

УДК 547.92,579.873.2

## ОПТИМИЗАЦИЯ СПОСОБА ПОЛУЧЕНИЯ 9 $\alpha$ -ГИДРОКСИ-АНДРОСТ-4-ЕН-3,17-ДИОНА – КЛЮЧЕВОГО ИНТЕРМИДИАТА В СИНТЕЗЕ ВЫСОКОАКТИВНЫХ ФТОРИРОВАННЫХ КОРТИКОСТЕРОИДОВ ИЗ ФИТОСТЕРИНОВ

© 2019 г. Н. В. Карпова<sup>1</sup>, Т. С. Стыщенко<sup>1</sup>, В. В. Ядерец<sup>1</sup>, В. А. Андрияшина<sup>1, \*</sup>, В. В. Джавахия<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт биоинженерии, Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии”  
Российской академии наук, Москва, 119071, Россия

\*e-mail: andryushina@rambler.ru

Поступила в редакцию 13.04.2018 г.

После доработки 16.07.2018 г.

Подписано в печать 25.07.2018 г.

Разработан способ трансформации фитостерина до 9 $\alpha$ -гидрокси-андростендиона с использованием смешанных культур актинобактерий *Mycobacterium neoaurum* Ac-1634 и *Rhodococcus erythropolis* Ac-1740 при высоких нагрузках стероидного субстрата. Внесение 9 $\alpha$ -гидроксилирующей культуры после первых 70 ч трансформации позволило повысить селективность процесса и исключить применение дорогостоящего и трудно регенерируемого метилциклодекстрина.

**Ключевые слова:** фитостерины, смешанные культуры, 9 $\alpha$ -гидроксилирование, фторированные кортикостероиды

**DOI:** 10.1134/S0555109919010070

В настоящее время самым дешевым и перспективным источником сырья для синтеза фармацевтических стероидов являются фитостерины (ФС). В предыдущей работе [1] был разработан эффективный метод выделения и очистки ФС из побочного продукта производства соевого масла. Также предложены оригинальные способы расщепления боковой цепи стерина до 17-кетоандростанов: андрост-4-ен-3,17-диона (АД), андроста-1,4-диен-3,17-диона (АДД) и 9 $\alpha$ -гидрокси-АД (9 $\alpha$ -ОН-АД), которые представляют собой ключевые интермедиаты для получения практически всех стероидных лекарственных препаратов [2–10]. Так, АДД считается идеальным промежуточным продуктом для синтеза эстрогенов, анаболиков и гестагенов 19-норстероидного ряда, АД – синтеза половых гормонов (андрогенов и прегнановых гестагенов) [11–14], а 9 $\alpha$ -ОН-АД – наиболее удобным полупродуктом для промышленного получения фторированных кортикоидов нового поколения на основе модифицированной стероидной молекулы, содержащей атомы фтора при С9, С6 и в диоксиацетоновой цепи, таких как триамцинолон, дексаметазон, бетаметазон, флуоцинолон, мометазон и флутиказон с высокой противовоспалительной, антиаллергической, иммунодепрессивной и противошоковой активностью при минимальных побочных эффектах [15–18]. Использование в каче-

стве ключевого полупродукта 9 $\alpha$ -ОН-АД обеспечивает наиболее короткий и простой способ получения фторированных аналогов стероидов, так как позволяет за счет легко осуществимой дегидратации 9 $\alpha$ -ОН-группы исключить из технологического процесса трудоемкую и неэкономичную стадию микробиологического 11-гидроксилирования.

В настоящее время 9 $\alpha$ -ОН-АД получают из стерина животного и растительного происхождения двумя способами. Первый способ включает двухстадийный процесс получения АД из стерина методом микробиологической трансформации бактериями рода *Mycobacterium* [19–21], а затем образовавшийся АД 9 $\alpha$ -гидроксилируют бактериальными культурами [4, 7, 8, 20, 22]. Второй – трансформацию стерина до 9 $\alpha$ -ОН-АД мутантными штаммами микроорганизмов с блокированным синтезом 1,2-дегидрогеназы [23–25]. Таким образом, для получения 9 $\alpha$ -ОН-АД можно последовательно подвергать стероидную молекулу действию различных микроорганизмов и выделять промежуточные продукты, или изменять эту молекулу последовательной трансформацией микроорганизмами, минуя стадию выделения [26], или проводить процесс со смешанными культурами микроорганизмов. Для последних двух случаев не-

обходимо, чтобы применяемые микроорганизмы-трансформаторы не были антагонистами [27, 28].

