

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-506520

(P2017-506520A)

(43) 公表日 平成29年3月9日(2017.3.9)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 P 1/06 (2006.01)	C 1 2 P 1/06 A	4 B 0 6 4
C 1 2 P 1/04 (2006.01)	C 1 2 P 1/04 A	4 B 0 6 5
C 1 2 N 1/20 (2006.01)	C 1 2 N 1/20 A	4 C 0 8 6
A 6 1 K 31/445 (2006.01)	C 1 2 N 1/20 E	
A 6 1 P 3/00 (2006.01)	A 6 1 K 31/445	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 35 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2016-569020 (P2016-569020)
 (86) (22) 出願日 平成27年2月17日 (2015. 2. 17)
 (85) 翻訳文提出日 平成28年10月14日 (2016. 10. 14)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2015/053282
 (87) 国際公開番号 W02015/121488
 (87) 国際公開日 平成27年8月20日 (2015. 8. 20)
 (31) 優先権主張番号 14382054.6
 (32) 優先日 平成26年2月17日 (2014. 2. 17)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 513032275
 グラクソスミスクライン、インテレクト
 アル、プロパティ、ディベロップメント
 、リミテッド
 GLAXOSMITHKLINE INT
 ELLECTUAL PROPERTY
 DEVELOPMENT LIMITED
 イギリス国ミドルセックス、ブレントフォ
 ード、グレート、ウエスト、ロード、98
 O
 (74) 代理人 100091982
 弁理士 永井 浩之
 (74) 代理人 100091487
 弁理士 中村 行孝

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 微生物学的方法

(57) 【要約】

ミガラスタットの微生物合成法であって、特に、少なくとも1種のイミノ糖が生産されるような条件下で微生物を培養すること、並びに、前記微生物から生産したイミノ糖を検出することおよび/または単離すること、並びに、前記方法で使用される微生物を含む方法。本発明は、前記方法により生産されたミガラスタット並びにそれらの医薬組成物および使用も含む。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

少なくとも 1 種のイミノ糖が生産されるような条件下で微生物を培養すること、並びに該微生物により生産されたイミノ糖を検出することおよび/または単離することを含む、ミガラスタットの生産方法。

【請求項 2】

d. 少なくとも 1 種のイミノ糖が生産されるような条件下で微生物を培養する工程、
e. 該微生物により生産されたイミノ糖を検出および/または収集する工程、並びに、
f. もし検出および/または収集した該イミノ糖がミガラスタットでない場合、検出および/または単離した該イミノ糖をミガラスタットへ変換する工程を含む、ミガラスタットの生産方法。

10

【請求項 3】

前記微生物が細菌を含む、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記細菌が、ストレプトマイセス (*Streptomyces*) 属、バチルス (*Bacillus*) 属、パエニバチルス (*Paenibacillus*) 属、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属、ラクトバチルス (*Lactobacillus*) 属、ラクトコッカス (*Lactococci*) 属、サルモネラ (*Salmonella*) 属、エシェリキア (*Escherichia*) 属、クレブシエラ (*Klebsiella*) 属、セラシア (*Serratia*) 属およびプロテウス (*Proteus*) 属からなる群から選択される、請求項 3 に記載の方法。

20

【請求項 5】

前記細菌が、ストレプトマイセス・ライジカス (*Streptomyces lydicus*)、ストレプトマイセス・サブルティラス (*Streptomyces subutilus*)、ストレプトマイセス・ラベンジュレ (*Streptomyces lavendulae*)、ストレプトマイセス・アナラトス (*Streptomyces anulatus*)、ストレプトマイセス・エスピー (*Streptomyces sp*) BTA530 株 (NCIMB 42142 株) およびストレプトマイセス・ライジカス (*Streptomyces lydicus*) ATCC319075 株からなる群から選択されるストレプトマイセス (*Streptomyces*) 菌を含む、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記培養が、回分発酵、流加発酵および連続発酵からなる群から選択される発酵法により実施される、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 7】

前記発酵法が、シード発酵および最終発酵を含む、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記検出工程が、ガラクトシダーゼ A 活性アッセイを用いて実施される、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

前記収集工程が、脱汚泥、ろ過、分別、pH 調節、濃縮、塩への変換、および再結晶化からなる群から選択される少なくとも一つの工程を含む、請求項 2 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 10】

前記条件が、細菌がミガラスタットを生産するのに好適であり、並びに、方法が培地中のミガラスタットを検出すること、および培地からミガラスタットを収集することを含む、請求項 3 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

前記細菌が、ラクトースを含む培地で培養される、請求項 3 ~ 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記条件が、細菌がガラクトスタチンを生産するのに好適であり、並びに、方法が培地中のガラクトスタチンを検出すること、および前記ガラクトスタチンをミガラスタットへ変換することを含む、請求項 3 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。

50

【請求項 1 3】

前記ガラクトスタチンが、培地中でミガラスタットへ変換される、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記ガラクトスタチンが、ミガラスタットへ変換される前に単離される、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 5】

変換工程が、化学的変換および生体内変化からなる群から選択される方法で実施される、請求項 1 2 ~ 1 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 6】

ミガラスタットをミガラスタット塩酸塩へ変換するさらなる工程を含む、請求項 1 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 7】

請求項 1 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の方法により生産したミガラスタットまたは請求項 1 6 に記載の方法により生産したミガラスタット塩酸塩。

【請求項 1 8】

請求項 1 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の方法により生産したミガラスタットまたは請求項 1 6 に記載の方法により生産したミガラスタット塩酸塩を含む、医薬組成物。

【請求項 1 9】

ファブリー病の治療に用いるための、請求項 1 ~ 1 5 のいずれか一項に記載のミガラスタット、または請求項 1 6 に記載の方法により生産されたミガラスタット塩酸塩。

【請求項 2 0】

療法における使用のための、請求項 1 ~ 1 5 のいずれか一項に記載のミガラスタット、または、請求項 1 6 に記載の方法により生産したミガラスタット塩酸塩。

【請求項 2 1】

請求項 1 8 に記載の医薬組成物の有効量を投与することによる、ファブリー病の治療を必要とする患者におけるファブリー病の治療方法。

【請求項 2 2】

単離されたストレプトマイセス・エスピー (Streptomyces sp) BTA530 株 (NCIMB 42142 株)。

【請求項 2 3】

変異ストレプトマイセス・エスピー (Streptomyces sp) BTM4 株 (NCIMB 42358 株)。

【請求項 2 4】

ミガラスタットの生産方法における、単離されたストレプトマイセス・エスピー (Streptomyces sp) BTA530 株 (NCIMB 42142 株) の使用、または、ストレプトマイセス・エスピー (Streptomyces sp) NCIMB 42142 株変異 BTM4 株 (NCIMB 42358 株) の使用。

【発明の詳細な説明】

【発明の背景】

【0001】

本発明は、一般名称がミガラスタット (migalastat) である、イミノ糖 D - 1 - デオキシガラクトノジリマイシン (DGJ) の製造方法に関する。

【0002】

ミガラスタットは、ファブリー病の治療に使用することができる (Fan et al., Nat Med 1999 5:1, 112-5)。ミガラスタットへのいくつかの化学的経路が文献において開示されている。Santoyo-Gonzalez らは、Synlett 1999 593-595において、望ましくないアジド化学を含んだ 8 工程からなる化学的経路による、D - ガラクトーゼからのミガラスタットの合成を記載している。1, 2 : 5, 6 - ジ - O - イソプロピリデン - D - グルコフラノースから開始するミガラスタットへの 1 2 工程化学的経路が、Legler & Pohl, Carbohydr. Res., 155 (1986) 119-129において記載されている。当該方法の最終工程には、ミガラスタットへ付加したガラクトスタチン亜硫酸水素塩を変換することを含む。ミガラ

10

20

30

40

50

タットは、ガラクトピラノース(Bernotas et al., Carbohydr. Res. 167 (1987) 305-11)、L - 酒石酸(Aoyagi et al., J. Org. Chem. 56 (1991) 815);ケブラコイトール(Chida et al., J. Chem. Soc., Chem Commun. 1994, 1247)、ガラクトフラノース(Paulsen et al., Chem. Ber. 1980, 113, 2601)、ベンゼン(Johnson et al., Tetrahedron Lett. 1995, 36, 653)、アラビノ - ヘキソース - 5 - ウロース(Barili et al., Tetrahedron 1997, 3407)、5 - アジド - 1, 4 - ラクトン(Shilvock et al., Synlett, 1998, 554)、デオキシノジリマイシン (Takahashi et al., J. Carbohydr. Chem. 17 (1998) 117); アセチルグルコサミン (Heightman et al., Helv. Chim. Acta 1995, 78, 514)、ミオ - イノシトール(Chida N, et al., Carbohydr. Res. 1992 Dec 31 ;237: 185-94)、ジオキサニルピペリデン (Takahata et al., Org. Lett. 2003; 5(14); 2527-2529)、および (E) - 2, 4 - ペンタジエノール (Martin et al., Org Lett. 2000 Jan, 2(1):93-5, Hughes et al., Nat Prod Rep. 1994 Apr;11(2):135-62)からも合成されてきた。 WO 2008/04501 5号公報 (アミカス セラピューティックス インコーポレイテッド(Amicus Therapeutics, Inc))は、ミガラスタットの調製のための別の化学的方法を記載している。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 3 】

ミガラスタットへの現存の化学的方法に関する課題は、費用がかかること、少なくとも8段階の方法を必要とすること、および有毒なアジド化学を潜在的に含むことである。ミガラスタットが、よりコスト効率よく、且つ持続的な方法で生産できるならば有益である。発酵法は、抗生物質アミノ酸やビタミンなどの生体分子を、大規模で且つ比較的低コストで生産する手段として、当産業で十分に確立されている(Atkinson & Mavittma, Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook, 2nd Edition, New York, Stockton Press, 1991)。ガラクトスタチンは、ストレプトマイセス・ライジカス(*Streptomyces lydicus*) PA-5726培養液 (Miyake and Ebata, Agric. Biol. Chem., 52(7), 1649-1654 (1988))からの亜硫酸水素塩付加物として単離してきたが、これまでにミガラスタットを生産すると知られた微生物は確認されていない。

【 発明の概要 】

【 0 0 0 4 】

本発明は、ミガラスタットの微生物合成のための方法に関する。特に、特定の自然発生的な微生物が、ミガラスタットまたはその前駆体を生産することを見出した。

【 0 0 0 5 】

一側面において、本発明は、少なくとも1種のイミノ糖が生産される条件下で微生物を培養すること、並びに、微生物により生産されたイミノ糖を検出することおよび/または単離することを含む、ミガラスタットの生産方法を提供する。

【 0 0 0 6 】

本発明の別の側面は、

- a . 少なくとも1種のイミノ糖が生産されるような条件下で微生物を培養する工程、
- b . 前記微生物により生産されたイミノ糖を検出および/または収集する工程、並びに、

c . もし前記の検出および/または収集したイミノ糖がミガラスタットでない場合、前記の検出および/または単離したイミノ糖をミガラスタットへ変換する工程を含む、ミガラスタットの生産方法を提供する。

【 0 0 0 7 】

別の側面において、本発明は、上記の方法で使用される微生物を提供する。

【 0 0 0 8 】

別の側面において、本発明は、上記の方法により生産されるミガラスタットを提供する。

【 0 0 0 9 】

別の側面において、本発明は、上記の方法により生産されたミガラスタットを含む、医薬組成物を提供する。

【 0 0 1 0 】

別の側面において、本発明は、上記の方法により生産されたミガラスタットを使用する治療方法を提供する。

【0011】

本発明は、ミガラスタットおよび/またはその前駆体を生産する微生物を確認するアッセイ法も提供する。

【発明の具体的説明】

【0012】

本発明は、ミガラスタットおよび/またはその前駆体を生産する、自然発生的な微生物の発見およびミガラスタットへの基本的な微生物方法経路の使用に基づく。

【0013】

「ミガラスタット」とは、(2R, 3S, 4R, 5S) - 2 - (ヒドロキシメチル)ピペリジン - 3, 4, 5 - トリオールである、1 - デオキシガラクトノジリマイシン (DGJ) を指す。本明細書で使用されるとおり、全体を通して「ミガラスタット」、「1 - デオキシガラクトノジリマイシン」または「DGJ」の意味は、本明細書で特段の記載がない限り、遊離塩基および塩酸塩を含むそれらの任意の塩形態の両方を含む。ミガラスタットの塩酸塩は、ミガラスタット塩酸塩として知られている。ミガラスタットの意味には、ミガラスタットの誘導体も含む (例: N - アセチルミガラスタット)。

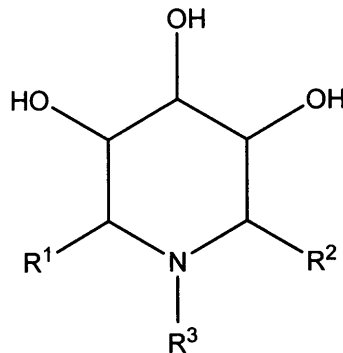
【0014】

「ガラクトスタチン」とは、6 - (ヒドロキシメチル) - 2, 3, 4, 5 - ピペリジンテトラオールである、ガラクトノジリマイシンを指す。本明細書で使用されるとおり、全体を通して「ガラクトスタチン」の意味は、本明細書で特段の記載がない限り、遊離塩基および亜硫酸水素塩付加物を含む任意の塩形態の両方を含む。ガラクトスタチンの意味は、ガラクトスタチンの誘導体も含む (例: N - アセチルガラクトスタチン)。

【0015】

「イミノ糖」とは、酸素原子環内の位置に窒素原子を有する糖の任意の類似体を意味する。本発明に従い生産および検出するイミノ糖は、下記の式を有してもよい:

【化1】



[式中、

R¹ は、H または OH であり、且つ R² は、H、CH₃ または CH₂OH であり、且つ R³ は、独立して H または置換または未置換の C₁ ~ C₁₂ アルキル、C₂ ~ C₁₂ アルケニル、C₂ ~ C₁₂ アルキニル、C₅ ~ C₆ シクロアルキル、C₅ ~ C₁₂ シクロアルケニル、C₅ ~ C₁₂ アリール、C₄ ~ C₁₂ ヘテロアリール、C₆ ~ C₁₂ アリールアルキル、C₄ ~ C₁₂ ヘテロシクリル、C₆ ~ C₁₂ ヘテロ環式アルキル、C₅ ~ C₁₂ ヘテロアリールアルキルまたは C₂ ~ C₁₂ アシルである。]。イミノ糖の例としては、ガラクトスタチン、ノジリマイシンおよびマンノジリマイシン並びにそれらのデオキシ型ミガラスタット、1 - デオキシノジリマイシンおよび 1 - デオキシマンノジリマイシンが挙げられる。用語「イミノ糖」には、上記でイミノ糖と名付けられた任意の生合成の前駆体も含まれ、環式または直鎖式でもよい。用語「イミノ糖」には、本内容で特段の記載がない限り、上記でイミノ糖と名付けられた鎖式形態、並びに、上記でイミノ糖と名付けられ

