



(12) Ausschließungspatent

(11) **DD 285 793 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

**DEUTSCHES PATENTAMT**

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

---

(21) DD C 12 P / 304 355 0 (22) 30.06.87 (44) 03.01.91

---

(71) siehe (73)

(72) Rudat, Wolf-Rüdiger, Dipl.-Biol.; Röhlig, Rosemarie; Glund, Konrad, Dr. rer. nat.; Pötter, Heinrich, Dr. rer. nat.; May, Rudolf, Dr. rer. nat.; Schlegel, Brigitte, Dr. rer. nat.; Künkel, Waldemar, Dr. rer. nat.; Fleck, Werner, Dr. habil. rer. nat., DD

(73) VEB Arzneimittelwerk Dresden, Wilhelm-Pieck-Straße 35, Radebeul, 9122, DD

---

(54) **Verfahren zur mikrobiellen Gewinnung von Ciclosporinen**

---

(55) Mikrobiologie; Pilzstamm; Stammvarianten; *Cylindrocarpon lucidum*; Wirkstoffgewinnung; zyklisches Peptid; Cyclosporin A; Cyclosporin B; Cyclosporin C; Heilmittel; Humanmedizin

(57) Die Erfindung beschreibt die mikrobiologische Gewinnung der zyklischen Peptida Cyclosporin A, B und C, die durch Einsatz spezieller aus dem Pilzstamm *Cylindrocarpon lucidum* isolierter Varianten in selektiver Weise möglich wird. Das Anwendungsgebiet der Erfindung liegt in erster Linie auf dem Sektor der Humanmedizin, da infolge der chemotherapeutischen und pharmakologischen Eigenschaften der Ciclosporine, insbesondere das Cyclosporin A, diese Verbindung in zunehmenden Maße als Heilmittel von Interesse ist.

### Patentansprüche:

1. Verfahren zur mikrobiellen Gewinnung von Ciclosporinen durch Fermentation des Stammes *Cylindrocarpon lucidum* NRRL 5760 unter Verwendung üblicher Nährlösungsbestandteile, **dadurch gekennzeichnet**, daß man als Impfmateriale durch Selektion erhaltene Varianten des Stammes NRRL 5760 einsetzt und kultiviert.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß man zur Herstellung von Cyclosporin A als Impfmateriale die isolierte Variante „f“ einsetzt und kultiviert.
3. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß man zur Herstellung von Cyclosporin C als Impfmateriale die isolierte Variante „b“ einsetzt und kultiviert.

### Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Herstellung zyklischer Peptide, wobei eine dieser Verbindungen, das Cyclosporin A, durch seine chemotherapeutischen und pharmakologischen Eigenschaften in zunehmendem Maße als Heilmittel von Interesse ist.

Der Wirkstoff Cyclosporin A ist vor allem bei der Therapie solcher Krankheiten des Menschen von Nutzen, bei denen Immunreaktionen eine Rolle spielen. So bezieht sich die Anwendbarkeit auf Autoimmunerkrankungen verschiedenster Art (z. B. Multiple Sklerose, Uveitis, Juvenile Diabetes vom Typ I, Anämie, Psoriasis u. a.), auf die entzündungshemmende Wirkung (z. B. Arthritis und rheumatische Erkrankungen), auf die antiparasitäre Wirkung (z. B. Malaria, Schistosomiasis, Filariasis, Coccidiomykose) und andere Einsatzgebiete.

Das gegenwärtige Hauptanwendungsgebiet ist aber der Einsatz der immunsuppressiv wirkenden Substanz bei Transplantationen verschiedenster Art (z. B. Niere, Herz, Lunge, Knochenmark u. a.) zur Vermeidung der Abstoßungsreaktion für implantierte Gewebe und Organe.

### Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Die Cyclosporine gehören zu einer neuartigen Gruppe von zyklischen Peptiden, die als natürlich vorkommende Stoffwechselprodukte bei Mikroorganismen gefunden und erstmals in den CH-PS 17111-73 bzw. CH-PS 14043-74 erwähnt werden.

Neben den in der Natur vorhandenen Cyclosporinen gibt es des weiteren halbsynthetische Verbindungen, die jedoch im Sinne von therapeutisch relevanten Substanzen bisher noch keine Rolle spielen.

