

(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT

(11) 164072 B

Patentdirektoratet
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 2865/86

(51) Int.Cl.5

C 12 P 21/02
//C 12 P 21/02,
C 12 R 1:465)

(22) Indleveringsdag: 18 jun 1986

(41) Alm. tilgængelig: 20 dec 1986

(44) Fremlagt: 04 maj 1992

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 19 jun 1985 JP 133552/85

(71) Ansøger: *RHONE-POULENC SANTE; "Les Miroirs", 18 avenue d'Alsace; F-92400 Courbevoie, FR

(72) Opfinder: Satoshi *Morioka; JP, Makoto *Shida; JP

(74) Fuldmægtig: Budde, Schou & Co. A/S

(54) Fremgangsmåde til udfældning og isolering af nosiheptid

(56) Fremdragne publikationer

DK ans. nr. 3261/84 (163670)

2865-86

(57) Sammendrag:

Ved en fremgangsmåde til separation og isolering af nosiheptid sættes der vand, eventuelt indeholdende en syre, til en opløsning af nosiheptid sammensat af kulturmediet af en nosiheptidproducerende stamme og et opløsningsmiddel, der er opløseligt i vand, hvorefter nosiheptidet isoleres efter fraskillelse af en fraktion, der er uopløselig i opløsningsmidlet og har mycelium som hovedbestanddel.

Herved fås nosiheptid i højt udbytte og med høj renhed i form af relativt store partikler, der let kan fraskilles ved f.eks. filtrering eller centrifugering.

Den foreliggende opfindelse angår en særlig fremgangsmåde til udfældning og isolering af nosiheptid, som er et antibiotikum, og opfindelsen angår nærmere bestemt en fremgangsmåde til udfældning og isolering af nosiheptid fra en gæringsvæske.

Nosiheptid, der ligeledes betegnes 9671 RP, er et antibiotikum, der fremstilles ved dyrkning af en stamme tilhørende slægten *Streptomyces* og er anvendeligt som hjælpestof ved fodring af dyr.

Det er kendt at fremstille nosiheptid ved dyrkning af en nosiheptidproducerende stamme tilhørende slægten *Streptomyces* (jf. offentliggjort JP-patentansøgning nr. 880/1965 eller US patentskrift nr. 3.155.581). Til separation og isolering af nosiheptid fra et kulturmedium er der foreslået en metode, der består i at anvende en cyclisk ether som ekstraktions-opløsningsmiddel (JP patentansøgning nr. 121273/1983 eller EP patentansøgning nr. 133079) eller at tilsætte et uorganisk salt efter behandlingen med opløsningsmiddel, men disse metoder er ikke tilfredsstillende.

Det er kendt at gennemføre udfældningen og isoleringen af et antibiotikum fra et kulturmedium ved at blande kulturmediet med et opløsningsmiddel, fraskille myceliet, der er uopløseligt i opløsningsmidlet, fjerne opløsningsmidlet ved destillation ved opvarmning eller under formindsket tryk og derefter fraskille de udfældede partikler af antibiotikum ved filtrering eller centrifugering. Denne fremgangsmåde er ikke let at gennemføre, og renheden af nosiheptidet er lav, da partiklerne er meget små.

Fra DK patentansøgning nr. 3261/84 kendes en fremgangsmåde til fremstilling af nosiheptid, hvorved en dyrkningsblanding behandles med en cyclisk ether, f.eks. tetrahydrofuran. Efter fjernelse af mycelium tilsættes et andet opløsningsmiddel som er tungtopløseligt eller uopløseligt i vand, f.eks. heptan, hvorefter nosiheptid kan fracentrifugeres. Nosiheptid fås herved i højt udbyttet og med høj renhed (95%).

Det er en ulempe ved denne fremgangsmåde, at det fremstillede nosiheptid indeholder rester af det andet opløsningsmiddel, f.eks. heptan, da det anvendes som hjælpestof ved fodring af dyr, og det derfor er at foretrække at have
5 en så lav mængde opløsningsmiddel som muligt i produktet.

Det har nu ifølge opfindelsen vist sig, at der i stedet for det andet opløsningsmiddel, f.eks. heptan kan anvendes vand eller vand indeholdende en syre til udfældning af nosiheptid, hvilket er en stor fordel i forhold til den
10 ovenfor beskrevne fremgangsmåde, da der herved, idet det første opløsningsmiddel, f.eks. tetrahydrofuran har et lavt kogepunkt, undgås opløsningsmiddelrester i nosiheptidproduktet.

