
Octrooiraad



⑩ A Terinzagelegging ⑪ 8000623

Nederland

⑲ NL

- ⑤4 **Werkwijze voor het bereiden van sisomycine.**
- ⑤1 Int.Cl.: C12P19/48, A61K31/71// C12R1/29.
- ⑦1 Aanvrager: Chinoin Gyógyszer- és Vegyészeti Termékek Gyára RT te
Boedapest.
- ⑦4 Gem.: Ir. C.M.R. Davidson c.s.
Octrooibureau Vriesendorp & Gaade
Dr. Kuiperstraat 6
2514 BB 's-Gravenhage.

-
- ②1 Aanvraag Nr. 8000623.
- ②2 Ingediend 31 januari 1980.
- ③2 Voorrang vanaf 1 februari 1979.
- ③3 Land van voorrang: Hongarije (HU).
- ③1 Nummer van de voorrangsaanvraag: CI -1906 .
- ②3 --
- ⑥1 --
- ⑥2 --

-
- ④3 Ter inzage gelegd 5 augustus 1980.

De aan dit blad gehechte stukken zijn een afdruk van de oorspronkelijk ingediende beschrijving met conclusie(s) en eventuele tekening(en).

Werkwijze voor het bereiden van sisomycine.

De uitvinding heeft betrekking op een nieuwe werkwijze voor het bereiden van sisomycine en zijn farmaceutisch aanvaardbare zouten langs microbiologische weg.

Sisomycine (0-2,6-diamino-2,3,4,6-tetradeoxyd-D-gly-ce-ro-hex-4-enopyranosyl)-1- 4(-O-(β -3-deoxy-4-C-methyl-3- β -methylamino- β -L-arabopyranosyl)- β -1-6)-2-desoxy-D-streptamine is een antibioticum met een breed spectrum.

Er zijn verschillende microbiologische methoden ter bereiding van sisomycine bekend, bijvoorbeeld uit de Amerikaanse octrooischriften 3.832.286 en 3.907.771. Volgens deze octrooischriften produceert het microorganisme *Micromonospora inyoensis* (NRRL 3292) het als hoofdcomponent.

De stam *Micromonospora grisea* (NRRL 3800) produceert behalve verdamycine (Amerikaans octrooischrift 3.951.746) de stam *Micromonospora zionensis* (NRRL 5466) behalve het antibioticum G-52 (Amerikaans octrooischrift 3.956.068) en voorts de stam *Micromonospora purpurea* var. *nigrescens* (MNG 00122) behalve een gentamycinecomplex (Hongaars octrooischrift 168.778) sisomycine.

In de loop van een onderzoek van bodemonsters uit Donauslib werd een nieuw microorganisme gewonnen, dat sisomycine produceert. Dit nieuwe microorganisme werd JMS-1 genoemd. De stam, die anders bleek te zijn dan alle tot dusver bekende microorganismen werd gedetermineerd als *Micromonospora danubiensis* species nova. Uit dit microorganisme verkreeg men door verschillende stamraffineerprocessen de stam aangeduid als JMS-3. In de loop van de fermentatie van deze stam, die werd gedeponseed bij de nationale verzameling van microorganismen te Boedapest op 19 juni 1978, verkreeg men een fermentatiemedium met een zeer hoge sisomycineconcentratie.

De uitvinding heeft betrekking op een nieuwe

werkwijze voor het bereiden van sisomycine met het kenmerk, dat men een stam van de microorganismespecies *Micromonospora danubiensis*, bijvoorkeur de stam MNG 00171 onder aerobe omstandigheden kweekt in een voedingsmedium, dat assimileerbare bronnen van koolstof en stikstof
 5 en voorts anorganische zouten bevat en indien nodig het verkregen sisomycine uit het fermentatiemedium wint en zuivert en/of omzet in een farmaceutisch aanvaardbaar zout.

Het volgens de uitvinding te gebruiken microorganis-
 me heeft onderstaande microscopische, macroscopische en biochemische
 10 eigenschappen.

Morfologie

Macroscopische waarnemingen: een 10 dagen oude, bij 37 °C op Czapek agar geïncubeerde cultuur vertoont een vrij
 15 gematigde groei, geen aerial mycelium, terwijl de kolonies een regelmatige ronde vorm hebben en licht roodachtig bruin gekleurd zijn. Buiten de kolonies kan men geen afscheiding van oplosbare pigmenten waarnemen.