10

20

30

40

50

た遊離塩基および任意の塩形態の付加物（例えば、亜硫酸水素塩付加物）も含む。

【0016】

本発明の様々な側面は、下記の段落においてさらに詳細に記載されている。

【0017】

1. 好適な微生物の同定

一側面において、本発明は、少なくとも1種のイミノ糖が生産されるような条件下で、微生物を培養すること、且つ、微生物により生産されたイミノ糖を検出および/または単離することを含む、ミガラスタットの生産方法を提供する。一実施態様において、イミノ糖を検出する。別の実施態様において、イミノ糖を単離する。

【0018】

一実施態様において、検出および/または単離したイミノ糖は、ミガラスタットまたはその誘導体である。別の実施態様において、検出および/または単離したイミノ糖は、ガラクトスタチンまたはその誘導体である。

【0019】

別の側面において、本発明は、ミガラスタットが生産されるような条件下で微生物を培養することを含む、ミガラスタットの生産方法を提供する。

【0020】

別の側面において、本発明は、ミガラスタットの製造において、ガラクトスタチンが生産されるような条件下で微生物を培養することを含む方法により生産されたガラクトスタチンの使用を提供する。

【0021】

別の側面において、本発明は、

- a. 少なくとも1種のイミノ糖が生産されるような条件下で微生物を培養する工程、
- b. 前記微生物により生産されたイミノ糖を検出および/または収集する工程、並びに、
- c. もし前記の検出および/または収集したイミノ糖がミガラスタットでない場合、前記の検出および/または単離したイミノ糖をミガラスタットへ変換する工程を含む、ミガラスタットの生産方法を提供する。

【0022】

微生物は、好適には、細菌、例えばグラム陽性菌である。例えば、微生物は、好適にはアクチノ細菌である。好適な微生物は、ストレプトマイセス (Streptomycetaceae) 科に属し、例としてストレプトマイセス (Streptomyces) 属またはストレプトベルティシリウム (Streptoverticillium) 属の微生物が挙げられる。あるいは、好適な微生物は、パチルス (Bacillus) 属、パエニパチルス (Paenibacillus) 属、コリネバクテリウム (Corynebacterium) 属、ラクトパチルス (Lactobacillus) 属およびラクトコッカス (Lactococci) 属からなる群から選択される属に属する。微生物は、好適には、グラム陰性菌である。例えば、好適な微生物は、サルモネラ (Salmonella) 属、エシェリキア (Escherichia) 属、クレブシエラ (Klebsiella) 属、セラシア (Serratia) 属およびプロテウス (Proteus) 属からなる群から選択される属に属する。一実施態様において、微生物は、ストレプトマイセス (Streptomyces) 属、パチルス (Bacillus) 属、パエニパチルス (Paenibacillus) 属、コリネバクテリウム (Corynebacterium) 属、ラクトパチルス (Lactobacillus) 属、ラクトコッカス (Lactococci) 属、サルモネラ (Salmonella)、エシェリキア (Escherichia) 属、クレブシエラ (Klebsiella) 属、セラシア (Serratia) 属およびプロテウス (Proteus) 属からなる群から選択される細菌である。一実施態様において、微生物は、エシェリキア (Escherichia) 属に属する。一実施態様において、微生物は、大腸菌 (Escherichia coli.) である。

【0023】

好適な細菌の例としては、ストレプトマイセス・ライジカス (Streptomyces lydicus)、ストレプトマイセス・サブリティラス (Streptomyces subutilus)、ストレプトマイセス・ラベンジュレ (Streptomyces lavendulae)、ストレプトマイセス・アナラトス (Streptomyces anulatus) などが挙げられる。本発明の当該側面で使用してもよい細菌の特

10

20

30

40

50

定の菌株には、ストレプトマイセス・エスピー (Streptomyces sp) BTA530株 (NCIMB 42142株, 2013年4月18日付で寄託) およびストレプトマイセス・ライジカス (Streptomyces lydicus) ATCC319075株が含まれる。一実施態様において、細菌は、ストレプトマイセス・ライジカス (Streptomyces lydicus)、ストレプトマイセス・サブルティラス (Streptomyces subrutillus)、ストレプトマイセス・ラベンジュレ (Streptomyces lavenderulae)、ストレプトマイセス・アヌラトス (Streptomyces anulatus)、ストレプトマイセス・エスピー (Streptomyces sp) BTA530株 (NCIMB 42142株) およびストレプトマイセス・ライジカス (Streptomyces lydicus) ATCC319075株からなる群から選択されるストレプトマイセス (Streptomyces) 菌を含む。

【0024】

10

本発明のこれらの側面において、使用に好適な微生物は、微生物の培養液中のイミノ糖の存在をスクリーニングすることにより同定してもよい。イミノ糖を、商業的な供給源からのグリコシダーゼアッセイを使用した培養プロセス中で検出してもよい。

【0025】

例えば、ミガラスタットおよびガラクトスタチンは、両方とも - ガラクトシダーゼAの可逆的競合阻害剤であり、これらミガラスタットおよびガラクトスタチンによると、イミノ糖を、 - ガラクトシダーゼA活性のために十分に認められている任意のアッセイを使用した培養プロセス中で検出してもよい。培養プロセス中のミガラスタットおよびガラクトスタチンの定量化を、次に、LC/MSなどの、十分に認められている分析的化学技術により実施してもよい。

20

【0026】

本発明の方法において使用に好適と認識される微生物は、イミノ糖の生産向上のためにさらに改良してもよい。例えば、本発明の方法において使用に好適と認識される微生物を、ガラクトスタチンまたはミガラスタットなどのイミノ糖の生産向上のため、ランダムスクリーニングの対象としてもよい。産業用菌株改良のため使用してもよい好適なランダムスクリーニングの手法は当技術分野において周知であり、例としてR.T. Rowlands (1984) "Industrial strain improvement: mutagenesis and random screening procedures" Enzyme and Microbial Technology 6(1) 3-10が挙げられる。この様なランダムに変異した微生物の一種は、ストレプトマイセス・エスピー (Streptomyces sp) 変異BTM4株 (NCIMB 42358株) である。当該菌株は、紫外線による変異照射の生き残りとして、ストレプトマイセス・エスピー (Streptomyces sp) BTA530株 (NCIMB 42142株) から誘導された単一コロニー分離株の群内でミガラスタットの増加生産のためスクリーニングすることにより選択された。

30

【0027】

単離したストレプトマイセス・エスピー (Streptomyces sp) BTA530株 (NCIMB 42142株) は、本発明の一側面を形成する。変異ストレプトマイセス・エスピー (Streptomyces sp) BTM4株 (NCIMB 42358株) は、本発明の別の側面を形成する。本発明のさらなる別の側面は、ミガラスタットの生産方法において、ストレプトマイセス・エスピー (Streptomyces sp) BTA530株 (NCIMB 42142株) の使用、または、変異ストレプトマイセス・エスピー (Streptomyces sp) BTM4株 (NCIMB 42358株) の使用である。

40

【0028】

2. 微生物の培養および発酵

用語「培養」には、生きた微生物を維持および/または育成することが含まれる (例えば、培養物または菌株の維持および/または育成)。本発明の方法の実行において、微生物を、液体培地中に培養してもよい。あるいは、微生物を、固体培地または半固体培地中で培養してもよい。

【0029】

2.1 培地

本発明の一実施態様において、微生物を、微生物の維持および/または育成に必要なまたは有益な栄養素を含んだ培地 (例えば、滅菌の液体培地) 中で培養する。栄養素の例と

50

して、炭素源、炭素基質、窒素源、リン源、微量元素および成長因子が挙げられる。

【0030】

好適な炭素源または炭素基質には、炭水化物、炭化水素、油、脂質、脂肪酸、有機酸およびアルコールが含まれる。好適な炭素源の例として、グリセロール、デキストリン、マルトデキストリン、菜種油、ラクトース、ガラクトース、タガトース、グルコース、ラクツロースおよびデキストロース（メリトース（Meritose）、即ち、デキストロースー水和物など）が挙げられる。

【0031】

一実施態様において、炭素源としてラクトースを使用する。一実施態様において、炭素源としてラクトースを最終濃度0～50%w/vまで、例えば0～30%、例えば0～10%、例えば1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%または9%使用する。一実施態様において、培地は、ラクトースを最終濃度約1～3%まで、例えば約2%含む。一実施態様において、培地は、ラクトースを最終濃度約1.7%w/vまで含む。別の実施態様において、炭素源としてラクツロースを使用する。一実施態様において、炭素源としてラクツロースを最終濃度0～50%w/vまで、例えば0～30%、例えば0～10%、例えば1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%または9%使用する。一実施態様において、培地は、ラクツロースを最終濃度約1～3%まで、例えば約2%含む。一実施態様において、培地は、ラクツロースを最終濃度約1.7%w/vまで含む。別の実施態様において、培地は、グリセロールを含む。一実施態様において、培地は、グリセロールを最終濃度約0～50%w/vまで、例えば0～30%、例えば0～10%、例えば1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%または9%含む。一実施態様において、培地は、グリセロールを最終濃度約3～5%まで、例えば約4%含む。

10

20

【0032】

別の実施態様では、炭素源としてガラクトースを使用する。一実施態様において、培地は、ガラクトースを最終濃度0～50%w/vまで、例えば0～30%、例えば0～10%、例えば1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%または9%含む。一実施態様において、培地は、ガラクトースを最終濃度約1～3%まで、例えば約2%含む。一実施態様において、培地は、ガラクトースを最終濃度約1.7%w/vまで含む。

【0033】

炭素源（複数可）は、本発明の方法における所望のイミノ糖生産に影響を与えるために選択してもよい。例えば、本発明の方法において、発明者らは、ラクトースを含む培地の使用が、イミノ糖生産微生物によるミガラスタットの生産を向上させることを見出した。ラクトースを含まない培地の使用は、微生物によるガラクトスタチンの生産を好む。本発明の一実施態様において、ミガラスタットの生産方法は、ラクトースを含む培地中で微生物を培養することを含む。

30

【0034】

培地は、好適には1種以上の炭素源を含んでよい。一実施態様において、微生物を、グリセロール、デキストリン、マルトデキストリン、菜種油、ラクトース、ガラクトース、タガトース、グルコースおよびラクツロースから選択される、1種以上の炭素源の存在下で培養する。一実施態様において、培地は、ラクトースおよびデキストロースを含む。一実施態様において、培地は、ラクツロースおよびデキストロースを含む。一実施態様において、培地は、ラクトース、デキストロースおよびグリセロールを含む。一実施態様において、培地は、ラクツロース、デキストロースおよびグリセロールを含む。一実施態様において、培地は、デキストロースおよびグリセロールを含む。

40

【0035】

一実施態様において、培地は、ラクトースを最終濃度0～50%w/vまで、例えば0～30%、例えば0～10%、例えば1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%または9%およびデキストロースを最終濃度0～50%w/vまで、例えば0～30%、例えば0～10%、例えば1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%または9%含む。一実施態様において、培地は、ラクトースを最終濃度約1～3%まで、例えば約2

50

%およびデキストロースを最終濃度約1~3%まで、例えば約1.5%含む。一実施態様において、培地は、ラクトースを最終濃度約1.7%w/vまでおよびデキストロースを最終濃度約1.5%w/vまで含む。

【0036】

一実施態様において、培地は、ラクツロースを最終濃度0~50%w/vまで、例えば0~30%、例えば0~10%、例えば1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%または9%およびデキストロースを最終濃度0~50%w/vまで、例えば0~30%、例えば0~10%、例えば1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%または9%含む。一実施態様において、培地は、ラクツロースを最終濃度約1~3%まで、例えば約2%およびデキストロースを最終濃度約1~3%まで、例えば約1.5%含む。一実施態様において、培地は、ラクツロースを最終濃度約1.7%w/vまでおよびデキストロースを、最終濃度約1.5%w/vまで含む。

10

【0037】

一実施態様において、培地は、ガラクトースを最終濃度0~50%w/vまで、例えば0~30%、例えば0~10%、例えば1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%または9%およびデキストロースを最終濃度0~50%w/vまで、例えば0~30%、例えば0~10%、例えば1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%または9%含む。一実施態様において、培地は、ガラクトースを最終濃度約1~3%まで、例えば約2%およびデキストロースを最終濃度約1~3%まで、例えば約1.5%含む。一実施態様において、培地は、ガラクトースを最終濃度約1.7%w/vまでおよびデキストロースを最終濃度約1.5%w/vまで含む。

20

【0038】

一実施態様において、培地は、ラクトースを最終濃度0~50%w/vまで、例えば0~30%、例えば0~10%、例えば1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%または9%およびデキストロースを最終濃度0~50%w/vまで、例えば0~30%、例えば0~10%、例えば1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%または9%およびグリセロールを最終濃度0~50%w/vまで、例えば0~30%、例えば0~10%、例えば1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%または9%含む。一実施態様において、培地は、ラクトースを最終濃度約1~3%まで、例えば約2%およびデキストロースを最終濃度約1~3%まで、例えば約1.5%およびグリセロールを最終濃度約3~5%まで、例えば約4%含む。一実施態様において、培地は、ラクトースを最終濃度約1.7%w/vまでおよびデキストロースを最終濃度約1.5%w/vまでおよびグリセロールを最終濃度約4%まで含む。

30

【0039】

一実施態様において、培地は、ラクツロースを最終濃度0~50%w/vまで、例えば0~30%、例えば0~10%、例えば1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%または9%およびデキストロースを最終濃度0~50%w/vまで、例えば0~30%、例えば0~10%、例えば1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%または9%およびグリセロールを最終濃度0~50%w/vまで、例えば0~30%、例えば0~10%、例えば1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%または9%含む。一実施態様において、培地は、ラクツロースを最終濃度約1~3%まで、例えば約2%およびデキストロースを最終濃度約1~3%まで、例えば約1.5%およびグリセロールを最終濃度約3~5%まで、例えば約4%含む。一実施態様において、培地は、ラクツロースを最終濃度約1.7%w/vまでおよびデキストロースを最終濃度約1.5%w/vまでおよびグリセロールを最終濃度約4%まで含む。

40

【0040】

一実施態様において、培地は、ガラクトースを最終濃度0~50%w/vまで、例えば0~30%、例えば0~10%、例えば1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%または9%およびデキストロースを最終濃度0~50%w/vまで、例えば0~30%、例えば0~10%、例えば1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%または9