Впервые в стероидном синтезе смесь двух микроорганизмов была применена в 1939 г. [27]. При трансформации АД культурами *Bacillus putrificus* и *Saccharomyces cerevisiae* восстанавливались обе кетогруппы и двойная связь с образованием 5 $\alpha$ -андростан-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -диола [27]. Действие на АД бактерий *Corynebacterium equi* и *Trichomonas foetis* позволяет в одну стадию ввести  $\Delta^1$ -связь и восстановить 17-кетогруппу до 1,2-дегидротестостерона. Также 1,2-дегидротестостерон образовывался (с выходом 60%) при трансформации АД смешанными культурами *Fusarium lateritium* и *Saccharomyces cerevisiae* [27]. При трансформации 9 $\alpha$ -фторгидрокортизона в  $\Delta^1$ -дегидро-16 $\alpha$ -гидрокси-фторгидрокортизон (триамцинолон) использовали метод трансформации со смешанными культурами *Arthrobacter simplex* и *Streptomyces roseochromogenus*. Бактериальная культура *A. simplex* осуществляла реакцию 1,2-дегидрирования, а грибная культура *S. roseochromogenus* – 16 $\alpha$ -гидроксильирования [28].

Проведение микробиологических трансформаций стероидов с использованием смешанных культур позволяет упростить и снизить стоимость технологического процесса, поскольку при этом отсутствуют дополнительные стадии выделения и очистки полупродуктов.

Цель работы – усовершенствование метода получения 9 $\alpha$ -ОН-АД из ФС для использования в промышленном производстве фторированных кортикостероидов.

## МЕТОДИКА

**Микроорганизмы.** В работе были использованы следующие штаммы микроорганизмов: *Mycobacterium neoaurum* Ас-1634, расщепляющий боковую цепь стероидов животного и растительного происхождения с образованием АД [2], и *Rhodococcus erythropolis* Ас-1740, выполняющий 9 $\alpha$ -гидроксильирование  $\Delta^4$ -3-кетостероидов [4, 29]. Все указанные штаммы депонированы в ВКПМ.

**Среды и условия культивирования.** Актинобактерии хранили на агаризованных средах приведенного ниже состава. Для *M. neoaurum* использовали среду I, pH 6.8–7.0, содержащую (г/л) глюкозу – 10.0, соевую муку – 5.0, лимонную кислоту – 2.2, мочевины – 0.5, NH<sub>4</sub>Cl – 1.0, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 0.5, MgSO<sub>4</sub> – 0.5, FeSO<sub>4</sub> – 0.05 и CaCO<sub>3</sub> – 1.5. Для *R. erythropolis* использовали среду II, pH 6.8–7.2, следующего состава (г/л): глюкоза – 10.0, кукурузный экстракт – 15.0 и K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 1.0.

Биомассу *M. neoaurum* в возрасте 5–7 сут, полученную смывом со скошенной агаризованной среды, переносили в конические колбы объемом 750 мл со 100 мл среды I и выращивали в течение 90–96 ч на качалке при перемешивании со скоро-

стью 220 об/мин и 28°C. Далее посевной материал *M. neoaurum* в стерильных условиях концентрировали в 2 раза.

Биомассу *R. erythropolis* в возрасте 4–5 сут, полученную смывом со скошенной агаризованной среды, переносили также в конические колбы объемом 750 мл со 100 мл среды II и выращивали в течение 70–72 ч на качалке при перемешивании со скоростью 220 об/мин и 28°C.

Полученный инокулят *R. erythropolis* в количестве 10% (об.) переносили в аналогичные колбы со средой II и выращивали в течение 24 ч в условиях, указанных выше.

Биомассу *R. erythropolis* для 2 стадии трансформации отстаивали в течение 24 ч при 4–5°C. Затем посевной материал *R. erythropolis* в стерильных условиях концентрировали в 2 раза.