Microscopische waarnemingen: lange, vertakte
 20 filamenten zonder scheidingswand, middellijn van het filament 0,5 µ, terwijl de sporen zich bevinden in eenvoudige sporofonen van 1-1,5 µ middellijn. De sporen zijn eivormig tot bolvormig.

Biochemische en fysiologische eigenschappen:
 de stam *Micromonospora danubiensis* MNG-00171 groeit behoorlijk bij
 25 temperaturen tussen 28 en 37 °C, maar bij temperaturen van 44 °C en daarboven wordt geen groei waargenomen.

Gebruik van de koolstofbron werd onderzocht aan het volgende voedingsmedium: Gistextract 0,5%, koolstofbron 1,0%, CaCO₃ 0,1%, agar 1,5% in gedestilleerd water. De resultaten worden
 30 weergegeven in tabel A.

Tabel A

Koolstof- bron		Micromonospora danubiensis MNG 00171
5	Arabinose	zwak (-)
	Ribose	matig (+)
	Xylose	zwak (-)
	Rhamnose	zwak (-)
	Fructose	behoorlijk (+++)
10	Galactose	matig (+)
	Glucose	behoorlijk (+++)
	Lactose	zwak (-)
	Saccharose	behoorlijk (+++)
15	Raffinose	zwak (-)
	Dulcitol	zwak (-)
	Mannitol	behoorlijk (+++)
	Inositol	zwak (-)
	zetmeel	behoorlijk (+++)
20		

Het gebruik van de stikstofbron werd onderzocht aan het volgende voedingsmedium: glucose 1%, agar 1,5% in gedestilleerd water. De resultaten worden gegeven in tabel B:

Tabel B

Stikstofgebruik		
Stikstofbron		Micromonospora danubiensis MNG 00171
25	0,5% Gist extract	behoorlijk (+++)
	1% N-Z-Amine type A	behoorlijk (+++)
	1% Asparagine	matig-zwak (+)
	1% Glutaminezuur	zwak (-)
	1% KNO ₃	zwak (-)
30		

35 Een groeiende kolonie van *Micromonospora danubiensis* hydrolyseert gelatine, melk en zetmeel en reduceert nitraat tot nitriet. Het microorganisme tolereert een maximum van 2% natriumchloride in

een groeimedium..

Cultuureigenschappen

In tabel C zijn cultuureigenschappen van micromono-sporadanubiensis JMS-3 weergegeven. (Bij de beschrijving van de kleuren bij deze waarnemingen is de volgende referentie gebruikt: Baumenns Farbtonkarte Arla II., Paul Baumann, Aue I-SA 87350 LAu 302, GFR).

8000623

Tabel B
Cultuureigenschappen

Medium		Micromonospora danubiensis MNG 00171
5	Bennettagar	zwakke groei, helder oranje kleur Oc 97-98
	Czapek agar	behoorlijke groei, roodachtig bruine kleur O 142-145
	Emerson agar	geen groei
	Glucose-Asparagine agar	geen groei
10	Glucose-Yeast-Extract-agar	behoorlijke groei, helder oranje kleur Oc 99
	voedingsagar	behoorlijke groei, wijnrode, sommige plaatsen geelbruine kleur Ro. 193, respectieve- lijk Or 165-166
15	Pepton ijzer agar	geen groei, slechts in sporen, kleine kolonies, lichtgele kleur, Oc 97 en CO 69, geen diffundeerbaar pigment
	Tyrosine agar	groei in sporen, kleur kan niet worden bepaald, geen diffundeerbaar pigment
20	Aardappelstamp zonder CaCO_3	geen groei
	Aardappelstamp met CaCO_3	matige groei, roodachtig bruine kleur, O 136 en O 145-147

Op grond van bovengenoemde feiten moet
 25 worden aangenomen, dat de als JMS-3 aangeduide Micromonospora stam
 verschilt van de uit de literatuur bekende Micromonospora species.
 Als men de opgesomde taxonomische kenmerken vergelijkt met het Micro-
 monospora-systeem van Luedemann is de stam JMS-3 gekwalificeerd als
 een nieuw species, dat in overeenstemming met zijn vindplaats is aan-
 30 geduid als Micromonospora danubiensis species nova.

