



⑫ A **Terinzagelegging** ⑪ **8502483**

Nederland

⑲ NL

- ⑤4 **Geneesmiddel SPF-140 met een werking tegen tumoren, en werkwijze voor de bereiding hiervan.**
- ⑤1 Int.Cl⁸: C12P 13/00, A61K 35/74.
- ⑦1 Aanvragers: Shigezo Udaka te Nagoya, Keiichiro Furukawa te Tokio en Shikibo Ltd. te Osaka, Japan.
- ⑦4 Gem.: Ir. F.X. Noz c.s.
Algemeen Octrooibureau
Boschdijk 155
5612 HB Eindhoven.

- ②1 Aanvraag Nr. 8502483.
- ②2 Ingediend 11 september 1985.
- ③2 Voorrang vanaf 13 september 1984.
- ③3 Land van voorrang: Japan (JP).
- ③1 Nummer van de voorrangsaanvraag: 190560/84 .
- ⑥2 - -

- ④3 Ter inzage gelegd 1 april 1986.

De aan dit blad gehechte stukken zijn een afdruk van de oorspronkelijk ingediende beschrijving met conclusie(s) en eventuele tekening(en).

Korte aanduiding: Geneesmiddel SPF-140 met een werking tegen tumoren,
en werkwijze voor de bereiding hiervan.

5 De uitvinding heeft betrekking op een tegen tumor werkend genees-
middel, aangegeven als SPF-140. Verder heeft de uitvinding betrekking op
een werkwijze voor de bereiding van de actieve stof.

Aangepaste vitale Streptococcus pyogenes is reeds toegepast om
een kanker bestrijdend middel te verkrijgen. Verder is een werkwijze
bekend voor het fijnmaken van cellen van S. pyogenes, de extractie van
10 een actieve stof hieruit met water of een zoutoplossing en toevoeging
hieraan van een organisch oplosmiddel om zodoende een tumoricidale stof
te winnen als precipitaat (zie Japanse octrooipublikatie 1647/1963),
welke werkwijze de bacteriolyse omvat van S. pyogenes met een lysokinase
zoals lysozym of cellulase of een proteïnase en het fractioneren van de
15 actieve fractie als waterige fase (zie Brits octrooischrift 1.163.865)
en een werkwijze bestaande uit het fijnmaken van de cellen van S. pyogenes,
het verzamelen van de in water onoplosbare stoffen en de behandeling hier-
van met een nuclease en een proteïnase (Japanse octrooiaanvraag 7014/1980).

Zoals boven aangegeven is het algemeen bekend dat streptococci
20 zelf of enkele stoffen hiervan een activiteit tegen tumor vertonen. De
tegenwoordig bekende stoffen zijn echter in hoofdzaak bacteriële cellen
of in water oplosbare of onoplosbare polymere bestanddelen van cellen. Ten
einde een actieve stof af te scheiden uit een bacterie is het noodzakelijk
een bacteriolyse uit te voeren of het mechanisch malen van het bacterie
25 houdende materiaal om het geheel te fractioneren. Deze behandelingen kunnen
de zuivering bemoeilijken, zodat het afscheiden van een actieve stof zeer
moeilijk is. De enige actieve stof die in feite is geïsoleerd en bepaald
is een eiwit met een molekulgewicht van 200.000 (zie Japanse octrooi-
publikatie 43841/1973 en de Japanse ter inzage gelegde octrooiaanvraag
30 44617/1976).

Er is eerder onderzoek verricht om een actieve stof tegen tumor
te isoleren, bereid door streptococci en dit is gelukt door het afschei-
den van nieuwe fysiologisch actieve stoffen SPF-1 en SPF-2 en een verdere
tegen tumor actieve stof SPF-100 (Nederlandse octrooiaanvraag 8402388),
35 door toevoeging van penicilline of een daarmee verwant zijnde stof op een
geschikt punt tijdens het kweken van streptococci, het daarna voortzetten
van het kweken en het winnen van de bovenvermelde stoffen, aanwezig in

8502483

het medium uit de gefiltreerde kweekvloeistof, gevolgd door zuiveren. Deze stoffen zouden de groei van een macromolekuul-permeabele mutant van een kolon bacillus MP-2 (FERM-P5432) (zie Agr. Biol. Chem., 43, 371-378 (1979)), verder aan te geven als MP-2-stam, remmen.

