

(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2009-505681  
(P2009-505681A)

(43) 公表日 平成21年2月12日(2009.2.12)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 1/14 (2006.01)	C 1 2 N 1/14 A	4 B 0 6 4
C 1 2 P 7/58 (2006.01)	C 1 2 P 7/58	4 B 0 6 5
C 1 2 P 17/12 (2006.01)	C 1 2 P 17/12	
C 1 2 P 17/18 (2006.01)	C 1 2 P 17/18 D	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 16 頁)

(21) 出願番号 特願2008-529382 (P2008-529382)  
 (86) (22) 出願日 平成19年6月29日 (2007. 6. 29)  
 (85) 翻訳文提出日 平成20年2月28日 (2008. 2. 28)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2007/015234  
 (87) 国際公開番号 W02008/002665  
 (87) 国際公開日 平成20年1月3日 (2008. 1. 3)  
 (31) 優先権主張番号 60/818, 145  
 (32) 優先日 平成18年6月29日 (2006. 6. 29)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 60/847, 344  
 (32) 優先日 平成18年9月25日 (2006. 9. 25)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 507084084  
 アイバックス ファーマシューティカルズ  
 スポレッツノスト エス ルチェニム オ  
 メゼニム  
 チェコ国, 7 4 7 7 0 オパバ 9, オ  
 ストラブスカ 2 9  
 (74) 代理人 100099759  
 弁理士 青木 篤  
 (74) 代理人 100077517  
 弁理士 石田 敬  
 (74) 代理人 100087871  
 弁理士 福本 積  
 (74) 代理人 100087413  
 弁理士 古賀 哲次

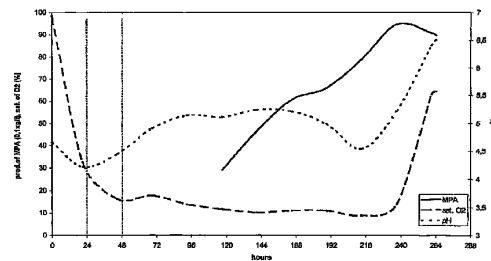
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 酸代謝産物生成の調節

(57) 【要約】

本発明は、ミコフェノール酸などの酸代謝産物を調製する方法、およびミコフェノール酸を増大した収率で生成する方法で、こうした方法に使用するアクセス番号CC M8364のペニシリウム種(Penicillium sp.)の菌株を提供する。

A graphical representation displaying the regulation of culture medium pH, by regulating the level of oxygen saturation, to obtain a pH above pH 4.5.



- 【特許請求の範囲】
- 【請求項1】  
微生物細胞を含む培養培地の酸素飽和の調節を含む、微生物細胞で生成される酸代謝産物の調節方法。
- 【請求項2】  
液中発酵培養方式において微生物細胞を生成する代謝産物を提供し、そしてこうした培養において微生物細胞から酸代謝産物の生成を含み、ここで培養培地の酸素飽和を調節し、培養培地のpHを制御する請求項1記載の方法。
- 【請求項3】  
酸代謝産物が、ウロン酸(uronic acid)、パスパリック酸(paspalic acid)、リセルジック酸(lysergic acid)のメチルカルピノールアミンおよびミコフェノール酸(mycophenolic acid)から成る群から選択される、請求項1又は請求項2記載の方法。 10
- 【請求項4】  
酸代謝産物がミコフェノール酸(MPA)である、請求項3記載の方法。
- 【請求項5】  
ミコフェノール酸が、培養培地中で1g/Lより多いMPAの最終濃度(培養培地のg/L)に生成される請求項4記載の方法。
- 【請求項6】  
濃度が5g/Lより多い請求項5記載の方法。 20
- 【請求項7】  
濃度が8g/Lより多い請求項6記載の方法。
- 【請求項8】  
微生物細胞が、真菌細胞および細菌細胞から成る群から選択される、これまでの請求項のいずれか1項記載の方法。
- 【請求項9】  
微生物細胞が、ペニシリウム種(Penicillium sp.)の細胞である請求項8記載の方法。
- 【請求項10】  
ペニシリウム種(Penicillium sp.)が、アクセス番号CCM 8364を有するペニシリウムの単一菌株である、請求項9記載の方法。
- 【請求項11】  
培養培地が、塩基性窒素資源と複合窒素資源とを含むこれまでの請求項のいずれか1項記載の方法。 30
- 【請求項12】  
複合窒素資源が、加水分解されたカゼイン、浸水状トウモロコシ又はその混合物から選択される請求項11記載の方法。
- 【請求項13】  
塩基性窒素源が、アミノ酸サプリメントを含む請求項11又は請求項12記載の方法。
- 【請求項14】  
アミノ酸サプリメントが、1又は複数のグリシン、メチオニン、およびアスパラギンである、請求項13記載の方法。 40
- 【請求項15】  
酸素飽和レベルが5乃至40%の範囲で制御される、これまでの請求項のいずれか1項記載の方法。
- 【請求項16】  
酸素飽和レベルが、生成期全体を通し制御される、これまでの請求項のいずれか1項記載の方法。
- 【請求項17】  
培養培地の酸素飽和レベルが、接種から0乃至24時間、0乃至48時間、24乃至48時間、および48時間からの期間から選択される期間中制御される、請求項16記載の方法。
- 【請求項18】 50

