



NORGE

(12) **UTLEGNINGSSKRIFT**

(19) **NO**

(11) **175873**

(13) **B**

(51) **Int Cl⁵ C 12 P 17/10, C 07 D 259/00**

Styret for det industrielle rettsvern

(21) Søknadsnr	895160	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	
(22) Inng. dag	20.12.89	(85) Videreføringsdag	
(24) Løpedag	20.12.89	(30) Prioritet	20.12.88, HU, 6497/88
(41) Alm. tilgj.	21.06.90		
(44) Utlegningsdato	12.09.94		

(71) Patentsøker Biogal Gyógyszergyár, Pallagi út 13, H-4042 Debrecen, HU
(72) Oppfinner Antonia Jekkel Nee Bokany, Budapest, HU
Gabor Ambrus, Budapest, HU
Eva Toth. Sarudy, Budapest, HU
Istvan Mihaly Szabo, Budapest, HU
Agota Huelber Nee Dobos, Budapest, HU
Attila Andor, Budapest, HU
Karoly Albrecht, Budapest, HU
Kalman Koenczoel, Budapest, HU
Valeria Szell, Budapest, HU
Eva Tomori Nee Joszt, Budapest, HU
Imre Moravcsik, Budapest, HU
Kalman Polya, Debrecen, HU
Janos Erdei, Debrecen, HU
Lajos Kiss, Debrecen, HU
Karoly Nagy, Debrecen, HU
Bela Palotas, Debrecen, HU
Etelka Deli Nee Konszky, Debrecen, HU
Karoly Buzasi, Debrecen, HU
Aniko Molnar Nee Antal, Debrecen, HU
Gyorgy Santha, Debrecen, HU
Vilma Szaszhegyesi, Debrecen, HU
Bela Makadi, Debrecen, HU
(74) Fullmektig Tandbergs Patentkontor AS, Oslo

(54) **Benevnelse** Mikrobiell fremgangsmåte for fremstilling av immunhemmende antibiotika

(56) **Anførte publikasjoner** Ingen

(57) **Sammendrag**

Foreliggende oppfinnelse angår en mikrobiell fremgangsmåte for fremstilling av immunhemmende cyclosporin-antibiotikakompleks eller dets bestanddeler, cyclosporin A, cyclosporin B og cyclosporin C, ved aerob fermentering av en filamentformig soppstamme som biosyntetiserer de ovenfor angitte antibiotika i et næringsmedium inneholdende anvendelige karbonkilder og nitrogenkilder såvel som mineralsalter, og ved isolering av de dannede produkter, som omfatter dyrkning av en stamme av den nye soppart Tolypocladium varium som danner

cyclosporin-antibiotikakomplekset, fortrinnsvis Tolypocladium varium sp. nov. CY/93, deponert ved the National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms, Budapest, Ungarn under nummer NCAIM(P)F 001005, på et næringsmedium inneholdende karbonkilder, organiske og uorganiske nitrogenkilder såvel som mineralsalter, under aerobe betingelser ved 25 til 30 °C, og hvis ønskelig, isolering og rensing av det dannede cyclosporin-antibiotikakompleks eller dets bestanddeler.

Foreliggende oppfinnelse angår en mikrobiell fremgangsmåte for fremstilling av cyclosporinkompleks eller dets bestanddeler, cyclosporin A, cyclosporin B og cyclosporin C ved hjelp av aerob fermentering.

Cyclosporinene er cycliske, nøytrale, apolare oligopeptider med 11 aminosyrer, hvori noen av aminosyredelene er forskjellige. Cyclosporin A og cyclosporin B ble først isolert av A. Rüegger et al. (Helv. Chim. Acta 59, 1075/1976/), mens cyclosporinene B, D, E og G ble isolert av R. Traber et al. (Helv. Chim. Acta 60, 1568/1977/) fra kulturen av en sopp (NRRL 8044), tidligere identifisert som *Trichoderma polysporum* (Ling ex Pers.) Rifai. Senere ble taksonomien for den nevnte stamme revidert og den deretter beskrevet som *Tolypocladium inflatum* Gams i litteraturen.

I dag er det kjent 25 forskjellige cyclosporinanti-biotika, betegnet som cyclosporin A til Z, (Helv. Chim. Acta 70, 13/1987/). Blant disse bestanddeler er cyclosporin A det mest verdifulle stoff som har en selektiv immunhemmende effekt.