Die bedeutendste Verbindung dieser Stoffgruppe ist das Cyclosporin A (WHO-Name Cyclosporin). Weitere natürlicherweise vorkommende, von Mikroorganismen gebildete Cyclosporine sind z. B. die Verbindungen Cyclosporin B (Ala<sup>2</sup>-Cyclosporin), Cyclosporin C (Thr<sup>2</sup>-Cyclosporin), Cyclosporin D (Val<sup>2</sup>-Cyclosporin) und andere.

Bisher sind folgende Mikroorganismen bekannt, die Cyclosporine zu synthetisieren vermögen:

*Cylindrocarpon lucidum* BOOTH, NRRL 5760  
(DD-PS 115695, 1974)

*Tolypocladium inflatum* GAMS, NRRL 8044  
(DD-PS 115695, 1974)

*Fusarium solani* MARTIUS (Saccardo emend. Synder et Hansen)  
MCI-1549 und MCI-1550  
(JP-Os 55-138523, 1980)

In der erwähnten DD-PS 115695 wird die mikrobielle Gewinnung der Cyclosporine A und B mit Hilfe des Stammes *Cylindrocarpon lucidum* NRRL 5760 beschrieben. Die Gewinnung und Isolierung von Cyclosporin C aus gleichem Stammmaterial bei identischen Kulturbedingungen ist in der CH-PS 141 195 erläutert.

Bei der Charakterisierung des Produzentenstammes NRRL 5760 wird davon ausgegangen, daß es sich bei diesem Stamm um einen neuen, bisher nicht bekannten Vertreter innerhalb der taxonomischen Artbeschreibung für *Cylindrocarpon lucidum* handelt. Wesentliche Begründung für die Abgrenzung des Stammes zur allgemein bekannten Artenkenntnis (vgl.: C. BOOTH, 1966; The Genus *Cylindrocarpon*, Mycological Papers No. 104,21) ist die Beschreibung der Größe der Makrokonidien und die ermittelte Wachstumsgeschwindigkeit einzelner Kolonien auf Kartoffel-Dextrose-Agar.

Zur Gewinnung der einzelnen Cyclosporine aus dem Stamm NRRL 5760 erfolgt das Wachstum des Mikroorganismus in emerser Produktionskultur, d. h. auf der Oberfläche eines flüssigen Nährmediums. Dabei wird der Produzentenstamm 11 Tage bei 27°C inkubiert, anschließend erfolgt die Ernte der Kultur und Aufarbeitung des wirkstoffhaltende Myzels.

Angaben zum anteiligen Gehalt der einzelnen Cyclosporine nach Beendigung der Fermentation zu Beginn der chemischen Aufarbeitung der Kultur sind nicht bekannt.

Eigene Untersuchungen zur Reproduktion der Patentangaben mit Hilfe des Stammes NRRL 5760 bestätigen prinzipiell das bekannte Herstellungsverfahren bezüglich Bildungsvermögen und Nachweis der verschiedenen Cyclosporinverbindungen. Als Nachteil wurden jedoch im Bereich der mikrobiologischen Kulturführung bei einer Reihe von Versuchsansätzen unter konstanten Anzuchtbedingungen auffällige Verfahrensschwankungen registriert. Das zeigte sich neben anderen Parametern insbesondere hinsichtlich der Menge an gebildetem Cyclosporin A. Die in der mikrobiologischen Produktionskultur aufgetretenen Unregelmäßigkeiten führten zudem zu veränderten Bedingungen für die Isolierung und Reinigung des Wirkstoffes, welches somit die Standardisierung des Herstellungsverfahrens allgemein erschwerte.

### Ziel der Erfindung

Die Erfindung hat zum Ziel, ein stabiles, reproduzierbares mikrobiologisches Herstellungsverfahren zu entwickeln, das es gestattet, bei gleichzeitiger Anhebung des biologischen Ausbeuteniveaus der Fermentation das zyklische Peptid Cyclosporin A zu erhalten.

### Charakterlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein technisches Verfahren für den Produzentenstamm NRRL 5760 zu entwickeln, welches die Mängel der eingangs erwähnten, bekannten Lösung beseitigt. Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß man als Impfmateriale durch Selektion erhaltene Varianten des Stammes NRRL 5760 einsetzt und kultiviert. Dabei gelangt zur Herstellung von Cyclosporin A bevorzugt die Variante „f“ und zur Herstellung von Cyclosporin C die Variante „b“ zur Anwendung.

