[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200480030382.7

[51] Int. Cl.
C12N 1/20 (2006.01)
C12P 17/18 (2006.01)
A61K 31/535 (2006.01)
C12R 1/465 (2006.01)

[43] 公开日 2006 年 11 月 22 日

[11] 公开号 CN 1867664A

[22] 申请日 2004.10.15
[21] 申请号 200480030382.7
[30] 优先权
[32] 2003.10.17 [33] IN [31] 1284/DEL/2003
[86] 国际申请 PCT/IB2004/003380 2004.10.15
[87] 国际公布 WO2005/038009 英 2005.4.28
[85] 进入国家阶段日期 2006.4.17
[71] 申请人 兰贝克赛实验室有限公司
地址 印度新德里
[72] 发明人 P·库马 S·沙尔玛 A·舒克拉
S·库马 R·K·莫瑞艾
V·卡蒂尔 A·米特拉
P·吉格拉斯

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司
代理人 范 征

权利要求书 2 页 说明书 11 页

[54] 发明名称

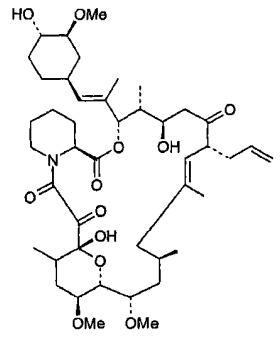
使用新的链霉菌菌种生产他克莫司(FK－506)

[57] 摘要

本发明涉及一种新的微生物淡青链霉菌 MTCC 5115 和一种利用该新微生物淡青链霉菌 MTCC 5115 生产免疫抑制剂他克莫司(FK－506)的方法。 本发明还涉及含有他克莫司(FK－506)的药物组合物和该组合物治疗或预防器官或组织如心脏、肾、肝、骨髓、皮肤等的移植排斥的用途。

1．分离的微生物淡青链霉菌 MTCC 5115（*Streptomyces glaucescens* MTCC 5115）。

2．用于生产式 I 的他克莫司（FK-506）的发酵方法：



式 I

该方法包括使用分离的淡青链霉菌 MTCC 5115。

3．生产他克莫司的方法，该方法包括在浸没的需氧发酵条件下在含水营养培养基中培育淡青链霉菌 MTCC 5115 菌株或其变体，和从所述培养基分离他克莫司的步骤。

4．如权利要求 3 所述的方法，其特征在于，所述营养培养基含有碳源、氮源和矿物盐中的一种或多种。

5．如权利要求 4 所述的方法，其特征在于，所述碳源是碳水化合物培养基。

6．如权利要求 5 所述的方法，其特征在于，所述碳水化合物源包括葡萄糖、木糖、半乳糖、甘油、右旋糖、淀粉、糊精、麦芽糖、聚乙二醇、大豆油、鼠李糖、棉子糖、阿拉伯糖、甘露糖、水杨苷和琥珀酸钠中的一种或多种。

7．如权利要求 4 所述的方法，其特征在于，所述氮源包括酵母抽提物、大豆蛋白胨、大豆粉、棉籽粉、玉米浆、小麦蛋白胨、玉米麸、奶粉、麦芽中的一种或多种。

8．如权利要求 4 所述的方法，其特征在于，所述矿物盐包括钙盐、镁盐、钠盐、钴盐、铜盐和钾盐中的一种或多种。

9．如权利要求 4 所述的方法，其特征在于，所述营养培养基还含有消泡剂。

10．如权利要求 3 所述的方法，其特征在于，在发酵期间，温度维持为约

20℃到约 40℃。

11. 如权利要求 10 所述的方法，其特征在于，所述温度维持在约 24℃到约 35℃。

12. 如权利要求 3 所述的方法，其特征在于，发酵期间，pH 维持为约 6.0-8.0。

13. 如权利要求 12 所述的方法，其特征在于，pH 维持为约 6.8-7.5。

14. 如权利要求 3 所述的方法，其特征在于，所述营养培养基是液体培养肉汤。

15. 如权利要求 3 所述的方法，其特征在于，所述他克莫司的分离包括过滤、离心、浓缩、减压下浓缩、冻干、酸化、用适当溶剂抽提、用吸附剂处理、用树脂处理、纯化和结晶中的一种或多种。

