

发酵法生产他克莫司的研究进展

杨文革, 管 珺, 胡永红

(南京工业大学制药与生命科学学院, 江苏 南京 210009)

摘要:介绍了他克莫司的结构特点和理化性质,并对几种结构类似物的性质进行了比较;阐述了他克莫司市场应用现状,着重介绍了发酵法生产他克莫司的研究进展,指出当前存在问题并论述了代谢工程在链霉菌发酵中的应用,对今后的研究趋势进行了展望。

关键词:他克莫司;代谢工程;链霉菌

中图分类号:TQ460

文献标识码:A

文章编号:0253-4320(2008)02-0034-04

Progress in fermentation of tacrolimus

YANG Wen-ge, GUAN Jun, HU Yong-hong

(College of Life Science and Pharmacy, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China)

Abstract: The chemical structure and properties of tacrolimus, and the different properties among several analogues are introduced and compared. The current situation of its application is reviewed. The progress in fermentation of tacrolimus is presented and the existing problems are pointed out. The technology of metabolic engineering used in fermentation is introduced especially. Furthermore, its outlook in future is forecasted.

Key words: tacrolimus; metabolic engineering; *Streptomyces*

他克莫司,化学名 17α -烯丙基- 1β , 14α -二羟基- 12β -[2-(4α -羟基- 3β -甲氧基- 1β -环己基)-1(*E*)-甲基-乙基]- $23,25\beta$ -二甲氧基- $13\alpha,19,21\alpha,27\beta$ -四甲基- $11,28$ -二氧氮-4-氮杂三环[22,3,1, $O^{4,9}$]二十八碳- 18 -烯- $2,3,10,16$ -四酮,几乎不溶于水,易溶于乙醇、甲醇、丙酮、醋酸乙酯、乙醚、苯酚和氯仿。他克莫司是显示左旋性的光学活性物质,结构特点在于具有 *L*-六氢吡啶羧基和 3 个双重结合键,形成全新的圆环状大环内酯^[1]。1984 年首次由日本藤泽制药公司从筑波链霉菌 (*Streptomyces tsukubaensis* No. 9993) 的发酵培养基中发现,其后国内外大力进行了他克莫司的基础和临床研究。

溶解状态下的他克莫司,六氢吡啶羧酸部位的酰胺键部分可因旋转障碍出现异构现象,存在顺式与反式的动态平衡;同样由于半缩酮碳部位的立体异构作用,还存在互变式异构体之间的动态平衡^[1]。机体内这样一类的平衡进行得十分迅速,因此在链霉菌的发酵液中存在多种他克莫司异构体类似物,最常见的是 FR-900520、FR-900523、FR-900525,这 3 种类似物和他克莫司的理化性质十分相近^[2-3]。因此无法严格评价其各自的生物学性质,现在一般

认为各异构体与他克莫司具有同等的生物学意义^[1],这在很大程度上造成了发酵液后期分离提取困难。

1 他克莫司在临床上的应用

他克莫司除了在抑制器官移植排斥反应方面具有显著疗效外,还广泛应用于斑秃、牛皮癣、银屑病、鱼鳞病、糖尿病、白塞氏病、变应性皮炎、类风湿性关节炎以及多发性硬化病等自身免疫疾病的治疗^[4-5]。作为免疫抑制剂,他克莫司作用机制和环孢菌素相似^[6],主要是抑制白细胞介素-2 的合成,作用于辅助 T 细胞,抑制 T 细胞活化基因的产生(对 γ -干扰素和白细胞介素-2 等淋巴因子的 mRNA 转录有抑制作用),同时还抑制白细胞介素-2 受体的表达,但不影响抑制型 T 细胞的活化。与环孢菌素相比,他克莫司有如下优点^[4,7-8]:①其免疫抑制作用无论在体外还是体内试验都是环孢菌素的数十倍到数百倍,在临床上质量分数为 1%时就有效,另外对已发生排异反应的抑制作用也比环孢菌素好。②以往以环孢菌素为基础的免疫抑制方案中,不可逆的慢性排斥反应问题依然存在,增加剂量虽然有

