(19) DANMARK

DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENET

(12) **FREMLÆGGELSESSKRIFT** (11) 144890 B

(21) Ansøgning nr. 3340/77

(51) Int.Cl.³ C 12 P 19/26

(22) Indleveringsdag 22. jul. 1977

(24) Løbedag 22. jul. 1977

(41) Alm. tilgængelig 23. jan. 1978

(44) Fremlagt 28. jun. 1982

(86) International ansøgning nr. -

(86) International indleveringsdag -

(85) Videreførelsesdag -

(62) Stamansøgning nr. -

(30) Prioritet 22. jul. 1976, 51/87503, JP

(71) Ansøger KUREHA KAGAKU KOGYO KABUSHIKI KAISHA, Tokyo, JP.

(72) Opfinder Chikao Yoshikumi, JP: Toshihiko Wada, JP: Masahiko Fujii, JP: Hiromitsu Makita, JP: Kinzaburo Suzuki, JP: m. fl.

(74) Fuldmægtig Ingeniørfirmaet Lehmann & Ree.

(54) Fremgangsmåde til fremstilling af et nitrogenholdigt polysaccharid.

DK 144890 B

Opfindelsen angår en fremgangsmåde til fremstilling af et nitrogenholdigt polysaccharid, ved hvilken en svamp hørende til slægten Coriolus af klassen Basidiomyceter gøres til genstand for submers dyrkning i et vandigt, væskeformigt substrat, og det dannede polysaccharid udvindes fra kulturen.

Polysaccharidet er anvendeligt til fremstilling af medikamenter, navnlig som anticancerogen medicin.

Det er velkendt, at et polysaccharid med antitumorigen effekt kan tilvejebringes fra den kulturvæske, hvori dyrkning af en svamp af klassen Basidiomyceter har fundet sted, og det er også en fastslået kendsgerning, at når en svamp af klassen Basidiomyceter gøres til genstand for submers dyrkning med et væskeformigt substrat, dannes det ønskede polysaccharid ikke blot i myceliet, men også i substratet.

Til fremstilling af et polysaccharid fra en sådan submers dyrkning af en svamp af klassen Basidiomyceter er der derfor generelt blevet benyttet en fremgangsmåde, hvori myceliet knuses, medens det brugte substrat (den uddyrkede kulturvæske) holdes på denform, hvori den forefindes, eller der sættes vand til substratet, hvorefter den uddyrkede kulturvæske underkastes filtrering eller centrifugalseparering for at fjerne mycelieremanensen, og det ønskede polysaccharid udvindes fra den således fremkomne væskeportion.

Skønt denne fremgangsmåde uden tvivl vurderes som rationel og praktisk anvendelig, giver den stadig anledning til nogle alvorlige problemer. I det tilfælde, hvor det submerse dyrkningsprodukt f.eks. straks deles i myceliet og væsken, kan denne opdeling ikke ske på effektiv måde som følge, ikke blot af forhøjet viskositet af systemet, men også af et højt vandindhold i myceliet. Vandtilsætning kan nedsætte viskositeten af den uddyrkede kulturvæske og forøge ekstraktionshastigheden i vand, men brugen af en overdreven vandmængde resulterer i, at tiden til delingen forlænges og nedsætter ikke myceliets vandindhold. Af disse grunde har der været behov for forbedringer i fremgangsmåden til tilvejebringelse af det ønskede polysaccharid fra ovennævnte submerse kultur med hensyn til højere effektivitet og højere udbytte ud fra et industrielt synspunkt.

Formålet med opfindelsen er at tilvejebringe en fremgangsmåde til opnåelse af et nitrogenholdigt polysaccharid med anticancerogen effekt og andre foretrukne farmacodynamiske virkninger fra en submers kultur af en svamp af klassen Basidiomyceter i højt udbytte ved udøvelse i kommerciel målestok.

Dette opnås ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen, hvilken fremgangsmåde er ejendommelig ved, at udvindingen foretages ved, at den fremkomne kultur tørres ved en temperatur på fra 60 til 150°C og ekstraheres med et vandigt opløsningsmiddel, og derefter renses den således fremkomne ekstraktopløsning ved derfra at fjerne de stoffer, hvis molekylvægt er mindre end 5.000.

Det mest karakteristiske træk ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen ligger i, at det ønskede stof ikke direkte udvindes fra den uddyrkede kulturvæske, men fås efter en tørring af den uddyrkede kulturvæske efterfulgt af ekstraktion af denne med et vandigt opløsningsmiddel.

