

УДК: 579.873.11:579.66

БИОСИНТЕЗ ТАКРОЛИМУСА ШТАММОМ *Streptomyces tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д В ПРИСУТСТВИИ ПОЛИМЕРНЫХ СОРБЕНТОВ И РАЗРАБОТКА МЕТОДА ЕГО ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ

© 2020 г. Д. С. Салионов^{1,2}, В. Ю. Пошихонцева^{3,4}, В. В. Фокина^{3,4}, *,
А. А. Шутов^{3,4}, В. М. Николаева^{3,4}, Г. Г. Васяров², Е. В. Титова²,
В. С. Карасев², С. М. Староверов^{1,2}, М. В. Донова^{3,4}

¹Химический факультет, Московский Государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва, 119234 Россия

²АО “БиоХимМак СТ”, Москва, 119234 Россия

³Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН, ФИЦ “Пушкинский научный центр биологических исследований РАН”, Пушкино, Московская обл., 142290 Россия

⁴ООО “Фарминс”, Пушкино, Московская обл., 142290 Россия

*e-mail: fokina@ibpm.pushchino.ru

Поступила в редакцию 14.05.2020 г.

После доработки 14.06.2020 г.

Принята к публикации 02.07.2020 г.

Такролимус, признанный мировой медициной как наиболее эффективный иммуносупрессивный агент, синтезируется актинобактериями рода *Streptomyces*, однако процесс сопровождается нежелательным образованием близких структурных аналогов. Разработан оригинальный метод его биосинтеза штаммом актинобактерий *Streptomyces tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д с применением бромированного стирол-дивинилбензолного сорбента SP-207. Этот подход позволил предотвратить нежелательную деструкцию такролимуса, упростить процедуру его выделения из культуральной среды и повысить его выход. Оптимизирована стадия предварительной очистки за счет использования регенерируемых сорбентов на основе метилметакрилата (HP2MG) и химически модифицированного силикагеля (Диасорб-100-Диол). При реализации технологического процесса применение сорбентов с привитыми к силикагелю сульфогруппами и ионами серебра при конечной очистке такролимуса позволило значительно увеличить производительность данной стадии. При этом выход такролимуса-сырца составил 60–70%. Полученные результаты могут быть использованы при создании полного цикла производства фармацевтической субстанции такролимуса.

Ключевые слова: биосинтез, такролимус, *Streptomyces tsukubensis*, сорбент SP-207, хроматография, выделение, очистка, аскомицин, 8-пропил-аналог такролимуса

DOI: 10.31857/S055510992006015X

Такролимус (FK-506) – это международное непатентованное название лекарственного препарата из группы иммуносупрессантов, представляющего собой 23-членный макролидный поликетид (822 Да), широко применяемый в мировой медицинской практике.

В настоящее время он используется при трансплантации костного мозга, почки и сердца [1–3], для лечения таких иммунных заболеваний, как ревматоидный артрит и кишечные воспаления [4, 5], в терапии атопического дерматита [6, 7], а также аллергических глазных заболеваний [8]. FK-506 проявляет активность против ортопоксвируса, ВИЧ и вируса иммунодефицита кошек [9, 10]. Сообщается о его нейропротекторных и нейрорегенеративных свойствах [11, 12], а также о возможном применении в лечении рака [13].

Эффективность такролимуса в предотвращении отторжения после трансплантации, а также при заболеваниях, резистентным к другим видам терапии, лежит в основе его медицинского применения и значимости.

Биосинтез такролимуса начинается с образования (4R,5R)-4,5-дигидроксициклогекс-1-ен-карбоновой кислоты с последующим удлинением углеродного скелета путем присоединения двух малонил-КоА, пяти метилмалонил-КоА, двух метоксималонил-АПБ и одного аллилмалонил-КоА. В дальнейшем углеродная цепь замыкается в кольцо, что обеспечивается включением в нее L-пипеколата, образуемого из L-лизина [14, 15], в результате этого синтезируется промежуточное соединение – пре-такролимус. Завершается синтез такролимуса двумя модификациями пре-такролимуса, включающими метилирование гид-

роксильной группы в положении С31 и окисление атома углерода в положении С20 [15].

Аскомицин и С8-пропил-аналог такролимуса (рис. 1) существенно осложняют получение чистого такролимуса при промышленной ферментации и являются причиной значительных потерь целевого продукта на стадии очистки [16].

Сложности очистки такролимуса также связаны с особенностями поведения молекулы в водных растворах, что обусловлено его цис-транс-конформационной изомеризацией [17], поскольку известно, что в растворе он существует в трех формах, представленных на рис. 2.

Согласно Фармакопее США [18] в фармацевтической субстанции содержание целевого компонента, такролимуса, должно быть не менее 98%, при этом допустимо, что неидентифицированные примеси и такая его изомерная форма, как С19-эпимер, составляют не более 0.1%, а такие его близкородственные аналоги, как аскомицин и С8-пропил-аналог такролимуса – 0.5 и 0.15% соответственно.

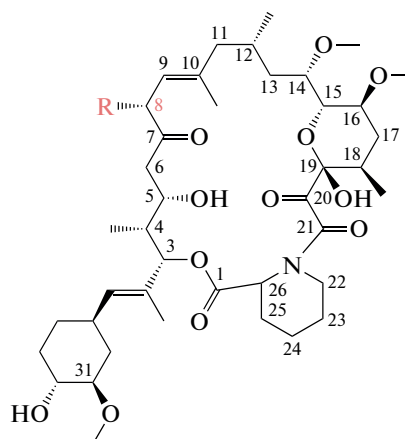
Процесс выделения и очистки такролимуса от примесных соединений включает следующие этапы: (1) выделение такролимуса и его аналогов из культуральной среды, (2) предварительную очистку такролимуса, (3) отделение такролимуса от его близкородственных аналогов и (4) кристаллизацию целевого вещества.