Cyclosporin A ble først kjent som et svakt anti-fungalt antibiotikum, dets vesentlige immunhemmende effekt ble først erkjent senere (J. F. Borel et al.: Immunology 32, 1017/1977/).

Det ble bekreftet i serier av analysebestemmelser in vitro og in vivo at cyclosporiner A, C og G er meget spesifikke immunhemmende midler.

Cyclosporin A inhiberte både humoral og celleformidlet immunrespons. Studier av dets virkningsmåte viste at det inhiberte T-celle-formering såvel som interleukin-2-syntese.

Den terapeutiske anvendelse av cyclosporin A ved humane organtransplantasjoner ble rapportert i 1978. Det ble først anvendt ved nyretransplantasjoner (R. J. Calne et al.: Lancet 1978/2, 1323) og benmargstransplantasjoner (R. L. Powles et al.: Lancet 1978/2, 1327).

Under organtransplantasjoner (nyre, bukspyttkjertel, lever, hjerte, lunge) og benmargstransplantasjoner kan avvisningen av organer eller benmarg hemmes ved hjelp av anvendelse av cyclosporin A.

Videre ble cyclosporin A anvendt med vellykket resul-

tat ved behandlingen av noen autoimmune sykdommer (uveitt, reumatoid artritt, psoriasis og myasthenia gravis).

I patentlitteraturen ble de følgende mikroorganismer anvendt for fremstillingen av cyclosporinkomplekset:

Cylindrocarpon lucidum Booth, NRRL 5760 (sveitsisk patentsøknad nr. 589 716); Tolypocladium inflatum Gams, NRRL 8044 (ifølge tidligere taxonomi: Trichoderma polysporum (Link ex. Pers.) Rifai (sveitsisk patentsøknad nr. 603 790)) Ifølge Bisett (1983): Tol. Inflatum W. Gams 1971 er synonym med Tol. Niveum (Rostrup) Bisett Comb. Mov., og Fusarium solani, MCI-1549, MCI-1550 (publisert japansk patentsøknad nr. 82 63093). I løpet av fermenteringsprosessene som utføres med de ovennevnte mikroorganismer ble det oppnådd lave produksjonsnivåer for cyclosporinene etter lange fermenteringsperioder og isoleringsutbyttene var også lave.

Undersøkelsene ifølge foreliggende oppfinnelse ble rettet på å finne mikroorganismestammer som ville produsere cyclosporin-antibiotikakomplekset eller dets bestanddeler i høyere konsentrasjoner og under mer fordelaktige betingelser enn de tidligere stammer. Ved screening av et stort antall stammer av filamentformig sopp isolert fra jordbunnen, ble det funnet en mikroorganismestamme av slekten Tolypocladium som var i stand til å biosyntetisere cyclosporin-antibiotikakomplekset. Denne mikroorganisme som er gitt betegnelsen CY/93 kunne ikke ved taksonomiske studier identifiseres med noen andre cyclosporinkompleks-dannende sopparter. Tolypocladium varium art nova CY/93 er en ny taksonomisk gruppe av Tolypocladium-slekten som kan differensieres på artsnivå.

Basert på resultatene av de ovenfor beskrevne undersøkelser angår foreliggende oppfinnelse en mikrobiell fremgangsmåte som gir en næringsløsning som inneholder høye konsentrasjoner av cyclosporin, ved anvendelse av en ny mikroorganisme, Tolypocladium varium art nova CY/93, deponert ved the National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms, Budapest, Ungarn under nummeret NCAIM(P)F 001005. Fermenteringsløsningen inneholder foruten cyclosporin A, som er hovedproduktet, også små mengder cyclosporin B og cyclosporin C.