Volgens een voorkeuroitvoeringsvorm wordt
 de stam Micromonospora danubiensis gekweekt in submerge cultuur onder
 aerobe omstandigheden.

35 In het voedingsmedium voor de produktie van

sisomycine kunnen verschillende koolstof- en stikstofbronnen, die door het microorganisme *Micromonospora danubiensis* assimileerbaar zijn, anorganische zouten, spoorelementen en antischuimtoevoegsels aanwezigheid zijn. Als koolstof-, stikstof- en energiebronnen kan
 5 men respectievelijk zetmeel, oplosbaar zetmeel, dextrine, glucose, saccharose, maismeel, sojameel, sojameelhydrolysaat, caseinehydrolysaat, maisweekvloei-
 10 stof, gistextract, enz. gebruiken.

Als anorganische zouten kan men verschillende
 10 ammonium-, ijzer-, zink-, mangaan-, magnesium-, natrium-, kalium-, en kobaltzouten gebruiken. Ter vergroting van de buffercapaciteit van het voedingsmedium kan men goed gebruik maken van calciumcarbonaat en als antischuimtoevoegsel kan men verschillende plantaardige oliën gebruiken (bijvoorbeeld palmolie, zonnebloemolie, sojaolie).

15 Het gebruik van verschillende voedingsmedium-componenten maakt het mogelijk verschillende voedingsmedia te produceren. De voedsel-behoefte voor de produktie van de entverschilt van die voor de hoofdfermentatie. Na is gebleken bevat een van de meest voordelige voedingsmedia voor de sisomycineproduktie sojameel, mais-
 20 weekvloei-
 25 stof, maismeel, zetmeel, saccharose, calciumcarbonaat, kobaltchloride en palmolie.

De fermentatietemperatuur kan 25-37°C bedragen. De fermentatie verloopt het beste bij 28-33 °C.

De beroering, die afhangt van de afmetingen van
 25 het fermenteervat, varieert van 100-600 omw./min. Een goede beluchting is 1 vol/vol per minuut.

De activiteit van de bijde fermentatie geproduceerde antibiotica (sisomycine en "ondergeschikte" componenten) wordt bepaald met het proeforganisme *Staphylococcus epidermidis* met de
 30 agardiffusiemethode, ten opzichte van een standaard sisomycineprodukt.

Tijdens 96-120 uur fermentatie bereikt de activiteitssom in de fermenteervloeistof een waarde van 400-450 u/ml (1u = 1 µg sisomycinebase activiteit). Sisomycineactiviteit bedraagt tot 85% van de totale antibiotische activiteit in de fermenteervloe-
 35 stof.

De winning van sisomycine kan op bekende wijzen

worden uitgevoerd. Desgewenst kan men de verkregen sisomycinebase in een farmaceutisch aanvaardbaar zout omzetten.

De door het microorganisme *Micromonospora danubiensis* geproduceerde hoeveelheid sisomycine is de veelvoudige
 5 hoeveelheid van die, die volgens bekende werkwijzen wordt geproduceerd. Onder laboratoriumomstandigheden bedraagt zij meer dan 450 u/ml en in de proeffabriekfermenteerinrichting 350-400 u/ml. De fermenteer-
 vloeistof bevat behalve sisomycine slechts 10-15% begeleidende antibiotica.

10 De volgende voorbeelden lichten de uitvinding toe.

Voorbeeld I

Men ent 100 ml steriel voedingsmedium in een 500 ml Erlenmeyerkolf van onderstaande samenstelling onder steriele
 15 omstandigheden met 1 ml van een mycelium (vegetatieve kiemen 10^7 - 10^8 /ml) van de onderkoelde stam *Micromonospora danubiensis* JMS-3 (MNG 00171). Het medium was als volgt samengesteld:

	Zetmeel	25,0 g
	Maisweekvloeistof	7,0 g
20	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3,5 g
	NaCl	5,0 g
	CaCO_3	8,0 g
	Leidingwater	1000 ml

Men stelt de pH van het voedingsmedium in op 7,5 voor sterilisatie, dus na sterilisatie bedraagt de pH 7,0-7,2.
 25

Men incubeert de cultuur 3 dagen bij 28 °C op een vlakke schudmachine (220 bewegingen per minuut, uitwijking 7,5 cm). Met de aldus verkregen cultuur ent men onder steriele omstandigheden 6 liter steriel voedingsmedium (in een glazen fermenteerinrichting van 10 liter). De samenstelling van het voedings-
 30 medium is hetzelfde als bij het bovengenoemde entvoedingsmedium.