50

%およびグリセロールを最終濃度0～50% w/vまで、例えば0～30%、例えば0～10%、例えば1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%または9%含む。一実施態様において、培地は、ガラクトースを最終濃度約1～3%まで、例えば約2%およびデキストロースを最終濃度約1～3%まで、例えば約1.5%およびグリセロールを最終濃度約3～5%まで、例えば約4%含む。一実施態様において、培地は、ガラクトースを最終濃度約1.7% w/vまでおよびデキストロースを最終濃度約1.5% w/vまでおよびグリセロールを最終濃度約4%まで含む。

【0041】

一実施態様において、培地は、デキストロースを最終濃度0～50% w/vまで、例えば0～30%、例えば0～10%、例えば1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%または9%およびグリセロールを最終濃度0～50% w/vまで、例えば0～30%、例えば0～10%、例えば1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%または9%含む。一実施態様において、培地は、デキストロースを最終濃度約1～3%まで、例えば約1.5%およびグリセロールを最終濃度約3～5%まで、例えば約4%含む。一実施態様において、培地は、デキストロースを最終濃度約1.5% w/vまでおよびグリセロールを最終濃度約4%まで含む。

10

【0042】

好適な窒素源には、大豆タンパク (Arcon Fなど)、綿実粉、CSL (コーンステープリカー)、ペプトン、酵母エキス、肉エキス、麦芽エキス、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、カザミノ酸およびリン酸アンモニウムが含まれる。綿実粉は、シグマ社 (Sigma) のProFlo, Pharmamediaを含む、多様な商業的供給源から入手可能である。一実施態様において、窒素源は、大豆タンパクである。一実施態様において、培地は、大豆タンパクを最終濃度約0～50% w/vまで、例えば0～30%、例えば0～10%、例えば1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%または9%含む。一実施態様において、培地は、大豆タンパクを最終濃度約1～5%まで、例えば約2.5%含む。一実施態様において、窒素源は、綿実粉である。一実施態様において、培地は、綿実粉を最終濃度約0～50% w/vまで、例えば0～30%、例えば0～10%、例えば1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%または9%含む。一実施態様において、培地は、綿実粉を最終濃度約1～5%まで、例えば約2.5%含む。一実施態様において、窒素源は、CSLである。一実施態様において、培地は、CSLを最終濃度約0～50% w/vまで、例えば0～30%、例えば0～10%、例えば0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%または9%含む。一実施態様において、培地は、CSLを最終濃度約0.5%まで含む。

20

30

【0043】

培地は、好適には、1種以上の窒素源を含んでもよい。一実施態様において、微生物を、大豆タンパク (Arcon Fなど)、綿実粉、CSL (コーンステープリカー)、ペプトン、酵母エキス、肉エキス、麦芽エキス、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、カザミノ酸およびリン酸アンモニウムから選択される、1種以上の窒素源を含む培地中で培養する。一実施態様において、培地は、綿実粉を最終濃度約0～50% w/vまで、例えば0～30%、例えば0～10%、例えば1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%または9%およびCSLを最終濃度約0～50% w/vまで、例えば0～30%、例えば0～10%、例えば0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%または9%含む。一実施態様において、培地は、綿実粉を最終濃度約1～5%まで、例えば約2.5%、CSLを最終濃度約0.5%まで含む。

40

【0044】

好適なリン源は、リン酸、それらのナトリウム塩およびカリウム塩を含む。好適な微量元素は、マグネシウム、鉄、マンガン、カルシウム、銅、亜鉛、ホウ素、モリブデン、塩化カリウムおよび/またはコバルト塩を含む。

【0045】

好適な微量元素の例として、硫酸マグネシウム、硫酸鉄、塩化亜鉛、塩化第二銅、塩化

50

カルシウム、炭酸カルシウム、塩化マグネシウム、塩化鉄、塩化ナトリウムおよび硫酸マンガが挙げられる。一実施態様において、微生物を、炭酸カルシウムを含む培地で培養する。

【0046】

好適な成長因子は、グルタミン酸、グルタミン酸ナトリウムおよびロイシンなどのアミノ酸（それらの塩を含む）、ビタミンB6およびクエン酸を含む。

【0047】

本発明の方法の側面の一実施態様において、培地は、大豆タンパク濃縮物（大豆タンパク濃縮物Arcon Fなど）例えば0～5%を含む。一実施態様において、培地は、デキストリン（水溶性でんぷん）例えば0～4%を含む。一実施態様において、培地は、硫酸マグネシウム（ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ）例えば0～0.7%を含む。一実施態様において、培地は、 KH_2PO_4 例えば0～0.8%を含む。一実施態様において、培地は、菜種油例えば0～0.2%を含む。一実施態様において、培地は、炭酸カルシウム例えば0～0.12%を含む。一実施態様において、培地は、Foam Doctorなどの消泡剤例えば0～0.4%を含む。一実施態様において、培地は、綿実粉例えば0～5%を含む。一実施態様において、培地は、グルコース例えば0～3%を含む。一実施態様において、培地は、ラクトース例えば0～7%を含む。一実施態様において、培地は、ラクツロース例えば0～7%を含む。一実施態様において、培地は、グリセロール例えば0～8%を含む。一実施態様において、培地は、CSL例えば0～1%を含む。一実施態様において、培地は、大豆タンパク濃縮物（大豆タンパク濃縮物Arcon Fなど）、デキストリン（水溶性でんぷん）、硫酸マグネシウム（ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ）、 KH_2PO_4 、菜種油、炭酸カルシウム、消泡剤、綿実粉、グルコース、ラクトース、ラクツロース、グリセロールおよびCSLのいずれか1種以上を含む。

10

20

【0048】

一実施態様において、培地は、大豆タンパク濃縮物（大豆タンパク濃縮物Arcon Fなど）、デキストリン（水溶性でんぷん）、硫酸マグネシウム（ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ）、 KH_2PO_4 、菜種油、炭酸カルシウムおよび消泡剤を含む。別の実施態様において、培地は、綿実粉、ラクツロース、メリトース（即ちデキストロース）グリセロール、CSL、炭酸カルシウムおよび消泡剤を含む。

【0049】

2.2 培養条件

本発明の方法において、微生物を、制御pHの下で培養してもよい。用語「制御pH」には、所望の生産物（例えば、ミガラスタットまたはガラクトスタチン）の生産をもたらす、任意のpHを含む。一実施態様において、微生物を、pH6.0～9.0の間で培養する。別の実施態様において、微生物を、pH7.0～8.0の間で培養する。別の実施態様において、微生物を、pH約7で培養する。別の実施態様において、微生物を、pH約7.2または約7.7または約7.8で培養する。

30

【0050】

一実施態様において、例えば微生物の培養中、維持するなど、pHを調整する。一実施態様において、pHを0～50時間維持し、別の実施態様において、pHを50～220時間維持した。別の実施態様において、pHを0～220時間維持した。

40

【0051】

好適には、培養の初期pHを好適なレベルに調節してもよいが、本発明の工程中、その後調整または維持しないことである。関連の実施態様において、初期pHを、6.5～7.60に調節し、その後調整しなかった。所望のpHは初期調節し、且つ、当業者に周知のいくつかの手法を使用して、任意にその後調整または維持してもよい。好適なpH調整剤の例として、 H_2SO_4 、水酸化アンモニウム、アンモニアガス、 $NaOH$ および酢酸pH調整剤が挙げられる。一実施態様において、pHを7～8の間で維持する。一実施態様において、 $NaOH$ を使用してpHを7～8で維持する。一実施態様において、pHをpH7.8に調節する。一実施態様において、 $NaOH$ を使用してpHを調節する。一

50

実施態様において、NaOHを使用してpHをpH 7.8に調整する。別の実施態様において、pHをpH 7.7に調節する。一実施態様において、NaOHを使用してpHを調節する。一実施態様において、NaOHを使用してpHをpH 7.7に調節する。一実施態様において、pHをpH 7.2に調節する。一実施態様において、NaOHを使用してpHをpH 7.2に調節する。

【0052】

本発明の方法において、微生物を、制御した通気の下で培養してもよい。用語「制御」には、所望のイミノ糖生産物（例えば、ミガラスタットまたはガラクトスタチン）の生産をもたらす任意の通気を含む。通気は、培地を介する散布された滅菌空気の導入および/またはプロペラまたはインペラまたは類似の攪拌装置からの機械的投入により提供される攪拌によるか、または培養容器通気孔を調整することで得られる圧力により、好適に制御することができる。例えば、エアリフト培養装置（airlift fermenter）を使用してもよい。

10

【0053】

一実施態様において、微生物を、通気量0.5vvm（1分間あたりの容器容積量）～1.5vvmの間で培養する。例えば、本発明の微生物を、0.5vvm、0.6vvm、0.7vvm、0.8vvm、0.9vvm、1.0vvm、1.1vvm、1.2vvm、1.3vvm、1.4vvm、1.5vvmで好適に培養してもよい。関連の実施態様において、通気を攪拌により制御する。一実施態様において、攪拌先端速度は、1.0m/s～6.0m/sの間である。

20

【0054】

本発明の方法において、微生物を、制御圧力の下で培養してもよい。用語「制御圧力」には、所望のイミノ糖生産物（例えば、ミガラスタットまたはガラクトスタチン）の生産をもたらす、任意の圧力を含む。一実施態様において、制御圧力は、圧力0.3Bar～1.5Barの間を含む。一実施態様において、微生物を、圧力0.3Bar～1.1Barの間で培養する。例えば、本発明の微生物を、圧力0.5Bar、0.6Bar、0.7Bar、0.8Bar、0.9Barで好適に培養してもよい。関連の実施態様において、通気を、培養容器を振動することにより制御する。例えば、微生物を、180rpm～280rpmで好適に培養してもよい。例えば、微生物を、200rpm～240rpmで好適に培養してもよい。例えば、微生物を、約220rpmで好適に培養してもよい。関連の実施態様において、通気を、攪拌の調整およびまたは通気量の調整を通して、培地中の溶存酸素レベルを調整することにより制御する。一実施態様において、溶存酸素を、10～50%以上で調整する。例えば、本発明の微生物を、10%、15%、20%、25%、30%、35%、または40%以上で好適に培養してもよい。例えば、本発明の微生物を、10%、15%、20%、25%、30%、35%、または40%で好適に培養してもよい。例えば、本発明の方法において、培養中の酸素レベルを20%以上に調整してもよい。

30

【0055】

本発明の方法において、微生物を、過剰な発泡をすることなく（例えば、Foam Doctorなどの消泡剤の添加を通じて）好適に培養してもよい。

40

【0056】

さらに、本発明の方法において、微生物を、制御温度の下で培養することができる。用語「制御温度」には、所望のイミノ糖生産物（例えば、ミガラスタットまたはガラクトスタチン）の生産をもたらす任意の温度を含む。一実施態様において、制御温度は、温度15°C～35°Cの間を含む。別の実施態様において、制御温度は、温度20°C～53°C、例えば25°C～40°Cの間である。例えば、本発明の微生物を、25°C、26°C、27°C、28°C、29°C、30°C、31°C、32°C、33°C、34°C、35°Cで好適に培養してもよい。例えば、本発明の方法において、微生物を約28°Cで培養してもよい。

【0057】

50

2.3 培養方法

微生物を、液体培地中で培養（例えば、維持および/または育成）することができ、且つ、連続的または断続的のいずれかで、静置培養、試験管培養、振とう培養（例えば、回転振とう培養、振とうフラスコ培養等）、曝気攪拌（aeration spinner）培養、あるいは攪拌槽またはエアリフト培養装置内の発酵などの、従来の培養方法により好適に培養することができる。一実施態様において、微生物を、振とうフラスコで培養する。別の実施態様において、微生物を、発酵装置内で培養する（例えば、発酵法）。本発明の発酵法は、特に限定されないが、回分発酵、流加発酵および発酵の連続的方法または手法を含む。語句「回分法」または「回分発酵」とは、閉ざされたシステムを指し、培地、栄養素、補助的添加剤等が発酵開始から設定し、発酵中、変更の対象としないが、培地の過剰な酸性化および/または微生物死滅を防ぐためにpHおよび酸素濃度などの因子を制御する試みを行ってもよい。語句「流加法」または「流加発酵」とは、回分発酵を指すが、例外として、発酵が進むにつれ、1種以上の基質または補助剤(supplement)を添加する（例えば、段階的にまたは連続的に添加する）。語句「連続法」または「連続発酵」とは、所望のイミノ糖生産物（例えば、ミガラスタットまたはガラクトスタチン）収集のため好適に、画定した発酵培地を、連続的に発酵装置へ添加し、使用したか、または、「調整した」培地と同量を同時に取り除くシステムを指す。このような多様な方法が開発され、且つ、当技術分野で周知である。

10

【0058】

本発明の一実施態様において、回分発酵法を使用する。別の実施態様において、流加発酵法を使用する。

20

【0059】

語句「少なくとも1種のイミノ糖が生産されるような条件下で培養する」には、少なくとも1種のイミノ糖の生産を得るか、または少なくとも1種のイミノ糖の所望の収率を得るために適切または十分な条件下（例えば、温度、圧力、pH、粘度、持続時間等）で、微生物を維持および/または育成することを含む。例えば、所望量のイミノ糖化合物（例えば、ミガラスタットまたはガラクトスタチンまたはそれらの前駆体）を生産するため、十分な時間培養を継続する。好ましくは、培養を、化合物の好適な生産に実質的に到達するため、十分な時間継続する（例えば、ミガラスタットまたはガラクトスタチンまたは好適なミガラスタット：ガラクトスタチンの比の好適な濃度に到達するための十分な時間）。一実施態様において、培養を、約12～24時間継続する。別の実施態様において、培養を、約24～36時間、36～48時間、48～72時間、72～96時間、96～120時間、120～144時間、144～168時間、168～192時間、192～216時間、216～240時間、240～264時間、264～288時間、288～312時間、312～336時間または336時間を超えて継続する。その一方で、別の実施態様において、微生物を、発酵の間中、少なくとも0.5～10g/Lの化合物を生産するように培養する。

30

【0060】

本発明の方法は、別々のシード(seed)発酵段階および最終発酵段階を含んでもよい。あるいは、接種胞子を最終段階培地に直接接種してもよい。一実施態様において、方法には、シード発酵および最終発酵を含む。一実施態様において、方法には、シード発酵段階を含まない。一実施態様において、方法には、シード発酵段階がない最終発酵段階を含む。別々のシード発酵段階および最終発酵段階を使用した場合、シード発酵段階において、シード発酵培地をシードするために接種材料を使用する。これは、胞子接種材料または植物性接種材料の使用により達成してもよい。シードされた発酵培地を、次に、本明細書で上記に記載した好適な条件下でインキュベートしてもよい。最終発酵段階において、シード発酵を、最終段階培地を接種するために使用する。