生成期の終了時に炭素資源の枯渇により、pHが上昇するまで、酸素飽和レベルは制御される請求項16又は請求項17記載の方法。

【請求項 19】

培養培地が、PH 4より高いpHに保持される、これまでの請求項のいずれか1項記載の方法。

【請求項 20】

PHが、酸代謝産物の生成段階の期間中に、培養培地の酸素飽和レベルを調節することにより保持される、請求項19記載の方法。

【請求項 21】

pHを、生成段階の期間中pH4.5乃至pH5.5の範囲にある請求項20記載の方法。

10

【請求項 22】

酸代謝産物がミコフェノール酸であり、そしてミコフェノール酸がミコフェノール酸モフェチルに変換される、これまでの請求項のいずれか1項記載の方法。

【請求項 23】

ミコフェノール酸が、2-モルホリノエタノールと反応することにより、ミコフェノール酸モフェチルに変換される、請求項22記載の方法。

【請求項 24】

Masaryk University Brno,Czech Republicで、Czech Collection Microorganisms(CCM)のアクセス番号CCM 8364として寄託される、ペニシリウム種(Penicillium sp.)の菌株。

【請求項 25】

何らかの表面又は環境で、個々の細胞、細胞の凝集体、菌糸(hyphas)、フィラメントおよびその凝集体の形状において、請求項24記載の菌株。

20

【請求項 26】

菌株が、MPA(培養培地のg/L)の最終濃度を1g/Lより多く生成できる、請求項24又は請求項25記載のペニシリウム種(Penicillium sp.)の菌株。

【請求項 27】

濃度が5g/Lより多い請求項26記載のペニシリウム種(Penicillium sp.)の菌株。

【請求項 28】

濃度が8g/Lよりも多い請求項27記載のペニシリウム種(Penicillium sp.)の菌株。

【請求項 29】

請求項24乃至請求項28のいずれかの菌株を発酵させることを含む、酸代謝産物を生成する方法。

30

【請求項 30】

酸代謝産物が、ウロン酸(uronic acid)、パスペリック酸(paspalic acid)メチル、リセルジック酸(lysergic acid)のカルピノールアミンおよびミコフェノール酸から成る群から選択される、請求項29記載の方法。

【請求項 31】

酸代謝産物が、ミコフェノール酸(MPA)である請求項30記載の方法。

【請求項 32】

請求項1乃至23のいずれか1項記載の方法において、請求項24乃至28のいずれか1項記載の菌株の使用。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、発酵プロセス中の酸素飽和レベルのレベルを調節し、微生物細胞により酸代謝産物の生成を調節するための方法に関する。特に本発明は、培養培地における酸素の飽和レベルを調節し、ペニシリウム種(Penicillium sp.)によりミコフェノール酸(mycophenolic acid)を調節する方法、およびアクセス番号CCM 8364を有する新たに単離されたペニシリウム(Penicillium)菌株に関する。

【背景技術】

50

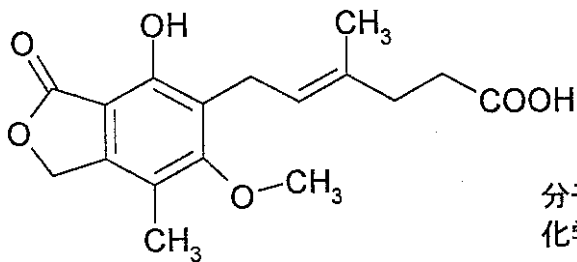
## 【0002】

ミコフェノール酸(mycophenolic acid)(MPAとして表す)は、数種のペニシリウム(Penicillium)により(Imperial Chemical Industries GB 1 158 387(1976), Lilly & Co GB 1 593 208(1978)), 又はペニシリウム(Penicillium)から得られる変異菌株(Ajinimoto KK US 4 452 891(1981))により生成される代謝産物である。MPAは、たとえば抗微生物剤(Floreyら、1946)、抗腫瘍剤(Williamsら、J. Antibiot., 21, 463(1968)、および免疫抑制剤(Mitsui, Suzuki, 1969)として、生物および医薬的な活性を有する。MPAの2-モルフォリノエチル・エステル誘導体であるミコフェノール・モフェチルは、通常治療に用いられている。

## 【0003】

MPAの化学構造式：

## 【化1】



分子量=320, 35  
化学式=C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>O<sub>6</sub>

MPAを生成する方法の1は、EP 1624070 A1に記載されているように、液中培養発酵法であり、この場合NaOHが、発酵培地のPHの調節に使用され、pHを4乃至7の範囲に保持される。MPAは、Imperial Chemical Industries GB 1158 387(1967); BIOCON, WO 01/64931 A1(2001); および IVAX, WO 2006/031665(2006), WO 01/21607 および WO 2005/105768)にて開示された方法で、種々の方法により発酵培地から単離することができる。次に単離されたMPAが、ミコフェノール酸モフェチル生成に使用される(WO 02/100855)。医薬的に活性な成分であるミコフェノール酸モフェチルに基づく薬剤を、効率的で経済的に生成するために、高レベルのMPAの生成が要望される。本発明はこうした方法を提供する。

## 【発明の開示】

## 【0004】

## 発明の簡単な説明

1の観点において本発明は、微生物細胞を含む培養培地の酸素飽和レベルを調節することを含み、微生物により生成された酸代謝産物の生成を調節する方法を提供する。好ましい例における方法は、液中発酵培養方式で酸代謝産物を生成する微生物細胞を提供し、そしてこうした培養中の微生物細胞から酸代謝産物が生成されることを含み、ここで培養培地の酸素飽和レベルを調節し培養培地のpHを制御する。好ましくは酸代謝産物が、ミコフェノール酸(MPA)である。