Interessanterweise wurde dabei neben einem leistungsmäßig deutlich verbesserten Stammmaterial – das betrifft vor allem die Synthese der Cyclosporine A und C – auch eine für die Cyclosporin-A-Bildung negative Variante erhalten, die die bekannten Wirkstoffe nur in geringsten Spuren bildet. Auffällig ist, daß diese Variante mehr oder weniger gehäuft auftritt und die Produktausbeute des Ausgangsstammes NRRL 5760, der sich somit als heterogener Stamm erweist, in verschieden ungünstiger Weise beeinflussen kann.

Der Erhalt dieser, sich extrem unterscheidenden Varianten – auch hinsichtlich morphologischer Kriterien – war insofern nicht zu erwarten, da der Stamm NRRL 5760 bisher in keiner Weise als uneinheitlich in der Fachwelt bekannt war. Außerdem war das Auftreten einer morphologischen und physiologischen Variabilität nicht beschrieben, und im vorliegenden Verfahren war keine Beeinflussung des genetischen Ausgangsmaterials, z. B. durch mutagen wirkende Chemikalien, Bestrahlung o. ä. vorgenommen worden.

Die erfindungsgemäß aus dem Stamm NRRL 5760 isolierten und gezüchteten Varianten entsprechen im wesentlichen den Merkmalen der in den genannten Patentschriften bekannten Stammbeschreibung (Wachstumsgeschwindigkeit, Größe der Makrokonidien).

Abweichend und neu ist die makroskopische Beurteilung des Stammes, insbesondere die Charakteristik seiner isolierten Einzelkolonien, die eine unverwechselbare Unterscheidung der Varianten erlauben, welches allerdings auf dem zitierten Kartoffel-Dextrose-Agar kaum, jedoch beispielsweise auf einem Nährmedium, das Kaseinpepton und Glukose enthält, besonders gut gelingt (vgl. Anlage 1, Beschreibung der Varianten).

Darüber hinaus gibt es Unterschiede im Sporulationsverhalten (vgl. Anlage 2). Das entscheidende Kriterium zur Charakterisierung der isolierten Varianten ist jedoch – im Hinblick auf das Herstellungsverfahren – das veränderte Bildungsvermögen für die einzelnen Cyclosporine.

Diese, unter einheitlichen und vergleichbaren Bedingungen der Anzucht erkannte unterschiedliche Synthesefähigkeit der einzelnen Varianten kann damit ausgenutzt werden, sowohl mit dem Ziel einer Ausbeuteerhöhung für die bisher bedeutendste Cyclosporinverbindung, das Cyclosporin A, als auch im Hinblick auf die bewußt vorgenommene Auswahl einer bestimmten Variante unter dem Gesichtspunkt des vorrangigen Erhalts einer besonders gewünschten Cyclosporinverbindung, z. B. das Cyclosporin C, welches ebenfalls immunsuppressive Wirkung zeigt.

Unabhängig davon konnte durch Veränderung des Mediums der Produktionskultur eine allgemeine Erhöhung der Produktausbeute erzielt werden.

Die Isolierung der Varianten erfolgte nach Anzucht des Ausgangsstammes unter aeroben und sterilen Kulturbedingungen auf mehreren Medien mit unterschiedlichen C- und N-Quellen. Die Isolate unterliegen, wie bei mikrobiologischen Verfahren allgemein üblich, vor ihrer Verwendung im Herstellungsverfahren der Produktionskultur einer ständigen Prüfung und gegebenenfalls einer daraus folgenden Selektionsmaßnahme, um sich der Reinheit und Stabilität des biologischen Materials zu versichern.

Die aerobe, emerse Produktionskultur geschieht durch Anzucht einer definierten Sporenmenge, die von einer Stammführung auf festem Medium erhalten und in einem flüssigen, sterilen Nährboden überführt wurde, der bekannte assimilierbare Kohlenstoff- und Stickstoffquellen sowie Mineralsalze und Spurenelemente enthält.

Die Vermehrung des Ausgangsstammes NRRL 5760 bzw. seiner Varianten erfolgt in Erlenmeyerkolben oder Penicillinflaschen bei einer Temperatur zwischen 20°C und 30°C über einen Zeitraum von 7 bis 18 Tagen.

Nach Beendigung der Fermentation erfolgt die Extraktion der Cyclosporine aus der Kultur mit allgemein üblichen Methoden. Die Bestimmung der Cyclosporine wird mittels Dünnschichtchromatographie und HPLC-Analytik im Vergleich mit Standard-Reinstanz durchgeführt.