40

【0061】

本発明の一実施態様において、方法には、初期シード発酵段階を含む。一実施態様において、方法には、シード発酵段階および最終発酵段階を含む。最終段階の発酵は、典型的

50

には、280時間まで行われる一方で、シード段階として発酵段階は、典型的には、72時間まで行われる。

【0062】

2.3.1 シード発酵

典型的には、接種材料は、培地1mlあたり $1.5 \times 10^4 \sim 2.5 \times 10^5$ 個の胞子の濃度を提供する胞子を含む。一つの好適な胞子濃度は、培地1mlあたり胞子 6×10^4 個である。シード発酵段階に好適な培地は、本明細書の上記第2.1節で定義したとおりである。一実施態様において、シード培地は、大豆タンパク濃縮物（大豆タンパク濃縮物Arcon Fなど）を含む。一実施態様において、シード培地は、デキストリン（水溶性でんぷん）を含む。一実施態様において、シード培地は、硫酸マグネシウム（ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ）を含む。一実施態様において、シード培地は、 KH_2PO_4 を含む。一実施態様において、シード培地は、菜種油を含む。一実施態様において、シード培地は、炭酸カルシウムを含む。一実施態様において、シード培地は、消泡剤を含む。一実施態様において、シード培地は、綿実粉（タンパク源）を含む。一実施態様において、シード培地は、メリトース（デキストロース）を含む。一実施態様において、シード培地は、CSL（タンパク源）を含む。

10

【0063】

一実施態様において、シード培地は、大豆タンパク濃縮物（大豆タンパク濃縮物Arcon Fなど）、デキストリン（水溶性でんぷん）、硫酸マグネシウム（ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ）、 KH_2PO_4 、菜種油、炭酸カルシウム、消泡剤、綿実粉、メリトース（デキストロース）およびCSLのいずれか1種以上を含む。

20

【0064】

一実施態様において、シード培地は、大豆タンパク濃縮物（大豆タンパク濃縮物Arcon Fなど）、デキストリン（水溶性でんぷん）、硫酸マグネシウム（ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ）、 KH_2PO_4 、菜種油、炭酸カルシウムおよび消泡剤を含む。

【0065】

一実施態様において、シード培地は、Arcon Fなどの大豆タンパク質 例えは0~5%、水溶性でんぷん 例えは0~4%、硫酸マグネシウム 例えは0~0.7%、リン酸カリウム 例えは0~0.8%、菜種油 例えは0~0.2%、塩化カルシウム 例えは0~0.12%、塩化マグネシウム 例えは0~0.04%、塩化ナトリウム 例えは0~0.04%、塩化鉄 例えは0~0.02%、塩化亜鉛 例えは0~0.002%、塩化第二銅 例えは0~0.002%、硫酸マンガン 例えは0~0.002%、および、消泡剤 例えは0~0.4%のいずれか1種以上または全種を含む。

30

【0066】

一実施態様において、シード育成段階において使用する培地は、綿実粉 例えは0~5%、CSL 例えは0~1.0%、ラクトース 例えは0~4%、グルコース 例えは0~2.5%、グリセロール 例えは0~8%、炭酸カルシウム 例えは0~1.6%、硫酸マグネシウム 例えは0~0.2%および消泡剤 例えは0~0.2%のいずれか1種以上または全種を含む。

【0067】

一実施態様において、シード培地は、綿実粉、メリトース（デキストロース）、デキストリン、CSLおよび炭酸カルシウムを含む。

40

【0068】

一実施態様において、シード育成段階において使用する培地は、綿実粉 例えは0~5%、メリトース（デキストロース）例えは0~3%、デキストリン 例えは0~8%、CSL 例えは0~1.0%、炭酸カルシウム 例えは0~1.6%のいずれか1種以上または全種を含む。

【0069】

別の実施態様において、シード培地は実質的に、本明細書の任意の実施態様において記載するとおりである。

50

【 0 0 7 0 】

シード培地の pH を、シード発酵段階の前および / または最中に、好適に調節してもよい。シード培地の pH を、本明細書の上記第 2 . 2 節に記載されるとおりに好適に調節してもよい。一実施態様において、シード培地を、例えば約 7 . 8 の pH など、7 . 0 ~ 8 . 0 の間の pH に調節する。一実施態様において、pH を、NaOH を使用して調節する。

【 0 0 7 1 】

シード発酵段階を、本明細書の上記第 2 . 2 節に記載したとおり、制御された通気の下で好適に実施してもよい。一実施態様において、通気を、攪拌および培地を介する滅菌空気により制御する。

10

【 0 0 7 2 】

シード発酵段階を、本明細書の上記段落第 2 . 2 節に記載したとおり、制御された温度の下で好適に実施してもよい。一実施態様において、シード発酵を 15 ° C ~ 35 ° C で実施する。例えば、シード発酵を 25 ° C、26 ° C、27 ° C、28 ° C、29 ° C、30 ° C、31 ° C、32 ° C、33 ° C、34 ° C または 35 ° C で実施する。

【 0 0 7 3 】

接種されたシード培地を、最終発酵段階のため、所望のバイオマスを生産するのに十分な時間培養する。一実施態様において、培養を約 12 ~ 24 時間継続する。別の実施態様において、培養を約 24 ~ 36 時間、36 ~ 48 時間、48 ~ 72 時間、72 ~ 96 時間、96 ~ 120 時間、120 ~ 144 時間または 144 時間を超えて継続する。

20

【 0 0 7 4 】

2 . 3 . 2 最終発酵

典型的には、最終段階培地に、最終段階培地開始量 0 . 1 % ~ 8 % v / v の間のレベルでシード培養を接種する。

【 0 0 7 5 】

最終発酵段階に好適な培地は、本明細書の上記第 2 . 1 節に記載したとおりである。一実施態様において、最終段階培地は、綿実粉を含む。別の実施態様において、最終段階培地は、グルコースを含む。別の実施態様において、最終段階培地は、ラクトースを含む。別の実施態様において、最終段階培地は、グリセロールを含む。別の実施態様において、最終段階培地は、CSL を含む。別の実施態様において、最終段階培地は、炭酸カルシウムを含む。別の実施態様において、最終段階培地は、Foam Doctor などの消泡剤を含む。別の実施態様において、最終段階培地は、ラクツロースを含む。別の実施態様において、最終段階培地は、メリトース (デキストロース) を含む。別の実施態様において、最終段階培地は、ガラクトースを含む。

30

【 0 0 7 6 】

別の実施態様において、最終段階培地は、綿実粉、グルコース、ラクトース、グリセロール、CSL、炭酸カルシウム、消泡剤、ラクツロースおよびメリトース (デキストロース) の 1 種以上を含む。

【 0 0 7 7 】

別の実施態様において、最終段階培地は、綿実粉、グルコース、ラクトース、グリセロール、CSL、炭酸カルシウムおよび消泡剤を含む。

40

【 0 0 7 8 】

別の実施態様において、最終段階培地は、綿実粉、グルコース、ラクツロース、グリセロール、CSL、炭酸カルシウムおよび消泡剤を含む。

【 0 0 7 9 】

別の実施態様において、最終段階培地は、綿実粉、グルコース、グリセロール、CSL、炭酸カルシウムおよび消泡剤を含む。

【 0 0 8 0 】

一実施態様において、最終段階培地は、綿実粉 例え ば 0 ~ 5 %、CSL 例え ば 0 ~ 1 . 0 %、ラクトース 例え ば 0 ~ 4 %、グルコース 例え ば 0 ~ 2 . 5 %、グリセロール

50

例えば 0 ~ 8 %、炭酸カルシウム 例 えば 0 ~ 1 . 6 % および消泡剤 例 えば 0 ~ 0 . 2 % のいずれか 1 種または全種を含む。

【 0 0 8 1 】

別の実施態様において、最終段階培地は、綿実粉、ラクトース、メリトース（デキストロース）、グリセロール、CSL、炭酸カルシウムおよび消泡剤を含む。

【 0 0 8 2 】

別の実施態様において、最終段階培地は、綿実粉 例 えば 0 ~ 5 %、CSL 例 えば 0 ~ 1 . 0 %、ラクトース例 えば 0 ~ 4 %、メリトース（デキストロース）例 えば 0 ~ 3 . 0 %、グリセロール 例 えば 0 ~ 8 %、炭酸カルシウム 例 えば 0 ~ 1 . 6 % および消泡剤 例 えば 0 ~ 0 . 2 % のいずれか 1 種または全種を含む。

10

【 0 0 8 3 】

別の実施態様において、最終段階培地は、綿実粉、ラクツロース、メリトース（デキストロース）、グリセロール、CSL、炭酸カルシウムおよびFoam Doctorを含む。

【 0 0 8 4 】

一実施態様において、最終段階培地は、綿実粉 例 えば 0 ~ 5 %、CSL 例 えば 0 ~ 1 . 0 %、ラクツロース 例 えば 0 ~ 4 %、メリトース（デキストロース）例 えば 0 ~ 3 . 0 %、グリセロール 例 えば 0 ~ 8 %、炭酸カルシウム例 えば 0 ~ 1 . 6 % および消泡剤 例 えば 0 ~ 0 . 2 % のいずれか 1 種または全種を含む。

【 0 0 8 5 】

一実施態様において、最終段階培地は、綿実粉 例 えば 0 ~ 5 %、CSL例 えば 0 ~ 1 . 0 %、ガラクトース 例 えば 0 ~ 4 %、デキストロース 例 えば 0 ~ 3 . 0 %、グリセロール 例 えば 0 ~ 8 %、炭酸カルシウム 例 えば 0 ~ 1 . 6 % および消泡剤 例 えば 0 ~ 0 . 2 % のいずれか 1 種または全種を含む。

20

【 0 0 8 6 】

別の実施態様において、最終段階培地は、実質的に、本明細書の実施例のいずれかにおいて記載されるとおりである。

【 0 0 8 7 】

別の実施態様において、生産局面（最終段階）は、綿実粉 例 えば 0 ~ 5 %、CSL 例 えば 0 ~ 1 . 0 %、ラクトース 例 えば 0 ~ 4 %、グルコース 例 えば 0 ~ 3 . 0 %、グリセロール 例 えば 0 ~ 8 %、炭酸カルシウム 例 えば 0 ~ 1 . 6 % および消泡剤 例 えば 0 ~ 0 . 2 % を含む液体培地中の有機物を培養することを含む。

30

【 0 0 8 8 】

最終段階培地の pH を、最終発酵段階の前および / または最中に、好適に調節してもよい。最終段階培地の pH を、本明細書の上記第 2 . 2 節に記載したとおりに好適に調節してもよい。一実施態様において、最終段階培地を、例えば約 7 . 2 の pH など、7 . 0 ~ 8 . 0 の間の pH に調節する。一実施態様において、pH を、NaOH を使用して調節する。

【 0 0 8 9 】

最終発酵段階を、本明細書の上記第 2 . 2 節に記載したとおりの制御された通気の条件下で好適に実施してもよい。一実施態様において、通気を、攪拌および培地を介する滅菌空気の通過により制御する。

40

【 0 0 9 0 】

最終発酵段階を、本明細書の上記第 2 . 2 節に記載したとおりの制御された温度の条件下で好適に実施してもよい。一実施態様において、シード発酵を 15 ° C ~ 35 ° C の間で実施する。例えば、最終段階発酵を 25 ° C、26 ° C、27 ° C、28 ° C、29 ° C、30 ° C、31 ° C、32 ° C、33 ° C、34 ° C または 35 ° C で実施する。例えば、最終段階発酵を、約 28 ° C で実施する。

【 0 0 9 1 】

最終発酵段階を、少なくとも 1 種のイミノ糖を生産するのに十分な時間培養する。一実施態様において、培養を、約 12 ~ 24 時間継続する。別の実施態様において、培養を、

50

約 24 ~ 36 時間、36 ~ 48 時間、48 ~ 72 時間、72 ~ 96 時間、96 ~ 120 時間、120 ~ 144 時間、144 ~ 168 時間、168 ~ 192 時間、192 ~ 216 時間、216 ~ 240 時間、240 ~ 264 時間、264 ~ 288 時間または 228 時間を超えて、例えば 280 時間以上、継続する。

【0092】

3. 所望の化合物の検出、収集および単離

本発明の方法側面の実施態様において、微生物はミガラストットを生産する。別の実施態様において、ミガラストットは、ガラクトスタチンを生産する。別の実施態様において、微生物は、ミガラストットおよびガラクトスタチンを生産する。

【0093】

本発明の手法には、所望の化合物（例えば、ミガラストットまたはガラクトスタチン）を収集する工程をさらに含むことが可能である。用語、所望の化合物を「収集する」には、培地から化合物を、抽出すること、採取すること、単離することまたは精製することを含む。化合物の収集は、特に限定されないが、従来樹脂（例えば、アニオンまたはカチオン交換樹脂、非イオン性吸収樹脂等）による処理、従来吸収剤（例えば、活性炭、ケイ酸、シリカゲル、セルロース、アルミナ等）による処理、pHの変更、溶剤抽出（例えば、アルコール、酢酸エチル、ヘキサン等の従来溶剤による）、透析、ろ過、濃縮、結晶化、再結晶化、pH調節、凍結乾燥等を含む、当技術分野で公知の、任意の従来単離または浄化の手法により行うことができる。例えば、第一に培養から微生物を除去することにより、化合物を培地から収集することができる。培地を、次いで、カチオンを除去するためにカチオン交換樹脂へ通すかまたは渡し、次いで、目的の化合物より強い酸性を有する無機アニオンおよび有機酸を除去するためにアニオン交換樹脂へ通すかまたは渡す。単離した目的のイミノ糖は、本明細書に記載したとおり、続けて塩（例えば、塩酸塩）へ変換することができる。

【0094】

一実施態様において、収集は以下の1工程以上を含む。

【0095】

(a) 脱汚泥 (desludging) : 例えばディスクスタック遠心単離機などの好適なプロセス遠心分離機を用いて、後のろ過段階を容易にするため、有利には、プロス固体を除去する。後のろ過装置の規模および配置次第で、この段階を省略してもよく、例えば、採取でのプロスを、平面シートで配置したか、または、より非効果的には、スパイラル網状に配置した膜の使用により直接的に清澄してもよい。