16. 如权利要求 15 所述的方法，其特征在于，所述方法还包括再结晶所分离的他克莫司。

17. 如权利要求 16 所述的方法，其特征在于，还包括将所获得的产物制成完成的剂型形式。

18. 一种治疗或预防温血动物中器官或组织的移植排斥的方法，该方法包括，向该温血动物提供含有采用权利要求 3 所述的方法获得的他克莫司的剂型。

19. 如权利要求 18 所述的方法，其特征在于，所述器官或组织是心脏、肾、肝、骨髓和皮肤。

20. 一种药物组合物，其特征在于，该组合物含有治疗有效量的采用权利要求 3 所述的方法获得的他克莫司（FK-506）和一种或多种药学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂。

使用新的链霉菌菌种生产他克莫司（FK-506）

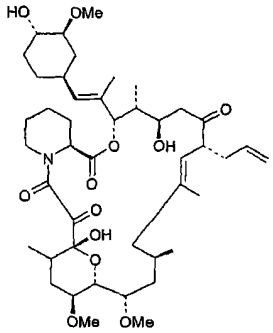
发明领域

本发明涉及新的微生物淡青链霉菌（Streptomyces glaucescens） MTCC 5115 和使用该新的微生物淡青链霉菌 MTCC 5115 制备免疫抑制剂他克莫司（tacrolimus，FK-506）的方法。本发明还涉及包含他克莫司（FK-506）的药物组合物，以及使用该组合物治疗或预防器官或组织如心脏、肾、肝、骨髓、皮肤等的移植排斥。

发明背景

最近已使用各种大环内酯化合物作为免疫抑制剂，用于预防骨髓和器官移植中的移植排斥，以及用于治疗各种自身免疫疾病。广泛接受的一种用于预防移植排斥的免疫抑制剂是环孢霉素。虽然环孢霉素被广泛用于免疫抑制治疗，但是其使用（尤其是较高浓度）常常伴随着副作用，如肾中毒性、肝中毒和中枢神经系统疾病。

考虑到这些，人们在不断寻找较新的更安全的具有较少副作用和更有效的药物。结果，已发现新的化合物如雷帕霉素及其衍生物子囊霉素或合成性类似物（总称为子囊霉素类（ascomycin））可用作免疫抑制剂。在子囊霉素类中，FK-506，通常称为式 I 的他克莫司被证明是有效的免疫抑制剂。



式 I

此外，已显示他克莫司及其衍生物能有效治疗大量的疾病，如哮喘（PCT

专利申请 WO 90/14826）、炎症和高增殖性皮肤病和免疫诱导疾病的皮肤表现（欧洲专利 315978）。尽管其在预防移植排斥方法的极大用途和较高有效性，他克莫司的生产仍存在自身的缺陷，如由于在生产过程中存在几种相关化合物而导致的低产率。

在如美国专利 4894366、5116756、5264355、5496727 和 5624842 中已报道了几种生产他克莫司的方法。通常，这些方法涉及使用链霉菌物种的各种菌株来生产他克莫司。

由这些报道的方法获得的产物中仍存在几种不需要的相关化合物。为了增加他克莫司的产率，同时减少发酵过程中产生的几种相关的杂质，我们着手分离了链霉菌菌种的一种新的能生产他克莫司的菌株。我们惊讶地发现，该新菌株在生物转化过程中仅仅产生少量的相关化合物。

发明内容

在一个总的方面提供一种新的微生物，淡青链霉菌 MTCC 5115，为生物纯形式。

在另一总的方面提供一种新的微生物，淡青链霉菌 MTCC 5115，它能通过发酵生产他克莫司。所制得的化合物具有并显示出 EPO 出版物 0184162 所述的他克莫司（FK-506）的所有物理和化学性质。

在另一总的方面提供一种生产免疫抑制剂他克莫司的方法。该方法包括使用常规方法在浸没的需氧发酵环境下、在含有氮营养物的含水碳水化合物培养基中培育淡青链霉菌 MTCC 5115 株足够长的时间、以产生产物他克莫司的步骤。