## 【0005】

もう1の観点において本発明は、ミコフェノール酸をミコフェノール酸モフェチルに変換することを含む、ミコフェノール酸モフェチルの調製方法を提供し、ここでミコフェノール酸が、ミコフェノール酸産成微生物細胞を含む発酵プロセスの酸素飽和レベルを調節することにより、調製される。

## 【0006】

さらに別の観点において、本発明は、Masaryk University, Brno, Czech Republicで、Czech Collection of Microorganisms(CCM)のアクセス番号 CCM8364として寄託されているペニシリウム種(Penicillium sp.)の菌株を提供する。アクセス番号 CCM8364として寄託されているペニシリウム種(Penicillium sp.)の菌株を、ミコフェノール酸を高濃度にて(

10

20

30

40

50

培養培地のリッター当たり1gより多い)生成する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0007】

発明の詳細な説明

本明細書に使用されているように、MPAに関連する場合の用語「高レベル」又は「高濃度」は、発酵ブロス(培養培地)の1リッター当たり1gを越えるレベル(又は濃度)のMPAを、好ましくは1リッター当たり約6g乃至約10gのMPAを示す。液中培養発酵の生成培地において高濃度のMPAを得るに、幾つか重要な要因がある。これらの要因としては、培地の組成物および培養条件があげられる。特に発酵ブロスの最適なpHを、生成期間中保持する必要がある。通常NaOHの添加を用いて、発酵ブロスのpHを調節し、そしてそのpHをpH4乃至pH7の範囲に保持する。

10

【0008】

さらにNaOHを用い指数増大期が終了した後に、PHの変移形成する。本発明は、発酵ブロス/培養培地に化学物質を添加することなく、酸素レベルを調節することにより、発酵ブロス/培養培地のpHを調節し、MPAの生成を調節する新たな方法に関する。このようにして本発明は、発酵ブロス/培養培地のpHを調節するために、天然の資源のみを使用する。空気を使用した酸素による飽和レベルが、この好気性過程にて制御された酸素供給により行われ、この過程においてpHの調節が行われる。従って本過程が、有害な酸性および/又はアルカリ性化合物の消費を減少させる。

20

【0009】

本発明は、発酵ブロスの酸素飽和レベルを調節することにより、微生物により作り出された酸代謝産物の生成を調節する方法を提供する。より具体的にその方法は、液中発酵培養方式における微生物細胞を提供し、ここで液中発酵培養の培養培地の酸素飽和レベルが、調節/制御され酸代謝産物を生成する。こうした培養培地の酸素飽和レベルを調節または制御することにより、培養媒地のpHが、pH4乃至pH7の範囲、好ましくはpH4乃至pH6の範囲、より好ましくはpH4乃至pH5.5の範囲に確実に保持される。こうした調節により、発酵ブロス(培養培地)中で高濃度の酸代謝産物を得る酸代謝産物の製造方法が、提供される。

【0010】

好ましくは酸代謝産物が、ウロン酸(uronic acid)、パスパリック酸(paspalic acid)、リセルジック酸(lysergic acid)のメチルカルピノールアミンおよびミコフェノール酸から成る群から選択される。好ましくは酸代謝産物がミコフェノール酸である。好ましくは、微生物細胞が、真菌細胞、および細菌の細胞から成る群から選択される。

30

【0011】

好ましくは微生物細胞が真菌細胞であり、より好ましくは微生物細胞が、ミコフェノール酸を生成するためのペニシリウム種(Penicillium sp.)細胞、パスパリック酸(paspalic acid)およびメチルカルピノールアミンを生成するためのクラビセプス種(Claviceps sp)細胞、又はウロン酸(uronic acid)を生成するためのクレブシエラ・ニューモニエ(Klebsiella pneumoniae)細胞である。

【0012】

好ましくはペニシリウム種(Penicillium sp.)細胞が、ペニシリウム(Penicillium)の単一の菌株である。好ましくは、ペニシリウム(Penicillium)の菌株が、アクセス番号CCM8364を有する菌株である。

40

【0013】

本発明の方法において適切な培養培地が、塩基性窒素資源および複合窒素資源を含む。塩基性窒素資源は、たとえば単純な無機分子、アミノ酸、又は窒素を含む他の有機化合物、たとえばアンモニア/アンモニウム塩、天然から取り出された何らかのアミノ酸などにて可能である。好ましい複合窒素資源が、加水分解されるカゼインおよび/又はコーン・ステープである。さらに培養培地は炭素資源を含む。培養培地に使用する適切な炭素資源は炭水化物、好ましくは糖質、より好ましくは単糖類、最も好ましくはスクロースである。

50

## 【0014】

さらに培養培地は、複合窒素源に加え特定のアミノ酸サプリメントを含み、あるいは塩基性窒素資源が単純なアミノ酸である。好ましいアミノ酸サプリメントが、1又は複数のグリシン、メチオニン、およびアスパラギンを含む。好ましくはメチオニンが、D,L-メチオニンである。好ましくはアスパラギンが、L-アスパラギンである。

## 【0015】

アミノ酸サプリメント中のアミノ酸は、通常約1乃至約30g/lの濃度、好ましくは約5乃至約8g/lの濃度にて使用される。グリシンは、通常約1乃至約30g/lの濃度、好ましくは約2乃至約20g/lの濃度、より好ましくは約3乃至約15g/lの濃度、さらにより好ましくは約5乃至約8g/lの濃度にて使用される。