1. Первый этап очистки включает экстракцию такролимуса и его аналогов из культуральной среды органическими растворителями с последующей сорбцией целевого компонента на неионогенном сорбенте [19–21].

2. На второй стадии происходит удаление балластных компонентов, в частности, окрашенных соединений. Как правило, данный этап выполняют в режиме нормально-фазовой жидкостной хроматографии (**НФ ЖХ**) на сорбентах на основе силикагеля или оксида алюминия с использованием в качестве подвижной фазы смеси гексан/этилацетат или гексан/ацетон [19–28].

3. Третий этап необходим для отделения близкородственных аналогов такролимуса, аскомицина и 8-пропил-аналога такролимуса. Данная стадия является ключевой, так как ее производительность и затраты на очистку единицы продукции вносят наибольший вклад в эффективность всей схемы выделения и получения конечного продукта как по показателю качества, так и по стоимости.

Как правило, разделение близкородственных примесей реализуется в режиме **НФ-ВЭЖХ** с использованием силикагелей, импрегнированных ионами серебра [19, 20, 26–28], или ионов серебра, которые добавляют непосредственно в элюент [21, 24]. Такой вариант очистки является наиболее эффективным с точки зрения селективности



- R₁ –CH₂–CH=CH₂ Такролимус
 R₂ –CH₂–CH₃ Аскомицин
 R₃ –CH₂–CH₂=CH₃ С8-Пропил-аналог такролимуса

Рис. 1. Структура такролимуса – 23-членного макроциклического поликетиды (R₁), и его близких структурных аналогов: аскомицина (R₂) и 8-пропил-аналога такролимуса (R₃). Нумерация атомов в молекуле такролимуса соответствует действующей фармакопее [18].

и обеспечивает большую нагрузку и выход целевого компонента. Однако эти сорбенты имеют существенный недостаток, связанный со смыванием серебра в процессе проведения разделения, что приводит к потере сорбентом сорбционно-хроматографических свойств [26–28].

Прочное удерживание ионов серебра на сорбенте обеспечивают сульфокатиониты в Ag⁺-форме, однако особенности процесса очистки на таких сорбентах недостаточно изучены, отсутствуют также корректные данные об их селективности, нагрузочных характеристиках и производительности.

4. Четвертой завершающей стадией очистки такролимуса является его кристаллизация из водно-органических смесей, что позволяет получить целевой продукт в правильной конформации.

В предыдущих работах было подтверждено филогенетическое положение штамма-продуцента такролимуса и уточнено его видовое название как *Streptomyces tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д, а также разработан метод и оптимизированы условия биосинтеза поликетиды, обеспечивающие высокий выход [29–31].

Цель работы – изучение биосинтеза такролимуса в присутствии полимерных сорбентов и разработка метода его выделения из культуральной среды *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д и очистки для получения кристаллического продукта высокой степени чистоты.

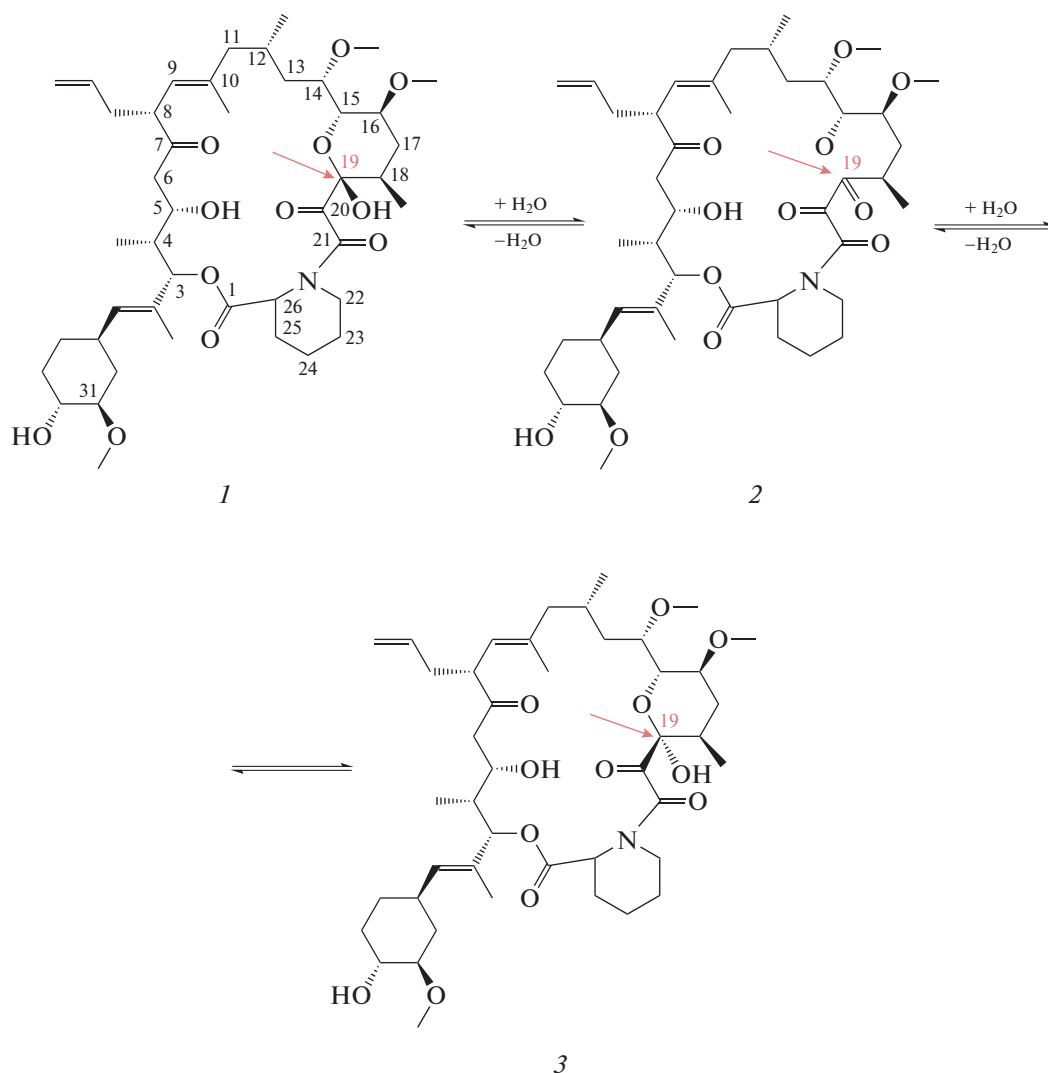


Рис. 2. Процесс изомеризации такролимуса (1) в водных растворах с образованием эимерных форм: такролимус-открытое кольцо (2) и C19-эимер такролимуса (3). Таутомерный центр молекулы показан стрелкой [17].

