



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2009148354/10, 25.12.2009

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
25.12.2009

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 25.12.2009

(45) Опубликовано: 10.05.2011 Бюл. № 13

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: US 20060057157 A, 16.03.2006.

**АВТОНОМОВА А.В.,
КРАСНОПОЛЬСКАЯ Л.М., МАКСИМОВ
В.Н. Оптимизация состава питательной
среды для погружного
культивирования *Galoderma lucidum* (Curt.:Fr)
P.Karst. Микробиология, 2006, т.75, №2, с.186-
192. СЫЧЕВ П.А., ТКАЧЕНКО Н.П.
Особенности физиологии роста и
макроморфогенеза штаммов съедобного
лекарственного гриба (см. прод.)**

Адрес для переписки:

117393, Москва, ул. Архитектора Власова,
45, кв.95, Л.М. Краснопольской

(72) Автор(ы):

**Краснопольская Лариса Михайловна (RU),
Автономова Анастасия Витальевна (RU),
Бухман Владимир Михайлович (RU),
Леонтьева Мария Ильинична (RU),
Соболева Наталия Юрьевна (RU)**

(73) Патентообладатель(и):

**Краснопольская Лариса Михайловна (RU),
Автономова Анастасия Витальевна (RU),
Бухман Владимир Михайлович (RU),
Леонтьева Мария Ильинична (RU),
Соболева Наталия Юрьевна (RU)**

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ СРЕДСТВА, ОБЛАДАЮЩЕГО ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ
АКТИВНОСТЬЮ, И СРЕДСТВО, ОБЛАДАЮЩЕЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТЬЮ

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к биотехнологии. Способ включает приготовление посевного мицелия базидиомицетов, приготовление производственной питательной среды и засев производственной питательной среды, содержащей источники углевода, азота, минеральные соли, приготовленным посевным мицелием, культивирование базидиомицета с последующим получением погружной культуры. Приготовление посевного мицелия осуществляют на стерильной питательной среде, содержащей глюкозу, соевую муку, дигидрофосфат калия, сульфат магния и

арахионовую кислоту. Выращивание посевного мицелия осуществляют при температуре 22-29°C в течение 2-6 суток при аэрации с последующей его гомогенизацией. Полученное противоопухолевое средство из погруженной культуры базидиомицета является эффективным, а длительность процесса культивирования сокращается с 2-3 недель до одной, увеличивается выход мицелия за счет разработки состава производственной питательной среды, условий культивирования, а также за счет подбора состава среды для получения посевного мицелия. 2 н. и 21 з.п. ф-лы, 6 табл.

(56) (продолжение):

сиитаке *Lentinus edodes* Berk (компоненты питательных сред и субстратов для культивирования)
Успехи медицинской микологии. Материалы II Всероссийского конгресса по медицинской
микологии. М.: 2004, т. III, с. 309-310. UA 36655 A, 16.04.2001. RU 2082755 C1, 27.06.1997.

R U 2 4 1 8 0 6 2 C 1

R U 2 4 1 8 0 6 2 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.
C12N 1/14 (2006.01)
A61K 36/07 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: **2009148354/10, 25.12.2009**

(24) Effective date for property rights:
25.12.2009

Priority:

(22) Date of filing: **25.12.2009**

(45) Date of publication: **10.05.2011 Bull. 13**

Mail address:

**117393, Moskva, ul. Arkhitekтора Vlasova, 45,
kv.95, L.M. Krasnopol'skoj**

(72) Inventor(s):

**Krasnopol'skaja Larisa Mikhajlovna (RU),
Avtonomova Anastasija Vital'evna (RU),
Bukhman Vladimir Mikhajlovich (RU),
Leont'eva Marija Il'inichna (RU),
Soboleva Natalija Jur'evna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Krasnopol'skaja Larisa Mikhajlovna (RU),
Avtonomova Anastasija Vital'evna (RU),
Bukhman Vladimir Mikhajlovich (RU),
Leont'eva Marija Il'inichna (RU),
Soboleva Natalija Jur'evna (RU)**

(54) METHOD FOR PRODUCTION OF REMEDY WITH ANTINEOPLASTIC ACTIVITY AND REMEDY WITH ANTINEOPLASTIC ACTIVITY

(57) Abstract:

FIELD: food industry.

SUBSTANCE: method involves preparation of inoculation mycelium of basidiomycetes, preparation of productive nutrient medium and inoculation of the productive nutrient medium, containing carbohydrate and nitrogen source and mineral salts, with the prepared inoculation mycelium. Basidiomycetes cultivation with subsequent production of an immersion culture. The inoculation mycelium preparation is performed in a sterile nutrient medium

containing glucose, soya flour, potassium dihydrogen phosphate, magnesium sulphate and arachidonic acid. The inoculation mycelium growing is performed at a temperature of 22-29°C during 2-6 days under aeration conditions with its subsequent homogenisation.

EFFECT: antineoplastic remedy produced from the basidiomycetes immersion culture is effective and the cultivation process duration is reduced from 2-3 weeks to one week; mycelium yield increases.

23 cl, 6 tbl, 12 ex

RU 2 4 1 8 0 6 2 C 1

RU 2 4 1 8 0 6 2 C 1

Группа изобретений относится к области биотехнологии и может быть использована для получения средства, обладающего противоопухолевой активностью, путем культивирования базидиомицетов в погруженной культуре.

5 Известно, что метаболиты многих видов базидиомицетов обладают лечебными свойствами, в частности противоопухолевым действием, включающим прямое ингибирующее действие на пролиферацию и рост клеток опухоли, повышение
10 противоопухолевого иммунитета, антиканцерогенное действие, а также антиоксидантным, противовирусным, гепатопротекторным и иммуномоделирующим действием. В последние годы в России, США, Китае, Японии, Корее ведутся работы по получению лекарственных средств на основе базидиомицетов. Создание новых
15 лекарственных препаратов сдерживается сложной дорогостоящей технологией выращивания базидиомицетов и выделения из них веществ, обладающих стабильными биологическими свойствами, в частности противоопухолевыми.