Opfindelsen angår således en fremgangsmåde til udfældning og isolering af nosiheptid, bestående i, at et kulturmedium fremkommet ved dyrkning af en nosiheptidproducerende stamme tilhørende slægten *Streptomyces* blandes med et opløsningsmiddel, der er opløseligt i vand, hvorefter en fraktion, der er uopløselig i opløsningsmidlet og har mycelium som hovedbestanddel fraskilles og nosiheptidet udfældes
20 fra den fremkomne opløsning, hvilken fremgangsmåde er ejendommelig ved, at der efter fraskillelsen af den uopløselige fraktion tilsættes vand eller vand indeholdende en syre i en mængde på 0,3 til 2 volumener pr. volumen nosiheptidopløsning til opløsningen indeholdende nosiheptidet, idet,
25 når der anvendes vand indeholdende en syre, mængden af syren er sådan, at pH-værdien af den fremkomne opløsning er mellem 3 og 7, fortrinsvis 5 og 6, hvorved nosiheptidet udfældes, og det således udfældede nosiheptid fraskilles.

30 Kendte som nosiheptidproducerende stammer er *Streptomyces actuosus* (NRRL 2954, ATCC 25421) og mutanter deraf tilhørende slægten *Streptomyces*. Kulturmediet indeholdende nosiheptid fås ved at dyrke en sådan stamme ved fremgangsmåden, der er beskrevet i offentliggjort JP patentansøgning nr. 880/1965 eller US patentskrift nr.
35 3.155.581. Fermenteringsmediet indeholder kulhydrater, uorganiske salte, som hydrører fra sammensætningen af

dyrkningsmediet, mycelium og nosiheptid. Nosiheptid akkumuleres på overfladen af myceliet, der hovedsageligt er sammensat af actinomyceter med kompliceret overfladestruktur.

5 Ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen blandes kulturmediet med et opløsningsmiddel. Opløsningsmidlerne omfatter ketoner, alkoholer og furanderivater, der er opløselige i vand, og fortrinsvis acetone, methylethylketon, aliphatiske alkoholer med mindre end 4 carbonatomer og tetrahydrofuran.

10 Som kulturmedium egnet til behandling med et opløsningsmiddel kan der enten anvendes en fermenteringsvæske, der er underkastet en mekanisk dehydratiseringsbehandling, såsom centrifugering eller filtrering, eller en rå fermenteringsvæske, der ikke er underkastet en dehydratiseringsbehandling. Det er økonomisk fordelagtigt at anvende en rå
15 fermenteringsvæske.

Den anvendte mængde opløsningsmiddel afhænger af opløsningsmidlets natur og mængden af vand og nosiheptid i fermenteringsmediet. Når der f.eks. anvendes tetrahydrofuran, acetone eller ethanol, er mængden i almindelighed mellem 0,5 og 5 volumener, fortrinsvis mellem 1,5 og 2,5
20 volumener, i forhold til volumenet af kulturmediet.

Behandlingen med opløsningsmiddel gennemføres i almindelighed i en beholder med omrøring, der har en anordning i bunden til fjernelse af uopløseligt materiale.
25 Behandlingstiden er i almindelighed mellem 0,5 og 3 timer, fortrinsvis mellem 1 og 2 timer, og temperaturen er sædvanligvis mellem 5 og 80°C, fortrinsvis mellem omgivelsestemperatur og 60°C.

30 pH-Værdien af det ved behandlingen anvendte kulturmedium afhænger af dyrkningsbetingelserne. pH-Værdien indstilles fortrinsvis til mellem 3 og 10, især mellem 5 og 9, ved behandlingen.

Efter behandlingen med et opløsningsmiddel fra-
35 skilles en uopløselig fraktion, der i det væsentlige består af mycelium, fra kulturmediet og opløsningsmidlet, så-

ledes at der fås en opløsning af nosiheptid.

Den ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen tilsatte mængde vand eller vand indeholdende en syre udgør 0,3 til 2 gange volumen af nosiheptidopløsningen og fortrinsvis 0,4
5 til 1 gange dette volumen. Separationen forløber ikke bekvemt, hvis der tilsættes en for lille mængde vand, og filtreringsegenskaberne bliver dårlige, hvis der tilsættes for meget vand.

Som syre anvendes der - enkeltvis eller i blanding
10 - en uorganisk syre, såsom svovlsyre, saltsyre eller salpetersyre, eller en organisk syre, såsom eddikesyre, i en sådan mængde, at pH-værdien af opløsningen er mellem 3 og 7, fortrinsvis mellem 5 og 6, når vandet indeholdende en syre sættes til opløsningen. Når pH-værdien er høj bliver ud-
15 fældningsgraden og den kemiske renhed af nosiheptid ringe.

Tilsætningen af vand eller vand indeholdende en syre bør ske gradvis under blanding og omrøring. I almindelighed tilsættes vandet eller vand indeholdende en syre i løbet af 0,1 til 5 timer, fortrinsvis 0,5 til 3 timer.

20 Måden, hvorpå vandet eller vand indeholdende en syre tilsættes, påvirker nosiheptidets partikelstørrelse og renhed væsentligt. Hvis der f.eks. tilsættes 4 m^3 vand til 6 m^3 opløsning indeholdende nosiheptid i en blander med et nyttevolumen på 10 m^3 under anvendelse af en høj
25 tilsætningshastighed (10-30 minutter, dvs. $0,4-0,13 \text{ m}^3/\text{min.}$), fås der partikler på under $0,14 \mu\text{m}$, hvis renhed er mellem 85 og 90%. Ved gradvis og kontinuerlig tilsætning ($0,5-5$ timer, dvs. $0,13-0,013 \text{ m}^3/\text{min.}$) fås der derimod partikler på $1-2 \mu\text{m}$, hvis renhed er 95-98%.