De taksonomiske trekk ved den nye soppart ble sammenlignet med de viktigste diagnostiske egenskaper for arten *Tolypocladium* som følger:

Slekten *Tolypocladium* ble først beskrevet av Gams i 1971 som en ny slekt av jordbunns-moniliaer. Dens karakteristiske egenskaper er: Langsom vekst, putelignende hvite kolonier, terminale og laterale fialider delvis utviklet på en kort sidegren, med sterkt oppsvulmet base og filamentformig, ofte bøydd hals, som ender i et encellet konidium. Innen denne slekt ble de følgende 3 nye arter differensiert av Gams: *T. geodes*, *T. cylindrosporum* og *T. inflatum*. *T. geodes* har en uttalt actinomycetes-type jordlukt mens den nye *T. varium* art nov. CY/93 er fullstendig fri for denne lukt. Videre er bærercellene hos *T. geodes* vesentlig smalere enn de tilsvarende hos *T. varium* art nov. CY/93. Konidiene hos *T. cylindrosporum* er karakteristisk lange og utstrakte mens de tilsvarende hos *T. varium* art nov. CY/93 er kuleformet og kun ubetydelig langstrakte. Konidiene hos *T. inflatum* er ovale og lengere enn de tilsvarende som er observert hos kulturen av *T. varium* art nov. CY/93. Fialidene hos *T. inflatum* er karakteristisk dannet i form av kranser enten direkte på hyfene eller på 2 til 3 μ m lange bærerceller. *T. varium* art nov. CY/93 viser ikke noe slikt kranslignende mønster, dette kan kun påvises sporadisk fra tid til annen. Først og fremst på grunn av det hvite, bomullslignende luftmycel, er alle kjente kolonier av *Tolypocladium*-arter hvite, mens baksiden av koloniene er gulgrå, farveløs eller gul. Det dannes ikke noen typiske oppløselige pigmenter. *T. varium* art nov. CY/93 kan også differensieres på denne måte: ved dyrkning på medier som inneholder glukose og pepton såvel som maltekstrakt-gjærekstrakt, dannes et mørkt, dypgrått, henholdsvis svart pigment med tidsmessig variabilitet.

Den taksonomiske evaluering av den nye art sammenlignet med de andre kjente *Tolypocladium*-arter ble utført på basis av de følgende publikasjoner: W. Gams: *Persoonia*, 6, 185-191 (1971); G. L. Barron: *Can. J. Bot.* 58, 439-442 (1980), og Bisett, J.: *Can. J. Bot.* 61, 1311-1329 (1983).

De diagnostiske mønstre av *Tolypocladium varium* art

nov. CY/93 er oppsummert i det følgende.

Ti dager gamle kolonier har en diameter på 10 til 25 mm, deres overflate er dekket av hvit, bomullslignende, rikt spordannende luftmycel. Baksiden av koloniene er gulgrå eller skittengrå. I noen sammensatte medier dannes et mørkt grått, oppløselig pigment. Både terminal og lateral spordannelse observeres på hyfene av luftmycelet. Fialider er lokalisert enten enkeltstående eller sporadisk, leilighetsvis i kranser, direkte på hyfene eller på korte (2 til 3 μm) bærer-celler. Fialidene er oppbygget fra en oppsvulmet base (2-4 x 2-3 μm) og en lang, filamentformig hals (2-4 x 0,5-0,6 μm). De øverste delers konidier er små (2-3 x 1,3-2,2 μm), vanligvis kuleformede og glatte. Den spesifikke tilleggsbetegnelse "varium" refererer til variabiliteten av fialidene. T. varium viser i dens livssyklus visse likhetstrekk med slekten Harposporium som vil bli referert til andre steder i beskrivelsen. Stammen betegnet CY/93 kan ikke anvende raffinose, men den vokser godt på de følgende karbonkilder: Mannitol, inositol, sukrose, fruktose, rhamnose, galaktose, dextrose, arabinose og xylose i overflatekultur. Kulturene utvikles dårlig på næringsmiddel- og maltekstrakt-agar, og utvikles godt på soyamel-agar, Czapek-agar og potet-dextrose-agar. Havremel-agar og dextrose-gjærekstrakt-agar er ikke egnet for lagring. T. varium adskiller seg markant fra T. Trigonosporum, som produserer kondidier som har et trigonalt utseende sett forfra med lett konkave kanter. T. varium adskiller seg også fra T. Balanoides. Den sistnevnte produserer lageniforme laterale fialider. Videre er holotype-stammen (CY/93) av Tolypocladium varium n. sp. forskjellig fra den autentiske type stamme av Tolypocladium inflatum (CBS 714.70) i betraktning av at den sistnevnte stamme utvikler et rikt hvit luftmycelium når den dyrkes på maltose-agar næringsmedium, mens Tolypocladium varium sp. nov. CY/93 ikke produserer slikt luftmycelium. Stammetypen Tolypocladium inflatum produserer rødlig brunt endopigment i dens substratmycelium på jern-pepton-agar dyrkningsmedium, mens substratmyceliet hos Tolypocladium varium sp. nov. CY/93 forblir lysgult. Stammen Tolypocladium varium sp. nov. CY/93 kan ikke utnytte

arabinose i motsetning til *Tolypocladium inflatum*. Ved anvendelse av natriumnitritt utvikler den sistnevnte stamme rikt mycelium, mens *Tolypocladium varium* sp. nov. CY/93 nesten ikke vokser.

