



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,  
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2006120501/13, 13.06.2006

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
13.06.2006

(45) Опубликовано: 20.04.2008 Бюл. № 11

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: ENDO A., KURODA M., TSUJITA Y., ML-236A, ML-236B, and ML-236C, new inhibitors of cholesterologenesis produced by *Penicillium citrinum*, *J Antibiot*, 1976 Dec; 29(12), 1346-8. ГУДОВА Н.В. Действие ловастина, ингибитора биосинтеза холестерина, на продуцент *Aspergillus terreus* шт.35, Тезисы докладов XIII международной конференции студентов, аспирантов и (см. прод.)

Адрес для переписки:  
125009, Москва, а/я 28, ЗАО "ОПП Интеллект Патент"

(72) Автор(ы):

Бибикова Маргарита Васильевна (RU),  
Грамматикова Наталья Эдуардовна (RU),  
Катлинский Антон Викентьевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Общество с ограниченной ответственностью  
"Сириус" (RU)

RU 2 3 2 2 4 9 1 C 1

(54) ШТАММ *LECANICILLIUM* SP. 347A - ПРОДУЦЕНТ КОМПЛЕКСА БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии, фармакологии, микробиологии, точнее к получению медицинского препарата с использованием микроорганизмов - продуцентов. Штамм *Lecanicillium* sp. Г16 выделен из почвенного образца Тебердинского заповедника. Депонирован

в Коллекции культур микроорганизмов ГНЦА под номером 347А. Изобретение позволяет получить комплексный препарат, обладающий высокой гиполипидемической и противоопухолевой активностью и пролонгирующим действием при низких концентрациях 3 табл.

(56) (продолжение):

молодых ученых "ЛОМОНОСОВ-2006", 12-15 апреля 2006 г, Москва, 2006, с.67-68. RU 2082755 C1, 27.06.1997. ГЕОРГИЕВА М.Л. Биологически активные вещества у микромицетов из содовых солончаков. Тезисы докладов XIII международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых "ЛОМОНОСОВ-2006", 12-15 апреля 2006 г, Москва, 2006, с.54-55. ЕВСЕНКО М.С. Противоопухолевая активность полисахаридов *Ganoderma lucidum* и ее изменение в процессе онтогенеза. Тезисы докладов XIII международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых "ЛОМОНОСОВ-2006", 12-15 апреля 2006 г, Москва, 2006, с.86-87.

RU 2 3 2 2 4 9 1 C 1



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,  
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.

**C12N 1/14** (2006.01)**C12P 1/02** (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21), (22) Application: **2006120501/13, 13.06.2006**(24) Effective date for property rights: **13.06.2006**(45) Date of publication: **20.04.2008 Bull. 11**

Mail address:

**125009, Moskva, a/ja 28, ZAO "OPP Intellekt  
Patent"**

(72) Inventor(s):

**Bibikova Margarita Vasil'evna (RU),  
Grammatikova Natal'ja Ehdvardovna (RU),  
Katlinskij Anton Vikent'evich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Obshchestvo s ogranichennoj otvetstvennost'ju  
"Sirius" (RU)**

(54) **LECANICILLIUM SPECIES 347A STRAIN AS PRODUCER OF COMPLEX OF BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology, microbiology, pharmacology.

SUBSTANCE: invention relates to preparing a medicinal preparation using microorganism-producers. Lecanicillium sp. G16 strain is isolated from a soil sample from Teberdinsky reservation and deposited in Collection of microorganism cultures GNTSA at number 347A.

Invention provides preparing a complex preparation possessing high hypolipidemic and antitumor activity and prolonged effect in low concentrations.

EFFECT: valuable medicinal properties of strain and preparation.

3 tbl, 1 ex

RU 2 3 2 2 4 9 1 C 1

RU 2 3 2 2 4 9 1 C 1

Изобретение относится к области фармакологии, микробиологии, биотехнологии, точнее к получению медицинского препарата с использованием микроорганизмов - продуцентов.

Предшествующий уровень техники

Культуры мицелиальных грибов являются источником биологически активных соединений. В клинике широко используются препараты с гипополипидемической, иммуносупрессивной, иммуностимулирующей и другими активностями. Установлена тесная связь иммунных реакций организма с его липидтранспортной системой. Большое значение имеет применение для медицинских целей липидов грибов, как эссенциальных, так и регулирующих гомеостаз макроорганизма.

