

(19) BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

# PATENTCHRIFT



(12) Ausschließungspatent

(11) **DD 298 276 A5**

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1  
Patentgesetz der DDR  
vom 27. 10. 1983  
in Übereinstimmung mit den entsprechenden  
Festlegungen im Einigungsvertrag

5(51) C 12 P 21/04  
C 12 R 1:645

DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

|      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |      |            |      |            |
|------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|------------|------|------------|
| (21) | DD C 12 P / 320 809 6                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | (22) | 11. 10. 88 | (44) | 13. 02. 92 |
| (71) | siehe (73)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |      |            |      |            |
| (72) | Bormann, Ernst-Joachim, Dr. sc. nat.; Ihn, Wolfgang, Dr. rer. nat.; Schlegel, Brigitte, Dr. rer. nat.; Freysoldt, Christiane, Dipl.-Biol.; May, Rudolf, Dr. rer. nat.; Dornberger, Klausjürgen, Dr. rer. nat.; Fleck, Werner, Dr. rer. nat. habil.; Wetzstein Horst, Dr. rer. nat.; Strumpf, Eberhard, Dr. rer. nat.; Große, Hans-Helmut, Dr. rer. nat.; Menzel, Klaus-Dieter; Bell, Hubertus, Dr. oec.; Gräfe, Udo, Prof. Dr. sc. nat.; Hübener, Renate, Dipl.-Biol., DE |      |            |      |            |
| (73) | Institut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie, Beutenbergstraße 11, O - 6900 Jena; Arzneimittelwerk Dresden GmbH, O - 8122 Radebeul, DE                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |      |            |      |            |

(54) **Verfahren zur Herstellung von Cyclosporin A**

(55) Cyclosporin A; Immunsuppressivum; Stamm *Tolypocladium inflatum* SF 136; Fermentation; Isolierung; Reinigung; Biomasse; Kulturfiltrat

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Cyclosporin A, einem mikrobiellen Wirkstoff, der als Immunsuppressivum breiten Eingang in die Therapie von Organtransplantationen gefunden hat. Die Erfindung verfolgt das Ziel, das Produkt auf mikrobiellem Wege mit erhöhten Ausbeuten herzustellen. Die dieser Zielstellung zugeordnete Aufgabe wird in der Weise gelöst, daß der neue Mikroorganismus *Tolypocladium inflatum* SF 136 aerob auf einem Medium fermentiert wird, welches organische Stickstoff-Substrate sowie Glukose oder Maltose und Salze enthält, und das gebildete Cyclosporin A aus Biomasse und Kulturfiltrat durch Extraktion mit organischen Lösungsmitteln isoliert sowie nachfolgend durch Chromatographie und Umkristallisation gereinigt wird.

ISSN 0433-6461

4 Seiten

## Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung von Cyclosporin A durch sterile aerobe Fermentation eines Mikroorganismus über eine Dauer von 10 Tagen bis 15 Tagen auf einem Medium mit organischem Stickstoff-Substrat, Kohlehydraten und Mineralsalzen bei pH-Werten im Bereich von pH 3,2 bis pH 7,5 und bei Temperaturen von 20°C bis 30°C sowie durch Gewinnung des Produkts aus Biomasse und Kulturfiltrat, **gekennzeichnet dadurch, daß man**
  - für die über die Stufen der Vor- und Hauptkultur geführte Fermentation den Stamm *Tolypocladium Inflatum* SF 136 einsetzt sowie
  - im Aufarbeitungsteil des Verfahrens an eine Extraktion mit organischen Lösungsmitteln eine Reinigung durch Chromatographie und gegebenenfalls durch Umkristallisation anschließt.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch, daß man in der Vorkultivierungsstufe dunkelbraun pigmentierte Einzelkolonien von Stamm *T. Inflatum* SF 136, erhalten nach emerger Kultivierung auf Mineralsalzagar mit Ammoniumsalz als einziger Stickstoff- sowie Glukose als einziger Kohlenstoffquelle, einsetzt.**
3. Verfahren gemäß Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch, daß man in der Vorkultivierungsstufe dunkelbraun pigmentierte Einzelkolonien von Stamm *T. Inflatum* SF 136, erhalten nach emerger Kultivierung auf Mineralsalzagar mit Ammoniumsalz als einziger Stickstoff- sowie Maltose als einziger Kohlenstoffquelle, einsetzt.**
4. Verfahren gemäß Anspruch 1 bis 3, **gekennzeichnet dadurch, daß man zur Extraktion des Cyclosporin A aus der Biomasse Aceton, Essigester und/oder Butylacetat verwendet.**
5. Verfahren gemäß Anspruch 1 bis 4, **gekennzeichnet dadurch, daß man zur chromatographischen Reinigung des Cyclosporin A Aluminiumoxid als Adsorbens und Chloroform als Eluent verwendet.**

## Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Cyclosporin A auf fermentativem Wege. Dieser mikrobiell gebildete Wirkstoff hat als Immunsuppressivum breiten Eingang in die Therapie von Organtransplantationen gefunden. Das Anwendungsgebiet der Erfindung liegt somit in der mikrobiologisch-pharmazeutischen Forschung und Industrie.

## Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Mikrobielle Verfahren zur Gewinnung von Cyclosporin A auf fermentativem Wege, nämlich durch die Kultivierung ausgewählter pilzlicher Mikroorganismen, sind seit 1975 bekannt (vgl. die Patentschriften CH 589 716, CH 603 790, DD 115 695, DE 2 455 859 und AT 350 716).

Als wichtigste Mikroorganismen werden Stämme aus den Arten *Tolypocladium Inflatum* sowie *Cylindrocarpum lucidum* eingesetzt, die emers oder submers auf flüssigen komplexen Medien bei pH-Werten im Bereich von pH 3,2 bis pH 7,5 und bei Temperaturen von 20°C bis 30°C kultiviert werden, wobei das gebildete Produkt aus der gewonnenen Biomasse wie auch aus dem Kulturfiltrat durch Extraktion mit Methanol gewonnen wird. Ausgedehnte screening-Untersuchungen führten zur Auffindung zahlreicher weiterer pilzlicher Spezies mit Cyclosporin-Bildungsvermögen, die jedoch biotechnologisch bislang nicht genutzt werden, so unter anderen *Tolypocladium geodes*, *Fusarium solani*, *Trichoderma viride*, *Neocosmospora vesifecta*, *Isaria fellina*, *Verticillium spec.*, *Paecllomyces spec.*, *Acremonium spec.* (s. a. Anlage 1).

Die beschriebenen Kultivierungsbedingungen erlauben gemäß der Fachliteratur nach 10- bis 15tägiger Fermentation Leistungen von 250 µg Cyclosporin A/ml, durch gezielte Mediumsveränderungen auch Werte bis zu 600 µg/ml (Symp. on Overproduction of Microbial Products, Budejovice, Juli 1988).

Entwicklungen in Richtung Festbett-Fermentation tragen bislang nur Prinziplösungscharakter ohne biotechnologische Relevanz. Charakteristisch für das verwendete biologische Material ist die Bildung von 4 cm bis 4,5 cm großen, weißen, ungefalteten Kolonien in der Oberflächenkultur. Diese morphologische Eigenart muß in Verbindung mit dem relativ geringen biosynthetischen Leistungsvermögen als Nachteil für eine ökonomisch effektive Herstellung von Cyclosporin A angesehen werden, da die geringe morphologische Differenzierung eine umfangreiche Wertbestimmung in der Selektion erforderlich macht und die Wachstumsintensität des stammspezifischen Mycels besondere Prozeßanforderungen wegen der Rheologie der Fermentationslösung stellt.

## Ziel der Erfindung

Die Erfindung verfolgt das Ziel, Cyclosporin A auf mikrobiellem Wege in erhöhten Ausbeuten herzustellen.

### Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, gestützt auf den Einsatz eines neuen pilzlichen Mikroorganismus ein technologisch effektives mikrobielles Verfahren zu beschreiben, mit dessen Hilfe Cyclosporin A in guten Ausbeuten hergestellt werden kann. Erfindungsgemäß wird die Aufgabe wie folgt gelöst: Unter aeroben und sterilen Fermentationsbedingungen wird der Mikroorganismus *Tolypocladium inflatum* SF 136 in einem flüssigen Submersmedium, welches eine organische Stickstoffquelle, Glukose oder Maltose sowie Mineralsalze enthält, bei Temperaturen von 20°C bis 30°C sowie einer Acidität von pH 3,2 bis pH 7,5 für die Dauer von 10 Tagen bis 15 Tagen kultiviert.

Der Stamm SF 136 ist in der Hinterlegungsstelle für Mikroorganismen der DDR, Zentralinstitut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie der AdW, DDR - 6900 Jena, Beutenbergstr. 11, unter der Registriernummer IMET 43868 hinterlegt worden.

Die Fermentation erfolgt in den Stufen der Vorzucht und der Hauptkultivierung.

Sporensandkonserven des genannten Stammes werden auf einem Agar-Nährmedium, welches Glukose als Kohlenstoffquelle und  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  als Stickstoffquelle enthält, ausgeplattet und für die Dauer von 10 Tagen bis 12 Tagen bei 24°C bis 25°C bebrütet. Von den entstandenen Einzelkolonien werden die 0,5 cm bis 1,0 cm im Durchmesser großen, an der Unterseite dunkelbraun pigmentierten Exemplare entnommen und nach Übertragung auf Mineralsalz-Glukose-Agar zur Ausbildung von mindestens 4 cm großen Einzelarealen in die erste Vorzuchtphase übertragen. Diese besteht aus 100-ml-Steilbrustflaschen oder 500-ml-Erlenmeyerkolben, die 20% ihres Volumens als Anzuchtmedium enthalten. Das Inoculummedium enthält Glukose oder Maltose als Kohlenstoffquelle, organische Stickstoffsubstrate sowie Mineralsalze und wird nach der Beimpfung für die Dauer von 48 Stunden bis 72 Stunden bei 24°C bis 25°C auf einem Rundschwinger mit 180 rpm bis 240 rpm geschüttelt. Nach Ausreifen des Inoculums erfolgt gegebenenfalls die Beimpfung der zweiten Anzuchtphase in einer Menge von 10% des Mediumvolumens. Diese Vorzuchtstufe besteht aus 500-ml-Erlenmeyerkolben, die wiederum 20% ihres Volumens als Medium enthalten. Nach 48stündiger Kultivierung unter den o. a. Bedingungen wird das Hauptkulturmedium mit 5% bis 10% der Anzuchtkultur beimpft und für die Dauer von 10 Tagen bis 15 Tagen unter Rundschütteln oder Rühren und Belüften kultiviert. Während des Fermentationsprozesses erfolgt zunächst die Bildung der Biomasse, der die Synthese des Cyclosporins A folgt. Aus dem ausgetragenen Fermentationsansatz wird das Produkt – wie nachstehend noch detaillierter dargestellt – durch Extraktion mit organischen Lösungsmitteln und nachfolgender adsorptiver Anreicherung und Reinigung gewonnen. Unter den angeführten Bedingungen erreichen die Fermentationsansätze in der genannten Zeit Leistungen von 800 bis 1200 µg/ml Cyclosporin A, welches analytisch durch Einsatz der HPLC erfaßt wird. Die Fermentationslösung weist zum Erntezeitpunkt eine rötlich-braune bis schwarz-braune Färbung bei pH-Werten von über 5,0 auf.

