



Ministero delle Imprese e del Made in Italy
DIREZIONE GENERALE PER LA TUTELA DELLA PROPRIETÀ INDUSTRIALE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHE

UIBM

DOMANDA DI INVENZIONE NUMERO	101989900095738
Data Deposito	20/12/1989
Data Pubblicazione	20/06/1991

Priorità	6497/88
Nazione Priorità	HU
Data Deposito Priorità	

Classifiche IPC

Titolo

PROCESSO MICROBICO PER LA PRODUZIONE DI ANTIBIOTICI IMMUNOSOPPRESSIVI

DESCRIZIONE dell'invenzione industriale dal titolo:

"PROCESSO MICROBICO PER LA PRODUZIONE DI ANTIBIOTICI IMMUNOSOP-
PRESSIVI"

della BIOGAL Gyogyszergyar

a DEBRECEN (Ungheria)

Inventori: Antonia JEKKEL nata BOKANY, Gabor AMBRUS, Eva TOTH SARUDY,
Istvan Mihaly SZABO, Agota HUELBER nata DOBOS, Attila ANDOR, Karoly
ALBRECHT, Kalman KOENCZOEL, Valeria SZELL, Eva TOMORI nata JOZST,
Imre MORAVCSIK, Kalman POLYA, Janos ERDEI, Lajos KISS, Karoly NAGY, Bela
PALOTAS, Etelka DELI nata KONSZKY, Karoly BUZASI, Aniko MOLNAR nata
ANTAL, Gyoergy SANTHA, Vilma SZASZHEGYESI e BELA MAKADI.

20 DIC. 1989

=°=°=°=°=°=

2276 5A/89

RIASSUNTO

La presente invenzione riguarda un processo microbico per la produzione di un complesso antibiotico di ciclosporine immunosoppressive o dei suoi componenti, ciclosporina A, ciclosporina B e ciclosporina C, mediante la fermentazione aerobica di un ceppo di fungo filamentoso che biosintetizza i suddetti antibiotici in un mezzo nutriente contenente sorgenti utilizzabili di carbonio ed azoto nonchè sali minerali ed isolando i prodotti formati, che comprende il fatto di mettere in cultura un ceppo dell'originale specie di fungo Tolypocladium varium producendo il complesso antibiotico delle ciclosporine, preferibilmente Tolypocladium varium sp. nov. CY 93 depositato alla collezione nazionale di Microorganismi Agricoli ed Industriali a Budapest, Ungheria con il numero di accesso NCAIM(P)F 001005, su di un mezzo nutriente contenente sorgenti di carbonio, sorgenti di azoto organiche ed inorganiche nonchè sali minerali in condizioni aerobiche ad una temperatura da 25

a 30° e se lo si desidera isolando e purificando il complesso antibiotico delle ciclosporine o i suoi componenti così prodotti.

TESTO DELLA DESCRIZIONE

La presente invenzione riguarda un processo microbico per la produzione di un complesso di ciclosporine o dei suoi componenti ciclosporina A, ciclosporina B e ciclosporina C mediante fermentazione aerobica.

Le ciclosporine sono oligopeptidi ad undici membri apolari neutri e ciclici in cui alcune delle parti componenti amminoacide sono diverse. La ciclosporina A e la ciclosporina B sono state isolate per primi da S. Helv. Chim. Acta 59, 1075 (1976/), mentre le ciclosporine B, D, E e G da R. Traber ed altri (Helv. Chim. Acta 60, 1568 (1977/)) dalla cultura di un fungo (NRRL 8044) identificato in precedenza come *Trichoderma polysporum* (Ling ex Pers.) Rifai. Più tardi la tassonomia del ceppo menzionato è stata revisionata e in seguito è stato descritto come *Tolypocladium inflatum* Gams in letteratura.

Attualmente sono noti 25 diversi antibiotici di ciclosporina elencati come ciclosporine da A a Z (Helv. Chim. Acta 70, 13, (1987/)). Tra questi componenti la ciclosporina A è la sostanza più valida avendo un effetto immunosoppressivo selettivo.

La ciclosporina A è divenuta dapprima nota come un antibiotico debole antifungino, il suo notevole effetto immunosoppressivo è stato riconosciuto soltanto successivamente (J. F. Borel et al.: Immunology 32, 1017 (1977/)).

E' stato confermato in serie di saggi in vitro ed in vivo che le ciclosporine A, C e G sono agenti immunosoppressivi molto specifici.

La ciclosporina A inibisce la risposta immune sia umorale che mediata dalle cellule. Studiando il suo modo di azione essa inibisce la proliferazione della cellula

T nonché la sintesi dell'interleucina 2.

L'uso terapeutico della ciclosporina A in trapianti di organi umani è stato riportato nel 1978. Esso è stato applicato dapprima nei trapianti di rene (R. J. Calne et. al.: Lancet 1978/2 (1323) e midollo spinale (R.L. Powles et.al.: Lancet 1978/2, 1327).

Nel corso dei trapianti di organi (rene, pancreas, fegato, cuore, polmone e di midollo spinale il rigetto degli organi o del midollo spinale può essere soppresso mediante l'applicazione di ciclosporina A.

Inoltre la ciclosporina A è stata applicata con successo per il trattamento di alcune malattie autoimmunitarie (uveite, artrite reumatoide, psoriasi e miastenia grave).