МЕТОДИКА

Реактивы. В работе использовали следующие реактивы: сорбент XAD-7 HP (“Sigma-Aldrich”, США), сорбенты SP-207 и HP2MG (“Mitsubishi chemical corporation”, Япония), силикагель (“Merck”, Германия), Диасорб-100-Диол, Диасфер-АК-СП-100, Диасорб-60-СП и Диасорб-100-Сульфид (АО “БиоХимМак СТ”, Россия), Relisorb SP400/SS (“Resindion”, Италия), Dowex 50WX8 (“Dow”, США), ацетонитрил для ВЭЖХ (“Panreac”, Испания), ацетон, толуол, изооктан для спектроскопии, этилацетат, метилтретбутиловый эфир, фосфорная кислота, нитрат серебра (“Компонент-Реактив”, Россия). Также использовали растворимый крахмал (“Купавнареактив”, Россия), глюкозу (“Диа-М”, Россия), пекарские дрожжи (“Саф-Момент”, Франция), кукурузный экстракт (“Sigma-Aldrich”, США), моногидрохлорид L-лизина (“PanReac”, США), пеногаситель

Лапрол (ПАО “Владимирский химический завод”, Россия) и стандартный препарат такролимуса для высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) (“Zhejiang Hisun Pharmaceutical Co. Ltd.”, Китай). Остальные реактивы и растворители марок хч и чда были получены от коммерческих производителей (Россия).

Микроорганизм и условия культивирования. Штамм *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д был получен из Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ) Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН.

Поддержание культуры и получение инокулята проводили, как описано ранее [30, 31]. В экспериментах по выявлению лучшего сорбента в среду биосинтеза до стерилизации вносили SP-207 или HP2MG в концентрации 40 г/л, а XAD-7HP служил в качестве контрольного сорбента. Биосинтез такролимуса проводили в биореакторе

АНКУМ-2М объемом 10 в 5 л среды (рН 7.0) следующего состава (г/л): растворимый крахмал – 75, кукурузный экстракт – 12.5, пекарские дрожжи – 16.6, $MnSO_4$ – 0.05, $CaCO_3$ – 3, сорбент – 40, пеногаситель Лапрол – 0.4 (мл/л), в которую дополнительно вносили стерильные растворы глюкозы и L-лизина (5 г/л). Ферментацию осуществляли в течение 10 сут при 25°C, поддерживая рН среды в диапазоне 6.8–7.2 и концентрацию растворенного кислорода (pO_2) – 30–60%, со 2 по 7 сут культивирования проводили подпитку 6%-ным раствором крахмала. В качестве сорбента был выбран SP-207 на основании его сорбционных характеристик, а также способности лучше осаждаться.

Выделение такролимуса. Для отмывки сорбента от остатков среды биосинтеза и мицелия культуральную жидкость порциями по ~500 мл помещали в стакан объемом 3 л, добавляли 2–2.5 л воды и активно перемешивали. Взвесь мицелия из верхних слоев культуральной жидкости удаляли вакуумным насосом. Операцию повторяли до полного удаления мицелия и получали промытый сорбент.

Такролимус с сорбента элюировали водно-ацетоновой смесью. Для этого сорбент помещали на фильтр Шотта, промывали 500 мл смеси вода/ацетон (45 : 55, об. %) и целевое вещество элюировали 500 мл смеси вода/ацетон (25 : 75, об. %). Процедуру элюции целевого вещества повторяли до полной экстракции такролимуса с сорбента. Фракции, содержащие целевое вещество, объединяли, и упаривали на роторном испарителе до маслообразного состояния. К маслянистой субстанции добавляли толуол в соотношении 1 : 10 по объему для экстракции целевого компонента и получившуюся двухфазную смесь разделяли на делительной воронке. Данную операцию повторяли 3 раза. Верхние слои, содержавшие раствор такролимуса в толуоле, объединяли. Количество такролимуса определяли методом ВЭЖХ, как описано ниже. Для регенерации сорбента добавляли равный объем смеси 0.5 М NaOH и изопропилового спирта (1 : 1). Раствор декантировали и приливали свежую смесь щелочи и спирта. Операцию проводили до полной потери окраски раствора над сорбентом. Затем сорбент многократно промывали водой и высушивали при 50°C.

Предварительная очистка такролимуса. Предварительную очистку осуществляли на силикагеле (Диасорб-100-Диол), модифицированном диольными группами, или метакрилатном сорбенте HP2MG. Для этого сорбент упаковывали в колонку (120 × 14 мм, объемом 18.5 мл) и уравнивали изооктаном. Целевой компонент элюировали ступенчатым градиентом ацетона (от 10 до 30 об. %) в изооктане. Фракции, содержащие такролимус, объединяли и упаривали под вакуумом. Количество вещества во фракциях определяли методом ВЭЖХ, как описано ниже.

Регенерация сорбентов после проведения предварительной очистки. Регенерацию сорбентов осуществляли путем последовательного промывания их ацетоном (2 объема колонки) и водой (3 объема колонки). Сорбент HP2MG дополнительно регенерировали смесью изопропанол/0.5 М NaOH, 1 : 1 об. (2 объема колонки) и водой (3 объема колонки). Сорбенты после регенерации промывали ацетоном (3 объемами колонки) для удаления воды.

