

**NORGE**



**STYRET  
FOR DET INDUSTRIELLE  
RETTSVERN**

**Utlegningssskrift nr. 122671**

Int. Cl. C 12 k 3/00 Kl. 30h-6

Patentsøknad nr. 170.137 Inngitt 16.X 1967

Løpedag -

Søknaden alment tilgjengelig fra 1.VII 1968

Søknaden utlagt og utlegningsskrift utgitt 26.VII 1971

Prioritet begjært fra: 21.X 1966 Tyskland,  
nr. R 44408

---

Dr. Eberhard Rehm,  
8961 Dietmannsried, Vockenthal 115, Tyskland.

Oppfinner: Søkeren.

Fullmektig: Siv.ing. Erling Quande.

Frengangsmåte ved utvinning av kulturer ved selektiv dyrkning  
av lactobakterier.

Foreliggende oppfinnelse angår en fremgangsmåte ved utvinning  
av kulturer ved selektiv dyrkning av lactobakterier.

Lactobakterier er de i stoffskiftefysiologisk henseende mest  
spesialiserte bakterier. Av denne grunn blir de i tiltagende grad  
anvendt ved påvisning av selv i mikromengder foreliggende amino-  
syrer, vitaminer og andre biovitale stoffer.

På grunn av deres spesielle krav til næringssubstrat og  
vanskelige dyrkning, er det rutinemessig hittil bare anvendt få,  
forholdsvis robuste arter.

En av de mest påvirkelige og fordringsfulle av lactobakteriene  
er *Lactobacillus bifidus*, som vokser i renkultur i avføringen til  
brysternærte spebarn, men som forsvinner såsnart som morsmelken  
erstattes med flaske-kumelk. Allerede ved ubetydelige endringer i

sammensetningen av dens optimale næringssubstrat, stanser dens vekst.

Det er kjent, f.eks. fra DAS 1.038.240 og fransk patent 2.427M, å dyrke lactobakterier sammen med den ikke patogene *Escherichia coli*, men man har hittil ikke ansett det for mulig å dyrke de følsomme lactobakterier sammen med patogene tarmbakterier, da disse siste, som er ytterst robuste og hurtigvoksende og ikke stiller store krav til næringssubstratet, hurtig utkonkurrerer og tilintetgjør lactobakteriene. Det har imidlertid vist seg at noen få lactobakterier ikke tilintetgjøres av de patogene bakterier. Formålet med oppfinnelsen er ved selektiv dyrkning å tilveiebringe kulturer av slike lactobakterier som er tilpasset til de patogene tarmbakterier og dessuten er mere robuste enn de patogene bakterier slik at de kan utkonkurrere disse.

Ved foreliggende fremgangsmåte utvinnes kulturer ved selektiv dyrkning av lactobakterier, ved at man til et næringssubstrat inneholdende kjente lactobakterier tilsetter kim av patogene tarmbakterier, som kim av tyfus-, paratyfus-, enteritis-, dysenteri- eller dyspepsicolibakterier, og derefter foretar en overpodning til et næringssubstrat, tar ut lactobakterier herfra, og påny overpoder dem til et næringssubstrat inneholdende de nevnte patogene kim, gjentar denne overpodning flere ganger og derpå overpoder de således selektivt dyrkede lactobakteriekim i et næringssubstrat som er fritt for de nevnte patogene kim.

En hensiktsmessig utførelsesform av foreliggende fremgangsmåte består i at der forut for den siste overpodning av de dyrkede lactobakterier til et patogenkimfritt næringssubstrat foretaes en overpodning til et næringssubstrat som inneholder drepte patogene kim fra tarmbakterier. Herved oppnår man absolutt sikkerhet for at det til slutt oppnådde lactobakterieholdige substrat er fritt for patogene kim.