5 Sammenligningen av *Tolypocladium varium* sp. nov. CY/93 med autentiske stammer av andre *Tolypocladium*-arter, med *Trichoderma polysporum* ATCC 16 641 og med *Cylindrocarpum lucium* NRRL 5760 er oppsummert i tabell I.

Basert på de ovenfor beskrevne undersøkelser angår
10 foreliggende oppfinnelse en mikrobiell fremgangsmåte for fremstilling av cyclosporinkompleks eller dets bestanddeler, cyclosporin A, cyclosporin B og cyclosporin C, ved aerob fermentering av en filamentformig soppstamme, kjennetegnet ved at stammen av den nye soppstammen *Tolypocladium varium* sp. nov.
15 CY/93, NCAIM (P)F001005, eller mutanter derav med vesentlig den samme morfologi og med evnen til å produsere mengder av cyclosporinkompleks eller dets bestanddeler i samme størrelsesorden som opphavsstammen, dyrkes på et næringsmedium inneholdende karbonkilder, organiske og uorganiske nitrogen-
20 kilder så vel som mineralsalter, under aerobe betingelser, ved 25-30 °C, ved pH i området 2,5-6 i 5-7 dager og hvis ønskelig, isolering og rensing av det dannede cyclosporin-antibiotikakompleks eller dets bestanddeler.

Ifølge en foretrukket utførelsesform av foreliggende
25 oppfinnelse dannes cyclosporin-antibiotikakomplekset ved hjelp av den nye stamme *Tolypocladium varium* sp. nov. CY/93. Den utvalgte stamme er meget fordelaktig på grunn av den hurtige vekst. Det er et gunstig trekk at stammen kan anvende sukrose, glukose, sorbose, maltose, fruktose, stivelse, glyserol såvel som forskjellige fettstoffer og oljer som karbon-
30 kilder, og et stort antall organiske og uorganiske nitrogenkilder, som maisstøpevæske, pepton, gjærekstrakt, kjøttekstrakt, natriumnitrat, ammoniumnitrat, ammoniumsulfat såvel som forskjellige aminosyrer. I tillegg til de ovennevnte

karbon- og nitrogenkilder kan næringsmediet som anvendes for produksjonen av cyclosporin-antibiotikakomplekset også inneholde mineralsalter (kaliumklorid, magnesiumsulfat eller kaliumdihydrogenfosfat), sporstoffer (kobber, mangan, jernsalter), og i tillegg vitaminer og antiskummidler.

Ifølge en foretrukket fremgangsmåte for foreliggende oppfinnelse inokuleres et flytende medium med en suspensjon av konidier og mycel, fremstilt fra agar-skråkulturen av *Tolypocladium varium* sp. nov. CY/93. Etter dyrkning i 3 dager anvendes den erholdte forkultur for å inokulere mediet som anvendes for antibiotikaproduksjonen, som deretter inkuberes ved 25 til 30 °C, fortrinnsvis ved 25 °C, i 5 til 7 dager. Under fermenteringen opprettholdes pH i området 6,0 til 2,5, fortrinnsvis ved 5,2. Fermenteringen utføres under aerobe betingelser, under kraftig omrøring (700 til 1000 rpm) og lufttilførsel på 300 liter/time.

Under fermenteringen kontrolleres cyclosporininnholdet av næringsløsningen ved hjelp av mikrobiell analysebestemmelse og høytrykks-væsekromatografi. Så snart som den maksimale mengde antibiotika er dannet, erholdes de fra dyrkningsvæsken på kjent måte ved hjelp av ekstraheringsfremgangsmåter og/eller adsorpsjonsfremgangsmåter.

