

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



(19) RU (11)

2141525⁽¹³⁾ C1

(51) МПК⁶ C12N5/04, A61K35/78,
C12P19/00
C09B61/00

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

Статус: по данным на 08.09.2014 - действует
Пошлина: учтена за 17 год с 07.07.2014 по 06.07.2015

(21), (22) Заявка: 98113512/13, 06.07.1998

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
06.07.1998

(45) Опубликовано: 20.11.1999

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: Sato K. et. al. Antraquinone production by
transformed root culture of Rubia tinctorum: influence
of phytohormones and sucrose concentration.
Phytochemistry. 1991, 30, N 5, p.1507 - 1509. 58146288
A, 31.08.83. 01222791 A, 06.09.89. 03094669 A,
19.04.91. 2065462 C1, 20.08.96. 2078105 C1, 27.04.97.

Адрес для переписки:
690022, Владивосток, пр.100 лет Владивостоку,
159, Биолого- почвенный институт, ДВО РАН,
патентная группа

(71) Заявитель(и):

Биолого-почвенный институт
Дальневосточного отделения РАН,
Тихоокеанский институт биоорганической
химии Дальневосточного отделения РАН

(72) Автор(ы):

Чернодод Г.К.,
Булгаков В.П.,
Лауве Л.С.,
Журавлев Ю.Н.,
Мищенко Н.П.,
Федореев С.А.,
Глазунов В.П.,
Денисенко В.А.

(73) Патентообладатель(и):

Биолого-почвенный институт
Дальневосточного отделения РАН,
Тихоокеанский институт биоорганической
химии Дальневосточного отделения РАН

(54) ШТАММ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТОК РАСТЕНИЙ RUBIA CORDIFOLIA L., ПРОДУЦЕНТ
АНТРАХИНОНОВ

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии и может быть использовано для получения ценных биологически активных веществ, антрахинонов, которые являются эффективным средством для лечения почечнокаменной болезни и заболеваний печени. Штамм культивируемых клеток растений Rubia cordifolia L. (марены сердцелистной) получен в Биолого-почвенном институте ДВО РАН и депонирован во Всероссийской коллекции клеточных культур высших растений при Институте физиологии растений РАН под индексом RC-I. Штамм RC-I получен из дикорастущего растения марены сердцелистной, собранного в Анучинском районе Приморского края. Штамм представляет собой каллусную ткань рыхлой консистенции желто-оранжевого цвета. Штамм выращивают в накопительном режиме на агаризованной питательной среде. Штамм RC-I является высокопродуктивным источником антрахиноновых пигментов- муньистина и пурпурина. Среднее содержание пигментов составляет 0,89% от массы сухих клеток. 3 табл.

Изобретение относится к биотехнологии и может быть использовано для получения ценных биологически активных веществ, в частности антрахинонов, которые являются эффективным средством для лечения почечнокаменной болезни и заболеваний печени. Поиск новых гепатопротекторных веществ и особенно лекарственных веществ, разрушающих и выводящих камни из почек, является актуальной задачей для медицины и фармацевтической промышленности.

Марена сердцелистная *Rubia cordifolia* L. (синоним: марена пурпурная *Rubia purpuria* DC.) - растение семейства мареновых (Rubiaceae), произрастает в странах Восточной Азии, Пакистане, на территории России - в Приморском крае. Экстракты из корней марены сердцелистной, содержащие антрахиноны, обладают способностью растворять и удалять камни из почек и мочевого пузыря (Gilani A. H., Janbaz K.H., Zaman M., Lateef A., Suria A., Ahmed H.R. Possible presence of calcium channel blocker(s) in *Rubia cordifolia*: an indigenous medicinal plant. *J. Pak. Med. As- soc.* 1994. V. 44. P. 82-85). Известно, что антрахиноны обладают гепато- защитным действием (Gilani A.H., Janbaz K.H. Effect of *Rubia cordifolia* extract on acetaminophen and CCl₄-induced hepatotoxicity. *Phytotherapy Res.* 1995. V. 9. P. 372-375).

Известно, что антрахиноны синтезируются в культурах растительных клеток. Так, пурпурин, ализарин и люцидин вырабатывается культурой корней растения *Rubia tinctorum* (Sato K., Yamazaki T., Okuyama E., Yoshihira K., Shimomura K. Anthraquinone production by transformed root culture of *Rubia tinctorum*: influence of phytohormones and sucrose concentration // *Phytochemistry.* 1991. V. 30. N 5. P. 1507-1509 (прототип). Известно, что из каллусной культуры растений *Cinchona ledgeriana* выделено до 15 различных антрахинонов (Wijnsma R., Verpoorte R., Mulder-Krieger Th., Svedpsen A. Anthraquinones in callus cultures of *Cinchona ledgeriana* // *Phytochemistry.* 1984. V. 23, N 10, P. 1507-1509). Известно, что набор антрахинонов продуцирует культура клеток *Morinda citrifolia* (Leistner E. Biosynthesis of morindone and alizarin in intact and cell suspension cultures of *Morinda citrifolia* // *Phytochemistry.* 1973. V. 12. P. 1669-1674). Однако в силу того, что некоторые антрахиноны обладают мутагенным действием, создание культур, синтезирующих большой набор антрахинонов, нежелательно. Проблема создания клеточного штамма, продуцента антрахинонов, заключается в том, чтобы культура продуцировала определенный набор антрахинонов, не обладающих мутагенным действием.