5 Verder is gebleken dat de gefiltreerde kweekvloeistof van de streptococci ook een fractie bevat die de groei van de MP-2-stam niet remt maar een tumor bestrijdende werking vertoont naast SPF-1, SPF-2 of SPF-100. De stof van deze fractie wordt aangegeven als SPF-140.

10 De tumor bestrijdende stof SPF-140 volgens de onderhavige uitvinding, afgescheiden in de gefiltreerde kweekvloeistof, wordt hierdoor gekenmerkt, dat deze een molekulgewicht heeft van 25.000-70.000 en geen invloed heeft op de remming van de groei van de MP-2-stam.

 Er zijn geen tumoricidale stoffen bekend samenhangende met S. pyogenes afgescheiden en verzameld in een medium en met een molekuul-
15 gewicht lager dan enkele keren 10.000. Verder kan uit het ultraviolet absorptiespectrum van de tumoricidale stof SPF-140 volgens de uitvinding, hetgeen een peptide-achtige stof blijkt te zijn, op basis van de elementair-analyse en kleurreacties, werden afgeleid dat het een nieuwe stof is, afwijkend van elke bekende tumoricidale stof.

20 Verder omvat de onderhavige uitvinding een werkwijze voor de bereiding van de tumoricidale stof SPF-140, waarbij een SPF-140 producerend streptococcus wordt gekweekt en de tumoricidale stof SPF-140 uit het medium wordt gewonnen.

 De uitvinding wordt nader toegelicht aan de hand van de volgende
25 beschrijving, waarbij is verwezen naar de bijgevoegde tekening, waarin:

 fig. 1 een ultraviolet absorptiespectrum weergeeft van een 0,1% waterige oplossing van SPF-140 en

 fig. 2 een infrarood-absorptiespectrum van deze oplossing weergeeft.

30 Bij de werkwijze volgens de uitvinding kunnen de streptococci worden toegepast die in staat zijn de tumoricidale stof SPF-140 te bereiden. Voorbeelden van de bacteriën zijn:

	<u>Streptococcus pyogenes</u>	ATCC 21060
	<u>Streptococcus sp.</u>	ATCC 21597
35	<u>Streptococcus pyogenes</u>	ATCC 21546
	<u>Streptococcus pyogenes</u>	ATCC 21547
	<u>Streptococcus pyogenes</u>	ATCC 21548.

8502483

Natuurlijke media zoals een medium met vleesextract, gistextract en infusiedmedium van hersens-hart (BHI-medium) zijn vaak toegepast, hoewel elk medium dat geschikt is voor de groei van streptococci kan worden toegepast.

5 Streptococci kunnen onder geschikte omstandigheden tot groeien worden gebracht, te weten bij een pH van 5,0 tot 8,0 (bij voorkeur 6,1 tot 7,2) en bij een temperatuur van 30 tot 40 °C (bij voorkeur 35 tot 37 °C). In het algemeen wordt een anaerobe en statische of geroerde kweek toegepast. Bij de onderhavige werkwijze worden penicilline of daarmee
10 verwant zijnde stoffen toegevoegd op een geschikt punt, welke stoffen een van belang zijnde rol spelen bij het winnen van de tumorcidale stof SPF-140.

Penicilline of daarmee samenhangende stoffen kunnen worden toegevoegd 3 tot 20 uren, bij voorkeur 5 tot 10 uren, na het begin van de
15 logaritmischegroeifase wanneer de bacterie wordt gekweekt bij 37 °C. Het voortzetten van het kweken gedurende 1 tot 20 uren, bij voorkeur 3 tot 15 uren, later, maakt het mogelijk een grote hoeveelheid tumorcidale stof SPF-140 in het medium te verzamelen.

De samenhangende stoffen waarvan bekend is dat ze een vergelijkbare werking hebben als penicilline, kunnen worden toegepast, hoewel
20 penicilline G gewoonlijk wordt gebruikt. Penicilline G wordt toegevoegd in een hoeveelheid van 100 tot 7000 eenheden/ml, bij voorkeur 300 tot 5000 eenheden/ml van het medium.