Образование базидиомицетами ценных для фармакологии веществ зависит как от используемых видов базидиомицетов, так и от технологии их культивирования (приготовление посевного материала, условия культивирования), а также процессов
20 выделения метаболитов.

Для лечения онкологических заболеваний используют химические вещества, такие как цитостатики, проявляющие высокую токсичность, что ограничивает их
25 применение.

Токсичность противоопухолевых средств, полученных из съедобных или несъедобных (неядовитых) базидиомицетов, по литературным данным или
30 отсутствует, или очень низкая (Chang & But, 1986, Su et al., 1987).

В настоящее время большое внимание уделяется разработке технологии культивирования базидиомицетов с целью получения максимального количества мицелия при культивировании в возможно короткий срок и методам выделения
35 противоопухолевых средств.

Известен способ получения средства, обладающего противоопухолевой активностью, из мицелия гриба *Ganoderma lucidum*. Мицелий получают путем культивирования *Ganoderma lucidum* в погруженной культуре на питательной среде, содержащей 50 г глюкозы, 20 г пептона, 0,87 г дигидрофосфата калия, 0,5 г сульфата
40 магния, 10 г хлорида железа (II), 7 г хлорида марганца, 10 г сульфата цинка, 4 мг хлорида цинка на 1 л воды, рН среды 5,5.

Предварительно готовят посевной мицелий. Для этого указанный гриб культивируют при 180 об/мин, 25°C в течение 10 суток. Полученную культуру
45 пересевают в свежую питательную среду в количестве 5% и вновь культивируют в течение 10 суток. Мицелий отделяют от культуральной жидкости и из него выделяют протеогликан G009 - средство, обладающее противоопухолевой активностью, очищают его и определяют противоопухолевую активность в отношении саркомы 180, привитой самцам мышей (RU 2082755 C1, 19.08.1997).

Недостатком описанного способа является длительный процесс приготовления посевного мицелия (до 20 суток), продолжительный процесс культивирования гриба (7
50 суток) и сложный процесс выделения средства, обладающего противоопухолевой активностью.

Известен способ получения препарата, влияющего на тканевый обмен, в том числе обладающего противоопухолевой активностью, предусматривающий глубинное культивирование гриба *Pleurotus ostreatus* 1137 (ВКПМ-F 819) в колбах на среде, содержащей пивное сусло 0,65° Б, при 26-28°C на роторной качалке с 200 об/мин,

длительность процесса до 24 суток, с последующим отделением мицелия от нативного раствора центрифугированием и выделением биологически активных веществ из мицелия экстракцией этанолом при нейтральном или кислом значениях pH. Экстракты упаривают в вакууме до сухого остатка. Сухой остаток растворяют в водном растворе этанола. Полученные фракции используют для биологических испытаний. Противопухоловую активность полученного средства исследуют на мышах с трансплантированным асцитным раком молочной железы при однократном введении химических противопухоловых средств - цитостатиков. Препарат, полученный вышеописанным способом, вводят в дозе 100 мг/кг через 2 часа после трансплантации опухоли, а затем в той же дозе в течение 9 суток ежедневно. Средняя продолжительность жизни животных составила $30,8 \pm 0,8$ суток, а в контроле - $18,0 \pm 0,8$ суток, т.е. на 71% больше, чем в контроле (RU 2192873 C1, 20.11.2002).

Недостатком описанного способа является длительность процесса культивирования гриба, а также проведение исследования противопухоловой активности на фоне цитостатиков - токсичных веществ, в связи с чем невозможно судить о самостоятельной противопухоловой эффективности полученных средств.

Известен способ получения средства, обладающего противопухоловой активностью, из мицелия базидиомицетов, выбранных из группы *Ganoderma lucidum*, *Hypsizyugus ulmarius*, *Kuhneromyces mutabilis*, *Omphalotus olearis*, *Panus conchatus*, *Piptoporus betulinus*, *Pleurotus eryngii*, *Trametes zonata*.

Базидиомицеты вначале выращивают на агаровой среде при 27°C , а затем пересевают на жидкую среду и культивируют в погруженной культуре при 27°C , 180 об/мин в течение 2-3 недель. Среда содержит 2% глюкозы, 0,1% пептона, 0,1% дрожжевого экстракта, 0,1% дигидрофосфата калия, 0,1% сульфата магния и микроэлементы (сульфат железа (II), сульфат марганца, сульфат цинка, сульфат меди). Из погруженной культуры выделяют мицелий, высушивают и из сухого мицелия экстрагируют средство, обладающее противопухоловой активностью. В качестве экстрагента используют метанол, этанол, ацетонитрил, этилацетат, хлороформ, дихлорметан или их смеси (US 20060057157, 16.03.2006).

Недостатком описанного способа получения средства, обладающего противопухоловой активностью, является длительное культивирование базидиомицетов (2-3 недели), использование для получения противопухолового средства только отделенного от культуральной жидкости и высушенного мицелия и низкая эффективность полученного средства в системе *in vitro*. В системе *in vivo* полученное средство испытано не было.

Задачей, на решение которой направлена группа изобретений, является сокращение длительности процесса культивирования базидиомицетов, повышение выхода мицелия и получение более эффективного противопухолового средства.

Поставленная задача решается за счет того, что в способе получения средства, обладающего противопухоловой активностью, включающем приготовление посевного мицелия базидиомицета, приготовление стерильной производственной питательной среды, засев производственной питательной среды, содержащей источники углерода, азота, минеральные соли, приготовленным посевным мицелием, культивирование базидиомицета с последующим получением погруженной культуры, согласно изобретению, приготовление посевного мицелия осуществляют на стерильной жидкой питательной среде, содержащей (г/л воды): глюкозу - 18,0-22,0, соевую муку - 8,0-12,0, дигидрофосфат калия - 2,0-3,0, сульфат магния - 0,2-0,4 и арахионовую кислоту - $1,0-5,0 \times 10^{-5}$, выращивание посевного материала проводят при

температуре 22-29° С в течение 2-6 суток при аэрации, при этом готовый посевной мицелий гомогенизируют.

