

(19) **DANMARK**



PATENTDIREKTORATET
TAASTRUP

(12) **FREMLÆGGELSESSKRIFT**

(11) **159275 B**



(21) Patentansøgning nr.: **2218/83**

(51) Int.Cl.⁵

C 07 K 15/04

(22) Indleveringsdag: **18 maj 1983**

A 61 K 35/74

(41) Alm. tilgængelig: **27 nov 1983**

(44) Fremlagt: **24 sep 1990**

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: **26 maj 1982 US 382404**

(71) Ansøger: ***Ribi Immunochem Research Inc.; P.O. Box 1409; N. E. 581 Old Corvallis Road; Hamilton; Montana 59840, US**

(72) Opfinder: **Edgar Ernst *Ribi; US**

(74) Fuldmægtig: **Firmaet Chas. Hude**

(54) **Fremgangsmåde til fremstilling af raffineret, afgiftet endotoksin**

(56) Fremdragne publikationer

Andre publikationer. Cancer Immunology and Immunotherapy,
bind 12 (1982) side 91-96

(57) Sammendrag:

2218-83

Et raffineret, afgiftet endotoksinprodukt (RDE-produkt) resulterer ved kombination med cellevægsskelet (CWS) i et middel, der er nyttigt til behandling af kræftsvulster. Fremgangsmåder til fremstilling af RDE samt fremgangsmåde til anvendelse af kombinationen af RDE og CWS er også omhandlet.

DK 159275 B

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til fremstilling af et raffineret, afgiftet endotoksin indeholdende intet påviseligt 2-ke-to-3-deoxyoctanoat, 350-475 nmol/mg phosphor og 1700-2000 nmol/kg fedtsyrer opnået ved hydrolysering af en endotoksinekstrakt opnået fra 5 mikroorganismer af familien enterobacteriaceæ med en syre, såsom salt-syre, svovlsyre, phosphorsyre, toluensulfonsyre eller trichloreddikesyre, og lyofilisering af det hydrolyserede produkt til opnåelse af rå lipid A .

10 Kombination af det omhandlede endotoksinprodukt (RDE-produkt) med cellevægtsskelet (CWS) resulterer i et terapeutisk effektivt middel til behandling af kræftsvulster uden de uheldige bivirkninger, der normalt er forbundet med endotoksiner.

15 Endotoksiske ekstrakter opnået fra enterobacteriaceæ inklusive stamorganismer og mutanter kendes. Disse ekstrakter har været benyttet til immunoterapi af forskellige immunogene svulster [se Peptides as Requirement for Immunotherapy of the Guinea-Pig Line-10 Tumor with Endotoxins, Ribí, et al., Cancer Immunol. Immunother., bind 7, side 43-58 20 (1979)]. Endotoksinekstrakterne vides imidlertid at være meget toksiske og derfor at have begrænset anvendelighed til behandling af kræftsvulster. Bestræbelser har været udfoldet med henblik på "afgiftning" af endotoksinerne under bevarelse af deres svulstundertrykkende evne. Som vist, i Ribí, et al., kendes kemiske procedurer til "afgiftning" 25 af endotoksiner under bevarelse af deres hjælpestofkarakter, såsom succinylering og phthalylering, der begge resulterede i tab af endotoksicitet og svulstundertrykkende evne. De kendte forsøg på opnåelse af et endotoksinprodukt med høj svulstundertrykkende evne og ringe eller ingen toksicitet har derfor indtil nu ikke været vellykkede.

30

Fra Cancer Immunology and Immunotherapy, bind 12 (1982), side 91-96, kendes endvidere en fremgangsmåde til fremstilling af raffinerede, afgiftede endotoksiner ved behandling af endotoksiske ekstrakter af mutantstammer af *Salmonella thypimurium* med kogende 0,1 N HCl.

35

Cellevægtsskelet er i alt væsentligt cellevæg, som har fået fjernet meget af det protein og mange af de lipider, der normalt findes i celle-

væggen. Det er et polymert mycolinsyre-arabinogalactan-mucopeptid indeholdende rester af trehalosemycol ("P₂") og uopløste tuberculoproteiner. Cellevægsskelet opnås fra enhver mycobakterie inklusive, men ikke begrænset til *M. smegmatis*, *M. phlei*, *Nocardia rubra*, *Nocardia asteroides*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium parvum*, *M. kansasii*, *M. tuberculosis* (stamme H 37 RV og Ayoma B) samt *M. Bovis*, stamme BCG. Endvidere kan cellevægsskelet opnås fra sådanne ikke-mycobakterier som *E. coli*, *B. Abortus* og *Coxiella burnettii*.

