

PATENT-SCHRIFT 141 036

Ausschließungspatent

Erteilt gemäß § 5 Absatz 1 des Änderungsgesetzes zum Patentgesetz

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(11)	141 036	(44)	09.04.80	Int. Cl. ³ 3 (51)	C 12 P 7/40
(21)	AP C 12 D / 203 108	(22)	05.01.78		
(31)	779 670	(32)	21.03.77	(33)	US

(71) siehe (73)

(72) Queener, Stephen W.; Nash III, Claude H., US

(73) Eli Lilly and Company, Indianapolis, US

(74) Patentanwaltsbüro Berlin, 113 Berlin, Frankfurter Allee 286

(54) Verfahren zur Herstellung von Mycophenolsäure

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Mycophenolsäure auf fermentativem Wege durch Züchten eines Mycophenolsäure erzeugenden Penicillinstammes in einem assimilierbaren Quellen für Kohlenstoff, Stickstoff und anorganische Salze enthaltenden Nährmedium unter submers aeroben Bedingungen. Ziel der Erfindung ist die Bereitstellung eines Verfahrens zur Herstellung von Mycophenolsäure, das höhere Ausbeuten als bisher liefert. Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, Penicillinstämme zu finden, mit der die gewünschte Verbesserung erzielt werden kann. Zur Lösung dieser Aufgabe wird erfindungsgemäß als Penicillinstamm *Penicillium stoloniferum*, vorzugsweise *Penicillium stoloniferum* NRRL 11078, verwendet.



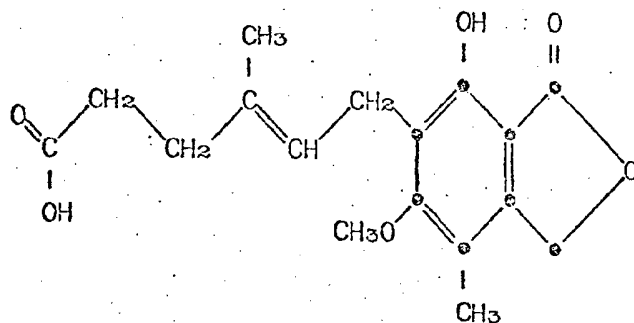
Anwendungsgebiet der Erfindung:

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von Mycophenolsäure, auf fermentativem Wege durch Züchten eines Mycophenolsäure erzeugenden Penicilliumstammes in einem assimilierbaren Quellen für Kohlenstoff, Stickstoff und anorganische Salze enthaltenden Nährmedium unter submers aeroben Bedingungen bis zur Erzeugung einer erheblichen Menge an Mycophenolsäure.

Charakteristik der bekannten Lösungen:

Bei der üblichen Arbeitsweise zur Verbesserung der Ausbeute an von einem Mikroorganismus erzeugten sekundären Metaboliten wird (1) der Mikroorganismus einem mutagenen Mittel ausgesetzt, und werden (2) Zufallsüberlebende auf erhöhte Titer des Sekundärmetaboliten geprüft und entsprechend eingeteilt. Die zweite Stufe erfordert eine Einzelfermentation jedes überlebenden Isolats, was sehr aufwendig und zeitraubend ist.

Mycophenolsäure hat folgende Struktur:



Mycophenolsäure (MPA) ist eine Verbindung mit mehreren wertvollen biologischen Wirkungen. Sie ist ein Mittel gegen Viren, ein Antitumormittel und gleichzeitig ein antifungales und antibakterielles Mittel. Von Mycophenolsäure ist außerdem berichtet worden, daß sie sich für die Behandlung von Psoriasis eignet.

Mycophenolsäure wird von vielen Species des Genus *Penicillium* erzeugt, zum Beispiel von *P. brevi-compactum*, *P. Stoloniferum*, *P. scabrum*, *P. nagemi*, *P. szaferei*, *P. patus-mei*, *P. grisco-brunneum* und *P. viridicatum*.

Es konnte gezeigt werden, daß bei der Biosynthese von Mycophenolsäure durch *Penicillium*species sowohl der Phenolkern als auch die siebengliedrige Seitenkette von MPA aus Acetat-einheiten gebildet werden (A.J. Birch et al., J. Chem. Soc. 1958, S. 369-375). Die Seitenkette von MPA entsteht durch Einführung eines C₁₅-Terpens, vermutlich Farnesylpyrophosphat (FPP), und anschließende oxidative Spaltung an der Doppelbindung des FPP-Teils [L. Canonica et al., J. Chem. Soc. Perkins Trans. I. 21, S. 2639-2653 (1972)]. FPP dient auch als ein Vorläufer von Sterinen, zum Beispiel Ergosterin, einem wichtigen Bestandteil von Fungalmembranen.