Соевая мука может быть использована как генетически модифицированных, так и не модифицированных сортов сои.

5 Гомогенизацию готового посевного материала можно осуществлять как перед засевом производственной питательной среды в гомогенизаторе в течение 2-5 минут, так и в процессе засева непосредственно в биореакторе при включенной мешалке на 300-500 об/мин в течение 0,5-6 минут.

10 Для культивирования следует использовать базидиомицет, выбранный из группы *Armillaria mellea* (Fr.) Karst., *Flammulina velutipes* (Curt.:Fr.) Singer, *Hericium erinaceus* (Bull.:Fr.) Pers., *Hypsizygos marmareus* (Peck) H.E.Bigelow, *Hypsizygos tessulatus* (Bulliard:Fr.) Singer, *Lentinus edodes* (Berk.) Singer, *Lyophyllum shimeji* (Kawam.) Hongo, *Pleurotus djamor* (Rumphius ex Fries) Boedjin, *Pleurotus ostreatus* (Jacq.:Fr.) Kumm.

15 При культивировании базидиомицета *Armillaria mellea* в производственную питательную среду следует вводить (г/л воды): растительное масло в количестве 15,0-18,0, соевую муку - 18,0-20,0, дигидрофосфат калия - 0,5-2,5, сульфат магния - 0,05-0,26, культивирование осуществлять при температуре 24-28° С в течение 4,5-5,5 суток.

20 При культивировании базидиомицета *Flammulina velutipes* в производственную питательную среду следует вводить (г/л воды): растительное масло в количестве 19,0-27,0, соевую муку в количестве 19,0-27,0, дигидрофосфат калия - 1,4-3,0, сульфат магния - 0,14-0,30, культивирование осуществлять при температуре 20-28° С в течение 5,5-6,5 суток.

25 При культивировании базидиомицета *Hericium erinaceus* в производственную питательную среду рекомендуется вводить (г/л воды): растительное масло и соевую муку в количествах, соответственно равных 10,0-27,0 и 20,0-25,0, дигидрофосфат калия вводить в количестве 2,0-3,3, сульфат магния - 0,2-0,3, культивирование осуществлять при температуре 24-32° С в течение 5,5-6,5 суток. В указанную производственную среду для культивирования *Hericium erinaceus* можно дополнительно вводить мелассу в количестве 1-40 г/л среды.

30 При культивировании базидиомицета *Hypsizygos marmareus* в производственную питательную среду целесообразно вводить (г/л воды): растительное масло в количестве 20,0-24,0, соевую муку в количестве 16,0-22,0, дигидрофосфат калия - 1,5-3,0, сульфат магния - 0,2-0,3, культивирование осуществлять при температуре 24-31° С в течение 5,5-6,5 суток.

40 При культивировании базидиомицета *Hypsizygos tessulatus* в производственную среду следует вводить (г/л воды): растительное масло в количестве 18,0-25,0, соевую муку - 20,0-28,0, дигидрофосфат калия - 1,6-2,6, сульфат магния - 0,2-0,3, культивирование осуществлять при температуре 24-33° С в течение 6,5-7,5 суток.

45 При культивировании базидиомицета *Lentinus edodes* в производственную питательную среду целесообразно вводить (г/л воды): растительное масло и соевую муку в количествах, соответственно равных 12,0-16,0 и 18,0-24,0, дополнительно вводить источник углерода в виде глюкозы в количестве 8-12, вводить дигидрофосфат калия в количестве 1,3-2,6, сульфат магния - 0,2-0,3, культивирование осуществлять при температуре 24-30° С в течение 5,5-6,5 суток.

50 При культивировании базидиомицета *Lyophyllum shimeji* в производственную питательную среду следует вводить (г/л воды): растительное масло в количестве 16,0-22,0, соевую муку - 18,0-25,0, дигидрофосфат калия - 2,0-3,0, сульфат магния - 0,2-0,3, культивирование осуществлять при температуре 24-34° С в течение 3,5-4,5 суток.

При культивировании базидиомицета *Pleurotus djamor* в производственную среду следует вводить (г/л воды): растительное масло в количестве 15,0-20,0, соевую муку - 15,0-21,0, дигидрофосфат калия - 2,0-3,3, сульфат магния - 0,2-0,3, культивирование осуществлять при температуре 26-35°C в течение 2,5-3,5 суток.

При культивировании базидиомицета *Pleurotus ostreatus* в производственную питательную среду целесообразно вводить (г/л воды): растительное масло в количестве 14,0-20,0, соевую муку - 11,0-19,0, дигидрофосфат калия - 2,0-3,0, сульфат магния - 0,2-0,3, культивирование осуществлять при температуре 24-28°C в течение 2,5-3,5 суток.

В качестве растительного масла в производственных питательных средах для культивирования *Armillaria mellea*, *Flammulina velutipes*, *Hericiium erinaceus*, *Hypsizyugus marmareus*, *Hypsizyugus tessulatus*, *Lentinus edodes*, *Lyophyllum shimeji*, *Pleurotus djamor*, *Pleurotus ostreatus* могут быть использованы подсолнечное, оливковое, соевое, льняное, арахисовое масла или их смеси.

Введение в состав производственных питательных сред растительного масла в заявленном количестве способствует не только сокращению длительности процесса культивирования и повышению выхода мицелия, но и снижает процесс пенообразования в процессе культивирования.

После культивирования базидиомицета полученную погруженную культуру следует подвергать сублимационной сушке, затем сухой мицелий измельчать и использовать в качестве противоопухолевого средства.