De svampe af klassen Basidiomyceter, der benyttes i forbindelse med den foreliggende opfindelse, er sådanne, som hører til slægten Coriolus, og som f.eks. omfatter Coriolus versicolor (Fr.) Quel., Coriolus consors (Berk.) Imaz., Coriolus hirsutus (Fr.) Quel., Coriolus pergamenus (Fr.) Pat., Coriolus pubescens (Fr.) Quel. og Coriolus conchifer (Schw.) Pat. De morphologiske træk og mycologiske egenskaber af disse Basidiomyceter er forklaret i "Coloured Illustration of Fungi of Japan" af Rokuya Imazeki og Tsuguo Hongo, Bind I, 1974, og II, 1975. Blandtdisse Basidiomyceter er de nedenfor angivne deponeret i The Fermentation Research Institute of the Agency of Industrial Science and Technology, som er et deponeringssted, der er udpeget af Generaldirektøren for det japanske patentdirektorat.

	Deponerings-nummer	Deponerings-dato
Coriolus versicolor (Fr.) Quél:	FERM-P-2414	25/12-1973
Coriolus consors (Berk.) Imaz.:	FERM-P-988	24/6-1971
Coriolus hirsutus (Fr.) Quél:	FERM-P-2711	6/9-1974
Coriolus pargamenus (Fr.) Pat.:	FERM-P-2712	6/9-1974

Ifølge den foreliggende opfindelse dyrkes svampe af den ovenfor nævnte art ved en submers dyrkningsmetode. Betegnelsen "submers dyrkningsmetode" betyder i den foreliggende forbindelse en fremgangsmåde, hvorved dyrkning gennemføres i et væskeformigt substrat under beluftning og omrøring, og mycelievæskten ikke finder sted på overfladen af det væskeformige substrat, men fortrinsvis i dybden af væskelaget. Denne dyrkning gennemføres generelt ved en beluftningshastighed på ca. 0,1-2,0 liter/liter/minut (substrat) og en omrøringshastighed på ca. 300-800 omdr./min.

Det til den submerse dyrkning anvendte substrat kan være et hvilket som helst af de kendte naturlige eller syntetiske substrater, der er almindeligt anvendt ved dyrkning af mikroorganismer eller passende modifikationer af disse kendte substrater. Dyrkning over ca. 3-10 dage med et sådant substrat er tilstrækkelig til at give det ønskede polysaccharid i tilfredsstillende højt udbytte.

Ved submers dyrkning under anvendelse af et vandigt substrat vil myceliet ikke propageres i væskeoverfladen under dannelse af store masser som det er tilfældet ved stationær dyrkning, men dannes i forholdsvis små kuglelignende eller fibrøse stykker som følge af den forskydningskraft, der fremkommer ved omrøring. Under denne proces dannes polysaccharidet ikke blot inden i myceliet, men også udenfor, d.v.s. også i substratet.

Ifølge den foreliggende opfindelse underkastes den uddyrkede kulturvæske, der fås fra ovenstående submerse dyrkning af en svamp af Coriolus-slægten, tørring. Denne tørring gennemføres ved en temperatur i området fra 60 til 150°C. Det tørringsudstyr, der benyttes til denne tørringsbehandling, er ikke underkastet nogen begrænsninger, men kan være af en almindligt anvendt type, såsom en tromletørrer, hurtigtørrer eller tyndtlagsfordamper.

Denne tørringsbehandling af kulturen har den effekt, at den efterfølgende ekstraktion med et vandigt opløsningsmiddel og udvindingen af polysaccharidet ved rensning af ekstraktopløsningen lettes betydeligt. Det skal bemærkes, at hvis temperaturen ved tørringsbehandlingen er under 60°C, fås ikke blot en reduceret tørringshastighed, men også en utilfredsstillende opnåelse af de ovenfor angivne virkninger. Det bør også tages

i betragtning, at det ønskede polysaccharid har tendens til at dekomponere, når tørringstemperaturen stiger, således at det er nødvendigt at gennemføre tørringsbehandlingen ved en temperatur, der ikke overstiger 150°C.

Kulturvæsken, som har undergået den ovenfor nævnte tørringsbehandling, ekstraheres derefter med et vandigt opløsningsmiddel ved en fremgangsmåde, der er almindeligt anvendt ved ekstraktion af frugtlegemerne eller myceliet. Betegnelsen "vandigt opløsningsmiddel" betyder i den foreliggende sammenhæng vand eller en vandig opløsning indeholdende et alkalimetalsalt (f.eks. natriumchlorid, natriumacetat), et polært organisk opløsningsmiddel (f.eks. methanol, ethanol) eller lignende, men i forbindelse med den foreliggende opfindelse er ekstraktion under opvarmning med vand eller en fortyndet alkalisk opløsning mest effektiv, og flertrinsekstraktionsteknik under anvendelse af denne ekstraktopløsning er mest fordelagtig til industrielle anvendelsesformål.