10 Cellevægsskelet produceres ved først at dyrke og derpå høste en bakterie, såsom *M. bovis*, stamme BCG (*bacillus Calmette-Guerin*). Den resulterende helcellerest oparbejdes ved hjælp af en cellefraktionator [Ribi Cell Fractionator (Sorvall, Model RF-1)], der bryder cellerne under adskillelse af den ydre omslutning eller cellevæg fra de proto-
15 plasmiske urenheder. De resulterende cellevægge underkastes derpå en række opløsningsmidelekstraktioner og enzymatiske behandlinger (f.eks. trypsin og/eller chymotrypsin) til opnåelse af renset cellevægsskelet.

20 Fremgangsmåden ifølge opfindelsen er ejendommelig ved, at man behandler det rå lipid A med et første opløsningsmiddel, såsom acetone, til opløsning af deri indeholdte fedtsyrer, opløser det resulterende uopløselige produkt i et andet opløsningsmiddel, såsom methanol, chloroform, acetone, pyridin, ether og eddikesyre, eller en blanding af
25 disse opløsningsmidler, og fører den resulterende opløsning gennem en kromatografisk søjle til opnåelse af det ønskede produkt.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen omfatter således ud over den kendte behandling af en endotoksinektstrakt med en stærk syre samt lyofili-
30 sering en særlig behandling med to forskellige opløsningsmidler og derefter en kromatografisk behandling.

Herved opnås et overlegent raffineret, afgiftet endotoksinprodukt (RDE), der har en høj svulstundertrykkende evne uden toksiske bivirk-
35 ninger, der normalt er knyttet dertil. Det ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen fremstillede raffinerede, afgiftede endotoksiner kan kombineres med cellevægsskelet (CWS) til opnåelse af et meget virksomt middel til behandling af kræftssvulster.

- Endotoksinekstrakter af den type, der anvendes som udgangsmateriale til fremstilling af RDE, kan opnås ud fra hvilke som helst enterobacteriaceæ inklusive stamorganismer og mutanter. Eksempelvis er de følgende slægter eksempler på den type mikroorganismer, som kan anvendes:
- 5 *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia*, *Brucella*, *Bordetella*, *Citrobacter*, *Pseudomonas*, *Pasturella*, *Neisseria*, *Proteus*, *Klebsiella* og *Serratia*.
- 10 Følgende arter bliver typisk benyttet:
- S. minnesota*, *S. typhimurium*, *B. pertussis*, *B. abortus*, *S. enteritidis*, *E. coli*, *S. typhi*, *S. marcescens*, *S. typhosa*, *Shigella flexni* og *S. abortus equi*.
- 15 De som udgangsmateriale benyttede endotoksiske ekstrakter kan fremstilles ved hjælp af en af flere kendte metoder [se f.eks. Webster, M.E., Sagin, J.F., Landy, M., og Johnson, A.G., J. Immunol. 1955, 744, 55, Westphal, O., Luderitz, O., og Bister, F., Z. Naturforsch., 76, 148 (1952), Westphal, O., Pyrogens, Polysaccharides in Biology, Tr. Second Macy Conference (George F. Springer, ed.), Madison, N.J., Madison Printing Co., 1957, 115, Galanos, C., Luderitz, O., Westphal, O., Eur. J. Biochem. 9, 245 (1969), Chen, C.H., Johnson, A.G., Kasai, N., Key, B.A., Levin, J., Nowotny, A., J. Infect. Dis., 128, 543 (1973), Ribí, E., Haskins, W.T., Landy, M., Milner, K.C., The Journal of Experimental Medicine 114, 647 (1961), Leive, L., Biochem. Biophys. Res. Comm., 21, 290 (1965), og Ribí, E., Milner, K.C., og Perrine, T., J. Immunol. 82, 75 (1959)].
- 20 Den foretrukne metode til opnåelse af den endotoksiske ekstrakt er den af Chen, et al. beskrevne, nemlig methanol-chloroform-udfældning.
- 30 Methanol-chloroform-præcipitatet (MCP) omsættes derpå med en organisk eller uorganisk syre og lyofiliseres derpå til fremstilling af et hydrolyseret, råt lipid A med formindsket toksicitet og pyrogenicitet sammenlignet med endotoksin-udgangs-
- 35

materialet. Det resulterende produkt behandles derpå med et opløsningsmiddel, som er i stand til specifikt at opløse fedtsyrer og andre urenheder uden opløsning af det rå lipid A.