После культивирования базидиомицета полученную погруженную культуру можно автоклавировать при 1,2-1,5 атм в течение 1,5-3 часов, отделять жидкую фазу фильтрованием и использовать в качестве противоопухолевого средства.

Для получения противоопухолевого средства после культивирования базидиомицета можно отделять мицелий из погруженной культуры фильтрованием, экстрагировать его дистиллированной водой в соотношении 90-360 г/л воды в процессе автоклавирования при 1,2-1,5 атм в течение 1,5-2,5 часов, отделенный водный экстракт использовать в качестве целевого средства.

После культивирования из погруженной культуры целесообразно отделять мицелий базидиомицета и проводить экстракцию этанолом в соотношении 90-360 г/100 мл экстрагента в течение 0,5-1,5 часов при перемешивании, полученный этанольный экстракт отделять от остатков мицелия, упаривать до сухого остатка на испарителе, а остаток мицелия заливать дистиллированной водой в соотношении 90-360 г/л, автоклавировать при 1,2-1,5 атм в течение 1,5-2,5 часов, полученный водный экстракт отделять и объединять с сухим остатком этанольного экстракта и полученную смесь использовать в качестве противоопухолевого средства.

После культивирования можно отделять из погруженной культуры мицелий базидиомицета, высушивать его при температуре 35-80°C, измельчать и использовать в качестве противоопухолевого средства.

Сухой измельченный мицелий базидиомицета следует подвергать экстрагированию кипящей дистиллированной водой в соотношении 18-72 г/л при 1,2-1,5 атм в течение 1,5-2,5 часов, затем водный экстракт отделять от остатков мицелия и использовать в качестве противоопухолевого средства.

Для увеличения срока хранения без снижения биологической активности водный экстракт мицелия базидиомицета может быть заморожен при температуре -18-70° С. Перед использованием в качестве противоопухолевого средства водный экстракт следует разморозить.

С той же целью водный экстракт мицелия базидиомицета может быть высушен на распылительной сушилке. Возможно использование как непосредственно сухого экстракта, так и его раствора в дистиллированной воде.

В водный экстракт мицелия базидиомицета можно добавлять 2-6 объемов этанола, выпавший осадок отделять, высушивать и использовать в качестве противоопухолевого средства.

Как следует из вышесказанного, противоопухолевое средство может быть использовано как в сухом порошкообразном виде, так и в жидком. К полученному противоопухолевому средству могут быть добавлены различные фармацевтические добавки, такие как витамины, микроэлементы, антиоксиданты, совместимые противоопухолевые средства.

Противоопухолевое средство может быть изготовлено в виде таблеток, капсул, напитка и может быть использовано как перорально, так и в виде микроклизм.

Дозировка противоопухолевого средства зависит от заболевания, возраста пациента, его веса, состава средства. В пересчете на содержание полисахаридов предпочтительная дозировка для лабораторных животных может быть 1-3 мг полисахаридов на кг массы, для человека - 0,08-0,25 мг/кг.

Технический результат заявленной группы изобретений заключается в увеличении выхода мицелия за счет разработки состава производственной среды, условий культивирования, подбора состава среды для получения посевного материала, в сокращении длительности процесса культивирования базидиомицета с 2-3 недель до 7,5 суток. Включение в состав производственной среды растительного масла не только повышает выход биомассы базидиомицета, но и препятствует пенообразованию среды в процессе культивирования базидиомицета. В совокупности разработанные способ культивирования базидиомицета и способ выделения противоопухолевого средства позволили получить эффективное средство, тормозящее рост опухоли в опытах *in vivo* до 94%.

Изобретение иллюстрируется нижеприведенными примерами, которые не охватывают весь объем притязаний, но и не ограничивают его.

Пример 1. Приготовление посевного мицелия базидиомицетов.

Готовили стерильные жидкие питательные среды, состав которых представлен в таблице 1, и засеивали мицелием базидиомицетов, выращенных на агаровой питательной среде.

Выращивание посевного мицелия осуществляли на ротационной качалке при температуре 22-29°C, скорости вращения качалки 180-220 об/мин в течение 2-6 суток. Условия культивирования базидиомицетов приведены в таблице 2.

Приготовленный посевной мицелий *Hericium erinaceus* штамм He-4, *Lentinus edodes* штамм Le-14, *Pleurotus ostreatus* штамм 447 гомогенизировали в процессе засева производственной среды в биореакторе при включенной мешалке на 500 об/мин в течение 0,5 минут.

Таблица 1.					
Составы сред для получения посевного мицелия базидиомицетов.					
Вид базидиомицета	Источники питания, г/л воды				
	Глюкоза	Соевая мука	KH ₂ PO ₄	MgSO ₄	Арахидоновая кислота
A.mellea	18	12	2,4	0,20	1,0×10 ⁻⁵
F.velutipes	22	8	2,5	0,24	3,0×10 ⁻⁵
H.erinaceus	19	10	3,0	0,4	5,0×10 ⁻⁵
H.marmareus	21	9	2,4	0,25	2,0×10 ⁻⁵

H.tessulatus	22	8,5	2,0	0,4	$4,5 \times 10^{-5}$
L.edodes	20	9	3,0	0,3	$4,0 \times 10^{-5}$
L.shimeji	21	9,5	2,5	0,24	$3,5 \times 10^{-5}$
P.djamor	19	10	2,0	0,3	$2,0 \times 10^{-5}$
P.ostreatus	22	9	2,5	0,4	$1,0 \times 10^{-5}$

Таблица 2.

Условия выращивания посевного мицелия базидиомицетов.			
Вид базидиомицета	Параметры культивирования		
	Скорость вращения мешалки, об/мин	Температура, °С	Длительность процесса, сут
A.mellea	220	25	4
F.velutipes	180	22	6
H.erinaceus	200	28	6
H.marmareus	220	25	3
H.tessulatus	220	25	3
L.edodes	220	25	6
L.shimeji	200	28	3
P.djamor	200	29	2
P.ostreatus	220	25	2

Пример 2. Погруженное культивирование базидиомицетов.