Nella letteratura brevettuale i seguenti microorganismi sono stati usati per la produzione del complesso delle ciclosporine: *Cylindrocarpon lucidum* Booth, NRRL 5760 (brevetto svizzero N°589.716); *Tolypocladium inflatum* Gams, NRRL 8044 (secondo la tassonomia precedente: *Trichoderma polysporum* (Link ex Pers). Rifai (brevetto svizzero N°603.790) secondo Bisett (1983) *Tol. inflatum* W. Gams 1971 è sinonimo di *Tol. Niveum* (Rostrup) Bisett. com. mov. e *Fusarium solani*, MCI-1549, MCI-1550 (domanda di brevetto giapponese pubblicata N°82-63093). Nel corso dei processi di fermentazione effettuati con i suddetti microorganismi sono stati ottenuti bassi livelli di produzione per le ciclosporine dopo lunghi periodi di fermentazione e le rese di isolamento sono anch'esse basse.

Le ricerche effettuate si sono focalizzate per trovare ceppi di microorganismi che producano il complesso antibiotico delle ciclosporine od i suoi componenti in concentrazioni superiore ed in condizioni più vantaggiose rispetto ai ceppi precedenti. Vagliando un gran numero di ceppi di funghi filamentosi isolati dal

terreno, è stato trovato un ceppo di microorganismo del genere *Tolypocladium* che è capace di biosintetizzare il complesso antibiotico delle ciclosporine. Questo microorganismo indicato con CY/93 non è stato potuto essere identificato negli studi tassonomici con una qualsiasi delle specie di funghi produttori del complesso delle ciclosporine. *Tolypocladium varium* species nova CY/93 è un nuovo nome tassonomico del genere *Tolypocladium* che può essere differenziato a livello di specie.

Sulla base dei suddetti reperimenti la presente invenzione riguarda un processo microbico che produce un brodo contenente elevate concentrazioni di ciclosporina applicando un nuovo microorganismo, *Tolypocladium varium* species nova CY/93 depositato alla Collezione Nazionale dei Microorganismi Agricoli ed Industriali, Budapest, Ungheria con il numero di accesso NCAIM(P)F 001005. Il brodo di fermentazione contiene oltre alla ciclosporina A che è un prodotto principale, anche piccole quantità di ciclosporina B e ciclosporina C.

Le caratteristiche tassonomiche della nuova specie di fungo son state confrontate con le proprietà diagnostiche principali della specie *Tolypocladium* come segue.

Il genere *Tolypocladium* è stato descritto dalla prima volta di Gams nel 1971 come nuovo genere di Moniliales del terreno. Le sue proprietà caratteristiche sono: lenta crescita, colonie bianche simili ad un cuscino, fialidi terminali e laterali sviluppate parzialmente su una corta catena laterale con base fortemente rigonfia e collo filamentoso frequentemente incurvato che termina in un conidium unicellulare. Con questo genere le seguenti tre nuove specie sono state differenziate da Gams: *T. geodes*, *T. cylindrosporum* e *T. infilatum*. *T. geodes* ha un odore di terreno pronunciato tipo Actinomyceti mentre il nuovo *T. varium* sp. nov. CY/93 è

completamente privo di esso. Inoltre le cellule portanti del *T. geodes* sono notevolmente più strette rispetto a quelle del *T. varium* sp. nov. CY/93. I conidi del *T. cylindrosporum* sono caratteristicamente lunghi ed allungati mentre quelli del *T. varium* sp. nov. CY/93 sono sferici e soltanto leggermente allungati. I conidi del *T. inflatum* sono ovoidali e più lunghi di quelli osservati nella cultura di *T. varium* sp. nov. CY/93. Le fialidi del *T. inflatum* sono caratteristicamente prodotte in verticilli o direttamente sulle ife oppure su cellule portanti lunghe da 2 a 3 µm. Il *T. varium* sp. nov. CY/93 non mostra alcun tale tracciato di disposizione a verticilli, e ciò è soltanto sporadicamente rilevabile di tanto in tanto. A causa principalmente del micelio aereo bianco simile a cotone, le colonie di tutte le note specie di *Tolypocladium* sono bianche, mentre il rovescio delle colonie è giallastro grigio, incolore o giallo. Non si produce alcun pigmento tipico solubile. Il *T. varium* sp. nov. CY/93 può essere differenziato anche sotto questo aspetto: su mezzi contenenti glucosio e peptone nonché estratto di malto ed estratto di lievito si produce con variabilità temporale un pigmento scuro rispettivamente grigio cupo e nero.

La valutazione tassonomica della nuova specie in confronto alle altre note specie di *Tolypocladium* è stata effettuata sulla base delle seguenti pubblicazioni: W. Gams: *Persoonia*, 6, 185-191 (1971); G.L. Barron: *Can J. Bot* 58 439-442 (1980), e Bisett, J. : *Can J. Bot* 61, 1311-1329 (1983).

I tracciati diagnostici del *Tolypocladium varium* sp. nov. CY/93 vengono riassunti appresso.