Cyclosporinkonsentrasjonen i næringsløsningene måles på basis av den antifungale aktivitet av cyclosporiner ved hjelp av platediffusjonstest. *Aspergillus niger*, *Aspergillus japonicus* og *Curvularia lunata* kan fordelaktig anvendes som testorganismer (M. Dreyfuss et al.: European J. Appl. Microbiol. 3, 125-133/1976/). HPLC-analysen av cyclosporinkonsentrasjonen i næringsløsningen ble utført fra næringsløsningsprøver som var fortynnet 10 ganger med metanol ifølge F. Kreuzig (J. Chromat. 290, 181/1984). Ifølge de utførte eksperimenter dannes cyclosporin-antibiotikakomplekset, inneholdende cyclosporin A som hovedprodukt og cyclosporin B og cyclosporin C som mindre bestanddeler, med høyt utbytte (950 mcg/ml) ved hjelp av den nye stamme *Tolypocladium varium* sp. nov. CY/93.

Ekstraheringsmetoder kan fordelaktig anvendes for isoleringen av cyclosporinkomplekset fra fermenteringsløsningen.

Før ekstrahering adskilles mycelet enten ved hjelp av filtrering eller sentrifugering. Antibiotika som dannes under fermenteringen kan fordelaktig vaskes ut fra mikroorganismecellene med lavere alkanoler, fortrinnsvis med metanol, eller med organiske ketoner, fortrinnsvis med aceton, mens cyclosporinene i næringsløsningsfiltratet kan ekstraheres med organiske oppløsningsmidler som ikke er blandbare med vann, som ethylacetat, n-butylacetat, diklormethan, 1,2-diklorethan eller kloroform, fortrinnsvis med n-butylacetat. Det erholdte råprodukt ved ekstrahering er forurensset med røde og fiolette pigmenter, dannet av soppen, som kan fjernes ved adsorpsjon på aktiv karbon eller silicagel. Mulige lipidforurensninger (dvs. antiskummidler) kan adskilles ved fordeling i et system av petroleumeter og metanol inneholdende 10 % vann, hvor urenheterne overføres i petroleumeterfasen.

Den vandige methanolfase konsentreres ved redusert trykk, deretter ekstraheres den vandige rest med diklormethan som avdampes for å gi rensset cyclosporin. Cyclosporin A kan adskilles fra de mindre cyclosporinbestanddeler ved hjelp av kolonnekromatografi og rekrySTALLISERING.

Strukturen av de isolerte produkter ble undersøkt ved hjelp av UV, IR, ^1H -NMR, ^{13}C -NMR og massespektroskopi, og aminosyreanalysert.

De følgende eksempler er illustrerende, men ikke begrensende, for området for foreliggende oppfinnelse.

Eksempel 1

En suspensjon av konidier og mycel fremstilles med 5 ml av en 0,9 % natriumkloridoppløsning erholdt fra maltekstrakt-gjærekstrakt-skråagarkulturen av *Tolypocladium varium* nov. sp. CY/93. 1 ml av denne suspensjonen anvendes for å inokulere 100 ml sterilt IC-inokulatmedium i en 500 ml Erlenmeyerkolbe.

Sammensetning av IC-mediet:

Glukose	40 g
Kasein-pepton	5 g
5 Natriumnitrat	3 g
Kaliumdihydrogenfosfat	2 g
Kaliumklorid	0,5 g
Magnesiumsulfat x 7 H ₂ O	0,5 g
Jern(II)-sulfat x 7 H ₂ O	0,01 g

10 i 1000 ml kranvann.

pH av næringsmediet justeres til 5,2 før sterilisering og blandingen steriliseres ved 121 °C i 25 min. Kulturen inkuberes ved 25 °C på en rotasjonsrister (340 rpm), deretter anvendes 5 ml porsjoner av dette inokulatmedium for inokulering av fermenter 500 ml Erlenmeyerkolber hver, inneholdende 100 ml FC₁ sterilt medium.

Sammensetning av FC₁-mediet:

Glukose	80 g
Trypton	40 g
20 Urea	2 g
Ammoniumsulfat	12 g
Natriumnitrat	3 g
Kaliumdihydrogenfosfat	2 g
Kaliumklorid	0,5 g
25 Magnesiumsulfat x 7 H ₂ O	0,5 g
Jern(II)-sulfat x 7 H ₂ O	0,01 g

i 1000 ml kranvann.

pH av næringsmediet justeres til 5,2 før sterilisering og blandingen steriliseres ved 121 °C i 25 min.