Folgende Beispiele dienen dazu, die Erfindung im Vergleich zum bekannten Stand der Technik zu erläutern, ohne sie hierauf zu beschränken.

### 1. Ausführungsbeispiel

Sporen des Stammes NRRL 5760, die unter flüssigem Stickstoff aufbewahrt wurden, werden in steriler 0,9%iger NaCl-Lösung suspendiert und auf ein festes Medium übertragen, welches entweder den Extrakt von 100 g geriebener Kartoffeln, 20 g Glukose und 30 g Agar oder 20 g Malzextrakt, 4 g Hefeextrakt und 30 g Agar pro Liter Leitungswasser enthält.

Nach einer Bebrütungsdauer von 10 Tagen bei 27°C und einer Zwischenlagerung der Kultur bei 4°C von mindestens 8–10 Tagen erfolgt die erneute Übertragung des Stammes. Dazu werden die wiederum in 0,9%iger NaCl-Lösung suspendierten Sporen entweder durch Anwendung des Lindnerschen Tröpfchenverfahrens zu Monosporen vereinzelt oder durch Ausplattieren geeigneter Verdünnungen isoliert voneinander auf einem Medium für etwa 3–5 Tage bei 27°C vermehrt, das pro Liter entmineralisiertes Wasser 10 g Kaseinpepton, 20 g Glukose, 1,8 g NaCl und 30 g Agar enthält.

Aus der Menge gewachsener Einzelkolonien werden anschließend vom Ausgangsstamm abweichende Linien isoliert und wiederum auf gleichem Medium getrennt voneinander passagiert. Kulturen, die in dieser Weise geführt werden, sind über mehrere Passagen stabil und stellen das Ausgangsmaterial für die jeweilige Produktionskultur dar.

Bei einer sich im Verlauf der Kultivierung ergebenden phänotypischen Veränderung der Isolate, die meist mit einer Verschiebung des Cyclosporinspektrums einhergeht, sind diese entsprechend oben genannter Beschreibung erneut zu gewinnen.

## 2. Ausführungsbeispiel (Referenzbeispiel)

Penicillinflaschen mit je 700 ml Inhalt einer Nährlösung, die pro Liter entmineralisiertes Wasser 30 g Saccharose, 10 g Maisquellwasser (entspr. etwa 0,6 g Stickstoff), 3 g NaNO<sub>3</sub>, 1 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5 g MgSO<sub>4</sub> × 7 H<sub>2</sub>O, 0,5 g KCl und 0,01 g FeSO<sub>4</sub> × 7 H<sub>2</sub>O enthält, werden mit 7 ml einer Konidien suspension (etwa 5 × 10<sup>7</sup> Konidien pro ml) des Stammes NRRL 5760 beimpft und 14 Tage bei 27°C inkubiert. Das von der Kulturbrühe abgetrennte und mit dem Ultraturax homogenisierte Myzel wird nach Extraktion mit 90%igem Methanol durch Filtration vom Lösungsmittel getrennt und das Filtrat bei Zimmertemperatur zur Trockne eingedunstet. Nach Aufnahme des Rückstandes in einem Gemisch von Acetonitril/Wasser erfolgt die Wirkstoffbestimmung mittels HPLC-Analytik.

Der nachgewiesene Gehalt an Cyclosporin A liegt im Durchschnitt bei 125 mg pro Liter Ansatzvolumen.

## 3. Ausführungsbeispiel

Penicillinflaschen mit je 900 ml bzw. 100 ml Erlenmeyer-Weithalskolben mit je 75 ml Inhalt einer Nährlösung, die – im Gegensatz zum 2. Ausführungsbeispiel – pro Liter entmineralisiertes Wasser 40 g Saccharose, 15 g Maisquellwasser (entspr. etwa 0,9 g Stickstoff), 3 g NaNO<sub>3</sub>, 1 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5 g MgSO<sub>4</sub> × 7 H<sub>2</sub>O, 0,5 g KCl und 0,01 g FeSO<sub>4</sub> × 7 H<sub>2</sub>O enthält, werden mit 9 ml bzw. 0,75 ml einer Konidien suspension (etwa 1–5 × 10<sup>7</sup> Konidien pro ml) des Stammes NRRL 5760 beimpft und 14 Tage bei 27°C inkubiert. Das entsprechend 2. Ausführungsbeispiel aufgearbeitete Myzel ergibt einen Gehalt an Cyclosporin A von durchschnittlich 190 mg pro Liter Ansatzvolumen.