Финишная очистка такролимуса. Конечную очистку такролимуса проводили с использованием сульфокатионитов, содержащих связанные ионы серебра. Было испытано пять различных катионообменных смол, модифицированных серебром: Relisorb SP400/SS, Dowex 50WX8, Диасфер-АК-СП-100, Диасорб-60-СП и Диасорб-100-Сульфо. Сульфокатиониты загружали в колонку (140 × 14 мм, объем 21.5 мл) и промывали (по 3 объема) дистиллированной водой, 0.1 М азотной кислотой и снова дистиллированной водой. Затем сорбент дополнительно последовательно промывали 1 М раствором нитрата серебра (2 объема) и дистиллированной водой (3 объема) для удаления не связавшихся ионов серебра и ацетоном (3 объема) для удаления из него воды. Смесь такролимуса и его близкородственных аналогов, полученную на стадии предварительной очистки, растворяли в подвижной фазе до достижения концентрации такролимуса 10 мг/мл в случае использования сорбентов Диасфер-АК-СП-100 и Dowex 50 WX8, 30 мг/мл при использовании сорбента Relisorb SP 400/SS, а также 100 мг/мл – сорбентов Диасорб-60-СП и Диасорб-100-Сульфо.

В качестве подвижных фаз для разделения такролимуса на серебросодержащих сорбентах использовали следующие смеси: изооктан/ацетон, метанол/этилацетат и ацетон/ацетонитрил. Скорость потока составляла 0.1–2 мл/мин. Качественный и количественный состав разделенных фракций определяли методом ВЭЖХ, как описано ниже.

Кристаллизация такролимуса. Фракции, содержащие такролимус, объединяли, определяли содержание макролида и упаривали на роторном испарителе досуха. В соответствии с методикой, описанной в работе [21], к полученной маслянистой субстанции добавляли ацетонитрил из расчета 10 мл ацетонитрила на 1 мг такролимуса. Затем при перемешивании медленно добавляли дистиллированную воду в количестве, в 1.7 раза превышающем количество ацетонитрила. Раствор оставляли на 12–14 ч при 5°C для кристаллизации продукта. Образовавшиеся кристаллы отфильтровывали и взвешивали.

Аналитический контроль стадий выделения и очистки такролимуса. Количественный ВЭЖХ-

Таблица 1. Характеристика сорбентов, использованных на стадии микробиологического синтеза такролимуса

Сорбент	Диаметр пор, Å	Поверхность, м ² /г	Размер частиц, мкм	Плотность, г/л
XAD-7 HP	60	450	560–710	1.05
SP-207	105	600	250–840	1.18
HP2MG	170	600	300–700	1.09

анализ такролимуса на стадии десорбции целевого вещества с сорбента после ферментации осуществляли на хроматографе Smartline (“Knauer”, Германия) с колонкой Диасфер С-18 (5 мкм, 4 × 250 мм) (АО “БиоХимМак СТ”, Россия). Условия хроматографии: состав мобильной фазы – ацетон/0.1% фосфорная кислота (60 : 40, об. %), скорость потока 1 мл/мин, температура колонки 25°C. Детектирование осуществляли при 220 нм.

Качественный и количественный ВЭЖХ-анализ такролимуса на стадии предварительной и финишной очистки осуществляли на хроматографе Smartline (“Knauer”, Германия) с колонкой Диасфер-130-Нитрил (5 мкм, 4 × 250 мм) (АО “БиоХимМак СТ”, Россия). Условия хроматографии: состав мобильной фазы – изооктан/метилтретбутиловый эфир/ацетонитрил (6 : 3 : 1 об./об./об.), скорость потока 0.8 мл/мин, температура колонки 25°C. Детектирование осуществляли при 220 нм.

Качественный состав продукта (включающий наличие таких примесей, как аскомицин, десметилтакролимус, С8-эпимер такролимуса и С8-пропил-аналог такролимуса) определяли согласно методике, описанной в Фармакопее США [18]. Анализ проводили на хроматографе PlatinBlue (“Knauer”, Германия) с колонкой BlueShell 80-С18 (4.5 мкм, 3 × 150 мм) (“Knauer”, Германия). Условия хроматографии: изократическое элюирование А/Б = 68 : 32 об. %, где А – 6 мМ фосфорная кислота/смесь ацетонитрил – метилтретбутиловый эфир (81 : 19 об. %), смешанные в соотношении 80 : 20 об. % и Б – 6 мМ фосфорная кислота/смесь ацетонитрил – метилтретбутиловый эфир (81 : 19 об. %), смешанные в соотношении 20 : 80 об. %; скорость элюента 0.7 мл/мин, температура колонки 60°C. Детектирование осуществляли при 220 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе для биосинтеза такролимуса штаммом *S. tsukubensis* ВКМ Ас-2618Д использовали среду, содержащую гидрофобный полимерный сорбент, что являлось наиболее технологичным подходом, поскольку сорбция целевого вещества проходила в течение культивирования. Это позволяло устранить деградацию такролимуса продуцентом [30, 31] и увеличить выход продукта, а также упростить процесс его извлечения из среды по завершении биосинтеза.

Сравнительное изучение влияния на выход такролимуса таких сорбентов, как амберлит XAD-7 HP, метакрилатный HP2MG и бромированный стиролдвинилбензолный SP-207, показало, что динамика сорбции макролида на указанных сорбентах в процессе культивирования имела схожий характер, достигаемые его выходы для XAD-7 HP, HP2MG или SP-207 имели близкие значения (690.0 ± 11.8 мг/л, 660.0 ± 12.6 и 662.0 ± 11.3 мг/л соответственно).

В табл. 1 приведены физико-химические характеристики сорбентов, использованных в работе (XAD-7 HP, HP2MG и SP-207).