Die Isolierung des Cyclosporin A wird in der Weise durchgeführt, daß das Peptid aus dem Kulturfiltrat mit organischen, mit Wasser nicht oder nur wenig mischbaren Lösungsmitteln und aus der Biomasse mit Wasser mischbaren oder wenig mischbaren Lösungsmitteln extrahiert, nach Konzentrieren der vereinigten Extrakte mit einem mit Wasser nicht mischbaren Lösungsmittel reextrahiert, über wasserfreiem  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und im Vakuumrotationsverdampfer zur Trockne gebracht wird. Bevorzugt kommen in dieser Extraktionsstufe die Lösungsmittel Aceton, Essigester und/oder Butylacetat zur Anwendung. Anschließend wird das Rohprodukt in einem organischen unpolaren Lösungsmittel wieder aufgenommen und säulenchromatographisch unter Verwendung von Aluminiumoxid als Adsorbens und Chloroform als Eluent gereinigt.

Aus dem kristallinen Reinprodukt, das nach Abdestillieren des Lösungsmittels der vereinigten Cyclosporin A-Fractionen der Säulenchromatographie resultiert, wird das Cyclosporin A durch Umfällen bzw. Umkristallisieren als kristalline Reinsubstanz erhalten.

#### Eigenschaften des Cyclosporin A:

Farblose, mikrokristalline Substanz aus Ether/Hexan,  $[\alpha]_D^{20} = -244 \pm 4^\circ$  ( $\text{CHCl}_3$ )

Elementaranalyse: C 61,9; H 9,5; N 12,6;

Summenformel:  $\text{C}_{22}\text{H}_{31}\text{N}_7$ .

Die Identität des Produktes wurde des weiteren durch vergleichende spektroskopische (IR, MS,  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ -NMR) Messungen sowie durch vergleichende chromatographische (DC, HPLC) Untersuchungen mit authentischem Cyclosporin A bzw. durch Vergleich mit den entsprechenden Daten in der Literatur (E. Rüegger et al. 1976, Helv. Chim. Acta 59, S. 1075) gesichert.

Die Vorteile des hier beschriebenen Herstellungsverfahrens für Cyclosporin A werden zusammenfassend gesehen

- in der Bereitstellung eines neuen Mikroorganismus, der neben dem Cyclosporin A keine weiteren, von diesem Wirkstoff schwer abtrennbaren Substanzen ins Fermentationsmedium abgibt bzw. in der Biomasse anreichert;
- in den erzielbaren hohen mikrobiellen Ausbeuten;
- in der einfachen Isolierung des Cyclosporin A in nahezu quantitativen Ausbeuten sowie
- in der einfach durchzuführenden Reinigung, die bei nur geringen Ausbeuteverlusten an Wirkstoff leicht zugängliche und billige Einsatzstoffe erfordert.

### Ausführungsbeispiele

#### Beispiel 1

Sporensandkonserven des Stammes *Tolypocladium inflatum* SF 136 werden auf Glukose-Mineralsalzagar aufgebracht, der folgende Zusammensetzung aufweist (g/l):

Glukose 40,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  3,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1, KCl 0,25,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,25,  $\text{CaCO}_3$  3,5, Agar 20; pH 5,3 bis 5,6 (Sterilisation 30 min 120°C). Nach Bebrütung der Petrischalen bei 24°C bis 25°C für die Dauer von 10 Tagen bis 12 Tagen werden von den entstandenen Einzelkolonien 0,5 cm bis 1,0 cm große Exemplare ausgehoben, sofern sie eine bis zu 5 cm große Aufhellungszone im Agar aufweisen und auf Petrischalen mit gleichartigem Agar übertragen. Auf diesen entstehen innerhalb von 10 Tagen bis 15 Tagen Einzelareale von mindestens 4 cm Durchmesser, von denen die Randgebiete als Impfmateriale für die Anzucht dienen. Durch Übertragung eines ca. 1,0 cm<sup>2</sup> großen Rasenstückes werden die Anzuchtkolben beimpft, die in 100-ml-Steilbrustflaschen 20 ml des folgenden Mediums enthalten (g/l):

Glukose 50, Kaseinpepton 10,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1, KCl 2,5 ad 1 l Aqua dest.; pH 5,3 bis 5,6 (Sterilisation 30 min 120°C).