De aldus verkregen kweekvloeistof wordt gecentrifugeerd om de
25 cellen te verwijderen en ammoniumsulfaat wordt aan het filtraat toegevoegd. Na het terugwinnen van de fracties van 50 tot 90%, berekend op de verzaadiging, kan het verkregen uitgezouten produkt dat de tumorcidale stof SPF-140 bevat, worden opgeslagen in een ingevroren toestand.

De tumorcidale stof SPF-140 wordt gezuiverd uit het uitgezouten
30 produkt door het uitgezouten produkt op te lossen in een bufferoplossing en adsorberen en elueren van de aldus gevormde oplossing volgens een batchgewijze of continue wijze met een ionenwisselaar, gevolgd door gelfiltratie-chromatografie.

Ionenwisselaars zoals een ion-uitwisselhars, een ion-uitwissel-
35 cellulose, ionenwisselaar Sephadex (een produkt van Pharmacia AB) of hydroxylapatiet en gelfiltratiematerialen zoals Toyopearl HW 50F of HW 50SF (produkten van Toyo Soda Mfg. Co., Ltd.) of Sephadex (een produkt

8502483

van Pharmacia AB) kunnen worden toegepast. De adsorptie van de tumoricidale stof SPF-140 door de ionenwisselaar en het elueren van SPF-140 hieruit kan worden uitgevoerd met een bufferoplossing van een geschikte zoutconcentratie en pH-waarde. Twee of meer ionenwisselaars of gelfiltratiematerialen kunnen desgewenst worden gecombineerd.

De tumoricidale stof SPF-140 in een gelyofiliseerde vorm, verkregen in voorbeeld I, zal hierna worden beschreven en dit is een lichtgeel poeder met de volgende fysisch-chemische eigenschappen.

- 1) Elementair-analyse: 42,58 tot 41,79% C, 6,15 tot 5,92% H,
12,69 tot 12,35% N, 36,33 tot 38,78% O en
2,25 tot 1,16% as.
- 2) Molekuulgewicht: ongeveer 25.000 tot 70.000, bepaald volgens gelfiltratie.
- 3) Ontledingspunt: wordt bruin bij 170 °C en zwart bij 245 °C en ontleedt.
- 4) Optische rotatie: $[\alpha]_D^{20} = -70,0^\circ$ tot $-80,0^\circ$ (C = 1,00).
- 5) Ultraviolet absorptiespectrum: fig. 1 geeft een ultraviolet absorptiespectrum weer van een 0,1% waterige oplossing hiervan, gekenmerkt door de maximale absorptie bij 275 nm.
- 6) Infrarood-absorptiespectrum: fig. 2 geeft een infrarood-absorptiespectrum hiervan weer.
- 7) Oplosbaarheid in oplosmiddelen: het is oplosbaar in water, gedeeltelijk oplosbaar in methanol en nauwelijks of niet oplosbaar in oplosmiddelen zoals ethanol, n-propanol, n-butanol, isobutanol, n-hexaan, chloroform, aceton, methylisobutylketon en ethylether.
- 8) Zuurgraad: de pH-waarde van een 1,0% waterige oplossing hiervan is 6,5.
- 9) Vorm: lichtgeel poeder.
- 10) Kleurreacties: ninhydrinereactie: +, biureetreactie: +, Lowry-reactie: +, Molisch-reactie: -, Dische-reactie: -, Anthron-reactie: - en cysteïnesulfaatreactie: -.
- 11) Stabiliteit: er zijn geen stabilisatoren vereist.

Volgens de uitvinding wordt de anti-bacteriële activiteit als volgt bepaald.

8502483

De anti-bacteriële activiteit wordt bepaald door de remmende werking op de groei van het eerder vermelde MP-2. Verder wordt de eenheid van activiteit van een fysiologisch actieve stof bepaald volgens de methode van Udaka (zie J. Antibiotics, 35, 1319 tot 1325 (1982)), ten aanzien van de anti-bacteriële activiteit tegen MP-2.

Daartoe wordt een medium (M3-medium) bestaande uit 1,75% Bact Antibiotic Medium 3 (een produkt van Difco) en 1,3% agar, gesteriliseerd door gedurende 15 minuten te verwarmen tot 120 °C. Vervolgens worden hoeveelheden van 20 ml van het medium uitgegoten in Petrischalen en afgekoeld om plaatvormige media te bereiden.