收稿日期:2007-11-30

基金项目:国家高技术研究发展(“863”)计划资助项目(2007AA02Z211)

作者简介:杨文革(1968-),男,博士,副教授,主要从事新药研究开发;胡永红(1968-),女,博士,教授,博士生导师,主要从事工业生物技术方面的研究,通讯联系人,025-83587108,hyh@njut.edu.cn。

进一步效果,但会带来严重的不良反应,而他克莫司可减少肝肾移植受体的急、慢性排斥反应,其中用于肾移植后的急性排斥率只有14%,低于环孢菌素(32%)。③用他克莫司的患者,细菌和病毒感染率也较环孢菌素治疗者的低,尤其对肝移植的能效高100倍,因而大大降低了临床使用剂量,治疗费用可降至原来的1/3~1/2,同时不良反应也明显降低,此外它还具有低死亡率、高移植存活率、移植物具有良好成功率及对类固醇的相对非依赖性等优点。

正因为有如此多的优点,他克莫司在中国上市的短时间内,市场份额迅速上升,已经成为肝脏及肾脏移植后排斥反应的临床一线药物。目前我国的免疫抑制市场规模为50亿~60亿元,其中国外公司上市的以山地明(环孢菌素)和他克莫司为代表的免疫抑制剂市场份额占80%。专家预测,随着我国器官移植手术的逐渐普及,我国的免疫抑制剂市场最终规模可达100亿~200亿元^[9]。据报道,他克莫司在日本当前售价为35万美元/kg,欧洲生产成本(原料+能耗)低于1万美元/kg^[10],而我国目前还未有他克莫司工业化生产的报道,其市场基本被日本和美国等国外公司占领,开发国内具有自主知识产权的他克莫司生产技术迫在眉睫。

2 发酵法生产他克莫司的现状

1984年,日本藤泽药品工业公司探索研究所首次从日本筑波山土壤中分离的筑波链霉菌(*Streptomyces tssukubaensis* No. 9993)的发酵液中提取得到一种大环内酯类免疫剂,即他克莫司。原始菌株的发酵产率很低,优化发酵条件之后,产率提高了10倍多。1986年后,进行了菌株的改良和发酵条件的进一步优化,生产能力提高了几十倍。同时开展提取与精制工艺的研究,建立了可信的高效液相色谱(HPLC)定量分析方法,解决了发酵、提取、精制工艺

放大过程中遇到的许多问题,使他克莫司的工业化生产得以成功。

随后,美国、韩国、印度等国相继进行了研究,大部分集中于菌种的筛选、培养基的优化以及发酵后期产物的提取工艺。1991年,美国Merck公司^[11]申请了专利,*Streptomyces* ATCC No. 55098经过7天(168 h)的培养,产生了37.8 mg/L他克莫司。1993年,美国Merck公司^[12]通过微生物转化的方法,用*Streptomyces* sp. ATCC No. 55387将一种物质转化为他克莫司,前期种子液培养后,50 mL发酵液经24 h产生了300 mg的他克莫司。1998年日本的Shinsuke等^[13]对菌株进行了紫外诱变,并优化发酵培养基,大大提高了发酵液中他克莫司的浓度,同时进行了分离提取工艺的研究,工艺流程得到简化。2003年,印度科学家Kumar等申请专利^[14],从印度的Narnaul (Haryana)土壤中筛选了链霉菌*Streptomyces glaucescens* MTCC 5115,高产他克莫司而且副产物极少,对原始菌株和诱变菌株同时进行发酵研究,其效价最高为5~10 mg/L(他克莫司,300 h);之后,再次^[15]报道在高通气量的糊精培养基中通过补料分批发酵192~279 h,产生了300~310 mg/L的他克莫司。同年,韩国研究人员Kang等^[16]公布了一种高产他克莫司的链霉菌*Streptomyces clavuligerus* CKD1119,并提供了一种高产他克莫司的方法,经过7~8天(168~192 h)的发酵得到350 mg/L的他克莫司。2004年,印度学者Vaid等^[17]对一株链霉菌进行紫外、X射线诱变,将植物油(大豆油、花生油、棉籽油、葵花籽油等)作为唯一碳源进行发酵,进行了逐渐放大培养,结果表明,6 t规模连续发酵6~8天(144~192 h),他克莫司的产率达到180~330 mg/L。

我国对他克莫司的发酵研究还处于起步阶段,杭州华东医药集团公司生物工程研究所的朱健等^[18]对菌株*Streptomyces hzsw-1-25*在60℃下经紫外、

(上接第33页)

- [21] Wan M X, Li Y M. Rectifying effect of polyaniline (PANI)/n-type porous silicon heterojunction[J]. Chinese J Polym Sci, 1999, 17(1): 49-55.
- [22] Li W, Andrienko I, Aneman H. Current-voltage characteristics of Schottky barrier structures on porous silicon, and effect of an organic stabilizer film[J]. Appl Phys Lett, 2000, 88(1): 316-320.
- [23] Monastyrskii L, Lesiv T, Olenych I. Composition and properties of thin solid films on porous silicon surface[J]. Thin Solid Films, 1999, 344: 335-337
- [24] Suh K Y, Kim Y S, Lee H H. Blue photoluminescence from in situ Cu-

doped porous silicon[J]. J Appl Phys, 2002, 91: 10206-10208.

- [25] Chen C H, Chen Y F. Strong and stable visible luminescence from Au-passivated porous silicon[J]. Appl Phys Lett, 1999, 75(17): 2560-2562.
- [26] Filippov V V, Pershukovich P P, Kuznetsova V V, et al. Photoluminescence excitation properties of porous silicon with and without Er^{3+} - Yb^{3+} -containing complex[J]. J Lumines, 2002, 99(3): 185-195.
- [27] Li Gubo, Hou Xiao-yuan, Yuan Shuai, et al. Passivation of light-emitting porous silicon by rapid thermal treatment in NH_3 [J]. Journal of Applied Physics, 1996, 80: 105967-105970.
- [28] 章小鸽,张俊全,张大全,等.硅及其氧化物电化学[M].北京:化学工业出版社,2004:387. ■

HNO₂ 等方法诱变,筛选得高产突变菌株 hzsw-8-1123,发酵效价得到较大提高,但再次诱变后负突变率较高。优化发酵培养基后,进行摇瓶和 2 m³ 罐的发酵试验,摇瓶的效价得到大大提高,但 2 m³ 罐的发酵效价却回落较大。华北制药集团的王晓蕾等^[19]对筑波链霉菌 65[#] 进行了原生质体制备、再生与诱变,该菌株的平均发酵单位提高了 51.4%。天津大学闻建平^[20]利用激光诱变原始菌株筑波链霉菌,发酵单位提高 5% ~ 30%。上海农药研究所薛建萍^[21]在 50 L 发酵罐中装入 35 L 培养基,发酵 96 h 产 150 mg/L 他克莫司。然而,发酵产率与印度 Vaid 等人的报道结果相比仍有一定差距。

3 代谢工程在链霉菌发酵中的应用

他克莫司是由放线菌中的链霉菌产生的,目前临床上约 2/3 的抗生素来源于链霉菌属^[22],作为抗生素的生产菌,链霉菌在生物医药工业中有着悠久的历史 and 独特的地位。它是一类典型的 G⁺ 好氧丝状菌,其生长周期涉及一个复杂的形态分化过程,包括孢子发芽、营养菌丝和气生菌丝形成以及孢子生成。链霉菌具有完善的代谢和分泌系统,最为显著的特征是具有丰富的次生代谢途径,而且初生代谢和次生代谢之间具有严密的调控体系,世界上发现的 5 000 多种抗生素中 60% 以上是由链霉菌通过次生代谢途径合成的。

从自然界中筛选微生物并通过化学或物理诱变改善其工业性能,是发酵工程的基本思路。传统的育种手段虽然在工业应用上是有效的,但由于突变的非定向性和设计的非理性,越来越暴露出其难以认识微生物生理本质的缺陷;而对微生物代谢特性的认识不足,又进一步妨碍了对其代谢能力的改造及工业应用^[23]。随着基因工程技术不断完善和成熟,代谢工程终于走上前台。从 1991 年 Bailey^[24] 及 Stephanopoulos 等^[25] 正式提出代谢工程的概念至今,代谢工程已蓬勃发展了十几年。代谢工程应用于菌种的改良,基本思想就是将微生物的整个代谢网络视为有机整体^[26],通过代谢流量分析(MFA)、代谢控制分析(MCA)、代谢网络分析及代谢网络流量分析,来对整个网络的代谢流进行遗传导向。

在次级代谢产物高产菌株的育种中也开展了大量代谢工程方面的研究。几十年来,关于链霉菌代谢调控的研究备受重视,已有 *Streptomyces coelicolor*、*streptomyces avemtilis* 的糖类、脂类、核酸、氨基酸、辅助因子等代谢途径以及能量代谢途径和相关抗生素

合成的次级代谢等多个代谢网络图,但目前还未有任何文献报道对他克莫司的产生菌进行代谢调控方面的研究,一般只是采用传统方法对菌株进行改良以及进行发酵、提取分离工艺的优化以提高产量。

对于次级代谢产物的代谢工程来说,透彻理解生化途径、遗传特性和生物合成调节机制是至关重要的^[26]。要实现次级代谢物的高产,不仅涉及到将初级代谢产生的前体物转化为次级代谢物,还涉及到将原料转化为初级代谢的前体物,尤其是与这 2 个部分衔接有关的酶促反应。因此,在链霉菌发酵产他克莫司的过程中,要提高产物产量,必须重点研究他克莫司产生菌的初级代谢网络和次级代谢网络,通过代谢流量分析(MFA)测出前体物和相关中间产物的流量,考察不同代谢途径之间的相互关系和代谢分支点处流量的分配情况,同时通过代谢控制分析(MCA)确定关键酶及限速步骤,从而利用切实可行的育种手段对细胞进行代谢流的导向并切断副产物的分支途径,以提高目的产物产量。

4 展望

纵观国内外研究进展可以发现,人们虽然对他克莫司的发酵生产进行了诸多研究,但仍存在原始菌株产他克莫司能力低下、发酵周期长、中间产物多、高浓度产物和底物抑制、发酵液分离提取复杂等问题。目前,国内报道的发酵法生产他克莫司产量约为 220 mg/L,国外报道的发酵法生产他克莫司最高产量为 350 mg/L 左右,但发酵时间均在 8 天左右,反应体系中他克莫司类似物等副产物较多,糖的利用率和产物浓度都有待进一步提高。

代谢工程与细胞生物、基因工程等技术联合应用已成为目前控制微生物代谢一个必不可少的手段。笔者所在课题组前期对菌种发酵产他克莫司的条件进行了初步探索与优化,对菌株的生理特性有了一定的了解,接下来将进一步对细胞基质内他克莫司的代谢途径进行系统研究,有望形成一套发酵法生产次生代谢产物的代谢调控基础理论,为生物法合成他克莫司等免疫剂的研究提供模板。反应分离耦合集成技术是南京工业大学的特色技术,已经成功应用于有机酸、氨基酸等多个产品的研究开发。将该技术应用于他克莫司的发酵过程中,形成具有特色的新型集成化发酵分离耦合体系,有望缩短工艺流程,提高他克莫司发酵效率,降低生产成本,实现该产品的国产化。

参考文献

- [1] 周吉海. FK506 的发现和开发应用[J]. 日本医学介绍, 1994, 15(6): 267 - 268.
- [2] Fujisawa Pharmaceutical Company Ltd. Method for immunosuppression: US, 4929611A[P]. 1990 - 05 - 29.
- [3] Fujisawa Pharmaceutical Company, Ltd. Tricyclo compounds, a process for their production and a pharmaceutical composition: US, 005496727A[P]. 1996 - 03 - 05.
- [4] 徐亲民. 他克莫司的工业化研究[J]. 国外医药抗生素分册, 2000, 21(4): 151 - 155.
- [5] 曹梅, 何焱玲. 他克莫司治疗皮肤疾病进展[J]. 合理用药, 2006, 3(4): 41 - 44.
- [6] 张亚, 王明伟. 新型免疫抑制剂药效关系的研究进展[J]. 中国新药杂志, 2005, 14(9): 1109 - 1113.
- [7] 闫文亮. 他克莫司(Tacrolimus)[J]. 国外新药介绍, 1998(3): 22 - 27.
- [8] Dong Y P. 我国免疫抑制剂市场规模及其构成[EB/OL][2005 - 10 - 11]. <http://www.szzy.com.cn>.
- [9] 雷公藤深度开发产品市场酝酿未来重要植物新药[EB/OL][2006 - 10 - 09]. <http://news.pharmnet.com.cn/news/2006/10/09/179648.html>.
- [10] 清华大学国际技术转移中心. 新型免疫抑制剂: 麦考酚酸与他克莫司技术简介[EB/OL][2005 - 08 - 30]. <http://www.itc.com.cn/view.asp?cat1-id=12&id=1613>.
- [11] Merck & Co Inc. New process for producing FK-506: EP, 0497515A1[P]. 1992 - 01 - 24.
- [12] Merck & Co Inc. Microbial transformation product having immunosuppressive activity: US, 005352783A[P]. 1994 - 10 - 04.
- [13] Shinsuke S, Takeshi A, Kiyoshi M, et al. Studies on the development of tacrolimus production-monograph[J]. Fermentation and Bioindustrial Chemistry, 1998, 76(9): 389 - 397.
- [14] Ranbaxy Laboratories Limited. Production of tacrolimus(FK-506) using new streptomyces species: WO, 2005038009A2[P]. 2005 - 04 - 28.
- [15] Ranbaxy Laboratories Limited. Fermentation processes for the preparation of tacrolimus: WO, 2007039816[P]. 2007 - 04 - 12.
- [16] CKD Bio Corp. Microorganism producing tacrolimus and mass-productive method tacrolimus using the same: WO, 2005063963A1[P]. 2005 - 07 - 14.
- [17] Concord Biotech Limited Process for producing tacrolimus(FK-506) using vegetable oil as source of carbon: WO, 2006011156A1[P]. 2006 - 02 - 02.
- [18] 朱健, 谢祥茂, 陈俊勇. 他克莫司产生菌的选育和生产工艺研究[J]. 中国医药工业杂志, 2005, 36(4): 207 - 210.
- [19] 王晓蕾, 高慧英, 蒋沁, 等. 他克莫司产生菌原生质体制备、再生与诱变[J]. 河北大学学报: 自然科学版, 2006, 26(1): 25 - 29.
- [20] 天津大学. 用于制备他克莫司的菌种诱变方法: 中国, 1687398A[P]. 2005 - 10 - 26.
- [21] 薛建萍, 朱健, 李还宝. 他克莫司的产生菌株及生产方法: 中国, 1876822A[P]. 2006 - 12 - 13.
- [22] 李欧, 缪克排. 链霉菌次级代谢研究进展[J]. 中国抗生素杂志, 2005, 30(11): 695 - 698.
- [23] 李寅, 曹竹安. 微生物代谢工程: 绘制细胞工厂的蓝图[J]. 化工学报, 2004, 55(10): 1573 - 1580.
- [24] Bailey J E. Towards a science of metabolic engineering[J]. Science, 1991(252): 1668.
- [25] Stephanopoulos G, Vallino J J. Network rigidity and metabolic engineering in metabolite overproduction[J]. Science, 1991, 252: 1675.
- [26] 潘军华, 曾媚涓, 李乃强, 等. 次级代谢产物的代谢工程[J]. 中国微生物学杂志, 2002, 27(4): 251 - 256. ■

2008年世界 CTL 大会将在巴黎举行

2008 世界 CTL 大会是第 1 次有关煤液化技术(又称煤制油技术,即将煤液化成石油产品)的世界大会,2008 年 4 月 3 日和 4 日将在巴黎举行。这次大会是在世界能源会议(World Energy Council),世界煤炭研究所(World Coal Institute)和法国石油研究所共同举办的,参加会议的有从事煤炭液化技术(CTL 或者 Coal-to-liquids)的专家,石油化工领域、汽车领域、航空领域以及提供煤的液化产品的相关机构和企业,另外工程、金融组织或者催化剂提供商也将带来他们对有关问题的分析,会议期间各方面将对这一新的能源现在或者将来的一些重大问题发表演讲。会议主办方的安排丰富而专业。

煤的液化技术(CTL 或者 Coal-to-liquids)在当今人们关于能源的战略思考当中占有重要的地位。南非所消耗的燃料有 30% 是从煤中提炼的。美国空军刚刚结束了 B52 使用这种燃料的实验,而且将在 2011 年之前用所有的机种进行试验。中国石油大学也刚刚推出一个液化煤的选修专业。中国煤炭业的第一大公司中国神华公司将在 2008 年将第一台液化煤的设备投入使用,每天的产量为 2 万桶。2008 年的世界煤的液化大会将是对战略、环境、技术和经济的重大问题进行交流的一个重要场所。

在战略方面,煤的液化有助于减少很多煤炭资源丰富、但石油资源贫乏的国家对石油能源的依赖程度。这种能源可以提高矿山企业的价值,改善石油企业供应的多样性。矿山企业和石油企业的高层领导之间的讨论将可以使人们了解这两大重要的工业领域的战略前景。

在环境方面,煤炭从其化学性质上能够产生更高的二氧化碳,这是从事煤的液化的单位所关心的重要问题。这

一问题将在会议上介绍、量化并和其他的能源进行比较。一些研究人员和工业部门的人将介绍一些示范的项目,或者是已经达到工业化生产的项目。他们将指出通过煤的液化生产的燃料,也就是所谓的“合成燃料”与传统的燃料相比,在环境方面的好处。

在技术方面,每个技术行业将由 2 家企业(一家直接从事这一活动的企业,一家间接与此活动有关的企业)来介绍煤的液化工艺在技术、经济和环境方面的性能。

液化煤所特有的经济重要性是非常重大的。利润要想高于效益标准,还有一些不确定的因素:煤炭和石油的价格变化,税务政策执行期限的不确定性,不管是否具有鼓励性的政策,与环境有关的成本,专利人和工程机构的担保并不是很大,因为到目前为止,只有一家企业具有工业生产的经验。

除了煤的液化之外,2008 世界 CTL 大会也将介绍以煤为原料生产化工产品(Coal-To-Chemicals),以及用生物质能来代替煤炭液化(Biomass-To-Liquids)的技术。

在大会结束时,将向煤的液化领域为人们更好地了解煤的液化,改善工艺、采用并普及这一技术而做出贡献的研究人员颁发 World CTL Award 奖。据悉该年度的奖项将颁给一位日本科学家,他是这一领域的杰出代表,该奖将由一位诺贝尔奖得主颁发。来自中国的 2 位能源专家:上海交通大学能源研究院院长黄震博士和中国神华集团副总经理张玉卓博士也将参加大会并发言。

在举行大会的地方,将同时举办展览,以方便有关企业接待考察的人员和客户。

有想了解 2008 世界 CTL 大会最新信息的人员,请访问网站: www.world-CTL2008.com。(邹晓文)