Проведенные исследования показали, что мицеллий и сорбенты XAD-7 HP или HP2MG вследствие мало различающихся значений плотности осаждались с близкими скоростями седиментации, что осложняло процедуру отделения сорбента от бактериальной биомассы. В свою очередь элюция такролимуса с остатками мицелия приводила к потере сорбционных характеристик сорбентов и осложняла их последующую регенерацию и повторное использование.

Сорбент SP-207 обладал наибольшей плотностью по сравнению с другими использованными в работе сорбентами (табл. 1), что делало его технологически наиболее пригодным, так как он легко отделялся от биомассы за счет высокой скорости седиментации. Отделенный от мицелия сорбент SP-207 можно было регенерировать и далее использовать в процессе ферментации.

Выход такролимуса в среде с исходным сорбентом SP-207 и прошедшим 3 цикла регенерации составил 662.0 ± 11.3 и 657.0 ± 13.5 мг/л соответственно, что свидетельствовало о сохранении его сорбционных свойств после многократной регенерации.

При проведении биосинтеза в биореакторе в среде с сорбентом SP-207 выход такролимуса составил 694.5 ± 57.7 мг/л после 10 сут культивирования с подпиткой. Всего было проведено 11 ферментаций в 10 л биореакторе АНКУМ-2М с коэффициентом заполнения 0.5.

Предварительная очистка такролимуса. В рамках данной работы была исследована возможность замены таких нерегенерируемых сорбентов, как оксид алюминия или силикагель, на сорбенты на основе полиметилметакрилата (HP2MG) и модифицированного диольной фазой кремнезема (Диасорб

Таблица 2. Характеристика сорбентов, использованных на стадии предварительной очистки такролимуса

Сорбент	Размер частиц, мкм	Диаметр пор, Å	Тип сорбционных центров
Силикагель	63–200	100	Силанольные группы
HP2MG	300–700	170	Сложноэфирные группы
Диасорб 100-Диол	60–200	100	Диольные группы

Таблица 3. Нагрузочная характеристика сорбентов, использованных на стадии предварительной очистки такролимуса

Сорбент	Нагрузка по FK-506, мг/мл	Регенерируемость	Выход такролимуса, %	Объем израсходованного органического растворителя, количество объемов колонки
Силикагель	4	–	80	6
HP2MG	5	+	85	6
Диасорб 100-Диол	5	+	80	6

Таблица 4. Состав целевых фракций после очистки такролимуса на сорбентах HP2MG и Диасорб 100-Диол

Компонент	Содержание компонента в смеси после очистки на сорбенте, %	
	Диасорб 100-Диол	HP2MG
Такролимус	75	76
Аскомицин	10	10
8-Пропил аналог такролимуса	3	4
Неидентифицированные примеси	12	10

100-Диол), которые можно было регенерировать. Эти сорбенты были выбраны вследствие их близкого к силикагелю и оксиду алюминия сорбционно-хроматографического поведения (табл. 2).

Для сравнения были использованы предыдущие данные, описанные в работах [20–26], о производительности процесса предварительной очистки такролимуса в условиях, при которых в качестве сорбента использовался силикагель.

Были оптимизированы концентрации и объемы промывочного и элюирующего растворов изооктан/ацетон для сорбентов HP2MG и Диасорб-100-Диол. В результате была предложена следующая схема предварительной очистки: целевое вещество, растворенное в толуоле, наносили на сорбент, затем последовательно промывали изооктаном (2 объема колонки), 10 об. % ацетона в изооктане (2 объема колонки) и элюировали 30 об. % ацетона в изооктане (2 объема колонки). Нагрузочные характеристики сорбентов и выходы такролимуса при проведении процесса предварительной очистки представлены в табл. 3.

В табл. 4 приведены сравнительные данные о содержании целевого компонента относительно суммы такролимуса и основных примесей для двух сорбентов, испытанных на стадии предварительной очистки. Как можно отметить, целевые фракции не отличались по составу и, таким обра-

зом, данные сорбенты показали одинаковую эффективность при удалении балластных компонентов сырья.

На основании полученных данных для последующей работы был выбран сорбент HP2MG. В табл. 5 приведен состав целевой фракции после одного и пяти циклов препаративной очистки – регенерации на данном сорбенте, которые свидетельствовали об устойчивости этого метода очистки.

Финишная очистка такролимуса. В табл. 6 приведены характеристики сульфокатионитов на основе метилметакрилата (Relisorb SP 400/SS и Диасфер-АК-СП-100), стирол-дивинилбензола (Dowex 50WX8) и силикагеля (Диасорб-60-СП и Диасорб-100-Сульфо), отличающиеся как природой матрицы, так и строением привитой группы.

Все изученные полимерные сульфокатиониты не показали достаточной селективности при отделении такролимуса от аналогов.

Наилучшие результаты были получены при использовании сорбента Relisorb SP 400/SS и в качестве элюента смеси изооктан/ацетон при нагрузке сорбента 3 мг/мл, скорости потока 1 объем колонки в 1 ч по следующей схеме элюирования: 0–2 объема колонки – 5 об. % ацетон/изооктан, 2–4 объема колонки – 20 об. % ацетон/изооктан, 4–5 объема колонки – 30 об. % ацетон/изооктан,

Таблица 5. Состав целевых фракции после 1 и 5 циклов препаративной очистки такролимуса на сорбенте HP2MG

Компонент	Содержание компонента в смеси, %	
	после 1 цикла очистки	после 5 циклов очистки –регенерации
Такролимус	76	75
Аскомицин	12	13
8-Пропил аналог такролимуса	3	4
Неидентифицированные примеси	9	8

Таблица 6. Характеристика сорбентов, использованных на стадии финишной очистки такролимуса

Сорбент	Тип матрицы	Размер частиц, мкм	Диаметр пор, Å	Емкость, ммоль экв/г
Relisorb SP 400/SS	Полиметилметакрилат	50–150	800–1000	0.1
Диасфер-АК-СП-100	Полиметилметакрилат	40–120	500–800	0.7
Dowex 50WX8	Стиролдивинилбензол	37–74	45–60	1.7
Диасорб-60-СП	Силикагель	50–70	60	0.6
Диасорб-100-Сульфо	Силикагель	63–200	100	0.49

5–6 объема колонки – 40 об. % ацетон/изооктан. При этом можно отметить, что сорбент обладал низкой селективностью и не позволял добиться хорошего разделения такролимуса и его аналогов (рис. 3а).