Для погруженного культивирования базидиомицетов готовили производственные среды, состав которых представлен в таблице 3. Производственные среды стерилизовали при 1,2 атм в течение 30 мин, охлаждали и засеивали посевным мицелием базидиомицетов, полученным по примеру 1.

Приготовленный посевной мицелий *Armillaria mellea* штамм Am-4, *Flammulina velutipes* штамм Fv-7, *Hypsizygus marmareus* штамм Hm-1, *Hypsizygus tessulatus* штамм Ht-1, *Lyophyllum shimeji* штамм Ls-2, *Pleurotus djamor* штамм Pd-3 гомогенизировали в гомогенизаторе в течение 4 минут перед засевом производственной среды, посевной мицелий *Hericium erinaceus*, *Lentinus edodes*, *Pleurotus ostreatus* гомогенизировали в процессе засева производственной среды в биореакторе при включенной мешалке на 500 об/мин в течение 0,5 минут.

Таблица 3.

Вид	Источники питания, г/л воды					
	Источники углерода			Источники азота	Минеральные соли	
	масло раст.	глюкоза	меласса	соевая мука	KH ₂ PO ₄	MgSO ₄
A.mellea	17	-	-	20	0,5	0,05
F.velutipes	27	-	-	27	2,4	0,24
H.erinaceus	10	-	30	22	2,8	0,28
H.erinaceus	27	-	-	25	3,3	0,30
H.marmareus	22	-	-	19	2,0	0,2
H.tessulatus	24	-	-	28	1,6	0,24
L.edodes	15	8	-	21	1,5	0,24
L.edodes	12	11	-	24	2,6	0,3
L.shimeji	20	-	-	23	2,6	0,26
P.djamor	18	-	-	18	2,6	0,26
P.ostreatus	15	-	-	11	2,4	0,24

Культивирование базидиомицетов *Armillaria mellea*, *Flammulina velutipes*, *Hypsizygus marmareus*, *Hypsizygus tessulatus*, *Lyophyllum shimeji*, *Pleurotus djamor* осуществляли в колбах на ротационной качалке при 200 об/мин. Базидиомицеты *Hericium erinaceus*,

Lentinus edodes, *Pleurotus ostreatus* выращивали в биореакторах с постоянно работающей мешалкой (200 об/мин) и подачей воздуха 1,5 об./об. в минуту.

Температурный режим и длительность процессов погруженного культивирования, а также выход воздушно-сухой биомассы (влажность 5-6%) представлены в таблице 4.

Контроль чистоты культур осуществляли с помощью световой микроскопии.

Фиксировали наличие на мицелии грибов пряжек, являющихся специфической морфологической структурой базидиомицетов, и отсутствие посторонней мико- и микробиоты.

Таблица 4.

Температурный режим, длительность процессов погруженного культивирования и выход воздушно-сухой биомассы базидиомицетов.

Вид	Температура культивирования, °С	Длительность процесса культивирования, сутки	Выход воздушно-сухой биомассы, г/л
<i>A.mellea</i>	24-26	4,5	20-22
<i>F.velutipes</i>	20-22	6,0	36-40
<i>H.erinaceus</i>	25-27	6,5	24-25
<i>H.marmareus</i>	24-26	5,5	27-29
<i>H.tessulatus</i>	24-26	7,5	18-21
<i>L.edodes</i>	24-26	6,0	20-21
<i>L.shimeji</i>	28-30	4,0	26-28
<i>P.djamor</i>	29-31	3,0	23-24
<i>P.ostreatus</i>	25-27	3,0	26-27

Пример 3. Получение средства, обладающего противоопухолевыми свойствами.

Получали погруженную культуру *Hericiium erinaceus* штамм He-4 по примеру 2 в биореакторе объемом 15 л (объем культуральной среды - 8 л). По окончании процесса культивирования погруженную культуру базидиомицета подвергали сублимационной сушке при профильном изменении температуры, включая многократное снижение температуры до минус 30°C, измельчали и использовали полученный сухой порошок в качестве противоопухолевого средства. Результаты оценки противоопухолевого действия средства представлены в таблице 5.

Пример 4. Получение средства, обладающего противоопухолевыми свойствами.

Получали погруженную культуру *Hypsizyugus marmareus* штамм Hm-1 по примеру 2. По окончании процесса погруженную культуру базидиомицета подвергали автоклавированию при 1,2-1,5 атм в течение 2 часов, отделяли жидкую фазу и использовали ее в качестве противоопухолевого средства. Результаты оценки противоопухолевого действия средства представлены в таблице 5.

Пример 5. Получение средства, обладающего противоопухолевыми свойствами.

Получали погруженную культуру *Lentinus edodes* штамм Le-14 по примеру 2, выращивая базидиомицет в биореакторе объемом 15 л с загрузкой 8 л производственной среды. По окончании погруженного культивирования мицелий отделяли фильтрованием. Сырой мицелий заливали дистиллированной водой в соотношении 100 г/л, автоклавировали при 1,5 атм в течение 2 часов. Полученный водный экстракт отделяли фильтрованием и использовали в качестве противоопухолевого средства. Результаты оценки противоопухолевого действия средства представлены в таблице 6.

Пример 6. Получение средств, обладающих противоопухолевыми свойствами.