Es ist bekannt, daß Polyenantibiotika, wie Nystatin, Filipin und Amphotericin B, durch Eingehen einer Verbindung mit dem Ergosterin in Fungalmembranen eine toxische Wirkung auf Fungi ausüben [J. M. T. Hamilton-Miller, Adv. Appl. Microbiol. Bd. 17, S. 109-134 (1974)]. Der Primärmechanismus der Resistenz gegen Polyenantibiotika entwickelt sich in Fungi durch genetische Unterbrechung der Biosynthese von Ergosterin, wobei Sterine mit geringerer Affinität zur Polyenantibiotika erzeugt werden. Diese Sterine bilden dann Fungalmembranen mit veränderten Durchlässigkeitseigenschaften. Zu einer anderen möglichen Klasse von polyenresistenten Mutanten gehören diejenigen, die Ergosterin überproduzieren, wodurch sie die Antibiotika entgiften, ehe diese die Membran erreichen [W. A. Zygmunt und P.A. Tavormina, Appl. Microbiol. Bd. 14, S. 865-869 (1966)]. Zwei Klassen von polyenresistenten Mutanten könnten Mycophenolsäure durch eine Überproduktion von FPP überproduzieren: (1) solche, bei denen die Synthese von FPP normal ist, aber die Synthese von Ergosterin nach der von FPP blockiert wird und (2) solche, die FPP und Ergosterin überproduzieren.

Ziel der Erfindung :

Alle bekannten Verfahren zur Herstellung von Mycophenolsäure haben nun jedoch den Nachteil, daß sie von Penicilliumstämmen ausgehen, die diese Säure nicht in der an sich gewünschten hohen Ausbeute ergeben. Ziel der Erfindung ist daher die Bereitstellung eines neuen Verfahrens zur Herstellung von Mycophenolsäure, das von Penicilliumstämmen ausgeht, welches die gewünschte Säure in einfacher Weise in hoher Ausbeute produziert.

Darlegung des Wesens der Erfindung:

Zur wirksamen Erzielung von verbesserten Mycophenolsäure bildenden Mutanten von Penicillium wird zunächst eine Mutation der Mycophenolsäure erzeugenden Penicilliumspecies durchgeführt, die mutierte Population einem Polyenantibiotikum ausgesetzt und die gegen das Polyenantibiotikum resistenten Mutanten auf ihre Mycophenolsäureerzeugung geprüft. Durch diese Art der Arbeitsweise werden Zeit und Aufwand erheblich verringert, die normalerweise zur Erzielung von Mutanten mit verbessertem Mycophenolsäuretitert erforderlich sind. Hierbei zeigt sich, daß Mutanten mit erhöhtem Mycophenolsäureerzeugungsvermögen bei einem hohen Grad der Häufigkeit aus Populationen von gegen Polyenantibiotika resistenten (PAR) Mutanten von Penicilliumspecies erhalten werden können. Dieser Grad der Häufigkeit ist höher als der derjenigen der mit zufällig ausgewählten Kolonien erreicht werden kann. Das Polyenantibiotikum verändert offenbar den Metabolismus von Sterinvorläufern, z. B. FPP, in den resistenten Mutanten, wodurch die Mycophenolsäuretitert erhöht werden. Polyenantibiotika sind bisher noch nicht zur Beeinflussung des Metabolismus von FPP in Fungi eingesetzt worden, um die Titer von Metaboliten, die sich von FPP ableiten, wie MPA, zu erhöhen. Es lassen sich hierdurch somit Penicilliumstämmen gewinnen, die mehr Mycophenolsäure bilden als ihre Elternstämmen, da hierbei die Zahl an Stämmen beträchtlich vermindert wird, die geprüft werden müssen, damit eine Ausbeutesteigerung erzielt wird, was im Gegensatz zu dem Standard-

vorgehen steht, wobei zeitraubende Zufallsprüfungen von mutierten Populationen von *Penicillium*kulturen durchgeführt werden müssen.

Die für ein solches Verfahren geeigneten Stämme von *Penicillium*species sind solche, die Mycophenolsäure erzeugen und gegenüber Polyenantibiotika empfindlich sind. Diese Stämme werden als Elternstämme eingesetzt, von denen PAR-Stämme erhalten werden.

In der ersten Stufe eines derartigen Verfahrens werden die Conidienpopulationen des *Penicillium*stamms mit einem mutagenen Mittel unter Anwendung üblicher Arbeitsweisen mutiert. Zu Beispielen für geeignete mutagene Mittel gehören N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin, Ethylmethansulfonat, salpetrige Säure und Ultraviolettlicht. Bei Verwendung eines chemischen mutagenen Mittels sollten die behandelten Zellen durch Waschen von dem mutagenen Mittel befreit werden.