Colonie vecchie 10 giorni aventi un diametro da 10 a 25 mm hanno la loro superficie ricoperta da micelio aereo bianco simile a cotone e riccamente spolulante. Il rovescio delle colonie è giallastro grigio o grigio sporco. In alcuni

mezzi complessi si produce un pigmento grigio scuro solubile. Si osserva sia la sporulazione terminale che laterale sulle ife del micelio aereo. Le fialidi sono disposte o solitariamente o sporadicamente ed occasionalmente in verticilli direttamente sulle ife o su corte cellule portanti (da 2 a 3 μ m). Le fialidi sono composte da una base rigonfia (2-4 x 2-3 μ m) ed un collo filamentoso lungo (2-4 x 0,5-0,6 μ m). I conidi delle teste sono piccoli (2-3 x 1,3-2,2 μ m), generalmente sferici e lisci. L'epiteto specifico vario si riferisce alla variabilità delle fialidi. Il Tol Varium mostra nel suo ciclo vitale una certa similarità cp, il genere Harposporium, sul quale si riferirà altrove in questa relazione. Il ceppo nominato CY/93 non può utilizzare raffinoso, ma cresce bene sulle seguenti sorgenti di carbonio: mannitolo, inositolo, saccarosio, fruttosio, ramnosio, galattosio, destrosio, arabinosio e xilosio in cultura superficiale. Le sue culture sono scarsamente sviluppate su agar nutriente ed agar estratto di malto, e ben sviluppate su agar di farina di soia, agar di Czapek e agar di patata e destrosio. L'agar di farina di avena e l'agar estratto di lievito di destrosio non sono adatti per la conservazione.

Il Tol. varium differisce notevolmente dal Tol. triginosporum, che produce conidi trigonali in vista frontale con bordi leggermente concavi. Il Tol. varium differisce anche dal Tol. balanoides. Quest'ultimo produce fialidi laterali lageniformi.

Inoltre il ceppo olotipo (CY/93) del Tolypocladium varium n. sp. è diverso dal ceppo di tipo autentico di Tolypocladium inflatum (CBS 714.70) sotto l'aspetto che quest'ultimo ceppo sviluppa un micelio aereo bianco ricco quando messo in cultura su mezzo nutriente di maltosio ed agar, mentre il Tolypocladium varium sp. nov. CY/93 non produce tali miceli aerei. Il ceppo tipo di Tolypocladium inflatum produce un endopigmento bruno rossastro nei suoi miceli di substrato su mezzo di

cultura agar ferropéptone, mentre i miceli di substrato del *Tolypocladium* rimangono giallo chiaro. Il ceppo *Tolypocladium varium* sp. nov. CY/93 non utilizza arabinosio mentre il *Tolypocladium inflatum* lo fa. Utilizzando nitrito di sodio quest'ultimo ceppo sviluppa miceli ricchi mentre il *Tolypocladium varium* sp. nov. CY/93 cresce a stento.

Il confronto del *Tolypocladium varium* sp. nov. CY/93 con i ceppi autentici di altre specie *Tolypocladium*, con *Trichoderma polysporum* ATCC 16, 641 e con *Cylindrocarpon lucium* NRRL 5760 viene riassunto nella tabella I.

