na drogi oddechowe. Dawka czynna zależy od rodzaju zwierzęcia i w pewnym stopniu od wirusa, w stosunku do którego ma dawać ochronę. U myszy dawka progowa wynosi około 0,5 mg/kg, podczas gdy u królika około 0,05 µg/kg.

Poniżej podany jest sposób otrzymywania kompleksów dwuskładnikowych wytwarzanych sposobem według wynalazku jak również ich zastosowanie. Podane poniżej stężenia dla polinukleotydów odnoszą się zawsze do nukleotydów monomerycznych, z których buduje się polimery, a dla których ciężar cząsteczkowy (molowy) przyjęty jest obliczony ciężar molowy (nukleozydomonofosforan minus woda). Powstający przy tym błąd, pochodzący z nieuwzględniania grup końcowych może być pominięty.

W miejsca niżej wymienionych mediów podtrzymujących kultury komórkowe mogą być oczywiście stosowane również inne media, ponieważ nie mają one wpływu na działanie kompleksu dwuskładnikowego, a istotne znaczenie mają jedynie dla samych kultur komórkowych. Stosowany w niżej podanych przykładach kwas poliryboinozynowy oznaczany symbolem A jest zwykłym produktem handlowym i posiada wartość $S_{20w} = 5,3$.

Kwas polirybo-2-tiocytydylowy oznaczany symbolem B, który został zastosowany w poniższych przykładach, można otrzymać według znanych metod, opisanych w niemieckim wyłożeniowym opisie patentowym (Deutsche Offenlegungsschrift) nr 2041735, zwłaszcza w przykładzie I tego opisu. I tak 4 ml wodnej mieszaniny (pH 8,3) zawierającej 0,4 mM chlorowodoru trój-(hydroksymetylo)-aminometanu (Tris.HCl), 0,008 mM $MgCl_2$, 0,04 mM soli dwusodowej 2-tiocytydino-5-dwufosforanu 0,04 mM dwutiotreitolu i 10 jednostek enzymatycznych polinukleotydofosforylasy (aktywność swoista 0,165 mM UDP/godz. X mg białka w temperaturze 37°) inkubowano 4 godziny w temperaturze 37°. Po oddzieleniu białka i 48 godzinnej dializie w temperaturze 3° zatężonej do 1,5 ml wodnej fazy w stosunku do 0,01 M (Tris.HCl) (pH 7,0) otrzymano składnik B, który wykazał wartość $s_{20w} = 8,3$ i był zastosowany w poniższych przykładach. (Oczywiście można zastosować również preparaty A względnie B z innymi wartościami S_{20w}).

Przykład I. Do 0,53 ml 0,01 M roztworu buforowego chlorowodoru trój-(hydroksymetylo)-aminometanu (pH = 7) który zawiera 0,19 µM/ml składnika B, dodaje się 1,37 ml roztworu soli Hanks'a (patrz np.: J.M. Hoskins, *Virological Procedures*, London 1967, strona 313) i miesza następnie z 0,10 ml roztworu soli Hanks'a (pH 7,0), który zawiera 1 µM/ml składnika A. Mieszaninę, która zawiera po 0,1 µM/ml składnika A i B, pozostawia się na 1 godzinę w temperaturze pokojowej i otrzymuje się w ten sposób roztwór kompleksu A + B. Hyperchromia w stosunku do widma sumarycznego składnika przy 250 nm wynosi 18%, przy 260 nm 18,2% przy 270 nm 20,8%, przy 280 nm 17%. $A_{max} = 247,5$ nm; $\lambda_{min.} = 226$ nm; $(M)_{340} = 1,2 \cdot 10^3$, $(M)_{320} = 0$;

$(M)_{303} = 1,4 \cdot 10^3$, $(M)_{297} = 0$; $(M)_{262} = 21,8 \cdot 10^3$, $(M)_{242} = 0$; $(M)_{232} = 18,8 \cdot 10^3$, pozorna $pK = 11,5$; punkt izobestyczny = 230 nm w temperaturze $0^\circ - 100^\circ$ kompleks A + B nie wykazuje w wodzie żadnego T_m ; w wodnej mieszaninie zawierającej 30% glikolu etylenowego i 0,05 M jonów Na^+ pojawia się ostre przejście przy $T_m = 77^\circ$. Średnia wartość s_{20w} kompleksu A + B wynosi 12,4; integralny rozdział wartości s_{20w} A + B podano w tablicy 1 (pomiar w 0,1 molarnym buforze fosforanowym, pH 7, po 97 minutach przy 20 000 obr/min.). W przeciwieństwie do wolnego kwasu polirybo-2-tiocytydylowego, kwas ten w kompleksie dwuskładnikowym nie jest atakowany przez polinukleotydofosforylasy.