Los hiervan wordt een medium bestaande uit 0,5% pepton, 0,5% vleesextract, 0,3% natriumchloride en 0,8% agar gesteriliseerd door gedurende 15 minuten te verwarmen tot 120 °C. Vervolgens wordt het geplaatst in een thermostaat bij 42 °C. Wanneer de temperatuur van het medium de waarde van 42 °C bereikt, wordt de MP-2-stam, die is gekweekt bij 37 °C gedurende 17 uren aan het medium toegevoegd bij een concentratie van 10^4 cellen/ml. Van het medium wordt 2 ml verzameld met een pipet en toegevoegd aan het oppervlak van het MS-medium dat te voren is bereid, hierop onmiddellijk homogeen uitgespreid en tot stollen gebracht. Vervolgens wordt een testoplossing op geschikte wijze verdund. Een papieren schijf (diameter 8 mm, een produkt van Toyo Roshi Co., Ltd.) wordt bevochtigd met de aldus verkregen oplossing. Vervolgens wordt deze papieren schijf aangebracht op de plaat zoals boven geprepareerd en de kweek gedurende 17 uren uitgevoerd bij 37 °C om de diameter te bepalen van de zone waarin remming optreedt, bewerkstelligd door de te onderzoeken stof. De concentratie van de te onderzoeken stof, waarbij de diameter van de zone, waarin de remming optreedt, 10 mm is, wordt gedefinieerd als zijnde één eenheid (1 e).

De uitvinding zal nader worden toegelicht aan de hand van de volgende voorbeelden.

Voorbeeld I

Van een BHI-medium werd 100 ml geënt met Streptococcus pyogenes ATCC 21060 en onderworpen aan een statische kweek gedurende 8 uren bij 37 °C om een geënte kweekvloei-stof te verkrijgen. Vervolgens werd 1 liter medium A met de volgende samenstelling: 1,0% vleesextract, 1,0% polypepton, 0,5% maltose, 0,25% gistextract, 0,1% primair kaliumwaterstoffosfaat en 0,05% magnesiumsulfaat en met een pH van 6,8, geënt met de aldus verkregen

8502483

kweekvloei-stof met enting en onderworpen aan een anaerobe eerste kweek onder dezelfde omstandigheden als vermeld voor de entkweek.

Vervolgens werd 8 liter medium A toegevoerd aan een fermentator van 10 liter, gesteriliseerd bij 120 °C gedurende 10 minuten, afgekoeld tot 37 °C en geënt met 1 liter van de eerst gekweekte vloei-stof. Het kweken had anaeroob plaats bij 37 °C en bij een pH van 6,5 gedurende 15,5 uren bij een roersnelheid van 300 omwentelingen per minuut. Vervolgens werden 5000 eenheden/ml penicilline G toegevoegd aan het medium en het kweken werd gedurende nogmaals 5 uren voortgezet. De verkregen kweekvloei-stof werd gecentrifugeerd om de cellen te verwijderen.

Ammoniumsulfaat werd aan de gefiltreerde kweekvloei-stof toegevoegd en een fractie van 50 tot 90% berekend op de verzadiging, werd gewonnen ter verkrijging van het neerslag. Het neerslag bevatte $381,0 \times 10^4$ eenheden fysiologisch actieve stof die de groei van MP-2 remde. Dit neerslag werd opgelost in 300 ml fosfaatbufferoplossing (1×10^{-2} M; pH = 7,0; KH_2PO_4 - Na_2HPO_4) en de verkregen oplossing werd toegevoerd aan een DEAE-cellulosekolom (5 x 70 cm) om zodoende de fysiologisch actieve stof te adsorberen. Daarna werd deze geëluëerd met de bovenvermelde fosfaat-bufferoplossing die 0,3M natriumchloride bevatte, welke eluering stapsgewijs plaatshad om een fractie te fractioneren met een fysiologische activiteit van $283,4 \times 10^4$ e. Deze fysiologisch actieve fractie werd geabsorbeerd aan een DEAE-Sephadex A-25-kolom (2,6 x 70 cm) en daarna geëluëerd waarbij de concentratie van natriumchloride lineair werd verhoogd in de fosfaat-bufferoplossing om de fysiologisch actieve fractie met een activiteit van $249,6 \times 10^4$ e te winnen. Het eluaat werd verder geconcentreerd en toegevoerd aan een kolom (2,6 x 100 cm) van een gel-filtratiemateriaal Toyopearl HW 50F om een niet-bacteriële fractie te winnen die vervolgens werd gelyofiliseerd ter verkrijging van 640 mg van de tumoricidale stof SPF-140.

