

NORGE



**STYRET
FOR DET INDUSTRIELLE
RETTSVERN**

Utlegningskrift nr. 121390

Int. Cl. C 12 d 9/04 Kl. 6b-16/03

Patentsøknad nr. 153.028 Inngitt 27.IV 1964

Løpedag -

Søknaden alment tilgjengelig fra 1.VII 1968

Søknaden utlagt og utlegningskrift utgitt 22.II 1971

Prioritet begjært fra: -

BIOFARMA, S.A.,
4, rue Deleau, Neuilly-sur-Seine, Frankrike.

Oppfinner: Jacques Servier, 92 rue Charles Laffitte,
Frankrike.

Fullmektig: Siv.ing. Karsten B. Halvosen.

Fremgangsmåte for fremstilling av anti-
inflammatorisk og antibiotisk virkende
fusafungin.

Foreliggende oppfinnelse angår en fremgangsmåte for fremstilling av antiinflammatorisk og antibiotisk virkende fusafungin ved submers dyrking av *Fusarium lateritium* Wr (CBS 119.63) i et vanlig næringsmedium under lufttilførsel ved 25-33°C, fortrinnsvis 29-30°C, ved en pH-verdi mellom 4,5 og 7,0 fortrinnsvis på omtrent 6,5, og påfølgende ekstrahering av det dannede antibiotikum ved hjelp av organiske løsningsmidler.

1

121390

2

Det særegne ved fremgangsmåten i henhold til oppfinnelsen er at luften tilføres i en mengde på 0,7 til 0,9 liter luft pr. minutt pr. liter dyrkingsmedium.

Fusafungien er beskrevet i fransk patentskrift 1.164.181 og dets terapeutiske anvendelse som antiinflammatorisk antibiotikum er beskrevet i det franske medikamentpatentskrift (BSM) 1084 M.

Den tidligere kjente fremgangsmåte for fremstilling av fusafungin hadde den mangel at utbyttende var forholdsvis små og at gjærings-tiden var lang. Fremgangsmåten i henhold til den foreliggende oppfinnelse fremviser ikke disse mangler.

Ved fremgangsmåten i henhold til oppfinnelsen kan utbyttet i forhold til den tidligere kjente fremgangsmåte økes med 500-600%, idet samtidig gjæringstiden nedsettes fra tidligere 6-10 døgner til omtrent 60-70 timer. Ved den foreliggende fremgangsmåte erholdes derfor i det samme tidsrom tilnærmet den tyvedobbelte mengde av fusafungin i forhold til fremgangsmåten beskrevet i det franske patentskrift 1.164.181. Denne overraskende forbedring oppnås bare i det angitte område, og allerede en variasjon på 0,1 l. luft pr. minutt pr. liter medium i hver retning resulterer i en reduksjon av utbyttet til nesten det halve. I den vedføyde figur vises avhengigheten av fusafungindannelsen i avhengighet av tilført luftmengde. De øvrige betingelser tilsvarer betingelsene i henhold til det nevnte franske patentskrift.

Bortsett fra andre mulige anvendelser, har fusafungin særlig verdi ved lokal anvendelse ved affeksjoner i luftveiene, huden og mucosa, f.eks. ved rhinitis, rhinopharyngitis, sinusitis, bronchitis, sår, infiserte ulcera o.l., i form av nasalløsninger, aerosoler, pomader o.l.

Fusafungin har et særlig bredt virkningsspektrum og er i svake konsentrasjoner virksom overfor de fleste patogene mikroorganismer, samtidig som det også har en anti-inflammatorisk virkning som er acetylsalicylsyre overlegen.

Dyrkingen foregår under submerse betingelser under lufting og bevegelse i medier hvor det sterile vann inneholder en nitrogenkilde, en karbonkilde, en kilde for vekstsubstanser, mineralsalter og en eller flere pufferforbindelser. Nitrogentilførselen kan sikres ved at det i mediet anbringes en eller flere av følgende substanser: gjærekstrakt, aminosyrer, peptoner, fiskemel, soya-mel, løselige mais ekstrakter, løselige melekstrakter, kjøttekstrakter, urinstoff, ammoniumnitrat.

Disse bestanddeler, som er lett tilgjengelige i rå form, har den fordel at de også tilfører spor av vekstfaktorer samt betraktelige mengder næringsmineraler.

Tilførselen av karbon kan skje i form av karbohydrater i rensset eller konsentrert form, ved hjelp av følgende substanser:

saccarose, melasse, løselig stivelse, glucose, glucosekonsentrater, gerelose, maltose, galactose, fructose, lactose.