Культивирование бактерии *M. neoaurum* для стадии трансформации стероидов в АД осуществляли в аналогичных колбах с отбойником в среде III, pH 7.0–7.2, содержащей (г/л) глюкозу – 20.0, соевую муку 18%-ной жирности – 20.0, лимонную кислоту – 3.0, мочевины – 0.65, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 2.0, MgSO<sub>4</sub> – 0.65, FeSO<sub>4</sub> – 0.065, CaCO<sub>3</sub> – 3.0 и ФС с размером частиц 5–15 мкм – 30.0, pH 7.0–7.2. Раствор глюкозы и посевной материал подавали дробно: 0 ч – 20%, через 48 ч – 10%, 96 ч – 10%.

Концентрированную биомассу *R. erythropolis* в количестве, соответствующем весу 0.4–0.5 г сухого вещества, переносили в колбы с 100 мл культуральной жидкости, полученной через 70 ч трансформации ФС культурой *M. neoaurum*.

**Оценка количества продуктов трансформации.** Количество АД и 9 $\alpha$ -ОН-АД в культуральной жидкости оценивали методом ТСХ. Стероиды извлекали экстракцией этилацетатом. Для анализа использовали пластинки Sorbfil (“Imid Ltd”, Россия) и систему бензол–ацетон 3 : 1. Аликвоты культуральной жидкости (1 мл) отбирали с интервалом, определяемом целями эксперимента. Экстракцию стероидов из проб осуществляли 4-кратным объемом этилацетата. Разделение стероидных соединений проводили в системе растворителей бензол/ацетон (3 : 1). Количественную оценку продуктов биоконверсии в пробах проводили визуально в УФ-свете на хроматоскопе ХЛ-6 (Россия) сравнением интенсивности поглощения пятен при длине волны 254 нм с пятнами стандартов известной концентрации.

**Выделение.** Из 200 мл культуральной жидкости 6 г 95%-ного ФС экстрагировали стероиды 3 раза равными объемами этилацетата. Объединенные экстракты осветляли 1 г активированного угля при перемешивании в течение 15 мин. Уголь отфильтровывали, а фильтрат упаривали в вакууме. Полученный остаток обрабатывали 10 мл диэтилового эфира при перемешивании в течение 30 мин. Осадок отфильтровывали, промывали диэтило-

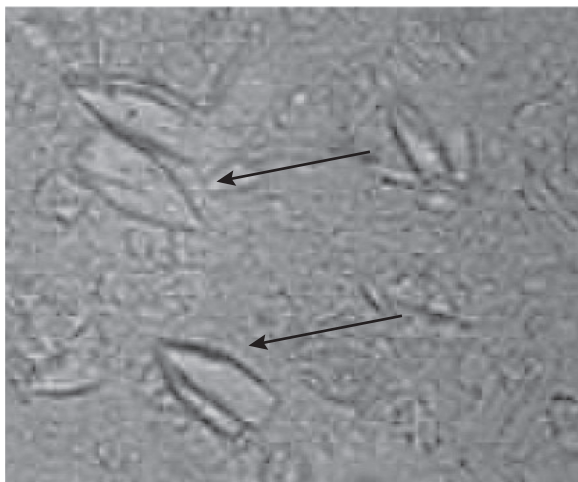


Рис. 1. Кристаллы АД в культуральной жидкости *M. neoaurum*.

вым эфиром и сушили. Получено 2.69 г 9 $\alpha$ -ОН-АД (выход 64.3% на ФС).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В предыдущей работе [7] был описан разработанный и усовершенствованный метод получения 9 $\alpha$ -ОН-АД из ФС при совместном культивировании актинобактерий *M. neoaurum* и *R. erythropolis*, при котором трансформация ФС до 9 $\alpha$ -ОН-АД смешанными культурами проводилась в две последовательные стадии без выделения из культуральной жидкости образовавшегося на первой стадии АД.