Tablica 1

$S_{20,w}$	C/c
5,5	0,02
6,5	0,04
7,5	0,08
8,5	0,13
9,7	0,20
10,5	0,28
11,5	0,39
12,5	0,50
13,5	0,83
14,5	0,93
15,5	1,00

Przykład II. Rozpuszcza się 0,32 mg składnika A w 10 ml 0,001 M roztworu kakodylanu sodu (pH = 7) zawierającego 59 mg NaCl, po czym dodaje się 1 ml 0,001 M roztworu składnika B i całość pozostawia w temperaturze pokojowej. Tworzenie kompleksu obserwuje się spektrometrycznie. Otrzymuje się roztwór kompleksu A + B, którego własności są identyczne z podanymi dla kompleksu A + B w przykładzie I.

Przykład III. 5 ml wodnej mieszaniny (pH = 8,3) zawierającej 0,5 mM buforu chlorowodoru trój-(hydroksymetylo)-aminometanu, 0,01 mM $MgCl_2$, 0,05 mM składnika B i 0,16 mg 2-tiocytydino-5-dwufosforanu dwusodowego zadaje się 5 jednostkami enzymatycznymi polinukleotydofosforylasy (aktywność swoista 0,165 mM UDP/godz. mg białka w temperaturze 37°) i całość pozostawia na 4 godziny w temperaturze 37° . Po usunięciu białka za pomocą wielokrotnej ekstrakcji za pomocą $CHCl_3$) alkohol izoamylowy zatęża się fazę wodną w temperaturze 15° do objętości 2 ml i dializuje 48 godzin w temperaturze 3° w stosunku do 0,01 M buforu chlorowodoru trój-(hydroksymetylo)-aminometanu. Otrzymuje się roztwór kompleksu A + B, który ma te same własności jak kompleks otrzymany według przykładu I.

Przykład IV. Do 4 ml 0,001 M roztworu kakodylanu sodu, zawierającego 24 mg NaCl, 0,1 mM kwasu polirybo-2,4-dwutiourydydylowego i 0,1 mM składnika B, dodaje się 20 μ m odczynnika siarczynowego, składającego się z 3 części objętościowych 1 M roztworu Na_2SO_3 i 1 części objętościowej 1 M roztworu $NaHSO_3$ i po 1 godzinie dodaje się ponownie 20 μ l odczynnika siarczynowego. Po upływie 1 godziny reakcję przerywa się, dodaje się 0,5 ml 0,2 M roztworu NH_4Cl , odczyn mieszaniny doprowadza się do wartości pH 8,5 za pomocą wodnego roztworu amoniaku i pozostawia całość na okres 1 godziny w temperaturze pokojowej po czym zatęża do objętości 2 ml, a następnie dializuje w ciągu 60 godzin w temperaturze 3° w stosunku do 0,01 M bufora chlorowodoru trój-(hydroksymetylo)-aminometanu. Otrzymuje się roztwór kompleksu A + B, który wykazuje identyczne własności jak kompleks otrzymany według przykładu I.

Przykład V. Z roztworu kompleksu A + B, wytworzonego według przykładu I przygotowuje się roztwór podstawowy przez dodanie 18 ml medium podtrzymującego kulturę komórkową, a składającego się z handlowego Tissue culture medium (TCM) 199 z dodatkami 0,168% $NaHCO_3$ jak również 100 IE penicyliny i 100 μ g streptomycyny na 1 ml. Po czym przez wielokrotne rozcieńczenie roztworu w stosunku 1 : 10 za pomocą wyżej wymienionego medium podtrzymującego kulturę otrzymuje się szereg rozcieńczeniowy. Każdymi 10 ml rozcieńczonych roztworów zalewa się 7-mio dniowe ściśle kultury komórkowe pierwszorzędowych komórek nerkowych królika w czworokątnych butelkach. Dla każdego stopnia rozcieńczenia używa się 3 butelek oraz 3 butelek kontrolnych, które zalane są jedynie medium podtrzymującym bez kompleksu A + B. Butelki poddaje się dojrzewaniu w temperaturze $35^\circ C$ przez noc w termostacie, zakaża następnie wirusem Herpes-Sim-

plex według znanego sposobu zalewa agar, po czym poddaje dojrzewaniu w ciągu następujących 48 godzin w temperaturze 35° i otrzymuje się drugą warstwę agarową do wybarwiania komórek. Po dalszych 24 godzinach dojrzewania widoczne już gołym okiem „dziury wirusowe” (Virusplaques) są liczone pod lupą. Z trzech pojedynczych wartości dla każdego stopnia rozcieńczenia oblicza się wartość średnią i ustawia w stosunku do wartości średniej kontrolnej. Na drodze graficznej uzyskuje się z tych wartości PRD₅₀, tzn 50% dawkę reakcyjną „dziury” (50% Plaque-Reduktions-Dosis), która dawałaby zredukowanie liczby dziur o 50%. W dalszych próbach z tym samym roztworem kompleksu A + B wytworzono szeregi rozcieńczeniowe w stosunku 1 : 2 i 1 : 4. Poza tym z późniejszych próbach były stosowane drugorzędowe zamiast pierwszorzędowych komórek nerkowych królika, a w jednym przypadku wirus Vaccinia zamiast Herpes-simplex. Uzyskane wyniki przedstawiono w tablicy 2.

