



Patentdirektoratet
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 2511/86

(51) Int.Cl.5

C 12 P 1/04

(22) Indleveringsdag: 29 maj 1986

/(C 12 P 1/04,
C 12 R 1:01)

(24) Lebedag: 17 feb 1982

(41) Alm. tilgængelig: 29 maj 1986

(44) Fremlagt: 28 dec 1992

(86) International ansøgning nr.: -

(62) Stamansøgning nr.: 0692/82

(30) Prioritet: 19 feb 1981 JP 22270/81 19 feb 1981 JP 22271/81 19 feb 1981 JP 22272/81

19 feb 1981 JP 22273/81 19 feb 1981 JP 22274/81 19 feb 1981 JP 22275/81

19 feb 1981 JP 22276/81 19 feb 1981 JP 22277/81 29 jan 1982 JP 11744/82

(71) Ansøger: *TOYAMA CHEMICAL CO. LTD.; 2-5, 3-chome; Nishishinjuku; Shinjuku-ku; Tokyo 160, JP

(72) Opfinder: Kenzo *Tamai; JP, Isamu *Saikawa; JP, Takashi *Yasuda; JP, Shohechi *Murakami; JP, Toyoo *Maeda; JP, Hiatsugu *Tsuda; JP, Hiroshi *Sakai; JP, Masatoshi *Sugita; JP, Yoshiko *Yamamoto; JP, Hisashi *Minami; JP, Takako *Hori; JP

(74) Fuldmægtig: Hofman-Bang & Bourard A/S

(54) Fremgangsmåde til fremstilling af TF-220, TF-230 og TF-240 forbindelser og de tilsvarende proteinfrie forbindelser

(56) Fremdragne publikationer

(57) Sammen drag:

2511-86

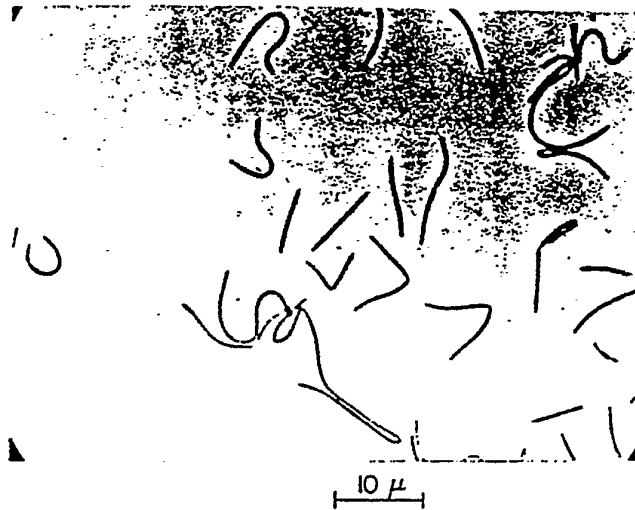
TF-220, TF-230 og TF-240 forbindelser og de tilsvarende proteinfrie forbindelser fremstilles ved dyrkning af *Fusobacterium nucleatum* TF-031 (FERM 5077, ATCC 31647) eller en mutant heraf i et dyrkningssubstrat under anaerobe betingelser, hvorefter et hydrofilt organisk opløsningsmiddel tilsættes substratet eller den supernatante væske heraf. Efter isolering af det derved fremkomne bundfald ekstraheres med vand ved pH 7,5-8, og ekstrakten behandles ved trinvis indstilling af pH til 5,5-6,5, 3,5-4,5 og 1,5-2,5, hvorved der dannes bundfald på de enkelte trin. Der oprenses og isoleres fra de enkelte trin eller behandles til fjernelse af proteindelen til opnåelse af ovennævnte forbindelser.

Forbindelserne er lægemidler med carcinostatisk og immunostimulerende virkning.

fortsættes

2511-86

FIG. 1



Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til fremstilling af hidtil ukendte forbindelser, der udviser carcinostatisk og immunostimulerende virkninger, og som betegnes TF-220, TF-230 og TF-240, og de tilsvarende proteinfrie forbindelser som betegnes TF-320, TF-330 og TF-340.

I de senere år har man i udstrakt grad anvendt lægemidler til patienter med forskellige typer cancer, der bevirker en forøgelse af værtsorganismens immunologiske aktivitet, hvorved der opnås en carcinostatisk virkning med hjælp fra den immunologiske funktion. Som antitumormidler i et sådant lægemiddel kendes forbindelser, der opnås fra forskellige bakterieorganismer eller forskellige bakteriekulturer eller polysaccharider, der er opnået fra frugtlegerne af Basidiomycetes eller dyrkede svampelegemer heraf.

Man har nu undersøgt den farmakologiske virkning af den supernatante væske, der er opnået ved at dyrke *Fusobacterium nucleatum* TF-031 (FERM 5077; ATCC 31647) og fjerne organismene fra kulturen, og har fundet, at en særlig komponent, der fås fra den supernatante væske, udviser en carcinostatisk virkning. Man har fundet, at komponenten har en indirekte carcinostatisk virkning ved at forøge den værtsformidlede antitumorstyring eller værtsens immunitet og at udnytte denne. Komponentens udviser særdeles lav toxicitet, og den kan opnås også ved at behandle selve kulturen.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen er i overensstemmelse hermed ejendommelig ved det i krav 1's kendetegnende del anførte.

Fra beskrivelsen til dansk patentansøgning nr. 3616/80 må det endvidere anses for kendt at fremstille en stofblanding betegnet TF-100 eller fraktioner heraf med carcino-

statiske og immunostimulerende virkninger ved en fremgangsmåde som er ejendommelig ved at *Fusobacterium nucleatum* TF-031 (FERM 5077; ATCC 31647) dyrkes i et passende næringssubstrat, hvorefter et hydrofilt organisk opløsningsmiddel sættes til kulturen eller dennes supernatante del. Herefter isoleres det dannede bundfald, og den vandopløselige fraktion af bundfaldet isoleres og underkastes eventuelt efterfølgende dialyse, ultrafiltrering, behandling med ionbytter, udfældning med bariumioner og efterfølgende fjernelse af barium, dialyse og ultrafiltrering eller den vandopløselige fraktion tilsættes et kvaternært ammoniumsalt, bundfaldet isoleres, og der dissocieres, idet de ønskede fraktioner isoleres på det enkelte behandlingstrin.

Opfindelsen beskrives nærmere i det følgende.

Som den anvendte bakterie ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen anvendes *Fusobacterium nucleatum* TF-031 (FERM 5077; ATCC 31647) og spontane mutanter eller kunstigt modificerede mutanter heraf med væsentlig samme egenskaber.

De bakteriologiske egenskaber af *Fusobacterium nucleatum* TF-031 er følgende:

25

(I) Form

- (1) celleform: tenformede (fig. 1)
- (2) cellernes polymorphisme: ingen
- 30 (3) bevægelighed: ingen
- (4) sporer: ingen
- (5) gramfarvning: gram-negativ
- (6) syrereresistens: negativ

35 (II) Vækstbetingelser i et dyrkningssubstrat:

- (1) TF-a agarplade og skråagardyrkningssubstrat
Ydre form: rund
Størrelse: ca. 1 mm
Udvækst: halvkugleformet
Struktur: dugdråbeagtig
Overflade: glat
Kanter: glat
Farve: mælkeagtig gullighvid
Gennemskinnelighed: uigennemsigtig
- (2) TF-a flydende dyrkningssubstrat
Vækst: kraftig
Turbiditet: koagulering
Bundfald: intet
Overfladevækst: ingen, ingen vækst til en dybde på ca. 5 mm
Gasudvikling: ingen

(III) Fysiologiske egenskaber

- (1) Produktion af hydrogensulfid: +
(2) Reduktion af nitrater: -
(3) Produktion af smørsyre: +
(4) Produktion af indol: +
(5) Urease: -
(6) Katalase: -
(7) Stivelseshydrolyse: -
(8) Oxygenkrav: anaerob
(9) Produktion af ammoniak: +
(10) Produktion af carbondioxid: +
(11) Vækstområde: pH 5,0-8,5, temperatur 30-45 °C
(12) Produktion af gas fra sukkerarter: L-arabinose (-), D-xylose (-), D-glucose (-), D-mannose (-), D-fructose (-), D-galactose (-), maldsukker (-), sucrose (-), trehalose (-), sorbitol (-), mannitol (-), inositol (-), glycerol (-), stivelse (-).

Forbindelserne betegnet TF-220, TF-230, TF-240, TF-320, TF-330 og TF-340 fremstilles på følgende måde:

5

10

15

20

25

30

35

Dyrkning af *Fusobacterium nucleatum* TF-031

Kultur eller den supernatante væske heraf

Hydrofilt organisk opløsningsmiddel —————>
Opløselig fraktion <———— Adskillelse

Bundfald

Vand —————> Ekstraktion ved pH 7,5-8,0

Fraktionering afhængig af pH

[Opsamling af en fraktion, der er vandopløselig i nærheden af pH 6 → TF-220
Opsamling af en fraktion, der er vandopløselig i nærheden af pH 6, → TF-230
men vandopløselig i nærheden af pH 4
Opsamling af en fraktion, der er vandopløselig i nærheden af pH 4, → TF-240
men vandopløselig i nærheden af pH 2]

TF-220



TF-230



TF-240



TF-320

TF-330

TF-340

* Fjernelse af protein

Ovennævnte produktionsmetode beskrives nedenfor:

(1) Dyrkning af bakterier

- 5 Dyrkning af *Fusobacterium nucleatum* TF-031 udføres på almindelig måde til dyrkning af anaerobe bakterier. Dvs., et dyrkningssubstrat indeholdende en nitrogenkilde som f.eks. oksehjerne-hjerteekstrakter, forskellige peptoner eller lignende; en vitaminkilde som f.eks. gærekstrakt
10 eller lignende; et uorganisk salt som f.eks. natriumchlorid eller lignende; en carbonkilde som f.eks. glucose, lactose eller lignende; et reducerende middel som f.eks. L-cystin, natriumsulfit, thioglycolat eller lignende, indstilles til en pH-værdi på 6-8,5, fortrinsvis 6,5-7,5,
15 og bakterierne udsåes på/i dyrkningssubstratet, hvorefter steady-state-dyrkning udføres under anaerobe betingelser ved 30-42 °C, fortrinsvis 32-37 °C i 1-5 dage, fortrinsvis 24-96 timer. Specielt er det ønskeligt at anvende dyrkningssubstraterne beskrevet i tabel 1 (i det efterfølgende omtalt som TF-dyrkningssubstrat). Imidlertid er
20 hjerne-hjerte-infusionssubstratet, der er et oksehjerne-hjerte-ekstrakt, ikke altid nødvendigt som nitrogenkilde, og det kan erstattes med et hjerteinfusionssubstrat, der er et oksehjerteekstrakt, kødekstrakt, fiskeekstrakt, majsstøbevæske eller lignende. Blandt de forskellige peptoner, er proteosepepton og phytonpepton ikke altid nødvendige, og trypticasepeptonen kan erstattes med polypepton.
25
- 30 Dersom agar ikke anvendes, er det en fordel at omrøre kulturen.

TABEL 1

Bestanddele af dyrkningssubstrat (g/liter)	TF-a	TF-b	TF-c	TF-d	TF-e	TF-f
Trypticase pepton	17	17	17	17	17	17
Phytonpepton	3	3	1,5	-	-	-
Proteosepepton	10	5	5	-	-	-
Hjerne-hjerte- infusion	35	17,5	-	-	-	-
Hjerteinfusion	-	-	25	20	10	15
Garekstrakt	3	3	3	3	3	3
Natriumchlorid	0,75	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5
Glucose	6	6	6	12	12	12
Lactose	5	5	5	10	10	10
L-cystin	0,25	0,5	0,5	-	-	-
Natriumsulfit	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Thioglycolat	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Agar	0 eller 0,7	0 eller 0,7	0 eller 0,7	0 eller 0,7	0 eller 0,7	0 eller 0,7

(2) Indsamling af den supernatante væske fra kulturen (fjernelse af organismerne)

Organismerne fjernes fra den ovennævnte opnåede kultur for at opnå en supernatant væske. For at fjerne organismerne kan en almindelig metode som centrifugering og filtrering anvendes, idet der bruges en filterhjælp som f.eks. Hyflo-Super-Cel, og specielt foretrækkes en centrifugeringsmetode af driftsmæssige hensyn på grund af mængden af fjernede organismer og udbyttet af den supernatante væske.

(3) Opsamling af carcinostatisk forbindelse TF-220, TF-230, TF-240, TF-320, TF-330 og TF-340

(i) (a) På dette tidspunkt indstilles den supernatante væske eller kulturen fortrinsvis til pH 1,5-7, fortrinsvis i nærheden af pH 2 (pH 1,5-2,5). Et hydrofilt organisk opløsningsmiddel sættes til den ovennævnte supernatante væske eller kultur, og det dannede bundfald opsamles. Hydrofile organiske opløsningsmidler omfatter f.eks. alkoholer som ethanol eller methanol, ketoner som f.eks. acetone, idet alkoholerne, specielt ethanol, giver det bedste resultat. Det hydrofile organiske opløsningsmiddel sættes fortrinsvis til på en sådan måde, at koncentrationen af dette bliver 30-80 rumfang-%, specielt 50-80 rumfang-%. Efter tilsætningen af det hydrofile organiske opløsningsmiddel, henstår den fremkomne blanding ved lav temperatur, fortrinsvis ved ca. 5 °C, i flere timer til adskillige dage, for at fuldende dannelsen af bundfaldet.

Det således dannede bundfald fraskilles ved almindelige metoder som f.eks. dekantering, centrifugering eller filtrering.

(b) Til det ovenfor fraskilte bundfald sættes vand sædvanligvis i en mængde på 5-20 gange bundfaldets, og bund-

faldet fraskilles afhængigt af pH. Specielt udføres denne procedure som følger:

5 (b-1) Det under (a) opnåede bundfald tilsættes separat vand sædvanligvis i en mængde på 5-20 gange bundfaldets. Blandingen indstilles til pH 7,5-8. Efter eventuel fjernelse af den uopløselige del, indstilles blandingen til nær pH 6 (5,5-6,5). De fremkomne vandopløselige og vandopløselige dele skilles fra hinanden ved en almindelig metode som f.eks. centrifugering eller filtrering. Den 10 således opnåede vandopløselige del (TF-220) har de i tabel 2 angivne egenskaber.

15 (b-2) Den vandopløselige del fraskilt ovenfor under (b-1) indstilles til nær pH 4 (3,5-4,5). Bundfaldet og den opnåede vandopløselige del skilles fra hinanden ved en almindelig metode som f.eks. centrifugering eller filtrering. Det opnåede bundfald (TF-230) har de i tabel 2 angivne egenskaber.