30 Denne proces er sædvanligt anvendt ved fraskillelse af krystaller, men den er aldrig blevet anvendt til amorfe produkter som nosiheptid. Det har overraskende vist sig, at nosiheptidpartiklerne, der udskilles fra opløsningen, fraskilles let ved centrifugering eller filtrering, da de har

gode sedimentations- og filtreringsegenskaber.

Opfindelsen illustreres ved de følgende eksempler.

Eksempel 1.

5 I en blander med en fælde i bunden anbringes 100 volumendele af et dyrkningsmedium fremkommet ved dyrkning af *Streptomyces actuosus* og 200 volumendele tetrahydrofuran. Der omrøres i 1 time ved 60°C. Myceliet skilles derefter fra ekstrakten ved centrifugering. Ekstraktens volumen er 260 volumendele.

Dyrkningsmediet har følgende sammensætning på vægtbasis:

	mycelium	7,5%
	kulhydrater	2,0%
15	uorganiske salte	0,5%
	nosiheptid	0,5%
	vand	89,5%

pH-værdien er 5,6.

20 En væskechromatografisk analyse viser, at ekstrakten indeholder 0,187 vægt-% nosiheptid (udbytte 90,0 vægt-%).

Der sættes derefter i løbet af 1 time 150 volumendele vand indeholdende 0,2 volumendele koncentreret svovlsyre til blanderen indeholdende 200 volumendele af den ovenfor anførte opløsning, hvorefter blandingen filtreres til fraskillelse af nosiheptid.

25 Ifølge væskechromatografisk analyse er koncentrationen af nosiheptid i filtratet 0,005 vægt-%.

Renheden af det således isolerede nosiheptid er 98%, og udbyttet er 95%.

30

35

0

Eksempel 2.

I en blander, der er identisk med den i eksempel 1 beskrevet, anbringes 100 volumendele af et kulturmedium, og pH-værdien indstilles til 8,0 ved tilsætning af 10 vægt-%'s natriumhydroxidopløsning. Derefter tilsættes der 200 volumendele acetone (i stedet for tetrahydrofuran). Der behandles som i eksempel 1. Volumen af opløsningen indeholdende nosiheptid er 240 volumendele. En væskechromatografisk analyse viser, at opløsningen indeholder 0,193 vægt-% nosiheptid, og at fraskillelsesgraden er 85%.

Der sættes derefter i løbet af 1 time, jævnt og under omrøring, 140 volumendele vand indeholdende 0,2 volumendele koncentreret svovlsyre til blanderen indeholdende 200 volumendele af den ovenfor anførte opløsning. Derefter filtreres blandingen til fraskillelse af nosiheptid, og dette udviser de samme karakteristika som nosiheptid fremstillet ifølge eksempel 1.

Koncentrationen af nosiheptid i filtratet er 0,008%.

Renheden af det isolerede nosiheptid er 98%, og udbyttet er 92,5%.

Eksempel 3.

I en blander indeholdende 200 volumendele af en opløsning indeholdende nosiheptid, der er dannet ved blanding af 100 volumendele fermenteringsvæske med 200 volumendele acetone og efterfølgende fraskillelse af uopløseligt materiale som i eksempel 2, sættes der i løbet af 1 time, jævnt og under omrøring, 300 volumendele vand. Nosiheptidet fraskilles på samme måde som i eksempel 1.

Koncentrationen af nosiheptid i filtratet er 0,007%.

Renheden af det isolerede nosiheptid er 97%, og udbyttet er 91%.

35

P A T E N T K R A V.

Fremgangsmåde til udfældning og isolering af nosiheptid, bestående i, at et kulturmedium fremkommet ved dyrkning af en nosiheptidproducerende stamme tilhørende slægten *Streptomyces* blandes med et opløsningsmiddel, der er opløseligt i vand, hvorefter en fraktion, der er uopløselig i opløsningsmidlet og har mycelium som hovedbestanddel fraskilles og nosiheptidet udfældes fra den fremkomne opløsning, k e n - d e t e g n e t ved, at der efter fraskillelsen af den uopløselige fraktion tilsættes vand eller vand indeholdende en syre i en mængde på 0,3 til 2 volumener pr. volumen nosiheptidopløsning til opløsningen indeholdende nosiheptidet, idet, når der anvendes vand indeholdende en syre, mængden af syren er sådan, at pH-værdien af den fremkomne opløsning er mellem 3 og 7, fortrinsvis mellem 5 og 6, hvorved nosiheptidet udfældes, og det således udfældede nosiheptid fraskilles.

20

25

30

35