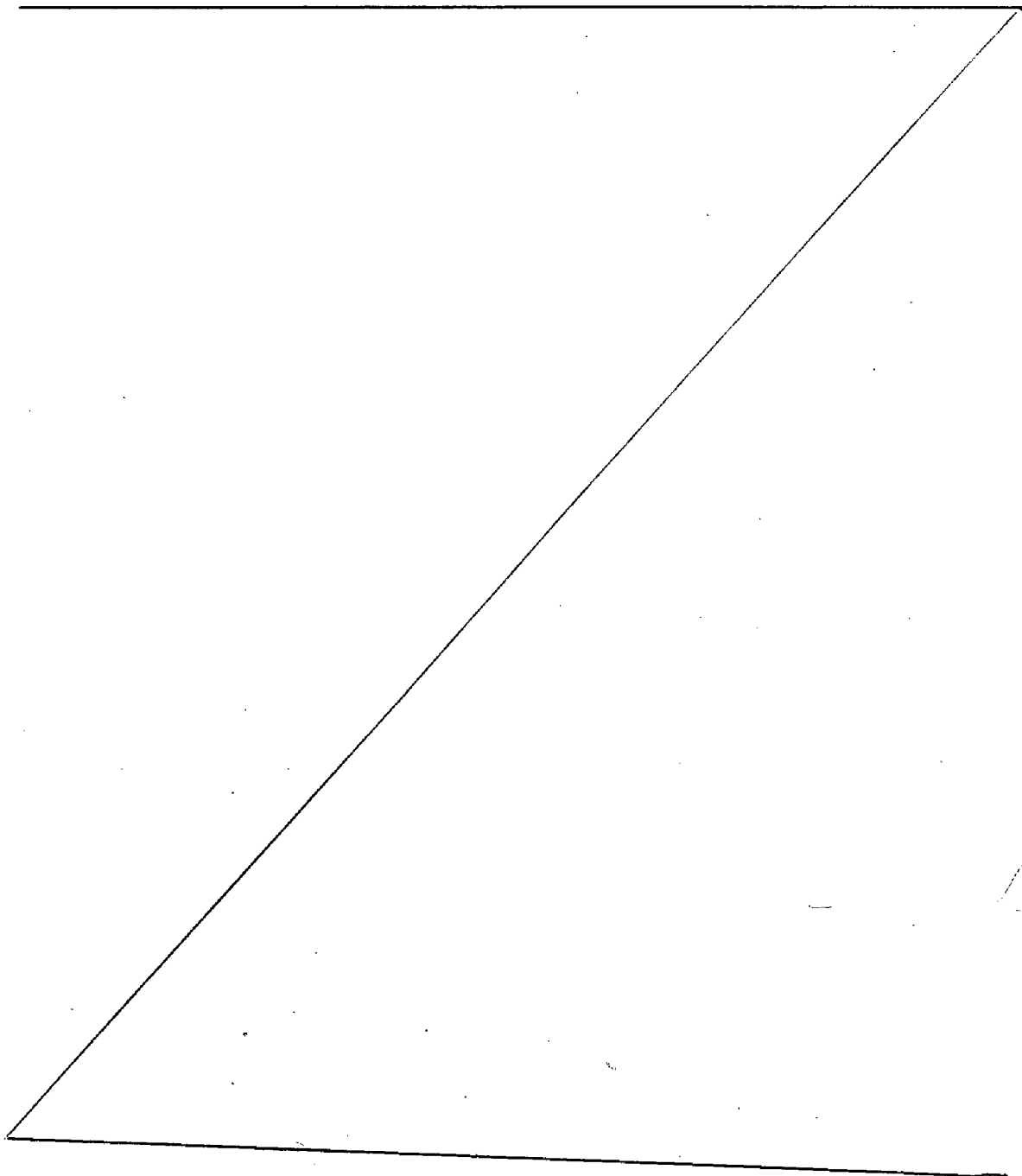


TABELLA I

Decomposizione della cellulosa	Tolypocladium varium CY/93	Tolypocladium cylindrosporum CBS 717.70	Tolypocladium cylindrosporum CBS 718.70	Tolypocladium geodes CBS 721.70	Tolypocladium geodes 722.70	Trichoderma polysporum ATCC 16641	Cylindrocarpon lucicum NRRL 5760
Micelio aereo: verde o verde blastro	-	-	-	-	-	+++	++
Pigmento solubile rosso produzione su agar king	-	-	-	-	-	-	+++
Produzione di pigmento bruno su agar ferro peptone	-	-	-	-	-	-	+++
Produzione di pigmento bruno su agar di glicerolo sintetico	-	-	-	-	-	+++	-
Utilizzazione di saccarosio	+++	+++	+++	+++	+++	-	+++
Utilizzazione di inulina	-	-	-	-	-	-	+++
Crescita a 5°C	+++	+++	+++	+++	+++	-	-
Crescita a 37°C	-	-	-	-	-	+	+++
Resistenza contro il trattamento caldo a 50°C per 60 minuti	+++	-	-	-	-	+++	+++
Produzione di acido da glucosio	+++	+++	+	+	+++	+++	+++
Utilizzazione di salicilato di sodio	-	-	-	-	-	+++	+++
Utilizzazione di malonato di sodio	++	++	++	-	-	++	++
Utilizzazione di tarttrato di sodio	+	++	+	-	-	++	+
Produzione di pigmento solubile lilla su agar di tirosina e leucina	-	-	-	+++	+++	-	-

Sulla base dei reperimenti di cui sopra la presente invenzione riguarda un procedimento per la preparazione del complesso antibiotico delle ciclosporine e/o dei suoi componenti ciclosporina A, ciclosporina B e ciclosporina C mediante la fermentazione aerobica di un ceppo di fungo filamentoso che biosintetizza gli antibiotici suddetti in un mezzo nutriente contenente sorgenti utilizzabili di carbonio e di azoto nonchè sali minerali, ed isolando i prodotti formati, che comprende il fatto di coltivare un ceppo della nuova specie di fungo *Tolypocladium varium* producendo il complesso antibiotico delle ciclosporine, preferibilmente *Tolypocladium varium* sp. nov. CY/93, depositato alla collezione nazionale dei microorganismi agricoli ed industriali di Budapest Ungheria sotto il numero di accesso NCAIM(P)F 001005, su un mezzo nutriente contenente sorgenti di carbonio, sorgenti di azoto organiche ed inorganiche nonchè sali minerali in condizioni aerobiche in una gamma di temperatura da 25 a 30°C, e se lo si desidera isolando e purificando il complesso antibiotico delle ciclosporine od i suoi componenti prodotti.

In conformità di una forma di realizzazione preferita della presente invenzione il complesso antibiotico delle ciclosporine viene prodotto con il nuovo ceppo *Tolypocladium varium* sp. nov. CY/93. Il ceppo prescelto è altamente vantaggioso a causa della sua crescita rapida. E' una caratteristica favorevole il fatto che il ceppo può utilizzare saccarosio, glucosio, sorbosio, maltosio, fruttosio, amido glicerolo nonchè vari grassi ed olii come sorgenti di carbonio, ed una varietà di sorgenti di azoto organiche ed inorganiche come liquore di infusione di mais, peptone, estratto di lievito, estratto di carne, nitrato di sodio, nitrato di ammonio, solfato di ammonio nonchè vari amminoacidi. In aggiunta alle sudette sorgenti di carbonio e di azoto i mezzi nutritivi usati per la produzione del complesso

antibiotico delle ciclosporine possono anche contenere sali minerali (cloruro di potassio) solfato di magnesio o fosfato di idrogenato di potassio), elementi in tracce (sale di rame, di manganese e di ferro) ed inoltre vitamine ed agenti antischiiumogeni.