De optimale mengder av disse karbonkilder svinger fra 3 til 7 vekt% av dyrkingsmediet.

Mineralsaltene velges slik at mediet tilføres to eller flere av følgende ioner: klorid, fosfat, nitrat, sulfat, karbonat, citrat, tartrat, natrium, kalium, ammonium, kalsium, magnesium, sink, jern, kopper.

Dyrkingsmediets pH-verdi kan variere innenfor relativt vide grenser, mellom 4,5 og 7, men bør i hvert fall ved begynnelsen av dyrkingen fortrinnsvis ligge mellom 5,5 og 6. Denne pH-verdi opprettholdes ved tilsetning av puffer-substanser, f.eks. løsninger av fosfater, citrater eller tartrater.

Dyrkingstemperaturen kan variere fra 25 til 33°C for å oppnå et høyere antibiotikuminnhold i det mycel som dannes under dyrkingen.

Dyrkingstiden kan reduseres betraktelig når det i henhold til oppfinnelsen foretas en gjennomlufting av mediet med 0,7-0,9 liter

121390

4

luft pr. min. pr. liter næringsløsning og ved at løsningen holdes i bevegelse. En dyrkingstid på 60 til 70 timer gir i alminnelighet gode resultater.

Utviklingen av kulturen overvåkes ved at man hver femte time tar ut en prøve på ca. 1 liter dyrkingsløsning til antibiotikumbestemmelse. Denne bestemmelse foretas papirkromatografisk. Dyrkingen avbrytes når fusafungininnholdet ikke lenger tiltar merkbart.

EKSEMPEL 1

I en 5-liters tohalset kolbe, hvor den ene hals er beregnet til å forbindes med en steril luftkilde, fremstilles et medium på 2 liter etter følgende oppskrift:

Pepton	1	%
Glucosekonsentrat	3	%
Natriumnitrat	0,1	%
Dikalium_fosfat	0,1	%
Magnesiumsulfat	0,05	%
Kalium_klorid	0,05	%
Vann	til 100	%

Begge kolbeåpningene proppes med bomull, hvorpå mediet steriliseres ved at det anbringes i en autoklav i 30 min. ved 120°C. Etter avkjøling til 29-30°C uttas en liten volumdel for å kontrollere at løsningen er steril og for å kontrollere at pH-verdien ligger i nærheten av 5.

Sporer av stammen fra en skråkultur på agarmedium suspenderes i destillert vann, som på forhånd er sterilisert, for at det skal oppnås en suspensjon som inneholder ca. 600 000 sporer pr. cm³.

Denne suspensjon benyttes til poding av det forannevnte medium, hvorpå kolbeinnholdet inkuberes ved 27°C.

Innblåsing av steril luft i væsken gjør det mulig å holde væsken i omrørt tilstand og bevirker en konstant tilførsel av oksygen.

Etter fermentering i 55 timer overføres kolbeinnholdet under aseptiske betingelser til en 100-liters reaksjonsbeholder av metall, hvor det på forhånd er anbragt 60 liter av et sterilt medium som er fremstilt etter følgende resept:

Pepton	0,5	%
Saccharose	4	%
Ammoniumnitrat	0,5	%
Monokaliumfosfat	0,1	%
Kaliumklorid	0,05	%
Magnesiumsulfat	0,05	%
Ferrisulfat	0,002	%
Vann	til 100	%

Kulturen inkuberes i 60 timer ved en temperatur på 28°C i reaksjonsbeholderen under mekanisk røring eller rysting og under konstant lufting. Den resulterende buljong benyttes til poding av 600 liter sterilt medium som er fremstilt i en 1800-liters metallbeholder og har følgende sammensetning:

Saccharose	5	%
Cerelose	0,5	%
Ammoniumnitrat	1	%
Natriumklorid	0,3	%
Magnesiumsulfat	0,25	%
Kaliumklorid	0,03	%
Smultolje	0,1	%
Vann	til 100	%

Kulturen inkuberes deretter 55 timer ved 28°C idet det opprettholdes en konstant kraftig lufting og bevegelse, hvorpå kulturløsningen benyttes til poding av produksjonsmediet.