Nach 72stündiger Kultivierung bei 24°C bis 25°C auf einem Rundschtwingtisch (180 rpm bis 220 rpm) dient die Anzuchtpassage der Beimpfung der Hauptkultur. Diese enthält in 500-ml-Erlenmeyerkolben jeweils 100 ml des nachfolgenden Mediums (g/l): Maltose 75, Kaseinpepton 25,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1, KCl 2,5 ad 1 l Aqua dest. sowie 1,2-Propandiol 0,5% v/v; pH 5,3 bis 5,6 (Sterilisation 30 min 120°C). Die Vorkultur wird in einer Menge von 5% auf die Hauptkultur übertragen. Die Kultivierung erfolgt 15 Tage lang bei 24°C bis 25°C auf einem Rundschtwinger (180 rpm–220 rpm). Nach Beendigung der Fermentation wird die entstandene Biomasse durch Zentrifugation von der Kulturlösung abgetrennt und im Verhältnis 0,5:1 (v/v) mit Aceton versetzt. Nach gründlichem Aufrühren wird mindestens 24 Stunden lang die Biomasse im Aceton belassen und dann zur Wertbestimmung verwendet. Diese erfolgt in an sich bekannter Weise nach Überführung des Produktes in Chloroform, Entwässerung, Trocknung und Wiederaufnahme in Acetonitril zwecks Beschickung der HPLC-Säulen. Die Leistung derartiger Fermentationsansätze beträgt 800 µg/ml bis 1200 µg/ml Cyclosporin A.

#### Beispiel 2

Nach Selektion des Leistungsmaterials gemäß Beispiel 1 und analoger Anzucht werden Hauptkulturen in 500-ml-Erlenmeyerkolben beimpft, die jeweils 100 ml des nachfolgenden Mediums enthalten (g/l):

Maltose 80, Kaseinpepton 20,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  5,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1, KCl 0,5,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,5 ad 1 l Aqua dest.; pH 5,3 bis 5,6 (Sterilisation 30 min 120°C).

Die Kulturbrühe weist nach 11tägiger Kultivierung und analytischer Bestimmung gemäß Beispiel 1 einen Gehalt von 1150 µg/ml Cyclosporin A auf.

2 Liter der auf diese Weise gewonnenen Kulturbrühe werden separiert; hierbei werden 120 g Biomasse und 1,8 l Kulturfiltrat erhalten. Die Biomasse wird 2mal mit je 0,3 l Aceton 12 Stunden unter Rühren extrahiert, die Extrakte werden vereinigt und das Lösungsmittel im Vakuum bei 30°C bis zur wässrigen Phase abdestilliert. Das Kulturfiltrat wird 2mal mit je 200 ml  $\text{CHCl}_3$  extrahiert, die vereinigten Chloroformextrakte werden im Vakuumrotationsverdampfer bei 30°C eingedampft, mit dem Extrakt der Biomasse vereinigt und nach Zusatz von 0,5 l Wasser 2mal mit je 200 ml Chloroform reextrahiert. Die vereinigten Reextrakte werden über wasserfreiem  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet, das Lösungsmittel im Vakuumrotationsverdampfer bei 30°C abdestilliert, der dunkelgefärbte ölige Rückstand in wenig Chloroform aufgenommen und an Aluminiumoxid (neutral AK St. I) mit Chloroform chromatographiert. Fraktionen, die DC-einheitliches Cyclosporin A enthalten, werden vereinigt, im Vakuumrotationsverdampfer bei 30°C eingedampft, der schwach gelb gefärbte ölige Rückstand in wenig Chloroform aufgenommen und ein zweites Mal an Aluminiumoxid mit Chloroform chromatographiert. Die Fraktionen, die DC-einheitliches Cyclosporin A enthalten, werden vereinigt, im Vakuumrotationsverdampfer bei 30°C eingedampft, und der nahezu farblose ölige Rückstand wird mit 40 ml Hexan verrührt, wobei sich das Cyclosporin A in kristalliner Form abscheidet. Man läßt die Cyclosporin A-Hexansuspension 12 Stunden bei -5°C, saugt anschließend das Cyclosporin A ab, wäscht das Produkt mit kaltem Hexan und trocknet 5 Stunden bei 50°C im Hochvakuum.