20 (b-3) Den under (b-1 eller b-2) fraskilte vandopløselige del indstilles til nær pH 2 (1,5-2,5), hvorved der dannes et bundfald. Bundfaldet skilles fra den vandopløselige del ved almindelige metoder som f.eks. centrifugering eller filtrering. Det fremstillede bundfald (TF-240) har de 25 i tabel 2 angivne egenskaber.

De således opnåede carcinostatisk forbindelser TF-220, TF-230 og TF-240 kan hver flere gange underkastes samme 30 fraktionering afhængig af pH for at renses. De således opnåede carcinostatisk forbindelser kan hver omdannes ved almindelige metoder til farmaceutisk acceptable salte heraf som f.eks. alkalimetalsalte som natriumsalte eller kaliumsalte og jordalkalimetalsalte, som f.eks. magnesiumsalte eller calciumsalte. 35

(ii) De under (i) opnåede fraktioner, TF-220, TF-230 og TF-240 underkastes hver proteinfjernelsesbehandling ved almindelige metoder, hvorved der opnås TF-320, TF-330 og TF-340. For at fjerne protein kan der anvendes fremgangsmåder, der er velkendte inden for fagområdet, og særligt foretrukken er en metode, der nedbryder med proteolytiske enzymer. Dersom det ønskes, at fjernelsen af protein udføres ved en behandling med et proteolytisk enzym, er det tilstrækkeligt, at hver af de under (i) ovennævnte opnåede fraktioner med carcinostatisk virkning opløses eller opslæmmes i vand eller en pufferopløsning, at den fremkomne opløsning eller suspension tilsættes et proteinnedbrydende enzym, og at enzymbehandlingen udføres på sædvanlig måde.

Som proteolytiske enzymer kan nævnes pronase, papain, trypsin, chymotrypsin og lignende. Pronase og trypsin foretrækkes. Det foretrækkes inden eller under enzymbehandlingen, at den vandige opløsning indstilles til og holdes ved pH 7-8. Til dette formål kan anvendes natriumhydroxid, kaliumhydroxid, natriumcarbonat, natriumhydrogencarbonat og lignende. For at forhindre nedbrydning af reaktionsblandingen under enzymbehandlingen er det en fordel at tilsætte en lille mængde af et organisk opløsningsmiddel som f.eks. chloroform, toluen eller lignende. Enzymet anvendes sædvanligvis i en mængde på ca. 1-2 vægt-% baseret på vægten af pulveret (tørstof), der skal underkastes enzymbehandlingen.

Den ovennævnte enzymbehandling udføres sædvanligvis ved 30-40 °C i 1-72 timer, fortrinsvis 24-48 timer. Den kan også udføres ved f.eks. først at tilsætte ca. 1 vægt-% af et enzym til pulveret (tørstof), og underkaste pulveret (tørstoffet) for enzymbehandling i 1-24 timer og herefter yderligere tilsætte ca. 1 vægt-% af enzymet igen for yderligere at enzymbehandle.

Efter ovennævnte enzymbehandling fjernes uopløselige dele eventuelt ved en behandling som f.eks. centrifugering eller filtrering, hvorefter der fra den således opnåede vandopløselige del opsamles de pågældende fraktioner af de carcinostatisk forbindelser TF-320, TF-330 og TF-340. På denne måde kan TF-320 fås fra TF-220, TF-330 fra TF-230 og TF-340 fra TF-240. Isoleringen af TF-320, TF-330 og TF-340 kan udføres ved i det mindste én fraktioneringsmetode afhængig af pH, separat udfældning med et hydrofilt organisk opløsningsmiddel, ved fraktionering med en ionbytter eller ved ultrafiltrering. Eventuelt kan én eller flere af disse behandlinger gentages flere gange. De carcinostatisk forbindelser TF-320, TF-330 og TF-340 fås specielt ved at indstille den ovennævnte vandopløselige dels pH til fortrinsvis en pH-værdi på ikke over 2,5 (eventuelt kan trichloreddikesyre tilsættes), fjerne det fremkomne bundfald, tilsætte den opløselige del et hydrofilt organisk opløsningsmiddel som f.eks. en alkohol, således at koncentrationen af denne bliver 30-80 rumfang-%, fortrinsvis 60-80 rumfang-%, opsamle det fremkomne bundfald, der er en fraktion af den omhandlede forbindelse, og herefter eventuelt behandle dette bundfald med en stærk anionbytterharpiks som f.eks. Dowex[®] 1, Amberlite[®] IRA-400 eller lignende (denne behandling kan udføres flere gange) for at opsamle de uadsorberede fraktioner, eventuelt underkaste fraktionerne ultrafiltrering (f.eks. Toyo Ultrafilter UK-50 [molekylvægtsafskæring: 50 000] eller Toyo Ultrafilter UK-200 [molekylvægtsafskæring: 20 000]), og herefter underkaste dem f.eks. koncentration, afsaltning, tørring eller udfældning fra et hydrofilt organisk opløsningsmiddel eller lignende. De således opnåede carcinostatisk forbindelser TF-320, TF-330 og TF-340 har de i tabel 2 angivne egenskaber.

De carcinostatisk forbindelser TF-320, TF-330 og TF-340 kan omdannes til farmaceutisk acceptable salte heraf ved almindelige metoder. Specielt skal f.eks. nævnes alkali-

metalsalte som f.eks. natriumsalte eller kaliumsalte og jordalkalimetalsalte som f.eks. magnesiumsalte eller calciumsalte som eksempler på farmaceutisk acceptable salte.

5

10

15

20

25

30

35

TABEL 2

Egenskaber Fraktion	Udseende	Farmakologisk virkning	Opløselighed
TF-220	gråhvidt- lysebrunt pulver	Denne fraktion hæmmer prolifera- tionen af Ehrlich tumor ascites, Ehrlich faste tumor, Sarcoma 180 og B-16 melanom hos mus og har en immunostimulerende virkning	Uopløselig i methanol, ethanol, acetone, benzen, chloroform, ethylacetat og diethylether
TF-230	"	"	"
TF-240	"	"	"
TF-320	"	Denne fraktion hæmmer prolifera- tionen af Ehrlich tumor ascites og Sarcoma 180 hos mus og har en immuno- stimulerende virkning	"

TABEL 2 (fortsat)

Egenskaber Fraktion	Udseende	Farmakologisk virkning	Opløselighed
TF-330	"	Denne fraktion hæmmer proliferationen af Ehrlich tumor ascites hos mus og har en immunostimulerende virkning	"
TF-340	"	"	"

TABEL 2 (fortsat)

Egenskaber Fraktion	Dekomponerings- punkt	Infrarøde absorptionspektre (KBr metode) cm ⁻¹	Elementaranalyseværdier		
			C (%)	H (%)	N (%)
TF-220	Denne fraktion viser ikke skarpt smelte- punkt og dekom- ponerer ved 160-240 °C	Dette spektrum har absorptions- bånd i nærheden af 3600-3200, 2950-2920, 1680-1620, 1550-1510, 1440-1380, 1240-1220 og 1120- 1020 cm ⁻¹	40-42	5-7	7-9
TF-230	Denne fraktion viser ikke skarpt smelte- punkt og dekom- ponerer ved 185-225 °C	"	42-45	5-7	10-11
TF-240	Denne fraktion viser ikke skarpt smelte- punkt og dekom- ponerer ved 200-215 °C	Dette spektrum har absorptions- bånd i nærheden af 3600-3200, 2950-2920, 1680-1620, 1550-1520, 1410-1360, 1280-1210, 1060, 960 og 820 cm ⁻¹	35-38	4-5	12-14

Tabel 2 (fortsat)

Egenskaber Fraktion	Dekomponerings- punkt	Infrarøde absorptionspektre (KBr metode) cm	Elementaranalyseværdier		
			C (%)	H (%)	N (%)
TF-320	Denne fraktion begynder at de- komponere ved ca. 180 °C og dekomponerer fuldstændigt over 195 °C	Dette spektrum har absorptions- bånd i nærheden af 3500-3300, 2920, 2850, 1660-1620, 1580-1540, 1460-1400, 1380-1360, 1120, 1080- 1020, 970 og 820-800 cm ⁻¹	38-47	5-7	1-4
TF-330	"	"	38-47	5-7	1-4
TF-340	Denne fraktion begynder at de- komponere ved ca. 140 °C og dekomponerer fuldstændigt over 200 °C	Dette spektrum har absorptions- bånd i nærheden af 3500-3300, 2920, 2850, 1660-1640, 1580-1520, 1460-1440, 1410-1340, 1250-1220, 1120-1030, 970 og 835 cm ⁻¹	32-34	4-6	3-5

TABEL 2 (fortsat)

Egenskaber	farvereaktion					
	Ninhydrin-reaktion	Molisch-reaktion	Phenol-H ₂ SO ₄ -reaktion	Anthron-H ₂ SO ₄ -reaktion	Indol-HCl-reaktion	Lowry-Folin-reaktion
Fraktion						
TF-220		+	+	+	+	+
TF-230		+	+	+	+	+
TF-240		+	+	+	+	+
TF-320	-	+	+	+	+	+
TF-330	-	+	+	+	+	+
TF-340	-	+	+	+	+	

TABEL 2 (fortsat)

Egenskaber Fraktion	Ultraviolette absorptions- spektre (vandig opløsning ved pH 7,0) λ max (nm)	Saccharidindhold udtrykt som glucose målt ved phe- nol-H ₂ SO ₄ -metoden (%)	Proteinindhold udtrykt som som bovint serumalbumin målt ved Lowry-Folin's metode (%)
TF-220	Ved absorptionskanten og i nærheden af 248-266 nm*	ca. 5 - ca. 25	$\leq$ ca. 10
TF-230	Ved absorptionskanten og i nærheden af 249-266 nm	ca. 5 - ca. 25	ca. 30 - ca. 60
TF-240	Ved absorptionskanten og i nærheden af 250-265 nm	ca. 15 - ca. 35	ca. 20 - ca. 30
TF-320	Ved absorptionskanten og i nærheden af 246-280 nm	ca. 16 - ca. 60	$\leq$ ca. 10
TF-330	Ved absorptionskanten og i nærheden af 246-280 nm	ca. 16 - ca. 60	$\leq$ ca. 10
TF-340	Ved absorptionskanten og i nærheden af 250-265 nm	ca. 20 - ca. 50	$\leq$ ca. 10

* Bemærkning: Målingen udførtes på de vandopløselige fraktioner.

De farmakologiske virkninger af de carcinostatisk for-
bindelser TF-220, TF-230, TF-240, TF-320, TF-330 og TF-
340 er som beskrevet nedenfor. I de følgende farmakolo-
giske forsøg opnåedes forsøgsforbindelsen TF-220 som be-
skrevet i eksempel 1, TF-230 som beskrevet i eksempel 3,
TF-240 som beskrevet i eksempel 5, TF-320 som beskrevet i
eksempel 6, TF-330 som beskrevet i eksempel 7 og TF-340
som beskrevet i eksempel 8.

10 (1) Immunostimulerende virkning

Tre ICR-stamme mus (hunmus 6 uger gamle) anvendtes for
hver gruppe. Hver af forsøgsforbindelserne opløstes i en
fysiologisk saltopløsning, og 0,2 ml af hver af de frem-
stillede opløsninger administreredes intraperitonealt til
musene. 24 timer efter administreringen injiceredes 0,2
ml af en carbonsuspension fremstillet ved at blande 1 ml
Pelikan blæk 17 sort (fremstillet af Günther-Wagner Co.,
Ltd.) med 2 ml af en fysiologisk saltopløsning indehol-
dende 3 vægt-% gelatine intravenøst i musens hale, og 1,
5, 10 og 15 minutter efter injektionen opsamledes 0,02 ml
af blodet fra øjenhulen under anvendelse af et hemato-
kritkapillær beklædt med heparin, og der fortyndedes
straks og hæmolyseredes med 1,6 ml af en 0,1 vægt-% van-
dig natriumcarbonatopløsning. Denne opløsning underkaste-
des kolorimetrisk bestemmelse ved 675 nm, og det phago-
cytotiske indeks (K-værdi) bestemtes ud fra ligningen be-
skrevet af Halpern et al.

30 Til musene i kontrolgruppen administreredes 0,2 ml af en
fysiologisk saltopløsning.

$$K = \frac{\log C_0 - \log C}{t - t_0}$$

hvor C_0 = carbonpulverindhold i blodet til tiden t_0 , og
 C = carbonpulverindholdet i blodet til tiden t .

Resultaterne er vist i tabel 3-5.

TABEL 3

Forbindelse	Dosis (mg/kg)	Gennemsnits K-værdi
TF-220	1,5 3	0,1087 $\pm$ 0,0346 0,1292 $\pm$ 0,0289
TF-230	5 10	0,1028 $\pm$ 0,0175 0,1194 $\pm$ 0,0334
TF-240	5 10	0,1109 $\pm$ 0,0250 0,1127 $\pm$ 0,0496
Kontrol	-	0,0348 $\pm$ 0,0037

TABEL 4

Forbindelse	Dosis (mg/kg)	Gennemsnits K-værdi
TF-320	0,1 1	0,0468 $\pm$ 0,0123 0,0715 $\pm$ 0,0040
TF-330	0,1 1	0,0601 $\pm$ 0,0098 0,0965 $\pm$ 0,0102
Kontrol	-	0,0295 $\pm$ 0,0007

TABEL 5

Forbindelse	Dosis (mg/kg)	Gennemsnits K-værdi
TF-340*	5	0,1292 $\pm$ 0,0229
	10	0,1001 $\pm$ 0,0295
Kontrol	-	0,0408 $\pm$ 0,0016

*Bemærkning: Forsøget udførtes på en gruppe bestående af
4 mus.

(2) Carcinostatisk virkning

(i) Antitumorvirkning over for Ehrlich tumor ascites

Ehrlich tumor ascitesceller indsprøjtedes intraperitonealt i ICR-stamme mus (hunmus, 6 uger gamle) i en mængde på 1×10^5 celler pr. mus. Herefter opløstes hver af forsøgsforbindelserne i fysiologisk saltopløsning, og 0,2 ml af hver af de fremstillede opløsninger administreredes intraperitonealt til musene en gang om dagen i 7 på hinanden følgende dage fra den første dag efter indsprøjtning af tumorcellerne. Til kontrolgruppen administreredes 0,2 ml fysiologisk saltopløsning på samme måde som beskrevet ovenfor.