30 Kolbene inkuberes på en rotasjonsrister (340 rpm) ved 25 °C. Under fermenteringen kontrolleres antibiotikakonsentrasjonen i næringsløsningen ved hjelp av platediffusjonstest. *Aspergillus niger* anvendes som testorganisme. Konsentrasjonen av cyclosporin-antibiotikakomplekset i næringsløsningen bestemmes ved anvendelse av cyclosporin A som standard.

35 Fermenteringen fortsettes i 168 timer, og etter denne tid inneholder næringsløsningen 400 µg/ml cyclosporin-antibiotikakompleks. Cyclosporinkomplekset isoleres i overensstemmelse med følgende fremgangsmåte.

Cellene fra 1 l av næringsløsningen filtreres og anti-biotika vaskes bort to ganger med 200 ml methanol. Den vandige methanoloppløsning konsentreres under redusert trykk, deretter ekstraheres antibiotikakomplekset fra det vandige konsentrat med 2 x 50 ml n-butylacetat. Cyclosporininnholdet i næringsløsningsfiltratet ekstraheres med 200 ml n-butylacetat. N-butylacetat-ekstraktene slås sammen, tørkes over vannfri natriumsulfat, og inndampes deretter under redusert trykk ved 40 °C. Deterholdte 3,7 g råprodukt oppløses i 10 ml methanol og overføres til toppen av en Sephadex LH-20-gelkolonne (kolonnelengde 40 cm, diameter 2,5 cm) forbehandlet med methanol. Lipidurenhetene adskilles deretter ved eluering med methanol. Fraksjonene inneholdene cyclosporinkomplekset inndampes under redusert trykk ved 40 °C. Adskillelsen av bestanddelene av det erholdte cyclosporinkompleks (1,05 g) utføres ved hjelp av kromatografi på silicagelkolonne fremstilt fra 20 g Kieselgel 40 (Reanal, Budapest), ved eluering med løsningsblandinger av kloroform-methanol, inneholdende gradvis økende volumer methanol. Elueringen startes med 100 ml kloroform, deretter fortsettes elueringen med kloroform-methanolblandinger hvori methanolinnholdet av hver 100 ml porsjon økes med 0,5 %. Cyclosporin-innholdet av fraksjonene kontrolleres ved tynnskiktkromatografi (plate: Kieselgel 60 F₂₅₄, DC Alufoil/Merck/, løpemiddel: ethylacetat-isopropanol 95:5, påvisning: joddamp). Cyclosporiner A, B og C elueres fra kolonnen ved hjelp av methanol-kloroformblandinger inneholdende henholdsvis 2,0 %, 2,5 % og 3,0 % methanol. Fraksjoner inneholdende de rene bestanddeler inndampes under redusert trykk, og gir 225 mg cyclosporin A (sm.p.: 137-140 °C, $[\alpha]_D$: -189°/methanol/), 25 mg cyclosporin B (sm.p.: 149-151 °C) og 52 mg cyclosporin C (sm.p.: 150-152 °C).

Eksempel 2

5 l IC-inokulatmedium, sterilisert ved 121 °C i 45 min. i en 10 l laboratoriefermentor, inokuleres med 200 ml av en inokulat-ristekultur fremstilt som beskrevet i eksempel 1, inkuberes deretter ved 25 °C, omristes ved 750 rpm og utluftes ved 300 l luft pr. time.

Fermenteringen fortsettes i 72 timer, deretter anvendes

500 ml av dette inokulatmedium for å inokulere 5 l FC₂-medium, sterilisert ved 121 °C i 45 min. i en 10 l laboratoriefementor.

Sammensetning av FC₂-mediet

5	Glukose	80 g
	Trypton	40 g
	Urea	2 g
	Ammoniumsulfat	12 g
10	Natriumnitrat	3 g
	Kaliumdihydrogenfosfat	2 g
	Kaliumklorid	0,5 g
	Magnesiumsulfat x 7 H ₂ O	0,5 g
	Kobber(II)-sulfat x 5 H ₂ O	0,01 g
15	Mangan(II)-sulfat x 7 H ₂ O	0,01 g
	Jern(II)-sulfat x 7 H ₂ O	0,01 g

i 1000 ml kranvann.

pH av mediet justeres til 5,2 før sterilisering. Den inokulerte kultur inkuberes ved 25 °C, ristes ved 750 rpm og utluftes med 300 l/t.