10

## 【0016】

L-アスパラギンは、通常約1乃至約30g/lの濃度、より好ましくは約2乃至約20g/lの濃度、より好ましくは約3乃至約15g/lの濃度、さらにより好ましくは約5乃至約8g/lの濃度にて使用される。

## 【0017】

ペニシリウム種(Penicillium sp.)が、明示された酸素飽和レベルを有する液中発酵培養にて増殖する時に、MPA生成の調節が起こる。こうした液中の発酵培養において培養培地の酸素飽和レベルが、0乃至24時間、又は0乃至48時間、又は24乃至48時間、又は48時間の期間中制御することが可能である。好ましくは生成過程の終了時に炭素資源の枯渇によりpHが上昇するまで、酸素飽和レベルが制御される。

20

## 【0018】

液中発酵におけるMPAの生成が、培養培地中の酸素飽和レベルを制御することにより増大できる。好ましくは酸素飽和レベルを、5乃至約40%の範囲、より好ましくは5乃至35%の範囲、さらにより好ましくは5乃至30%の範囲である。酸素飽和%が、 $pO_2$ 電極により測定されるように、 $pO_2$ を指しており、これにより100%の酸素飽和レベルが、微生物細胞培養のない培養培地の最大曝気と関連する。

## 【0019】

好ましい例において、ペニシリウム種(Penicillium sp.)が、培養の接種および生成段階で異なる培養培地で増殖される。第一段階(接種段階)、 $T = 0$  時間にて開始され、第二段階が $T = 24$  時間で始まり、そして第三段階(生成段階)が、 $T = 48$  時間にて開始される。

30

好ましい方法は、接種培地中で微生物細胞を増殖し、そしてさらに生成培地の容積の少なくとも20%、好ましくは少なくとも25%の接種原にて生成培地を接種することを含む。

## 【0020】

本発明の方法において、培養培地のpHが、pH4より高いpH、好ましくはpH4乃至pH7の範囲のpHにて保持される。好ましくは培養培地の酸素飽和レベルが、調節することにより保持される。培養培地における酸素飽和レベルが、 $pO_2$ 電極を用い酸素レベルを連続的に監視し、そして振盪速度および添加される空気容量を調整することにより、必要な時の酸素レベルを調整することで、調節される。

## 【0021】

このようにして培養培地のpHが、培養物の生成段階中にpH4より高いpHにて保持され、そしてそれが、酸代謝産物を発酵培養方式にて活発に生成させる期間である。微生物細胞による接種が、発酵培養系に移された後に本期間が開始される。好ましくはpHが、培養培地において生成段階中にpH4.5より高く、好ましくはpHが、培養培地において生成段階中に約pH4.5乃至約pH5.5の範囲である。

40

## 【0022】

このように調節された液中培養温度が、MPAを生成するに十分な期間、約20 乃至約30 に保持される。好ましくは本発明の方法における液中培養温度が、約240時間乃至約300時間の期間で約24 乃至約26 に保持される。

## 【0023】

50

培養培地における酸素飽和レベルを調節するという本発明の方法によるMPAの生成を調節することで、MPAの最終濃度(培地のg/l)を、1g/Lより多く、より好ましくは2g/Lより多く、又は3g/Lより多く、さらにより好ましくは4g/Lより多く、さらにより好ましくは5g/Lより多く、6g/Lより多く、又は8g/Lより多く生成し得る。

【0024】

さらに本発明は、たとえば1g/Lより多い、高レベルのMPAを生成するペニシリウム種(Penicillium sp.)の新しい菌株(アクセス番号CCM8364として寄託)を提供する。この菌株は、菌株CCM8364が作り出す野生型ペニシリウム種(Penicillium sp.)菌株と比較した場合、より高いレベルのMPAを生成する。こうした野生型の菌株は、液中培養にて増殖した場合、平均収率が約600mg/lのMPAを生成する。

10

【0025】

さらにこうした菌株の培養、好ましくは生物的に純粋な培養、たとえば寄託番号CCM8364を有する真菌菌株の増殖細胞のみを含む培養などが、提供される。こうした培養は、好ましくはこうした真菌の菌株の少なくとも90%を有す。培養におけるこの菌株が、何らかの面や環境において、個々の細胞、細胞の凝集体、菌糸、フィラメント、およびその凝集体の形状にて可能である。

【0026】

アクセス番号8364を有するペニシリウム種(Penicillium sp.)の菌株が、MPAの最終濃度(培地のg/l)を、1g/Lより多く、より好ましくは2g/L、又は3g/Lより多く、さらにより好ましくは4g/Lより多く、さらにより好ましくは5g/Lより多く、6g/Lより多く、又は8g/Lより多く生成することができる。CCM8364の菌株が、正に選択する媒介物(media)と結合した化学的および物理的変異化法の方式を用いることで、作り出される。

20

【0027】

さらに本発明は、本発明の方法によりミコフェノール酸を調製し、さらにそれをミコフェノール酸モフェチルに変換することで、ミコフェノール酸モフェチルを調製する方法を提供する。ミコフェノール酸は、たとえば、WO 02/100855に開示されている方法で、ミコフェノール酸モフェチルに変換することが可能である。

