



(51) МПК
C12N 1/20 (2006.01)
C07K 2/00 (2006.01)
C12P 21/00 (2006.01)
C12R 1/44 (2006.01)

**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
 ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2010105633/10, 16.02.2010

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
 16.02.2010

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 16.02.2010

(45) Опубликовано: 10.09.2011 Бюл. № 25

(56) Список документов, цитированных в отчете о
 поиске: RU 2200195 C2, 10.03.2003. US 6043219 A,
 28.03.2000. WO 9718708 A1, 29.05.1997.

**Использование результатов научных
 разработок за 2007 г. Биологические науки.
 Отчет о научной и научно-организационной
 деятельности за 2007 г. Часть 1, 30.07.2008.**

Найдено в Интернете: <http:

**//www.uran.ru/resultats/presid/2007/ursr_bs/ursr_b
 s2007.htm>. NAVARATNA (см. прод.)**

Адрес для переписки:

614081, г.Пермь, ул. Голева, 13, ИЭГМ УрО
 РАН

(72) Автор(ы):

**Коробов Владимир Павлович (RU),
 Лемкина Лариса Марковна (RU),
 Полудова Татьяна Вячеславовна (RU)**

(73) Патентообладатель(и):

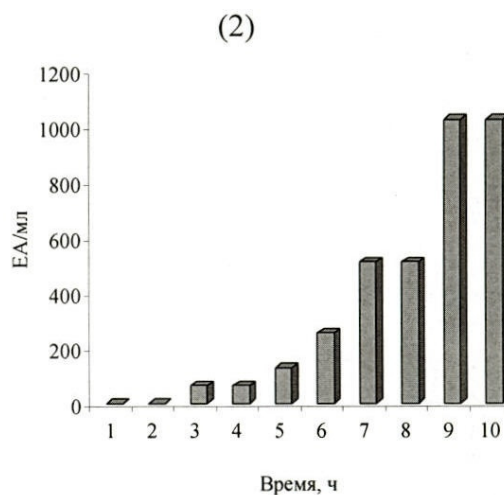
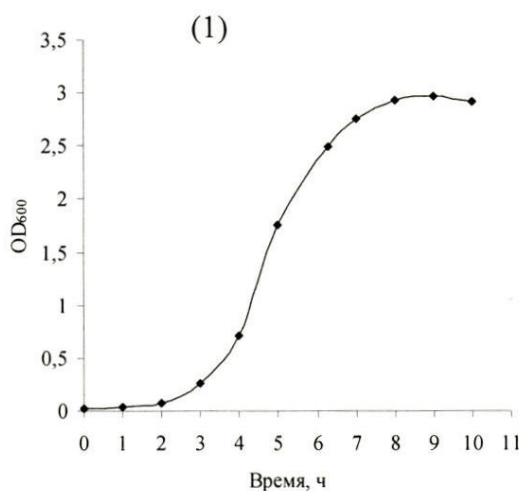
**Институт экологии и генетики
 микроорганизмов УрО РАН (RU)**

**(54) ШТАММ STAPHYLOCOCCUS HOMOINIS KLP-1 - ПРОДУЦЕНТ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ
 ПЕПТИДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ, ИНГИБИРУЮЩИХ РАЗВИТИЕ ГРАМПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ
 БАКТЕРИЙ**

(57) Реферат:

Штамм *Staphylococcus hominis* KLP-1 выделен из клинического материала при проведении скрининга штаммов коагулазонегативных стафилококков на способность к продукции низкомолекулярных антибактериальных пептидов. Штамм депонирован в коллекции ГНИИСКМПБ им. Тарасевича под номером 284. При культивировании на жидкой питательной среде штамм характеризуется повышенным выходом

низкомолекулярных пептидных антибактериальных соединений, ингибирующих рост грамположительных бактерий. Антибактериальное действие проявляется в отношении бактерий следующих родов: *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Enterococcus*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*. Выход низкомолекулярных антибактериальных пептидов составляет 1024000 ЕА на 1 л среды. 1 ил., 1 табл.