Det foretrukne opløsningsmiddel til dette formål er acetone.

- 5 Phosphatindholdet i det afgiftede, raffinerede lipid A er ca. det halve af det indhold, der findes i det toksiske modstykke, hvilket antyder, at phosphatindholdet er forbundet med endotoksins toksiske virkninger.

- 10 De foretrukne uorganiske syrer, der anvendes til omsætning med MCP, er saltsyre, svovlsyre eller phosphorsyre, og de foretrukne organiske syrer er toluensulfonsyre eller trichlor-eddikesyre. Reaktionen kan hensigtsmæssigt udføres ved en temperatur mellem ca. 90 og 130°C i et tidsrum, der er til-
- 15 strækkeligt til fuldstændig hydrolyse, sædvanligvis mellem ca. 15 og 60 min.

Fremstillingen af rå, afgiftet endotoksin kan også foretages ved omsætning af udgangsmaterialet med syren i nærværelse

20 af et organisk opløsningsmiddel, såsom chloroform, methanol og ethanol eller kombinationer deraf.

- Det resulterende rå lipid A opløses i acetone, der er særlig egnet til fjernelse af fedtsyrekomponenterne. Opløsnings-
- 25 midlet fjernes derpå til fremstilling af rå, afgiftet endotoksin.

- Det rå afgiftede endotoksin opløses derpå i et opløsningsmiddel og føres gennem en egnet kromatografisk søjle, såsom eksempelvis en kromatografisk molekularudelukkelsessøjle, til
- 30 fraskillelse af RDE-fraktionerne, som derpå kombineres efter fjernelse af opløsningsmidlet. Den rå, afgiftede endotoksinopløsning føres gennem en Sephadex-søjle i nærværelse af et opløsningsmiddel, såsom chloroform, methanol,
- 35 acetone, pyridin, ether eller eddikesyre eller kombinationer deraf. Søjletrykket kan variere, men ligger typisk i intervallet mellem ca. atmosfærisk tryk og 7 kp/cm², og strømningshastigheden ligger mellem ca. 0,1 og 10 ml/min.

Den rå, afgiftede endotoksinopløsning kan også føres gennem en DEAE-cellulosesøjle ved de samme tryk- betingelser som ovenfor nævnt for Sephadex-søjlen. Strømnings- hastigheden kan holdes mellem ca. 2 og 15 ml/min. De benyt-
5 tede opløsningsmidler er også de samme som de, der blev benyttet til Sephadex-søjlen, selvom vand og/eller diethylamin kan sættes til alle blandinger i en koncentration på indtil ca. 1%.

- 10 Andre metoder til fremstilling af RDE ud fra rå, afgiftet endotoksin indbefatter passage af opløsningen gennem en silicagel 60 lavtrykssøjle med en partikelstørrelse på mellem ca. 15 og 63 mikron under anvendelse af et opløsningsmiddel valgt blandt chloroform, methanol, vand og ammoniumhydroxid.
15 Det foretrukne volumenforhold i den ovennævnte opløsningsmiddelblanding er ca. 50:25:4:2.

RDE fremstillet ifølge den foreliggende opfindelse samt CWS kombineres til fremstilling af et middel, der har kraftig
20 antisvulstvirkning. De kræftformer, der kan behandles med RDE-CWS-midlet indbefatter dyrs svulster, såsom kvæg-pladecellecarcinoma, kvæg-fibrosarcoma, hest-sarcoid, hest-melanoma, hest-pladecellecarcinoma, kanin-brystsvulster, kanin-adenoma og kanin-melanoma samt humane svulster, såsom brystsvulster,
25 lungesvulster, en coleo-rektal svulst, ondartet melanoma, pladecellecarcinomaer og ovariesvulster.

Midlet administreres fortrinsvis ved indsprøjtning i et farmaceutisk acceptabelt medium, såsom en olie-smådråbeemulsion,
30 direkte ind i svulsten under betingelser, der beskrives mere indgående i det følgende. Det ovennævnte middel kan f.eks. stabiliseres ved hjælp af en lyofiliseringsprocedure og derpå genfortyndes uden tab af virkningsevne.