In conformità di un metodo preferito della presente invenzione un mezzo liquido viene inoculato con una sospensione di conidi e miceli preparata dalla cultura inclinata di agar di *Tolypocladium varium* sp. nov. CY/93. Dopo aver coltivato per tre giorni, la precultura ottenuta viene usata per inoculare il mezzo applicato per la produzione di antibiotico, che viene dopo di ciò incubato ad una temperatura da 25 a 30°C e preferibilmente a 25°C per un periodo da 5 a 7 giorni. Durante la fermentazione il pH viene mantenuto nella gamma da 6,0 a 2,5, e preferibilmente a 5,2. La fermentazione viene effettuata in condizioni aerobiche con un'agitazione vigorosa (da 750 a 1000 giri al minuto) ed aerazione di 300 l/ora.

Durante la fermentazione il contenuto di ciclosporine del brodo viene sorvegliato mediante saggio microbico e cromatografia liquida ad alta pressione. Non appena la quantità massima di antibiotici è stata prodotta questi vengono ottenuti dal liquido di cultura in maniera nota nei metodi estrattivi e/o assorbitivi.

La concentrazione di ciclosporina dei brodi viene misurata sulla base dell'attività antifungina delle ciclosporine mediante la prova di diffusione su lastra. *Aspergillus niger*, *Aspergillus japonicus* e *Curvularia lunata* possono essere vantaggiosamente usati come organismi di prova (M. Dreyfuss et al.: *Europea J. Appl. Microbiol.* 3, 125-133/1976/). L'analisi con cromatografia liquida ad alta pressione della concentrazione di ciclosporine del brodo viene effettuata dai campioni di brodo diluiti dieci volte con metanolo secondo F. Kreuzig (*J. Chromat.* 290, 181 /1984/). In conformità degli esperimenti effettuati il complesso antibiotico di

ciclosporine contenente ciclosporina A come prodotto principale e ciclosporina B e ciclosporina C come componenti minori, viene prodotto con elevata resa a (950 mcg/ml) mediante il nuovo ceppo *Tolypocladium varium* sp.nov. CY/93.

I metodi di estrazione possono essere applicati vantaggiosamente per l'isolamento del complesso di ciclosporine dal brodo di fermentazione. Prima dell'estrazione il micelio viene separato o per filtrazione o per centrifugazione. Gli antibiotici prodotti durante la fermentazione possono essere vantaggiosamente lavati via dalle cellule di microorganismo con alcanoli inferiori, preferibilmente con metanolo, oppure con chetoni organici, preferibilmente con acetone, mentre le ciclosporine nel filtrato di brodo possono essere estratte con solventi organici immiscibili in acqua, come etilacetato, n-butilacetato, diclorometano, 1,2-dicloroetano o cloroformio, preferibilmente con n-butilacetato. Il prodotto grezzo ottenuto mediante estrazione viene contaminato da pigmenti rosso e violetto prodotti dal fungo, che possono essere rimossi mediante assorbimento su carbon dolce attivo o gel di silice. Eventuali contaminanti lipidi (vale a dire agenti antischiumogeni) possono essere separati mediante distribuzione in un sistema di etere di petrolio e metanolo contenente 10% di acqua, ove le impurità vengono trasferite nella fase di etere di petrolio.

La fase metanolo acquosa viene contratta a pressione ridotta, quindi il residuo acquoso viene estratto con diclorometano, che viene evaporato per dare ciclosporina purificata. La ciclosporina A può essere separata dai componenti minori di ciclosporina mediante cromatografia su colonna e ricristallizzazione.

La struttura dei prodotti isolati viene indagata mediante spettroscopia di massa e UV, IR, ^1H NMR, ^{13}C NMR e analisi di amminoacidi.

I seguenti esempi sono illustrativi ma non limitativi dell'ambito della

presente invenzione.

ESEMPIO 1

Una sospensione di conidio e micelio viene preparata con 5 ml di una soluzione di cloruro di sodio allo 0,9% ottenuta dalla cultura inclinata con agar estratto di lievito ed estratto di malto di *Tolypocladium varium* nov. sp. CY/93. 1 ml di questa sospensione viene usato per inoculare 100 ml di mezzo di inoculo IC sterile in un pallone di Erlenmeyer da 500 ml.

Composizione del mezzo IC:

Glucosio 40 g

Caseina peptone 5 g

Nitrato di sodio 3 g

Fosfato idrogenato di potassio 2 g

Cloruro di potassio 0,5 g

Solfato di magnesio $\times 7 H_2O$ 0,5 g

Solfato di ferro (II) $\times 7 H_2O$ 0,01 g

in 100 ml di acqua di rubinetto.

Il pH del mezzo nutritivo viene regolato a 5,2 prima della sterilizzazione e la miscela viene sterilizzata a 121°C per 25 minuti. La cultura viene incubata a 25°C su un agitatore rotativo (340 giri al minuto) quindi si usano porzioni da 5 ml di questo mezzo di inoculo per inoculare 15 palloni da 500 ml di Erlenmeyer contenenti 100 ml ciascuno di mezzi sterili FC_1 .