Известно биологически активное соединение "ловастатин", получаемый из штамма *P.cetrinum* (Endo A., Kuroda M., Tsujita Y. ML-236A, ML-236B and ML-236C, new inhibitors of cholesterologenesis produced by *P.cetrinum*. J.Antibiot / 1976, v.29, pp. 1346-1348), который проявляет гипополипидемическую активность. Однако, его концентрация при использовании достаточно велика и он не обладает пролонгирующим действием.

Сущность изобретения

Целью изобретения является использование штамма *Lecanicillium* sp. 347A для получения комплексного препарата, обладающего высокой гипополипидемической и противоопухолевой активностью и пролонгирующим действием при низких концентрациях.

Штамм *Lecanicillium* sp. Г16 выделен из почвенного образца Тебердинского заповедника и депонирован в Коллекцию культур микроорганизмов ГНЦА под номером 347A.

Указанный штамм относится к мезофильным аэробам, его рост наблюдается в диапазоне температур 10-32°C. Хорошо сохраняется при температурах 4-8°C. Штамм сохраняет жизнеспособность при pH 3,0-8,0. При комнатной температуре и чередующемся освещении указанный штамм в течение 2 недель сохраняет способность продуцировать вторичные метаболиты.

Оптимальными для роста штамма *Lecanicillium* sp. 347A и образования им вторичных метаболитов являются температуры в пределах 24-26°C и pH 6,0-7,0.

Штамм *Lecanicillium* sp. 347A через 2 недели роста при 24°C характеризуется следующими морфологическими свойствами.

Солодовый агар: образует белые, опушенные ватообразные колонии D=90 мм.

Воздушный мицелий достигает высоты 10 мм и выше. Центр колонии более плотный, слегка приподнят. Обратная сторона - желтовато-кремовая.

На среде Райстрика - колонии белые, опушенные, ватообразные. Обратная сторона желтовато-кремовая. D=90 мм.

Среда Чапека - колонии белые, ватообразные, несколько приплюснутые. Центр колонии слегка приподнят. Наблюдаются центрические кольца. Обратная сторона также с центрическими кольцами, кремоватая с зеленоватыми полосами. D=40-45 мм.

Сусло-агар: Колонии белые, высокие, образуют центрические кольца: плотные в центре и к периферии более рыхлые. Высота более 10 мм, D=40-45 мм. Обратная сторона колонии центрическими кольцами - буровато-кремовые.

Овсяный агар: колонии белые, опушенные, ватообразные D=90 мм. Воздушный мицелий достигает высоты 10 мм. Центр колонии более плотный, слегка приподнят. Обратная сторона кремовая.

Гаузе 1: Колонии белые, рыхлые, ватообразные. D=45-50 мм. Высота 6-8 мм.

Спороносный слой в середине колонии более плотный, центр вдавлен, к периферии разрезанный.

Рост и развитие культуры на агаризованных средах происходит по мицелиальному типу с образованием типичных разветвленных конидиеносцев с фиалидами, которые встречаются как единичные, так и в мутовках. На концах фиалид находятся склеенные в капельках конидии. Конидии цилиндрические с закругленными концами размером 3-5×1-2 μm, собранные в округлые головки. Хламидоспоры не наблюдаются.

Сведения, подтверждающие возможность осуществления изобретения.

Комплексный препарат биологически активных соединений получают выращиванием

штамма в глубинных условиях на посевной и ферментационной среде одного и того же состава, содержащей органический азот (может быть представлен гороховой или соевой мукой, БВК и т.д.), углеводы (меласса, солод, сахароза, глюкоза, крахмал картофельный и т.д.), минеральные соли (хлорид натрия, фосфорнокислый калий 1 и 2-х замещенный, аммоний сульфат) и воду, рН среды 6,5-7,2. Посевная стадия длительностью 48-72 часа, объем инокулята 5-15%. Процесс ферментации осуществляют в течение 10-14 суток при 24°C в условиях аэрации. Объем среды в колбах емкостью 750 мл составляет 100-200 мл.

По окончании ферментации отделяют мицелий от нативного раствора и экстрагируют препарат органическим растворителем (ацетон, спирт). Растворитель удаляют на роторном испарителе и целевой сырец реэкстрагируют из водной взвеси петролейным эфиром. Реэкстракт осушают безводным сульфатом натрия и концентрируют до окрашенного сиропообразного продукта. Комплексный препарат осаждают гексаном.