Кривая роста (1) и динамика продукции антибактериальных пептидов (2)
Staphylococcus hominis KLP-1

(56) (продолжение):

M.A.D.B. ET AL. Two-component anti-*Staphylococcus aureus* lantibiotic activity produced by *Staphylococcus aureus* C55. // *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, v.64, №12, pp.4803-4808. SAHL H.G. ET AL. Mode of action of the staphylococcinlike peptide Pep5: voltage-dependent depolarization of bacterial and artificial membranes. // *Journal of Bacteriology*, 1988, v.170, №1, pp.84-88.

RU 2 4 2 8 4 7 0 C 1

RU 2 4 2 8 4 7 0 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.
C12N 1/20 (2006.01)
C07K 2/00 (2006.01)
C12P 21/00 (2006.01)
C12R 1/44 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION(21)(22) Application: **2010105633/10, 16.02.2010**(24) Effective date for property rights:
16.02.2010

Priority:

(22) Date of filing: **16.02.2010**(45) Date of publication: **10.09.2011 Bull. 25**

Mail address:

614081, g.Perm', ul. Goleva, 13, IEhGM UrO RAN

(72) Inventor(s):

**Korobov Vladimir Pavlovich (RU),
Lemkina Larisa Markovna (RU),
Poljudova Tat'jana Vjacheslavovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Institut ehkologii i genetiki mikroorganizmov
UrO RAN (RU)****(54) STAPHYLOCOCCUS HOMINIS KLP-1 STRAIN PRODUCING LOW-MOLECULAR PEPTIDE COMPOUNDS INHIBITING GRAM-POSITIVE BACTERIA DEVELOPMENT**

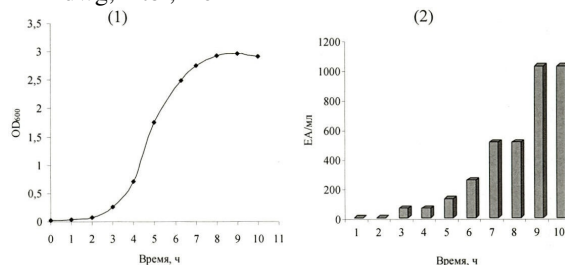
(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: *Staphylococcus hominis* KLP-1 strain is recovered from a clinical material in screening of coagulase-negative staphylococci strains for ability to produce low-molecular antibacterial peptides. The strain is deposited in Tarasevich State Research Institution of Standardisation and Control of Medical Biological Preparations, No. 284. The antibacterial action is shown concerning the bacteria of the following species: *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Enterococcus*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*. The low-molecular antibacterial peptide yield makes 1024000 EA in 1 l of the medium.

EFFECT: strain cultured on a nutrient fluid is characterised by higher yield of low-molecular peptide antibacterial compounds inhibiting gram-positive bacteria growth.

1 dwg, 1 tbl, 2 ex



Кривая роста (1) и динамика продукции антибактериальных пептидов (2) *Staphylococcus hominis* KLP-1

Изобретение относится к области биотехнологии, медицинской микробиологии и микробиологической промышленности и касается получения штамма *Staphylococcus hominis* KLP-1, продуцента низкомолекулярных пептидных соединений, ингибирующих развитие грамположительных микроорганизмов.

В культуральной жидкости *Staphylococcus hominis* KLP-1 обнаружена антибактериальная активность, подавляющая развитие *Staphylococcus epidermidis* 33 и других грамположительных бактерий. Установлено, что антибактериальная активность обусловлена наличием двух низкомолекулярных пептидов, не нуждающихся в синергидном дополнении друг друга для проявления активности. Вместе с тем, антибактериальная активность при совместном действии пептидов значительно повышается.

Продукция микроорганизмами биологически активных соединений в окружающую среду хорошо известна и давно используется в практических целях. Особое место среди биологически активных микробных метаболитов принадлежит белковым антибактериальным веществам - бактериоцинам, которые являются орудиями антагонистических реакций в бактериальных системах (Papagianni M. Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function, and applications. *Biotechnology Advances*. 2003. №21. P. 465-499).