35 Mængden af RDE i en enkelt indsprøjtning til behandling af dyr ligger mellem 6,25 og 250 mikrogram/milliliter. Mængden af CWS ligger mellem 125 og 750 mikrogram/milliliter. Antallet

af milliliter af det i svulsten indsprøjtede biologiske middel bestemmes af svulstens størrelse i overensstemmelse med følgende tabel:

Dyrs dosis i overensstemmelse med svulststørrelse

5

<u>Diameter af svulst (cm)</u>	<u>Mængde af indsprøjtet biologisk middel</u>
0-1 cm	indtil 0,5 ml
1-2 cm	0,5 til 2,5 ml
2-3 cm	2,5 til 5 ml
10 3-5 cm	5 til 10 ml
5-8 cm	10 til 15ml
større end 8 cm	15 til 20 ml

15 Den maksimale dosis pr. indsprøjtning er ca. 1500 mikrogram RDE og ca. 4500 mikrogram CWS. Behandlingsforløbet omfatter indtil 5 indsprøjtninger administreret med en uges intervaller.

20 RDE-CWS-midlet i et passende injicerbart medium, såsom en oliedråbeemulsion, administreres direkte til humane svulster. Mængden af henholdsvis RDE og CWS i en enkelt indsprøjtning ligger mellem ca. 50 og 1000 mikrogram med en foretrukken enkeltdosis mængde på mellem ca. 275 og 325 mikrogram af hver komponent til en typisk voksen patient på 70 kg. I løbet af 25 ca. 1 uge administreres injektionerne med indtil ialt 15 injektioner. Det er generelt ønskeligt at administrere midlet indeholdende mellem ca. 50 og 500 mikrogram/ml RDE og mellem ca. 50 og 500 mikrogram/ml CWS pr. injektion.

30 Som beskrevet ovenfor kan midlet til behandling af varmblo- dede dyr og mennesker benyttes i form af en oliedråbeemul- sion. Mængden af benyttet olie ligger i intervallet mellem ca. 0,5 og 3,0 volumen%, regnet i forhold til midlet samlede volumen. Det foretrækkes at anvende mellem ca. 0,75 og 1,5 35 volumen% af olien. Eksempler på sådanne olier indbefatter

let mineralolie, squalan, 7-n-hexyloctadecan, "Conoco superoil" og "Drakeol" 6 VR mineralolie (fremstillet af Pennreco Company, Bulter, Pennsylvania).

5 Den homogeniserede olieholdige blanding kombineres derpå med en detergent, som eventuelt kan være opløst i en saltvandsopløsning forud for blanding. Detergentmængden ligger typisk mellem ca. 0,02 og 0,20 volumen% og fortrinsvis mellem ca. 0,10 og 0,20 volumen%, regnet i forhold til midlets samlede volumen. Ethvert almindeligt detergentmateriale kan anvendes
10 inklusive "Tween-80" og "Arlacel" (fremstillet af the Atlas Chemical Company).

Blandingen opnået ved detergenttilsætningen homogeniseres derpå til dannelse af en suspension, der har en højere procentdel af oliedråber overtrukket med RDE og CWS, således som
15 bestemt ved iagttagelse under et mikroskop.

De følgende eksempler illustrerer fremgangsmåden ifølge opfindelsen.

20

Eksempel 1 - Fremstilling af rå, afgiftet endotoksin

En 650 mg prøve af et methanol-chloroform-præcipitat, der
25 var fremstillet i overensstemmelse med proceduren ifølge Chen, et al., J. Infect. Dis. 128, 543 (1973), blev suspenderet i 150 ml 0,1N HCl i en trehalset rundbundet kolbe, der var udstyret med en tilbagesvaler, og neddykket i en sonikator. Efter lydbehandling blev glasapparatet derpå sænket ned i
30 et oliebad, der blev holdt ved 120°C, hvilket gjorde det muligt for kolbens indre temperatur at nærme sig eller overstige opløsningens kogepunkt. Overophedning af opløsningen blev minimeret ved at udstyre kolben med et kapillarrør, som var tilknyttet en nitrogengaskilde, via en af halsene. En kon-
35 tinuert strøm af nitrogen blev opretholdt under hele hydro-

lyseproceduren.