Получали погруженные культуры *Hericiium erinaceus* штамм He-4 и *Lentinus edodes* штамм Le-14 по примеру 2, выращивая базидиомицеты в биореакторах объемом 15 л, содержащих по 9 л производственной среды. По окончании процессов выращивания мицелий отделяли фильтрованием. Навески сырой биомассы *Hericiium erinaceus*

и *Lentinus edodes* в количестве 150 и 300 г, соответственно, заливали 100 мл этанола, экстракцию проводили в течение 1 часа при перемешивании. Этанольные экстракты отделяли фильтрованием и упаривали до сухого остатка на вакуумном испарителе. Оставшиеся после экстракции этанолом порции мицелия *Hericium erinaceus* и *Lentinus edodes* заливали по 1 л дистиллированной воды и автоклавировали при 1,2 атм в течение 2,5 часов. Водные экстракты отделяли от мицелия фильтрованием, водный экстракт мицелия *Hericium erinaceus* объединяли с сухим остатком этанольного экстракта мицелия *Hericium erinaceus*. Водный экстракт мицелия *Lentinus edodes* - с этанольным экстрактом мицелия *Lentinus edodes*. Таким образом было получено 2 противоопухолевых средства. Результаты оценки противоопухолевого действия средств представлены в таблице 6.

Пример 7. Получение средств, обладающих противоопухолевыми свойствами.

Получали погруженные культуры *Flammulina velutipes* штамм Fv-7 и *Pleurotus ostreatus* штамм 447 по примеру 2, выращивая первый базидиомицет в колбах на качалке, а второй - в биореакторе общим объемом 15 л с 9 л производственной среды. По окончании процессов погруженного культивирования мицелий базидиомицетов отделяли фильтрованием, сушили при 60°C, измельчали и использовали в качестве противоопухолевых средств. Результаты оценки противоопухолевого действия средств представлены в таблице 5.

Пример 8. Получение средств, обладающих противоопухолевыми свойствами.

Выращивали погруженные культуры *Armillaria mellea* штамм Am-4, *Flammulina velutipes* штамм Fv-7, *Hypsizygus tessulatus* штамм Ht-1, *Lyophyllum shimeji* штамм Ls-2, *Pleurotus djamor* штамм Pd-3 и *Pleurotus ostreatus* штамм 447 согласно примеру 2, культивирование проводили в колбах на качалке. После окончания процессов погруженного культивирования мицелий базидиомицетов отделяли фильтрованием, сушили при 65°C и измельчали. Делали навески сухого измельченного мицелия базидиомицетов: *Armillaria mellea* - 6 г, *Flammulina velutipes* - 6 г, *Hypsizygus tessulatus* - 5 г, *Lyophyllum shimeji* - 10 г, *Pleurotus djamor* - 1,8 г, *Pleurotus ostreatus* - 3,6 г. Навески заливали 100 мл дистиллированной воды и экстрагировали в автоклаве при 1,2 атм в течение 2 часов. Водные экстракты отделяли фильтрованием и использовали в качестве противоопухолевых средств. Результаты оценки противоопухолевого действия полученных средств представлены в таблице 5.

Пример 9. Получение средств, обладающих противоопухолевыми свойствами.

Водный экстракт сухого измельченного мицелия *Armillaria mellea* штамм Am-4, полученный по примеру 8, замораживали при температуре -18°C, водный экстракт сухого измельченного мицелия *Pleurotus djamor* штамм Pd-3, полученный по примеру 8, замораживали при температуре -70°C. Экстракты хранили при температуре заморозки в течение 4 месяцев, после чего размораживали при комнатной температуре и использовали в качестве противоопухолевых средств. Результаты изучения противоопухолевой активности средств представлены в таблице 5.

Пример 10. Получение средств, обладающих противоопухолевыми свойствами.

Экстракт погруженного мицелия *Hericium erinaceus* штамм He-4, полученный по примеру 6, и водный экстракт сухого измельченного погруженного мицелия *Hypsizygus tessulatus* Ht-1, полученный по примеру 8, сушили с помощью распылительной сушилки. Полученные средства растворяли в дистиллированной воде таким образом, чтобы концентрации полученных растворов соответствовали концентрации растворов, подвергнутых сушке, и использовали для оценки их противоопухолевых свойств. Полученные результаты приведены в таблице 5.

Пример 11. Получение средств, обладающих противоопухолевыми свойствами.

В работе использовали водный экстракт сырого мицелия *Lentinus edodes* штамм Le-14, полученный по примеру 5, и водные экстракты сухого измельченного мицелия *Flammulina velutipes* штамм Fv-7 и *Pleurotus ostreatus* штамм 447, полученные по примеру 8. В экстракты добавляли 96% этанол. Соотношение объемов этанола и экстракта мицелия *Lentinus edodes* было 4:1, соотношение объемов этанола и экстракта *Flammulina velutipes* было 2:1, соотношение объемов этанола и экстракта *Pleurotus ostreatus* было 6:1. Выпавшие осадки, представляющие собой суммарные фракции водорастворимых полисахаридов мицелия, отделяли центрифугированием и подвергали лиофильной сушке. Сухие осадки использовали в качестве противоопухолевых средств. Результаты изучения их активности представлены в таблице 5.

Пример 12. Оценка противоопухолевого действия полученных противоопухолевых средств.

Изучение противоопухолевого действия препаратов из погруженной культуры изучаемых видов грибов проводили *in vivo* на двух перевиваемых штаммах опухолей: Т-лимфоме EL-4 и Т-клеточном лимфолейкозе Р388. Опухоли прививали гибридным мышам (C57B1/6×DBA/2)F₁ (далее В6D2F₁), Т-лимфому EL-4 прививали самцам, Т-клеточный лимфолейкоз Р388 - самкам. Мышей получали из питомника РАМН «Крюково». После поступления мышей выдерживали в карантине 21 день. Штаммы опухолей хранили в азотном банке при температуре -196°С. После размораживания штаммы опухолей поддерживали в сингенных условиях в асцитной форме серийными внутрибрюшинными пассажами на мышах линии DBA/2. В опыте в день 0 Т-лимфому EL-4 прививали под кожу правого бока по 10⁵ клеток. Т-клеточный лимфолейкоз Р388 - по 10⁶ клеток. Лечение начинали через 10 суток после прививки Т-лимфомы EL-4 и через 2 суток после прививки Т-клеточного лимфолейкоза Р388.