【0096】

(b) ろ過 - 初期の清澄には、好適には、分子量 10 ~ 50 kDa の切断膜（例えば、10 kDa 膜）を、理想的には平面シート配置で使用する。任意の親水性膜を使用してもよく、典型的には、PES（ポリエーテルスルホン）またはCA（酢酸セルロース）である。膜未透過流、即ち不要流中のイミノ糖の濃度を下げたための透析ろ過を使用することにより、所望のイミノ糖収集を改善することができる。典型的には、3透析ろ過工程を行い、各工程で加える透析ろ液量と等しい透過液量を除外する。当初の 10 ~ 50 kDa 透過液および 1 kDa 分子量の切断膜により添加した任意の透析ろ液を限外ろ過することにより、分別前にさらなる精製を達成することができる。再度、典型的には、既に記載した方法の3つの透析ろ過を使用した、1 kDa システム内での透析ろ過により、所望のイミノ糖の収集を改善することができる。

【0097】

(c) 分別、例えばカチオン交換樹脂を使用して - 一実施態様において、所望のイミノ糖 (amino sugar) を、カチオン交換カラムに捕捉し、塩酸の段階勾配を使用して、樹脂から溶離する。10 ~ 50 kDa または 1 kDa のいずれかで処理した、5 ~ 25 bed の間の量の限外ろ液を、カチオン交換樹脂へ搭載することができる。典型的には、樹脂を、好適なカラムに収容するが、所望の生産物を、攪拌による限外ろ液への樹脂を添加することで捕捉し、且つ、その後ろ過により、任意の好適な培地および装置に収集することも

10

20

30

40

50

できる。好適な樹脂は、典型的には、しかし排他的でなく、例えばスルホンなどの、好適な官能基を有する、スチレンジビニルベンゼン共重合体である。樹脂に好適な粒子サイズは、カラム内に収容された際、良好な流動特性に適合するサイズであり、例えば200~250ミクロンである。より小さい粒子サイズでより高い単離有効性を達成することができる。より大きな樹脂粒子については逆であり、より高いカラム流動率を達成することができる。残渣限外ろ液の空隙容量の排出の後、典型的には塩酸などの、酸の希釈溶液で樹脂を溶離することにより、所望のイミノ糖を収集することができる。好適な酸濃度は、0.1~0.5モルである。有利的には、溶離を勾配溶離として行うことができ、所望のイミノ糖の精製を容易にする。カチオン交換段階の溶離を、他のカチオン、特に NH_4^+ を使用して実行することもできる。

10

【0098】

(d) pHの調節：一実施態様において、(c)からの滞留分(pooled fraction)のpHを、攪拌と、例えば水酸化ナトリウムなどの好適な滴定剤の添加により、pH6~7へ調節する。さらなる実施態様において、(c)からの滞留分のpHを、好適なアニオン交換樹脂を使用して調節する。好適なアニオン交換樹脂には、Dow IRA 67またはDowex marathon WBAを含む。pHを調節するためのアニオン交換樹脂の使用により、有利には、液体中の付加的無機物の望ましくないレベルにつながる滴定剤の追加を回避する。

【0099】

(e)濃縮：これは、未透過液中のイミノ糖を濃縮するのに十分保持力がある膜を使用してナノろ過(逆浸透)することにより、好適に実施してもよい。あるいは、カチオン交換工程(c)からの選択部分を濃縮またはさらに濃縮するために、蒸発を使用してもよい。

20

【0100】

(f)塩への変換：これは、濃縮塩酸などの酸を添加することにより、好適に実施してもよい。塩を、エタノールなどの抗溶剤の添加を原因とする沈殿の後に、固体として単離する。本発明の方法側面の実施態様において、ミガラスタット遊離塩基を、例えばミガラスタットHClなどのミガラスタット塩に変換する。

【0101】

(g)再結晶化：一実施態様において、これは、水中でミガラスタット塩酸塩を溶解し、エタノールなどの抗溶剤の添加により引き起こされる沈殿の後、固体を単離することにより、実施してもよい。

30

【0102】

一実施態様において、ミガラスタットの収集は、上記の工程の全てを含む。別の実施態様において、ガラクトスタチンの収集は、上記の工程の全てを含む。一実施態様において、収集工程には、脱汚泥、ろ過、分別、pH調節、濃縮、塩への変換および再結晶化からなる群から選択される少なくとも1つの方法を含む。

【0103】

別の実施態様において、イミノ糖を、結果として得た製剤が、他の培地成分を実質的に含まない(例えば、培地成分および/または発酵副産物を含まない)ように「抽出される」、「単離される」または「精製される」。用語「他の培地成分を実質的に含まない」とは、化合物が、それ自体が生産された培地からの培地成分または発酵副産物から分離された、所望の化合物の製剤を含む。一実施態様において、製剤は、所望の化合物の約80%(乾燥重量にて)より多い(例えば、他の培地成分または発酵副産物の約20%より少ない)。別の実施態様において、製剤は、所望の化合物の約90%より多い(例えば、他の培地成分または発酵副産物の約10%より少ない)。別の実施態様において、製剤は、所望の化合物の約95%より多い(例えば、他の培地成分または発酵副産物の約5%より少ない)。また別の実施態様において、製剤は、所望の化合物の約98~99%より多い(例えば、他の培地成分または発酵副産物の約1~2%より少ない)。所望の化合物が塩へ誘導体化されると、化合物は、塩の形成に関連して化学的汚染物をさらに含まないことがある。所望の化合物がアルコールへ誘導体化されると、アルコールの形成に関連して化学

40

50

的汚染物をさらに含まないことがある。

【0104】

別の実施態様において、イミノ糖は、例えば、微生物が生物学的に無害（即ち、安全）である場合、微生物から精製されない。例えば、培養物（または培養浮遊物）全体を生産物（即ち、粗生産物）源として使用することができる。一実施態様において、培養物（または培養浮遊物）を改良なく使用する。別の実施態様において、培養物（または培養浮遊物）を濃縮する。また別の実施態様において、培養物（または培養浮遊物）を乾燥または凍結乾燥する。

【0105】

好適には、本発明の生産方法は、顕著に高い収率での所望の化合物の生産をもたらす。語句「顕著に高い収率」とは、十分に高まっているか、または競合の生産方法で通常とされる生産レベルまたは収率を上回っている、生産レベルまたは収率、例えば、所望の生産物の商業的生産に十分なレベルまで高まっている、生産レベルまたは収率を含む（例えば、商業的実行可能なコストによる生産物の生産）。一実施態様において、本発明は、所望の生産物（例えば、ミガラスタット）が0.5 g/Lを超えたレベルで生産されるような条件下で、組換え微生物を培養することを含む生産方法を特色とする。本発明の任意の側面の一実施態様において、少なくとも0.5 g/Lのイミノ糖が生産されるまで培養を継続する。一実施態様において、少なくとも1.0 g/Lのイミノ糖が生産されるまで培養を継続する。一実施態様において、少なくとも1.3 g/Lのイミノ糖が生産されるまで培養を継続する。一実施態様において、少なくとも1.5 g/Lのミガラスタットが生産されるまで培養を継続する。一実施態様において、少なくとも2.0 g/Lのイミノ糖が生産されるまで培養を継続する。一実施態様において、少なくとも2.4 g/Lのイミノ糖が生産されるまで培養を継続する。一実施態様において、少なくとも1.0 g/Lのミガラスタットが生産されるまで培養を継続する。一実施態様において、少なくとも1.3 g/Lのミガラスタットが生産されるまで培養を継続する。一実施態様において、少なくとも1.5 g/Lのミガラスタットが生産されるまで培養を継続する。一実施態様において、少なくとも2.0 g/Lのミガラスタットが生産されるまで培養を継続する。一実施態様において、少なくとも2.4 g/Lのミガラスタットが生産されるまで培養を継続する。一実施態様において、少なくとも1.0 g/Lのガラクトスタチンが生産されるまで培養を継続する。一実施態様において、少なくとも1.3 g/Lのガラクトスタチンが生産されるまで培養を継続する。一実施態様において、少なくとも1.5 g/Lのガラクトスタチンが生産されるまで培養を継続する。一実施態様において、少なくとも2.0 g/Lのガラクトスタチンが生産されるまで培養を継続する。一実施態様において、少なくとも2.4 g/Lのガラクトスタチンが生産されるまで培養を継続する。

【0106】

好適には、本発明の微生物には、ミガラスタットが生産されるように、少なくとも1種の生合成エンハンサー（biosynthetic enhancer）が提供される（即ち、供給される）。用語「生合成エンハンサー」または「エンハンサー」とは、微生物の培地中に提供されたか、接触のために持ち込まれたか、または含まれた際に、例えばミガラスタットなどの生合成を向上させるかまたは増加させるのに役立つ薬剤または化合物を含む。用語「生合成エンハンサー」または「エンハンサー」には、それらの範囲において「生合成前駆体」または「前駆体」を含む。本発明の側面において、生合成エンハンサーの存在下でイミノ糖を生産する細菌を培養することを含む、ミガラスタットの生産方法を提供する。

【0107】

好適なイミノ糖生産細菌を、細菌を培養すること、および、培養プロセス中のイミノ糖の存在をスクリーニングすることにより同定してもよい。上記の第1節に記載したとおり、商業的供給源からのグリコシダーゼアッセイの使用により、イミノ糖を培養プロセス中で検出してもよい。本発明の側面において、使用に好適な細菌は、上記の第1節に記載したとおりであり、ストレプトマイセス・ライジカス（*Streptomyces lydicus*）、ストレプトマイセス・サブリティラス（*Streptomyces subrutilus*）、ストレプトマイセス・ラベンジ

10

20

30

40

50

ユレ (*Streptomyces lavendulae*)、ストレプトマイセス・アナラトス (*Streptomyces anulatus*)、ストレプトマイセス・エスピー (*Streptomyces sp*) BTA530株 (NCIMB 42142株) およびストレプトマイセス・ライジカス (*Streptomyces lydicus*) ATCC319075株からなる群から選択される、ストレプトマイセス (*Streptomyces*) 菌を含む。第2節に記載した培地、培養条件および培養方法が、本発明の側面において使用に好適である。

【0108】

好適な生体エンハンサー (bioenhancer) は、培養される微生物の生き残りおよび複製だけでなく、むしろ、本発明の方法における所望のイミノ糖の生産を特異的に誘導する、任意の添加基質を含む。例えば、一実施態様において、生合成エンハンサーまたはエンハンサーは、ラクトースである。別の実施態様において、生合成エンハンサーまたはエンハンサーは、ラクツロースである。添加される生合成エンハンサー (例えば、ラクトース、ラクツロース) の量は、好ましくは、微生物の生産性を向上させるのに十分な濃度を培地中にもたす量である (例えば、ミガラスタットの生産を向上させるのに十分な濃度)。用語「過剰ラクトース」および「過剰ラクツロース」とは、ラクトースまたはラクツロースの、問題の微生物を培養するのに通常使用されるレベルより増加したか、またはより高いレベルを含む。従って、過剰ラクトースレベルは、50%のレベルまで、例えば1~10%、例えば4%を含むことができる。本発明の生合成エンハンサーは、濃縮された溶液または懸濁液の形態 (例えば、水または緩衝液などの好適な溶剤) または固体の形態 (例えば、パウダーの形態) で添加することができる。さらに、本発明の生合成エンハンサーは、単一アリコートで、所与の時間中、連続的または断続的に添加することができる。

10

20

【0109】

微生物がガラクトスタチンを生産する本発明の実施態様において、ガラクトスタチンを、ミガラスタットへ変換してもよい。一実施態様における、条件が、細菌がガラクトスタチンを生産するのに好適である本発明の方法において、方法には、培地中でガラクトスタチンを検出し、当該ガラクトスタチンをミガラスタットへ変換することが含まれる。一実施態様において、ガラクトスタチンを、培養中にミガラスタットへ変換してもよい。別の実施態様において、ガラクトスタチンを、ミガラスタットへ変換する前に単離する。一実施態様において、ガラクトスタチンの変換を、化学的変換を介して行ってもよい。例えば、プラチナ触媒との触媒的水素化または NaBH_4 との化学的還元により、ガラクトスタチンを DGJ に変換することができる。好適な方法は、Legler & Pohl, Carbohydr. Res., 155 (1986) 119-129に記載されている。本実施態様において、ガラクトスタチンを、ミガラスタットへの化学的変換前に単離してもよい。別の実施態様において、ガラクトスタチンを、ミガラスタットへの化学的変換前には単離しない。

30

【0110】

別の実施態様において、ガラクトスタチンのミガラスタットへの変換を、生体内変化を経由して実施してもよい。これは、生体内変化微生物を使用することで好適に実施してもよい。「生体内変化微生物 (biotransformation microorganism)」とは、ガラクトスタチンをミガラスタットへ変換する酵素を含む任意の微生物である。好適な生体内変化微生物は、ガラクトスタチンを含む培地で培養されている微生物の培養プロセス中のミガラスタットの存在をスクリーニングすることにより同定してもよい。生体内変化微生物は、イミノ糖を生産すると既に知られている微生物であってもよい。あるいは、イミノ糖を生産すると既に知られていない微生物であってもよい。生体内変化微生物は、好適には、グラム陽性菌である。例えば、微生物は好適には、アクチノ細菌である。好適な微生物は、ストレプトマイセス (*Streptomycetaceae*) 科に属し、例としてストレプトマイセス (*Streptomyces*) 属またはストレプトベルティシリウム (*Streptoverticillium*) 属の微生物が挙げられる。あるいは、好適な微生物は、バチルス (*Bacillus*) 属、パエニバチルス (*Paenibacillus*) 属、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属、ラクトバチルス (*Lactobacillus*) 属およびラクトコッカス (*Lactococci*) 属からなる群から選択される属に属する。

40

【0111】

生体内変化微生物は、好適にはグラム陰性菌である。例えば、好適な微生物は、サルモ

50

ネラ (Salmonella) 属、エシェリキア (Escherichia) 属、クレブシエラ (Klebsiella) 属、セラシア (Serratia) 属およびプロテウス (Proteus) 属からなる群から選択される属に属する。一実施態様において、微生物は、エシェリキア (Escherichia) 属に属する。一実施態様において、微生物は、大腸菌である。別の実施態様において、微生物は、真核微生物である。一実施態様において、微生物は、真菌である。一実施態様において、微生物は、サッカロマイセス (Saccharomyces) 属に属する。例えば、サッカロマイセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae) である。

【0112】

本発明の当該側面の一実施態様において、生体内変化微生物は、ストレプトマイセス・エスピー (Streptomyces sp) である。別の実施態様において、生体内変化微生物は、バチルス・エスピー (Bacillus sp) である。別の実施態様において、生体内変化微生物は、ストレプトマイセス・サブリティラス (Streptomyces subutilus)、バチルス・アトロファエウス (Bacillus atrophaeus) またはストレプトマイセス・クラブリゲルス (Streptomyces clavuligerus) である。本発明の側面において使用しうる特定の細菌株には、本発明者らが、1種のイミノ糖から別のイミノ糖への生体内変化の能力があることを見出した、ストレプトマイセス・クラブリゲルス (Streptomyces clavuligerus) ATCC 27064 株を含む。