Den således fremkomne ekstraktopløsning underkastes derefter behandling for at rense opløsningen ved derfra at fjerne de stoffer, der har en molekylvægt på under 5.000, hvorved det ønskede polysaccharid fremkommmer. Denne behandling kan gennemføres under anvendelse af en hvilken som helst kendt, egnet fremgangsmåde, såsom udsaltning, dialyse, ultrafiltrering, omvendt osmose, ionbytterharpiksbehandling, gelfiltrering eller udfældning med et organisk opløsningsmiddel. Disse metoder kan benyttes enten alene eller i kombination.

Af disse metoder er de mest effektive for så vidt angår den foreliggende opfindelse ultrafiltrering og omvendt osmose.

Efter fjernelse af de lavmolekylære bestanddele (med molekylvægt under 5.000) fra ekstraktopløsningen ved ovennævnte rensningsbehandling underkastes ekstraktopløsningen spraytørring eller frysetørring og forarbejdes derefter til handelsprodukter.

Det polysaccharid, der fremkommer ifølge den foreliggende opfindelse på den ovenfor beskrevne måde (dette polysaccharid er i det følgende betegnet "det foreliggende stof"), er et leverbrunt stof med et nitrogenindhold på 2-8%, i de fleste tilfælde 3-6%, og det har intet tydeligt smeltepunkt men bliver gradvist sort og dekomponerer ved en temperatur på over ca. 120°C.

Det foreliggende stof er opløseligt i vand, men næsten uopløseligt i alkohol, pyridin, chloroform, benzen og hexan. Endvidere er det næsten smagløst og lugtfrit.

Nedenstående Tabel 1 viser resultaterne af forskellige farvereaktionsprøver gennemført på det foreliggende stof.

Tabel 1

Farvereaktion	Farve	Resultat
α-naphthol-svovlsyrereaktion (Molisch's reaktion)	Violet	Saccharid bekræftet
Indol-svovlsyrereaktion (Disch's reaktion)	Brun	Saccharid bekræftet
Anthron-svovlsyrereaktion	Grønblå	Saccharid bekræftet
Phenol-svovlsyrereaktion	Brun	Saccharid bekræftet
Tryptophan-svovlsyrereaktion	Violetbrun	Saccharid bekræftet
Lowry-Folin-proces	Blå	Peptidbinding bekræftet
Ninhydrinreaktion efter saltsyrehydrolyse	Violetblå	α-aminosyrer bekræftet

De i ovenstående tabel anførte forsøgsresultater indicerer, at det foreliggende stof er et nitrogenholdigt polysaccharid. Molekylvægten af det foreliggende stof bestemt ved en ultracentrifugeringsmetode lå i området fra 5.000 til 300.000, og vægtmiddelmolekylvægten var fra 10.000 til 100.000. Værdier fremkommet ved andre målemetoder, såsom fraktionering med en ultrafiltreringsmembran, lå alle i området fra 10.000 til 100.000. Det er derfor en yderst pålidelig vurdering at ansætte middelmolekylvægten af stoffet til at ligge i området fra 10.000 til 100.000.

Det ifølge den foreliggende opfindelse tilvejebragte nitrogenholdige polysaccharid udviste en særdeles god antitumorigen effekt i mus, ikke blot ved intraperitoneal indgivelse, men også ved oral indgivelse. Dette betyder, at det foreliggende stof har en særdeles god anvendelighed som oral anticancerogenmedicin. Denne effekt er rent faktisk blevet eftervist ved mange og talrige forsøg. Endvidere udviser det foreliggende

stof udover den orale antitumorigene effekt også høj aktivitet med hensyn til genetablering af den undertrykte immunitet i en værtsorganisme. Det vil sige, at det foreliggende stof ikke blot var brugbart til at hindre de ugunstige bivirkninger ved kemoterapi af cancer og forøge sensitiviteten ved radioterapi, men også til at hindre en nedgang i immuniteten eller den fysiske styrke af en patient som følge af en operation eller blodtransfusion, og til at kontrollere eller hindre virus- eller bakterieinfektion, som der bliver fare for, når patientens fysiske styrke eller immunitet nedsættes. Oral indgivelse af det foreliggende stof gav også en særdeles god effekt med hensyn til forbedring af leverfunktionen, fremme af appetitten, afhjælpning af tarmforstyrrelser og fremme af urinering. Det var også anvendeligt til behandling af spedalskhed.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen vil nu blive beskrevet mere detaljeret ved hjælp af en udførelsesform. I nedenstående beskrivelse af udførelsesformen er alle procentangivelser på vægtbasis, med mindre andet er angivet.