I en dyrkingsbeholder på 12 m³ som er forsynt med en egnet røre-anordning, dobbelthkappe for regulering av temperaturen, en passende anordning til fordeling av steril luft og en innretning som automatisk sprøyter inn sterilt antiskum-middel dersom dette skulle være nødvendig, fremstilles 6 m³ næringsmedium ved at følgende bestanddeler blandes:

Saccarose	5,5 %
Cerelose	0,5 %
Ammoniumnitrat	1 %
Natriumklorid	0,3 %
Monokaliumfosfat	0,5 %
Magnesiumsulfat	0,25 %
Vann	til 100 %

Mediet steriliseres ved oppvarming i 30 min. til 120°C, hvorpå det avkjøles til 30°C. Mediet podes og inkuberes deretter i 60 timer ved 30°C. Under hele dyrkingstiden foretas røring med en hastighet på 20-40 omdreininger/min., samtidig som det i beholderens nedre del tilføres steril luft i en mengde på 4,8 m³ pr. min. gjennom fordelingsanordningen.

Dyrkingen avbrytes når 90% av karbohydratene er forbrukt. Fusafungininholdet i fermenteringsløsningen utgjør da i gjennomsnitt 0,5-0,8 g pr. liter.

Dyrkingsløsningen filtreres gjennom en filterpresse og innholdet i rammene vaskes med 2 m³ vann, hvorpå kakene delvis tørkes ved innblåsing av komprimert luft. Mycelet blir deretter tørket i 30 timer ved 70°C i en ovn med tvangsmessig luftsirkulasjon og derpå oppmalt. Herved oppnås 88 kg tørt produkt med et innhold på 5,71% fusafungin. Råproduktet blir deretter ekstrahert på følgende måte:

Pulveret suspenderes i 836 liter metanol, tilsettes 44 liter eddiksyrepuffer med pH 4,25 (0,05 molar) og omrøres en time ved værelsestemperatur. For å fraskille det ekstraherte pulver suges metanol-løsningen av, hvorpå den overføres til en fordamper hvor

den inndampes til 200 liter. Deretter tilsettes 100 liter heksan og senere under røring 200 liter vann. Etter røring i 15 min. stilles det hele i ro i 30 min. f r den nedre fase fjernes.

Heksanekstrakten ekstraheres tre ganger, hver gang med 25 liter metanol-vann-blanding (3:1 volumdeler). Metanolblandingen inndampes deretter under redusert trykk til 12,5 liter. Under inndunstingen fordamper metanolen slik at vanninnholdet i løsningen regelmessig tiltar, hvorved fusafunginet utfelles.

Den resulterende suspensjon overføres deretter til en kolbe, som er forsynt med en avstrykningsr rer, og omrøres 48 timer i et isbad. Antibiotikumet isoleres fra morluten ved filtrering gjennom en Büchner-trakt.

Filterkaken vaskes deretter med 5 liter av en blanding av metylalkohol og vann (1:2,5 volumdeler) som på forhånd er avkjølt til 4 C.

Etter tørking i et vakuumt rkeskap oppnås 2,805 kg råprodukt av gr gul farve.

Råproduktet løses i 140 liter vannfri, ikke denaturert metylalkohol og tilsettes deretter 100 g aktivt kull og 100 g filterhj lpemiddel. Etter omrøring i 30 min. fjernes aktivkullet, filterhj lpemidlet og de uløselige forurensninger ved filtrering. Filterkaken vaskes med 14 liter metylalkohol.

Filtratet overføres til en beholder hvor det under røring langsomt tilsettes 200 liter destillert vann som på forhånd er oppvarmet til 70 C. Under fortsatt langsom røring avkjøles forsiktig til ca. 35 C. Krystalliseringen utløses ved tilsetting av noen krystaller rent fusafungin, hvorpå r ringen fortsettes ytterligere 12 timer. Etter 48 timer ved 44 C isoleres krystaller av rent fusafungin ved filtrering. Filterkaken vaskes med 10 liter av en blanding av metanol og vann (1:2 volumdeler) som på forhånd er avkjølt til +4 C, og deretter med 20 liter destillert vann.

1

121390

8

Krystallene tørkes i tørkeskap i vakuum ved 40°C. Herved oppnås 2,110 kg rent antibiotikum.

Dether beskrevne eksempel kan naturligvis utsettes for adskillige forandringer hva fermenteringsbetingelsene og betingelsene for ekstrahering og rensing angår. Löseligheten av fusafungin i vann er praktisk talt null og antibiotikumet finnes konsentrert i mycelet. Fraskilling av mycelet ved filtrering eller sentrifugering for å ekstrahere det virksomme stoff er imidlertid ikke ubetinget nødvendig.

EKSEMPEL 2.