Ausbeute: 2,20 g Cyclosporin A (94%iges Produkt)  $\Delta$  2,09 g Cyclosporin A (100%iges Produkt)  $\Delta$  87% Ausbeute, bezogen auf den analytisch bestimmten Gehalt von 1,2 g Cyclosporin A/l KB in der Kulturbrühe.

Zur Feinstrreinigung (100%iges Produkt) wird das Cyclosporin A aus Ether/Hexan umgefällt oder aus Aceton umkristallisiert und im Hochvakuum bei 50°C getrocknet.

#### Beispiel 3

2 Liter der nach Beispiel 2 gewonnenen Kulturbrühe (mit 1,2 g Cyclosporin A/l) werden auf 20°C abgekühlt und separiert. Man erhält 250 g feuchte Biomasse, die dreimal mit Essigester ( $2 \times 11$  und  $1 \times 20$  ml) jeweils 1 Stunde ausgerührt wird. Die abdekantierten Extrakte werden vereinigt, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Das so erhaltene braungefärbte ölige Rohprodukt (8,9 g) enthält 2,11 g Cyclosporin A (88% Ausbeute). Die Ausbeuten der einzelnen Extraktionsstufen betragen bei der 1. Extraktion 75% (1,8 g CyA), bei der 2. Extraktion 12% (0,3 g CyA) und bei der 3. Extraktion 0,5% (0,01 g CyA).

Zur weiteren chromatographischen Reinigung des Cyclosporins A werden 60 g Kieselgel (Korngröße 0,062 mm bis 0,2 mm) in Chloroform eingeschlammmt und in eine Säule (2,5 cm  $\times$  50 cm) eingefüllt. 1,5 g des erhaltenen Rohproduktes werden in 15 ml Chloroform/Methanol (99:1, v/v) gelöst und auf die Säule aufgetragen. Die Elution wird mit dem gleichen Lösungsmittelsystem durchgeführt. Die einzelnen Fraktionen zu jeweils 10 ml werden dünnschichtchromatographisch überprüft. Die Cyclosporin A-enthaltenden Fraktionen werden vereinigt und das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert.

Ausbeute: 422 mg (80% CyA = 338 mg CyA)  $\Delta$  95% Ausbeute.

Zur Feinstrreinigung erfolgt eine nochmalige Chromatographie an Kieselgel mit dem Elutionssystem Essigester/Isopropanol (95:5, v/v). Fraktionen, die DC-einheitliches Cyclosporin A enthalten, werden vereinigt und im Vakuum zur Trockne eingeeengt. Der verbleibende farblose Rückstand wird mit n-Hexan verrührt und über Nacht im Kühlschrank belassen. Das Cyclosporin A wird dann abgesaugt, mit kaltem Hexan gewaschen und über Calciumchlorid getrocknet; man erhält 95%iges Cyclosporin A.

#### Anlage 1

Species von cyclosporinbildenden Pilzen:

*Acremonium* sp. S 42160/F

*Paecilomyces* sp. S 84-21622/F

*Verticillium* sp. 85-22022/F

*Isaria felina* (DC per FR)

Fr., S 249/F

*Neocosmospora vasinfecta* E. F. Smith

*Tolypocladium geodes* GAMS CBS 723.70

*Trichoderma viride*

*Fusarium solani*

DREYFUSS, M. M. 1986,  
Sydowia 39, 12–36

GAUZE, G. F., et al. 1983,  
Antibiotiki 28, 243–245  
SAWAI et al. 1981,  
Agric. Biol. Chem. 45, 5,  
1223–1228  
JP-138523