## 4. Ausführungsbeispiel

Die Bedingungen der Kulturführung werden ebenso, wie im 3. Ausführungsbeispiel beschrieben, gewählt, jedoch wird im Gegensatz dazu die entsprechend dem 1. Ausführungsbeispiel isolierte Variante „w“ des Stammes NRRL 5760 eingesetzt. Der ermittelte Gehalt an Cyclosporin A liegt am 14. Kulturtag unter 10 mg pro Liter Ansatzvolumen. Die Cyclosporine B und C konnten im Verlauf der Kultivierung nicht nachgewiesen werden.

## 5. Ausführungsbeispiel

Die Bedingungen der Kulturführung werden ebenso, wie im 3. Ausführungsbeispiel beschrieben, gewählt, jedoch wird im Gegensatz dazu die entsprechend 1. Ausführungsbeispiel isolierte Variante „h“ des Stammes NRRL 5760 eingesetzt. Der Gehalt an Cyclosporin A liegt durchschnittlich bei 110 mg pro Liter Ansatzvolumen. Das Verhältnis der Cyclosporine A, B, C untereinander beträgt etwa 80:10:10.

## 6. Ausführungsbeispiel

Die Bedingungen der Kulturführung werden ebenso, wie im 3. Ausführungsbeispiel beschrieben, gewählt, jedoch wird im Gegensatz dazu die entsprechend 1. Ausführungsbeispiel isolierte Variante „f“ des Stammes NRRL 5760 eingesetzt. Der Gehalt an Cyclosporin A liegt durchschnittlich bei 260 mg pro Liter Ansatzvolumen. Das Verhältnis der Cyclosporine A, B, C untereinander beträgt etwa 85:5:10.

## 7. Ausführungsbeispiel

Die Bedingungen der Kulturführung werden ebenso, wie im 3. Ausführungsbeispiel beschrieben, gewählt, jedoch wird im Gegensatz dazu die entsprechend 1. Ausführungsbeispiel isolierte Variante „b“ des Stammes NRRL 5760 eingesetzt. Der Gehalt an Cyclosporin A liegt durchschnittlich bei 130 mg pro Liter Ansatzvolumen, der Gehalt an Cyclosporin C jedoch durchschnittlich bei 300 mg pro Liter Ansatzvolumen. Cyclosporin B wird nur in Spuren unter 10 mg pro Liter Ansatzvolumen gebildet, d. h., das Verhältnis der Cyclosporine A und C untereinander beträgt etwa 30:70.

**Anlage 1****Beschreibung des Phänotyps der aus dem Stamm NRRL 5760 isolierten Varianten (Einzelkolonie)**

Variante „f“	flach, im Zentrum punktförmig erhaben, Myzel dünnwollig, grau-beige, Unterseite orangefarben mit hellem Rand
„b“	flach, fein strukturierte Oberfläche, ohne wolliges Luftmyzel, Färbung kreisförmig abgestuft von grau-beige bis rosa-orange, Unterseite rosa-orange, heller Rand
„w“	hutartig erhaben mit flach auslaufendem Rand, wolliges Luftmyzel, reir weiß, Unterseite hellgrau-braun
„h“	flach, radiale Furchen, im Zentrum kreisförmig gefaltet, feinwollig, weiß bis hellbeige, Unterseite hellbraun-beige

**Anzuchtmedium: (Angaben pro Liter)**

20g Glukose, 10g Kaseinpepton, 1,8g NaCl und 30g Fadenagar

**Anlage 2**

**Tabelle: Konidienbildung isolierter Varianten des Stammes NRRL 5760 nach 7 Kulturtagen bei 27°C**

Stammaterial	Konidienzahl pro Kolonie	Konidienzahl pro cm <sup>2</sup> Kolonie
NRRL 5760	$3,3 \times 10^8$	$1,1 \times 10^7$
Variante „f“	$3,5 \times 10^8$	$1,1 \times 10^7$
„b“	$2,3 \times 10^8$	$1,0 \times 10^7$
„w“	$1,5 \times 10^7$	$5,7 \times 10^5$
„h“	$1,5 \times 10^6$	$7,4 \times 10^4$

**Anzuchtmedium: siehe Anlage 1**