Til 1 liter dyrkingssats, fremstilt som beskrevet i eksempel 1, tilsettes under røring 0,25 liter n-butylalkohol, hvorpå blandingen ved hjelp av en syre bringes til en pH-verdi på 4 ($\pm 0,3$). Røringen opprettholdes deretter i 30 min. ved konstant pH-verdi. Etter 2 timers henstand fjernes den nedre fase.

Det ekstraherte mycel isoleres fra butanolekstrakten ved filtrering i nærvær av et filterhjelpemiddel, som f.eks. "Supercel". Butanolekstrakten blir umiddelbart deretter inndampet under redusert trykk til det oppnås en viskos gulbrun ^{sirup} som inneholder antibiotikumet. "Sirupen" løses i heksan, hvorpå den resulterende løsning ekstraheres 3 ganger med små volumdeler av en vandig alkoholisk blanding som ikke er blandbar med heksan. De alkoholiske ekstrakter samles og inndampes i vakuum til lite volum. Antibiotikumet faller derved ut i form av et gulaktig fast stoff etter hvert som løsningen taper sitt alkoholinhold.

Fusafunginutfellingen når sitt maksimum etter inndamping til 1/5 av det opprinnelige volum og er ved +4°C praktisk talt fullstendig etter 48 timer.

Antibiotikumet oppnås i "rå" tilstand ved filtrering, hvorpå det tørkes i vakuum

EKSEMPEL 3

En dyrkingssats som er fremstilt som angitt i eksempel 1 innstilles på pH 6,5 og ekstraheres med metylisobutylketon eller metyletylketon. Ketonekstrakten fraskilles og inndampes til det oppnås en "sirup" som renses som beskrevet i eksempel 1.

EKSEMPEL 4

En dyrkingssats som er fremstilt som beskrevet i eksempel 1, ekstraheres ved pH 9 med etylacetat eller amylacetat. Det organiske løsningsmiddel fraskilles, vaskes med en pufferløsning som holder pH 4,25 (acetatpuffer) og inndampes til det oppnås en "sirup" som deretter renses slik som beskrevet i eksempel 1.

EKSEMPEL 5

Ved å filtrere dyrkingssatsen uten forutgående endring av pH-verdien kan antibiotikumet holdes tilbake i filterkaken sammen med mycelet, slik at størstedelen av de løselige forurensninger i filtratet kan fjernes. Tilsetning av et filterhjelpemiddel er ikke ubetinget nødvendig.

Filterkaken vaskes, tørkes i en ovn med tvangsmessig luftsirkulasjon og finmales. Det virksomme stoff ekstraheres under anvendelse av ett eller flere av følgende løsningsmidler:

Etylacetat, isoamylacetat, butylacetat, metylalkohol, isopropylalkohol, n-butylalkohol, aceton, metyletylketon, metylisobutylketon, etyleter, isopropyleter, butyleter, benzen, heksan, petroleter, kloroform, karbontetraklorid, metylenklorid, etylendiklorid, etylentriklorid, pyridin o.l.

Alle disse løsningsmidler løser fusafunginet mer eller mindre selektivt og lar en større eller mindre del forurensinger bli tilbake i filterkaken. Den ekstraherte kake fjernes ved filtrering, hvorpå filtratet inndampes til lite volum. Det oppnådde sirupaktige konsentrat løses deretter i heksan eller petroleter, hvorpå det virksomme stoff ekstraheres med en vandig metanolisk blanding slik som beskrevet i eksempel 1.

121390

10

PATENTKRAV:

Fremgangsmåte for fremstilling av antiinflammatorisk og anti-biotisk virkende fusafungin ved submers dyrking av *Fusarium lateritium* Wr (CBS 119.63) i et vanlig næringsmedium under lufttilførsel ved 25-33°C, fortrinnsvis 29-30°C, ved en pH-verdi mellom 4,5 og 7,0, fortrinnsvis på omtrent 6,5, og påfølgende ekstrahering av det dannede antibiotikum ved hjelp av organiske løsningsmidler, k a r a k t e r i s e r t v e d at luften tilføres i en mengde på 0,7 til 0,9 liter luft pr. minutt pr. liter dyrkingsmedium.

Anførte publikasjoner:

Fransk patent nr. 1.164.181

121390

FUSAFUNGIN UTBYTTE
I KILOGRAM

SAMMENLIKNEDE
FORSØK MED FREM-
STILLING AV FUSA-
FUNGIN I AVHEN-
RIGHET AV TIL-
FØRT LUFTMENGDE
7 m³ MEDIUM