De aldus verkregen tumoricidale stof SPF-140 werd gebruikt als de te onderzoeken stof in de experimenten 1 en 2, die hierna zullen worden vermeld, om de tumoricidale werking te onderzoeken.

Voorbeeld II

Streptococcus pyogenes ATCC 21060 werd op dezelfde wijze gekweekt als aangegeven in voorbeeld I in een medium B met de volgende samenstelling: 0,5% vleesextract, 1,0% polypepton, 0,25% gistextract en 0,1% natriumchloride. De pH van dit medium was 6,7. Penicilline G werd toege-

8502483

voegd om een concentratie te verkrijgen van 1000 eenheden/ml medium. De gefiltreerde kweekvloeistof werd op dezelfde wijze gezuiverd als aangegeven in voorbeeld I ter verkrijging van 767 mg tumorcidale stof SPF-140.

Voorbeeld III

5 Streptococcus pyogenes ATCC 21060 werd op dezelfde wijze gekweekt als vermeld in voorbeeld I in een medium C met de volgende samenstelling: 1,0% vleesextract, 1,0% polypepton, 0,5% maltose, 0,25% gistextract, 0,1% primair zuur kaliumfosfaat, 0,05% magnesiumsulfaat en 0,5% natriumchloride. De pH van het medium bedroeg 6,5. De gefiltreerde kweekvloeistof werd ge-
10 zuiverd op dezelfde wijze als vermeld in voorbeeld I ter verkrijging van 527 mg tumorcidale stof SPF-140.

Voorbeeld IV

15 Streptococcus pyogenes ATCC 21060 werd gekweekt op dezelfde wijze als vermeld in voorbeeld I in een medium D met de volgende samenstelling: 0,8% maltose, 0,1% polypepton, 0,1% gistextract, 1,43% primair zuur kaliumfosfaat, 0,585% magnesiumsulfaat en 1,0% kaliumnitraat. De pH-waarde van het medium bedroeg 6,5. Penicilline G werd toegevoegd ter verkrijging van een concentratie van 1000 eenheden/ml medium. De gefiltreerde kweekvloeistof werd op dezelfde wijze gezuiverd als aangegeven
20 in voorbeeld I ter verkrijging van 830 mg tumorcidale stof SPF-140.

Voorbeeld V

25 Streptococcus pyogenes ATCC 21060 werd op dezelfde wijze gekweekt als vermeld in voorbeeld I in een medium E met de volgende samenstelling: 0,3% maltose, 0,5% casaminozuren, 1,0% gistextract, 0,5% primair zuur kaliumfosfaat, 0,1% magnesiumsulfaat, 0,1% natriumchloride en 0,5% kaliumnitraat. De pH van medium E bedroeg 6,5. Penicilline G werd toegevoegd ter verkrijging van een concentratie van 1000 eenheden/ml medium. De gefiltreerde kweekvloeistof werd op dezelfde wijze gezuiverd als vermeld in voorbeeld I ter verkrijging van 570 mg tumorcidale stof SPF-140.

30 Experiment 1

De tumorcidale activiteit van de te onderzoeken stof werd in vitro bepaald volgens de bepaling van de mate van cellulaire remming.

35 L-5178Y (Leukemia) toegepast als tumorcellen, werd gesuspenderd in een RPMI 1640-medium dat 10% FCS en 5 mg/l kanamycine bevatte. Van dit medium werd 0,45 ml geïnjecteerd in een Falcon 2058-buis ter verkrijging van een concentratie van 1×10^5 cellen/buis. Vervolgens werd een bepaalde hoeveelheid van de te onderzoeken stof, bereid door de tumorcidale stof

8502483

SPF-140 op te lossen in 0,05 ml medium, in het medium geïnjecteerd en gekweekt in aanwezigheid van 5% CO₂ bij 37 °C. Een kleuring met trypaanblauw werd uitgevoerd 48 uren na de toevoeging van de te onderzoeken stof en de mate van cellulaire remming werd bepaald door de volgende vergelijking:

$$\text{mate van cellulaire remming (\%)} = \frac{(A) - \text{aantal cellen in elke te onderzoeken groep}}{\text{aantal cellen in de ter vergelijking dienende groep (A)}} \times 100.$$

In tabel A zijn de resultaten weergegeven verkregen onder toepassing van de tumoricidale stof SPF-140 als het te onderzoeken middel, waarbij de procentuele graad van cellulaire remming is aangegeven.