10

【0113】

生体内変化は、例えば培養中の植物細胞などの他の手段により好適に実施してもよい。培養に好適な植物細胞には、クワ (Morus alba) (桑の実) またはコメリナ・コムニス (Commelina communis) (ツククサ) からの植物細胞を含んでもよい。

20

【0114】

一実施態様において、ガラクトスタチンが、ミガラスタットへの生体内変化前に単離される。別の実施態様において、ガラクトスタチンが、ミガラスタットへの生体内変化前に単離されない。

【0115】

ミガラスタットを単離し、塩形態で使用する場合、ミガラスタットの塩は薬学的に許容可能であるべきである。好適な薬学的に許容可能な塩は、当業者にとり明白である。薬学的に許容可能な塩は、Berge, Bighley and Monkhouse J.Pharm.Sci (1977) 66, pp 1-19 に記載されたものを含む。当該薬学的に許容可能な塩は、例えば塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸などの無機酸、および、例えばコハク酸、マレイン酸、酢酸、フマル酸、クエン酸、酒石酸、安息香酸、p-トルエンスルホン酸、メタンスルホン酸またはナフタレンスルホン酸などの有機酸とで形成される酸付加塩を含む。例えばシュウ酸塩またはギ酸塩などの他の塩を使用してもよく、例えば、ミガラスタットの単離に用いられてもよく、かつ本発明の範囲内に含まれる。本発明の一実施態様において、ミガラスタットは、ミガラスタット塩酸として単離される。

30

【0116】

ミガラスタットは、1種以上の等価の酸と酸付加塩を形成してもよい。本発明は、本発明の範囲内において、全ての可能な化学量論および非化学量論の形態におけるミガラスタットの使用を含む。

40

【0117】

ミガラスタットは、結晶性または非結晶性の形態で調製してもよく、結晶性の場合、場合により、例えば水和物として、溶媒和されていてもよい。本発明は、本発明の範囲内において、可変的量の溶媒 (例えば、水) を含むミガラスタットだけでなく、化学量論的溶媒 (例えば、水和物) を含む。さらに、異なる結晶化条件により、結晶生産物の異なる多様型形態の形成がもたらされてもよい。本発明は、本発明の範囲内において、任意の多様型形態におけるミガラスタットの使用を含む。

【0118】

本発明は、ミガラスタットの医薬組成物における使用に関するため、化合物が、実質的に純粋な形態で好ましくは提供されることは容易に理解されることであり、例として、少

50

なくとも純度60%、より好適には少なくとも純度75%、および好ましくは少なくとも純度85%、特に少なくとも純度98%が挙げられる(%は、重量対重量に基づく(weight for weight basis))。化合物の純粋でない処方物は、医薬組成物において使用される、より純粋な形態に調製するために使用してもよい。

【0119】

本発明は、療法における使用のための、本発明の方法に従い生産したミガラスタット、または、それらの薬学的に許容可能な塩も提供する。本発明は、ファブリー病の治療または予防を必要とする対象における、ファブリー病の治療または予防の方法であって、前記対象に、本発明の方法により生産したミガラスタットまたはそれらの薬学的に許容可能な塩の有効量を投与することを含む方法を提供する。

10

【0120】

本発明は、ファブリー病の治療または予防で使用するための薬剤の製造における、本発明の方法に従い生産したミガラスタットまたはそれらの薬学的に許容可能な塩の使用も提供する。療法における使用のため、ミガラスタットは、通常、医薬組成物として投与される。

【0121】

ミガラスタットまたはそれらの薬学的に許容可能な塩は、例えば、経口、非経口、口腔、舌下、鼻腔、直腸または経皮投与によるなど、任意の便宜的方法で投与してもよく、医薬組成物は、適宜適応される。

【0122】

経口的に与えられた際に有効である、ミガラスタットまたはそれらの薬学的に許容可能な塩は、例えば、シロップ、懸濁液、乳液、錠剤、カプセルまたは薬用ドロップなどの液体または固体に製剤化することができる。

20

【0123】

液体製剤は、例えば、水、エタノールまたはグリセリンなどの水溶性溶剤、または、ポリエチレングリコールまたは油などの非水溶性溶剤などの、好適な液体担体内の有効成分の懸濁液または溶液から一般的に構成される。製剤には、懸濁剤、防腐剤、着香料および/または着色料が含まれてもよい。

【0124】

錠剤形態の組成物は、例えば、ステアリン酸マグネシウム、でんぷん、ラクトース、スクロースおよびセルロースなどの固体制剤を調製するために通常使用する、任意の好適な薬学的担体を使用して調製することができる。

30

【0125】

カプセル形態の組成物は、通常の方法を使用して調製することができ、例として、有効成分を含むペレットは、標準担体を使用し、次いで硬ゼラチンカプセルに充填することで調製することができ、あるいは、分散剤または懸濁剤は、例えば、水溶性ガム、セルロース、ケイ酸塩または油などの任意の好適な薬学的担体を使用して、分散剤または懸濁剤を次いで軟ゼラチンカプセルに充填することにより調製することができる。

【0126】

典型的な非経口組成物は、例えば、ポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン、レシチン、ラッカセイ油またはごま油などの滅菌水溶性担体または非経口的許容な油内の有効成分の溶液または懸濁液から構成される。あるいは、溶液を凍結乾燥し、次いで投与直前に好適な溶剤によって再構成することができる。

40

【0127】

鼻腔投与用組成物は、エアゾール、ドロップ、ゲルおよびパウダーとして便宜的に製剤化することができる。エアゾール製剤は、典型的には、薬学的に許容可能な水溶性または非水溶性溶剤内の有効成分の溶剤または純度の高い懸濁剤を含み、通常は単一または複数投薬量で、滅菌形態で、使用のため噴射器付きのカートリッジまたは詰め替えの形態をとることができる密封容器で提供される。あるいは、密封容器は、単回投与鼻吸入器または絞り弁付きエアゾールディスペンサー(aerosol dispenser)などの使い捨て投薬装置で

50

あってもよい。投薬形態がエアゾールディスペンサーを含む場合、例えば空気などの圧縮ガスであってもよい高圧ガス、または、例えばフルオロクロロ炭化水素またはヒドロフルオロカーボンなどの有機高圧ガスを含むことになる。エアゾール投薬形態は、ポンプ式吸入器の形態を採用してもよい。

【0128】

口腔投与または舌下投与に好適な組成物は、錠剤、薬用ドロップおよびトローチ剤を含み、有効成分は、砂糖およびアカシア、トラガカントまたはゼラチンおよびグリセリンなどの担体と製剤される。

【0129】

直腸投与の組成物は、便宜的に、ココアバターなどの従来の坐薬基質を含む坐薬の形態である。

【0130】

経皮投与に好適な組成物は、塗り薬、ゲルおよびパッチを含む。

【0131】

一実施態様において、組成物は、錠剤、カプセルまたはアンプルなどの投与形態単位である。

【0132】

組成物は、投与方法により、有効成分に対して0.1~100重量%、例えば10~60重量%含んでもよい。組成物は、投与方法により、担体に対して0~99重量%、例えば40~90重量%含んでもよい。組成物は、投与方法により、有効成分に対して0.05~1000mg、例えば1.0~500mg含んでもよい。組成物は、投与方法により、担体中50~1000mg、例えば100~400mg含んでもよい。前記疾患の治療において使用される化合物の投薬量は、疾患の重症度、患者の体重、および他の同様因子により、通常のように可変的である。しかし、一般的指針として、好適な投薬単位は、0.05~1000mg、より好適には1.0~500mgであってもよく、且つ、それらの投薬単位は、1日あたり1回以上、例えば1日2回または3回投与されてもよい。当該療法は、数週または数か月延長されてもよい。投薬量およびレジメンは次から選択されてもよい：1日2回25mg；1日1回50mg；1日2回50mg；2日に1回50mg；1日1回75mg；1日2回75mg；1日1回100mg；1日2回100mg；1日1回150mg；1日2回150mg；2日に1回150mg；1日1回250mg；1日2回250mg；および2日に1回250mg。特定の実施態様において、投薬量およびレジメンは2日に1回150mgである。特定の一実施態様において、投薬量およびレジメンは、2日に1回150mgミガラスタットHClである。

【0133】

本明細書に記載されるとおり、治療に関する任意の参照は、確立された予後および予防治療の両方を含むものと理解されるべきである。

【0134】

本発明の別の側面において、ミガラスタット、その塩および/または薬学的に許容可能な組成物は、別の治療的に有効な薬剤と組み合わせて使用してもよい。一実施態様において、本発明の方法に従い生産したミガラスタットを、ファブリー病の治療のため、置換-ガラクトシダーゼA酵素(-Gal A)との組合せで使用してもよい。ファブリー病の治療には、現在2種の-Gal A製品が入手可能である：アガルシダーゼアルファ(agalsidase alfa) (Replagal (商標)、シャーヒューマンジェネティックセラピーズ社(Shire Human Genetic Therapies)) およびアガルシダーゼベータ(agalsidase beta) (Fabrazyme (商標)、ゲンザイム社(Genzyme Corporation))。上記による組合せは、医薬組成物の形態で、使用のため便宜的に提供されてもよく、従って、1種以上の薬学的に許容可能な担体および/または賦形剤とあわせて、上記で定義される組合せを含む医薬組成物は、さらに本発明の側面を表す。

【0135】

当該組合せの個々の化合物を、別々の、または組み合わせた1種または複数の医薬組成

10

20

30

40

50

物で、連続的にまたは同時のいずれかにより投与してもよい。

【0136】

本発明は、本明細書で定義する組合せを調製する方法であって、
 (a) 組合せの個々の化合物を連続的に、または同時に、のいずれかで投与するために別々の医薬組成物を調製すること、または
 (b) 組合せの個々の化合物を同時に投与するために、組み合わせた医薬組成物を調製すること、
 のいずれかを含む方法を提供し、
 該医薬組成物が、1種以上の薬学的に許容可能な担体および/または賦形剤との組合せを含む方法を提供する。

10

【実施例】

【0137】

本発明は、以下の特定の実施例を参照して説明されるが、これらの実施例により限定されるものではない。

【0138】

実施例1：DGJおよびガラクトスタチンを生産する微生物を同定するためのGCCaseアッセイの使用

DGJおよびガラクトスタチンの生化学的検出のために、商業的供給源からの数個のグリコシダーセアッセイが設定された(即ち、生コーヒー豆由来の -ガラクトシダーセおよび米由来の -グルコシダーセ)。これらのアッセイで、酸性pHにおける基質として対応の4-ニトロフェニル - D-グリコピラノシドを使用して、酵素活性を測定した。反応は、室温下で、炭酸ナトリウムの添加により1時間後に終了し、各ウェル(well)内の塩基性pHにおけるその後の4-ニトロフェノラートの形成を、384wマイクロプレートリーダーを使用して400nmでの吸収率(Abs)により測定した。これらアッセイが、商業的供給源からの数種のイミノ糖の使用により、妥当性が確認された。

20

【0139】

ピペリジンイミノ糖は、非常に極性であるため、アッセイ内の細胞外培地中で検出することができる。各菌株を、50mlの培地を含む250ml Erlenmeyerフラスコ中で、28℃で、200rpmの軌道攪拌器内で育成した。4発酵日後、培養ブロス50ml Falconへ移し、20分間3000rpmで遠心分離し、次いで4℃で保管した。

30

【0140】

培養ブロスの遠心分離で得た浮遊物を含むスクリーニングサンプルを、10%最終アッセイ濃度で、 -ガラクトシダーセおよび -グルコシダーセに対して、二度試験した。

【0141】

-ガラクトシダーセアッセイを阻害する浮遊物を、HILICカラムを使用してLC/MS(トリプル四重極に接続したuPLC)によりさらに分析し、ギ酸勾配0.1%を含む水/アセトニトリルで、0.6ml/分で、40℃で溶離した。この分析的方法により、0.5ppbまでの対応の商業的標準に対する培養ブロス中の1-デオキシガラクトノジリマイシンの量が定量化される。しかし、ガラクトスタチンの量を、1-デオキシガラクトノジリマイシンと同量(equivalent)と決定した。

40

【0142】

収集した微生物のスクリーニングの間、総じて13個の放線菌株を、1-デオキシガラクトノジリマイシンおよび/またはガラクトスタチンの生産菌株として同定した。表1において、それらの菌株および参考株としてのストレプトマイセス・ライジカス(*Streptomyces lydicus*) ATCC_31975株を報告する。

【0143】

【表 1】

表 1. DGJ および/またはガラクトスタチン生産菌株として微生物スクリーニングにより同定された放線菌

菌株	分類学
BTA122	未知の放線菌
BTA293	未知の放線菌
BTA530	ストレプトマイセス・エスピー (Streptomyces sp) NCIMB 42142 株
BTA1002	未知の放線菌
BTA1088	未知の放線菌
BTA1516	未知の放線菌
BTA1539	ストレプトマイセス・ライジカス (Streptomyces lydicus) ATCC_31975 株
BTA1836	ストレプトベルティシリウム・ロゼオバーチシリウム (Streptoverticillium roseoverticillatum)
BTA1964	ストレプトベルティシリウム・レチキュラム (Streptoverticillium reticulum)
BTA2016	ストレプトマイセス・フェルベンス (Streptomyces fervens)
BTA2024	ストレプトベルティシリウム・サルモニス (Streptoverticillium salmonis)
BTA2052	ストレプトベルティシリウム種 (Streptoverticillium species)
BTA2348	ストレプトマイセス・フェルベンス (Streptomyces fervens)
BTA2474	ストレプトベルティシリウム・バルダシイ (Streptoverticillium baldacii)

10

20

【 0 1 4 4 】

実施例 2 : 1IDGJ発酵

(a) ストレプトマイセス・エスピー (Streptomyces sp) 胞子株の調製

ストレプトマイセス・エスピー (Streptomyces sp) NCIMB 42142株を 26 で、湿度 40 % で、デキストリン 0.3 %、トレハロース二水和物 1 %、K₂HPO₄ 0.05 %、NaCl 0.1 %、MgSO₄・7H₂O 0.1 %、CaCl₂ 0.05 %、カザミノ酸 0.2 %、MOPS 緩衝液 1.05 %、FeSO₄ 0.0001 %、MnSO₄・H₂O 0.000076 %、ZnSO₄・7H₂O 0.0001 %、RO KO寒天 3 %を含む寒天上で 9 ~ 11 日間育成した。胞子を除去し、10 %スクロース中で懸濁し、且つ、およそ - 70 で保管した。必要なアリコート室温で解凍し、Triton X/Saline (0.05 % TritonX 100、0.85 % NaCl) を使用して、必要な濃度を提供するために希釈した。