【0028】

特に好ましい例、および図示した実施例に、引用により本発明が開示されているため、当業者は、明細書に開示されているように、本発明の精神および範囲を逸脱することなく記載および図示したように、本発明の変更を理解することが出来よう。本特許出願に示された資料の開示は、引用により本明細書に込み入れられている。さらに以下の実施例は、本発明の特に好ましい例をさらに示すことを意図しており、当然限定されるものでない。

30

【実施例】

【0029】

実施例1: ペニシリウム(Penicillium) 菌株CCM8364の増殖特性

巨視的形態

寒天-厚肉マルト培地-MEA-(35gのマルト抽出物、5gのペプトン、13gの寒天、1000mlのH<sub>2</sub>O)で腐性増殖期で7日間の培養後に、菌株CCM8364が、直径1.1cmの壊死状(sphacelus)の気中菌糸体コロニーを形成する。表面の様子がピロード状で、中心にこぶ状があり、そして白色の縁を有する。分生子を形成するレベルが中程度であり、コロニーが褐色に近い色に着色し、そして浸出を呈し、淡黄色(buff)、リバース・パフ(reverse buff)を呈す。

40

【0030】

寒天-厚肉のCzapek酵母培地中で腐性増殖期間で7日間の培養後に、菌株CCM8364が直径2.3cmの壊死状(sphacelus)の気中菌糸体コロニーを形成する。表面の様子がピロード状で、放射状に溝を有し、中心にこぶ状がありそして白色の縁を有する。分生子を形成するレベルは中程度であり、コロニーが褐色に近い色に着色し、そして浸出を呈し、赤褐色(red brown)、リバース赤褐色(reverse cinnamon)を呈す。

【0031】

寒天-厚肉生成培地G25N中で腐性増殖期間で7日間の培養後に、菌株CCM8364が、直径0.3

50

cmの壊死状(sphacelus)の気中菌糸体コロニーを形成する。表面の様子がピロード状であり、分生子を形成するレベルはほぼ中程度であり、コロニーが中心に平面的で、白色の縁を形成し、スモーク・グレイ-緑色をおびた色合いのプロリアス・グレイに着色し、浸出のないリバース・ペイル(reverse pale)を呈する。

#### 【0032】

##### 微視的形態

菌糸体が、表面が平滑な300-600x4-6 $\mu$ mの菌柄(stips)、変異性ペニシリン、テレバテシレ(terveticillate)、及び不均一なパターンを形成する複数の分岐点を伴う不均整体、2-3の環生の枝、12-20x-4-4.5 $\mu$ mの環生状のメツラ(metulae)、測定値13-16x2.5-3 $\mu$ mのアセロース(acerose)、フィアリドスの増幅形(phialides ampulliform)、分離体と短鎖状で、3.5-5.5 $\mu$ mでほぼ球状、4-6x2-4 $\mu$ mで楕円状の分生孢子(conidia)、明らかにざらざらにて、明確な壁から成る。

10

#### 【0033】

##### 実施例2:MPA法

各単離体が、MPAの生成のため評価された。この方法は、2段階-接種および生成から成る。接種培地(IM)が、炭素資源(たとえばスクロース)、窒素資源(適切な資源は、加水分解されたカゼイン、および液体に浸したトウモロコシを含む)、および無機塩( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ など)を含む。50mlのIMを、250mlのエレンマイヤー・フラスコに、120 $^\circ\text{C}$ にて20分間滅菌した。単離体の孢子が、20mlの滅菌水にて寒天斜面培養培地から洗い出される。

#### 【0034】

5mlの本孢子懸濁液をIM用の接種物として使用し、その後振盪しながら280回転/分の攪拌速度にて24-28 $^\circ\text{C}$ で3-5日間培養した。全容量の10%を添加し得られたIMを、生成培地(PM)の接種用に使用した。PMA法として本発明に利用されたPMは、炭素資源(たとえばスクロース)、窒素資源(適切な資源は、カゼイン、およびグリシン、アスパラギン、メチオニンなどのアミノ酸を含む)、および無機塩(たとえば $\text{K}_3\text{PO}_4$ 、 $\text{MgSO}_4$ )を含む。

20

#### 【0035】

250mlのエレンマイヤー・フラスコに50mlのPMを、120 $^\circ\text{C}$ にて20分間滅菌した。次に試験培養を、10乃至14日間振盪しながら24-28 $^\circ\text{C}$ にて通気条件下で行った。攪拌速度が280回転/分である。培地のpHを、接種前に測定し(pH4.9乃至pH5.1)、そして上記のようにpHメータを使用し、実験の終了するまでに2回又は3回測定した。酸素の飽和レベルが、実験室又はプラントの発酵体において連続的に測定した。

30

#### 【0036】

MPAを含む等分量を、当業者周知の標準的な技術により、HPLCクロマトグラフにて評価し、標準(研究報告RR/RD/CH024/01-A、再試験RR/RD/AN061/05-Aによるinternal IVAX標準MPA)に対するMPAの内容を決定した。使用されるカラムは、Chromolith speed ROD, RP18e, 50x4.6mm, (MERCKにより製造), mobile phase:40%のアセトニトリル、680 $\mu$ lの $\text{H}_3\text{PO}_4$ /liter  $\text{H}_2\text{O}$ を含む60%の水, flow 5-6.5ml/minおよび温度30 $^\circ\text{C}$ であった。