Resultaterne er angivet i tabel 6 og 7.

$$T/C = \frac{\text{Overlevelsesdage for musene i en gruppe til hvilken, der er administreret forsøgsforbindelse}}{\text{Overlevelsesdage for mus i kontrolgruppen}} \times 100 (\%)$$

TABEL 6

Forbindelse	Dosis (mg/kg x antal admini- streringer)	Gennemsnitsoverlevelses- dage (dag)	T/C (%)	Forhold af overlevende i 30 dage	Forhold mellem fuldständig hel- bredelse
TF-220	0,3 x 7 1,5 x 7	>22,8 + 6,1 >29,1 + 2,3	>135 >173	2/8 7/8	1/8 5/8
TF-230	1 x 7 5 x 7	>29,9 + 0,3 >28,3 + 4,6	>177 >168	7/8 7/8	7/8 7/8
TF-240	1 x 7 5 x 7	>23,2 + 5,6 >24,5 + 7,5	>138 >146	3/8 5/8	2/8 5/8
Kontrol	-	16,8 + 2,6	100	0/8	0/8

TABEL 7

Forbindelse	Dosis (mg/kg x antal administreringer)	Gennemsnitsoverlevelsesdage (dag)	T/C (%)	Forhold af overlevende i 30 dage	Forhold mellem fuldstændig helbredelse
TF-320	0,5 x 7 1 x 7	>29,0 + 2,6 >28,1 + 4,9	>172 >167	7/8 7/8	7/8 7/8
TF-330	0,5 x 7 1 x 7	>29,8 + 0,6 >29,6 + 0,9	>177 >176	7/8 7/8	7/8 7/8
TF-340	1 x 7 5 x 7	>28,3 + 4,5 >24,0 + 9,4	>168 >143	7/8 5/8	5/8 5/8
Kontrol	-	16,8 + 2,3	100	0/8	0/8

(ii) Antitumorvirkning over for Sarcoma-180 celler

(a) Sarcoma-180 celler transplanteredes intraperitonealt i ICR-stamme mus (hunmus, 6 uger gamle) i en mængde på 1×10^5 celler pr. mus. Derefter opløstes hver af forsøgsforbindelserne i fysiologisk saltopløsning og 0,2 ml af hver af de fremstillede opløsninger administreredes intraperitonealt til musene en gang om dagen i 7 på hinanden følgende dage fra den første dag efter transplantationen af carcinomacellerne. Til kontrolgruppen administreredes 0,2 ml af en fysiologisk saltopløsning på samme måde. Resultaterne er vist i tabel 8.

15

20

25

30

35

TABEL 8

Forbindelse	Dosis (mg/kg x antal admini- streringer)	Gennemsnitsoverlevelses- dage (dag)	T/C (%)	Forhold af overlevende i 30 dage	Forhold mellem fuldstandig hel- bredelse
TF-220	0,3 x 7 1,5 x 7	>26,3 + 6,0 >30,0 ± 0,0	>177 >203	2/5 5/5	2/5 5/5
TF-230	1 x 7 5 x 7	>29,2 + 1,6 >24,8 ± 9,9	>197 >168	4/5 3/5	4/5 2/5
TF-240	1 x 7 5 x 7	>21,4 + 7,3 >30,0 ± 0,0	>145 >203	2/5 5/5	1/5 5/5
Kontrol	-	14,8 ± 2,3	100	0/5	0/5

(b) Sarcoma-180 celler transplanteredes subcutant i armhulen på ICR-stamme mus (hunmus, 6 uger gamle) i en mængde på 1×10^7 celler pr. mus. Herefter opløstes forsøgsforbindelserne i fysiologisk saltopløsning eller i en 5% vandig glucoseopløsning, og 0,2 ml af hver af de fremstillede opløsninger administreredes intravenøst eller intramuskulært i musene en gang om dagen i 7 på hinanden følgende dage fra første dag efter indtransplanteringen af carcinomacellerne. Til kontrolgrupperne administreredes 0,2 ml af en 5% vandig glucoseopløsning eller en fysiologisk saltopløsning på samme måde som omtalt ovenfor. Resultaterne er vist i tabel 8-(2).

$$T_v (\%) = 100 \times \frac{C_v}{\text{Tumurvægt hos mus i en gruppe til hvilken, der er administreret forsøgsforbindelse}} \times \frac{\text{Tumurvægt hos mus i kontrolgruppen}}{\text{Tumurvægt hos mus i kontrolgruppen}}$$

TABEL 8-(2)

Forbindelse	Vej	Dosis (mg/kg x antal administrere- ringer)	Væske, hvori for- bindelsen er opløst	Tumorrægt (g)	Tv/Cv (%)
TF-320	iv	0,1 x 7	Fysiologisk salt- opløsning	1,54 ± 0,77	31
	im	0,1 x 7	"	3,50 ± 0,45	71
	iv	0,1 x 7	5% vandig glucose- opløsning	1,67 ± 0,58	34
	im	0,1 x 7	"	2,38 ± 0,42	48
Kontrol	-	-	"	4,94 ± 2,42	100

Resultaterne for TF-320 er på den 14. dag efter transplantering af Sarcoma 180-celler.

(iii) Antitumorvirkning over for Ehrlich faste tumor

Ehrlich tumorceller transplanteredes subcutant i armhulen på ICR-stamme mus (hunmus, 6 uger gamle) i en mængde på 4
5 $\times 10^6$ celler pr. mus. Herefter opløstes hver af forsøgsforbindelserne i en fysiologisk saltopløsning eller 5% vandig glucoseopløsning, og 0,2 ml af hver af de fremstillede opløsninger administreredes intraperitonealt til musene en gang om dagen i 7 på hinanden følgende dage fra
10 den først dag for indtransplanteringen af tumorcellerne. Til kontrolgrupperne administreredes 0,2 ml af en fysiologisk saltopløsning eller en 5% vandig glucoseopløsning på samme måde som ovenfor. Vægten af hver tumor bestemtes. Vægtbestemmelsen af tumoren udførtes ved at måle hoveddiametere
15 (a mm) og den mindre diameter (b mm) ved hjælp af en skydelære og erstatte værdierne for a og b med følgende ligning:

$$20 \quad \text{Tumorens vægt} = \frac{a \times b^2}{2} \quad (\text{mg})$$

Resultaterne er angivet i tabel 9.

25

30

35

TABEL 9

Forbindelse	Dosis (mg/kg x antal administreringer)	Administreringsdag	Dag 14*	
			Tumorens vægt	Tv/Cv (%)
TF-220	3 x 7	Dag 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7	4,30 ± 2,1	62
	6 x 7		2,89 ± 1,2	42
TF-230	10 x 7		2,63 ± 1,22	38
	20 x 7		2,04 ± 0,66	29
TF-240	10 x 7		4,07 ± 0,75	59
	20 x 7		4,02 ± 1,66	59
Kontrol	-		6,82 ± 1,14	100

Bemærkning: TF-220 til TF-240 anvendtes efter opløsning i fysiologisk saltopløsning.

*: Den dag, vægten af tumoren beregnedes.

(iv) Antitumorvirkning over for B-16 melanomceller

(a) B-16 melanomceller transplanteredes subcutant i armhulen på BDF₁-stamme mus (hanmus, 7 uger gamle) i en mængde på 1×10^6 celler pr. mus. Herefter opløstes hver af forsøgsforbindelserne i en fysiologisk saltopløsning, og 0,2 ml af hver af de fremstillede opløsninger administreredes intraperitonealt til musene en gang om dagen i 7 på hinanden følgende dage fra den 1. dag efter indtransplanteringen af tumorcellerne. Til kontrolgruppen administreredes 0,2 ml af en fysiologisk saltopløsning på samme måde. Vægten af tumorerne bestemtes på 17. eller 23. dag efter indtransplantering af tumorcellerne. Bestemmelsesmetoden var som ovenfor (iii). Resultaterne er vist i tabel 10.

TABEL 10

Forbin- delse	Dosis (mg/kg x antal admini- streringer	Gennemsnit- lig tumor- vægt (g)	Tv/Cv (%)
TF-220	1,5 x 7 3 x 7	3,92 $\pm$ 2,29 3,69 $\pm$ 0,81	82 77
TF-230	5 x 7 10 x 7	3,21 $\pm$ 0,64 3,71 $\pm$ 1,08	67 77
TF-240	5 x 7 10 x 7	3,78 $\pm$ 1,26 4,00 $\pm$ 1,36	79 84
Kontrol	-	4,76 $\pm$ 0,68	100

Bemærkninger: Gennemsnitstumorvægtene for TF-220 til TF-240 bestemtes den 17. dag efter indtransplanteringen af tumorcellerne.

(3) Akut toxicitet

LD₅₀-værdierne for mus (ICR-stamme, hunmus, 6 uger gamle, intravenøs administrering) er vist i tabel 11.

TABEL 11

Forbindelse	LD ₅₀ (mg/kg)
TF-220	>200
TF-230	>100
TF-240	>200
TF-340	>200

Som det fremgår af de ovennævnte farmakologiske forsøg, er forbindelserne TF-220, TF-230, TF-240, TF-320, TF-330 og TF-340 værdifulde som carcinostatisk midler, hvorfor de kan forventes at have virkning over for forskellige cancer-sygdomme og at udvise bemærkelsesværdige virkninger over for specielt faste cancere. Alle forbindelserne havde udmærkede virkninger.

TF-220, TF-230, TF-240, TF-320, TF-330 og TF-340 forbindelserne kan anvendes i forskellige farmaceutiske dosisformer som perorale lægemidler, som injektioner eller suppositorier, idet den foretrukne form er som injektion. Dersom de anvendes som perorale lægemidler, kan disse indeholde forskellige hjælpestoffer og foreligge som kapsler, tabletter, pulvere eller granuler. Dersom de omhandlede forbindelser anvendes som injektioner, kan disse foretages subcutant, intramuskulært eller intrave-

nøst, og de kan anvendes som en suspension, en opløsning eller et pulver, der opløses i saltvand, eller en opløsning, der ved brugen indeholder glucose eller et lokal-anæstetikum.

5

Dosis af TF-220, TF-230, TF-240, TF-320, TF-330 og TF-340 udvælges afhængigt af patientens tilstand, skønt det sædvanligvis er fordelagtigt at administrere disse i en voksendosis på 0,005 til 50 mg/kg én gang om dagen eller
10 flere gange om dagen afhængig af administreringsmåden, idet de fortrinsvis administreres subcutant, intramuskulært eller intravenøst eller som injektion i den angrebne del.

15 Opfindelsen forklares nærmere i detaljer nedenfor, idet der henvises til eksemplerne og de medfølgende tegninger, hvor

fig. 1 viser et mikroskop-fotografi, der angiver formen
20 af *Fusobacterium nucleatum* TF-031, der anvendes ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen;

fig. 2 viser et infrarødt absorptions-spektrum af den carcinostatisk forbindelse TF-220 fremstillet i eksempel
25 1, der omtales nærmere nedenfor;

fig. 3 viser et ultraviolet absorptions-spektrum af forbindelsen;

30 fig. 4 viser et infrarødt absorptions-spektrum af den carcinostatisk forbindelse TF-230 fremstillet i eksempel 3, der omtales nedenfor;

fig. 5 viser et ultraviolet absorptions-spektrum af forbindelsen;
35

fig. 6 viser et infrarødt absorptions-spektrum af den carcinostatiske forbindelse TF-240 fremstillet i eksempel 5, der omtales nærmere nedenfor;

5 fig. 7 viser et ultraviolet absorptions-spektrum af forbindelsen;

10 fig. 8 viser et infrarødt absorptions-spektrum af den carcinostatiske forbindelse TF-320 fremstillet i eksempel 6, der omtales nærmere nedenfor;

fig. 9 viser et ultraviolet absorptions-spektrum af forbindelsen;

15 fig. 10 viser et væskechromatografi med høj ydeevne af forbindelsen;

20 fig. 11 viser et infrarødt absorptions-spektrum af den carcinostatiske forbindelse TF-330 fremstillet i eksempel 7, der omtales nærmere nedenfor;

fig. 12 viser et ultraviolet absorptions-spektrum af forbindelsen;

25 fig. 13 viser et væskechromatografi med høj ydeevne af forbindelsen;

30 fig. 14 viser et infrarødt absorptions-spektrum af den carcinostatiske forbindelse TF-330 (renset) fremstillet i eksempel 7, der omtales nærmere nedenfor;

fig. 15 viser et ultraviolet absorptions-spektrum af forbindelsen;

35 fig. 16 viser et infrarødt absorptions-spektrum af den carcinostatiske forbindelse TF-340 fremstillet i eksempel 8, der omtales nærmere nedenfor:

fig. 17 viser et ultraviolet absorptions-spektrum af forbindelsen; og

5 fig. 18 viser et væskechromatografi med høj ydeevne af forbindelsen.

EKSEMPEL 1

(1) I en 10 liters forgæringsbeholder (fremstillet af Marubishi Rika Kenkyusho) anbragtes 8 liter af et TF-e dyrkningssubstrat indeholdende 17 g trypticase pepton, 10 g hjerteinfusion, 3 g gærekstrakt, 7,5 g natriumchlorid, 12 g glucose, 10 g lactose, 0,1 g natriumsulfit og 0,5 g natrium-thioglycolat, pr. liter destilleret vand. Dyrkningssubstratet steriliseredes i 30 minutter ved 120 °C. Efter afkøling af dyrkningssubstratet, ledtes nitrogengas gennem dette med en hastighed på 100 ml/min. i en time. I dyrkningssubstratet udsåedes 1 liter af en fordyrket kultur af *Fusobacterium nucleatum* TF-031 (FERM-5077, ATCC-31647) fremstillet forud ved at dyrke kulturen i et TF-e dyrkningssubstrat, der havde ovennævnte sammensætning. Cellerne dyrkedes 3 dage ved 37 °C under omrøring (30 omrøringer pr. minut), medens der tilførtes nitrogengas med en hastighed på 65 ml/min. Efter dyrkningen sættes til kulturen 160 g Celite[®] og 80 g cellulose-pulver, og blandingen omrørtes og filtreredes under reduceret tryk, hvorved der opnåedes 7,8 liter af en bakteriefri supernatant væske af kulturen.

(2) Til 7,8 liter af ovennævnte supernatante væske sættes 117 ml koncentreret saltsyre for at indstille væskens pH til 2,0, hvorefter 11,7 liter ethanol tilsættes for at danne en 60% vandig ethanol-opløsning, der herefter henstod 24 timer ved 4 °C. Herefter fjernedes den supernatante væske ved dekantering, og den tilbageblevne del underkastedes centrifugering (6×10^3 omdrejninger pr. minut i 5 minutter) ved 4 °C for at opsamle bundfaldet.