30

【 0 1 4 5 】

(b) シード段階発酵の調製および接種

計量容器 (batching vessel) 内で、Arcon F (タンパク質源) 2.5 %、デキストリン 2.0 %、硫酸マグネシウム 0.25 %、オルトリン酸塩二水素カリウム 0.1 %、菜種油 0.1 %、塩化カルシウム 0.02 %、塩化マグネシウム 0.02 %、塩化ナトリウム 0.02 %、塩化鉄 0.01 %、塩化亜鉛 0.001 %、塩化銅 0.001 %、硫酸マンガン 0.001 % を計量することにより、3 L t s のシード培地を調製した。水酸化ナトリウムにより、培地を pH 7.7 に調節し、500 ml 振とうフラスコ内へ容積 100 ml を分注し、20 分間 121 で滅菌した。6 × 10⁴ 個 / ml の最終濃度を提供するため、1.0 ml s の胞子を各シードフラスコへ導入し、28 および 220 rpm で、48 時間インキュベートした。

40

【 0 1 4 6 】

(c) 最終段階発酵の調製および接種

計量容器内で、綿実粉 (タンパク質源) 2.5 %、ラクトース 1.7 %、メリトース 1.5 %、グリセロール 4 %、CSL (タンパク質源) 0.5 %、炭酸カルシウム 0.8 % および Foam Doctor (消泡剤) 0.1 % を計量することにより、19 L t s の

50

最終段階培地を調製した。水酸化ナトリウムにより、培地を pH 7.2 に調節し、121 で 30 分間滅菌し、シードフラスコからのシードと接種するために準備された各滅菌最終段階容器へ 1.4 L t s を移した。

最終段階容器を 1400 r p m、通気量 1.1 L / m i n、28 で設定し、培地は、滅菌後 pH 調節しなかった。

48 時間育成した 40 m l s のシードを、各最終段階容器内へ移し、上記条件下で 214 時間インキュベートした。この規模では、溶存酸素レベルを測定または維持しなかった。

最終段階発酵を、pH、粘度および全体を通したミガラストットの製造について測定し、且つ、ミガラストット濃度が 1700 u g / m l のレベルとなった時に採取した。

10

【0147】

実施例 3 10l DGJ発酵スケールアップ

(a) ストレプトマイセス・エスピー (*Streptomyces sp*) 孢子株の調製

ストレプトマイセス・エスピー (*Streptomyces sp*) NCIMB 42142 株を 26 で、湿度 40 % で、デキストリン 0.3 %、トレハロース二水和物 1 %、K₂HPO₄ 0.05 %、NaCl 0.1 %、MgSO₄ · 7H₂O 0.1 %、CaCl₂ 0.05 %、カザミノ酸 0.2 %、MOPS 緩衝液 1.05 %、FeSO₄ 0.0001 %、MnSO₄ · H₂O 0.000076 %、ZnSO₄ · 7H₂O 0.0001 %、ROKO 寒天 3 % を含む寒天上で 9 ~ 11 日間育成した。

孢子を除去し、10 % スクロース中で懸濁し、且つ、およそ -70 で保管した。必要なアリコート室温で解凍し、Triton X/Saline (0.05 % TritonX 100、0.85 % NaCl) を使用して、必要な濃度を提供するために希釈した。

20

【0148】

(b) シード段階発酵の調製および接種

計量容器内で、Arcon F (タンパク質源) 2.12 %、Foam Doctor (消泡剤) 0.194 %、デキストリン 1.82 %、硫酸マグネシウム 0.323 %、オルトリン酸塩二水素カリウム 0.0364 %、菜種油 0.0971 %、炭酸カルシウム 0.0607 % を計量することにより、19 L t s のシード培地を調製した。水酸化ナトリウムにより、培地を pH 7.8 に調節し、40 分間 121 で滅菌し、接種のために準備した滅菌シード容器へ 4 L t s を移した。

30

シード容器を 300 r p m、通気量 2 L / m i n、28 で設定し、培地は、滅菌後 pH 調節しなかった。

シード容器内に最終濃度 1 m L あたり 6×10^4 個の孢子を提供するため、10 m L s の孢子をシード容器内へ導入し、上記条件下で 54 時間インキュベートした。

【0149】

(c) 最終段階発酵の調製および接種

計量容器内で、綿実粉 (タンパク質源) 2.5 %、ラクトース 1.7 %、メリトース 1.5 %、グリセロール 4 %、CSL (タンパク質源) 0.5 %、炭酸カルシウム 0.8 %、および、Foam Doctor (消泡剤) 0.1 % を計量することにより、250 L t s の最終段階培地を調製した。水酸化ナトリウムにより、培地を pH 7.2 に調節し、121 で 30 分間滅菌し、シード容器からのシードとの接種に準備された各滅菌最終段階容器へ 10 L t s を移した。

40

最終段階容器を 300 r p m、通気量 10 L / m i n、28 で設定し、培地は、滅菌後 pH 調節しなかった。

54 時間育成した 250 m l s のシードを、各最終段階容器内へ移し、上記条件下で 214 時間インキュベートした。発酵の間中、攪拌の増加により、溶存酸素レベルを 20 % 超で維持した。

最終段階発酵を、pH、粘度および全体を通したミガラストットの生産について測定し、且つ、ミガラストット濃度が 1500 u g / m l のレベルとなった時に採取した。

【0150】

50

実施例 4 1000/3000I DGJ発酵スケールアップ

(a) ストレプトマイセス・エスピー (*Streptomyces* sp) 胞子株の調製

ストレプトマイセス・エスピー (*Streptomyces* sp) NCIMB 42142株を26℃で、湿度40%で、デキストリン 0.3%、トレハロース二水和物 1%、 K_2HPO_4 0.05%、NaCl 0.1%、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1%、 $CaCl_2$ 0.05%、カザミノ酸 0.2%、MOPS緩衝液 1.05%、 $FeSO_4$ 0.0001%、 $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.000076%、 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.0001%、RO KO寒天 3%を含む寒天上で9~11日間育成した。胞子を除去し、10%スクロース中で懸濁し、且つ、およそ-70℃で保管した。必要なアリコート室温で解凍し、Triton X/Saline (0.05% Triton X 100、0.85% NaCl) を使用して、必要な濃度を与えるために希釈した。

10

【0151】

(b) シード段階発酵の調製および接種

計量容器内で、Arcon F (タンパク質源) 2.12%、Foam Doctor (消泡剤) 0.194%、デキストリン 1.82%、硫酸マグネシウム 0.323%、オルトリン酸塩二水素カリウム 0.0364%、菜種油 0.0971%および炭酸カルシウム 0.0607%を計量することにより、1000 Ltsのシード培地を調製した。水酸化ナトリウムにより、培地をpH 7.8に調節し、40分間121℃で滅菌し、接種のために準備した滅菌シード容器に移した。

シード容器を80 rpm、通気量 $30 Nm^3 / Hr$ 、圧力0.7 bar、28℃で設定し、培地は、滅菌後pH調節しなかった。

20

接種缶 (inoculation can) を経由して、 $6 \times 10^4 / mL$ の濃度で、500 mLsの胞子をシード容器へ導入し、上記条件下で52時間インキュベートした。

【0152】

(c) 最終段階発酵の調製および接種

計量容器内で、綿実粉 (タンパク質源) 2.5%、ラクトース 1.7%、メリトース 1.5%、グリセロール 4%、CSL (タンパク質源) 0.5%、炭酸カルシウム 0.8%およびFoam Doctor (消泡剤) 0.1%を計量することにより、 $2 \times 3000 Lts$ の最終段階培地を調製した。水酸化ナトリウムにより、培地をpH 7.2に調節し、121℃で40分間滅菌し、シード容器からのシードとの接種に準備された2個の滅菌最終段階容器へ移した。最終段階容器を70 rpm、通気量 $110 Nm^3 / Hr$ 、圧力0.7 bar、28℃で設定し、培地は、滅菌後pH調節しなかった。

30

シード容器からの、52時間育成した90 Ltsのシードを、滅菌した移し系 (sterile transfer line) を経由し、各最終段階容器内へ移し、上記条件下で282時間インキュベートした。発酵の間中、溶存酸素レベルを20%超で維持した。

最終段階発酵を、pH、粘度および全体を通したミガラスタットの生産について測定し、且つ、ミガラスタット濃度が $1300 \mu g / mL$ のレベルとなった時に採取した。

【0153】

(d) 限外ろ過によるプロス固体の除去 - この作業は、平面シート配置された10 kDa膜を採用することで成功した。生産物の収集は、この段階で透析ろ過により、向上させてもよい。

40

【0154】

(e) 高分子量材料 (high MWt material) の除去 - 上記の限外ろ過段階からの透過液 (加えて任意の透析ろ液) を、1 kDa膜を使用してさらに限外ろ過する。1 kDa透過液内に、顕著な量の減色を達成できる。重ねて、生産物の収集を、透析ろ過により向上させてもよい。

【0155】

(f) 分別 - 1 kDa限外ろ過からの透過液を、ミガラスタット生産物を捕捉するカチオン交換樹脂 (UBK550) のカラム上に搭載する。脱イオン化水との置換洗浄に続けて、ミガラスタットを、塩酸の段階勾配を使用して、樹脂から溶離する。段階勾配は、生産物が

50

ら幾つかの不純物の分離をもたらす。

【0156】

(g) 滞留分のワークアップ (work-up) - 滞留分は、固体アニオン交換樹脂 (IRA67) を添加し、よく混合することで pH 6 ~ 7 の範囲に調節する。(これにより、溶液中の望ましくないレベルの付加的無機物につながる、滴定剤 (例えば、NaOH) の添加を回避できる。) アニオン交換樹脂を、ろ過により除去し、混入している濃厚ミガラスタット溶液を除去するために洗浄し、次いで継続中の別の方法サイクルへ向け再生する。ろ液を濃縮工程へ進める。

【0157】

(h) 滞留分の濃縮 - pH 調節した滞留分をナノろ過 (別名: 逆浸透膜) により濃縮する。この方法で得ることができるミガラスタットの最終濃縮は、器具および膜に依存する。大きな規模での試行は、この段階で他の不純物を加えて 30 ~ 40 mg/ml を含む濃縮された滞留分が、約 40 barg の浸透圧を有することを示唆する。高度な操作圧力を有する器具により、水の除去が容易になり、ミガラスタットのより高い滴定量につながる。最終所望濃度は、蒸発によってのみによって得られてもよい。

10

【0158】

実施例 5 ミガラスタット HCl 塩の単離

全ての重量、容積および等価は、遊離塩基に関する。

【0159】

(a) プレろ過

ミガラスタット遊離塩基の水溶液をアッセイし、溶液中のミガラスタット遊離塩基の質量を決定した。遊離塩基水溶液 (1.0 wt のミガラスタット遊離塩基に相当する) を GF タイプフィルター (1.2 μm) でろ過し、ろ液を回転蒸発器フラスコ内へ充填する。

20

【0160】

(b) 蒸留および酸分解法

内容物を、次いで真空下 (ジャケット温度 (jacket temperature) 約 45 °C) で投入遊離塩基に対しておよそ重量 1.8 に濃縮する。内容物を 20 ~ 25 °C に冷却し、次いで 36 ~ 37 % w/w の塩酸 (1.95 eq = 1.0 vol) を添加する。内容物を、次いで 45 ~ 50 °C に暖め、約 30 分間攪拌した。得られたスラリー (slurry) を、沈殿した塩化ナトリウムを収集するため、約 30 ~ 35 °C でろ過した。フラスコおよびケーキを 36 ~ 37 % w/w の塩酸 (1.2 eq = 0.6 vol) で洗浄する。

30

【0161】

(c) 結晶化

ろ液を結晶化容器へ移し、15 ~ 20 °C に冷却する。スラリーを生じさせるため、無水エタノール (2.5 vol) を、15 ~ 25 °C で、結晶化容器内へ、少なくとも 30 分間にわたり添加する。内容物を約 20 °C で少なくとも 1 時間攪拌した。生産物をろ過し、無水エタノール (2 x 2.5 vol) で洗浄し、生産物を、溶液を含まずに吸い取る。生産物を、次いで一定の重量を達成するまで、40 °C 以下で乾燥する。

【0162】

期待収率: 理論上 80 ~ 90 %

観察した収率パーセントの範囲: 理論上 80 ~ 90 %

$$V_{\text{min}} = 2 \text{ vol}$$

$$V_{\text{max}} = 3.7 \text{ vol}$$

40

【0163】

実施例 6 ガラクトスタチンの発酵

(a) ストレプトマイセス・ライジカス (Streptomyces lydicus) ATCC319075 孢子株の調製

ストレプトマイセス・ライジカス (Streptomyces lydicus) ATCC319075 株 (Streptomyces lydicus ATCC317095) を 26 °C で、湿度 40 % で、デキストリン 0.3 %、トレハロース二水和物 1 %、K₂HPO₄ 0.05 %、NaCl 0.1 %、MgSO₄ .