EKSEMPEL

1.600 liter af et substrat sammensat af 10% glucose, 1,5% gærekstrakt, 0,1% KH_2PO_4 og 0,1% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ indførtes i en $2m^3$ lodret fermentor, og dette substrat indpodedes 20 liter svampeopslæmning af Coriolus versicolor (Fr.) Quel. FERM-P-2414 tilvejebragt fra rystedyrkning, efterfulgt af 7 dages dyrkning ved 26^oC ved en beluftningshastighed på 0,5 liter/minut pr. liter substrat og en omrøringshastighed på 150 omdr./min.

Den således fremkomne uddyrkede kulturvæske (opslæmning) deltes i portioner på ca. 500 liter, og hver af disse portioner tørredes ved hjælp af et tørreapparat af dobbelttromletypen. Tromletørreapparatets overflades temperatur afpassedes således, at temperaturen af overfladen af den uddyrkede kulturvæske (idet kulturvæskeoverfladen er tilknyttet tromleoverfladen i form af et tyndt lag) ville blive henholdsvis 65^oC, 80^oC, 90^oC, 110^oC og 145^oC, og at vandindholdet af hvert tørret produkt ville være mindre end 20 vægtprocent (se nedenstående Tabel 2).

Derefter tilsattes der til hvert af disse tørrede produkter 250 liter varmt vand, og der ekstraheredes ved 90 ± 1^oC i 3 timer, og efter afkøling adskiltes det i mycelieremanens

og ekstraktopløsning ved hjælp af en skruedekanteringsenhed og en centrifugalseparator med separeringsplade. Den tilsyneladende viskositet af blandingssystemet og den for centrifugalsepareringen i denne ekstraktionsproces nødvendige tid var som angivet i Tabel 2.

Den fra den ovenfor beskrevne behandling fremkomne ekstraktopløsning førtes gennem en ultrafiltreringsmembran, "type GM-5" fremstillet af en højpolymer elektrolyt af "Bio-Engineering Ltd.", Japan, til fjernelse af de ekstraktkomponenter, hvis molekylvægt er mindre end 5.000, fra ekstraktopløsningen, hvorved der fremkom ca. 100 liter af den rensede opløsning. Da koncentrationen af denne rensede opløsning var ca. 1%, koncentreredes den ved hjælp af en koncentrator til et koncentrationsniveau, der egnede sig for den efterfølgende spraytørringsbehandling. Da den rensede opløsning danner gel, hvorved behandlingen vanskeliggøres, hvis opløsningen koncentreres over et vist niveau, er grænsekoncentrationsværdien, under hvilken der ikke forekommer geldannelse, vist som den kritiske koncentration i Tabel 2. Den tid, der var nødvendig til spraytørring af ovennævnte koncentrerede opløsning og udbyttet af det fremkomne polysaccharid, er også vist i Tabel 2.

Med henblik på sammenligning (sammenligningseksempler) behandledes uddyrket kulturvæske fremkommet ved samme fremgangsmåde som den ovenfor beskrevne svarende til den ovenfor beskrevne udførelsesform efter tørring ved 45°C og 160°C og uden tørring, og der gennemførtes tilsvarende målinger på de respektive produkter under opnåelse af de resultater, der fremgår af Tabel 2.

Tabel 2

Prøve nr.	Eksempel					Sammenligningseksempel		
	1	2	3	4	5	1	2	3
Tørrings-temperatur (°C)	65	80	90	110	145	45	160	Ingen tørring
Vandindhold (vægtprocent) efter tørringsbehandling	20	20	17	12	6	50	2	-
Mængde tørret kultur (kg)	31	31	30	28	27	50	26	-
Mængde varmt vand anvendt til ekstraktion (liter)	250	250	250	250	250	350	250	0
Tilsyneladende viskositet (CPS) af blandingssystem anvendt ved ekstraktion	150	150	100	100	100	200	100	250
Tid nødvendig til adskillelse (minutter)	35	35	35	30	30	60	30	90
Tid nødvendig til ultrafiltrering (timer)	5,5	5,5	5,5	5	5	10	5	20
Kritisk koncentration af renset opløsning (vægtprocent)	15	15	15	15	15	8	15	4

Tabel 2 (fortsat)