Dette bundfald vaskedes med 400 ml af en 60% vandig ethanolopløsning, der havde en pH-værdi på 2,0, 400 ml ethanol, 200 ml acetone og 200 ml diethylether i nævnte rækkefølge, og der tørredes ved reduceret tryk, hvorved opnåedes 4,9 g af et pulver.

(3) Det under (2) ovenfor fremstillede pulver opslæmmedes i 49 ml vand. pH af den fremstillede suspension indstilles til 7,5 til 8,0 ved at tilsætte 1 N vandig natriumhydroxidopløsning, og efter omrøring i 30 min. ved stuetemperatur, tilsættes 1 N saltsyre for at indstille pH af opløsningen til 6,0. Efter omrøring i 2 timer under isafkøling underkastedes blandingen herefter centrifugering (1×10^4 omdrejninger pr. minut, 10 min.) for at skille bundfaldet fra den supernatante væske. Dette bundfald vaskedes med 5 ml vand, der havde en pH-værdi på 6,0, og bundfaldet skiltes fra vaskevandet ved centrifugering (1×10^4 omdrejninger pr. minut, 10 min.). Bundfaldet vaskedes med 10 ml ethanol og tørredes under reduceret tryk, hvorved der opnåedes 1,8 g af den carcinostatiske forbindelse TF-220.

Den fremstillede carcinostatiske forbindelse TF-220 havde de i tabel 2 viste egenskaber. Det infrarøde absorptionspektrum og det ultraviolette absorptionspektrum af forbindelsen er vist i henholdsvis fig. 2 og 3.

EKSEMPEL 2

(1) I en 10 liters forgæringsbeholder anbragtes 8 liter af et TF-d dyrkningssubstrat indeholdende 17 g trypti-casepepton, 20 g hjerteinfusion, 3 g gærekstrakt, 7,5 g natriumchlorid, 12 g glucose, 10 g lactose, 0,1 g natriumsulfit og 0,5 g natriumthioglycolat pr. liter destilleret vand. Dyrkningssubstratet steriliseredes 30 minutter ved 120 °C. Efter afkøling af dyrkningssubstratet ledtes nitrogen gas gennem dette i 1 time med en hastighed

på 100 ml/minut. I dyrkningssubstratet udsåedes 1 liter af en fordyrket kultur af *Fusobacterium nucleatum* TF-031 (FERM-5077, ATCC-31647) forud fremstillet ved at dyrke i et TF-d dyrkningssubstrat med samme sammensætning som
5 ovenfor. Cellerne dyrkedes i 5 dage ved 37 °C under omrøring (30 omdrejninger pr. min.), medens der tilledtes nitrogengas med en hastighed på 65 ml/minut. Efter dyrkning tilsattes dyrkningsopløsningen 160 g Celite® og 80 g cellulosepulver, og den fremkomne blanding omrørtes og
10 filtreredes under reduceret tryk, hvorved der opnåedes 7,8 liter af den bakteriefri supernatante væske af kulturen.

(2) Til 7,8 liter af ovennævnte supernatante væske sattes
15 117 ml koncentreret saltsyre for at indstille den supernatante væskes pH til 2,0. Herefter sattes 11,7 liter ethanol til den supernatante væske for at opnå en 60% vandig ethanolopløsning, der herefter henstod i 24 timer ved 4 °C.

20 Den opløste del underkastedes derefter dekantering, og den tilbageblevne del centrifugeredes (6×10^3 omdrejninger pr. minut, 5 minutter) ved 4 °C for at opsamle bundfaldet. Dette bundfald vaskedes med 400 ml af en 60%
25 vandig ethanolopløsning, der havde en pH på 2,0, 400 ml ethanol, 200 ml acetone og 200 ml diethylether i nævnte rækkefølge, og der tørredes ved reduceret tryk, hvorved der opnåedes 5,07 g pulver.

30 Det således opnåede pulver behandledes som beskrevet i eksempel 1 (3), hvorved der opnåedes 1,9 g af den carcinostatisk forbindelse TF-220.

35 Den således fremstillede carcinostatisk forbindelse TF-220 havde de i tabel 2 angivne egenskaber. Det infrarøde absorptionsspektrum og det ultraviolette absorptionsspektrum var meget nær identiske med de, der opnåedes for den

fremstillede forbindelse i eksempel 1.

EKSEMPEL 3

5 (1) I en 10 liters forgæringsbeholder anbragtes 8 liter af et TF-e dyrkningssubstrat med samme sammensætning som i eksempel 1. Dyrkningssubstratet steriliseredes i 30 minutter ved 120 °C. Efter afkøling af dyrkningssubstratet ledtes nitrogengas gennem dette i 1 time med en hastighed på 100 ml/minut. I dyrkningssubstratet udsåedes 1 liter af en fordyrket kultur af *Fusobacterium nucleatum* TF-031 (FERM-5077, ATCC-31647), der var fremstillet forud ved at dyrke bakterien i et TF-e dyrkningssubstrat med samme sammensætning som ovenfor. Cellerne dyrkedes i 2 dage ved 15 37 °C under omrøring (30 omdrejninger pr. minut), medens der tilførtes nitrogengas med en hastighed på 65 ml/minut. Efter dyrkning af kulturen tilsattes 160 g Celite[®] og 80 g cellulosepulver, og den fremkomne blanding omrørtes og filtreredes under reduceret tryk, hvorved der opnåedes 7,8 liter af en bakteriefri supernatant væske af kulturen. 20

(2) Til 7,8 liter af den supernatante væske fremstillet ovenfor under (1) sattes 117 ml koncentreret svovlsyre for at indstille pH af væsken til 2,0. Herefter tilsattes 11,7 liter ethanol til den supernatante væske for at danne en 60% vandig ethanolopløsning, der herefter henstod i 24 timer ved 4 °C, indtil bundfaldet var faldet fuldstændig til ro. Den supernatante væske fjernedes herefter ved dekantering, og den tilbageblevne del centrifugeredes (6 x 10³ omdrejninger pr. minut, 5 minutter) ved 4 °C for at opsamle bundfaldet. Dette bundfald vaskedes med 400 ml af en 60% vandig ethanolopløsning med en pH-værdi på 2,0, 400 ml ethanol, 200 ml acetone og 200 ml diethylether i nævnte rækkefølge, og der tørredes ved reduceret tryk til 35 opnåelse af 2,73 g af et pulver.

(3) Det under (2) fremstillede pulver opslæmmedes i 25 ml vand. Den fremstillede suspensions pH indstilledes til 7,5 til 8,0 ved tilsætning af 1 N vandig natriumhydroxidopløsning, og suspensionen omrørtes ved stuetemperatur i 5 30 minutter, hvorefter 1 N saltsyre tilsattes for at indstille pH til 6,0. Herefter omrørtes suspensionen under isafkøling i 2 timer, hvorefter der centrifugeredes (1×10^4 omdrejninger pr. minut, 10 minutter) for at skille bundfaldet fra den supernatante væske. Bundfaldet vaskedes med 5 ml vand med pH 6,0, og bundfaldet fraskiltes vaskevandet ved centrifugering (1×10^4 omdrejninger pr. minut, 10 minutter). Vaskevandet og den ovennævnte supernatante væske sloges sammen, og den fremkomne opløsning henstod, efter at pH var indstillet til 4,0 ved tilsætning af 1 N saltsyre, ved en temperatur på ikke mere end 15 5 °C i 12 timer, hvorefter der centrifugeredes (1×10^4 omdrejninger pr. minut, 10 minutter) for at skille bundfaldet fra den supernatante væske. Bundfaldet vaskedes med 15 ml vand med pH på 4,0, og bundfaldet fraskiltes vaskevandet ved centrifugering (1×10^4 omdrejninger pr. 20 minut, 10 minutter), og bundfaldet vaskedes med 10 ml ethanol, hvorefter der tørredes under reduceret tryk til opnåelse af 0,58 g af den carcinostatiske forbindelse TF-230.

25 Den fremstillede carcinostatiske forbindelse TF-230 havde de i tabel 2 viste egenskaber. Det infrarøde absorptionspektrum og det ultraviolette absorptionsspektrum er vist i henholdsvis fig. 4 og 5.

30

EKSEMPEL 4

(1) I en 10 liters forgæringsbeholder anbragtes 8 liter af et TF-d dyrkningssubstrat med samme sammensætning som 35 i eksempel 2. Dyrkningssubstratet steriliseredes 30 minutter ved 120 °C. Efter afkøling af dyrkningssubstratet ledtes nitrogen gas gennem dette i 1 time med en hastighed

på 100 ml/minut. I dyrkningssubstratet udsåedes 1 liter af en fordyrket kultur af *Fusobacterium nucleatum* TF-031 (FERM-5077, ATCC-31647) forud fremstillet ved at dyrke i et dyrkningssubstrat med samme sammensætning. Cellerne
5 dyrkedes 2 dage ved 37 °C under omrøring (30 omdrejninger pr. minut), idet der tilledtes nitrogengas med en hastighed på 65 ml/minut. Efter dyrkningen tilsattes kulturen 160 g Celite[®] og 80 g cellulosepulver, og den fremkomne blanding omrørtes og filtreredes under reduceret tryk,
10 hvorved der opnåedes 7,8 liter af en bakteriefri supernatant væske af kulturen.

(2) Til 7,8 liter af den supernatante væske fremstillet ovenfor under (1) sattes 117 ml koncentreret saltsyre for
15 at indstille den supernatante væskes pH til 2,0. Herefter sattes 11,7 liter ethanol til den supernatante væske for at få en 60% vandig ethanolopløsning, der herefter henstod ved 4 °C i 24 timer. Den supernatante del fjernedes derefter ved dekantering, og den tilbageblevne del centrifugeredes (6×10^3 omdrejninger pr. minut, 5 minutter)
20 ved 4 °C for at opsamle bundfaldet. Dette bundfald vaskedes med 400 ml af en 60% vandig ethanolopløsning med pH på 2,0, 400 ml ethanol, 200 ml acetone og 200 ml diethylether i nævnte rækkefølge, og der tørredes under reduceret tryk, hvorved der opnåedes 3,15 g pulver.
25

(3) Det under (2) fremstillede pulver behandledes på samme måde som i eksempel 3 (3), hvorved der opnåedes 0,8 g af den carcinostatisk forbindelse TF-230. Den således
30 fremstillede carcinostatisk forbindelse TF-230 havde de i tabel 2 viste egenskaber. Det infrarøde absorptionspektrum og det ultraviolette absorptionsspektrum var i det væsentlige identisk med spektrene opnået for den fremstillede forbindelse i eksempel 3.

EKSEMPEL 5

(1) I 25 ml vand opslæmmedes 3,9 g af pulveret fremstillet på samme måde som i eksempel 1 (1) og (2). Ved tilsætning af 1 N vandig natriumhydroxidopløsning indstilledes den fremkomne suspensions pH til 7,5 til 8,0, og efter omrøring af suspensionen ved stuetemperatur i 30 minutter indstilledes pH atter til 6,0 ved tilsætning af 1 N saltsyre. Efter omrøring i 2 timer med isafkøling centrifugeredes suspensionen (1×10^4 omdrejninger pr. minut, 10 minutter) for at skille bundfaldet fra den supernatante væske. Bundfaldet vaskedes med 5 ml vand med pH på 6,0, og bundfaldet fraskiltes vaskevandet ved centrifugering (1×10^4 omdrejninger pr. minut, 10 minutter). Dette vaskevand og den ovennævnte supernatante væske sloges sammen og underkastedes behandlingen under (2) nedenfor. Bundfaldet vaskedes med 10 ml ethanol, og der tørredes under reduceret tryk, hvorved der opnåedes 1,06 g af den carcinostatisk forbindelse TF-220.

Den således fremstillede carcinostatisk forbindelse TF-220 havde de i tabel 2 viste egenskaber. Det infrarøde absorptionsspektrum og det ultraviolette absorptionsspektrum var i det væsentlige identisk med spektrene opnået for forbindelsen fremstillet i eksempel 1.

(2) Den forenede opløsning bestående af den supernatante væske og vaskevandet opnået under (1) ovenfor, tilsattes 1 N saltsyre for at indstille pH til 4,0, hvorefter blandingen henstod i 12 timer ved ikke mere end 5 °C. Dernæst centrifugeredes blandingen (1×10^4 omdrejninger pr. minut, 10 minutter) for at skille bundfaldet fra den supernatante væske. Bundfaldet vaskedes med 5 ml vand med pH 4,0, og bundfaldet og vaskevandet centrifugeredes (1×10^4 omdrejninger pr. minut, 10 minutter). Vaskevandet sloges sammen med den ovennævnte supernatante væske, og underkastedes behandlingen beskrevet nedenfor under (3).

Bundfaldet vaskedes med 5 ml ethanol, og der tørredes under reduceret tryk, hvorved der opnåedes 0,48 g af den carcinostatisk forbindelse TF-230.

- 5 Den fremstillede carcinostatisk forbindelse TF-230 havde de i tabel 2 viste egenskaber. Det infrarøde absorptionspektrum og det ultraviolette absorptionspektrum var i det væsentlige identisk med spektrene opnået for forbindelsen fremstillet i eksempel 3.

10

- (3) Til den forenede opløsning bestående af den supernatante væske og vaskevandet opnået ovenfor under (2) sættes 1 N saltsyre for at indstille pH til 2,0, og blandingen henstod i 2 timer under isafkøling. Blandingen centrifugeredes (6×10^3 omdrejninger pr. minut, 10 minutter) for at skille bundfaldet fra den supernatante væske. Bundfaldet vaskedes med 3 ml vand med pH på 2,0, og bundfaldet og vaskevandet centrifugeredes (6×10^3 omdrejninger pr. minut, 10 minutter). Bundfaldet vaskedes med 5 ml ethanol, og der tørredes under reduceret tryk, hvorved der opnåedes 0,10 g af den carcinostatisk forbindelse TF-240.

20

- Den således fremstillede carcinostatisk forbindelse TF-240 havde de i tabel 2 viste egenskaber. Det infrarøde absorptionspektrum og det ultraviolette absorptionspektrum er vist i henholdsvis fig. 6 og 7.