Пример: От одного литра культуральной жидкости отделяют мицелий центрифугированием или фильтрованием. Полученный влажный мицелий (80% влажности) экстрагируют 3-х кратным объемом ацетона (по отношению к объему мицелия) в течение часа. Экстракт отделяют от мицелия фильтрованием и удаляют растворитель на роторном испарителе при 45°C. Целевой сырец реэкстрагируют из водной взвеси петролейным эфиром (2 раза по 1/4 объема от объема водной взвеси). Петролейный реэкстракт сушат безводным сульфатом натрия и концентрируют на роторном испарителе до окрашенного сиропообразного продукта. Получают 0,5 г комплексного препарата.

Биологическая активность комплексного препарата биологически активных соединений  
Комплексный препарат биологически активных соединений проявляет высокую гипополипидемическую активность.

При использовании стандартной методики определения синтеза стеролов клетками культуры гепатоцитов Нер G2 по включению <sup>3</sup>Н-ацетата натрия в стеролы. Установлено, что ловастатин в дозе 200 мг/мл подавляет синтез стеролов на 50±6 (%). Комплексный препарат биологически активных соединений в разведении 1:1000 подавлял синтез стероидов на 60±2 (%).

На модели гиперлипидемии кроликов in vivo под действием комплексного препарата 347А в дозе 0,04 мг/кг показано максимальное снижение общего холестерина (ОХ) в крови кроликов на 55%, триглицеридов (ТГ) на 40%, липопротеидов низкой плотности (ЛПНП) на 98% и увеличение уровня липопротеидов высокой плотности (ЛПВП) на 30%. При действии контрольного препарата ловастатина в дозе 4 мг/кг наблюдается снижение ОХ на 53%, ТГ на 46%, ЛПНП на 97% и повышение ЛПВП 18%. Под влиянием комплексного препарата 347А эффект сохраняется в течение 5 часов, в то время как действие контрольного препарата ловастатина прекращается. Сравнительные данные действия ловастатина и комплексного препарата биологически активных соединений приведены в таблице 1.

Препарат	Конц. препарата (мг/кг)	Максимальное снижение уровня ОХ (%)	Максимальное снижение уровня ТГ (%)	Максимальное увеличение уровня ХС ЛПВП (%)	Максимальное снижение уровня ХС ЛПНП (%)
ловастатин	4	53,5	45,8	17,7	97,1
препарат	0,04	54,9	39,3	30,1	98,6

Комплексный препарат биологически активных соединений подавляет фитогемагглютинин (ФГА) индуцированную пролиферацию лимфоцитов крови доноров в концентрации 0,01-1 мкг/мл на 92-98%, что проиллюстрировано примером в таблице 2.

№	Контроль (имп/мин)		Опыт (имп/мин) Жизнеспособность лимфоцитов							
	Спонт.	ФГА	ФГА+препарат (мкг/мл)			Контроль		Опыт ФГА+препарат		
						Спонт.	ФГА			
			1	0,1	0,01				0,1	0,01
1	1752	45673	1067	1102	4314	3	14	21	0,7	22

2	2483	53966	1265	1765	4491	0,5	0,9	14	14	15
1	Процент подавления		97,7	97,6	90,6					
2	Процент подавления		97,7	96,7	91,7					

5 Комплексный препарат биологически активных соединений индуцирует апоптоз трансформированных лимфоидных клеток линии Yurkat в концентрации 1-100 нг/мл на 15-20%, что проиллюстрировано примером в таблице 3.

10

Таблица 3.				
	Контроль	Комплексный препарат биологически активных соединений		
		100 (нг/мл)	10 (нг/мл)	1 (нг/мл)
Гипердиплоидные	29,79	32,58	36,35	28,35
Диплоидные	30,72	27,86	24,24	25,88
Апоптоз	16,04	17,77	19,99	14,13
Некроз	23,82	22,24	27,82	23,99

15 Таким образом, заявленный комплексный препарат биологически активных соединений проявляет гиполипидемическую активность, которая проявляется в снижении содержания в крови животных общего холестерина, триглицеридов, нормализации соотношения ЛПВП и ЛПНП, и противоопухолевую активность, индуцируя апоптоз трансформированных лимфоидных клеток линии Yurkat, при этом обладая свойством длительного действия при низкой концентрации.

20

#### Формула изобретения

25 Штамм *Lecanicillium* sp. 347A, депонирован в Коллекции культур микроорганизмов ГНЦА - продуцент комплекса биологически активных соединений, проявляющих гиполипидемическую и противоопухолевую активность и обладающих пролонгирующим действием при низких концентрациях.

30

35

40

45

50