Men voert de kweek in de glazen fermenteerinrichting uit bij 28 °C, een roterende beweging van 400 omw./min. en een beluchting van 1 vol./vol. per minuut. Als antischuimmiddel
 35 gebruikt men, naar behoefte, palmolie.

De in 40 uur ontwikkelde ent wordt gebruikt voor het enten van het fermentatievoedingsmedium. De hoeveelheid ent bedraagt 600 ml, de hoeveelheid voedingsmedium 6 liter, de pH 7,0-7,2 en het volume van de fermenteerinrichting 10 liter. De samenstelling van het voedingsmedium is als volgt:

5	sojameel	50,0 g
	maiszetmeel	10,0 g
	saccharose	30,0 g
	CaCO ₃	5,0 g
10	Maisweekvloeistof	5,0 g
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	4,5 mg
	leidingwater	1000 ml

De kweek geschiedt bij 31 °C onder een beroering van 400 omw./min. en een beluchting van 6 liter per minuut. Als antischuimmiddel gebruikt men palmolie.

De antibioticaproductie begint in het 28-34^{ste} uur van de fermentatie en de hoogte waarde wordt bereikt na 110 uur fermentatie.

Op dit tijdstip bepaalt men het totale anti-biotica-gehalte van de fermentatievloeistof op 400 u/ml ten opzichte van een standaard sisomycine onder gebruikmaking van het proeforganisme *Staphylococcus epidermidis* en de agar diffusiemethode. (J.S. Simpson: Analytical Microbiology, Acad. Press, New York, blz. 87-124, 1963).

25 Voorbeeld II

Men ent het onderstaande voedingsmedium met de vegetatieve cultuur, geproduceerd door de stam *Micromonospora danubiensis* JMS-3 (MNG 00171) op een vlakke schudmachine volgens voorbeeld I. Het voedingsmedium is als volgt samengesteld:

30	Sojameel	10,0 g
	Zetmeel	10,0 g
	Saccharose	10,0 g
	CaCO ₃	4,0 g
	leidingwater	1000 ml

35 De pH van het voedingsmedium na sterilisatie bedraagt

800 06 23

7,0-7,2 en de hoeveelheid medium bedraagt 6 liter (in een glazen
fermenteerinrichting van 10 liter). Men voert de kweek uit bij 31 °C,
een roterende beroering van 400 omw./min. en een beluchting van
6 liter per minuut. Als antischuimmiddel gebruikt men, naar behoefte,
5 palmolie.

Men gebruikt 600 ml van de in 36 uur ont-
wikkelde ent voor de ent van fermentatievoedingsmedium van de
volgende samenstelling:

	sojameel	30,0 g
10	maismeel	25,0 g
	CaCO ₃	5,0 g
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	10,0 mg
	leidingwater	1000 ml

De pH van het voedingsmedium bedraagt na
15 sterilisatie 7,0-7,2. De kweek geschiedt bij een temperatuur van 33 °C,
een roterende beroering van 600 omw./min. en een beluchting van 6 liter
per minuut. Als antischuimmiddel gebruikt men palmolie.

De antibioticaproductie begint tussen het
26-30^{ste} uur van de fermentatie en de hoogste waarde wordt na 100 uur
20 fermentatie bereikt. Op dit moment bedraagt het totale antibiotica-
gehalte van de fermenteervloeistof 420 u/ml ten opzichte van hun
standaard sisomycinemonster.