25

EKSEMPEL 6

30

- (1) I 10 ml vand opslæmmedes 1 g af den carcinostatisk forbindelse TF-220 fremstillet som beskrevet i eksempel 5 (1). Til den fremstillede suspension sættes 1 N vandig natriumhydroxidopløsning under omrøring for at indstille pH til 7,8. Blandingen opvarmedes til 37 °C, og der tilsættes 15 mg "Pronase" E og flere dråber toluen. Under omrøring enzymbehandles blandingen ved en pH-værdi på

35

7,8 til 8,0 ved 37-40 °C i 24 timer. Efter behandlingen centrifugeredes blandingen (4000 omdrejninger pr. minut, 10 minutter) for at skille bundfaldet fra den supernatante væske. Til bundfaldet sættes 3 ml vand med pH 8,0, og
5 blandingen centrifugeredes (4000 omdrejninger pr. minut, 10 minutter) for at skille bundfaldet fra vaskevandet. Vaskevandet og den supernatante væske sloges sammen, og til opløsningen sættes 1 N saltsyre for at indstille pH til 2,0, hvorved der dannedes et bundfald. Blanding
10 henstod ved 5 °C i 12 timer, og herefter centrifugeredes (1×10^4 omdrejninger pr. minut, 10 minutter) for at skille bundfaldet fra den supernatante væske. Til bundfaldet sættes 3 ml vand med pH 2,0, og blandingen centrifugeredes (1×10^4 omdrejninger pr. minut, 10 minutter)
15 for at skille bundfaldet fra vaskevandet. Dette vaskevand og ovennævnte supernatante væske sloges sammen, og ethanol sættes til opløsningen til dannelsen af en 80% vandig ethanolopløsning. Den vandige ethanolopløsning omrørtes 2 timer under isafkøling, hvorefter den centrifugeredes
20 (4000 omdrejninger pr. minut, 10 minutter) for at skille bundfaldet fra den supernatante væske. Bundfaldet vaskedes med 5 ml 80% vandig ethanolopløsning og 5 ml ethanol i nævnte rækkefølge, og herefter tørredes under reduceret tryk, hvorved der opnåedes 163 mg af den carcinostatisk
25 forbindelse TF-320.

I 5 ml vand opløstes 150 mg af ovennævnte pulver, og den fremstillede opløsning indstilledes til pH på 7,0 ved tilsætning af 1 N vandig natriumhydroxidopløsning. Den
30 fremstillede opløsning hældtes på en søjle pakket med 25 ml Amberlite® IRA 400 forud indstillet til OH-typen med 1 N vandig natriumhydroxidopløsning. Herefter ledtes 100 ml vand gennem søjlen. Alle eluaterne sloges sammen, og 1 N saltsyre tilsattes for at indstille pH til 7,0. Opløsningen koncentreredes under reduceret tryk, og herefter
35 filtreredes der gennem et Millipore® filter med en porediameter på 0,3 µm, hvorefter der frysetørredes til op-

nåelse af 110 mg af den frysetørrede carcinostatiske forbindelse TF-320.

5 Den fremstillede carcinostatiske forbindelse TF-320 havde de i tabel 2 angivne egenskaber, og saccharidindholdet heraf var sædvanligvis ca. 20-60% udtrykt som glucose. Det infrarøde absorptionsspektrum, det ultraviolette absorptionsspektrum og high performance væskechromatografi af en typisk forbindelse er vist i henholdsvis fig. 8, 9
10 og 10.

(2) I 50 ml vand opløstes 100 mg af den ovennævnte carcinostatiske forbindelse TF-320, og den fremstillede opløsning koncentreredes til en koncentration på 100 gange
15 den oprindelige under anvendelse af "Ultrafilter" UK-50. Dette koncentrat filtreredes gennem et Millipore[®] filter med en porediameter på 0,2 μ m, og herefter frysetørredes til opnåelse af 72 mg af den rensede, frysetørrede carcinostatiske forbindelse TF-320. Den fremstillede rensede
20 carcinostatiske forbindelse TF-320 havde de i tabel 2 angivne egenskaber, og saccharidindholdet heraf var sædvanligvis ca. 16 til 30% udtrykt som glucose.

EKSEMPEL 7

25 (1) I 5 ml vand opslæmmedes 0,48 g af den carcinostatiske forbindelse TF-230 fremstillet som beskrevet i eksempel 5 (2). Til suspensionen sættes 1 N vandig natriumhydroxidopløsning under omrøring for at indstille pH til 7,8. Blandingen opvarmedes til 37 °C, og der tilsættes 5,0 mg
30 "Pronase" E og flere dråber toluen. Under omrystning enzymbehandlede blandingen ved en pH-værdi på 7,8 til 8,0 ved 37-40 °C i 24 timer. Efter behandlingen centrifugeredes blandingen (4000 omdrejninger pr. minut, 10 minutter)
35 for at skille bundfaldet fra den supernatante væske. Til bundfaldet sættes 3 ml vand med pH på 8,0, og blandingen centrifugeredes (4000 omdrejninger pr. minut, 10 minut-

ter) for at skille bundfaldet fra vaskevandet. Dette vaskevand og ovennævnte supernatante væske sloges sammen, og til opløsningen sættes 1 N saltsyre for at indstille pH til 2,0, hvorved der dannedes et bundfald. Denne blanding henstod 12 timer ved 5 °C, hvorefter der centrifugeredes (1 x 10⁴ omdrejninger pr. minut, 10 minutter) for at skille bundfaldet fra den supernatante væske. Til bundfaldet sættes 3 ml vand med pH på 2,0, og blandingen centrifugeredes (1 x 10⁴ omdrejninger pr. minut, 10 minutter) for at skille bundfaldet fra vaskevandet. Dette vaskevand og den ovennævnte supernatante væske sloges sammen, og til opløsningen sættes ethanol til opnåelse af en 80% vandig ethanolopløsning. Den vandige ethanolopløsning omrørtes 2 timer under isafkøling, og herefter centrifugeredes (4000 omdrejninger pr. minut, 10 minutter) for at skille bundfaldet fra den supernatante væske. Bundfaldet vaskedes med 5 ml af en 80% vandig ethanolopløsning og 5 ml ethanol i nævnte rækkefølge, og herefter tørredes under reduceret tryk, hvorved der opnåedes 100 mg af den carcinostatisk forbindelse TF-330.

I 5 ml vand opløstes 100 mg af ovennævnte pulver, og den fremstillede opløsnings pH indstilledes til 7,0 ved tilsætning af 1 N vandig natriumhydroxidopløsning. Den fremstillede opløsning hældtes på en søjle pakket med 15 ml Amberlite[®] IRA 400, der var forud indstillet til OH-typen med 1 N vandig natriumhydroxidopløsning. Herefter ledtes 60 ml vand gennem søjlen. Alle eluaterne sloges sammen, og der indstilledes til en pH-værdi på 7,0 ved tilsætning af 1 N saltsyre. Opløsningen koncentreredes under reduceret tryk og filtreredes gennem et Millipore[®] filter, der havde en porediameter på 0,3 µm, og til slut frysetørredes, hvorved der opnåedes 70 mg af den frysetørrede carcinostatisk forbindelse TF-330.

35

Den fremstillede carcinostatisk forbindelse TF-330 havde de i tabel 2 viste egenskaber. Det infrarøde absorptions-

spektrum, ultraviolette absorptionsspektrum og high performance væskechromatogrammet er vist i henholdsvis fig. 11, 12 og 13.

- 5 (2) I 50 ml vand opløstes 70 mg af den ovennævnte carcinostatiske forbindelse TF-330, og den fremstillede opløsning koncentreredes 100 gange under anvendelse af "Ultrafilter" UK-50. Dette koncentrat filtreredes gennem et Millipore[®] filter, der havde en porediameter på 0,2
10 µm, og herefter frysetørredes, hvorved opnåedes 49 mg af den rensede, frysetørrede carcinostatiske forbindelse TF-330.

- 15 Den rensede carcinostatiske forbindelse TF-330 fremstillet på denne måde havde de i tabel 2 angivne egenskaber, og saccharidindholdet heraf var sædvanligvis ca. 16-30% udtrykt som glucose. Det infrarøde absorptionsspektrum og det ultraviolette absorptionsspektrum af en typisk TF-330 er vist i henholdsvis fig. 14 og 15.

20

EKSEMPEL 8

- 25 I 10 ml vand opslæmmedes 0,9 g af den carcinostatiske forbindelse TF-240 fremstillet på samme måde som beskrevet i eksempel 5 (3), og 1 N vandig natriumhydroxid sættes til den fremstillede suspension under omrøring for at indstille pH til 7,8. Efter opvarmning til 37 °C sættes til suspensionen 9 mg "Pronase" E og flere dråber toluen i nævnte rækkefølge. Den fremstillede blanding enzym-
30 behandlede under omrystning ved 37 °C til 40 °C ved en pH-værdi på 7,8 til 8,0 i 24 timer. Blandingen centrifugeredes (4000 omdrejninger pr. minut, 10 minutter) for at skille bundfaldet fra den supernatante væske. Til bundfaldet sættes 3 ml vand med pH på 8,0, og den fremstillede suspension centrifugeredes (4000 omdrejninger pr. mi-
35 nut, 10 minutter) for at skille bundfaldet fra vaskevandet. Vaskeopløsning og ovennævnte supernatante væske slo-

- ges sammen, og til den forenede opløsning sættes 1 N saltsyre for at indstille pH til 2,0, hvorved der dannes et bundfald. Den fremkomne opslæmning henstod 12 timer ved 5 °C, hvorefter der centrifugeredes (1×10^4 omdrejninger pr. minut, 10 minutter) for at skille bundfaldet fra den supernatante væske. Til bundfaldet sættes 5 ml vand, der havde en pH-værdi på 2,0, og den fremstillede suspension centrifugeredes (1×10^4 omdrejninger pr. minut, 10 minutter) for at skille bundfaldet fra vaskeopløsningen. Vaskeopløsningen og ovennævnte supernatante væske sloges sammen, og til opløsningen sættes ethanol til opnåelse af en 80% vandig ethanolopløsning. Den vandige ethanolopløsning omrørtes 2 timer under isafkøling, hvorefter der centrifugeredes (1×10^4 omdrejninger pr. minut, 10 minutter) for at skille bundfaldet fra den supernatante væske. Bundfaldet vaskedes med 5 ml 80% vandig ethanolopløsning og 5 ml ethanol i nævnte rækkefølge, og der tørredes under reduceret tryk til opnåelse af 170 mg af den carcinostatiske forbindelse TF-340.
- I 5 ml vand opløstes 150 mg af dette pulver, og den fremstillede opløsnings pH indstilledes til 7,0 ved tilsætning af 1 N vandig natriumhydroxidopløsning. Opløsningen hældtes på en søjle pakket med 25 ml Amberlite® IRA 400 forindstillet til OH-typen under anvendelse af 1 N vandig natriumhydroxidopløsning. Herefter ledtes 100 ml vand gennem søjlen, og alle eluaterne sloges sammen og indstilledes til pH på 7,0 ved tilsætning af 1 N saltsyre. Den opnåede opløsning koncentreredes under reduceret tryk og filtreredes gennem et Millipore® filter, der havde en porediameter på 0,3 μm , hvorefter der frysetørredes til opnåelse af 110 mg af den frysetørrede carcinostatiske forbindelse TF-340.
- Den fremstillede carcinostatiske forbindelse TF-340 havde de i tabel 2 angivne egenskaber, og det infrarøde absorptionsspektrum, ultraviolette absorptionsspektrum og high

performance væskechromatogrammet er vist i henholdsvis fig. 16, 17 og 18.

EKSEMPEL 9

5

0,9 g af den carcinostatisk forbindelse TF-240 fremstillet som beskrevet i eksempel 5 (3) behandledes som beskrevet i eksempel 8, hvorved der opnåedes 115 mg frysetørret carcinostatisk forbindelse TF-340.

10

Den fremstillede carcinostatisk forbindelse TF-340 havde de i tabel 2 angivne egenskaber, og det infrarøde absorptionsspektrum, ultraviolette absorptionsspektrum og high performance væskechromatogram var i det væsentlige identisk med resultaterne opnået for forbindelsen fremstillet i eksempel 8.

15

EKSEMPEL 10

20

0,9 g af den carcinostatisk forbindelse TF-240 fremstillet i eksempel 5 (3) behandledes som beskrevet i eksempel 8, bortset fra at (a) enzymbehandlingen udførtes under anvendelse af 9 mg trypsin (fremstillet af Difco) i stedet for "Pronase" E og (b) efter enzymbehandlingen indsamledes bundfaldet fra den vandopløselige del med en pH på 2,0 under anvendelse af en 60% vandig ethanolopløsning i stedet for en 80% vandig ethanolopløsning. Herved opnåedes 105 mg frysetørret carcinostatisk forbindelse TF-340.

25

30

Den fremstillede carcinostatisk forbindelse TF-340 havde de i tabel 2 angivne egenskaber, og det infrarøde absorptionsspektrum og ultraviolette absorptionsspektrum var i det væsentlige identisk med spektrene opnået for forbindelsen i eksempel 8.

35

EKSEMPEL 11

Den carcinostatisk forbindelse TF-240 fremstillet i eksempel 5 (3) underkastedes samme enzymbehandling som i eksempel 8, hvorefter der i stedet for opsamling af bundfaldet fra den vandopløselige del med pH på 2,0 opsamledes bundfald ved tilsætning af 40% trichloreddikesyre til en trichloreddikesyrekoncentration på 10%. Herved dannedes en vandopløselig del, der omdannedes til en 80% vandig ethanolopløsning, hvorefter samme behandlinger som i eksempel 8 udførtes til fremstilling af 99 mg frysetørret carcinostatisk forbindelse TF-340.

Den fremstillede carcinostatisk forbindelse TF-340 havde de i tabel 2 angivne egenskaber, og det infrarøde absorptionsspektrum, ultraviolette absorptionsspektrum og high performance væskechromatogrammet var i det væsentlige identisk med resultaterne opnået for forbindelsen fremstillet i eksempel 8.

20

PRÆPARATIONSEKSEMPEL 1

En fortyndet vandig natriumhydroxidopløsning sættes til 2 til 3 mg af den carcinostatisk forbindelse TF-220, således at der dannes en opløsning med pH på 7,0 til 7,5. Den vandopløselige del af den resulterende opløsning fyldes i en ampul og frysetørres. Denne opløses, når den skal bruges, i en steriliseret fysiologisk saltopløsning, en 0,5% lidocaineopløsning, en 5% vandig glucoseopløsning eller lignende, og den resulterende opløsning bruges som en injektion.

30

PRÆPARATIONSEKSEMPEL 2

En fortyndet vandig natriumhydroxidopløsning sættes til 1 mg af den carcinostatisk forbindelse TF-230, således at der dannes en opløsning med pH på 7,0 til 7,5. Denne op-

35

- løsning anbringes i en ampul og frysetørres. Den opløses, når den skal bruges, i en steriliseret fysiologisk saltopløsning, en 0,5% lidocaineopløsning, en 5% vandig glucoseopløsning eller lignende, og den resulterende opløsning bruges som en injektion.