Die zweite Stufe dieses Verfahrens besteht in der Gewinnung der gegen Polyenantibiotika resistenten Mutanten. Hierzu können verschiedene Arbeitsweisen angewandt werden. Eine bevorzugte Methode ist jedoch die folgende: Die behandelten Zellen werden mit einem zum Suspendieren geeigneten Medium verdünnt. Ein aliquoter Anteil der Zellsuspension wird aseptisch auf eine poröse Membran filtriert (etwa 1×10^5 Zellen/Membran).

Die Membranen werden auf Nährstoffkissen aufgebracht, die mit einem flüssigen Medium gesättigt sind, und über Nacht bei 20 bis 30 °C zur Ermöglichung einer Ausprägung inkubiert. Die Membranen werden dann auf andere Nährstoffkissen übertragen, die mit dem gleichen Medium gesättigt sind, das jedoch ein Polyenantibiotikum, wie Nystatin oder Filipin, in verschiedenen Konzentrationen enthält. Beispiele für die angewandten Konzentrationsbereiche sind 10-100 mcg/ml Nystatin und 5-50 mcg/ml Filipin. Die Membranen werden bei 20 bis 25 °C inkubiert, bis Nadelspitzenkolonien zu beobachten sind.

Klone werden von Membranen mit nicht mehr als 20 Klonen/Membran isoliert. Diese Stämme werden auf Schrägen aus einem mit 1,5 % Agar verfestigten flüssigen Nährmedium erhalten und werden später erneut auf den Grad ihrer Resistenz gegen das Polyenantibiotikum geprüft, dem sie ausgesetzt worden waren. Stämme der zweiten Generation werden von resistenten Stämmen erhalten, die erneut mutiert und wie oben beschrieben behandelt wurden, wodurch Mutanten gewonnen werden, die gegen noch höhere Konzentrationen der Polyenantibiotika resistent sind.

Die so erhaltenen PAR-Mutanten werden dann nach üblichen Arbeitsweisen auf ihre Mycophenolsäureproduktion geprüft. Beispielsweise kann folgendermaßen vorgegangen werden: Die Mutanten werden auf Schrägen aus mit 1,5 % Agar verfestigtem flüssigem Nährmedium gehalten. Ein bestimmtes gleichbleibendes Volumen der so erhaltenen Zellen wird in ein definiertes Fermentationsmedium /(W. L. Muth et al. Antimicrob. Agents Chemotherap. Bd. 8, S. 321 (1975)/ geschabt und 4 bis 6 Tage bei etwa 25 °C auf einer Drehschüttelvorrichtung mit 250 bis 285 U/Minute inkubiert. Die erhaltene Gärmaische wird zum Lösen der MPA auf einen pH-Wert von 8 eingestellt. Gepufferte Proben werden mit Chloroform in einem Verhältnis von 1 : 10 vermischt. Die Chloroformphase wird abgetrennt und auf einem Ultraviolett-spektrophotometer bei 304 nm untersucht.

Hohe Gehalte an Mycophenolsäure werden durch übliche Methoden der Isolierung und Identifizierung nach anschließend durchgeführten Fermentationen bestätigt.

Durch Anwendung des oben erläuterten Selektions- und Züchtungsverfahrens lassen sich nun in einfacher Weise *Penicillium*-stämme auffinden und züchten, die in besonders hoher Ausbeute Mycophenolsäure ergeben. Bei diesen *Penicillium*stämmen handelt es sich um *Penicillium stoloniferum*, insbesondere *Penicillium stoloniferum* NRRL 11078.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung von Mycophenolsäure der eingangs genannten Art ist daher dadurch gekennzeichnet, daß hierbei als Penicilliumstamm *Penicillium stoloniferum*, insbesondere *Penicillium stoloniferum* NRRL 11078, verwendet wird.

Zur Züchtung des verbesserten Stamms *P. stoloniferum* NRRL 11078 können die verschiedensten Kulturmedien verwendet werden. Für die Erzeugung von Mycophenolsäure allgemein verwendete Medien sind allgemein bekannt (verbleiche zum Beispiel W. L. Muth et al., Antimicrob. Agents Chemotherap. Bd. 8, S. 321 - 327 (1975); R. H. Williams et al., Antimicrobial Agents Chemotherap. 1968, S. 229 - 233 und GB-PS 1 158 387 und 1 157 099). Geeignete Kulturmedien enthalten assimilierbare Quellen für Kohlenstoff, Stickstoff und anorganische Salze. Die Fermentation wird unter aeroben Fermentationsbedingungen in an sich bekannter Weise fortgeführt, bis eine erhebliche Menge Mycophenolsäure gebildet ist. Zur Bestimmung der Spitze der Mycophenolsäureerzeugung kann die MPA-Bildung durch mehrere verschiedene Maßnahmen überwacht werden. Bei einer bevorzugten Maßnahme wird einfach eine Probe entnommen und das Ultraviolettabsorptionsmaximum der Mycophenolsäure bei 304 nm, wie bereits beschrieben, ermittelt.