En annen hensiktsmessig utførelsesform for foreliggende fremgangsmåte består i at der som siste patogenkimfrie næringssubstrat anvendes et tyktflytende næringssubstrat på basis av melk og/eller lever. Et slikt tyktflytende næringssubstrat har på grunn av et forholdsvis lavt vanninnhold en forhalende virkning på lactobakterienes vekst.

En ytterligere hensiktsmessig utførelsesform for foreliggende fremgangsmåte består i at den siste lactobakteriekultur inneholdende

næringssubstrat gjøres holdbar ved tørring, frysning eller frysetørring. Herved oppnåes et preparat med en til praktiske formål god holdbarhet.

Det skal tilføyes at der ved foreliggende fremgangsmåte kan tilsettes tarmslimhinne eller aktive stoffer derav til næringssubstratet.

Foreliggende fremgangsmåte gjør det mulig å kunne dyrke *Lactobacillus bifidus* selv i store mengder. Innpodet i kolonier, en pasta eller oppslemning av de ovennevnte kim av patogene tarmbakterier, blir veksten av *Lactobacillus bifidus* i betraktelig grad påskyndet. Herved foregår, som man kan vise i mikrotransplanteringsforsøk med mikromanipulatorførte glasstråder, en nesten fullstendig utkonkurrering av koloniene av patogene kim til fordel for de *Lactobacillus bifidus*-kolonier som til slutt nesten utfyller dem.

En ved løpende ensartede passasjer i ansamlinger av de ovennevnte patogene kim dyrket *Lactobacillus bifidus* er, overført på mennesker eller dyr, istand til også in vivo å utkonkurrere de angjeldende patogene kim og desimere dem i den grad at den av dem fremkalte sykdom opphører.

Hvis de således dyrkede *Lactobacillus bifidus* bakterier administreres til friske mennesker eller dyr, beskytter de på samme måte som fysiologiske tarmbakterier deres vertsorganisme mot eventuelle i legemet innkommende sykdomskim.

På basis av det ved foreliggende fremgangsmåte fremstilte produkt kan man fremstille legemidler som inneholder lactobakterier, spesielt *Lactobacillus bifidus* og/eller *Lactobacillus acidophilus* som er spesielt tilpasset til patogene bakterier, eller disses eggehvitestoffer.

#### Eksempel 1

0,1 ml renkultur av en fra frisk avføring fra et diende spebarn uttatt, in vitro i melk dyrket stamme av *Lactobacillus bifidus* podes i 10 ml skummet søtmeik. Etter 10 timers inkubering tilsettes der 0,1 ml at en patogen dyspepsicolistamme, og der inkuberes i ytterligere 10 timer. Derefter foretaes der utpodning på næringssubstrat i plateform og 24 timers anaerob inkubering ved hjelp av vanlige, i handelen forekommende bakteriologiske arbeidsredskaper. Etter undersøkelse av de åpnede, inkuberte plater under et vanlig, i handelen forekommende spesialmikroskop kan begge slags kim på

122671

4

grunn av deres artskarakteristiske, forskjellige farvefremtoningspreg utskilles nøyaktig og anvendes igjen til subkulturer på samme måte som anført ovenfor. Etter med 2 dagers mellomrom gjentatte, gjennom måneder utførte symbiosedyrkingen av disse to slags kim i melk med stadig foretatte mellomliggende utvelgninger av de til enhver tid til de patogene kims protein best tilpassende bifiduskim utføres dyrkingen av den siste bifidus-subkultur derpå til massiv kimformering på et absolutt dyspepsicolifritt næringssubstrat på basis av melk og/eller lever. Herav kan små mengder uttaes. Næringsmediet kan ved tørring og frysetørring opparbeides til et holdbart preparat.

#### Eksempel 2

Stadig gjentatte symbiosedyrkingen av dyspepsicolibakterier og bifiduskim utføres ifølge eksempel 1, men før den massive formering av den siste bifidus-subkultur i patogenkimfritt næringssubstrat innskytes følgende nest siste subkultur for i tilfelle av en feil ved de mellomliggende utvelgelser å ha absolutt sikkerhet for at det oppnådde preparat er dyspepsicolifritt.