Заметная селективность достигалась при использовании сорбента Диасфер-АК-СП-100 и в качестве элюента этилацетата при нагрузке 3 мг/мл и скорости потока 1.5 объема колонки в 1 ч в режиме изократического элюирования. Как видно на рис. 3б, выход целевого вещества при этом составил около 50%, а значительная часть такролимуса (43%) элюировалась вместе с аскомицином и 8-пропил-аналогом такролимуса. Снижение нагрузки не приводило к значительному улучшению разделения компонентов.

Подобрать условия разделения не удалось и на сорбенте Dowex WX8. Аскомицин, 8-пропил-аналог такролимуса и такролимус элюировались практически одновременно (рис. 3в). Можно предположить, что это связано с недоступностью большей части внутренней поверхности сорбента для разделяемых молекул такролимуса и его примесей вследствие набухания сорбента в органическом растворителе.

Сульфокатиониты на основе силикагеля (Диасорб-60-СП и Диасорб-100-Сульфо) показали высокую селективность при разделении такролимуса и его аналогов.

Для сорбента Диасорб-100-Сульфо высокая селективность была достигнута при использовании в качестве элюента ацетона. При нагрузке 8 мг/мл и скорости потока 2.35 объема колонки в 1 ч выход целевого вещества составил 70%, степень очистки продукта – 96.7% (рис. 3г), а производительность – 2.95 мг такролимуса/(мл сорбента × ч).

Неожиданный результат был получен для сорбента Диасорб-60-СП (рис. 3д). При использовании в качестве элюента 100%-ного ацетона (нагрузка 10.5 мг/мл сорбента, поток 3.5 объема колонки в час) в двух объемах колонки элюировались только аналоги такролимуса (аскомицин и 8-пропил-аналог-такролимуса), а для элюции такролимуса была необходима добавка ацетонитрила в ацетон (не менее 5 об. %). При 30 об. % ацетонитрила такролимус элюировался в следующих двух объемах колонки.

Таким образом, было показано, что отделение такролимуса от аналогов можно провести даже в сорбционном режиме. Производительность данного метода составила 8.35 мг такролимуса/(мл сорбента × ч), что оказалось в 28 раз эффективнее процесса разделения на цианосеребряных сорбентах [27], которые считаются наиболее эффективными из импрегнированных сорбентов. Характеристики разделения были устойчивы после проведения 15 последовательных циклов очистки, а снижения селективности процесса не было выявлено.

Процесс очистки такролимуса на сорбенте Диасорб-60-СП был реализован также и в режиме проточной хроматографии (рис. 3е). При изократическом элюировании в системе 5 об. % ацетонитрила в ацетоне, нагрузке 8.8 мг/мл и скорости потока 2.55 объема колонки в 1 ч выход целевого вещества составил 80%. Производительность метода – 7.04 мг такролимуса/(мл сорбента × ч), содержание аскомицина – 1–1.2%, чистота целевой фракции – 96.2% (сумма площадей пиков такролимуса, С19-эпимера такролимуса и такролимуса-открытое кольцо).