Ausführungsbeispiel

Die Erfindung wird durch das folgende Beispiel weiter erläutert.

B e i s p i e l

Zur Gewinnung der gegen Polyenantibiotika resistenten Mutanten wird *Penicillium stoloniferum* Stamm NRRL 859 als Elternstamm verwendet. Konidienpopulationen von 2 bis 3×10^6 Zellen/ml werden 10 Minuten mit N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin in einer

Endkonzentration von 1,0 mg/ml in 0,05 m tris(Hydroxymethyl)-aminomethan-(Tris, Fisher Scientific)-Puffer-0,05 m Maleinsäure, pH 8,0, behandelt. Hierdurch wird eine Abtötung von 90 % erzielt. Die behandelten Zellen werden durch Waschen mit einer Salzlösung, die Polyoxyethylen(20)sorbitanmono-oleat (Tween 80) enthält, von dem mutagenen Mittel befreit. Die gewaschenen Zellen werden in 30 ml eines Mediums mit folgender Zusammensetzung suspendiert:

<u>Bestandteil</u>	<u>Menge (%)</u>
NaCl	0,85
Tween 80	0,02
K ₂ HPO ₄	0,35

entionisiertes Wasser; Einstellung des pH-Werts auf 6,5 mit konzentrierter HCl

Anteile der Zellsuspension von je 2,5 ml werden aseptisch auf Celluloseester-Membranfilter (Millipore Corp., Bedford, Mass. 01730 USA, Durchmesser 47 mm, Porengröße 0,45 µ; HAWGO4700 etwa 1×10^5 Zellen/Membran) filtriert.

Die so erhaltenen Membranen werden auf absorbierende Cellulose-Kissen (Millipore Corp., AP10-04750) aufgebracht, die mit 2 ml eines flüssigen Nährmediums der folgenden Zusammensetzung gesättigt sind:

<u>Bestandteil</u>	<u>Menge (%)</u>
Glucose	1,00
Casein, säurehydrolysiert	0,50
Hefeextrakt	0,20
NH ₄ Cl	0,10
KH ₂ PO ₄	0,54
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,04
CaCO ₃	0,04

Leitungswasser; Einstellung des pH-Werts auf 6,5 mit 50-prozentiger NaOH vor dem Sterilisieren

Die Membranen auf den Kissen werden über Nacht bei 23 °C inkubiert. Dann werden die Membranen auf andere Nährstoffkissen überführt, die mit dem gleichen Nährmedium gesättigt sind, das jedoch Filipin und Nystatin in verschiedenen Konzentrationen enthält. Es werden folgende Konzentrationen angewandt:

Filipin 10-25 mcg/ml

Nystatin 20-70 mcg/ml

Die Membranen werden bei 23 °C inkubiert, bis nadelspitzengroße Kolonien erscheinen. Von denjenigen Membranen, die nicht mehr als 20 Klone/Membran tragen, werden Klone isoliert. Diese Stämme werden auf Schrägen aus dem gleichen, mit 1,5 % Agar verfestigten Nährmedium erhalten und werden später erneut untersucht, um den Grad ihrer Resistenz gegen das Polyenantibiotikum zu bestimmen, mit dem sie behandelt worden waren. Es werden 45 PAR-Stämme selektioniert. 21 dieser Stämme werden in Schüttelkolben auf MPA-Erzeugung geprüft. Einer dieser Stämme, NRRL 11078, ist gegen 15 mcg/ml Filipin resistent und erzeugt erheblich mehr Mycophenolsäure als der Elternstamm. Die bei drei Fermentationen erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle I zusammengestellt.

T a b e l l e I

maximaler Mycophenolsäure-Titer (mg/ml)

	Elternstamm		Mutante		Fermentations- dauer (Tage)
	NRRL 859		NRRL 11078		
Test 1	1,23		1,85		6
Test 2	1,78 ± 0,13		1,96 ± 0,03		6
Test 3	0,69 ± 0,08		0,87 ± 0,09		4

203108

Erfindungsansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von Mycophenolsäure auf fermentativem Wege durch Züchten eines Mycophenolsäure erzeugenden Penicilliumstammes in einem assimilierbare Quellen für Kohlenstoff, Stickstoff und anorganische Salze enthaltenden Nährmedium unter submers aeroben Bedingungen bis zur Erzeugung einer erheblichen Menge an Mycophenolsäure, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß als Penicilliumstamm Penicillium stoloniferum verwendet wird.
2. Verfahren nach Punkt 1, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß als Penicilliumstamm Penicillium stoloniferum NRRL 11078 verwendet wird.