Voorbeeld III

Men ent het onderstaande voedingsmedium met
25 de vegetatieve cultuur, geproduceerd door de stam *Micromonospora*
danubiensis JMS-3 (MNG 00171) op een vlakke schudmachine volgens de
methode van voorbeeld I. Het voedingsmedium is als volgt samengesteld:

	zetmeel	25,0 g
	sojameelhydrolysaat	15,0 g
30	(NH ₄) ₂ SO ₄	2,0 g
	NaCl	3,0 g
	ZnSO ₄	0,5 g
	CaCO ₃	8,0 g
	leidingwater	1000 ml

35 De pH van het voedingsmedium bedraagt na

8000623

sterilisatie 7,0-7,2 en de hoeveelheid medium bedraagt 6 liter (in een glazen fermenteerinrichting van 10 liter). Men voerde de hydrolyse van het sojameel uit met NOVO-bacteriele protease gedurende 30 min. bij 60 °C en een pH van 7,5.

- 5 Na de ent voerde men de kweek uit bij 28 °C, een roterende beroering van 400 omw./min. en een beluchting van 6 liter per minuut. Als antischuimmiddel gebruikt men palmolie.

Men gebruikt 600 ml van de in 40 uur ontwikkelde ent voor de ent van het volgende fermentatievoedingsmedium:

10	Sojameelhydrolysaat	50,0 g
	zetmeel	10,0 g
	dextrine	25,0 g
	CaCO ₃	5,0 g
	Saccharose	10,0 g
15	CoCl ₂ .6H ₂ O	4,5 mg
	leidingwater	1000 ml

- De pH van het voedingsmedium na sterilisatie bedraagt 7,0-7,2 en de hoeveelheid medium bedraagt 6 liter (in een glazen fermenteerinrichting van 10 liter). Men voerde de hydrolyse van het sojameel uit met NOVO bacteriele protease gedurende 30 min. bij 60 °C en een pH van 7,5.

Na enting voerde men de kweek uit bij 31 °C, een roterende beroering van 600 omw./min. en een beluchting van 6 liter per minuut. Als antischuimmiddel gebruikt men palmolie.

- 25 De antibioticaproductie begint tussen het 26-30^{ste} uur van de fermentatie, waarbij de hoogste waarden na 100 uur fermenteren wordt bereikt. Op dit tijdstip bedraagt het totale antibioticagehalte van de fermenteervloeistof 430 u/ml, berekend op een standaardsisomycinemonster.

30 Voorbeeld IV

- Men ent een hoeveelheid van 200 liter onderstaand voedingsmedium (volume van de roestvrijstalen voorfermenteerinrichting bedraagt 300 liter) met de vegetatieve cultuur, geproduceerd door de stam *Micromonospora danubiensis* JMS-3 (MNG 00171) in een glazen fermenteerinrichting volgens voorbeeld II. Het voedingsmedium

was als volgt samengesteld:

	Sojameel	10,0 g
	Zetmeel	10,0 g
	saccharose	10,0 g
5	CaCO ₃	4,0 g
	leidingwater	1000 ml

De pH van het voedingsmedium na sterilisatie bedraagt 7,0-7,2. Als antischuimmiddel gebruikt men palmolie.

- De kweek geschiedt bij 31 °C, een roterende beroering van 180 omw./min. en een beluchting van 200 liter per minuut.

Men gebruikt de in 36 uur ontwikkelde ent voor de ent van het fermentatievoedingsmedium van de volgende samenstelling (het volume van het medium bedraagt 2000 liter):

	sojameel	30,0 g
15	maismeel	25,0 g
	CaCO ₃	5,0 g
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	10,0 mg
	leidingwater	1000 ml

- De pH van het voedingsmedium na sterilisatie bedraagt 7,0-7,2. De kweektemperatuur bedraagt 33 °C bij een roterende beroering van 220 omw./min. en een beluchting van 2 m³/min, terwijl men als antischuimmiddel een mengsel gebruikt van sojaolie en palmolie (50%-50%).

- De antibioticaproductie begint tussen het 26-30^{ste} uur van de fermentatie en de hoogste waarde wordt na 100 uur fermentatie bereikt. Op dit tijdstip bedraagt het totale antibioticagehalte van de fermenteervloeistof 380 u/ml ten opzichte van een standaardsisomycinemonster.

- Toen de fermentatie voltooid was, verkreeg men door opwerken op bekende wijze 288 g zuivere sisomycinebase, die ook gebonden water bevatte.