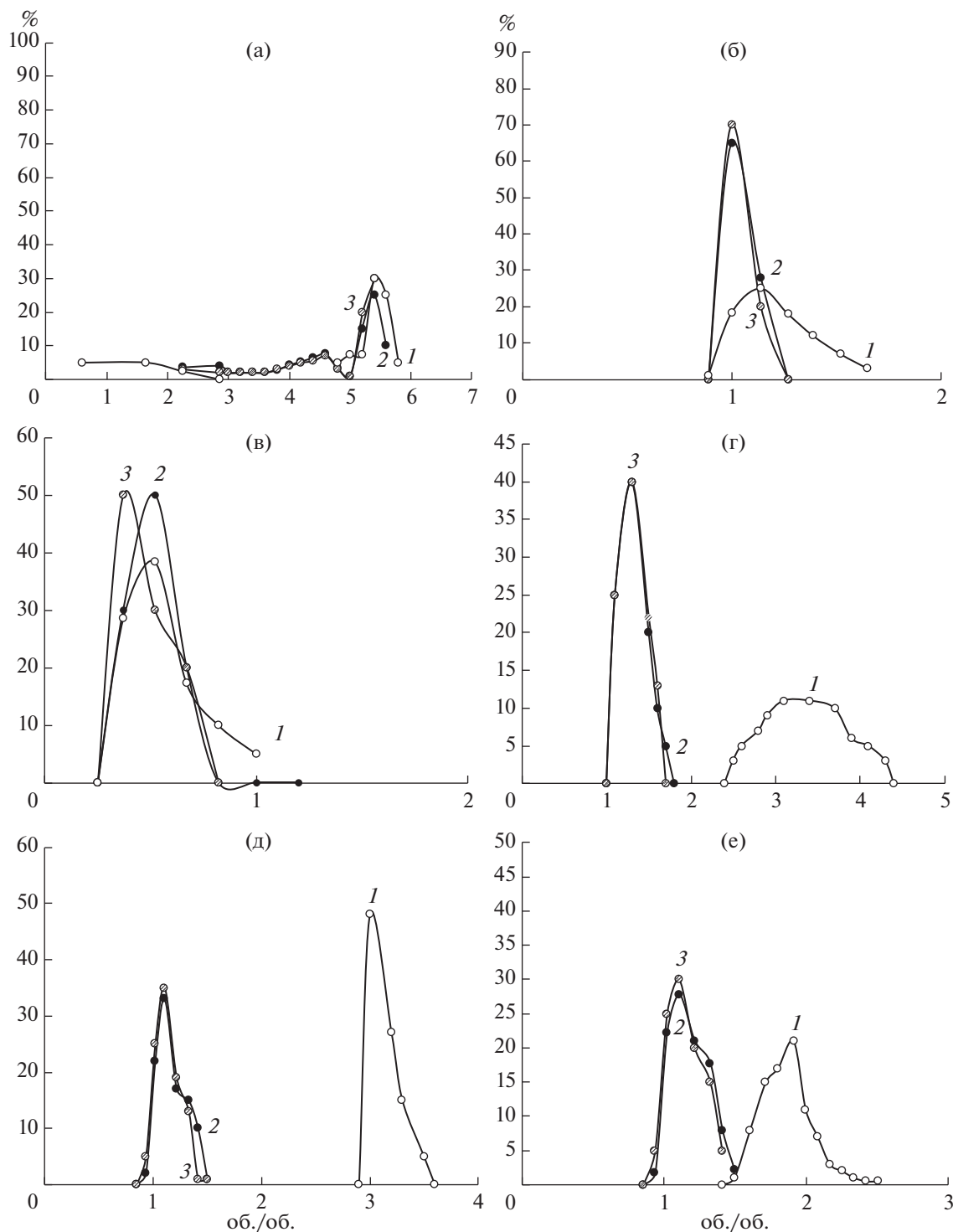


Рис. 3. Хроматограммы препаративного разделения такролимуса (1) и его аналогов – аскоцинина (2) и 8-пропил-аналога такролимуса (3) на сорбентах Relisorb SP 400/SS (а), Диасфер-АК-СП-100 (б), Dowex 50 WX8 (в), Диасорб-100-Сульфо (г), Диасорб-60-СП (д, е) (на оси X об./об. – объем фракций, выраженный в объемах колонки).

Таким образом, использование сульфокатионитов на основе силикагеля позволяло реализовать процесс очистки такролимуса от аналогов с высокой селективностью и выходом, а также производи-

тельностью, превышающей известную [19–28] более чем в 20 раз.

Дальнейшее увеличение производительности может быть достигнуто за счет оптимизации фрак-

Таблица 7. Качественный и количественный состав кристаллов такролимуса

Компонент	Содержание, %	Критерий приемлемости, %, по USP [18]
Такролимус	99.3 (суммарно с С19-эпимером такролимуса 99.8)	98–102
С19-Эпимер такролимуса	0.5	Не нормируется
Аскомицин (+ неидентифицированное соединение)	0.2	0.5
С19-Эпимер аскомицина	–	0.1
С8-Эпимер такролимуса	–	0.15
С8-Пропил-аналог такролимуса	–	0.15
Такролимус-открытое кольцо	–	Не нормируется
Десметилтакролимус	–	0.1
Общее количество нормируемых и неидентифицированных примесей	0.2	1.0

ционного состава сорбентов и нагрузочных характеристик процесса.

Сравнение хроматограмм на рис. 3г и 3д показало, что сорбент с размером частиц 50–70 мкм (рис. 3д) обеспечивал меньшую ширину хроматографических зон по сравнению с сорбентом с размером частиц 63–200 мкм (рис. 3г). Для сорбента Диасорб-100-Сульфо при достигнутой селективности процесса нагрузочные характеристики и производительность могут быть заметно увеличены при переходе к частицам с размером 50 мкм.

На рис. 3д видно, что емкость сорбента Диасорб-60-СП в сорбционном режиме очистки использовалась лишь частично, и нагрузочные характеристики процесса и производительность могут быть значительно увеличены.

После кристаллизации такролимус соответствовал требованиям фармакопеи [18] по хро-

мографической чистоте продукта, равной 99.3% (рис. 4 и табл. 7).

Таким образом, разработана схема выделения и очистки такролимуса со значительно возросшей производительностью на ключевой стадии процесса, при которой соблюдались требования по чистоте, предъявляемые к субстанции такролимуса. Использование на стадии биосинтеза бромированного стирол-дивинилбензольного сорбента SP-207 с повышенной плотностью позволило упростить стадию выделения такролимуса из культуральной среды. На стадии первичной очистки показана возможность использования регенерируемых сорбентов на основе метилметакрилата (HP2MG) и химически модифицированного силикагеля. Применение на стадии конечной очистки сорбентов с силикагелевой матрицей с привитыми сульфопропильными группами, модифицированными ионами серебра, приводило к достижению высокой селективности и производительности процесса.

Работа выполнена при финансовой поддержке государственного задания (проект № АААА-А16-116062110077-6).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Trede N.S., Warwick A.B., Rosoff P.M., Rohrer R., Bierer B.E., Guinan E.* // Bone Marrow Transplant. 1997. V. 20. № 3. P. 257–260.
2. *Meier-Kriesche Li S., Gruessner R., Fung J., Bustami R., Barr M., Leichtman A.* // Am. J. Transplant. 2006. V. 6. № 5. P. 1111–1131.
3. *McCormack P.L., Keating G.M.* // Drugs. 2006. V. 66. № 17. P. 2269–2279.
4. *Akimoto K., Kusunoki Y., Nishio S., Takagi K., Kawai S.* // Clin. Rheumatol. 2008. V. 27. № 11. P. 1393–1397.
5. *Benson A., Barrett T., Sparberg M., Buchman A.L.* // Inflamm. Bowel Dis. 2008. V. 14. № 1. P. 7–12.
6. *Remitz A., Reitamo S.* // Expert Opin. Drug Saf. 2009. V. 8. № 4. P. 501–506.
7. *Ingram J.R., Martin J.A., Finlay A.Y.* // Am. J. Clin. Dermatol. 2009. V. 10. № 4. P. 229–237.