在另一方面提供一种药物组合物，该组合物包含治疗有效量的他克莫司，和一种或多种药学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂。

下文将详细描述本发明的一个或多个实施方式。基于说明书和权利要求书，本发明其它的特征、目的和优点将变得明显。

发明详述

本发明者发现了一种新的微生物，淡青链霉菌 MTCC 5115，它从收集自

印度的 Narnaul（Haryana）的土壤样品中分离得到。

从收集自印度的 Narnaul，Haryana 的土壤样品中分离得到的淡青链霉菌已依布达佩斯条约保藏在印度 Chandigarh 的微生物典型培养物保藏中心（MTCC），保藏号是 MTCC 5115。

本发明者还发现，该新微生物淡青链霉菌 MTCC 5115 能在适当的发酵条件下高度生产他克莫司，而在生物转化过程中仅获得少量的不需要的相关化合物。

淡青链霉菌 MTCC 5115 具有下述形态学、培养、生物学和生理学特征。

（A）淡青链霉菌 MTCC 5115 的形态学和培养特征

采用 Becker 等的方法进行细胞壁分析。对菌株的全部全部水解产物进行分析，显示存在 LL-二氨基庚二酸。因此，据信该菌株的细胞壁为 I-型（Becker, B. 等，应用微生物学，12，421-423，1964）。

根据 Shirling & Gottlieb （Shirling E.B.和 D. Gottlieb，International Journal of Systemic Bacteriology，16，313-340，1966）描述的方法进行形态学观察。使培养物在 28℃在酵母抽提物麦芽汁琼脂（YMA）上生长 11 天。发现孢子链形态是螺旋形/视网膜型，基内菌丝体为灰白色，气生菌丝体为灰橙色。集落不透明，中间凸起，边缘不规则，粗糙且稠度高。

菌株的显微镜研究和细胞壁分析揭示，该菌株属于链霉菌属。但是，结果显示新的分离物和已知的他克莫司（FK-506）生产者之间完全不同（表 1 和 2）。

在几种固体培养基上（如燕麦粉琼脂、YMA、自来水琼脂、基础矿物质琼脂、无机盐淀粉矿物质琼脂、甘油天冬酰胺琼脂和 Czapek 琼脂）观察培养特征。在 28℃培育培养物 11 天。在 Czapek 琼脂、营养琼脂、马铃薯右旋糖琼脂和葡萄糖天冬酰胺琼脂上该培养物显示出非常好的生长。在基础矿物质琼脂、自来水琼脂和燕麦粉琼脂上，其生长不足。在 YMA 上观察到可溶的色素的产生，这与他克莫司（FK-506）的已知生产者 Merck ATCC 55098 的情况不同。淡青链霉菌 MTCC 5115 的营养菌丝体的颜色从白色到灰白色，而 FK-506 的另一生产菌株津岛链霉菌 9993（*Streptomyces tsukubaensis* 9993）的颜色则从浅桃红色到红橙色到浅褐色（表 1 和 2）。

表 1

淡青链霉菌 MTCC 5115 与已知的 FK-506 生产者的比较形态学和培养特征

系列号	试验	菌株		
		淡青链霉菌 MTCC 5115	津岛链霉菌 9993	链霉菌 ATCC 55098 株
1	细胞壁氨基酸	LL-DAP	LL-DAP	LL-DAP
2	细胞壁糖类	无特征糖类	无数据	葡萄糖
3	细胞壁类型	1 型	1 型	1 型
4	孢子链形态学	螺旋形/视网膜形	直的可弯曲的	直链
5	气生菌丝体（YME，20 天）	灰橙色	浅灰色	黄白色
6	可扩散的色素	淡黄色	暗的红橙色	阴性
7	产生的可扩散的色素	阳性	阳性	阴性
8	颜色系列	灰白色	灰色	白色或黄色
9	革兰氏反应	革兰氏阳性	革兰氏阳性	革兰氏阳性
10	酸快速染色	阴性	无数据	无数据