#### 【0037】

##### 実施例3:突然変異および選択方法

##### 1. 選択

手順として第一段階で野生型ペニシリウム種(Penicillium sp.)の孢子を生成する傾斜培養物を水中に懸濁し、そして菌糸断片の欠いたものにした。次に懸濁液を100孢子/mlに希釈し、そしてMEAを含むペトリプレート(Petri plates)上に広げた。次にプレートを7日間24-27 $^\circ\text{C}$ でインキュベートした。寒天プレート上で成長したコロニーを取り出し、ブラック・フラスコ(Blacke flask)中に同じ滋養寒天培地の傾斜培地に保持した。16日の培養後に、単一コロニー単離体を、生成試験装置にて試験した。最良の生成物(発酵プロセス中1.2gのMPA/l)による単離物を、次の段階において変異化した。

40

#### 【0038】

##### 2. N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソ-グワニジン(NG)による突然変異

孢子が形成された傾斜体を水に懸濁し、菌糸断片を欠いたものにした。次に分生子のポ

50

ピュレーションを、サリン中0.2MのNG溶液に、8時間暴露した。この変異化処理において、約99.9%の孢子が死滅した。次に処理された孢子を、変異原のないように洗浄し、そしてペトリプレート(Petri plates)上に広げた。プレートを24-27℃で7日間インキュベートした。寒天プレート上で成長したコロニーを取り出し、ブラック・フラスコ(Blacke flask)中に同じ滋養寒天培地の傾斜培地に保持した。16日の培養後に単一コロニーの単離体を、生成試験装置にて試験した。最良の生成物(発酵プロス中2.4gのMPA/l)による単離物を、次の段階において変異化した。

【0039】

### 3. エチルメタンスルホン酸エステル(EMS)による変異化

孢子が形成された傾斜体を水中に懸濁し、菌糸断片を欠いたものにした。次に分生子のピュレーションを、サリン中0.2MのEMS溶液に16時間暴露した。この変異化処理において、約99.9%の孢子が死滅した。次に処理された孢子を、変異原のないように洗浄し、そしてMEAを含むペトリプレート(Petri plates)上で接種した。コロニーがプレートに形成されるまでプレートを、24-27℃で7日間インキュベートした。コロニーを取り出し、ブラック・フラスコ(Blacke flask)中に同じ滋養寒天培地の傾斜培地に保持した。16日の培養後に単一コロニーの単離体を、生成試験装置にて試験した。最良の生成物(発酵プロス中5.6gのMPA/l)による単離物を、次の段階において変異化した。

【0040】

### 4. UV放射による変異化

孢子が形成された傾斜体を水中に懸濁し、菌糸断片を欠いたものにした。懸濁液を、 $1 \times 10^5$ 孢子/mlに希釈し、そしてMEAを含むペトリプレート(Petri plates)上に広げた。次にプレートを、約 $15 \text{ Jm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ である放射線容量のUV放射に約500秒間暴露した。この変異化処理において、約99.9%の孢子が死滅した。次にペトリプレート(Petri plates)を、24-27℃で7日間インキュベートした。次に寒天プレート上で成長したコロニーを取り出し、ブラック・フラスコ(Blacke flask)中に同じ滋養寒天培地の傾斜培地に保持した。16日の培養後に、単一コロニーの単離体を、生成試験装置にて試験した。最良の生成物(発酵プロス中6.0gのMPA/l)による単離物を、次の段階において変異化した。

【0041】

### 5. ガンマー線放射による変異化

孢子が形成された傾斜体を水中に懸濁し、菌糸断片を欠いたものにした。懸濁液を、 $1 \times 10^5$ 孢子/mlに希釈し、1500Gyである放射線容量のガンマ放射に暴露した。放射された単離物を、MEAを含むペトリプレート(Petri plates)上に広げた。次にコロニーがプレート上に形成されるまで、ペトリプレート(Petri plates)を、24-27℃で7日間インキュベートした。次にコロニーを取り出し、ブラック・フラスコ(Blacke flask)中で同じ滋養寒天培地の傾斜培地に保持した。16日の培養後に単一コロニーの単離体を、生成試験装置にて試験した。最良の生成物(発酵プロス中10gのMPA/l)による単離物を、ブラック・フラスコ(Blacke flask)中の寒天培地上に2回通した。それぞれ通した後生成試験を行い、MPAの高い生成率を継続して検証した。

【0042】

新しく生成された菌株が、in the Czech Collection of Microorganisms(CCM)におけるブタペスト条約に基づいてMasaryk University, Tvreho 14 Brno, Czech Republicで、収集番号CCM8364として寄託された。正に選択した方法と組み合わせ変異化方法の方式により、MPAの平均含有量が、親菌株に対する発酵プロスとして600mg MPA/lからMPA方法による菌株CCM8354に対する発酵プロスとして10g MPA/lに増大することができる。

【0043】

### 実施例4. 培地発酵期間中で、高い酸素飽和培養によるMPAの生成

菌株CCM8364が、全体積約14立方メートルで液中発酵物の発酵用に使われる。生成培地では、炭素資源として白糖、窒素資源として加水分解されたカゼイン、グリシン、アスパラギン、およびメチオニン、そして開始pHが5.0でK,PおよびMgを含む鉱物があげられる。生成培地を、第三段階の接種物(約26%w/w)により接種した。培養温度が24-26℃であり

10

20

30

40

50

、そして行われた生成発酵が285時間であった。培養培地のpHを、培地を酸素にて30%より高いレベルに飽和することにより制御した。培養培地のpHを、酸素による飽和手段により制御した。溶解した酸素の値、培養中のpH、生成段階の終了時のMPAの濃度が、以下の表に要約される。生成培地の酸素飽和によりpHが、pH4より低いpHまで低下し、そして最終MPAの生成レベルが5.7g MPA/lに到達する。