20 Fermenteringen ~~fortsettes~~ under de ovenfor beskrevne betingelser i 144 timer inntil det oppnås maksimale titere for cyclosporininnhold, og deretter høstes næringsløsningen.

25 Cyclosporin A isoleres fra 4,8 l fermenteringsnæringsløsning, inneholdende 500 µg/ml av cyclosporinkomplekset, ved hjelp av følgende fremgangsmåte.

30 Mikroorganismecellene sentrifugeres og cyclosporinkomplekset vaskes ut fra cellene med 2 x 1 l methanol. Den vandige methanoloppløsning konsentreres under redusert trykk, deretter ekstraheres antibiotikakomplekset fra det vandige konsentrat med 2 x 250 ml n-butylacetat.

35 Cyclosporinkomplekset ekstraheres fra filtratet av fermenteringsløsningen med 2 x 500 ml n-butylacetat. Alle n-butylacetat-ekstrakter sammenslås og tørkes over vannfri natriumsulfat, deretter inndampes løsningen under redusert trykk ved 40 °C. Den innledende rensing av det erholdte råprodukt (19,2 g) utføres ved hjelp av kromatografi på en kolonne fremstilt fra 100 g Kieselgel 60 (partikkelstørrelse 0,063 til 0,2 mm), med en løpemiddelløsning bestående av

kloroform-methanol-aceton (92:4:4). Fraksjonene inneholdende
 cyclosporinkomplekset (tynnskiktkromatografisk analyse: plate:
 Kieselgel 60 F₂₅₄, DC Alufoil/Merck/; løpemiddel: hexan-ace-
 5 ton 2:1; påvisning: klor/tolidinreagens) inndampes til tørr-
 het. Inndampningsresten (5,28 g) underkastes kolonnekromato-
 grafi for å gi cyclosporin A. Kolonnen fremstilles fra 115 g
 Kieselgel 60 (partikkelstørrelse 0,063 til 0,2 mm), og den
 elueres med blandinger av hexan-aceton inneholdende gradvis
 10 økende volumer aceton. Cyclosporin A elueres fra kolonnen
 med en blanding inneholdende 23 % aceton. Ved inndamping
 av fraksjonene inneholdende cyclosporin A erholdes 1,46 g
 cyclosporin A.

Eksempel 3

15 En suspensjon av konidier og mycel fremstilles med 5
 ml av en 0,9 % natriumkloridoppløsning fra maltekstrakt-
 gjærekstrakt-skråagarkulturen av *Tolypocladium varium* nov.
 sp. CY/93 og anvendes for å inokulere 800 ml IC-inokulat-
 medium beskrevet i eksempel 1, og steriliseres i en 3 l
 20 Erlenmeyerkolbe. Kolben inkuberes på en rotasjonsrister
 (340 rpm) ved 25 °C i 2,5 dager, deretter inokuleres i kol-
 ben 5 l av et FC₃-medium, sterilisert i en 10 l laboratorie-
 fermentor ved 121 °C i 45 min.

Sammensetning av FC₃-mediet

25	Sorbose	60 g
	Trypton	40 g
	Urea	2 g
	Ammoniumsulfat	12 g
	Natriumnitrat	3 g
30	Kaliumdihydrogenfosfat	2 g
	Kaliumklorid	0,5 g
	Magnesiumsulfat x 7 H ₂ O	0,5 g
	Mangan(II)-sulfat x 7 H ₂ O	0,01 g
	Jern(II)-sulfat x 7 H ₂ O	0,01 g

35 i 1000 ml kranvann.

pH av mediet justeres til 5,2 før sterilisering. Den
 inokulerte kultur inkuberes ved 25 °C, ristes ved 1000 rpm
 og utluftes med 300 l/t.

Fermenteringen fortsettes i 168 timer, ved hvilket

tidspunkt fermenteringsløsningen inneholder 600 mcg/ml av cyclosporinkomplekset ifølge den mikrobielle analysebestemmelse.

Ved isolering som beskrevet i eksempel 2, erholdes 310 mg cyclosporin A fra 1 l næringsløsning.