Prøve nr.	Eksempel					Sammenligningseksempel		
	1	2	3	4	5	1	2	3
Tid nødvendig til spraytørring (timer)	10	10	10	10	10	24	10	37
Udbytte (gram)	900	900	900	900	900	950	800	950
Antitumorigen effekt (tumorinhibering (%)):								
Intraperitoneal indgivelse	96	97	95	98	97	93	60	95
Oral indgivelse	65	67	70	60	62	65	10	71
Bemærkninger						Indeholdende urenheder		Indeholdende urenheder

Det ses af de i ovenstående Tabel 2 angivne numeriske værdier, at når kulturen, der er fremkommet ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen underkastes en tørringsbehandling under de angivne temperaturforhold, nemlig ved en temperatur i området fra 60 til 150°C, kan den påfølgende ekstraktionsbehandling, ekstraktrensningsbehandlingen, koncentreringsbehandlingen og spraytørringsbehandlingen af den rensede opløsning gennemføres på meget fordelagtig måde og rationelt.

Hvert af de således fremkomne polysaccharidprodukter var et i vand let opløseligt brunt pulver (produktet ifølge sammenligningseksempel 3 indeholdt en spormængde af uopløselige bestanddele). Resultatet af elementaranalyse af produkterne viste, at hvert produkt var sammensat af C, H, N og O, hvoraf N tegnede sig for fra ca. 3 til 3,5%. Resultaterne af de forskellige farvereaktionsprøver, som er vist i Tabel 1, angav også produkternes

positive art. Det bekræftedes af disse resultater, at de ovenfor nævnte produkter var nitrogenholdige polysaccharider.

Det foreliggende stofs inhiberende effekt overfor faste Sarcoma-180 tumorer i mus ved såvel intraperitoneal som oral indgivelse var som vist i tabel 2, som viser den særdeles gode inhiberende effekt i alle tilfælde, undtagen når tørringsbehandlingen gennemførtes ved høj temperatur over 150°C.

Tumor-inhiberingseffekten måltes ifølge en sædvanligt anvendt fremgangsmåde, som er beskrevet i korthed nedenfor.

Sarcoma-180 tumorcellerne transplanteredes intraperitonealt i musene, og efter 7 dages tilstrækkelig vækst transplanteredes 10^6 af disse celler yderligere under skulderhuden af andre mus under dannelse af faste tumorer. Indgivelse af prøverne påbegyndtes 24 timer efter transplantationen.

Stoffet blev opløst i en fysiologisk saltvandsopløsning i en koncentration på 1 mg/ml. Ved intraperitoneal indgivelse blev opløsningen injiceret i gruppen af mus, som havde fået indtransplanteret tumorceller, én gang hver anden dag i alt 10 gange i en dosis på 10 mg stof/kg muselegemsvægt/injektion. Da den gennemsnitlige legemsvægt af de i forsøget anvendte mus var 20 g, var det injicerede volumen opløsning 0,2 ml/mus/injektion.

Ved oral indgivelse blev stoffet indgivet i en dosis på 1000 mg/kg én gang dagligt i en periode på 20 dage, og da den gennemsnitlige legemsvægt af de i forsøget benyttede mus var 20 g, var det indgivne volumen opløsning 20 ml/mus/pr. dag.

Hver tumor udskrælledes 25 dage efter transplantationen, og tumorinhiberingsforholdet beregnedes ud fra middelvægten af tumorer i den gruppe mus, som havde fået indgivet stoffet, og middelvægten af tumorer i kontrolgruppen.

P a t e n t k r a v.

1. Fremgangsmåde til fremstilling af et nitrogenholdigt polysaccharid, ved hvilken en svamp hørende til slægten Coriolus af klassen Basidiomyceter gøres til genstand for submers dyrkning i et vandigt, væskeformigt substrat, og det dannede polysaccharid udvindes fra kulturen, k e n d e t e g n e t ved, at udvindingen foretages ved, at den fremkomne kultur tørres ved en temperatur på fra 60 til 150°C og ekstraheres med et vandigt opløsningsmiddel, og derefter renses den således fremkomne ekstraktopløsning ved derfra at fjerne de stoffer, hvis molekylvægt er mindre end 5.000.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at ekstraktionen med vandigt opløsningsmiddel gennemføres i flere trin.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 2, k e n d e t e g n e t ved, at det vandige opløsningsmiddel er vand og/eller en fortyndet, alkalisk opløsning.

4. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at rensningen af ekstraktopløsningen gennemføres ved ultrafiltrering og/eller omvendt osmose.

Fremdragne publikationer: