



## 免疫抑制剂霉酚酸的研究及产业化进展

黄润业<sup>1,2,3#</sup>, 元兰达<sup>1#</sup>, 陈国参<sup>1</sup>, 尹文兵<sup>2,3\*</sup>

<sup>1</sup>河南省科学院生物研究所, 河南 郑州 450008

<sup>2</sup>中国科学院微生物研究所真菌学国家重点实验室, 北京 100101

<sup>3</sup>中国科学院大学医学院, 北京 100049

**摘要:** 霉酚酸是世界上应用最广泛的免疫抑制剂之一, 市场需求巨大。目前为止, 主要是通过真菌发酵的方式进行霉酚酸的工业生产, 而用于生产的菌株多是经过诱变的高产短密青霉菌。本文从霉酚酸的研究应用现状、化学合成以及生物合成途径、遗传调控、发酵生产以及市场分析等方面对霉酚酸的研究及产业化进展进行了系统综述。为该药物的新颖衍生物开发、提高产率以及应用先进生物技术智能化创制提供重要参考和依据。

**关键词:** 霉酚酸, 生物合成, 调控途径, 发酵

1893年, 意大利物理学家 Bartolomeo Gosio 首次从青霉菌中分离纯化出了一种化合物, 并将其命名为霉酚酸(mycophenolic acid, MPA)<sup>[1]</sup>。在1950年代, 霉酚酸的化学结构被解析<sup>[2-4]</sup>。霉酚酸因其复杂的化学结构, 激发了许多有机化学家的兴趣。1969年, Birch 等首次完成了霉酚酸的化学全合成<sup>[5]</sup>, 在此之后, 有机化学家们陆陆续续设计出新的霉酚酸全合成途径。

自从霉酚酸被分离纯化后, 它的生物学功能也吸引了科学家的注意。在1969年, Planterose

通过琼脂扩散实验与动物实验, 发现了霉酚酸优良的抗病毒以及对细胞有丝分裂的抑制活性<sup>[6]</sup>; 同年, Akiko Mitsui 和 Seikichi Suzuki 通过动物实验, 发现了霉酚酸的免疫抑制活性<sup>[7]</sup>。在此之后, 科学家们陆续发现了霉酚酸及其衍生物具有抑制淋巴细胞增殖, 抑制果糖、甘露糖以及黏附分子向糖蛋白转移, 抑制细胞介导的同种异体细胞免疫排斥反应, 抑制抗体形成等生物活性, 以及在生理代谢过程中产生的次黄嘌呤单核苷酸脱氢酶的抑制活性, 并将霉酚酸用于人类自身免

基金项目: 国家重点研发计划(2020YFA0907801); 国家自然科学基金(21807108); 河南省科学院省级特聘研究员项目(200505006)

#共同第一作者。

\*通信作者。Tel: +86-10-64806170; E-mail: yinwb@im.ac.cn

收稿日期: 2020-12-23; 修回日期: 2021-02-05; 网络出版日期: 2021-03-22

疫疾病的治疗以及降低器官移植之后的免疫排斥反应<sup>[8]</sup>, 在医药领域展现出了巨大的应用价值。

霉酚酸的合成具有化学合成与生物合成 2 种方式。虽然有机化学家陆续设计了新的霉酚酸化学合成途径, 但仍弥补不了霉酚酸生产过程中途径步骤冗长、得率低的短板。因此, 通过真菌发酵生产霉酚酸, 是目前工业生产霉酚酸的主要方式。本文对霉酚酸的发展现状进行了简要阐述; 阐述了霉酚酸的化学合成途径与生物合成途径, 以及霉酚酸在青霉菌生长过程中的表达调控; 对真菌霉酚酸生产现状进行了概述, 并对霉酚酸市场进行了简要分析。期望通过遗传手段以及工业手段, 提高真菌霉酚酸的产率, 满足市场需求。

## 1 霉酚酸基本性质及其应用现状

### 1.1 霉酚酸的结构及其基本理化性质

霉酚酸(mycophenolic acid, MPA), 又名麦考酚酸, 为真菌次级代谢产物。Bartolomeo 于 1893 年从青霉中对其进行了提取、纯化及结晶, 这也是世界上第一种被纯化出来的抗生素<sup>[1]</sup>。霉酚酸化学结构式(图 1)为 E-4-甲基-6-(1,3-二氢-7-甲基-4-羟基-6-甲氧基-3-氧代-5-异苯并呋喃基)-4-己烯酸, 是一种聚酮-萜类(polyketide-terpenoid)杂合的天然产物。分子式为  $C_{17}H_{20}O_6$ , 分子量为 320.341, 是一种乳白色粉末。溶于甲醇、乙醇; 微溶于醚、氯仿; 难溶于苯、甲苯; 几乎不溶于冷水。pKa 为 4.5, 熔点 141 °C, 沸点 145 °C, 有毒<sup>[1]</sup>。

### 1.2 霉酚酸的生理活性及其临床应用现状

T 淋巴细胞与 B 淋巴细胞的增殖主要依赖鸟嘌呤的从头合成途径, MPA 具有抑制次黄嘌呤

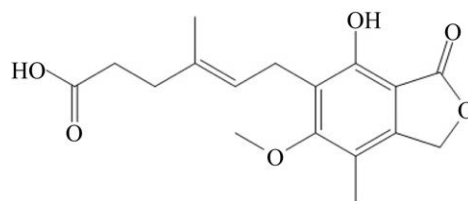


图 1. 霉酚酸的化学结构<sup>[1]</sup>

Figure 1. Chemical structure of mycophenolic acid<sup>[1]</sup>.

单核苷酸脱氢酶(IMPDH)的生理活性, 从而抑制了次黄嘌呤核苷酸(IMP)向黄嘌呤核苷酸(XMP)的转化, 最终抑制鸟嘌呤的从头合成与淋巴细胞的增殖<sup>[9-12]</sup>。MPA 通过选择性地阻断淋巴细胞的增殖与抑制抗原递呈细胞与树突状细胞的活性, 抑制了 B 淋巴细胞向记忆细胞与浆细胞的转化, 并且降低了细胞因子的分泌, 然而 MPA 对同样参与免疫反应的单核细胞与巨噬细胞的活性并没有显著的影响<sup>[13]</sup>。因此, MPA 在临床上展现出了巨大的抗免疫排斥反应、抗癌与抗病毒的应用价值。

在临床上, MPA 作为一种免疫抑制剂, 常与其他种类的免疫抑制剂联用, 对移植排异和自身免疫性疾病均有显著疗效<sup>[1,14]</sup>。MPA 通过抑制海藻糖、甘露糖的糖基转运, 抑制了活化的淋巴细胞与上皮细胞或靶细胞间的粘附, 从而保护靶细胞免遭淋巴细胞的杀伤; 或者通过抑制外源细胞和抗体之间的排斥反应与抗体形成, 可以有效延长移植器官的存活<sup>[15]</sup>。目前霉酚酸制剂已应用于降低心脏移植<sup>[16]</sup>、糖尿病患者肾移植<sup>[17]</sup>、肝移植等器官移植的免疫排异反应<sup>[18]</sup>, 以及自身免疫性疾病如狼疮性肾炎<sup>[19-23]</sup>、血管炎<sup>[24]</sup>、小儿皮炎<sup>[25]</sup>等的治疗中。除此之外, 在其他的非免疫疾病治疗当中, MPA 也被当作一种药物治疗, 比如系统性硬化症<sup>[26]</sup>等。MPA 对乙肝病毒、冠状病

毒也展现出较强的抑制作用<sup>[27-30]</sup>，在治疗中东呼吸综合征等病毒感染的人类疾病当中，展现出了巨大的潜力。但是霉酚酸的药代动力学受到多方面因素的影响，比如患者间的个体差异、患者肾功能、器官移植后的时期、使用剂量、与其他免疫抑制剂的联用等，因此霉酚酸在血浆中的浓度应该受到严格的监控，这也是霉酚酸制剂在临床使用受限的原因之一<sup>[31]</sup>。

MPA 还能影响信号转导通路，比如通过降低蛋白激酶 C $\alpha$  (PKC $\alpha$ )、C $\beta$ I (PKC $\beta$ I)和 C $\beta$ II (PKC $\beta$ II)的磷酸化作用，从而抑制转化生长因子- $\beta$ 1 (transforming growth factor- $\beta$ , TGF $\beta$ 1)的生物活性，进而降低纤连蛋白的合成及其在细胞外的沉积<sup>[32]</sup>。在癌症治疗过程当中，MPA 也展现出优良的抗肿瘤活性。MPA 能通过影响多条分子途径与生物学过程从而抑制癌细胞的生长、繁殖与转移。例如下调周期蛋白依赖性激酶 4 和 5 (CDK4 和 CDK5)，从而引起细胞周期停滞<sup>[33]</sup>。但由于其易于和糖醛酸结合，因此很难达到临床应用水平<sup>[34]</sup>。

## 2 霉酚酸的合成

### 2.1 化学合成

Birch 等在 1969 年首次完成了霉酚酸的化学全合成<sup>[5]</sup>。近年来国内外有很多关于霉酚酸合成方法的报道，在结构上，霉酚酸可以看作是一个六取代的苯环，根据侧链合成方法的不同，将合成路线分为两类：(1) 分别合成芳环母环和侧链，再进行母环 C-6 与侧链的卤代进而获得霉酚酸，也包括霉酚酸的线性合成途径<sup>[35-39]</sup>；(2) 先合成具有侧链的母环结构，经环化、芳香化等步骤完成霉酚酸的合成<sup>[40-45]</sup>。

Birch 采取线性合成的方式，先合成邻苯二甲酸酯 **1**，再在 C-6 引入 3-溴丙烯 **2**，随后再进行侧链的延长，最终合成霉酚酸<sup>[5]</sup>。1991 年，Patterson 在 Birch 的合成路线上加以改进，也是通过邻苯二甲酸二甲酯内酯化形成杂环取代基，以及臭氧氧化烯丙基双键形成侧链醛基<sup>[35]</sup>。不同之处在于 Patterson 通过添加格氏试剂 **7** 与醛基反应延长侧链，并利用丙酸催化乙酸三乙酯的克莱森重排得到 **9**，提高了霉酚酸 55% 的产率(图 2-A)。1993 年，Patterson 在原有的合成路线上，又加以完善<sup>[36]</sup>。他以 3-羟基-2-环己烯酮 **11** 与丙烯醇 **12** 为底物，通过 Alder-Rickert 反应，构建出一个五取代的邻苯二甲酸二甲酯衍生物 **14**，然后经过克莱森重排反应，在 C-6 引入丙烯基得到化合物 **16**，之后的步骤就与之前一样，最终合成 MPA (图 2-B)。Canonica 先分别合成侧链-烯丙基溴化物 **18** 和芳环母环-苯酐 **19**，在氧化银(Ag<sub>2</sub>O)与二恶烷(dioxane)的催化下，形成 C-6 烷基化的产物 **20**，最后选择性甲基化 C-5-OH 得到霉酚酸 **22**<sup>[38]</sup> (图 2-C)。

Danheiser 采取芳环环化策略，即基于炔烃与环丁烯酮热合成的 Danheiser 苯环化反应<sup>[41]</sup> (图 3)。以炔烃 **23** 与环丁烯酮 **24** 作为底物，经过 Danheiser 苯环化反应，得到芳香环 **25**；再依次经过溴代得到化合物 **26**、氧化得到化合物 **27** 以及酯化得到化合物 **28**，最终合成霉酚酸 **22** (图 2-D)；Brookes 等通过霉酚酸的逆合成分析，设计出了一条由钼催化芳香化的全合成路线<sup>[40]</sup>。

在霉酚酸的化学合成过程中，发现当其甲基被乙烯基或者小分子烷基取代时，表现出更强的 IMPDH 抑制活性<sup>[46]</sup>，且霉酚酸的共价修饰衍生物也表现出比霉酚酸更强的抗淋巴细胞增

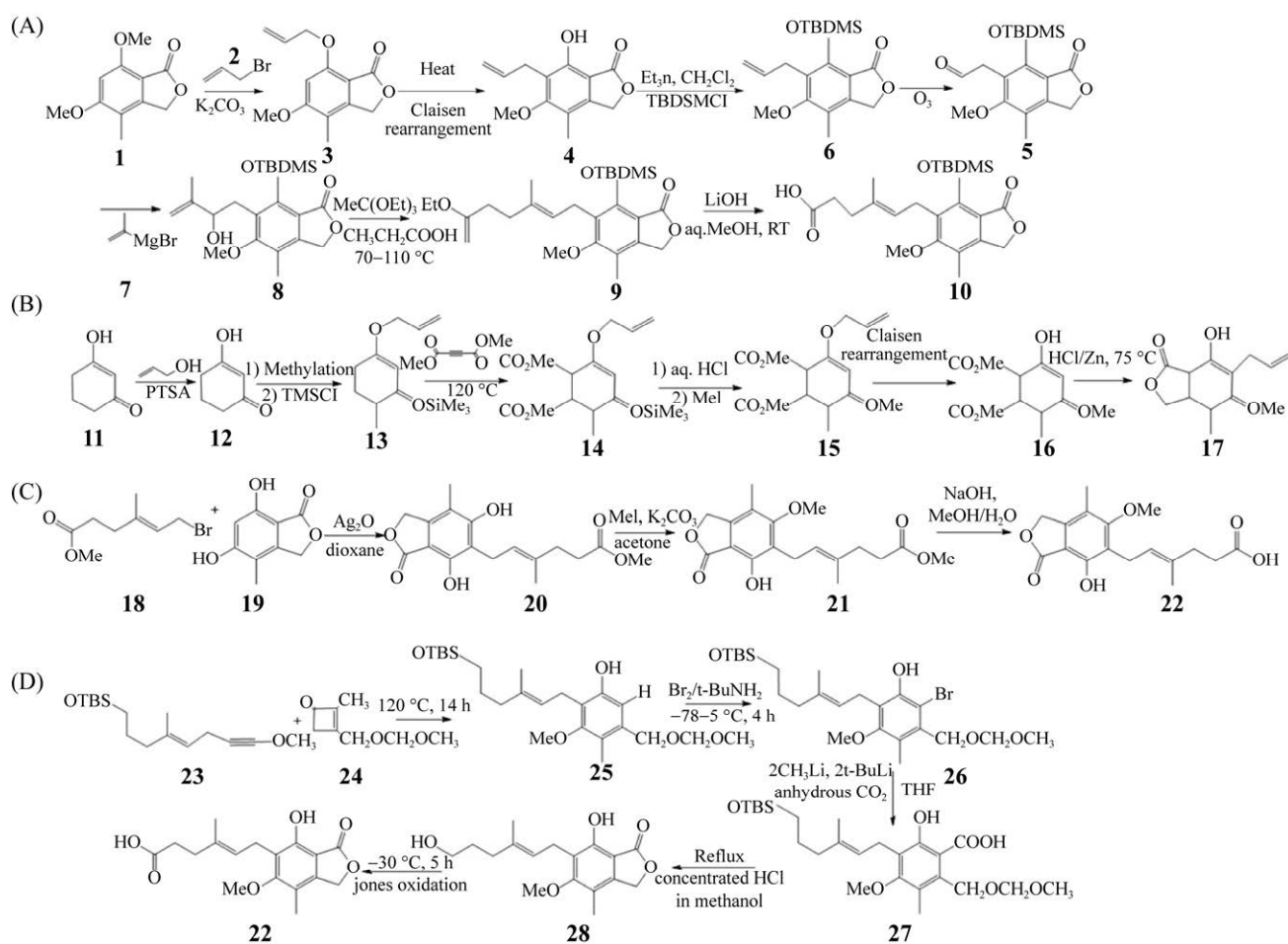


图 2. 霉酚酸合成设计路线

Figure 2. Design synthetic of mycophenolic acid. A: by Birch and Patterson (1991)<sup>[5,35]</sup>; B: by Patterson (1993)<sup>[36]</sup>; C: by Canonica<sup>[38]</sup>; D: by Danheiser<sup>[41]</sup>.

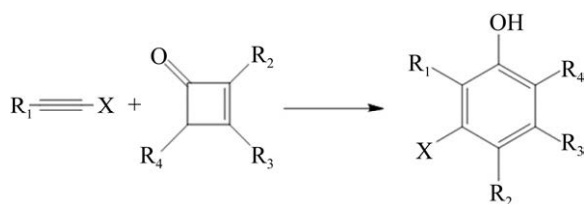
图 3. Danheiser 苯环化反应<sup>[41]</sup>

Figure 3. Danheiser benzene cyclization reaction<sup>[41]</sup>.

殖活性。比如, Cholewinski 等通过化学合成霉酚酸与吡啶/吡啶酮的共轭衍生物, 不仅提高了霉酚酸的药物活性, 而且降低了霉酚酸的生物毒性<sup>[47]</sup>; Malachowska-Ugarte 等合成的霉酚酸硝基吡啶/吡

啶酮衍生物也表现出了比霉酚酸更强的免疫抑制活性<sup>[48]</sup>。因此霉酚酸的共价修饰与芳香环上甲氧基团修饰是增强其免疫抑制活性的重要方式, 也是霉酚酸化学合成的优势所在。

## 2.2 生物合成

在青霉中, 霉酚酸的生物合成基因是成簇存在的<sup>[49-50]</sup>(图 4-A)。相关生物合成途径已被解析, 发现与 MPA 合成相关的酶在细胞中的定位存在明显的区域化特征<sup>[50-52]</sup>。MpaC 定位于细胞质中, 是一种聚酮合酶, 负责 MPA 生物合成中骨架的

合成。MpaC 主要包括酰基载体蛋白质转移酶 (SAT)和  $\beta$ -酮基合成酶(KS)、酰基转移酶(AT)、产物模板(PT)、酰基载体蛋白(ACP)、甲基转移酶(MT)结构域,且在蛋白质的碳端有环化酶/硫酯酶活性,催化多聚酮环化和 PKS 的释放。MpaDE 与内质网相结合,是一种 P450 与水解酶的融合酶,具有与 P450 相似的性质,催化 C-3 甲基的氧化。MpaA 是一种与高尔基体相关的异戊烯基转移酶,催化四邻苯肽的异戊烯化,异戊烯化后被氧化裂解。MpaH 是过氧化物酶体中的酰基辅酶 A 水解酶,类似于 Akt2 位于过氧化物酶体起氧化作用; MpaG 是位于细胞质中的 *O*-甲基转移酶,催化 MPA 脱甲基化与去甲基霉酚酸的甲基化<sup>[53-54]</sup>; MpaB 是与内质网相结合的氧化酶,催化了法尼基侧链的氧化裂解;过氧化物酶体是发

生  $\beta$ -氧化的场所。在上述酶促反应与过氧化物酶体中  $\beta$ -氧化机制的共同作用下,催化了 MPA 的生物合成。MpaH 编码肌昔-5-单磷酸脱氢酶,不参与 MPA 的生物合成,是作为 MPA 生物合成过程中的抗性基因。短密青霉菌合成霉酚酸的主要途径(图 4-B):MpaC 催化了 1 分子的乙酰辅酶 A、3 分子的丙二酸单酰辅酶 A 以及 1 分子的 *S*-腺苷甲硫氨酸(SAM)形成 1 分子 5-甲基昔色酸(5-MOA); MpaDE 是由细胞色素 P450 结构域(MpaD)与水解酶结构域(MpaE)组成的融合酶, MpaD 催化 C-8 发生羟基化形成 3,5-二羟基-7-(羟甲基)-6-甲基苯甲酸(DHMB),随后由 MpaE 催化分子发生内酯化,形成 3,5-二羟基-6-甲基肽(DHMP);异戊烯基转移酶 MpaA 催化 DHMP 的法尼基化,通过将法尼基焦磷酸(FPP)的法尼基转移

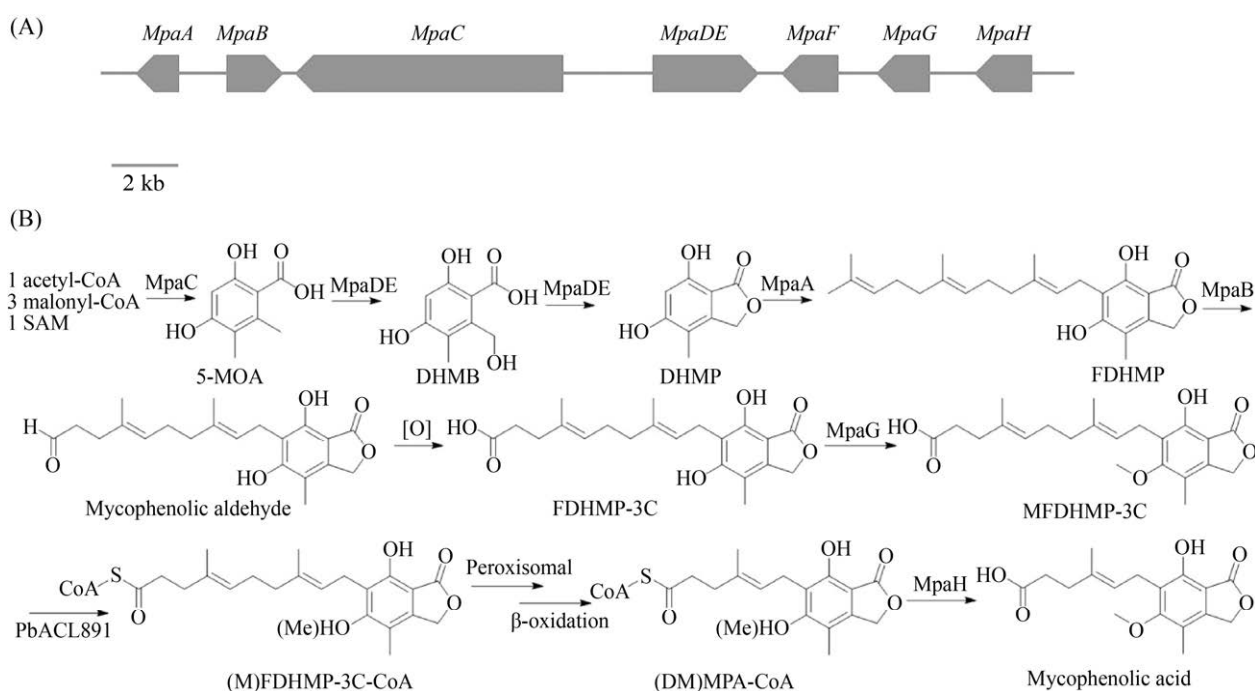


图 4. 霉酚酸的生物合成

Figure 4. Biosynthesis of mycophenolic acid. A: Biosynthetic gene cluster<sup>[49-50]</sup>. B: Main biosynthetic pathway of MPA<sup>[51,55-58]</sup>.

到 DNMP 上,并以 C-C 键相连,产生 4-法尼基-3,5-二羟基-6-甲基肽(FDHMP); *O*-甲基转移酶 MpaB 氧化裂解 FDHMP 的 C<sub>19</sub>=C<sub>20</sub> 双键,形成 FDHMP-3C;在 FDHMP-3C 进入到过氧化物酶体之前,由甲基转移酶 MpaG 催化 FDHMP-3C 发生 5-*O*-甲基化形成 MFDHMP-3C;在(M)FDHMP-3C、ATP、CoA 与 Mg<sup>+</sup>存在的条件下,PbACL891(乙酰辅酶 A 连接酶的同源蛋白,C 端具有丙氨酸-赖氨酸-亮氨酸三肽)催化了(M)FDHMP-3C-CoA 的形成,是连接生物合成途径与过氧化物酶体内  $\beta$ -氧化途径的关键步骤,对 MPA 合成中的特异性和高效性至关重要;(M)FDHMP-3C-CoA 在过氧化物酶体中进行  $\beta$ -氧化,每次脱去 2 个碳,最终形成(DM)MPA-CoA;MpaH 在  $\beta$ -氧化链的缩短过程中,起到一个阀门的作用,通过水解辅酶 A,决定了 MPA 的合成效率与多样性,MPA-CoA 在 MpaH 的催化下脱去辅酶 A,形成 MPA; *O*-甲基转移酶 MpaG 通过催化去甲基霉酚酸(DMMPA)发生 5-*O*-甲基化,形成 MPA<sup>[51,55-58]</sup>。

在 MPA 的生物合成过程当中,通过改变无机环境能够提高其产量。向短密青霉菌的培养基中分别添加 0.02% 的山梨酸钾与 0.015% 苯甲酸钠,发现 MPA 的产量分别提高了 1.7 倍与 1.5 倍<sup>[59]</sup>。这可能是因为一定浓度的山梨酸钾能够抑制菌体的生长,促进黄曲霉毒素 B1 与 T-2 毒素的累积,从而造成参与三羧酸循环的酶活性降低,引起细胞内的乙酰辅酶 A 大量累积,乙酰辅酶 A 作为底物参与细胞内聚酮类化合物的生物合成,从而提高聚酮类及相关杂合类次级代谢产物的生物合成。苯甲酸钠分子通过渗透作用进入细胞中,极大地降低了胞内的 pH 值,抑制了糖酵解相关酶的活性(磷酸果糖激酶被抑制的最严重);或是作

为一种超氧化物诱导了细胞内的抗氧化物损伤应答反应机制,激活了胞内的次级代谢途径。另外,通过减少副产物的合成也可以提高 MPA 的产量。 $\beta$ -羟基- $\beta$ -甲基戊二酰辅酶 A (HMG-CoA)裂解酶是短密青霉菌中 MPA 代谢旁路的关键基因,通过构建 HMG-CoA 裂解酶突变株,发现其 MPA 产量比野生型菌株 ATCC 16024 提高了 71%<sup>[60]</sup>。

### 3 霉酚酸生物合成的遗传调控

在霉酚酸的生物合成基因簇当中,并没有发现编码转录因子的调控基因<sup>[50]</sup>。这表明霉酚酸的遗传调控依赖于其他调控因子。真菌生理代谢的转变与繁殖、产孢等生命活动密切相关,因此调控青霉属繁殖发育的相关全局调控因子最有可能是霉酚酸生物合成的调控因子。娄地青霉中的 *pcz1* 基因编码 Zn(II)<sub>2</sub>Cys<sub>6</sub> 蛋白,是菌体生长与产孢的正向调控因子,并且负调控孢子的萌发<sup>[61]</sup>。通过 RNAi 沉默以及替换强启动子过表达 *pcz1*,发现 *pcz1* 能够正向调控 MPA 的生物合成基因簇<sup>[62]</sup>,但是具体的调控机制尚不明确。

在产黄青霉中,青霉素合成基因簇的缺失突变会促进 PR-毒素的生物合成;在娄地青霉中,PR-毒素基因簇的沉默能够促进霉酚酸的生物合成。这说明青霉素生物合成基因簇、PR-毒素生物合成基因簇与霉酚酸生物合成基因簇不仅存在着分子之间的交叉交流<sup>[49,63]</sup>,并且存在一个交叉调控网络,由上级合成途径中的特定代谢产物或者 microRNA 负调控/抑制下级次级代谢途径<sup>[64]</sup>。已知青霉素的生物合成会抑制 PR-毒素的生物合成,PR-毒素的生物合成会抑制霉酚酸的生物合成。如果青霉素、PR-毒素与霉酚酸的生物合成

之间存在着一个级联调控关系, 通过逆向推导, 可猜测霉酚酸的生物合成上调会抑制 PR-毒素的生物合成, 从而促进青霉素合成的上调; 亦或是青霉素的生物合成与霉酚酸的生物合成之间存在着一个直接的调控关系。但是目前还没有相关数据说明青霉素生物合成与霉酚酸生物合成之间存在的调控关系。

## 4 霉酚酸的真菌发酵生产

### 4.1 产霉酚酸菌属

霉酚酸主要是由青霉菌属真菌产生, 包括 *Penicillium stoloniferum* (匍匐茎青霉菌)<sup>[65]</sup>、*Penicillium brevicompactum* (短密青霉菌)<sup>[66-68]</sup>、*Penicillium roqueforti* (娄地青霉菌)<sup>[69]</sup>、*Penicillium viridicatum* (纯绿青霉菌)<sup>[70]</sup>、*Penicillium canescens* (灰白青霉菌)<sup>[71]</sup>、*Penicillium rugulosum* (褶皱青霉菌)<sup>[71]</sup>、从肉类产品中分离出的 *Penicillium carneum*<sup>[72]</sup>和 *Penicillium fagi*<sup>[73]</sup>、从板栗粉中分离出来的 *Penicillium bialowiezense* (比阿娄维扎青霉菌)<sup>[74]</sup>、从海洋中分离出的青霉菌 *Penicillium* sp. SCSIO sof101<sup>[71-73,75]</sup>。而之前曾被报道过会产生 MPA 的 *Penicillium paxilli* (蕈青霉菌) 则被 Vinkurova 证明并不会产生 MPA<sup>[71]</sup>。除了青霉菌属真菌之外, 从腐烂的水果和青贮饲料当中分离得到的 *Byssochlamys nivea* (雪白丝衣霉)<sup>[76]</sup>也能够产生 MPA。目前为止, 工业上应用于霉酚酸生产的菌株主要是短密青霉菌和娄地青霉菌。

### 4.2 高产菌株的诱变

诱变育种是指通过特定的条件或方法处理菌株, 从而诱导菌株发生突变, 然后再通过筛选得到达到要求的菌株, 工程菌株的构建完成这一

系列步骤。诱变育种具备操作简单、周期短、效果好等优点, 现在得到广泛应用。其中紫外诱变在工业微生物育种中使用非常普遍。

张琴等以短密青霉 MA-4 为出发菌株, 应用紫外和亚硝基胍诱变, 结合霉酚酸与三氟乙酸抗性筛选, 获得高产、稳定的突变株 MA-H8。经过发酵培养基优化, 突变株发酵水平为 4500  $\mu\text{g/mL}$ <sup>[77]</sup>。刘梅等从土壤中分离得到的 MPA 产生菌 F-663, 经紫外线、微波等诱变育种筛选到菌株 M-51, 其 MPA 产量达 1951  $\mu\text{g/mL}$ , 又经过 5 个剂量 15 keV 氮离子注入方法的诱变育种以及发酵条件优化, 产量从初始的 133  $\mu\text{g/mL}$  提高至 2819  $\mu\text{g/mL}$ , 显示了该菌株的高产潜力, 并且由于该菌株发酵产物组分比较单一, 发酵液经乙酸乙酯初步提取, 提取物中霉酚酸的含量可达到 80%<sup>[78]</sup>。廖爱芳等以短密青霉菌 UH35-58 为出发菌株, 经紫外线诱变, 采用摇瓶一级发酵补水工艺(64 h 补水 20%)淘汰大量低产菌株, 获得高产突变株 N110-N76<sup>[79]</sup>。用 HPLC 测定其发酵液的霉酚酸含量, 发酵单位比出发菌株 UH35-58 提高 120%。经过连续传代试验, 该菌株的遗传性状稳定。Ismaiel 等从洛克福奶酪中分离出了两株具有 MPA 生产活性的 *Penicillium roqueforti*——AG101 和 LG109, 置于紫外线下照射 90–120 min, MPA 浓度分别能够提高至 3.22 $\pm$ 0.03  $\mu\text{g/mL}$  与 3.80 $\pm$ 0.11  $\mu\text{g/mL}$ <sup>[80]</sup>, 之后随着暴露时间的增加, 产量逐渐降低。El-Sayed 等在 2019 年对 AG101 与 LG109 的霉酚酸生产条件进行优化, 用紫外线(254 nm)照射孢子 90 min 与 120 min, 并且利用甘蔗渣进行固体发酵后, 霉酚酸的浓度提高至 14.85 $\pm$ 0.01 mg/kg 和 14.89 $\pm$ 0.01 mg/kg; 用 0.75 kGy 的伽马射线照射, 两株菌株产霉酚酸的最高浓度

可达  $16.41 \pm 0.11$  mg/kg 和  $16.63 \pm 0.11$  mg/kg<sup>[81]</sup>。

王昆蓉等以短密青霉 TK1-41# 为出发菌株, 对霉酚酸产生菌进行诱变育种研究。根据 MPA 产生菌的特点, 设计了一种新的筛选方式, 即通过制霉菌素预处理, 改变了 MPA 产生菌细胞膜的通透性, 提高了它对诱变剂的敏感性。最后再经过紫外诱变和添加高浓度自身代谢产物的方法, 对 MPA 产生菌进行复合处理, 获得了高产突变株 TK93#, 其在 1 t 发酵罐上的产量比出发菌株 TK1-41# 提高了 163%<sup>[82]</sup>。以 *P. brevicompactum* D-4 为出发菌株, 经紫外线诱变和自然分离纯化, 筛选出一株 MPA 的产量明显地高于出发菌株的突变株 U8-S-5, 在 10 m<sup>3</sup> 发酵罐上的 MPA 效价可以达到 1600 μg/mL, 较出发菌株提高 8 倍多<sup>[83]</sup>。杨亚勇等通过对霉酚酸产生菌的原生质体制备、再生条件进行研究, 建立了原生质体诱变筛选体系。在此基础上, 采用紫外线和亚硝酸复合诱变处理霉酚酸产生菌的原生质体, 经原生质体再生获得了 A-S-8 的菌株, 该菌株比对照菌株生产能力提高 28.2%, 摇瓶和 50 L 发酵实验的效价均可达到 6000 μg/mL 以上<sup>[84-85]</sup>。

### 4.3 霉酚酸的发酵、提取及分析

霉酚酸的发酵技术包括固态培养及发酵和液态发酵。次级代谢往往发生于菌体生长营养后期。因此, 霉酚酸的产量与菌体的生长关联密切。

#### 4.3.1 霉酚酸的固体发酵及其提取与分析方法:

Patel 利用短密青霉菌进行固体发酵生产霉酚酸, 最终产量为 4.5 g/kg<sup>[86-87]</sup>。使用质量比为 80% 蒸熟的香米(steamed parmal rice)作为初始底物, 并在初始底物中添加 40 g/L 葡萄糖、54 g/L 蛋白胨、8 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、2 g/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、7 g/L 甘氨酸以及 1.65 g/L 的甲硫氨酸(pH 5.0)和少量微量元

素。微量元素及其添加浓度为: FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2.2 g/L, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.3 g/L, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2.4 g/L, MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.16 g/L 和 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 0.2 g/L, 初始 pH 均为 5.0。在 25 °C 发酵生产 12 d 后, 霉酚酸的产量达到 3.4 g/kg。若将葡萄糖换成糖浆, 产量会达到 4 g/kg; 将香米换成米糠, 产量将会达到 4.5 g/kg。

发酵之后, 向锥形瓶中加入 200 mL 乙酸乙酯(pH 4.0)。将锥形瓶置于振动台上(200 r/min), 充分混合乙酸乙酯与固体发酵物, 共振 4 h。通过过滤回收提取物。用旋转蒸发器蒸发少量提取物, 之后用 1 mL 甲醇溶解残余物, 再用 0.45 μmol/L 过滤器过滤后, 进行 HPLC 分析。利用高效液相色谱分析霉酚酸。选用 C<sub>18</sub> 柱, 柱温设置为 40 °C。流动相为乙腈和水(体积比为 50 : 50), pH 调至 3.0, 流速设置为 0.5 mL/min。进样量为 10 μL。用光电二极管阵列检测器检测 220 nm 的波长, 并与标准品进行比对。

#### 4.3.2 霉酚酸的液体发酵及其提取与分析方法:

Ardestani 使用 *Penicillium brevicompactum* ATCC16024 发酵生产霉酚酸<sup>[88]</sup>, 发现基本培养基中没有添加 N-乙酰马来酰亚胺与苯甲酰甲醛, 最高产率为 5.37 μg/(mL·h); 如果添加了 18 μg/mL 的苯甲酰甲醛, 产率提高了 93.11%, 达到 10.37 μg/(mL·h); 如果添加 6 μg/mL 的 N-乙酰马来酰亚胺, 产率提高了 106.89%, 达到 11.11 μg/(mL·h)。基本培养基配方为葡萄糖 80 g/L、甘氨酸 9 g/L、酶解酪蛋白 15 g/L、蛋氨酸 0.5 g/L、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5 g/L、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1 g/L 以及 1 mL/L 的微量元素混合物。微量元素混合物的配方为 FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2.2 g/L、CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.3 g/L、ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2.4 g/L、MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.16 g/L、KMoO<sub>4</sub> 0.2 g/L。所有培养



基的 pH 值均用 HCl/NaOH 调到 6.0。置于摇床中 200 r/min、24 °C 发酵 12 d。调整发酵液的 pH 值至 7.0，置于离心机中 10000 r/min 离心 10 min 除去菌体。利用填装有高纯度硅胶的吸附色谱柱提取 MPA，用甲醇进行洗脱。使用 pH 为 2 的冰水沉淀纯化洗脱液中的 MPA 白色粉末，置于 65 °C 烘箱中进行干燥。将样品溶解于甲醇当中 (1000 µg/mL)，用 0.2 µmol/L 的滤膜过滤，利用高效液相色谱(HPLC)进行分析。HPLC 分析时选用 C<sub>18</sub> 柱，柱温设置为 40 °C。以等比例的 0.1 mol/L 的磷酸氢二钾与乙腈(pH 为 3.0)作为流动相，流速设置为 0.5 mL/min。在紫外线探测器上检测 250 nm 波长，并与标准品进行比对。

高兴蓉等对短密青霉菌 L 产生霉酚酸的发酵工艺条件进行了研究。发现在以葡萄糖为碳源的情况下，霉酚酸的产量最高；以甘氨酸作为氮源时，霉酚酸产量最高，并通过均匀设计法优化了发酵培养基的组成。原始的发醇培养基为葡萄糖 100 g/L、甘氨酸 14 g/L、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3 g/L、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1 g/L、L-蛋氨酸 0.5 g/L 以及微量元素混合液，培养基 pH 值为 4.5。优化后的培养基成分为葡萄糖 240 g/L、甘氨酸 22 g/L、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 6 g/L，其他成分保持不变，pH 调至 4.0。在优化条件下，摇瓶发酵单位比原始产量提高了 89%，达到 8565 µg/mL<sup>[89]</sup>。

霉酚酸的最终得率受到培养条件、萃取剂、pH、流动相流速与洗脱液体积等因素的影响。Anand 等通过响应曲面法(response surface methodology)算出在霉酚酸的纯化过程当中，在 pH 为 6.05、流速为 1.96 mL/min、洗脱体积为 149.49 mL 的条件下，霉酚酸的得率最高，为 84.42%，而最终实际得率为 84.12%，理论得率与

实际得率十分接近<sup>[90]</sup>。因此，在霉酚酸的生物发酵、萃取与纯化的过程中，能通过均匀设计法优化培养基组分，选用乙酸乙酯作为萃取剂，再通过响应曲面法优化纯化条件，实现霉酚酸得率最大化。

## 5 霉酚酸市场分析

### 5.1 霉酚酸专利申请

在德温特专利检索平台上，共检索到 828 条与霉酚酸有关的国内外申请专利。对检索结果进行分析后发现，其中与化学方面相关的专利有 819 条，与药理学方面相关的专利有 796 条，与生物技术以及应用微生物学方面相关的专利有 422 条。其中，2020 年的霉酚酸相关申请专利共检索到 32 项。数量最多的就是霉酚酸在癌症、自身免疫疾病以及器官移植等疾病治疗中的应用，共搜索到 21 项。

在中国国家知识产权局共检索到与霉酚酸相关申请专利 58 项。对这些申请专利分析发现由霉酚酸制备的药物，不仅仅能够治疗人类疾病，比如白癜风、器官移植后的免疫排斥反应等，还能够治疗非人类哺乳动物与植物疾病。

### 5.2 霉酚酸产品主要类型

免疫抑制剂在器官移植和自身免疫系统疾病方面疗效显著。目前市场上免疫抑制剂种类繁多，作用机制多样。其中销售数量和销售金额排序前 3 位分别为霉酚酸酯、环孢素与他克莫司。在临床上应用的霉酚酸制剂主要是瑞士罗氏公司生产的霉酚酸酯(MMF 骁悉)和诺华公司的霉酚酸制备钠(MPS 米芙)。霉酚酸产品主要剂型包括分散片、片剂、胶囊剂、注射剂和干混悬液等。

### 5.3 市场分析

据有关数据统计,美国的器官移植市场 2005 年已超 100 亿美元,并以每年 5.2%的速度增加。据 SFDA 南方所数据,我国免疫抑制剂市场规模约 100 亿元左右,其中真菌代谢产物的市场份额最高,其次分别为中药类和化学制剂类,激素和生物制剂等所占份额较小。另外 IMS 数据显示,2009 年中国免疫抑制剂市场购药金额为 23 亿元,而从 2006 年到 2009 年,中国免疫抑制剂市场 4 年的复合增长率为 15%,其中 2007 年增长 8.3%,2008 年增长 14.56%,2009 年增长 22% 市场增长呈加速态势。免疫抑制剂市场容量取决于每年新接受器官移植病人的增长率和已移植病人的存活时间。2008 年卫生部副部长黄洁夫等在“21 世纪中国与全球健康——《柳叶刀》专辑中文版”研讨会上指出,中国每年大约有 150 万人因末期器官功能衰竭需要器官移植,其中包括尿毒症、肝癌和肺癌等患者,但每年能够使用的器官数量不到 1 万,供求比例达到 1:150,今后每年的器官移植手术规模将扩大 3 倍,由于器官移植患者需要终身服用免疫抑制药物,因此抗排异免疫抑制剂市场机遇非常广大,而霉酚酸由于高效安全、副作用小等特点具有广阔的开发前景。2014 年,霉酚酸的销售额已在 5.34 亿美元左右,展现出了巨大的经济价值<sup>[86]</sup>。

据罗氏中国官方网站资料,霉酚酸在美国的专利保护已于 2007 年到期,在欧盟的专利保护于 2011 年到期,预计同类产品市场竞争将愈加激烈。中国免疫抑制剂市场具有垄断性特征,95% 以上份额被少数寡头占据。合资企业所占份额比其余厂家总和还多,要争得市场不是容易之事。

但外资企业产品价格昂贵,一旦国产药上市将占有价格优势。我国在免疫抑制剂药物市场规模约 100 亿元,并且国家仍在增加对医疗财政支出,加大医保力度,相信随着相关政策的出台,国内免疫抑制剂市场容量还会不断增大,霉酚酸的研发前景广阔<sup>[91]</sup>。

## 6 展望

霉酚酸主要是由青霉菌产生的一种次级代谢产物,也是目前世界上使用最广泛的抗免疫抑制剂之一,被用作降低器官移植之后的免疫排斥反应、治疗自身免疫疾病以及治疗炎症等,在医药领域的市场需求巨大。工业生产霉酚酸的方式主要是通过真菌发酵,继而从发酵液中分离纯化霉酚酸。但是目前霉酚酸发酵生产的工业化仍处于较低水平,成本十分高昂,用于发酵的菌株主要经过紫外诱变的高产短密青霉菌,但是这种方法对于青霉菌生产霉酚酸的潜力开发有限。未来的研究工作应当更加深入探索霉酚酸的合成代谢与发酵调控机理。例如通过遗传手段优化青霉菌霉酚酸合成途径、增强青霉菌霉酚酸的表达、减少青霉菌霉酚酸副产物的合成等。此外还可以通过对霉酚酸基因簇和关键酶基因进行改造以对其发酵生产进行调控。随着基因组挖掘技术的发展,特别是短密青霉菌基因组测序的完成,给霉酚酸的异源表达提供了基础条件,而生物信息技术又可以在基因水平上对霉酚酸合成基因簇进行改造,提高工业菌株的生产性能,进而发掘出更多的霉酚酸衍生物,为新型药物开发提供了优异的资源。

## 参考文献

- [1] Bentley R. Mycophenolic acid: A one hundred year odyssey from antibiotic to immunosuppressant. *Chemical Reviews*, 2000, 100: 3801–3825.
- [2] Birkinshaw JH, Raistrick H, Ross DJ. Studies in the biochemistry of micro-organisms .86. The molecular constitution of mycophenolic acid, a metabolic product of *Penicillium brevicompactum* dierckx .3. Further observations on the structural formula for mycophenolic acid. *Biochemical Journal*, 1952, 50: 630–634.
- [3] Logan WR, Newbold GT. Lactones .5. Experiments relating to mycophenolic acid. *Journal of the Chemical Society*, 1957: 1946–1951.
- [4] Harrison W, Shearer HMM, Trotter J. Crystal-structure of mycophenolic acid. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions*, 1972, 2: 1542–1544.
- [5] Birch AJ, Wright JJ. A total synthesis of mycophenolic acid. *Journal of the Chemical Society D: Chemical Communications*, 1969, 14: 788–789.
- [6] Planterose DN. Antiviral and cytotoxic effects of mycophenolic acid. *The Journal of General Virology*, 1969, 4(4): 629–630.
- [7] Mitsui A, Suzuki S. Immunosuppressive effect of mycophenolic acid. *The Journal of Antibiotics*, 1969, 22(8): 358–363.
- [8] Allison AC, Eugui EM. Immunosuppressive and other effects of mycophenolic acid and an ester prodrug, mycophenolate mofetil. *Immunological Reviews*, 1993, 136: 5–28.
- [9] Dubsy PC, Friedl J, Stift A, Bachleitner-Hofmann T, Jakesz R, Gnant MFX, Weigel G. Inosine 5'-monophosphate dehydrogenase inhibition by mycophenolic acid impairs maturation and function of dendritic cells. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 2006, 364(1/2): 139–147.
- [10] Cicinnati VR, Hou J, Lindemann M, Horn PA, Sotiropoulos GC, Paul A, Gerken G, Beckebaum S. Mycophenolic acid impedes the antigen presenting and lymph node homing capacities of human blood myeloid dendritic cells. *Transplantation*, 2009, 88: 504–513.
- [11] Wadia PP, Herrera ND, Abecassis MM, Tambur AR. Mycophenolic acid inhibits maturation and function of human dendritic cells and B cells. *Human Immunology*, 2009, 70(9): 692–700.
- [12] Shigesaka M, Ito T, Inaba M, Imai K, Yamanaka H, Azuma Y, Tanaka A, Amuro H, Nishizawa T, Son Y, Satake A, Ozaki Y, Nomura S. Mycophenolic acid, the active form of mycophenolate mofetil, interferes with irf7 nuclear translocation and type i ifn production by plasmacytoid dendritic cells. *Arthritis Research & Therapy*, 2020, 22: 11.
- [13] Kannegieter NM, Hesselink DA, Dieterich M, Kraaijeveld R, Rowshani AT, Leenen PJM, Baan CC. The effect of tacrolimus and mycophenolic acid on CD14+ monocyte activation and function. *PLoS One*, 2017, 12(1): e0170806.
- [14] Elbarbry FA, Shoker AS. Therapeutic drug measurement of mycophenolic acid derivatives in transplant patients. *Clinical Biochemistry*, 2007, 40: 752–764.
- [15] Allison AC, Eugui EM. Mycophenolate mofetil and its mechanisms of action. *Immunopharmacology*, 2000, 47(2/3): 85–118.
- [16] Amin AA, Araj FG, Ariyamuthu VK, Drazner MH, Ayvaci MUS, Mammen PPA, Mete M, Urey MA, Tanriover B. Impact of induction immunosuppression on patient survival in heart transplant recipients treated with tacrolimus and mycophenolic acid in the current allocation era. *Clinical Transplantation*, 2019, 33(8): e13651.
- [17] Bolin PJ, Gohh R, Kandaswamy R, Shihab FS, Wiland A, Akhlaghi F, Melancon K. Mycophenolic acid in kidney transplant patients with diabetes mellitus: Does the formulation matter? , *Transplant Rev (Orlando)*, 2011, 25: 117–123.
- [18] Neuberger M, Sommerer C, Böhnisch S, Metzendorf N, Mehrabi A, Stremmel W, Gotthardt D, Zeier M, Weiss KH, Rupp C. Effect of mycophenolic acid on inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH) activity in liver transplant patients. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*, 2020, 44(4): 543–550.
- [19] Moore RA, Derry S. Systematic review and meta-analysis of randomised trials and cohort studies of mycophenolate mofetil in lupus nephritis. *Arthritis Research & Therapy*, 2006, 8(6): R182.
- [20] Stassen PM, Kallenberg CG, Stegeman CA. Use of mycophenolic acid in non-transplant renal diseases. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 2007, 22: 1013–1019.
- [21] Sagcal-Gironella ACP, Fukuda T, Wiers K, Cox S, Nelson S, Dina B, Sherwin CMT, Klein-Gitelman MS, Vinks AA, Brunner HI. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of mycophenolic acid and their relation to response to therapy of childhood-onset systemic lupus erythematosus. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 2011, 40(4): 307–313.

- [22] Godron-Dubrasquet A, Woillard JB, Decramer S, Fila M, Guignon V, Tellier S, Morin D, Sordet M, Saint-Marcoux F, Harambat J. Mycophenolic acid area under the concentration-time curve is associated with therapeutic response in childhood-onset lupus nephritis. *Pediatric Nephrology*, 2021, 36(2): 341–347.
- [23] Jiang YP, Zhao XX, Chen RR, Xu ZH, Wen CP, Yu J. Comparative efficacy and safety of mycophenolate mofetil and cyclophosphamide in the induction treatment of lupus nephritis: a systematic review and meta-analysis. *Medicine*, 2020, 99(38): e22328.
- [24] Hiemstra TF, Jones RB, Jayne DR. Treatment of primary systemic vasculitis with the inosine monophosphate dehydrogenase inhibitor mycophenolic acid. *Nephron Clinical Practice*, 2010, 116: c1–10.
- [25] Wang GF, Ye QF, Huang YD, Lu JM, Xu H, Li ZP. Population pharmacokinetics of mycophenolic acid in pediatric patients with juvenile dermatomyositis and optimization of limited sampling strategy. *Xenobiotica*, 2021, 51(2): 167–176.
- [26] Lee KA, Kim BY, Choi SJ, Kim SK, Kim SH, Kim HS. A real-world experience of mycophenolate mofetil for systemic sclerosis: a retrospective multicenter observational study. *Archives of Rheumatology*, 2020, 35: 366–375.
- [27] Miller-Patrick K, Vincent DL, Early RJ, Weems YS, Tanaka Y, Ashimine DT, Nusser KD, Lee CN, Ledgerwood KS, Weems CW. Effects of the purine biosynthesis pathway inhibitors azaserine, hadacidin, and mycophenolic acid on the developing ovine corpus luteum. *The Chinese journal of physiology*, 1993, 36: 245–252.
- [28] Hoppe-Seyler K, Sauer P, Lohrey C, Hoppe-Seyler F. The inhibitors of nucleotide biosynthesis leflunomide, FK778, and mycophenolic acid activate hepatitis B virus replication *in vitro*. *Hepatology: Baltimore, Md*, 2012, 56(1): 9–16.
- [29] Hart BJ, Dyal J, Postnikova E, Zhou H, Kindrachuk J, Johnson RF, Olinger GG, Frieman MB, Holbrook MR, Jahrling PB, Hensley L. Interferon- $\beta$  and mycophenolic acid are potent inhibitors of middle east respiratory syndrome coronavirus in cell-based assays. *Journal of General Virology*, 2014, 95: 571–577.
- [30] Shen L, Niu J, Wang C, Huang B, Wang W, Zhu N, Deng Y, Wang H, Ye F, Cen S, Tan W. High-throughput screening and identification of potent broad-spectrum inhibitors of coronaviruses. *Journal of Virology*, 2019, 93.
- [31] Ferreira PCL, Thiesen FV, Pereira AG, Zimmer AR, Fröhlich PE. A short overview on mycophenolic acid pharmacology and pharmacokinetics. *Clinical Transplantation*, 2020, 34(8): e13997.
- [32] Yung S, Zhang Q, Zhang CZ, Chan KW, Lui SL, Chan TM. Anti-DNA antibody induction of protein kinase C phosphorylation and fibronectin synthesis in human and murine lupus and the effect of mycophenolic acid. *Arthritis and Rheumatism*, 2009, 60(7): 2071–2082.
- [33] Dun BY, Sharma A, Xu H, Liu HT, Bai S, Zeng LW, She JX. Transcriptomic changes induced by mycophenolic acid in gastric cancer cells. *American Journal of Translational Research*, 2013, 6(1): 28–42.
- [34] Meza-Avina ME, Ordonez M, Fernandez-Zertuche M, Rodriguez-Fragoso L, Reyes-Esparza J, de Los Rios-Corsino AA. Synthesis of some monocyclic analogues of mycophenolic acid via the johnson ortho ester claisen rearrangement. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 2005, 13: 6521–6528.
- [35] Patterson JW, Huang GT. The orthoester claisen rearrangement in the synthesis of mycophenolic-acid. *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications*, 1991: 1579–1580.
- [36] Patterson JW. The synthesis of mycophenolic acid. *Tetrahedron*, 1993, 49(22): 4789–4798.
- [37] Patterson JW. The synthesis of mycophenolic-acid from 2,4-dihydroxybenzoic acid. *Journal of Organic Chemistry*, 1995, 60: 4542–4548.
- [38] Canonica L, Rindone B, Santaniello E, Scolastico C. Biosynthesis of mycophenolic acid. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 1972, 21: 2639–2643.
- [39] Plé PA, Hamon A, Jones G. A convergent synthesis of mycophenolic acid. *Tetrahedron*, 1997, 53(9): 3395–3400.
- [40] Halle MB, Yudhistira T, Lee WH, Mulay SV, Churchill DG. Diels-alder and stille coupling approach for the short protecting-group-free synthesis of mycophenolic acid, its phenylsulfenyl and phenylselenenyl analogues, and reactive oxygen species (ROS) probing capacity in water. *Organic Letters*, 2018, 20(12): 3557–3561.
- [41] Danheiser RL, Gee SK, Perez JJ. Total synthesis of mycophenolic-acid. *Journal of the American Chemical Society*, 1986, 108: 806–810.
- [42] Covarrubias-Zuniga A, Gonzalez-Lucas A. A total synthesis of mycophenolic acid. *Tetrahedron Letters*, 1998, 39: 2881–2882.

- [43] Covarrubias-Zuniga A, Gonzalez-Lucas A, Dominguez MM. Total synthesis of mycophenolic acid. *Tetrahedron*, 2003, 59: 1989–1994.
- [44] Brookes PA, Cordes J, White AJP, Barrett AGM. Total synthesis of mycophenolic acid by a palladium-catalyzed decarboxylative allylation and biomimetic aromatization sequence. *European Journal of Organic Chemistry*, 2013(32): 7313–7319.
- [45] Cordes J, Barrett AGM. Synthesis of macrosporin and related 9,10-anthraquinones by biomimetic polyketide aromatization and cyclization of 6-benzylresorcyates. *European Journal of Organic Chemistry*, 2013: 1318–1326.
- [46] Nelson PH, Carr SF, Devens BH, Eugui EM, Franco F, Gonzalez C, Hawley RC, Loughhead DG, Milan DJ, Papp E, Patterson JW, Rouhafza S, Sjogren EB, Smith DB, Stephenson RA, Talamas FX, Waltos AM, Weikert RJ, Wu JC. Structure-activity relationships for inhibition of inosine monophosphate dehydrogenase by nuclear variants of mycophenolic acid. *Journal of Medicinal Chemistry*, 1996, 39(21): 4181–4196.
- [47] Cholewinski G, Iwaszkiewicz-Grzes D, Trzonkowski P, Dzierzbicka K. Synthesis and biological activity of ester derivatives of mycophenolic acid and acridines/acridones as potential immunosuppressive agents. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2016, 31(6): 974–982.
- [48] Malachowska-Ugarte M, Cholewinski G, Dzierzbicka K, Trzonkowski P. Synthesis and biological activity of novel mycophenolic acid conjugates containing nitro-acridine/acridone derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2012, 54: 197–201.
- [49] García-Estrada C, Martín JF. Biosynthetic gene clusters for relevant secondary metabolites produced by *Penicillium roqueforti* in blue cheeses. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(19): 8303–8313.
- [50] Abdiel DC, Carlos GD, Inmaculada V, Juan F RA, Ramon O GR, Gloria L, Renato C. Identification and functional analysis of the mycophenolic acid gene cluster of *Penicillium roqueforti*. *PLoS One*, 2016, 11(1): e0147047.
- [51] Zhang W, Du L, Qu ZP, Zhang XW, Li FW, Li Z, Qi FF, Wang X, Jiang YY, Men P, Sun JR, Cao SN, Geng C, Qi FX, Wan XB, Liu CN, Li SY. Compartmentalized biosynthesis of mycophenolic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2019, 116: 13305–13310.
- [52] Hansen BG, Salomonsen B, Nielsen MT, Nielsen JB, Hansen NB, Nielsen KF, Regueira TB, Nielsen J, Patil KR, Mortensen UH. Versatile enzyme expression and characterization system for *Aspergillus nidulans*, with the *Penicillium brevicompactum* polyketide synthase gene from the mycophenolic acid gene cluster as a test case. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(9): 3044–3051.
- [53] Regueira TB, Kildegaard KR, Hansen BG, Mortensen UH, Hertweck C, Nielsen J. Molecular basis for mycophenolic acid biosynthesis in *Penicillium brevicompactum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77: 3035–3043.
- [54] Zhang W, Cao SN, Qiu L, Qi FX, Li Z, Yang Y, Huang SH, Bai FL, Liu CN, Wan XB, Li SY. Functional characterization of MpaG', the O-methyltransferase involved in the biosynthesis of mycophenolic acid. *Chembiochem*, 2015, 16(4): 565–569.
- [55] Chen XW, Wang L, Zhang JM, Jiang T, Hu CH, Li DH, Zou Y. Immunosuppressant mycophenolic acid biosynthesis employs a new globin-like enzyme for prenyl side chain cleavage. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2019, 9(6): 1253–1258.
- [56] Hansen BG, Mnich E, Nielsen KF, Nielsen JB, Nielsen MT, Mortensen UH, Larsen TO, Patil KR. Involvement of a natural fusion of a cytochrome P450 and a hydrolase in mycophenolic acid biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(14): 4908–4913.
- [57] Hansen BG, Genee HJ, Kaas CS, Nielsen JB, Regueira TB, Mortensen UH, Frisvad JC, Patil KR. A new class of IMP dehydrogenase with a role in self-resistance of mycophenolic acid producing fungi. *BMC Microbiology*, 2011, 11(1): 1–7.
- [58] Gillot G, Jany JL, Dominguez-Santos R, Poirier E, Debaets S, Hidalgo PI, Ullan RV, Coton E, Coton M. Genetic basis for mycophenolic acid production and strain-dependent production variability in *Penicillium roqueforti*. *Food Microbiology*, 2017, 62: 239–250.
- [59] Zhelifonova VP, Antipova TV, Kozlovskii AG. Effect of potassium sorbate, sodium benzoate, and sodium nitrite on biosynthesis of cyclopiazonic and mycophenolic acids and citrinin by fungi of the *Penicillium* genus. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2017, 53(6): 711–714.
- [60] Dong YG, Zhang J, Xu R, Lv XX, Wang LH, Sun AY, Wei DZ. Insertion mutation in hmg-coa lyase increases the production yield of MPA through agrobacterium tumefaciens-mediated transformation. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2016, 26: 1924–1932.

- [61] Gil-Durán C, Rojas-Aedo JF, Medina E, Vaca I, García-Rico RO, Villagrán S, Levicán G, Chávez R. The *pcz1* gene, which encodes a Zn(II)<sub>2</sub>Cys<sub>6</sub> protein, is involved in the control of growth, conidiation, and conidial germination in the filamentous fungus *Penicillium roqueforti*. *PLOS ONE*, 2015, 10(3): e0120740.
- [62] Juan F RA, Carlos GD, Alejandra G, Inmaculada V, Gloria L, Luis FL, Renato C. The developmental regulator *pcz1* affects the production of secondary metabolites in the filamentous fungus *Penicillium roqueforti*. *Microbiological Research*, 2018, 212: 67–74.
- [63] Martín JF. Key role of LaeA and velvet complex proteins on expression of  $\beta$ -lactam and PR-toxin genes in *Penicillium chrysogenum*: cross-talk regulation of secondary metabolite pathways. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2017, 44(4/5): 525–535.
- [64] Hidalgo PI, Ullan RV, Albillos SM, Montero O, Fernandez-Bodega MA, Garcia-Estrada C, Fernandez-Aguado M, Martin JF. Molecular characterization of the pr-toxin gene cluster in *Penicillium roqueforti* and *Penicillium chrysogenum*: Cross talk of secondary metabolite pathways. *Fungal Genetics Biology*, 2014, 62: 11–24.
- [65] Detroy RW, Freer SN, Fennell DI. Relationship between the biosynthesis of virus-like particles and mycophenolic acid in *Penicillium stoloniferum* and *Penicillium brevicompactum*. *Canadian Journal of Microbiology*, 1973, 19(11): 1459–1462.
- [66] Nulton CP, Campbell IM. Mycophenolic-acid is produced during balanced growth of *Penicillium-brevicompactum*. *Canadian Journal of Microbiology*, 1977, 23: 20–27.
- [67] Xu XY, Zhang XY, Nong XH, Wang J, Qi SH. Brevianamides and mycophenolic acid derivatives from the deep-sea-derived fungus *Penicillium brevicompactum* dffscs025. *Marine Drugs*, 2017, 15: 10.
- [68] Min C, Dong H, Liu XB, Zhang ZS. Screening and identification of a *Penicillium brevicompactum* strain isolated from the fruiting body of *Inonotus obliquus* and the fermentation production of mycophenolic acid. *Annals of Microbiology*, 2019, 69(13): 1351–1360.
- [69] Engel G, Vonmilczewski KE, Prokopek D, Teuber M. Strain-specific synthesis of mycophenolic-acid by *Penicillium-roqueforti* in blue-veined cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, 1982, 43: 1034–1040.
- [70] Frisvad JC, Filtenborg O. *Terverticillate penicillia* - chemotaxonomy and mycotoxin production. *Mycologia*, 1989, 81: 837–861.
- [71] Vinokurova NG, Ivanushkina NE, Kochkina GA, Arinbasarov MU, Ozerskaya SM. Production of mycophenolic acid by fungi of the genus *Penicillium* link. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2005, 41(1): 83–86.
- [72] Nielsen KF, Sumarah MW, Frisvad JC, Miller JD. Production of metabolites from the *Penicillium roqueforti* complex. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54(10): 3756–3763.
- [73] Sorensen LM, Jacobsen T, Nielsen PV, Frisvad JC, Koch AG. Mycobiota in the processing areas of two different meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 2008, 124: 58–64.
- [74] Prencipe S, Siciliano I, Gatti C, Garibaldi A, Gullino ML, Botta R, Spadaro D. Several species of *Penicillium* isolated from chestnut flour processing are pathogenic on fresh chestnuts and produce mycotoxins. *Food Microbiology*, 2018, 76: 396–404.
- [75] Song XX, Tu RX, Mei XL, Wu SL, Lan B, Zhang L, Luo XQ, Liu JY, Luo MH. A mycophenolic acid derivative from the fungus *Penicillium* sp. SCSIO sof101. *Natural Product Research*, 2020, 34(9): 1206–1212.
- [76] Puel O, Tadrist S, Galtier P, Oswald IP, Delaforge M. *Byssoschlamys nivea* as a source of mycophenolic acid. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(1): 550–553.
- [77] Zhang Q, Hu HF, Zhu BQ. Breeding of high mycophenolic acid-producing strain. *Chinese Journal of Pharmaceuticals*, 2006, 37(7): 452–453. (in Chinese)  
张琴, 胡海峰, 朱宝泉. 麦考酚酸高产菌株的选育. 中国医药工业杂志, 2006, 37(7): 452–453.
- [78] Liu M, Zhang P, Cui XL, Ren X, Zhang H, Jin Y, Shan YQ, Dong YS, Shi Y, He JG. Studies on the breeding by ion implantation and cultivation of mycophenolic acid producing strain. *Acta Microbiologica Sinica*, 2006, 46(5): 816–819. (in Chinese)  
刘梅, 张鹏, 崔晓兰, 任晓, 张华, 金莹, 单越琦, 董悦生, 石英, 贺建功. 离子注入选育霉酚酸高产菌株及其发酵条件研究. 微生物学报, 2006, 46(5): 816–819.
- [79] Liao AF, Chen H, Jia W. Selection for mycophenolic acid high-producing *Penicillium brevicompactum*. *Chinese Journal of Antibiotics*, 2011, 36(9): 667–670, 707. (in Chinese)

- 廖爱芳, 陈宏, 贾纬. 霉酚酸高产菌株短密青霉菌的选育. *中国抗生素杂志*, 2011, 36(9): 667–670, 707.
- [80] Ismaiel AA, Ahmed AS, El-Sayed ESR. Optimization of submerged fermentation conditions for immunosuppressant mycophenolic acid production by *Penicillium roqueforti* isolated from blue-molded cheeses: enhanced production by ultraviolet and gamma irradiation. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2014, 30(10): 2625–2638.
- [81] El-Sayed E SR, Ahmed AS, Ismaiel AA. Agro-industrial byproducts for production of the immunosuppressant mycophenolic acid by *Penicillium roqueforti* under solid-state fermentation: Enhanced production by ultraviolet and gamma irradiation. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2019: 18.
- [82] Wang KR, Xie Y, Zhang HL, Ran QP, Yu YQ. Selection of mycophenolic acid high producing strain with pretreatment of nystatin. *Chinese Journal of Antibiotics*, 2013, 38(10): 741–743. (in Chinese)  
王昆蓉, 谢云, 张洪兰, 冉启平, 俞岩青. 制霉菌素预处理选育麦考酚酸高产菌株. *中国抗生素杂志*, 2013, 38(10): 741–743.
- [83] Qin XT, Xu YF, Cheng ZB. Studies on mutagenesis and fermentation of mycophenolic acid producing strain. *Chinese Journal of Antibiotics*, 2005, 30(7): 426–427. (in Chinese)  
秦祥田, 许永锋, 程赵兵. 麦考酚酸产生菌的诱变育种及发酵的研究. *中国抗生素杂志*, 2005, 30(7): 426–427.
- [84] Yang YY, Li CH, Meng WW. Protoplast mutation breeding of mycophenolic acid producing strain, *Penicillium brevicompactum*. *Chinese Journal of Antibiotics*, 2006, 31(10): 587–590. (in Chinese)  
杨亚勇, 李长洪, 孟文伟. 麦考酚酸产生菌原生质体诱变育种的研究. *中国抗生素杂志*, 2006, 31(10): 587–590.
- [85] Ren ZH, Su CY, Yan J, Dai M, Zhao Y, Wang HY, Dai MW, Zhang J. Establishment of a genetic *Penicillium brevicompactum* to transformation system for produce mycophenolic acid. *Acta Microbiologica Sinica*, 2013, 53(11): 1226–1232. (in Chinese)  
任志红, 苏彩云, 闫敬, 戴梦, 赵颖, 王红怡, 代明伟, 张佳. 霉酚酸产生菌原生质体转基因方法的建立. *微生物学报*, 2013, 53(11): 1226–1232.
- [86] Patel G, Patil MD, Soni S, Khobragade TP, Chisti Y, Banerjee UC. Production of mycophenolic acid by *Penicillium brevicompactum*-a comparison of two methods of optimization. *Biotechnology Reports (Amst)*, 2016, 11: 77–85.
- [87] Patel G, Patil MD, Soni S, Chisti Y, Banerjee UC. Production of mycophenolic acid by *Penicillium brevicompactum* using solid state fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2017, 182: 97–109.
- [88] Ardestani F. Effects of phenylglyoxal and n-ethylmaleimide concentration on mycophenolic acid production by *Penicillium brevicompactum* atcc16024. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 2016, 15: 925–931.
- [89] Gao XR, Yao SJ, Zhu J, Qing YL, Zhang XL. Optimization of submerged fermentation conditions of *Penicillium brevicompactum* producing mycophenolic acid. *Chinese Journal of Pharmaceuticals*, 2007(4): 273–276. (in Chinese)  
高兴蓉, 姚善泾, 朱健, 卿亚丽, 张小玲. 麦考酚酸产生菌液体发酵条件的优化. *中国医药工业杂志*, 2007(4): 273–276.
- [90] Anand S, Srivastava P. Optimization strategies for purification of mycophenolic acid produced by *Penicillium brevicompactum*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2020, 191(2): 867–880.
- [91] Gu JF, Wang W. Abroad and home production situations, R & D progress and market analysis of immunosuppressive agents from microorganisms. *Chinese Journal of New Drugs*, 2011, 20(2): 129–136. (in Chinese)  
顾觉奋, 王玮. 微生物来源的免疫抑制剂国内外生产研发状况及市场分析. *中国新药杂志*, 2011, 20(2): 129–136.

# Research and industrialization progress of immunosuppressant mycophenolic acid

Runye Huang<sup>1,2,3#</sup>, Landa Qi<sup>1#</sup>, Guocan Chen<sup>1</sup>, Wenbing Yin<sup>2,3\*</sup>

<sup>1</sup> Henan Academy of Science Institute of Biology, Zhengzhou 450008, Henan Province, China

<sup>2</sup> State Key Laboratory of Mycology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

<sup>3</sup> Savaid Medical School, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

**Abstract:** Mycophenolic acid is one of the most widely used immunosuppressant in the world, and the market demand is huge. So far, the industrial production of mycophenolic acid is mainly through fungal fermentation, and the strains used for production are mostly mutagenized high-yielding *Penicillium brevicompactum*. This article systematically reviews the research and industrialization progress of mycophenolic acid. Five aspects including current research and application of mycophenolic acid, chemical synthesis and biosynthetic pathways, genetic regulation, fermentation production and market analysis are described. This review will provide valuable information for the development of novel derivatives of the drug, the improvement of yield, and the intelligent creation of advanced biotechnology in the future.

**Keywords:** mycophenolic acid, biosynthesis, regulatory pathway, fermentation

(本文责编: 张晓丽)

---

Supported by the National Key Research and Development Program of China (2020YFA0907801), by the National Natural Science Foundation of China (21807108) and by the Program of Provincial Distinguished Researcher, HNAS (200505006)

<sup>#</sup>Those authors contributed equally to this work.

\*Corresponding author. Tel: +86-10-64806170; E-mail: yinwb@im.ac.cn

Received: 23 December 2020; Revised: 5 February 2021; Published online: 22 March 2021