【表1】

表1

No.	時間 (h)	24	48	72	120	144	164	192	240	MPA g/l
1	酸素飽和	45%	37%	36%	60%	64%	64%	76%	79%	5.7
	pH	4.52	4.82	4.45	3.84	3.96	3.77	3.91	4.65	

10

## 【0044】

## 実施例5. 培地発酵期間中で、中間の酸素飽和培養によるMPAの生成

菌株CCM8364が、全体積約14立方メートルで液中発酵物の発酵用に使われる。生成培地では、炭素資源として白糖、窒素資源として加水分解されたカゼイン、グリシン、アスパラギン、およびメチオニン、そして開始pHが5.0でK,PおよびMgを含む鉱物があげられる。生成菌株ペニシリウム種(Penicillium sp.)(CCM8364)を、発酵用に使した。生成培地を、第三段階の接種物(約26%w/w)により接種した。培養温度が24-26 であり、そして行われた生成発酵が285時間であった。培養培地のpHを、培地を酸素にて30%より高いレベルに飽和することにより制御した。溶解した酸素の値、培養中の培養培地のpH、生成段階の終了時のMPAの濃度が、以下の表に与えられる。

20

【表2】

表2

No.	時間 (h)	24	48	72	120	144	164	192	240	MPA g/l
2	酸素飽和	24%	18%	17%	24%	20%	21%	18%	16%	7.5
	pH	4.24	4.54	4.77	5.15	5.37	5.14	4.47	4.41	

30

## 【0045】

## 実施例6. 培地発酵期間中で、低い酸素飽和培養によるMPAの生成

菌株CCM8364が、全体積約14立方メートルで液中発酵物の発酵用に使われる。生成培地では、炭素資源として白糖、窒素資源として加水分解されたカゼイン、グリシン、アスパラギン、およびメチオニン、そして開始pHが5.0でK,PおよびMgを含む鉱物があげられる。生成菌株ペニシリウム種(Penicillium sp.)(CCM8364)を、発酵用に使した。生成培地を、第三段階の接種物(約26%w/w)により接種した。培養温度が24-26 であった。発酵プロセスが、炭素資源(1x10% w/w)を伴う培地により、143時間供給され、そして生成発酵を257時間で終了した。培養培地のpHを、酸素を用い飽和する手段にて制御した。溶解した酸素の値、培養中の培養培地のpH、生成段階の終了時のMPAの濃度が、以下の表に与えられる。

40

【表 3】

表 3

No.	時間 (h)	24	48	72	120	144	164	192	240	MPA g/l
3	酸素飽和	30%	25%	17%	18%	13%	11%	9%	9%	8.2
	pH	4.03	4.19	4.65	5.05	5.09	5.06	4.86	5.65	

10

## 【0046】

実施例7. WO 02/100855によるミコフェノール酸からミコフェノール酸モフェチルの生成

実施例5により調製された粗製ミコフェノール酸100gを、還流冷却器を備えた反応フラスコ中に、200mlのジブチルエーテルと共に入れた。継続的な攪拌下で、混合液を50乃至60℃に暖め、その後40mlの2-モルホリノエタノールを加えた。反応混合液を、水の共沸分離下沸騰するまで加熱した。48時間後混合液を23℃まで冷却し、200mlのジクロロメタンを加えた。溶液を、100mlの0.5Mの水溶性 $K_2CO_3$ にて2回、そして100mlの水にて1回抽出した。次にジクロロメタンを真空下で蒸留除去し、そして懸濁液を10乃至15℃まで冷却した。この方法において合成された結晶組織のミコフェノール酸モフェチルを、酢酸エチルにより再結晶した。結晶を乾燥した後110gのミコフェノール酸モフェチルが、99.0%より高い純度(HPLC)で得られた。