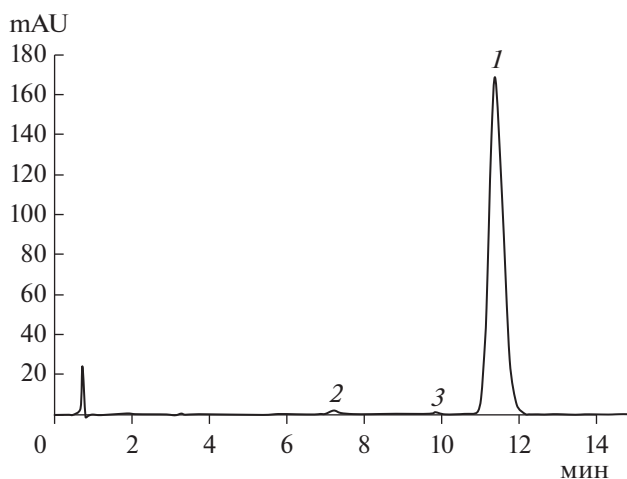


Рис. 4. ВЭЖХ-анализ свежеприготовленного раствора кристаллов такролимуса: такролимус (1), С19-эпимер такролимуса (2), аскомицин (3).

8. Barot R.K., Shitole S.C., Bhagat N., Patil D., Sawant P., Patil K. // J. Clin. Diagn. Res. 2016. V. 10. № 6. P. 5–9.
9. Reis S.A., Moussatche N., Damaso C.R.A. // J. Appl. Microbiol. 2006. V. 100. № 6. P. 1373–1380.
10. Karpas A., Lowdell M., Jacobson S.K., Hill F. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1992. V. 89. № 17. P. 8351–8355.
11. Klettner A., Herdegen T. // Curr. Drug Targets CNS Neurol. Disord. 2003. V. 2. № 3. P. 153–162.
12. Konofaos P., Terzis J.K. // J. Reconstr. Microsurg. 2013. V. 29. № 3. P. 141–148.
13. Periyasamy S., Warriar M., Tillekeratne M.P.M., Shou W., Sanchez E.R. // Endocrinology. 2007. V. 148. № 10. P. 4716–4726.
14. Goranovic D., Blazic M., Magdevska V., Horvat J., Kuscer E., Polak T., Santos-Aberturas J., Martinez-Castro M., Barreiro C., Mrak P. // BMC Microbiol. 2012. V. 12. № 1. P. 238–243.
15. Barreiro C., Martinez-Castro M. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2014. V. 98. № 2. P. 497–507.
16. Jung S., Lee K., Park Y.-J., Yoon S., Yoo J. // Biotechnol. Bioprocess. Eng. 2011. V. 16. № 6. P. 1208–1213.
17. Akashi T., Nefuji T., Yoshida M., Hosoda J. // J. Pharm. Biomed. Anal. 1996. V. 14. № 3. P. 339–346.
18. The United States Pharmacopeial Convention. // USP 37 – NF 32 The United States Pharmacopeia and National Formulary 2014: Main Edition Plus Supplements 1 and 2, 2013.
19. Международный патент. 2005. № 2006/069386 A1.
20. Международный патент. 2005. № 2006/031664 A1.
21. Международный патент. 2006. № 2006/048145 A1.
22. Международный патент. 2005. № 2005/098011 A1.
23. Международный патент. 2000. № 2000/71546 A1.
24. Международный патент. 2007. № 2007/017029 A1.
25. Международный патент. 2009. № 2009/116729 A2.
26. Международный патент. 2007. № 2007/013017 A1.
27. Международный патент. 2005. № 2007/106587 A2.
28. Патент США. 2008. № 0000834 A1.
29. Poshekhontseva V.Y., Bragin E.Y., Fokina V.V., Shtratnikova V.Y., Starodumova I.P., Tarlachkov S.V., Donova M.V. // Microbiol. Resour. Announc. 2019. V. 8. № 24. e00510-19.
30. Патент РФ. 2013. № 2495937.
31. Пошехонцева В.Ю., Фокина В.В., Суходольская Г.В., Шутов А.А., Донов М.В. // Биотехнология. 2019. Т. 35. № 5. С. 42–50.

Biosynthesis of Tacrolimus by the *Streptomyces tsukubensis* VKM Ac-2618D Strain in the Presence of Polymeric Sorbents and Development of a Method for Its Isolation and Purification

D. S. Salionov^{a, b}, V. Yu. Poshekhontseva^{c, d}, V. V. Fokina^{c, d, *}, A. A. Shutov^{c, d}, V. M. Nikolaeva^{c, d}, G. G. Vasiarov^b, E. V. Titova^b, V. S. Karasev^b, S. M. Staroverov^{a, b}, and M. V. Donova^{c, d}

^aChemistry Department of the Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia

^b“BioChemMack S&T”, Moscow, 119234 Russia

^cSkryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, “Pushchino scientific center for biological research RAS”, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

^d“Pharmins”, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

*e-mail: fokina@ibpm.pushchino.ru

Tacrolimus is known as one of the most effective immunosuppressive agents. This macrocyclic polyketide is synthesized by actinobacteria of the genus *Streptomyces*, however, the process is accompanied by the undesirable formation of close structural analogues. For now, the problem of the efficient isolation and purification of tacrolimus according to the requirements of pharmacopeia is still unsolved. An original method of tacrolimus biosynthesis by the actinobacterial strain *Streptomyces tsukubensis* VKM Ac-2618D using brominated styrene-divinylbenzene sorbent SP-207 was developed. This approach allowed to reduce the undesirable destruction of tacrolimus, increase its yield and simplifying the isolation procedure from the culture medium. The preliminary purification stage was optimized by utilization of regenerated sorbents based on methyl methacrylate (HP2MG) and chemically modified silica gel (Diasorb-100-Diol). The implementation of the silica gel sorbents with grafted sulfonic groups modified with silver ions at the finishing purification step allowed significantly increase the productivity of this key stage. The yield of tacrolimus according to the developed method was around 60–70%. The results could be implemented for the full-cycle production development of the pharmaceutical grade tacrolimus.

Keywords: biosynthesis, tacrolimus, *Streptomyces tsukubensis*, sorbent SP-207, chromatography, isolation, purification, ascomycin, tacrolimus 8-propyl-analog