Действие изучаемых препаратов оценивали при пероральном введении. Препараты вводили с помощью зонда внутригастрально ежедневно 1 раз в сутки в течение 10 суток. Сухую измельченную биомассу грибов и сублимированные погруженные культуры грибов испытывали в дозе 50 мг/кг/сут, препараты готовили, добавляя измельченный грибной материал в крахмальный клейстер таким образом, чтобы суточная доза для каждого животного содержалась в 0,3 мл клейстера.

Полисахаридные фракции применяли в дозе 2 мг/кг/сут в виде водных растворов, суточная доза раствора составляла 0,3 мл/мышь. Доза водных экстрактов мицелия базидиомицетов составляла 0,25-0,3 мл/кг/сут, содержание сухих веществ в водных экстрактах варьировало в диапазоне 13-19 мг/мл. Высушенные с помощью распылительной сушки водные экстракты мицелия грибов испытывали в дозе 4,8 мг/кг/сут, навески сухих экстрактов растворяли в воде, объем вводимого раствора составлял 0,3 мл/мышь. Количество мышей в контрольных и экспериментальных группах составляло 8-10 животных. В течение опытов следили за общим состоянием мышей, изменением массы тела, прививаемостью опухоли, динамикой роста опухоли. Торможение роста опухоли (ТРО) рассчитывали по формуле: $ТРО(\%) = (M_k - M_o) / (M_k) \times 100$, где M_k и M_o - средняя расчетная масса опухоли в контроле и опыте, соответственно. Массу опухоли рассчитывали по формуле $M (мг) = (a \times b \times c) / 2$, где M - расчетная масса опухоли, а, b, c - 3 наибольших взаимоперпендикулярных диаметра опухолевого узла в мм. Достоверность различий средних значений массы опухоли определяли по t-критерию Стьюдента. За достоверные принимали различия при $P \leq 0,05$. Противоопухолевая эффективность полученных средств представлена в

таблицах 5 и 6.

Таблица 5.		
Противоопухолевое действие полученных средств. Модель: Т-клеточный лимфолейкоз Р388, учет на 14 сутки опыта.		
№ примера	Препарат	ТРО, %
5	1	2
	3	75
	4	56
10	7	52
	8	56
	8	69
	8	87
	8	59
15	8	72
	8	44
	8	75
	9	66
	9	45

20	1	2	3
	10	Hericium erinaceus, сухой экстракт сухого погруженного мицелия (после распылительной сушки)	65
		Hypsizygos tessulatus, сухой экстракт сухого погруженного мицелия (после распылительной сушки)	63
	11	Lentinus edodes, полисахаридная фракция погруженного мицелия	81
25		Flammulina velutipes, полисахаридная фракция погруженного мицелия	94
		Pleurotus ostreatus, полисахаридная фракция погруженного мицелия	74

Таблица 6.		
Противоопухолевое действие полученных средств. Модель: Т-лимфома EL-4 учет на 18 сутки опыта.		
№ примера	Препарат	ТРО, %
30	5	62
	6	58
35	6	59

Таким образом, поставленная задача решена. Длительность процесса культивирования сокращена до 2-6 дней при сохранении эффективности полученных средств, обладающих противоопухолевой активностью.

Формула изобретения

1. Способ получения средства, обладающего противоопухолевой активностью, включающий приготовление посевного мицелия базидиомицета, приготовление производственной питательной среды, засев производственной питательной среды, содержащей источники углерода, азота, минеральные соли и воду, приготовленным посевным мицелием, культивирование базидиомицета с последующим получением погруженной культуры, отличающийся тем, что приготовление посевного мицелия осуществляют на стерильной жидкой питательной среде, содержащей, г/л воды: глюкозу - 18,0-22,0, соевую муку - 8,0-12,0, дигидрофосфат калия - 2,0-3,0, сульфат магния - 0,2-0,4 и арахидоновую кислоту - $1,0-5,0 \times 10^{-5}$, выращивание посевного

мицелия проводят при температуре 22-29°C в течение 2-6 суток при аэрации, при этом готовый посевной мицелий гомогенизируют.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что гомогенизацию готового посевного мицелия перед засевом производственной питательной среды осуществляют в гомогенизаторе в течение 2-5 мин, а в процессе засева - в биореакторе при включенной мешалке на 300-500 об/мин в течение 0,5-6 мин.

3. Способ по п.1, отличающийся тем, что культивируют базидиомицеты, выбранные из группы *Armillaria mellea* (Fr.) Karst., *Flammulina velutipes* (Curt.:Fr.) Singer, *Hericium erinaceus* (Bull.:Fr.) Pers., *Hypsizygos marmareus* 1611 (Peck) H.E.Bigelow, *Hypsizygos tessulatus* (Bulliard:Fr.) Singer, *Lentinus edodes* (Berk.) Singer, *Lyophyllum shimeji* (Kawam.) Hongo, *Pleurotus djamor* (Rumphius ex Fries) Boedjin, *Pleurotus ostreatus* (Jacq.:Fr.) Kumm.

4. Способ по п.3, отличающийся тем, что культивирование базидиомицета *Armillaria mellea* ведут в производственной питательной среде, содержащей, г/л воды: растительное масло - 15,0-18,0, соевую муку - 18,0-20,0, дигидрофосфат калия - 0,5-2,5, сульфат магния - 0,05-0,26, при температуре 24-28°C в течение 4,5-5,5 суток.

5. Способ по п.3, отличающийся тем, что культивирование базидиомицета *Flammulina velutipes* ведут в производственной питательной среде, содержащей, г/л воды: растительное масло - 19,0-27,0, соевую муку 19,0-27,0, дигидрофосфат калия - 1,4-3,0, сульфат магния - 0,14-0,30, при температуре 20-28°C в течение 5,5-6,5 суток.