Использование метода смешанных культур позволило упростить и удешевить технологию получения стероидных веществ. Однако, АД, накапливающийся на первом этапе после расщепления боковой цепи ФС с повышенной нагрузкой (30 г/л или выше) в виде крупных кристаллов (рис. 1), многократно превышающих размером бактериальные клетки, становился труднодоступным для дальнейшей трансформации до 9 $\alpha$ -ОН-АД.

Для решения этой проблемы в процессе трансформации ФС использовали метил- $\beta$ -циклодекстрин (МЦД) в весовом соотношении 1 : 5, который образовывал водорастворимый комплекс включения с АД, образующимся при расщеплении стерина, и далее АД трансформировался в 9 $\alpha$ -ОН-АД (рис. 2) [7].

Однако МЦД является дорогостоящим и трудно регинерируемым реагентом, поэтому в дальнейшем были предприняты попытки получить аналогичные по выходу результаты без использования МЦД при такой же нагрузке субстрата.

Для предотвращения процесса укрупнения образующихся кристаллов АД, в значительной степени зависящего от концентрации стероида, 9 $\alpha$ -гидроксилирующую культуру *R. erythropolis* вносили на 70 ч трансформации, что соответствовало экспоненциальной фазе роста культуры *M. neoaurum* и процессу интенсивного накопления АД (рис. 3а). При достижении его концентрации выше 10 г/л в культуральной жидкости образовывались кристаллические структуры (рис. 1), недоступные для дальнейшего введения гидроксильной группы в 9 $\alpha$ -положение стероидной молекулы, катализируемого культурой *R. erythropolis*.

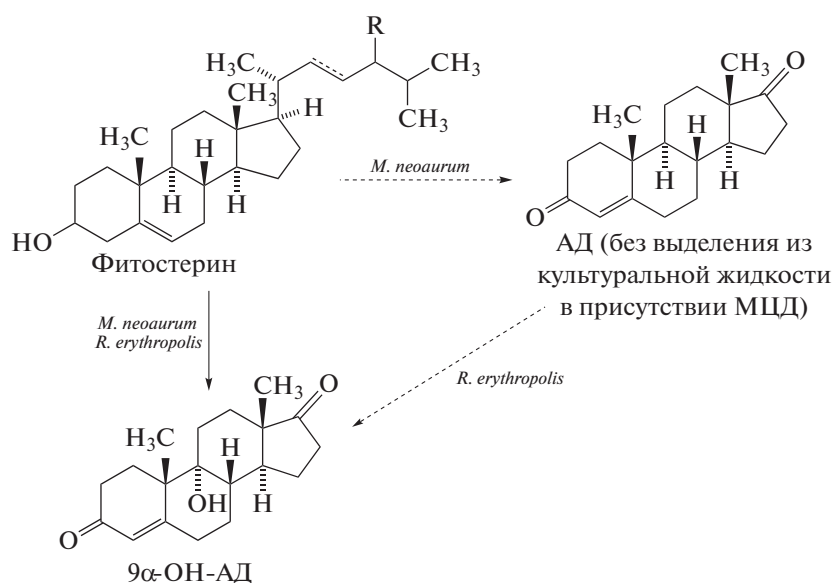


Рис. 2. Схема получения 9 $\alpha$ -ОН-АД из ФС с использованием МЦД и без него.