PRÆPARATIONSEKSEMPEL 3

- En fortyndet vandig natriumhydroxidopløsning sættes til 1 mg af den carcinostatisk forbindelse TF-240, således at der dannes en opløsning med pH på 7,0 til 7,5, og opløsningen anbringes i en ampul og frysetørres. Den opløses, når den skal bruges, i en steriliseret fysiologisk saltopløsning, en 0,5% lidocaineopløsning, en 5% vandig glucoseopløsning eller lignende, og den resulterende opløsning bruges som en injektion.

PRÆPARATIONSEKSEMPEL 4

- En vandig opløsning med pH på 7,0 til 7,5 indeholdende den carcinostatisk forbindelse TF-320 anbringes i en ampul og frysetørres, således at der dannes frysetørret carcinostatisk TF-320 præparater indeholdende 0,5 eller 1 mg. Dette opløses, når det skal bruges, i en steriliseret fysiologisk saltopløsning, en 0,5% lidocaineopløsning, en 5% vandig glucoseopløsning eller lignende, og den resulterende opløsning bruges som injektion.

PRÆPARATIONSEKSEMPEL 5

- En vandig opløsning med pH på 7,0 til 7,5 indeholdende den carcinostatisk forbindelse TF-330 fyldes i en ampul og frysetørres, således at der opnås frysetørret carcinostatisk TF-330 præparater med 0,5 eller 1 mg. Dette opløses, når det skal bruges, i en steriliseret fysiologisk saltopløsning, en 0,5% lidocaineopløsning, en 5% vandig glucoseopløsning eller lignende, og den resulterende op-

løsning bruges som en injektion.

PRÆPARATIONSEKSEMPEL 6

- 5 En vandig opløsning med pH på 7,0 til 7,5 indeholdende den carcinostatisk forbindelse TF-340 fyldes i ampul og frysetørres, således at der opnås frysetørret carcinostatisk TF-340 præparater indeholdende 0,5 eller 1 mg. Dette opløses, når det skal bruges, i en steriliseret fysiologisk saltopløsning, en 0,5% lidocaineopløsning, en 5% vandig glucoseopløsning eller lignende, og den resulterende opløsning bruges som en injektion.
- 10

15

20

25

30

35

P a t e n t k r a v :

1. Fremgangsmåde til fremstilling af carcinostatisk og immunostimulerende forbindelser betegnet TF-220, TF-230 og TF-240 eller de tilsvarende proteinfrie forbindelser betegnet TF-320, TF-330 og TF-340, k e n d e t e g n e t ved, at bakterien *Fusobacterium nucleatum* TF-031 (FERM 5077, ATCC 31647) eller en mutant heraf med i det væsentlige samme egenskaber dyrkes i et dyrkningssubstrat indeholdende nitrogenkilder, carbonkilder, vitaminkilder, reducerende midler og uorganiske salte, med eller uden agar, under anaerobe betingelser, hvorefter et hydrofilt organisk opløsningsmiddel, eventuelt efter fraskillelse af bakteriecellerne, sættes til substratet eller dettes supernatante væske, og det fremkomne bundfald isoleres og ekstraheres med vand ved pH 7,5 til 8, hvorpå ekstrakten behandles ved trinvis indstilling af pH til 5,5 til 6,5, 3,5 til 4,5 og 1,5 til 2,5, idet de ved hver pH-værdi dannede bundfald fraskilles og yderligere renses og om ønsket underkastes en proteinfjernende behandling.
2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at den proteinfjernende behandling udføres med et proteolytisk enzym.
3. Fremgangsmåde ifølge krav 2, k e n d e t e g n e t ved, at enzymbehandlingen er en behandling med pronase eller trypsin.
4. Fremgangsmåde ifølge et vilkårligt af kravene 1-3, k e n d e t e g n e t ved, at det hydrofile organiske opløsningsmiddel, der tilsættes den supernatante væske, er en alkohol.
5. Fremgangsmåde ifølge et vilkårligt af kravene 1-4, k e n d e t e g n e t ved, at dyrkningen udføres ved 32-

37 °C i 1-4 dage i et dyrkningssubstrat med en pH-værdi på 6,5-7,5.

5 6. Fremgangsmåde ifølge krav 4, k e n d e t e g n e t ved, at pH af den supernatante væske indstilles til 1,5-2,5; at en alkohol tilsættes, således at koncentrationen af denne i den fremstillede opløsning er 50-70 rumfang-%.