6. Способ по п.3, отличающийся тем, что культивирование базидиомицета *Hericium erinaceus* ведут в производственной питательной среде, содержащей, г/л воды: растительное масло - 10,0-27,0, соевую муку - 20,0-25,0, дигидрофосфат калия - 2,0-3,3, сульфат магния - 0,2-0,3, при температуре 24-30°C в течение 5,5-6,5 суток.

7. Способ по п.6, отличающийся тем, что в производственную среду дополнительно вводят мелассу в количестве 1-40 г/л среды.

8. Способ по п.3, отличающийся тем, что культивирование базидиомицета *Hypsizygos marmareus* ведут в производственной питательной среде, содержащей, г/л воды: растительное масло - 20,0-24,0, соевую муку - 16,0-22,0, дигидрофосфат калия - 1,5-3,0, сульфат магния - 0,2-0,3, при температуре 24-31°C в течение 5,5-6,5 суток.

9. Способ по п.3, отличающийся тем, что культивирование базидиомицета *Hypsizygos tessulatus* ведут в производственной питательной среде, содержащей, г/л воды: растительное масло - 18,0-25,0, соевую муку - 20,0-28,0, дигидрофосфат калия - 1,6-2,6, сульфат магния - 0,2-0,3, при температуре 24-33°C в течение 6,5-7,5 суток.

10. Способ по п.3, отличающийся тем, что культивирование базидиомицета *Lentinus edodes* ведут в производственной питательной среде, содержащей, г/л воды: растительное масло - 12,0-16,0, соевую муку - 18,0-24,0, глюкозу - 8-12, дигидрофосфат калия - 1,3-2,6, сульфат магния - 0,2-0,3, при температуре 24-30°C в течение 5,5-6,5 суток.

11. Способ по п.3, отличающийся тем, что культивирование базидиомицета *Lyophyllum shimeji* ведут в производственной питательной среде, содержащей, г/л воды: растительное масло - 16,0-22,0, соевую муку - 18,0-25,0, дигидрофосфат калия - 2,0-3,0, сульфат магния - 0,2-0,3, при температуре 24-34°C в течение 3,5-4,5 суток.

12. Способ по п.3, отличающийся тем, что культивирование базидиомицета *Pleurotus djamor* ведут в производственной питательной среде,

содержащей, г/л воды: растительное масло - 15,0-20,0, соевую муку - 15,0-21,0, дигидрофосфат калия - 2,0-3,3, сульфат магния - 0,2-0,3, при температуре 26-35°C в течение 2,5-3,5 суток.

5 13. Способ по п.3, отличающийся тем, что культивирование базидиомицета *Pleurotus ostreatus* ведут в производственной питательной среде, содержащей, г/л воды: растительное масло - 14,0-20,0, соевую муку - 11,0-19,0, дигидрофосфат калия - 2,0-3,0, сульфат магния - 0,2-0,3, при температуре 24-28°C в течение 2,5-3,5 суток.

10 14. Способ по п.1, отличающийся тем, что после культивирования базидиомицета полученную погруженную культуру подвергают сублимационной сушке, затем высушенную культуру измельчают и полученный сухой порошок используют в качестве средства, обладающего противоопухолевой активностью.

15 15. Способ по п.1, отличающийся тем, что после культивирования базидиомицета полученную погруженную культуру автоклавируют при 1,2-1,5 атм в течение 1,5-3 ч, отделяют жидкую фазу и используют ее в качестве средства, обладающего противоопухолевой активностью.

20 16. Способ по п.1, отличающийся тем, что после культивирования из погруженной культуры отделяют мицелий базидиомицета, заливают его дистиллированной водой в количестве 90-360 г/л, автоклавируют при 1,2-1,5 атм в течение 1,5-2,5 ч, полученный водный экстракт отделяют и используют в качестве средства, обладающего противоопухолевой активностью.

25 17. Способ по п.1, отличающийся тем, что после культивирования из погруженной культуры отделяют мицелий базидиомицета и проводят экстракцию этанолом в количестве 90-360 г/100 мл экстрагента в течение 0,5-1,5 ч при перемешивании, полученный этанольный экстракт отделяют от остатков мицелия, упаривают до сухого остатка на испарителе, а остаток мицелия заливают дистиллированной водой в
30 количестве 90-360 г/л, автоклавируют при 1,2-1,5 атм в течение 1,5-2,5 ч, полученный водный экстракт отделяют от остатка мицелия и объединяют с сухим остатком этанольного экстракта, и полученную смесь используют в качестве средства, обладающего противоопухолевой активностью.

35 18. Способ по п.1, отличающийся тем, что после культивирования из погруженной культуры отделяют мицелий базидиомицета, высушивают его при температуре 35-80°C, измельчают и сухой порошок мицелия используют в качестве средства, обладающего противоопухолевой активностью.

40 19. Способ по п.18, отличающийся тем, что сухой измельченный мицелий базидиомицета подвергают экстрагированию дистиллированной водой в количестве 18-72 г/л при 1,2-1,5 атм в течение 1,5-2,5 ч, затем водный экстракт отделяют от остатков мицелия и полученный водный экстракт мицелия используют в качестве средства, обладающего противоопухолевой активностью.

45 20. Способ по п.19, отличающийся тем, что полученное противоопухолевое средство замораживают при температуре -18...-70°C и используют в качестве средства, обладающего противоопухолевой активностью.

50 21. Способ по п.19, отличающийся тем, что полученное жидкое противоопухолевое средство сушат и используют в качестве средства, обладающего противоопухолевой активностью.

22. Способ по п.19, отличающийся тем, что в водный экстракт мицелия базидиомицета добавляют 2-6 объемов этанола, выпавший осадок отделяют и используют в качестве средства, обладающего противоопухолевой активностью.

23. Средство, обладающее противоопухолевой активностью, отличающееся тем, что оно получено по любому из пп.1-22.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50