Tablica 2

Próba	Komórki	Wirus	PRD ₅₀ µg/ml
1	Pierwszorzęd. nerkowe królika	Herpes simpl.	0,0035
2	„ „ „	„	0,0065
3	Drugorzędowe „	Vaccinia	0,0030
4	Drugorzędowe „	Herpes-simpl.	0,0061

Zostały również sprawdzone osobno składniki A i B; nie zaobserwowano przy tym żadnej reakcji liczby „dziur”, aż do stężeń 0,61 µg/ml.

Przykład VI. Przeprowadzono badania aktywności biologicznej kompleksu otrzymanego według przykładu II, za pomocą testu obniżania ilości „dziur”. Badania prowadzono według sposobu opisanego w przykładzie V, z tą różnicą, że użyto wyłącznie komórki drugorzędowe nerek króliczych. Medium podtrzymujące kultury komórkowe zastosowane w doświadczeniach 3 i 4 nie zawierało streptomycyny. Uzyskane wyniki ilustruje tablica 3.

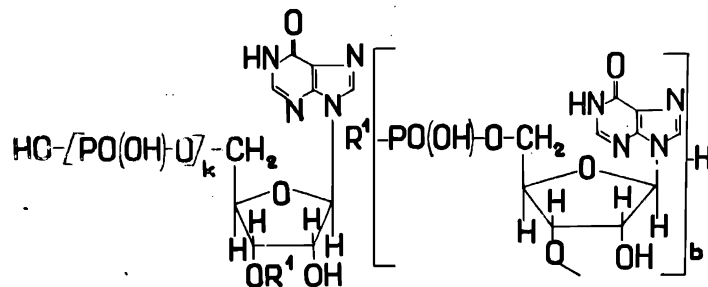
Tablica 3

Próba	Komórki	Wirus	PRD ₅₀ µg/ml
1	Drugorzęd. nerkowe królika	Herpes-simpl.	0,013
2	„ „ „	Vaccinia	0,00067
3	„ „ „	Herpes simpl.	0,0015
4	„ „ „	Herpes simpl.	0,0057

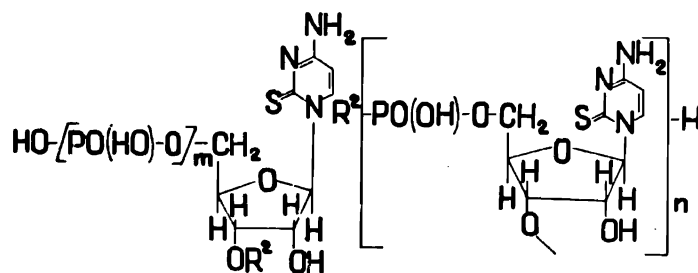
Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania biologicznie czynnych kompleksów dwuskładnikowych, składających się z kwasu poliryboinezynowego oznaczonego symbolem A, o wzorze 1, w którym k oznacza liczbę całkowitą 1–3, a symbol b oznacza liczbę całkowitą 1–2000, oraz z kwasu polirybo-2-tiocytydylowego oznaczonego symbolem B o wzorze 2, w którym m oznacza liczbę całkowitą 1–3, a n oznacza liczbę całkowitą 1–2000, oraz ich soli z metalami lub soli amonowych, z n a m i e n n y t y m, że miesza się roztwory zwłaszcza wodne o różnym stężeniu jonowym hemopolinukleotydu o wzorze 1, w którym k i b mają wyżej podane znaczenie i nukleotydu o wzorze 2, w którym m i n mają wyżej podane znaczenie lub ich soli z metalami lub soli amonowych.

2. Sposób wytwarzania biologicznie czynnych kompleksów dwuskładnikowych, składających się z kwasu poliryboinozynowego oznaczonego symbolem A, o wzorze 1, w którym K oznacza liczbę całkowitą 1–3, a symbol b oznacza liczbę całkowitą 1–2000, oraz z kwasu polirybo-2-tiocytydylowego oznaczonego symbolem B, o wzorze 2, w którym m oznacza liczbę całkowitą 1–3, a n oznacza liczbę całkowitą 1–2000, oraz ich soli z metalami lub soli amonowych, z n a m i e n n y t y m, że miesza się wodny roztwór homopolinukleotydu oznaczonego wyżej symbolem A, o wzorze 1, w którym symbol K i b mają wyżej podane znaczenie z kwasem polirybo-2,4-tiourydylowym, po czym roztwór poddaje się działaniu jonów siarczynowych i/lub jonów kwaśnego siarczynu w obecności środka utleniającego, korzystnie przy wartości pH 4,5–9,0, a zwłaszcza pH 7 i kwas polirybo-2,4-tiourydylowy przekształca w kwas polirybo-4-sulfotiourydylowy, następnie wprowadza do roztworu wodę amoniakową lub jony amonowe do uzyskania roztworu o wartości pH 7–10, a zwłaszcza 8,5 i otrzymany wyżej kwas polirybo-4-sulfotiourydylowy przekształca w składnik B i ewentualnie doprowadza roztwór do odpowiedniej wartości pH i/lub odpowiedniego stężenia jonowego.



Wzór 1.



Wzór 2.