Задача изобретения - получение нового источника антрахинонов, штамма культивируемых клеток растения *Rubia cordifolia* L., продуцента антрахинонов.

Штамм получен в Биолого-почвенном институте ДВО РАН и депонирован во Всероссийской коллекции клеточных культур высших растений при Институте физиологии растений РАН под номером ВСКК(ВР) 60. Наименование штамма - RC-1.

Штамм характеризуется следующими признаками.

Родословная штамма: стеблевые апексы дикорастущего растения марены сердцелистной, собранного в Анучинском районе Приморского края. Для получения и культивирования каллусов использовали питательную среду следующего состава, мг/л воды:

NH₄NO₃ - 350-450

KNO₃ - 1500-2300

K₂HPO₄ - 150-190

CaCl₂•6H₂O - 600-730

MgSO₄•7H₂O - 350-390

H₃BO₄ - 4,2-8,0

MnSO₄•4H₂O - 15,6-26,7

CuSO₄•5H₂O - 0,02-0,03

CoCl₂•2H₂O - 0,02-0,03

ZnSO₄•7H₂O - 6,0-10,3

Na₂MoO₄•2H₂O - 0,2-0,3

KJ - 0,52-0,90

FeSO₄•7H₂O - 25,0-30,6

Na₂EDTA•2H₂O - 33,6-41,0

Мезо-инозит - 80-120

Тиамин гидрохлорид - 0,15-0,25

Никотиновая кислота - 0,4-0,6

Пиридоксин гидрохлорид - 0,4-0,6

6-бензиламинопурин - 0,45-0,55

α-нафтилуксусная кислота - 1,5-2,5

Казеина гидролизат - 40-60

Сахароза - 24000-26000

Агар - 5800-6200

Вода - До 1 л

pH среды 5,6-5,8 до автоклавирования

Число пассажей к моменту паспортизации и депонирования: 20.

Штамм представляет собой каллусную ткань рыхлой консистенции желто-оранжевого цвета. Ростовой индекс и продуктивность по сырой и сухой биомассе представлена в таблице 1. Каллусы выращиваются в накопительном режиме на агаризованной питательной среде.

Стандартные условия культивирования: температура 25±1°C, относительная влажность воздуха (70±10%), освещенность - отсутствует, сосуды для выращивания - колбы Эрленмейера объемом 100 мл, объем питательной среды 30 мл, либо культуральные сосуды объемом 200 мл, содержащие 60 мл питательной среды. Кратность посева 1:10.

Цитологические характеристики. Ткань представляет собой популяцию, состоящую на 20-86% из клеток меристематического типа округлой, овальной, треугольной и неправильной формы, имеющих средние размеры 81 x 62 мкм и из клеток паренхимного типа (содержание 14-80%) округлой, овальной, вытянутой, подковообразной, треугольной, трапециевидной и неправильной формы, имеющих средние размеры 193 x 103 мкм. Максимум митотической активности наблюдается на 36 сутки культивирования. Митотический индекс составляет 8,8%.

Кариологическая характеристика

Распределение клеток по числу хромосом, % клеток в модальном классе (см. таблицу 1а)

Диплоидный набор хромосом - 38. Маркерных хромосом не отмечено.

Соотношение живых и мертвых клеток, %: живых 25-90, мертвых - 10-75.

Способность к морфогенезу: отсутствует.

Качественная и количественная характеристика биосинтеза вторичных продуктов. Штамм продуцирует пигменты антрахиноновой группы, пурпурин и муньистин. Пурпурин и муньистин не обладают мутагенным действием. Отмечено также присутствие в следовых количествах других пигментов.