表 2

淡青链霉菌 MTCC 5115 的生物学和生理学特征

系列号	试验	菌株		
		淡青链霉菌 MTCC 5115	津岛链霉菌 9993	链霉菌 ATCC 55098 株
1	黑色素	阳性	阳性	阴性
2	硝酸盐减少	阴性	阴性	无数据
3	在 7%NaCl 中的生长	阴性	<=3%	无数据
4	黄嘌呤	阳性	无数据	无数据
5	最佳生长温度	28℃	28℃	27℃

（B）淡青链霉菌 MTCC 5115 的生物学和生理学特征

结果显示在表 2 中。在淡青链霉菌 MTCC 5115 中，类黑素色素形成是阳性的，而在较早知道的 FK-506 的生产者中是阴性的。在 YMA 上生长的温度范围为 22-35℃，最佳温度是 28℃。

与已知的 FK-506 生产菌株相比，MTCC 5115 的糖利用模式显示易于利用果糖、半乳糖、葡萄糖、甘露糖醇、蔗糖；鼠李糖的利用少，不利用阿拉伯糖、m-肌醇、棉子糖、水杨苷和木糖（表 3）。淡青链霉菌 MTCC 5115 有节制地利用苯丙氨酸和脯氨酸，但容易地利用组氨酸。

表 3

淡青链霉菌 MTCC 5115 的糖利用模式*

系列号	糖类	菌株		
		淡青链霉菌 MTCC 5115	津岛链霉菌 9993	链霉菌 ATCC 55098 株
1	阿拉伯糖	阴性	阴性	差阳性
2	果糖	阳性	阴性	适度利用
3	半乳糖	阳性	阴性	无数据
4	葡萄糖	阳性	不确定	适度
5	内消旋肌醇（meso-inositol）	阴性	阴性	阴性
6	甘露糖醇	阳性	阴性	少利用
7	棉子糖	阴性	阴性	少利用
8	鼠李糖	弱阳性	阴性	少利用
9	水杨苷	阴性	不确定	无数据
10	蔗糖	阳性	不确定	阴性
11	木糖	阴性	阴性	阴性

*Pridham, T.G.和 Gottlieb D.；“The utilization of carbon compounds by some Actinomycetales as an aid for species determination”，*J. Bacteriology* 56，107-117，1948。

各种形态学、生物学和生理学特征的比较显示，淡青链霉菌 MTCC 5115 与较早的已知的 FK-506 生产者不同。淡青链霉菌 MTCC 5115 的 16s rDNA 的限制片段分析与已知的 FK-506 生产者（津岛链霉菌 9993）比较显示出清楚的剪切不同，从而进一步证实前者是一种不同的菌株。

因此，根据公开的描述（Bergy's Manual of Determinative Bacteriology，第 8 版，1974）将此菌株与各种链霉菌菌种相比。比较的结果是，淡青链霉菌 MTCC 5115 被认为与淡青链霉菌更相似。

本发明者还开发了使用这种新的微生物淡青链霉菌 MTCC 5115 来生产他克莫司的方法。该方法还包括使用该菌株的能够生产他克莫司物质的任一突变体/变体，包括天然的以及人工培养的突变体，后者可通过采用常规的方法如辐照 UV、X 光、γ射线和用 N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍（NTG）、甲磺酸乙酯（EMS）、甲磺酸甲酯（MMS）等处理或进行遗传操作从已描述的生物获得。

该方法涉及在浸没的需氧条件下、在含有可同化的碳源和氮源的含水营养培养基中培养（发酵）淡青链霉菌 MTCC 5115；和从所述培养基中分离他克莫司。

营养培养基中碳源的例子包括碳水化合物，如葡萄糖、木糖、半乳糖、右旋糖、甘油、淀粉、糊精、麦芽糖、聚乙二醇、大豆油等。其它来源可包括鼠李糖、棉子糖、阿拉伯糖、甘露糖、水杨苷、琥珀酸钠等。