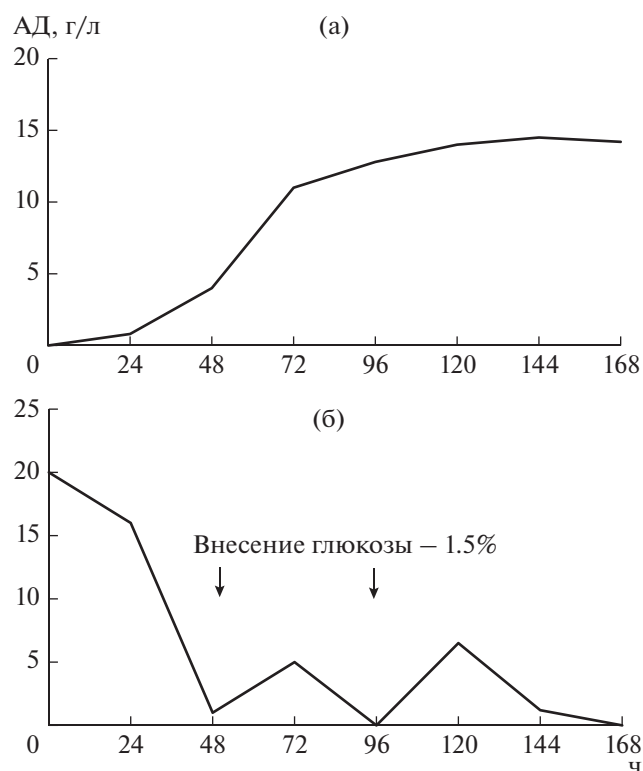


Рис. 3. Динамика накопления АД и потребления глюкозы при трансформации 30 г/л ФС культурой *M. neoaurum*.

Для интенсификации микробиологических трансформаций применяли дробное внесение инокулята и раствора глюкозы. Как видно на рис. 3б, после 48 и 96 ч проведения процесса биоконверсии запас глюкозы оказывался полностью исчерпанным, поэтому в стерильных условиях вносили растворы глюкозы в количестве 1.5 об.% и инокулята *M. neoaurum* – 10 об.%.

Таким образом, добавление на 70 ч трансформации бактерии *R. erythropolis* способствовало тому, что образующийся АД сразу гидроксировался до 9 $\alpha$ -ОН-АД. Время трансформации при нагрузке ФС 30 г/л в отсутствие солилизатора составило 168 ч, а выход 9 $\alpha$ -ОН-АД – 64–65%.

Помимо снижения стоимости процесса за счет проведения его без дорогостоящего МЦД, к преимуществу данного метода можно отнести его высокую селективность без образования побочных продуктов, а образующееся в качестве побочного продукта незначительное количество тестостерона гидроксировалось культурой *R. erythropolis* с образованием также 9 $\alpha$ -ОН-АД [8].

Таким образом, удалось разработать эффективный способ трансформации ФС до 9 $\alpha$ -ОН-АД с использованием метода смешанных культур актинобактерий *M. neoaurum* и *R. erythropolis* при высоких нагрузках стероидного субстрата.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы Президиума РАН “Разработка новых биотехнологических методов получения высокоактивных фторированных кортикостероидов противовоспалительного и антиаллергического действия по совмещенной схеме из фитостероинов через 9 $\alpha$ -гидрокси-АД с использованием в процессе биотрансформации вновь созданных иммобилизованных биокатализаторов” (проект № 1201371077).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Савинова Т.С., Диев Н.Т., Войшвилло Н.Е., Андриюшина В.А., Карпова Н.В., Белецкая И.П., Луи Д. Нуу // Хим.-фарм. журн. 2012 Т. 46. № 3. С. 34–38.
2. Патент РФ. 2004. № 2231553.
3. Патент РФ. 2007. № 2297455.
4. Патент РФ. 2009. № 2351645.
5. Молчанова М.А., Андриюшина В.А., Савинова Т.С., Стыценко Т.С., Родина Н.В., Войшвилло Н.Е. // Биоорг. химия. 2007. Т. 33. № 3. С. 379–384.
6. Родина Н.В., Молчанова М.А., Войшвилло Н.Е., Андриюшина В.А., Стыценко Т.С. // Прикл. биохимия и микробиология. 2008. Т. 44. № 1. С. 56–62.
7. Андриюшина В.А., Родина Н.В., Стыценко Т.С., Лью Дук Хи, Дружинина А.В., Ядерец В.В., Войшвилло Н.Е. // Прикл. биохимия и микробиология. 2011. Т. 47. № 3. С. 297–301.
8. Карпова Н.В., Андриюшина В.А., Ядерец В.В., Дружинина А.В., Стыценко Т.С., Шаскольский Б.Л., Лозинский В.И., Лью Дук Хи, Войшвилло Н.Е. // Прикл. биохимия и микробиология. 2011. Т. 47. № 4. С. 429–435.
9. Andryushina V.A., Rodina N.V., Stytsenko T.S., Luu Duc H., Voyshvillo N.E. // 3rd Annual World Congress of Industrial Biotechnology. China: Da lian. 2010. P. 21.
10. Andryushina V.A., Luu Duc Huy, Rodina N.V., Truong Nam Hai, Nguyen Thi Quy, Nguyen Thi Diep, Voyshvillo N.E. // Inter Sci. Conference on Chemistry for Development and Integration. Hanoi.: Full Sci. Report. Hanoi. 2008. P. 191–194.
11. Патент РФ. 2001. № 2170740.
12. Патент РФ. 2000. № 2156255.
13. Патент РФ. 2000. № 2156256.
14. Патент РФ. 2001. № 2163606.
15. Fernandes P., Cruz A., Angelova B., Pinheiro H.M., Cabral J.M.S. // Enz. Microb. Technol. 2003. V. 32. № 6. P. 688–705.
16. Kapur J.C., Marx A.F., Verweij J. // Steroids. 1989. V. 54. №1. P. 181–185.
17. Batist J.N.M., Slobbe A.F.M., Marx A.F. // Steroids. 1989. V. 54. № 2. P. 321–329.
18. Batist J.N.M., Barendse M.C.M.E., Marx A.F. // Steroids. 1990. V. 55. № 1. P. 109–120.
19. Malaviya A., Gomes J. // Appl. Biochem. Biotechnol. 2009. V. 158. № 2. P. 374–386.
20. Haq Nawaz Bhatti, Rasheed Ahmad // Steroids. 2012. V. 77. № 4. P. 1267–1290.