10

15

20

25

30

35

FIG. 1

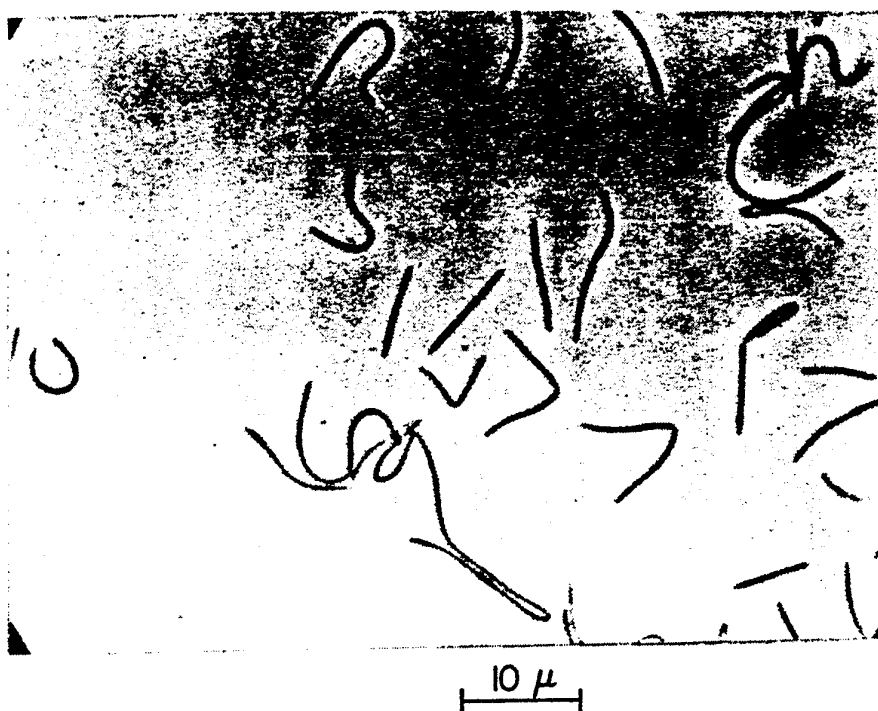


FIG. 2

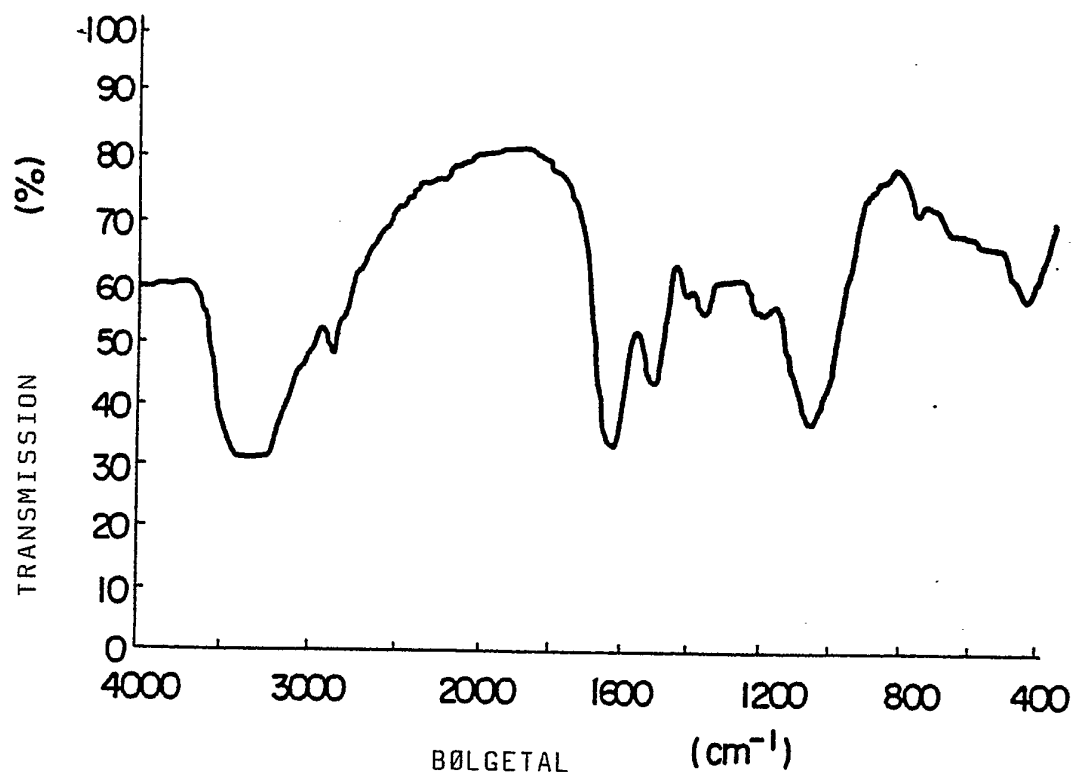


FIG. 3

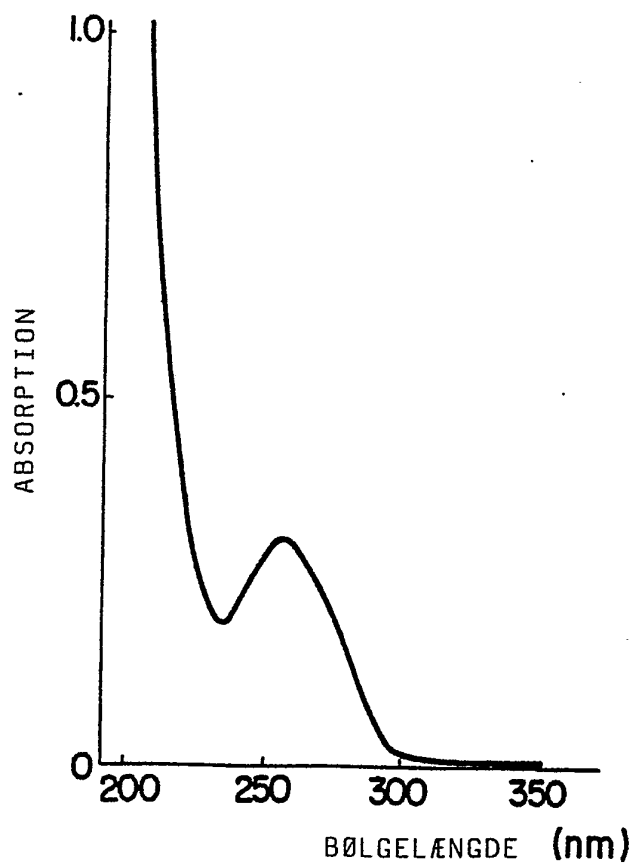


FIG. 4

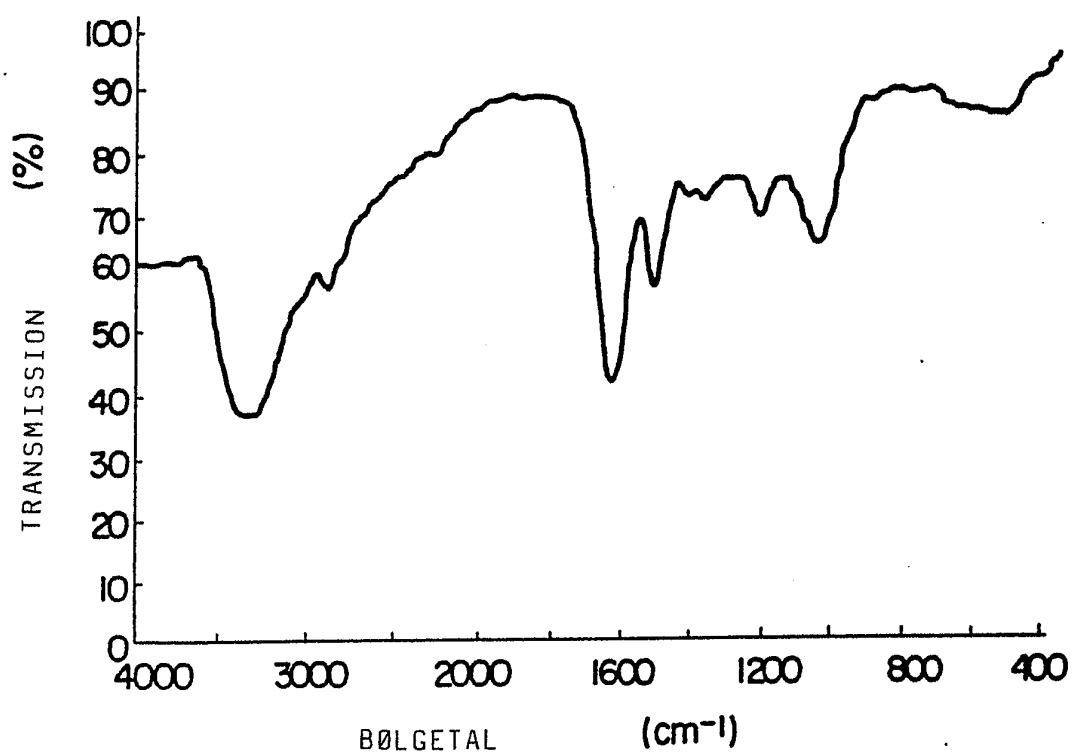


FIG. 5

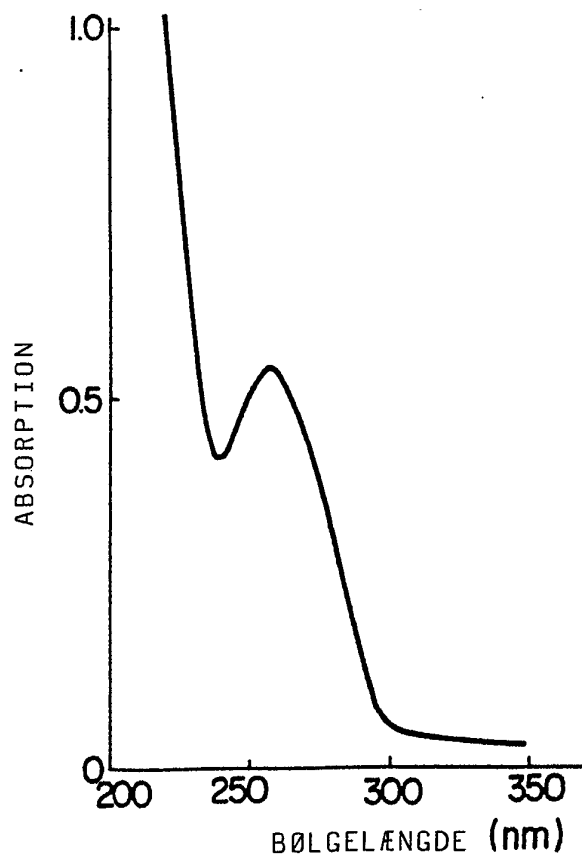


FIG. 6

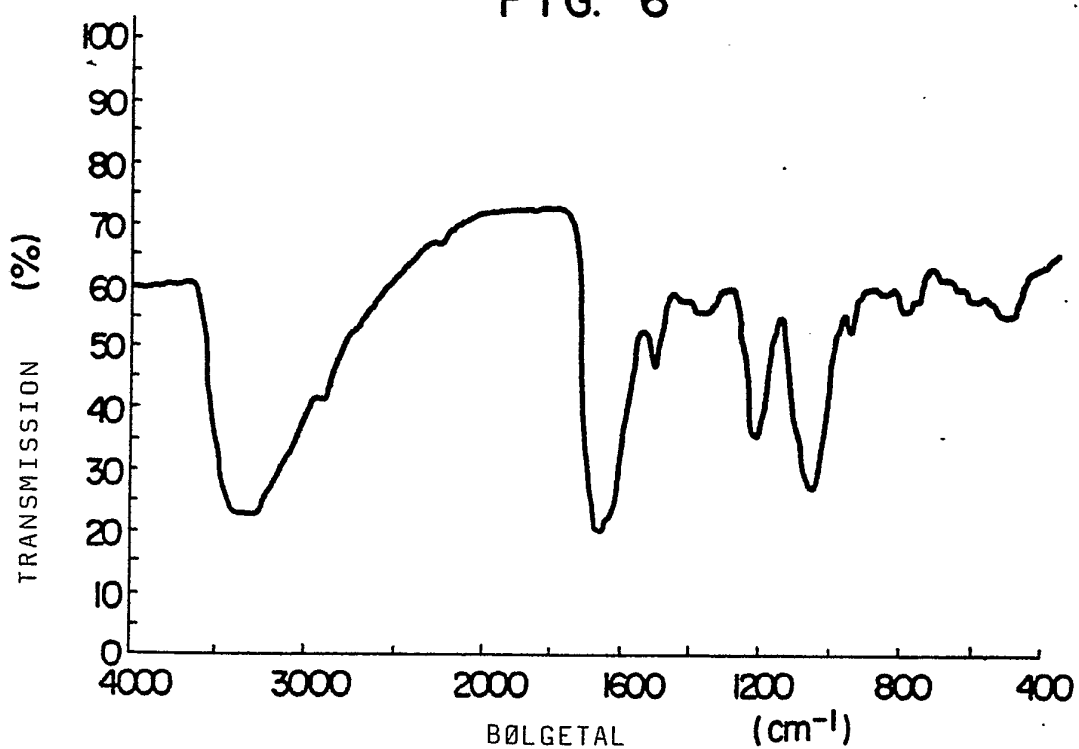


FIG. 7

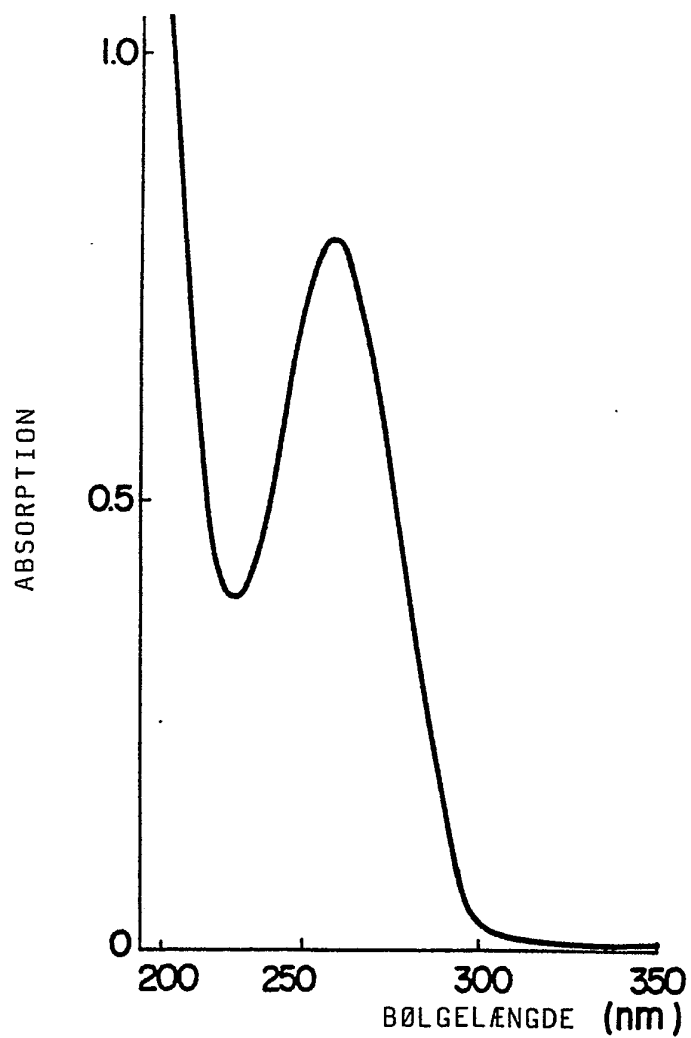


FIG. 8

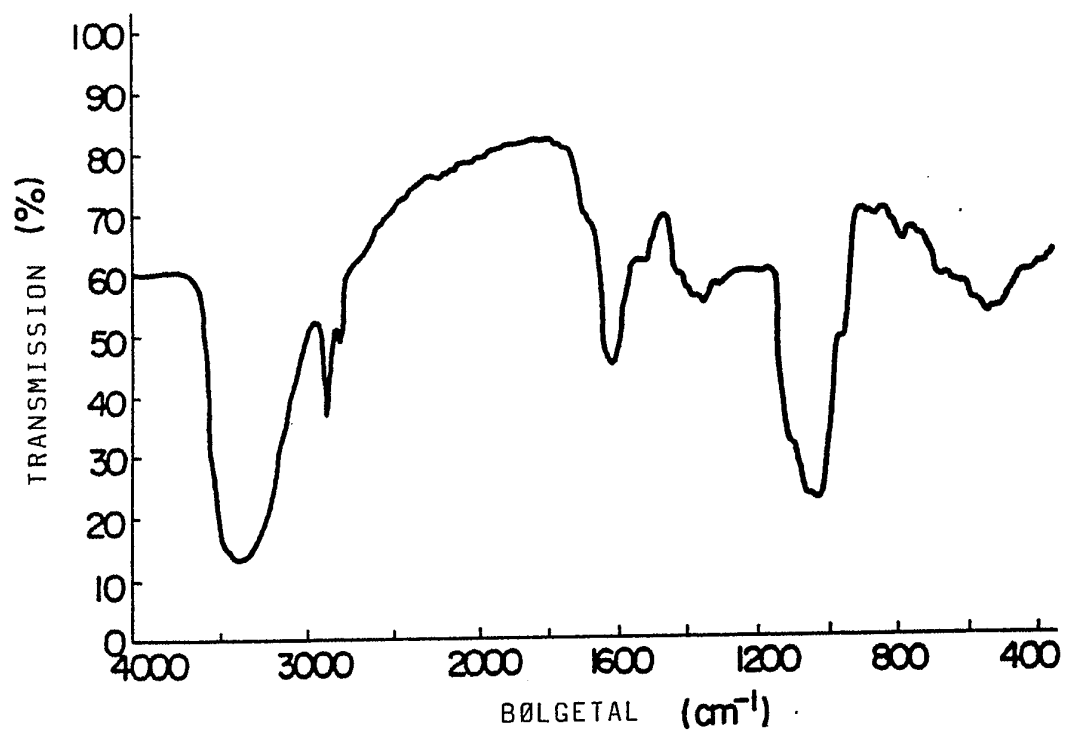


FIG. 9

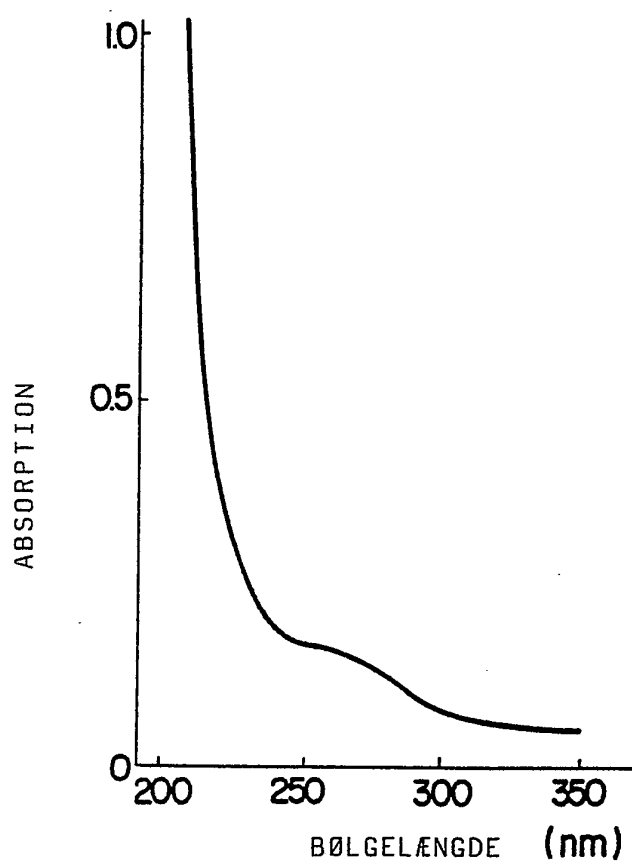


FIG. 10

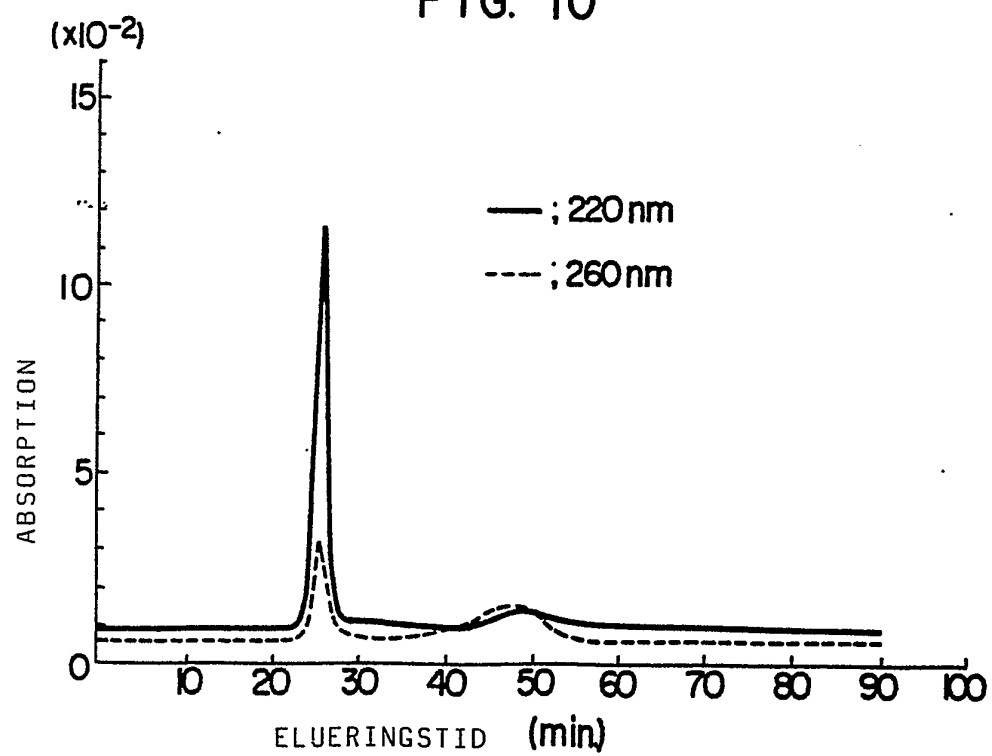


FIG. 11

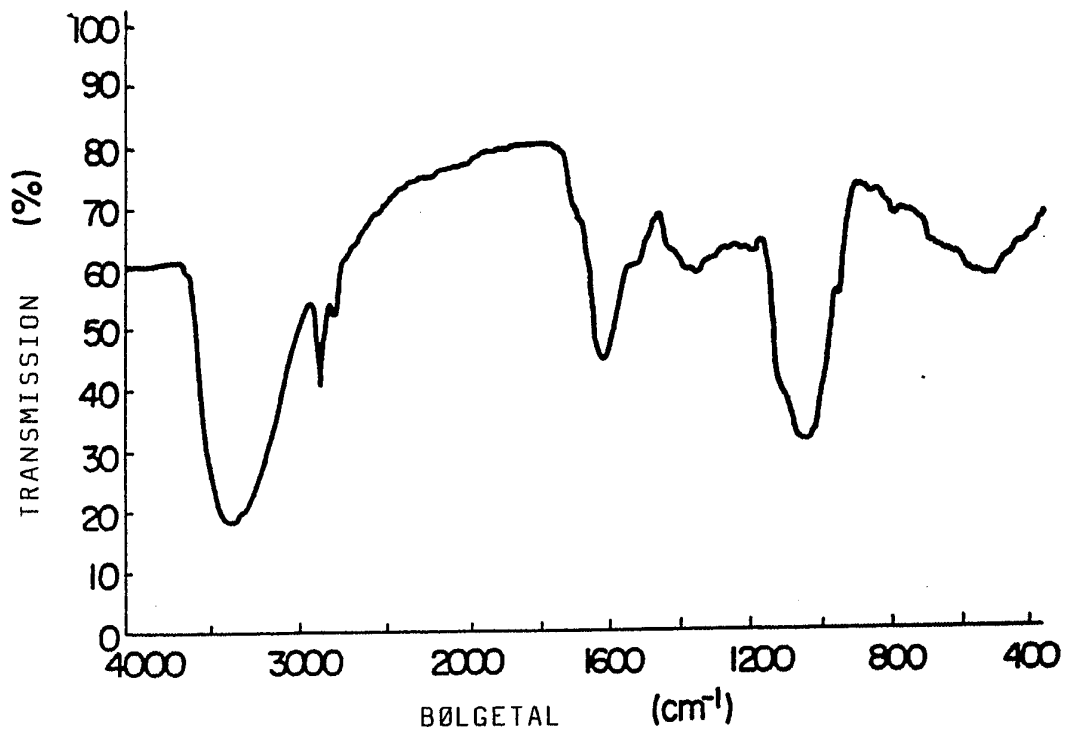
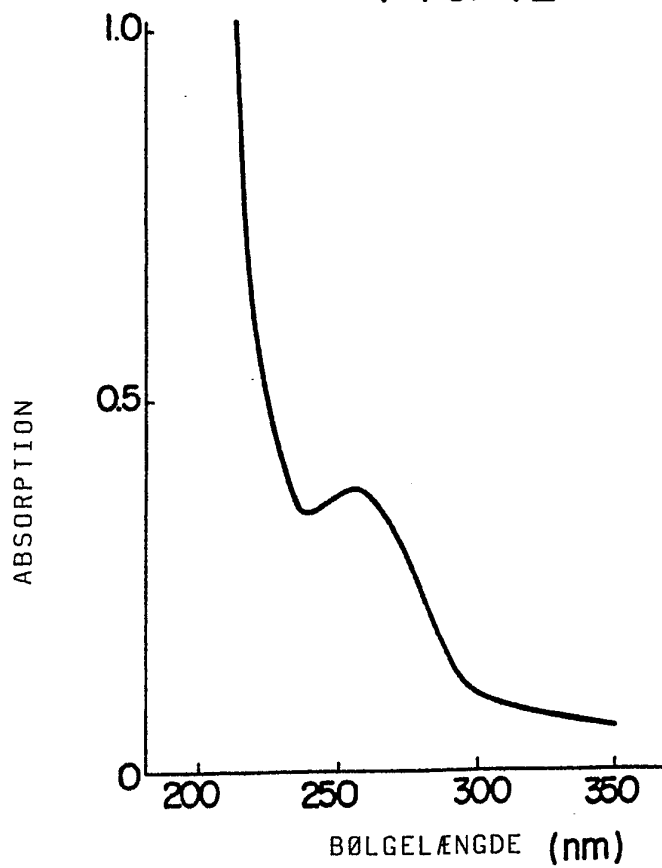