В настоящее время внимание исследователей привлечено к группе низкомолекулярных пептидов, не оказывающих влияния на клетки продуцирующего их штамма, но вызывающих подавление роста и гибель клеток других видов микробов этого рода, а также бактерий других родов и семейств. Данный факт позволяет рассматривать низкомолекулярные антибактериальные пептиды в качестве природных антибиотиков нового поколения, перспективных для борьбы с возбудителями бактериальной группы инфекционных заболеваний человека и животных (Nascimento J.S. et al. Bacteriocins as alternative agents for control of multiresistant staphylococcal strains. *Letters in Applied Microbiology*. 2006. V.42. P. 215-221).

Выделение антибактериальных соединений является известным признаком для некоторых видов бактерий рода *Staphylococcus*.

В литературе описаны штаммы стафилококков, которые могут представлять интерес для биотехнологического получения антибактериальных пептидов в коммерческих целях.

Известен штамм *S. epidermidis* 5, секретирующий низкомолекулярное пептидное соединение Pep 5, спектр антибактериальной активности которого ограничен представителями других видов рода *Staphylococcus* и некоторыми видами рода *Micrococcus* (Sahl H.G. and Brandis H. Mode of action of the staphylococcin-like peptide Pep5 and culture conditions effecting its activity. *Zentralbl. Bacteriol. Mikrobiol. Hyg.* 1982. V.252, №2. P.166-175).

Наиболее близким аналогом по совокупности существенных признаков и достигаемому результату является продуцируемый *S. aureus* C55 стафилококцин C55 - бактериоцин, в состав которого входят два лантионинсодержащих пептида с молекулярными массами 3339 Да и 2993 Да, проявляющих синергизм действия (Navarata M.A. et al., Two-component anti-*Staphylococcus aureus* lantibiotic activity produced by *Staphylococcus aureus* C55. *Appl Environ Microbiol.* 1998. V.64, №12. P.4803-4808).

Таким образом, представленные известные штаммы обладают сравнительно узким спектром антибактериального действия.

Задачей, на решение которой направлено заявляемое изобретение, является

получение нового штамма микроорганизмов-продуцентов высокоактивных низкомолекулярных пептидных соединений широкого спектра антибактериального действия.

5 Технический результат, который может быть получен при осуществлении изобретения, заключается в повышенном выходе целевого высокоактивного соединения широкого спектра антибактериального действия при культивировании продуцента на богатой питательной среде.

10 Сущность изобретения - штамм *Staphylococcus hominis* KLP-1, секретирующий при культивировании на жидкой питательной среде повышенные количества низкомолекулярных пептидных антибактериальных соединений, ингибирующих рост грамположительных микроорганизмов различных родов и семейств.

15 Штамм *Staphylococcus hominis* KLP-1 выделен в 2006 году из клинического материала при проведении скрининга штаммов коагулазонегативных стафилококков на способность к продукции низкомолекулярных антибактериальных пептидов.

20 Штамм депонирован в коллекции Государственного научно-исследовательского института стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А.Тарасевича под номером 284 как продуцент низкомолекулярных антибактериальных пептидов широкого спектра действия, отличающийся от известных штаммов значительно более высоким уровнем продукции указанных соединений при периодическом культивировании.

25 Условия хранения: в лиофилизированном состоянии (коллекция ГНИИСКМБП им. Тарасевича), на агаризованной питательной среде Muller-Hinton (МН) (Atlas R.M. Microbiological Media. Florida. CRC Press. 1993. 1079 p.) под вазелиновым маслом (в рабочих коллекциях лабораторий).

30 Штамм *Staphylococcus hominis* KLP-1 характеризуется следующими культурально-морфологическими и физиолого-биохимическими свойствами: бактерии представляют собой клетки сферической формы, диаметр 0,5-1,2 мкм; грамположительные, неподвижные, не образующие спор. В фиксированных мазках расположены одиночно, парами, тетрадами и, преимущественно, скоплениями в виде типичных виноградных гроздьев. Хорошо растут на LB-агаре, на агаре Muller Hinton (МН) и жидких питательных средах LB и среде, разработанной в лаборатории авторов (патент на изобретение РФ №2274654).