21. Wang F., Yao K., Wei D. // Appl. Environ. Microbiol. 2010. V. 76. № 13. P. 4578–4582.
22. Wei Wei, Shuyue Fa, Fengqing Wang, Dongzhi Wei // Appl. Biochem Biotechnol. 2010. V. 162. № 6. P. 1446–1456.
23. Sukhodolskaya. G.V., Nikolayeva V.M., Khomutov S. M., Donova M.V. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2007. V. 74. № 4. P. 867–873.
24. Патент США. 1994. № 5298398.
25. Довбня Д.В., Хомутов С.М., Фокина В.В., Донова М.В. // Журн. физ. химии. 2015. Т. 9. № 6. С. 38–47. (Dovbnya D.V., Khomutov S.M., Fokina V.V., Donova M.V. // Russian J. Physical Chem. B. 2015. V. 9. № 3. P. 436–444.)
26. Mazumder T.K., Sonomoto K., Tanaka A., Fukui S. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1985. V. 21. № 2. P. 154–161.
27. Ахрем А.А., Тумов Ю.А. Стероиды и микроорганизмы. М.: Наука, 1970. 127 с.
28. Yoshida T. Sueki M., Taguchi H., Kulprecha S., Nilubol N. // Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 1981. V. 11. № 1. P. 81–88.
29. Родина Н.В., Андрюшина В.А., Стыщенко Т.С., Турова Т.П., Баслеров Р.В., Пантелеева А.Н., Войшвилло Н.Е. // Прикл. биохимия и микробиология. 2009. Т. 45. № 4. С. 439–445.

## Optimization of the Method of Obtaining 9 $\alpha$ -hydroxy-androst-4-ene-3,17-dione — Key Intermediat in Synthesis of the Highly Active Fluorinated Corticosteroids from Phytosterols

N. V. Karpova<sup>a</sup>, T. S. Stytsenko<sup>a</sup>, V. V. Yaderets<sup>a</sup>, V. A. Andryushina<sup>a, \*</sup>, and V. V. Dzhavakhiya<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Institute of Bioengineering, Research Center of Biotechnology of Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

\*e-mail: andryushina@rambler.ru

Received April 13, 2018

Revised July 16, 2018

Accepted July 25, 2018

A way of phytosterols transformation to 9 $\alpha$ -hydroxy-androstenedione under high loads of the steroid substrate has been developed using the mixed cultures method for actinobacteria *M. neoaurum* and *R. erythropolis*. The introduction of a 9 $\alpha$ -hydroxylating culture after the first 70 h of transformation made it possible to increase the selectivity of the process and to exclude the use in it of an expensive and difficultly regenerated methylcyclodextrin.

**Keywords:** phytosterols, mixed cultures, 9 $\alpha$ -hydroxylation, fluorinated corticosteroids