Eksempel 4

En suspensjon av konidier og mycel fremstilles med 5 ml av en 0,9 % natriumkloridløsning fra den 5 til 7 dager gamle maltekstrakt-gjærekstrakt-skråagarkultur av *Tolypocladium varium* nov. sp. CY/93 (NCAIM(P)F 001005) og anvendes for å inokulere 500 ml IC-inokulatmedium beskrevet i eksempel 1, og steriliseres i en 3 l Erlenmeyerkolbe. Kolben inkuberes på en rotasjonsrister (340 rpm) ved 25 °C i 3 dager, deretter inokuleres i kulturen 5 l av et FC₄-medium, sterilisert i en 10 l laboratorief fermentor ved 121 °C i 45 min.

Sammensetning av FC₄-mediet

Maltose	80 g
Trypton	40 g
Urea	2 g
Ammoniumsulfat	12 g
Natriumnitrat	3 g
Kaliumdihydrogenfosfat	2 g
Kaliumklorid	0,5 g
Magnesiumsulfat x 7 H ₂ O	0,5 g
Mangan(II)-sulfat x 7 H ₂ O	0,01 g
Kobber(II)-sulfat x 5 H ₂ O	0,01 g
Jern(II)-sulfat x 7 H ₂ O	0,01 g

i 1000 ml kranvann.

pH av mediet justeres til 5,2 før sterilisering.

Etter inokulering inkuberes fermenteringsløsningen ved 25 °C, ristes ved 1000 rpm og utluftes med 300 l/t.

Fermenteringen fortsettes i 144 timer, ved hvilket tidspunkt fermenteringsløsningen inneholder 620 mcg/ml av cyclosporinkomplekset ifølge den mikrobielle analysebestemmelse.

Isoleringen utføres ved hjelp av fremgangsmåten beskrevet i eksempel 1. Det ble således erholdt 305 mg cyclosporin A fra 1 l næringsløsning.

Eksempel 5

En suspensjon av konidier og mycel fremstilles med 5 ml av en 0,9 % natriumkloridløsning fra den 5 til 7 dager gamle maltekstrakt-gjærekstrakt-skråagarkultur av *Tolypocladium varium* nov. sp. CY/93 (NCAIM(P)F 001005), og anvendes for å inokulere 500 ml IC-inokulatmedium beskrevet i eksempel 1, og steriliseres i en 3 l Erlenmeyerkolbe. Kolben inkuberes på en rotasjonsrister (340 rpm) ved 25 °C i 2 dager, deretter inokuleres i kulturen 5 l av et FC₁-medium, sterilisert i en 10 l laboratoriefermentor ved 121 °C i 45 min. Etter inokulering ristes fermenteringsløsningen ved 750 rpm ved 25 °C og utluftes med 300 l/t. Etter dyrkning i 96 timer tilsettes en sterilisert vandig oppløsning av 100 g maltose og fermenteringen fortsettes inntil den 144 time, ved hvilket tidspunkt næringsløsningen inneholder 950 mcg/ml av cyclosporinkompleket ifølge den mikrobielle analysebestemmelse. Tilsammen høstes 4,8 l av næringsløsningen. Isolering utført ifølge fremgangsmåten beskrevet i eksempel 2 ga 2,75 g cyclosporin A.

P a t e n t k r a v

1. Mikrobiell fremgangsmåte for fremstilling av cyclosporinkompleks eller dets bestanddeler, cyclosporin A, cyclosporin B og cyclosporin C, ved aerob fermentering av en filamentformig soppstamme, k a r a k t e r i s e r t v e d at stammen av den nye soppstammen *Tolypocladium varium* sp. nov. CY/93, NCAIM (P)F001005, eller mutanter derav med vesentlig den samme morfologi og med evnen til å produsere mengder av cyclosporinkompleks eller dets bestanddeler i samme størrelsesorden som opphavsstammen, dyrkes på et næringsmedium inneholdende karbonkilder, organiske og uorganiske nitrogenkilder så vel som mineralsalter, under aerobe betingelser, ved 25-30 °C, ved pH i området 2,5-6 i 5-7 dager og hvis ønskelig, isolering og rensing av det dannede cyclosporin-antibiotikakompleks eller dets bestanddeler.

2. Fremgangsmåte ifølge krav 1,
k a r a k t e r i s e r t v e d at fermenteringen utføres
i et dyrkningsmedium inneholdende pepton, ammoniumsulfat og
trypton som nitrogenkilde og glukose, maltose og sorbitol som
5 karbonkilde.

10

15

20

25

30

35