Eigenschappen van het produkt:

Smeltpunt 198-201 °C

$[\alpha]_D^{25} = +188^\circ$ (c = 0,3 water)

Elementaire analyse:

Berekend op monohydraat: C = 49,80%; H = 8,2%; N = 14,95%.

Gevonden: C = 49,15%; H = 8,37%; N = 15,15%.

IR-spectrum (KBr): ν OH, NH 3170-3360, ν CH=COC 1690,
 5 ν COC 1060 cm^{-1} .
 PMR-spectrum (D_2O): δ 1,20 (Me-4", s, 3H), δ 2,50 (Me-N-3", s, 3H),
 δ 2,56 (H-3", d, $J_{2"3"} = 10$ Hz, 1H), δ 3,17
 (H-6', bs, 2H), δ 3,30 (H_{ax}-5", d, $J_{\text{gem}} =$
 12 Hz, 1H), δ 3,80 (H-2", dd, $J_{2"3"} = 10$ Hz,
 10 $J_{1"2"} = 4$ Hz, 1H), δ 4,04 (H_e-5", d, $J_{\text{gem}} =$
 12 Hz, 1H), δ 4,88 (H-4', bt, 1H), δ 5,09
 (H-1", d, $J_{1"2"} = 4$ Hz, 1H), δ 5,35 (H-1', d,
 $J_{1'2'} = 2$ Hz, 1H) ppm.

Massagetallen van de karakteristieke ionen (m/e):
 15 447, 332, 304, 160, 145, 127, 118, 110, 100.

Voorbeeld VBereiding van sisomycinesulfaat

Men lost 15 g zuivere sisomycinebase op in 60
 20 ml gedeïoniseerd water en voegt bij de verkregen oplossing druppels-
 gewijze zoveel 5 N zwavelzuur, dat de pH 4,3 bedraagt. Daarna voegt
 men bij de oplossing 1,5 g actieve kool en roert het mengsel 30 min.,
 waarna men filtreert over een Seitz vel. Men wast het filter met
 3 x 50 ml gedeïoniseerd water en voegt de verenigde filtraten onder
 25 continu roeren bij 1 liter methanol. Men laat de oplossing, die
 afgescheiden precipitaat bevat in een koelruimte staan, waarna men
 het precipitaat filtreert.

Het afgefiltreerde sisomycinesulfaat wordt
 gewassen met 3 x 50 ml methanol en in vacuüm bij 50 °C boven P_2O_5
 30 gedroogd tot constant gewicht. Aldus verkrijgt men 22 g sisomycine-
 sulfaat.

C O N C L U S I E S

1. Werkwijze voor het bereiden van het antibioticum sisomycine of een farmaceutisch aanvaardbaar zout daarvan met het kenmerk, dat men een *Micromonospora danubiensis* stam
 5 aerob fermenteert op een voedingsmedium, dat een assimileerbare koolstof- en stikstofbron en voorts anorganische zouten bevat en het verkregen antibioticum eventueel vervolgens in een zout omzet.

2. Werkwijze volgens conclusie 1, met het kenmerk, dat men als koolstof- en stikstofbron zetmeel, dextrine, saccharose, maismeel, sojameel, maisweekvloeistof of
 10 gehydrolyseerd sojameel gebruikt.

3. Werkwijze volgens conclusie 1, met het kenmerk, dat men de kweek bij 25-37°C, bij voorkeur bij 28-33 °C uitvoert.

15 4. Werkwijze volgens conclusie 1, met het kenmerk, dat men als anorganische zouten ammonium-, kobalt-, en zinkzouten gebruikt.

5. Werkwijze volgens conclusie 1, met het kenmerk, dat men de uit de fermenteervloeistof gewonnen
 20 sisomycinebase in het sulfaat omzet.

6. De actinomycetenspecies *Micromonospora danubiensis*.

7. De actinomycesstam *Micromonospora danubiensis* MNG 00171.

25 8. Werkwijze volgens conclusie 1, met het kenmerk, dat men een voedingsmedium gebruikt, dat sojameel, maisweekvloeistof, maismeel, zetmeel, saccharose, calciumcarbonaat, calciumchloride en palmolie bevat.

30