Hydrolyse blev fortsat i 30 min., hvorefter opløsningen blev kølet i et isbad, lydbehandlet til dispergering af det faste materiale og fordelt på corex-rør. Kolben blev vasket med
5 destilleret vand til fjernelse af alt fast materiale, der klæbede til kolbens sider, og vaskevandet blev sat til suspensionen i corex-rørene. Centrifugering blev udført med 12000 omdrejninger pr. min. i 80 min. Den ovenstående væske blev dekanteret fra og bortkastet. Den faste rest blev resuspenderet i destilleret vand, lydbehandlet indtil suspensionen
10 var godt dispergeret og recentrifugeret. Centrifugeringsprocessen blev derpå gentaget. Resten blev optaget i destilleret vand, skalfrosset og lyofiliseret under opnåelse af 382 mg rå lipid A. 150 mg af dette materiale blev behandlet med
15 kold (0°C) acetone til fjernelse af fedtsyre, lydbehandlet samt filtreret gennem et Whatman nr. 1 tyngdefiltreringsapparat ved 5°C. 100 mg rå, afgiftet endotoksin blev tilbage efter tørring.

20 Eksempel 2 - Fremstilling af rå, afgiftet endotoxin

En 120 mg prøve af MCP (methanol-chloroform-præcipitat) blev suspenderet i 12 ml absolut methanol, lydbehandlet til dispergering af faste materialer og fordelt på 6 (1 x 10 cm)
25 glastrør med skruelåg. 2 ml 0,2N HCl blev sat til hvert rør, og den resulterende suspension blev inkuberet i et kogende vandbad i 45 min. Efter hydrolyse blev rørene kølet i et bad af isvand og centrifugeret i ca. 10 min. ved 2500 omdrejninger pr. min. Den ovenstående væske blev dekanteret fra, og 5 ml
30 af en 2:1 chloroform/methanol-blanding blev sat til resten til frembringelse af opløsning. 2 ml vand blev tilsat pr. rør, og opløsningen blev blandet. Den tofasede opløsning blev recentrifugeret ved 2500 omdrejninger pr. min i 10 min. Den øvre vandfase blev bortkastet, og 1 ml af en 4:1 chloroform/
35 methanol-blanding blev sat til hvert rør, hvilket resulterede i en klar opløsning. Opløsningerne blev samlet, og opløsningsmidlet blev fordampet på en rotationsfordamper. Resten blev

tørret under højvakuum og lyofiliseret til opnåelse af 45 mg rå lipid A. 20 mg af dette materiale blev behandlet med kold (0°C) acetone, lydbehandlet og filtreret gennem et Whatman nr. 1 tyngdefiltreringsapparat ved 5°C. 13 ml rå, afgiftet endotoksin forblev tilbage efter tørring.

5

Eksempel 3 - Fremstilling af raffineret, afgiftet endotoksin

110 g LH-20-100 (25-100 mikron partikelstørrelse: Pharmacia) blev kombineret med 600 ml af en 2:1 chloroform/methanol-blanding og fik lov til at henstå i 30 min. Den resulterende opslæmning blev sat til en 25 x 1000 mg glaskromatografisøjle (BRL Laboratories), som var udstyret med tryktilslutninger. Efter afsluttet pakning blev søjlen ved hjælp af "Teflon"-trykrør tilsluttet en ISCO-pumpe, model 132. 400 ml af en 4:1 chloroform/methanol-blanding blev pumpet gennem søjlen med en hastighed på 3 ml i min. 100 mg rå, afgiftet endotoksin fremstillet ifølge eksempel 1 blev påført på søjlen i 2,5 ml af en 4:1 chloroform/methanol-blanding via en prøvesløjfe. Strømningen blev formindsket til 1 ml/min., og efter at 150 ml af elueringsmidlet var opsamlet, blev afgangsstrømmen sluttet til en fraktionsopsamler. 4 ml fraktioner blev opsamlet, og raffinerede, afgiftede endotoksinfraktioner blev bestemt ved hjælp af tyndtlagskromatografisk analyse af fraktionerne [E. Merck, 0,25 mm tyk, chloroform/methanol/H₂O/NH₄OH (50:25:4:2) som elueringsmiddel].