氮源的例子包括酵母抽提物、大豆蛋白胨、大豆粉、棉籽粉、玉米浆、小麦蛋白胨、玉米麸、奶粉、麦芽等。

碳源和氮源并不需要以它们的纯形式使用，虽然可有利地混合使用。

此外，也可将钙、镁、钠、钴、铜和钾的矿物盐加到营养培养基中。如果需要，尤其是在培育培养基严重起泡时，可加入消泡剂，如液体石蜡、脂肪油、植物油、矿物油或硅氧烷。

此外，当在大的槽中进行生长时，可使用营养体型微生物，以避免他克莫司生产中的停滞阶段。可通过将从斜面培养得到的生物的孢子或菌丝体接种到培养基中，培育所述接种的培养基（也称为种子培养基（I 阶段）），然后将该 I 阶段种子转移到 II 阶段种子培养基（II 阶段），从而产生营养体型的生物。

这种种子可用于接种生产培养基。

在发酵过程中，培养物以小球形式生长，因此，它需要低的搅拌，以满足培养物的氧需求。与以丝状生长的其它链霉菌相比，这提供了一个优点。丝状生长通常导致培养基中氧不足。为了增加氧供应，需要提高搅拌速率，这进一步导致大量菌丝受到剪切，而且微生物活性往往会下降。

营养培养基最初和结束时（收获）的 pH 可维持为约 6-8。具体是，pH 可维持在约 6.8-7.5。

可在浸没的需氧条件下在约 20-40℃（如约 24℃-约 35℃）的温度中进行发酵。发酵时间可以是约 120 小时到约 400 小时，发酵时间可根据发酵条件和生产规模而变化。尤其是，可在 27℃、约 6.8-7.5 的 pH 条件下培育生产培养基约 240 小时到约 310 小时。

用于培育和进行发酵的培养基包含下述成分：

成分	g/L
右旋糖（dextrose）	5.0-30.0
糊精	30-200
棉籽粉	5.0-20.0
大豆粉	5.0-20.0
大豆蛋白胨	5.0-20.0
甘油	5.0-30.0
KH_2PO_4	0.2-1.5
$CaCO_3$	0.5-3.0
聚乙二醇	1.0-10.0

这种培养基提供了一个优点，因为用于该培养基中的所有原料均衍生自植物，因此，它不含有任何可传播的海绵状脑炎（Transmissible Spongiform Encephalitis,TSE）/牛海绵状脑炎（Bovine Spongiform Encephalitis,BSE）组织。

可采用常规的方法从培养基中回收所获得的产物他克莫司，如采用高压液相色谱法（HPLC）。他克莫司物质发现存在于培养基和滤液中，并可从菌丝体和滤液中分离和纯化。

从培养基中分离他克莫司包括过滤、离心、浓缩、减压浓缩、冻干、酸化、用适当溶剂抽提、用吸附剂处理、用树脂处理、纯化和结晶中的一个或多个处理。

术语“适当溶剂”包括任何溶剂或溶剂混合物，在该溶剂或溶剂混合物中，他克莫司可被增溶，该溶剂包括如乙酸乙酯、甲醇、甲苯等。可用吸附剂如活性炭、硅胶、氧化铝等进行处理。树脂的例子包括阴离子和阳离子交换树脂。

可将获得的产物再结晶一次或多次，以获得较高的纯度。

可给予他克莫司，用于预防和治疗温血动物的器官或组织如心脏、肾、肝、骨髓、皮肤等的移植排斥。

为公开的目的，温血动物指具有稳态机制的动物王国的成员，包括哺乳动物和鸟类。

在下面的具体实施方式部分，将以实施例的方式进行描述，以产生本发明的方法。但是，这些内容并不限制本发明的范围。对于本领域技术人员而言，这些实施例的各种变化是显而易见的。

实施例 1：淡青链霉菌 MTCC 5115 的分离

采用如下所述的稀释平板技术从土壤中分离淡青链霉菌 MTCC 5115。

从印度的不同地区采集土壤样品，以分离生产他克莫司的新微生物。将样品风干，在 90℃加热 1 小时，进行预处理。将 1 克预处理样品放到无菌试管中，加入无菌蒸馏水使体积为 10 毫升。混合混合物 10 秒钟，放置 1 小时。用预先无菌处理的蒸馏水进行系列稀释，将系列稀释物平板接种到含有各为 50μg/ml 的氯霉素和制霉菌素/放线菌酮的天冬酰胺-甘油培养基上。使用 1 毫升的悬浮液来平板接种。在 28℃培育平板 7-10 天。