Пример. 1 г каллусной ткани штамма RC-1 помещают в культуральные флаконы объемом 200 мл, содержащие 60 мл питательной среды следующего состава, мг/л воды:

NH₄NO₃ - 400

KNO₃ - 1900

K₂HPO₄ - 170

CaCl₂•6H₂O - 665

MgSO₄•7H₂O - 370

H₃BO₄ - 6,2

MnSO₄•4H₂O - 22,3

CuSO₄•5H₂O - 0,025

CoCl₂•2H₂O - 0,025

ZnSO₄•7H₂O - 8,6

Na₂MoO₄•2H₂O - 0,25

KJ - 0,83

FeSO₄•7H₂O - 27,8

Na₂EDTA•2H₂O - 37,3

Мезо-инозит - 100

Тиамин гидрохлорид - 0,2

Никотиновая кислота - 0,5

Пиридоксин гидрохлорид - 0,5

6-бензиламинопурин - 0,5

α-нафтилуксусная кислота - 2,0

Казеина гидролизат - 100

Сахароза - 25000

Агар - 6000

Вода дистиллированная - До 1 л

(рН среды 5,6 до автоклавирования). Ткань культивируют в течение 30 суток при температуре 25°C, относительной влажности воздуха 70%, в темноте. Затем извлекают из сосудов, высушивают в токе нагретого до 60°C воздуха и экстрагируют трехкратно кипящим метиловым спиртом. Метиловый спирт удаляют под вакуумом. Остаток красно-оранжевого цвета представляет собой неочищенную сумму антрахиноновых пигментов. Колоночной хроматографией на сефадексе LH-20 в системе хлороформ - метанол (10:1) получают фракции двух основных пигментов. После удаления под вакуумом растворителей антрахиноны кристаллизуют из соответствующих растворителей. Структуры полученных пигментов установлены на основании физико-химических свойств и спектральных данных:

Мульистин. C₁₅H₈O₆. Молекулярная масса 284,22.

Золотистые пластинки (хлороформ), температура плавления 231-233°C.

УФ-спектр (этанол), λ (нм), (lgε): 248 (4,52), 289 (4,30), 424 (3,76).

ИК-спектр (KBr), ν̄ (см⁻¹): 3190, 1698, 1675, 1631, 1587. Масс-спектр m/z, %: 284 M⁺ (11), 283 [M-1]⁺, (60), 267 (35), 266 (99), 241 (46), 240 (100), 238 (80), 212 (40), 184 (50). ПМР-спектр (CDCl₃): 7,47 (с., 1H, H-4), 7,84 (м., 2H, H-6, H-7), 8,33 (м., 2H, H-5, H-8), 11,44 (шир. с., OH), 13,13 (с., OH), 16,52 (с., OH). ¹³ЯМР-спектр (DMSO-d₆): 107,1, 109,3, 113,6, 126,1, 126,4, 132,5, 133,1, 133,9, 134,3, 134,9, 162,3, 163,1, 167,0, 181,4, 184,5.

Пурпурин. C₁₄H₈O₅. Молекулярная масса 256.21.

Красные кристаллы, т. пл. 262°C.

УФ-спектр (этанол), λ (нм), (lg ϵ): 203 (4,35), 257 (4,46), 296 (3,91) 459 (плечо), 485 (3,85), 521 (плечо).

ИК-спектр (CH₂Cl₂), ν (см⁻¹): 1623, 1588. Масс-спектр m/z, %: 256 M⁺, (100), 228 (100), 186 (17).

ПМР-спектр (CDCl₃): 6,83 (с., 1H, H-3), 7,83 (м., 2H, H-6, H-7), 8,35 (м., 2H, H-5, H-8), 12,24 (с., OH), 12,28 (с., OH). ¹³ЯМР-спектр (DMSO-d₆): 104,9, 109,6, 112,1, 125,9, 126,1, 132,2, 133,1, 133,6, 134,4, 149,2, 156,7, 160,2, 182,7, 186,1.

Количество пурпурина и муьистина, продуцируемое штаммом на протяжении года культивирования, представлено в таблице 2. Среднее содержание этих двух пигментов составило 0,89% от массы сухих клеток. Штамм характеризуется стабильным соотношением муьистина и пурпурина (таблица 2).

Таким образом, использование предложенного штамма марены сердцелистной RC-1 позволяет получить антрахиноновые пигменты биотехнологическим способом.

Формула изобретения

Штамм культивируемых клеток растений *Rubia cordifolia* L., продуцент антрахинонов.

РИСУНКИ

[Рисунок 1](#), [Рисунок 2](#), [Рисунок 3](#)

QB4A Государственная регистрация договора о распоряжении исключительным правом

Дата и номер государственной регистрации договора: **08.07.2014 № РД0151152**

Вид договора: **лицензионный**

Лицо(а), предоставляющее(ие) право использования:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Биолого-почвенный институт Дальневосточного отделения Российской академии наук (RU)

Лицо, которому предоставлено право использования:

Общество с ограниченной ответственностью "МИП-Микроклон ДВ" (RU)

Условия договора: **НИЛ, на срок до 06.07.2018 на территории РФ**

Дата внесения записи в Государственный реестр: **08.07.2014**

Дата публикации: [27.07.2014](#)