FIG. 12



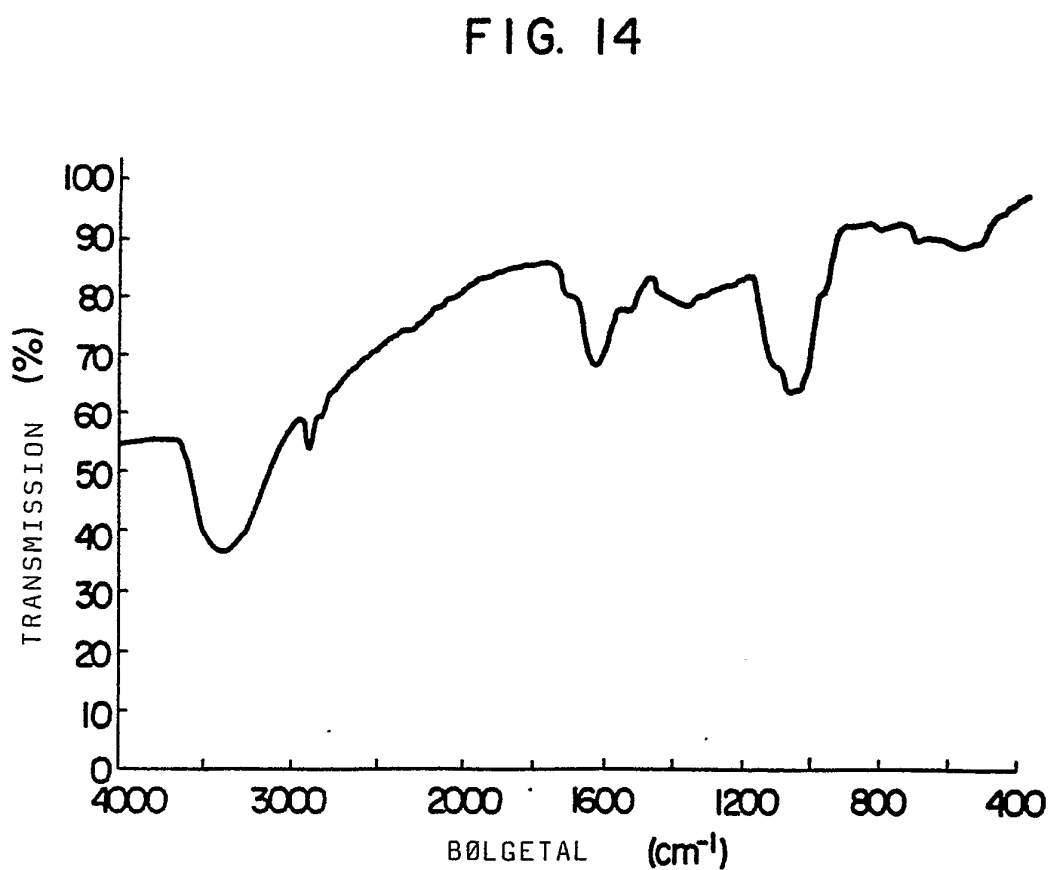
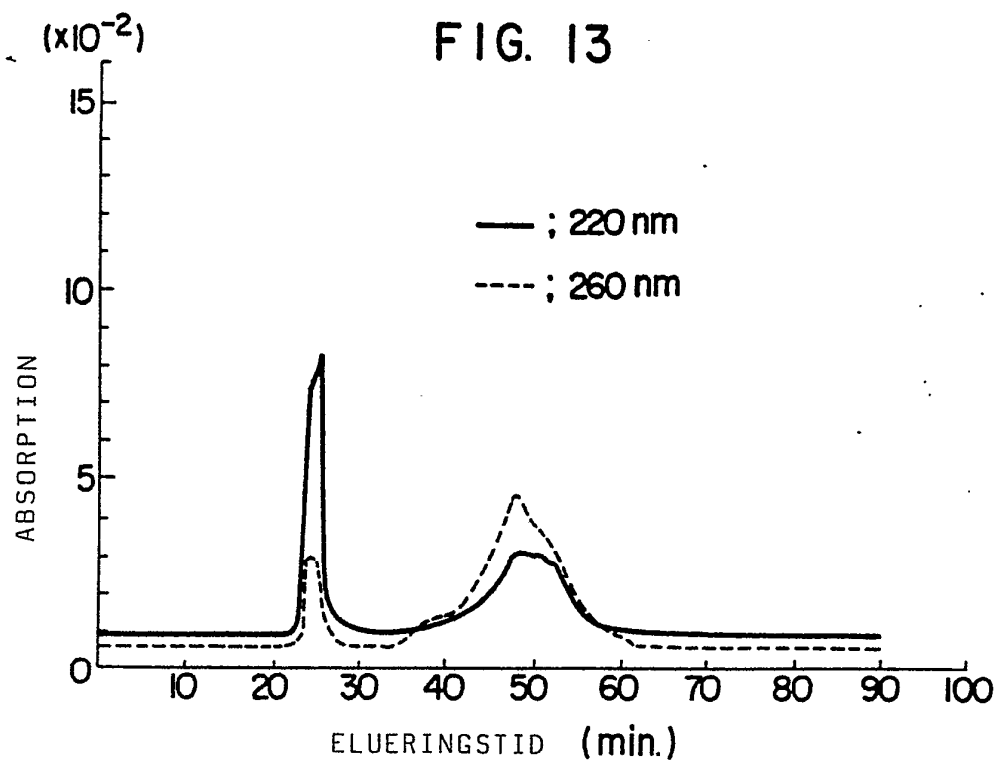


FIG. 15

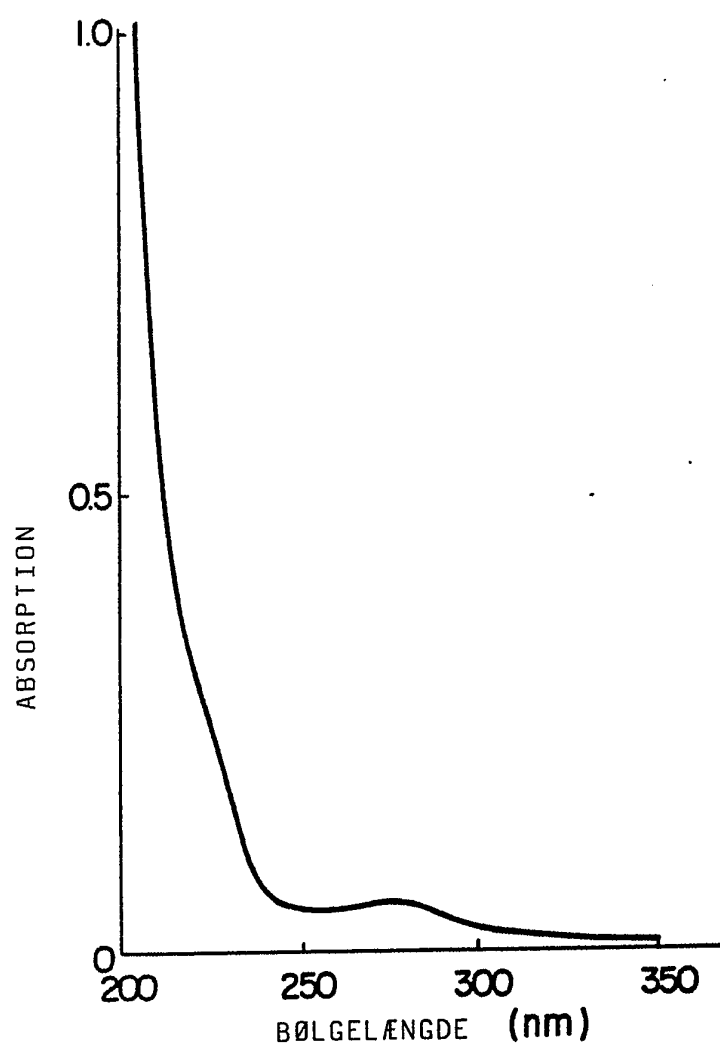


FIG. 16

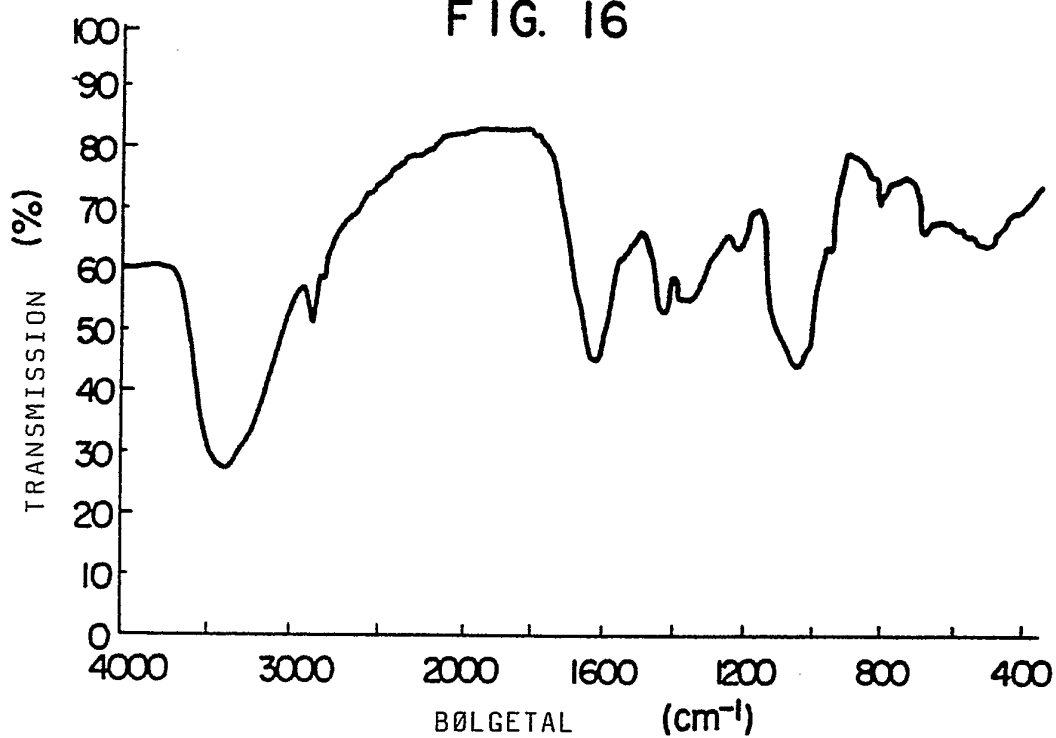


FIG. 17

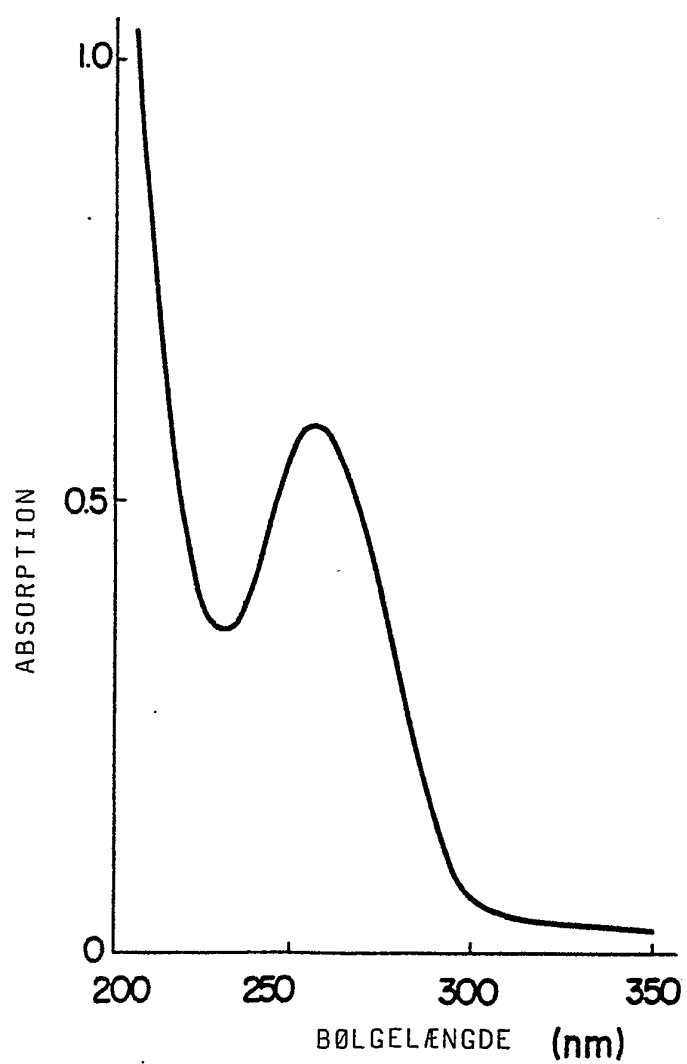


FIG. 18