20

## 【図面の簡単な説明】

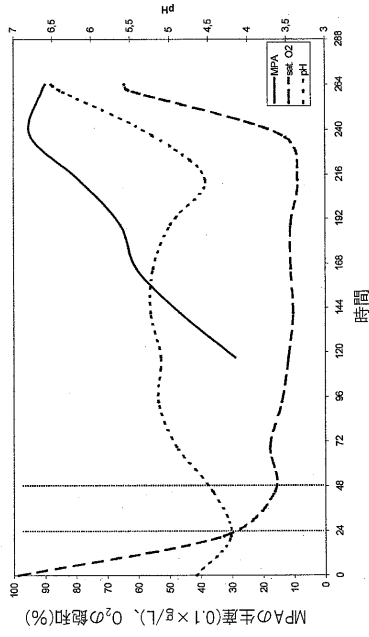
## 【0047】

【図1】pH4.5より高いpHを得るように酸素飽和レベルを調節することにより、培養培地のpH調節の表示図。

【図2】pH4.5より低いpHを得るように酸素飽和レベルを調節することにより、培養培地のpH調節の表示図。

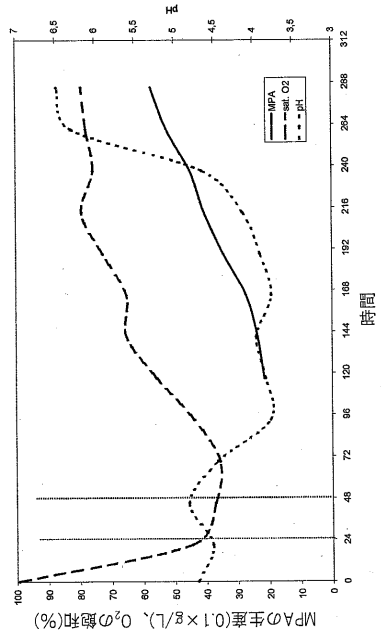
【 図 1 】

Figure 1: pH4.5より高いpHを得るように酸素飽和レベルを調節することによる培養培地のpHの調節を表示する図



【 図 2 】

Figure 2: pH4.5より低いpHを得るように酸素飽和レベルを調節することによる培養培地のpHの調節を表示する図



【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2007/015234

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. C12P17/04		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12P		
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 practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 1 624 070 A (TECNIMEDE SOCIEDADE TECNICO ME [PT]) 8 February 2006 (2006-02-08) cited in the application	1,3-5,8, 9,11, 13-16, 19,21-23
Y	paragraph [0002] - paragraph [0018]	2,12,17, 18,20,21
X	DE 44 07 441 A1 (KERNFORSCHUNGSANLAGE JUELICH [DE]) 15 September 1994 (1994-09-15) page 2, line 49 - page 5, line 10	1,8,15, 16,19
X	WO 99/20785 A (UNIV MINNESOTA [US]; SCHENDEL FREDERICK J [US]; DILLINGHAM RICHARD [US]) 29 April 1999 (1999-04-29) page 11, line 6 - line 22	1,15,16, 19
	----- -/-	
<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 document 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 <b>6 November 2007</b>		Date of mailing of the international search report <b>16/11/2007</b>
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer <b>De Kok, Ad</b>

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2007/015234

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2004/044183 A (AKZO NOBEL NV [NL]; LIN WENGLONG R [US]; MISTRY FIROZ R [US]; NARAYANA) 27 May 2004 (2004-05-27) page 7, line 13 - page 8, line 11 page 12, line 14 - line 22 page 13, line 4 - page 16, line 7	2,12,17, 18,20,21
Y	GB 1 593 208 A (LILLY CO ELI) 15 July 1981 (1981-07-15) cited in the application	12
A	the whole document	1,24-32
A	WO 02/100855 A (IVAX CORP [US]; GALENA CZ A S [CZ]; CHUDLIK MILOSLAV [CZ]; HUSEK ALES) 19 December 2002 (2002-12-19) cited in the application the whole document	22,23
A	WO 2005/082902 A (IVAX CORP [US]; IVAX PHAMACEUTICALS S R O [CZ]; CVAK LADISLAV [CZ]; MO) 9 September 2005 (2005-09-09) the whole document	3

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2007/015234

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 1624070	A	08-02-2006	BR PI0503193 A MA 27787 A1	27-06-2006 01-03-2006
DE 4407441	A1	15-09-1994	AT 401182 B AT 47394 A US 6303351 B1	25-07-1996 15-11-1995 16-10-2001
WO 9920785	A	29-04-1999	AU 1094399 A US 6083728 A	10-05-1999 04-07-2000
WO 2004044183	A	27-05-2004	AU 2003298649 A1 US 2005202525 A1 US 2004091954 A1	03-06-2004 15-09-2005 13-05-2004
GB 1593208	A	15-07-1981	BE 862618 A1 DD 141036 A5 DE 2800071 A1 ES 465821 A1 FR 2384846 A1 IL 53741 A JP 53115880 A NL 7800064 A US 4115197 A	04-07-1978 09-04-1980 05-10-1978 16-09-1978 20-10-1978 27-02-1981 09-10-1978 25-09-1978 19-09-1978
WO 02100855	A	19-12-2002	BR 0210931 A CA 2450013 A1 CN 1520411 A CZ 20012071 A3 EP 1421081 A1 HK 1068630 A1 HU 0400189 A2 JP 2004534063 T NZ 530013 A PL 364366 A1 RU 2283313 C2 SK 15062003 A3 TW 241299 B US 2005085635 A1	08-06-2004 19-12-2002 11-08-2004 15-01-2003 26-05-2004 08-09-2006 28-07-2004 11-11-2004 27-05-2005 13-12-2004 10-09-2006 03-11-2004 11-10-2005 21-04-2005
WO 2005082902	A	09-09-2005	BR PI0506798 A CA 2556774 A1 CN 1956985 A EP 1718644 A1 JP 2007523171 T KR 20070024490 A	22-05-2007 09-09-2005 02-05-2007 08-11-2006 16-08-2007 02-03-2007

## フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, 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, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(74)代理人 100108903  
弁理士 中村 和広

(74)代理人 100117019  
弁理士 渡辺 陽一

(74)代理人 100141977  
弁理士 中島 勝

(72)発明者 ポクルダ, スデネク  
チェコ国, 7 4 7 2 3 ボラチツェ, フラブニ 7 4

(72)発明者 サトケ, ヨセフ  
チェコ国, 7 4 7 0 5 オババ 5, アントニナ ソビー 3 1

(72)発明者 バラ, ブラヂミル  
チェコ国, 7 0 2 0 0 オババ, クリジコバ 2 8 6 0 / 1 6

(72)発明者 バリク, ヨセフ  
チェコ国, 7 4 7 0 5 オババ 5, ペカルスカ 1 0 3

Fターム(参考) 4B064 AD42 AD54 AD77 CA05 CC12 CD13 CD14 DA01  
4B065 AA67X BC06 CA10 CA18 CA44