Composizione del mezzo FC_1

Glucosio 80 g

Tryptone 40 g

Urea 2 g

Solfato di ammonio 12 g

Nitrato di sodio 3 g

Fosfato di idrogenato di potassio 2 g

Cloruro di potassio 0,5 g

Solfato di magnesio $\times 7 H_2O$ 0,5 g

Solfato di ferro (II) $\times 7 H_2O$ 0,01 g

in 1000 ml di acqua di rubinetto.

Il pH del mezzo nutritivo viene regolato a 5,2 prima della sterilizzazione e la miscela viene sterilizzata a 121°C per 25 minuti.

I palloni vengono incubati su un agitatore rotativo (340 giri al minuto) a 25°C. Durante la fermentazione la concentrazione di antibiotici di brodo viene sorvegliata mediante la prova di diffusione su lastra. *Aspergillus niger* viene applicato come organismo di prova. La concentrazione del complesso antibiotico di ciclosporine nel brodo viene saggiata usando la ciclosporina A come standard.

La fermentazione viene continuata per 168 ore quando il brodo contiene 40 µg/ml di complesso antibiotico di ciclosporina. Il complesso di ciclosporina viene isolato in conformità del seguente metodo.

Le cellule di 1 litro del brodo vengono filtrate e gli antibiotici vengono lavati via due volte con 200 ml di metanolo. La soluzione di metanolo acquosa viene concentrata sotto pressione ridotta, quindi il complesso antibiotico viene estratto dal concentrato acquoso con 2 x 50 ml di n-butil acetato. Il contenuto di ciclosporina del filtrato di brodo viene estratto con 200 ml di n-butilacetato. Gli estratti di n-butilacetato vengono raccolti assieme, essiccati su solfato di sodio anidro e quindi evaporati a pressione ridotta a 40°C. I 3,7 g di prodotto grezzo ottenuto vengono sciolti in 10 ml di etanolo e trasferiti alla sommità di una colonna

gel di Sephadex LH-20 (lunghezza di colonna 40 cm, diametro 2,5 cm) preparata con metanolo. Quindi le impurità lipide vengono separate eluendo un metanolo. Le frazioni che contengono il complesso di ciclosporina vengono evaporate sotto pressione ridotta a 40°C. La separazione dei componenti del complesso di ciclosporina ottenuto (1,05 g) viene effettuata mediante cromatografia su una colonna di gel di silice preparata da 20 g di 20 g di Kieselgel 40 (Reanal, Budapest) eluendo con miscela di solvente cloroformio e metanolo contenuti volumi gradatamente in aumento di metanolo. L'eluizione viene iniziata con 100 ml di cloroformio, quindi viene continuata con miscele di cloroformio e metanolo in cui il contenuto di metanolo di ciascuna porzione da 100 ml aumenta dello 0,5%. Il contenuto di ciclosporina delle frazioni viene sorvegliato mediante cromatografia su strato sottile (lastra: Kieselgel 60 F₂₅₄, DC Alufoil /Merck/, solvente di sviluppo etilacetato isopropanolo 95:5 rilevamento vapori di iodio). Le ciclosporine A, B e C vengono eluite dalla colonna mediante miscele di metanolo e cloroformio contenenti rispettivamente 2,0%, 2,5% e 3,0% di metanolo. Le frazioni contenenti i componenti puri vengono evaporate sotto pressione ridotta dando 225 mg di ciclosporina A (punto di fusione 137-140°C) $[\alpha]_D^{25}$: -189° /metanolo/, 25 mg di ciclosporina B (punto di fusione: 149-151°C) e 52 mg di ciclosporina C (punto di fusione: 150-152°C).

ESEMPIO 2

Cinque litri di mezzo di inoculo IC sterilizzato a 121°C per 45 minuti in un fermentatore da laboratorio da 10 litri, vengono inoculati con 200 ml in una cultura agitata di inoculo preparata come descritto nell'esempio 1, quindi incubata a 25°C, agitata a 750 giri al minuto ed aerata con 300 l/ora di aria.

La fermentazione viene continuata per 72 ore, quindi si usano 500 ml di

questo mezzo di inoculo per inoculare 5 l di mezzo FC_2 sterilizzato a $121^{\circ}C$ per 45 minuti in un fermentatore da laboratorio da 10 litri.

Composizione del mezzo FC_2 :

Glucosio 80 g

Tryptone 40 g

Urea 2 g

Solfato di ammonio 12 g

Nitrato di sodio 3 g

Fosfato di idrogenato di potassio 2 g

Cloruro di potassio 0,5 g

Solfato di magnesio $\times 7 H_2O$ 0,5 g

Solfato di rame (II) $\times 5 H_2O$ 0,01 g

Solfato di manganese (II) $\times 7 H_2O$ 0,01 g

Solfato di ferro (II) $\times 7 H_2O$ 0,01 g

in 1000 ml di acqua di rubinetto

Il pH del mezzo viene regolato a 5,2 prima della sterilizzazione. La cultura inoculata viene incubata a $25^{\circ}C$, agitata con 750 giri al minuto ed aerata con 300 l/ora di aria.

La fermentazione viene continuata nelle condizioni suddette per 144 ore finchè si raggiungono i titoli di picco di ciclosporina e quindi il brodo viene raccolto.

La ciclosporina A viene isolata dai 4,8 litri di brodo di fermentazione contenenti 500 ug/ml del complesso di ciclosporina mediante il seguente metodo.