25

De raffinerede, afgiftede endotoksinfraktioner blev kombineret og opløsningsmidlet afdampet under efterladelse af 30 mg raffineret, afgiftet endotoksin som et hvidt pulver.

30

Eksempel 4 - Fremstilling af raffineret, afgiftet endotoksin

33 g DEAE-cellulose (Whatman DE-32) blev suspenderet i 150 ml iseddikesyre og forsigtigt omrørt i 10 min. til opnåelse af et opslæmmet pulver. Blandingen blev henstillet natten over.

35

Opslæmningen blev udhældt på en 25 x 400 mm søjle, fik lov til at bundfældes under tapning, og overskud af syre blev derefter ledt bort. Søjlen blev vasket med 2000 ml methanol efterfulgt af 200 ml af en 4:1 chloroform/methanol-blanding. En 100 mg prøve af rått, afgiftet endotoksin, som var frem-

5 stillet ifølge eksempel 1, blev sat til søjlen i 3 ml af en 4:1 chloroform/methanol-blanding eller en 80:20:1 blanding af chloroform, methanol og vand. Søjlen blev elueret med 350 ml af en 4:1 chloroform/methanol-blanding efterfulgt af 300 ml af en 99:1 methanol/vand-blanding. Under anvendelse af

10 et lineær gradient-apparat blev søjlen elueret med 2000 ml af en lineær gradient startende med 100% methanol og endende med 0,2 M eddikesyre i methanol. Søjlen blev elueret med en hastighed på 6 ml/min., og 15 ml fraktioner blev opsamlet. Hveranden fraktion blev analyseret for samlet phosphorindhold

15 i overensstemmelse med proceduren ifølge Bartlett, G.R., J. Biol. Chem. 234, 466-471 (1959). Fraktionerne blev samlet og inddampet til næsten tørhed på en rotationsfordamper samt optaget i 10 ml af en 2:1 chloroform/methanol-blanding samt 40 ml 0,001 M eddikesyre i en skilletragt. Det nedre lag blev

20 fraskilt, filtreret gennem Whatman nr. 2 filtrerpapir og ind-dampet til tørhed til opnåelse af 19,2 mg raffineret, afgiftet endotoksin.

Eksempel 5

25 Tretten stamme 2 marsvin med Line-10 svulstvækster på ca. 9 mm blev indsprøjtet én gang med 0,4 ml af en steril olie-dråbeemulsion, dvs. "Drakeol" 6 VR mineralolie (Pennsylvania Refining Company, Butler, Pennsylvania), der indeholdt

30 50 mikrogram (RDE) og 50 mikrogram (CWS), direkte i svulst-vævet.

Ved afslutningen af en 3 måneders periode blev dyrene undersøgt, og i 12 af de 13 dyr havde fuldstændig undertrykkelse

35 af svulstvæksten fundet sted. Ved et kontrolofforsøg blev seks stamme 2 marsvin med Line-10 svulstvækster på ca. 9 mm ind-

sprøjtet én gang med 0,4 ml indeholdende 50 mikrogram RDE alene. Indsprøjtningerne blev foretaget direkte ind i svulstvævet. Ingen af de 6 svulster viste nogen tegn på undertrykkelse.

5

P a t e n t k r a v .

1. Fremgangsmåde til fremstilling af raffineret, afgiftet
10 endotoksin indeholdende intet påviseligt 2-keto-3-deoxyoctanoat, 350-475 nmol/mg phosphor og 1700-2000 nmol/kg fedtsyrer opnået ved hydrolysering af en endotoksinekstrakt opnået fra mikroorganismer af familien enterobacteriaceæ med en syre, såsom saltsyre, svovlsyre, phosphorsyre, toluensulfonsyre eller
15 trichloreddikesyre, og lyofilisering af det hydrolyserede produkt til opnåelse af rå lipid A, k e n d e t e g n e t ved, at man behandler det rå lipid A med et første opløsningsmiddel, såsom acetone, til opløsning af deri indeholdte fedtsyrer, opløser det resulterende uopløselige produkt i et andet
20 opløsningsmiddel, såsom methanol, chloroform, acetone, pyridin, ether og eddikesyre, eller en blanding af disse opløsningsmidler, og fører den resulterende opløsning gennem en kromatografisk søjle til opnåelse af det ønskede produkt.
- 25 2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at hydrolysen udføres ved en temperatur mellem 90 og 130°C.

30

35