Dyspepsicolikimene podes i de ovenfor angitte mengdeforhold i melk, inkuberes i 3 timer og drepes derpå ved oppvarming i 30 minutter til 60°C. Derefter innpodes de ovenfor angitte mengder av bifiduskim. Denne nest siste subkulturs vesentlige forskjell fra de foregående dyrkingen består således i at bifiduskimene dyrkes i melk som inneholder utelukkende drepte dyspepsicolikim, og dermed uten betenkning kan inngies pr. os til profylaktiske eller terapeutiske formål.

#### Eksempel 3

Fra hver avføring fra en forsøksperson ble der med en platinaløkke tatt en brøkdel av et gram som ble smurt på et proteinholdig, ved hjelp av agar i gelform overført fast næringssubstrat. Næringssubstratet ble derefter inkubert i et tidsrom på 1 - 3 dager ved 37 - 42°C, og derpå ble en mengde omtrent av størrelse som et knappenålshode av bifiduskoloni podet i ca. 50 ml steril melk. Derefter ble en omtrent like stor mengde (likeledes av omtrent samme størrelse som et knappenålshode) av i handelen forekommende dyspepsicolikim innført i den samme melk, hvorefter der ble foretatt en inkubering av ca. 2 dagers varighet ved 37 - 42°C. Derefter ble der med en vanlig løkke tatt en brøkdel av en ml, som ble strøket ut på et fast næringssubstrat og igjen inkubert i ca.

2 dager ved 37 - 42°C. Herefter ble der under anvendelse av et spesialmikroskop og biokjemiske kontrollforanstaltninger med en vanlig løkke uttatt en enkelt renkulturkoloni av *Lactobacillus bifidus*, som ble podet i ca. 50 ml steril melk og igjen inkubert ved 37 - 42°C i ca. 1 dag. Denne melk ble derefter inntatt pr. os. Fra den neste avføring ble der igjen uttatt en liten mengde, hvorefter man gikk frem som ovenfor beskrevet. Denne stadig gjentatte tilpasning av *Lactobacillus bifidus* til patogene kim og tarmmiljø er inntil nu blitt utført ca. 400 ganger etter hverandre, uten at der kunne konstateres den minste helbredmessige skade på forsøkspersonen.

#### P a t e n t k r a v

1. Fremgangsmåte ved utvinning av kulturer ved selektiv dyrkning av lactobakterier, k a r a k t e r i s e r t v e d at man til et næringssubstrat inneholdende kjente lactobakterier, tilsetter kim av patogene tarmbakterier, som kim av tyfus-, paratyfus-, enteritis-, dysenteri- eller dyspepsicolibakterier, og derefter foretar en overpodning til et næringssubstrat, tar ut lactobakterier herfra, og påny overpoder dem til et næringssubstrat inneholdende de nevnte patogene kim, gjentar denne overpodning flere ganger og derpå overpoder de således selektivt dyrkede lactobakteriekim i et næringssubstrat, som er fritt for de nevnte patogene kim.

2. Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at der forut for den siste overpodning av de dyrkede lactobakterier til et patogenkimfritt næringssubstrat foretaes en overpodning til et næringssubstrat som inneholder drepte patogene kim fra tarmbakterier.

3. Fremgangsmåte ifølge krav 1 k a r a k t e r i s e r t v e d at der som siste patogenkimfrie næringssubstrat anvendes et tyktflytende næringssubstrat på basis av melk og/eller lever.

4. Fremgangsmåte ifølge krav 1 eller 3, k a r a k t e r i s e r t v e d at den siste lactobakteriekultur inneholdende næringssubstrat gjøres holdbar ved tørring, frysing, eller frysetørring.

Anførte publikasjoner:

Fransk patent nr. 2427 M

Tysk utl.skrift nr. 1.038.240