Le cellule di microorganismi vengono centrifugate e il complesso di ciclosporina viene lavato via dalle cellule con 2 x 1 litri di metanolo. La soluzione

acquosa di metanolo viene concentrata sotto pressione ridotta, quindi il complesso antibiotico viene estratto dal concentrato acquoso con 2 x 250 ml di n-butilacetato.

Il complesso di ciclosporina viene estratto dal filtrato del brodo di fermentazione con 2 x 500 ml di n-butilacetato. Tutti gli estratti di n-butilacetato vengono raccolti, essiccati su solfato di sodio anidro, quindi la soluzione viene evaporata sotto pressione ridotta a 40°C. La purificazione preliminare le prodottogreggio ottenuto (19,2 g) viene effettuata mediante cromatografia su una colonna preparata da 100 g di Kieselgel 60 (dimensione di particelle da 0,063 a 0,2 mm), con un solvente di sviluppo di cloroformio metanolo acetone 92:4:4). Le frazioni contenenti il complesso di ciclosporina (analisi cromatografica su strato sottile: lastra: Kieselgel 60 F₂₅₄, DC Alufoil/Merck/; solvente di sviluppo esano acetone:1; rilevamento reagente clorotolidina) vengono evaporate fino a secchezza. Il residuo di evaporazione 5,28 g è sottoposto a cromatografia su colonna per dare la ciclosporina A. La colonna viene preparata da 115 g di Kieselgel 60 (dimensione di particelle da 0,063 a 0,2 mm), e viene eluita con miscele di esano ed acetone contenenti i volumi gradatamente in aumento di acetone. La ciclosporina A viene eluita dalla colonna con una miscela contenente 23% di acetone. Evaporando le frazioni contenenti la ciclosporina A si ottengono 1,46 g di ciclosporina A.

ESEMPIO 3

Una sospensione di conidio e micelio viene preparata con 5 ml di una soluzione di cloruro di sodio allo 0,9% dalla cultura inclinata di agar, estratto di malto ed estratto di lievito di *Tolypocladium varium* nov. sp. CY/93 e viene usata per inoculare 800 ml del mezzo di inoculo IC descritto nell'esempio 1 e sterilizzato in un pallone di Erlenmeyer da 3 litri. Il pallone viene incubato su un agitatore rotativo (350 giri al minuto) a 25°C per 2,5 giorni, quindi 5 l di un mezzo FC₃

sterilizzato in un fermentatore da laboratorio da 10 litri a 121°C per 45 minuti, vengono inoculati con esso.

Composizione del mezzo FC₃

Sorbosio 60 g

Tryptone 40 g

Urea 2 g

Solfato di ammonio 12 g

Nitrato di sodio 3 g

Fosfato di idrogenato di potassio 2 g

Cloruro di potassio 0,5 g

Solfato di magnesio x 7 H₂O 0,5 g

Solfato di manganese (II) x 7 H₂O 0,01 g

Solfato di ferro (II) x 7 H₂O

in 1000 ml di acqua di rubinetto.

Il pH del mezzo viene regolato a 5,2 prima della sterilizzazione. La cultura inoculata viene incubata a 25°C, agitata a 1000 giri al minuto aerata a 300 l/ora di aria.

La fermentazione viene continuata per 168 ore, quando il brodo di fermentazione contiene 600 mcg/ml del complesso di ciclosporina secondo il saggio microbico.

Mediante isolamento come descritto nell'esempio 2, si ottengono 310 mg di ciclosporina A da un litro del brodo.

ESEMPIO 4

Una sospensione di conidio e micelio viene preparata con 5 ml di una soluzione di cloruro di sodio allo 0,9% dalla cultura inclinata di agar di estratto di

lievito ed estratto di malto vecchia da 5 a 7 giorni di *Tolypocladium varium* nov. spe. CY/93 (NCAIM(P)F 001005) e viene usata per inoculare 500 ml di mezzo di inoculo IC descritto nell'esempio 1, e sterilizzata in un pallone di Erlenmeyer da 3 litri. Il pallone viene incubato su un agitatore rotativo (350 giri al minuto) a 25°C per 3 giorni, quindi 5 l di un mezzo FC₄ sterilizzato in un fermentatore da laboratorio da 10 l a 121°C per 45 minuti vengono inoculati con esso.

Composizione del mezzo FC₄:

Maltosio 80 g

Tryptone 40 g

Urea 2 g

Solfato di ammonio 12 g

Nitrato di sodio 3 g

Fosfato idrogenato di potassio 2 g

Cloruro di potassio 0,5 g

Solfato di magnesio $\times 7 H_2O$ 0,01 g

Solfato di manganese (II) $\times 7 H_2O$ 0,01 g

Solfato di rame (II) $\times 5 H_2O$

Solfato di ferro (II) $\times 7 H_2O$ 0,01 g

in 1000 ml di acqua di rubinetto.

Il pH del mezzo viene regolato a 5,2 prima della sterilizzazione.

Dopo l'inoculazione il brodo di fermentazione viene incubato a 25°C, agitato a 1000 giri al minuto ed aerato con 300 litri/ora di aria.

La fermentazione viene continuata per 144 ore, quando il brodo di fermentazione contiene 620 mcg/ml del complesso di ciclosporina secondo il saggio microbico.

L'isolamento viene effettuato mediante il metodo descritto nell'esempio 1.
Così si ottengono 305 mg di ciclosporina 1 da un litro di brodo.