TABEL A

SPF-140 (mg/ml)	L-5178Y
2,0	15,3
1,0	11,3

Experiment 2

De tumoricidale activiteit van de te onderzoeken stof werd in vivo bepaald onder gebruikmaking van vrouwelijke CRJ-CD-1 ICR-muizen die 5 weken oud waren.

Sarcoma-180 ascites kankercellen werden als kankercellen gesuspenderd in een fysiologische zoutoplossing en gebruikt. Elke muis kreeg intraperitoneaal 0,2 ml suspensie toegediend die 1×10^6 kankercellen bevatte. Na toediening van de kankercellen werd een bepaalde hoeveelheid van de te onderzoeken stof intraperitoneaal toegediend aan elke muis, hetgeen 1 keer per dag gedurende 7 dagen plaatshad om het aantal levende muizen waar te nemen.

In tabel B zijn de resultaten van het experiment samengevat, waarbij de tumoricidale stof SPF-140 werd gebruikt als het te onderzoeken middel.

TABEL B

Tumoricidale activiteit van SPF-140 (aantal levende muizen)

5

dosering (mg)	dag					
	0	10	15	20	25	30
ter vergelijking	5/5	2/5	1/5	0/5	0/5	0/5
0,3	5/5	5/5	5/5	4/5	4/5	3/5

10

De verlenging van de levensduur (gemiddelde overlevingsperiode (dagen) van de ter vergelijking dienende groep/gemiddelde overlevingsperiode (dagen) van de te onderzoeken groep x 100) van het te onderzoeken middel was 270%.

8502483

CONCLUSIES

1. Tumoricidale stof, aangegeven als SPF-140, met het kenmerk, dat deze de volgende fysisch-chemische eigenschappen heeft:

- 5 (1) Elementair-analyse: 42,58 tot 41,79% C, 6,15 tot 5,92% H,
12,69 tot 12,35% N, 36,33 tot 38,78% O en
2,25 tot 1,16% as.
- (2) Molekuulgewicht: ongeveer 25.000 tot 70.000, bepaald volgens
gelfiltratie.
- 10 (3) Ontledingspunt: wordt bruin bij 170 °C en zwart bij 245 °C en
ontleedt.
- (4) Optische rotatie: $[\alpha]_D^{20} = -70,0^\circ$ tot $-80,0^\circ$ (C = 1,00).
- (5) Ultraviolet absorptiespectrum: fig. 1 geeft een ultraviolet
absorptiespectrum weer van een 0,1% waterige oplos-
15 sing hiervan, gekenmerkt door de maximale absorptie
bij 275 nm.
- (6) Infrarood-absorptiespectrum: fig. 2 geeft een infrarood-
absorptiespectrum hiervan weer.
- (7) Oplosbaarheid in oplosmiddelen: het is oplosbaar in water, ge-
deeltelijk oplosbaar in methanol en nauwelijks of
20 niet oplosbaar in oplosmiddelen zoals ethanol,
n-propanol, n-butanol, isobutanol, n-hexaan, chlo-
roform, aceton, methylisobutylketon en ethylether.
- (8) Zuurgraad: de pH-waarde van een 1,0% waterige oplossing hier-
25 van is 6,5.
- (9) Vorm: lichtgeel poeder.
- (10) Kleurreacties: ninhydrinereactie: +, biureetreactie: +,
Lowry-reactie: +, Molisch-reactie: -,
Dische-reactie: -, Anthron-reactie: - en
30 cysteïnesulfaatreactie: -.
- (11) Stabiliteit: er zijn geen stabilisatoren vereist.