35 Рост на агаризованной среде.

40 При высеве со скошенного агара штрихом растут в виде гладких с ровными краями круглых молочно-белых колоний, размер которых в аэробных условиях при 37°C через 24 ч составляет 1,2-1,5 мм, через 48 ч 1,7-1,9 мм и через 72 ч 2,0-2,2 мм. Колонии легко снимаются с поверхности агара микробиологической петлей.

Рост на жидкой среде.

45 При инокулировании среды жидкой культурой в условиях перемешивания наблюдается быстрый рост в виде гомогенной взвеси, при отстаивании которой бактериальные клетки равномерно оседают на дно сосуда и легко переходят во взвешенное состояние при встряхивании. Оптическая плотность гомогенной жидкой суточной культуры, выращенной в колбах на 250 мл с объемом среды 50 мл при 37°C на термостатируемом шейкере Certomat («Sartorius», Германия) при 150 об/мин, достигает 2,7-3,2 (детектор - спектрофотометр PD-303, длина волны 600 нм, кювета с длиной оптического пути 10 мм). На всех средах в присутствии 10-15% NaCl 50 наблюдается интенсивный рост.

Клетки быстро лизируются под действием лизоцифа, но малочувствительны к

действию лизоцима.

Биохимические признаки.

Оксидазоотрицательны. Образуют кислоту при окислении в аэробных условиях сахарозы, мальтозы, трегалозы, лактозы, галактозы и фруктозы.

5 Обладают нитратредуктазой, не образуют ацетона, не вызывают гемолиза и не коагулируют кроличью сыворотку; не обладают щелочной фосфатазой, чувствительны к новобиоцину.

10 Сопоставление перечисленных физиолого-биохимических особенностей выделенного штамма с дифференцирующими признаками видов и подвидов рода *Staphylococcus*, приведенными в «Определителе бактерий Берджи» (1997), а также в перечне биологических признаков видов и подвидов рода *Staphylococcus*, наиболее важных для идентификации различных видов по схеме видовой классификации коагулазонегативных стафилококков, предложенной А.К.Акатовым и В.С.Зуевой

15 (Акатов, Зуева. Стафилококки. 1983. М.: «Медицина», 254 с.), позволяет идентифицировать его в качестве одного из штаммов вида *Staphylococcus hominis*.

Продукт, синтезируемый штаммом:

20 При периодическом культивировании выделенного штамма *Staphylococcus hominis* KLP-1 на жидкой питательной среде, разработанной в лаборатории авторов, клетки выделяют в окружающую среду соединения, ингибирующие рост ряда грамположительных микроорганизмов родов: *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Enterococcus*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*.

25 Антибактериальное действие супернатанта культуры *Staphylococcus hominis* KLP-1 проявляется при внесении его в среду роста бактерий *S. epidermidis* 33. Ингибирующая активность сохраняется после 60 мин кипячения супернатантов. Обработка супернатантов нуклеазами - ДНК-азой и РНК-азой не оказывает влияния на их антибактериальное действие. После протеолиза трипсином, пепсином и протеиназой К

30 антибактериальная активность в супернатантах культуры-продуцента полностью исчезает. При ультрафильтрации в системе Centricon-3 (3 кДа, «Amicon») антибактериальная активность препаратов полностью обнаруживается в ультрафильтрате. Представленные факты подтверждают пептидную природу фактора, обладающего молекулярной массой не более 3000 Да.

35 Продуктивность штамма:

Продуктивность штамма исследована на среде, разработанной в лаборатории авторов (патент на изобретение РФ №2274654) путем изучения динамики количества выделяемого продуцентом антибактериального пептида, ингибирующего развитие

40 тест-бактерий *Staphylococcus epidermidis* 33. Выделение антибактериальной активности в среду происходит во время экспоненциального роста культуры. Типичным является проявление ингибирующего действия фильтратов среды роста в разведении 1:1024 при оптической плотности культуры 2,6-2,8.

45 Способ определения антибактериальной активности в супернатантах культуры *Staphylococcus hominis* KLP-1:

50 Определение антибактериальной активности в аликвотах среды культивирования проводили в иммунологических планшетах, используя принцип двукратных разведений аликвот сред роста. В лунки планшета вносили по 100 мкл жидкой среды МН. В первую лунку ряда добавляли 100 мкл исследуемого супернатанта, стерилизованного кипячением на водяной бане в течение 10 мин. Путем последовательного переноса 100 мкл содержимого первой лунки ряда в последующие готовили серию двукратных разведений от 1:2 до 1:4096. Затем в каждую лунку

планшета вносили по 10 мкл суспензии клеток тест-культуры *S. epidermidis* 33, содержащей 10^6 КОЕ/мл. Эффективность ингибирующего действия оценивали через 16-18 ч инкубации планшетов при 37°C. За условную единицу активности антибактериального фактора принимали обратную величину максимального разведения, при котором наблюдалось полное торможение роста тест-бактерий, и выражали ее в единицах активности (ЕА)/мл.

Способ, условия и состав сред для хранения штамма: В лабораторных условиях штамм хранится на скошенном МН-агаре, после посева петлей жидкого инокулума.

Пересев на свежий МН-агар осуществляется каждые 3 месяца.

Для лиофилизации клеток штамма в качестве криопротектора использован сахарозо-желатиновый агар, содержащий 10% сахарозы, 1,5% желатины и 0,1% агара. Исследование продукции антибактериального пептида штаммом после лиофилизации показало полное сохранение этого признака при росте на жидкой питательной среде.

Отношение к фагам: чувствительность бактерий данного штамма к фагам исследована в филиале ФГУП «Микроген» НПО «Биомед» (г.Пермь). Штамм *S. hominis* KLP-1 лизируется типовыми фагами I, II, III, V групп и внегрупповыми фагами, а также специфическим бактериофагом в титре 10^{-3} по методу Грациа.

Генетические особенности: Антибиотикочувствительность штамма исследована традиционным методом с использованием стандартных дисков, содержащих различные по механизму действия антибиотики. Учет зон торможения роста бактериального газона проводили через 18 ч.

Средний диаметр зон подавления роста в мм:

Ампициллин - 15; оксациллин - 18; гентамицин - 9; левомицетин - 10; линкомицин - 32; рифампицин - 36; тетрациклин - 16; фузидин - 28; эритромицин - 10; цефалексин - 23; ципрофлоксацин - 26; ванкомицин - 18.

Возможность использования изобретения иллюстрируется примерами, которые не ограничивают объем и сущность притязаний, связанных с ними.

Пример 1.

При культивировании продуцента *Staphylococcus hominis* KLP-1 на жидкой питательной среде, разработанной в лаборатории авторов (г/л дистиллированной воды: казаминовые кислоты - 10 г, дрожжевой экстракт - 5 г, калий фосфорнокислый двузамещенный - 7 г, магний сернокислый - 0,1 г, натрий лимоннокислый 2-водный - 0,5 г, аммоний сернокислый - 2 г, глюкоза - 0,2%), при перемешивании и температуре 37°C выделение антибактериальных соединений начинается, как это представлено на чертеже, в начале логарифмической стадии роста и достигает максимума через 8-9 ч роста к началу стационарной стадии развития культуры.

Пример 2.

Антибактериальное действие супернатантов среды культивирования *Staphylococcus hominis* KLP-1 представлено в таблице 1.

Таким образом, полученный штамм является продуцентом низкомолекулярных пептидных соединений, проявляющих антибактериальную активность в отношении широкого спектра грамположительных микроорганизмов. Штамм характеризуется высоким уровнем продукции этих соединений, достигающим 1024000 ЕА на 1 л среды при культивировании на жидкой питательной среде.

Формула изобретения

Штамм *Staphylococcus hominis* KLP-1, депонированный в коллекции ГНИИСКМПБ им. Тарасевича под номером 284, - продуцент низкомолекулярных пептидных

соединений, ингибирующих развитие грамположительных бактерий.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50