ESEMPIO 5

Si prepara una sospensione di conidio e micelio con 5 ml di una soluzione di cloruro di sodio allo 0,9% dalla cultura inclinata di agar di estratto di lievito ed estratto di malto vecchia da 5 a 7 giorni di *Tolypocladium varium* nov. sp. CY/93 (NCAIM(P)F 001005), e viene usata per inoculare 500 ml di mezzo di inoculo IC descritto nell'esempio 1 e sterilizzato in un pallone Erlenmeyer da 3 litri. Il pallone viene incubato su un agitatore rotativo (340 giri al minuto) a 25°C per due giorni, quindi 5 l di un mezzo (FC₁) sterilizzato in fermentatore da laboratorio da 10 l a 121°C per 45 minuti vengono inoculati con esso. Dopo l'inoculazione il brodo di fermentazione viene agitato con 750 giri al minuto a 25°C e aerato con 300 l/ora. Dopo la coltivazione per 96 ore si aggiunge una soluzione acquosa sterilizzata di 100 g di maltosio e la fermentazione viene continuata fino alla centoquarantaquattresima ora quando il brodo contiene 950 mcg/ml del complesso di ciclosporina in conformità del saggio microbico. Nel complesso si raccolgono 4,8 litri del brodo. L'isolamento effettuato in conformità del metodo descritto nell'esempio 2 produce 2,75 g di ciclosporina A.

RIVENDICAZIONI

1. Processo microbico per la produzione di complesso di ciclosporina o dei suoi componenti, ciclosporina A, ciclosporina B e ciclosporina C mediante la fermentazione areobica di un ceppo di fungo filamentoso che biosintetizza gli antibiotici suddetti in un mezzo nutriente contenente sorgenti utilizzabili di carbonio e di azoto nonché sali minerali ed isolando il prodotto formato, che comprende le operazioni di coltivare un ceppo della nuova specie di fungo

L'isolamento viene effettuato mediante il metodo descritto nell'esempio 1.
Così si ottengono 305 mg di ciclosporina 1 da un litro di brodo.

ESEMPIO 5

Si prepara una sospensione di conidio e micelio con 5 ml di una soluzione di cloruro di sodio allo 0,9% dalla cultura inclinata di agar di estratto di lievito ed estratto di malto vecchia da 5 a 7 giorni di *Tolypocladium varium* nov. sp. CY/93 (NCAIM(P)F 001005), e viene usata per inoculare 500 ml di mezzo di inoculo IC descritto nell'esempio 1 e sterilizzato in un pallone Erlenmeyer da 3 litri. Il pallone viene incubato su un agitatore rotativo (340 giri al minuto) a 25°C per due giorni, quindi 5 l di un mezzo (FC_1) sterilizzato in fermentatore da laboratorio da 10 l a 121°C per 45 minuti vengono inoculati con esso. Dopo l'inoculazione il brodo di fermentazione viene agitato con 750 giri al minuto a 25°C e aerato con 300 l/ora. Dopo la coltivazione per 96 ore si aggiunge una soluzione acquosa sterilizzata di 100 g di maltosio e la fermentazione viene continuata fino alla centoquarantaquattresima ora quando il brodo contiene 950 mcg/ml del complesso di ciclosporina in conformità del saggio microbico. Nel complesso si raccolgono 4,8 litri del brodo. L'isolamento effettuato in conformità del metodo descritto nell'esempio 2 produce 2,75 g di ciclosporina A.

RIVENDICAZIONI

1. Processo microbico per la produzione di complesso di ciclosporina o dei suoi componenti, ciclosporina A, ciclosporina B e ciclosporina C mediante la fermentazione areobica di un ceppo di fungo filamentoso che biosintetizza gli antibiotici suddetti in un mezzo nutriente contenente sorgenti utilizzabili di carbonio e di azoto nonché sali minerali ed isolando il prodotto formato, che comprende le operazioni di coltivare un ceppo della nuova specie di fungo

Tolypocladium varium produttore il complesso antibiotico di ciclosporina su un mezzo nutriente contenente sorgenti di carbonio, sorgenti di azoto organiche ed inorganiche, nonchè sali minerali in condizioni aerobiche ad una temperatura di 25-30°C e se lo si desidera isolare e purificare il complesso antibiotico di ciclosporina ed i suoi componenti prodotti.

2. Procedimento come rivendicato nella rivendicazione 1 in cui si usa come ceppo di fungo Tolypocladium varium sp. nov. CY/93 depositato alla Collezione Nazionale dei Microorganismi Agricoli ed Industriali a Budapest Ungheria sotto il numero di accesso NCAIM(P)F 001005.

3. Procedimento come rivendicato nella rivendicazione 1 in cui la fermentazione viene effettuata in un mezzo di cultura contenente peptone, solfato di ammonio e triptone come sorgente di azoto, e glucosio, maltosio e sorbitolo come sorgente di carbonio.

4. Specie di fungo Tolypocladium varium.

5. Tolypocladium varium sp. nov. CY/93 depositato alla collezione nazionale dei microorganismi agricoli ed Industriali di Budapest Ungheria sotto il numero di accesso NCAIM(P)F 001005.

pp. BIOGAL Gyogyszergyar

Il mandatario:

RICCARDI Sergio
Consulente in Proprietà Industriale