2. Werkwijze ter bereiding van een tumoricidale stof SPF-140,
met het kenmerk, dat een SPF-140 producerend streptococcus wordt gekweekt
en de tumoricidale stof SPF-140 uit het medium wordt gewonnen.

35 3. Werkwijze ter bereiding van een tumoricidale stof SPF-140
volgens conclusie 2, met het kenmerk, dat penicilline of een daarmee verwant
zijnde stof wordt toegevoegd aan het medium bij een geschikt punt tijdens
het kweken van een streptococcus producerende tumoricidale stof SPF-140.

0502483

4. Geneesmiddel met een tumoricidale werking, met het kenmerk, dat een actieve stof zoals vermeld in conclusie 1 in een geneeskundig geschikte toedieningsvorm wordt gebracht.

5

Eindhoven, september 1985

12 485

FIG. 1

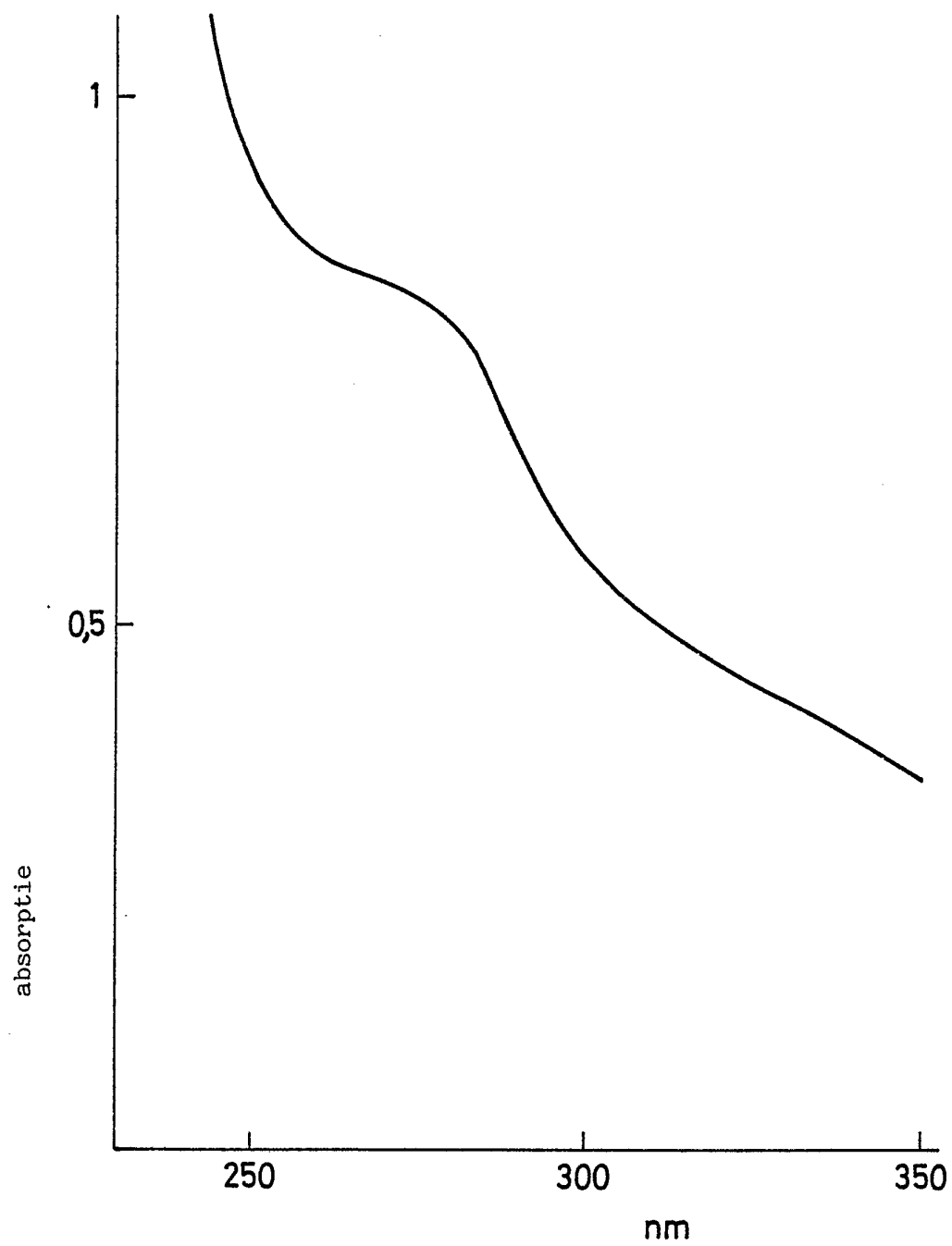
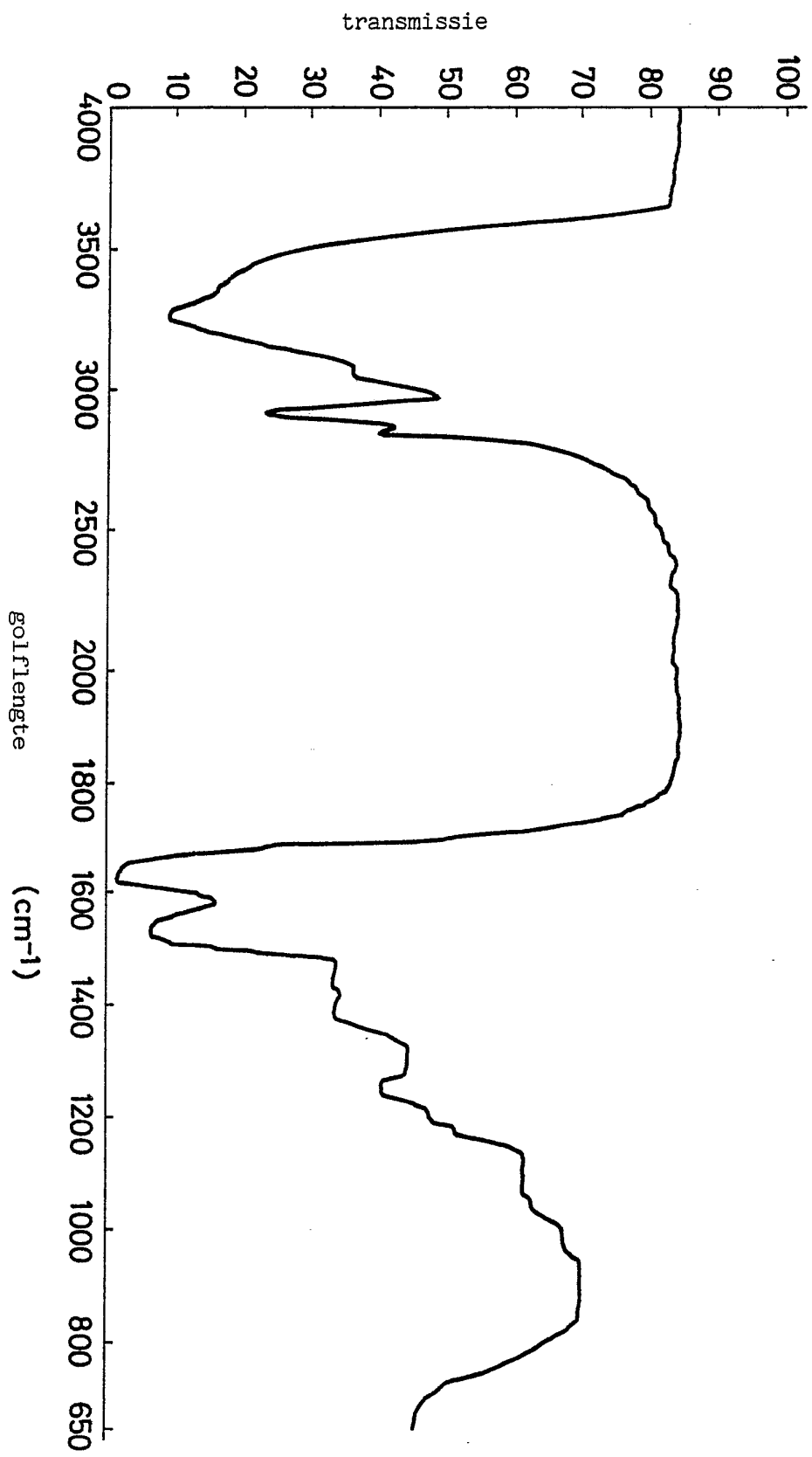


FIG. 2



2502466