50

7 H 2 O 0.1%、CaCl₂ 0.05%、カザミノ酸 0.2%、MOPS 緩衝液 1.05%、FeSO₄ 0.0001%、MnSO₄・H₂O 0.000076%、ZnSO₄・7H₂O 0.0001%、ROKO寒天 3%を含む寒天上で5~7日間育成した。胞子を除去し、10%スクロース中で懸濁し、且つ、およそ-70で保管した。必要なアリコート室温で解凍し、Triton X/Saline (0.05% TritonX 100、0.85% NaCl) を使用して、必要な濃度を提供するために希釈した。

【0164】

(b) シード段階発酵の調製および接種

計量容器内で、Arcon F (タンパク質源) 2.5%、デキストリン 2.0%、硫酸マグネシウム 0.25%、オルトリン酸塩二水素カリウム 0.1%、菜種油 0.1%、塩化カルシウム 0.02%、塩化マグネシウム 0.02%、塩化ナトリウム 0.02%、塩化鉄 0.01%、塩化亜鉛 0.001%、塩化銅 0.001%、硫酸マンガン 0.001%を計量することにより、3 L t s のシード培地を調製した。水酸化ナトリウムにより、培地をpH 7.7に調節し、500 ml 振とうフラスコ内へ容量100 ml を分注し、20分間121で滅菌した。

各シードフラスコに、 6×10^4 / mL の濃度で、1.0 mL s の胞子を導入し、28、220 rpm で48時間インキュベートした。

【0165】

(c) 最終段階発酵の調製および接種

計量容器内で、綿実粉 (タンパク質源) 2.5%、メリトース 1.5%、グリセロール 4%、CSL (タンパク質源) 0.5%、炭酸カルシウム 0.8% およびFoam Doctor (消泡剤) 0.1%を計量することにより、19 L t s の最終段階培地を調製した。水酸化ナトリウムにより、培地をpH 7.2に調節し、次いで121で30分間滅菌し、シードフラスコからのシードとの接種に準備された各滅菌最終段階容器へ1.4 L t s を移した。

最終段階容器を1400 rpm、通気量1.1 L / min、28で設定し、培地は、滅菌後pH調節しなかった。

48時間育成した40 mL s のシードを、各最終段階容器に移し、上記条件下で214時間インキュベートした。この規模では、溶存酸素レベルを測定または維持しない。

最終段階発酵を、pH、粘度および全体を通したガラクトスタチンの生産について測定し、且つ、ガラクトスタチン濃度が1700 μ g / mL に到達した時に採取した。

【0166】

実施例7 ガラクトスタチン硫酸水素塩、(2S, 3R, 4S, 5S, 6R) - 3, 4, 5 - トリヒドロキシ - 6 - (ヒドロキシメチル) ピペリジン - 2 - スルホン酸からのミガラスタット、(2S, 3S, 4R, 5S) - 2 - (ヒドロキシメチル) ピペリジン - 3, 4, 5 - トリオールの調製

メタノール (3 mL) 中のガラクトスタチン硫酸水素塩、(2S, 3R, 4S, 5S, 6R) - 3, 4, 5 - トリヒドロキシ - 6 - (ヒドロキシメチル) ピペリジン - 2 - スルホン酸の懸濁液 (50 mg, 0.206 mmol) に、アセトン酸 (2.5 eq s, 29 μ L, 0.514 mmol) およびアダムス触媒 (PtO₂, 20 mg) を添加した。混合物を、放出前に40および圧力5.5 bar で18時間水酸化した。粗混合物を、次いで、触媒および他の不溶性物質を取り除くためにろ過し、低減された圧力下でろ液を乾燥するまで濃縮して、オフホワイト色の固体として(2R, 3S, 4R, 5S) - 2 - (ヒドロキシメチル) ピペリジン - 3, 4, 5 - トリオール、アセトン酸 (11 mg, 0.067 mmol, 24%) を得た。

¹H NMR: (400MHz, D₂O): 4.21-4.18 (1H, m, CH_{e,q}), 4.11 (1H, ddd, J = 5.0, 10.0, 12.0 Hz, CH_{a,x}), 3.91 (1H, dd, J = 5.0, 12.0 Hz, CH_{a,H_b}), 3.83 (1H, dd, J = 9.0, 12.0 Hz, CH_{a,H_b}), 3.66 (1H, dd, J = 2.0, 10.0 Hz, CH_{a,x}), 3.54 (1H, dd, J = 5.0, 12.0 Hz, CH_{e,q}), 3.44 (1H, dd, J = 5.0, 9.0 Hz, CH_{a,x}), 2.90 (1H, app. t, J = 12.0 Hz, CH_{a,x})。

10

20

30

40

50

【0167】

実施例8：ラクツロースを使用した1IDGJ発酵

(a) ストレプトマイセス・エスピー (Streptomyces sp) 胞子株の調製

pH 7.3の、酵母エキス 0.5%、麦芽エキス 1.0%、グリセロール 0.5%、およびBacto寒天 2%上で育成したBTA530 Y3株の表面育成物を、胞子形成を促進する寒天(デキストリン 0.3%、トレハロース二水和物 1%、 K_2HPO_4 0.05%、 $NaCl$ 0.1%、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1%、 $CaCl_2$ 0.05%、カザミノ酸 0.2%、MOPS緩衝液 1.05%、 $FeSO_4$ 0.0001%、 $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.000076%、 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.0001%、ROKO寒天 3%)上に取り出し、画線した。26℃で、湿度40%で9~11日間のインキュベート後、胞子を取り除き、10%スクロース中で懸濁した。胞子の懸濁液をマスターストック(Master Stock)(MS)として使用し、容積1.2mL、およそ-70℃で保存した。

10

MS冷凍胞子を、室温で解凍し、前記寒天またはデキストリンを除いた同様のものを含んだThompsonボトルを接種するために使用した。26℃、湿度40%で9~11日間のインキュベート後、ボトルを4℃下で18~48時間置いた。胞子を、寒天の表面から取り出し、10%スクロース中に懸濁し、発酵容器への播種に必要なまで、およそ-70℃で、容積1.2、5または15mLで保管した。

【0168】

(b) シード段階発酵の調製および接種

計量容器内で、綿実粉(タンパク質源) 2.5%、メリトース(デキストロース) 1.5%、デキストリン 4%、CSL(タンパク質源) 0.5%、炭酸カルシウム 0.8%を計量することにより、3Ltsのシード培地を調製した。水酸化ナトリウムにより、培地をpH 7.2に調節し、500ml振とうフラスコ内に容積100mlを分注し、20分間121℃で滅菌した。Triton Xを使用してBTA530 Y3胞子株を希釈し、各シードフラスコ内で1mLあたり胞子 1.5×10^7 個の濃度を提供するため、1mLをシードフラスコに添加した。フラスコを、28℃および220rpmで48時間インキュベートした。

20

【0169】

(c) 最終段階発酵の調製および接種

計量容器内で、綿実粉(タンパク質源) 2.5%、ラクツロース 1.7%、メリトース 1.5%、グリセロール 4%、CSL(タンパク質源) 0.5%、炭酸カルシウム 0.8%およびFoam Doctor(消泡剤) 0.1%を計量することにより、19Ltsの最終段階培地を調製した。水酸化ナトリウムにより、培地をpH 7.2に調節し、次いで121℃で30分間滅菌し、シードフラスコからのシードとの接種に準備された各滅菌最終段階容器内に1.4Ltsを移した。最終段階容器を1400rpm、通気量1.1L/min、28℃に設定し、培地は、滅菌後pH調節しなかった。

30

48時間育成した40mlsのシードを、各最終段階容器に移し、上記条件下で214時間インキュベートした。この規模では、溶存酸素レベルを測定または維持しない。

最終段階発酵を、pH、粘度および全体を通したミガラストットの生産について測定し、且つ、ミガラストット濃度が1700ug/mlのレベルとなった時に採取した。

40

【0170】

実施例9：変異ストレプトマイセス・エスピー (Streptomyces sp) を使用した1LDGJ発酵

(a) ストレプトマイセス・エスピー (Streptomyces sp) 胞子株の調製

ストレプトマイセス・エスピー (Streptomyces sp) 変異BTM4株 (NCIMB 42358株)を26℃で、湿度40%で、デキストリン 0.3%、トレハロース二水和物 1%、 K_2HPO_4 0.05%、 $NaCl$ 0.1%、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1%、 $CaCl_2$ 0.05%、カザミノ酸 0.2%、MOPS緩衝液 1.05%、 $FeSO_4$ 0.0001%、 $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.000076%、 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.

50

0.001%、ROKO寒天 3%を含む寒天上で9~11日間育成した。胞子を除去し、10%スクロース中で懸濁し、且つ、およそ-70℃で保管した。必要なアリコート室温で解凍し、Triton X/Saline (0.05% TritonX 100、0.85% NaCl) を使用して、必要な濃度を提供するために希釈した。

【0171】

(b) シード段階発酵の調製および接種

計量容器内で、Arcon F (タンパク質源) 2.5%、デキストリン 2.0%、硫酸マグネシウム 0.25%、オルトリン酸塩二水素カリウム 0.1%、菜種油 0.1%、塩化カルシウム 0.02%、塩化マグネシウム 0.02%、塩化ナトリウム 0.02%、塩化鉄 0.01%、塩化亜鉛 0.001%、塩化銅 0.001%、硫酸マンガン 0.001%を計量することにより、3 L t s のシード培地を調製した。水酸化ナトリウムにより、培地をpH 7.7に調節し、500 ml 振とうフラスコ内に容積100 ml を分注し、20分間121℃で滅菌した。

各シードフラスコへ、10 ml s の胞子を、最終濃度 6×10^4 個 / 1 ml となるように導入し、28℃および220 rpmで48時間インキュベートした。

【0172】

(c) 最終段階発酵の調製および接種

計量容器内で、綿実粉 (タンパク質源) 2.5%、ラクトース 1.7%、メリトース 1.5%、グリセロール 4%、CSL (タンパク質源) 0.5%、炭酸カルシウム 0.8%およびFoam Doctor (消泡剤) 0.1%を計量することにより、19 L t s の最終段階培地を調製した。水酸化ナトリウムにより、培地をpH 7.2に調節し、121℃で30分間滅菌し、シードフラスコからのシードとの接種に準備された各滅菌最終段階容器内に1.4 L t s を移した。最終段階容器を1400 rpm、通気量1.1 L / min、28℃に設定し、且つ、培地は、滅菌後pH調節しなかった。

48時間育成した40 ml s のシードを、各最終段階容器に移し、上記条件下で214時間インキュベートした。この規模では、溶存酸素レベルを測定または維持しなかった。

最終段階発酵を、pH、粘度および全体を通したミガラスタットの生産について測定し、且つ、ミガラスタット濃度が2400 ug / ml のレベルとなった時に採取した。

10

20

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2015/053282

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12P17/12 C12R1/465 A61K31/445 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12P C12R A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	YUKIO MIYAKE ET AL: "The structures of a .BETA.-galactosidase inhibitor, galactostatin, and its derivatives.", AGRICULTURAL AND BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 52, no. 3, 1 January 1988 (1988-01-01), pages 661-666, XP055184501, ISSN: 0002-1369, DOI: 10.1271/bbb1961.52.661 the whole document ----- -/--	1-9, 12-21
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
21 April 2015		30/04/2015
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Schneider, Patrick

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2015/053282

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	RUIZ M ET AL: "Amino and hydroxy acid based diastereoselective synthesis of 1-deoxygalactostatin and its imino acid derivative", TETRAHEDRON LETTERS, PERGAMON, GB, vol. 40, no. 10, 5 March 1999 (1999-03-05) , pages 2021-2024, XP027014074, ISSN: 0040-4039 [retrieved on 1999-03-05] the whole document -----	1,3-9, 12-21
X	LEES W J ET AL: "The enzymatic synthesis of 1,5-dideoxy-1,5-diimino-d-talitol and 1-deoxygalactostatin using fuculose-1-phosphate aldolase", BIOORGANIC CHEMISTRY, ACADEMIC PRESS INC., NEW YORK, NY, US, vol. 20, no. 2, 1 June 1992 (1992-06-01), pages 173-179, XP024022727, ISSN: 0045-2068, DOI: 10.1016/0045-2068(92)90037-4 [retrieved on 1992-06-01] the whole document -----	1-9, 12-21
X	YUKIO MIYAKE ET AL: "Inhibition of .BETA.-galactosidase by galactostatin, galactostatin-lactam, and 1-deoxygalactostatin.", AGRICULTURAL AND BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 52, no. 7, 1 January 1988 (1988-01-01), pages 1649-1654, XP055184401, ISSN: 0002-1369, DOI: 10.1271/bbb1961.52.1649 the whole document -----	1-9, 12-21
X	GB 2 086 394 A (SHIONOGI SEIYAKU KK) 12 May 1982 (1982-05-12) page 3; claim 10 -----	5
A	WO 2008/045015 A1 (AMICUS THERAPEUTICS INC [US]; MAJOR MICHAEL [US]; PETERSON ROBERT [US]) 17 April 2008 (2008-04-17) the whole document -----	1-24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2015/053282

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
GB 2086394	A	12-05-1982	DE 3142400 A1	25-11-1982
			FR 2492664 A1	30-04-1982
			GB 2086394 A	12-05-1982
			JP S5774090 A	10-05-1982
			NL 8104832 A	17-05-1982
			NZ 198680 A	30-04-1985
			US 4497797 A	05-02-1985

WO 2008045015	A1	17-04-2008	BR P10613222 A2	28-12-2010
			CN 101277969 A	01-10-2008
			EP 2027137 A1	25-02-2009
			HK 1125111 A1	16-05-2013
			IL 187988 A	30-11-2014
			JP 5107350 B2	26-12-2012
			JP 2009539834 A	19-11-2009
			US 2006293515 A1	28-12-2006
			WO 2008045015 A1	17-04-2008

フロントページの続き

(51) Int. Cl. F I テーマコード (参考)
A 6 1 P 43/00 (2006.01) A 6 1 P 3/00
 A 6 1 P 43/00 1 0 5

(81) 指定国 AP (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(74) 代理人 100082991

弁理士 佐藤 泰和

(74) 代理人 100105153

弁理士 朝倉 悟

(74) 代理人 100143971

弁理士 藤井 宏行

(72) 発明者 エミリオ、アルバレス - ルイス

スペイン国マドリッド、トレス、カントス、パルケ、テクノロヒコ、デ、マドリッド、4、カリエ、サンティアゴ、グリソリア、グラクソスミスクライン、インベスティガシオン、イ、デサロリョ、ソシエダッド、リミターダ

(72) 発明者 アンドリュー、ジョン、コリス

イギリス国カンブリア、ウルバーストン、ノース、ロンズデール、ロード、グラクソスミスクライン

(72) 発明者 アリソン、サラ、ダン

イギリス国ウエスト、サセックス、ワージング、ドミニオン、ウェイ、グラクソスミスクライン

(72) 発明者 アンドリュー、ピーター、フォスベリー

イギリス国ハートフォードシャー、スティーブネッジ、ガネルズ、ウッド、ロード、グラクソスミスクライン

(72) 発明者 サラ、ジェーン、レディー

イギリス国ハートフォードシャー、スティーブネッジ、ガネルズ、ウッド、ロード、グラクソスミスクライン

(72) 発明者 マリア、ヘスス、バスケス、ムニス

スペイン国マドリッド、トレス、カントス、パルケ、テクノロヒコ、デ、マドリッド、4、カリエ、サンティアゴ、グリソリア、グラクソスミスクライン、インベスティガシオン、イ、デサロリョ、ソシエダッド、リミターダ

F ターム (参考) 4B064 AF41 CA02 CA03 CC03 CD09 CE03 DA03

4B065 AA01X AA15X AA24X AA26X AA29X AA30X AA40X AA46X AA48X AA50X

AC14 AC20 BB15 BB16 BD14 BD15 BD18 CA19 CA44

4C086 AA01 AA04 BC21 MA01 MA04 NA14 ZB21 ZC21