将分离的集落挑到新鲜的 YMA 平板上。在 28℃培育该平板 10 天。将平板上的生长物挑到 YMA 斜面上，在 28℃培育 10-11 天。保存这些斜面备用。

实施例 2：筛选分离物

用 2.5 毫升 0.85％氯化钠溶液制备从培育了 11 天的 YMA 斜面上获得的各分离物的孢子/菌丝体悬浮液。将该悬浮液接种到 35 毫升如美国专利 5194378

所述的无菌 KE 种子培养基中。

灭菌前先将种子培养基的 pH 调整为 6.9。在旋转摇动器中在 28℃培育该培养物 44-48 小时，然后将 2 毫升的种子培养基接种到 25 毫升的 FKA 生产培养基中，根据美国专利 5194378 所述的条件进行发酵。

测试发酵肉汤的甲醇提取物针对土曲霉（*Aspergillus terreus*）变体株的抗真菌活性，以 FK-506 作为标准。22 株显示出清除区域（clearing zone），从而证明了抗土曲霉的抗真菌活性。采用 HPLC 来证实这些菌株的抽提物中存在 FK-506。其中一个菌株，即淡青链霉菌 MTCC 5115，在与标准 FK-506 相同的滞留时间处出现了非常小的峰。

实施例 3：16s rDNA 的限制片段分析

用不同的限制性内切核酸酶（BamH1、Bgl1、Nco1、Sma1、EcoR1、HindIII、EcoRV、Stu1&Psn AI）对淡青链霉菌 MTCC 5115 与津岛链霉菌 9993 之间的 16s rDNA 的限制片段模型进行比较。这些试验揭示淡青链霉菌 MTCC 5115 具有不同的原型。

实施例 4：方法优化

用 2.5 毫升 0.85％氯化钠溶液制备从培育了 11 天的 YMA 斜面上获得的淡青链霉菌 MTCC 5115 的孢子/菌丝体悬浮液。使种子在 28℃生长过 I 阶段/II 阶段 44-48 小时。种子培养基的组成如下：

种子培养基	
成分	克/升
糊精	10.0
右旋糖	1.0
棉籽粉	2.5
酵母抽提物	5.0
酪蛋白酶水解产物	5.0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.05
奶粉	2.0
磷酸盐缓冲液（0.67M）pH7.0	2 毫升
NaCl	0.5
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.001
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	0.005
$CaCl_2$	0.02
$FeSO_4 \cdot 5H_2O$	0.025

用 2 毫升种子培养物接种到具有下述组成的生产培养基中：

生产培养基	
成分	克/升
右旋糖	5.0
糊精	120.0
棉籽粉	10.0
大豆粉	10.0
大豆蛋白胨	10.0
甘油	10.0
KH_2PO_4	0.8
$CaCO_3$	1.5
聚乙二醇	1.0

无菌化前先将营养培养基的 pH 调整为 7.0-7.2，然后将培养基在 121℃无菌处理 25 分钟。

发酵在 240rpm、24℃条件下进行 290-310 小时，采用 HPLC 分析他克莫司。他克莫司（FK-506）的峰非常明显和清楚。

使用 FK-506 工作标准强化此 HPLC 峰，证实肉汤中存在他克莫司（FK-506）。从约 300 小时后的上述生产培养基中获得的 FK-506 的最高滴度是 5-10μg/ml。

实施例 5：FK-506 的分离和纯化

将 6 升发酵肉汤酸化至 pH 为 4.0，用等体积的乙酸乙酯抽提 2 次。合并乙酸乙酯层（6 升），40℃、真空条件下浓缩到 100 毫升。采用已知的柱层析技术进一步纯化，用 LCMS 测试分离产物的质量（MASS）。

分析结果证明，所分析的化合物与欧洲专利 184162 和美国专利 4894366 中所述的他克莫司（FK-506）类似。

虽然已以具体实施例的方式描述了本发明，但是对于本领域技术人员而言，某些改动及等价形式是显而易见的，这些改动及等价形式也在本发明的范围内。