



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 256 701** ⁽¹³⁾ **C1**
(51) МПК⁷ **C 12 N 1/14, C 12 P 17/10,**
7/00/(C 12 N 1/14, C 12 R 1:68)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2003136115/13, 11.12.2003

(24) Дата начала действия патента: 11.12.2003

(45) Опубликовано: 20.07.2005 Бюл. № 20

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: CUI CB, KAKEYA H, OKADA G et al. Novel mammalian cell cycle inhibitors, tryprostatins A, B and other diketopiperazines produced by *Aspergillus fumigatus*. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological properties. J. Antibiot. (Tokyo), 1996 Jun; 49(6): 527-33. CUI C.B., KAKEYA H., OSADA H. Novel mammalian cell cycle inhibitors, tryprostatins (см. прод.)

Адрес для переписки:

690022, г. Владивосток, пр-кт 100 лет Владивостоку, 159, ТИБОХ ДВО РАН, зав. патентным отделом Н.И. Стадниченко

(72) Автор(ы):

Пивкин М.В. (RU),
Афиятуллов Ш.Ш. (RU),
Кузнецова Т.А. (RU),
Еляков Г.Б. (RU)

(73) Патентообладатель(ли):

ТИХООКЕАНСКИЙ ИНСТИТУТ
БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
ДАЛЬНЕВОСТОЧНОГО ОТДЕЛЕНИЯ РАН (RU)

(54) ШТАММ ГРИБА ASPERGILLUS FUMIGATUS - ПРОДУЦЕНТ ИНДОЛЬНЫХ АЛКАЛОИДОВ И СПОСОБ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ

(57) Реферат:

Изобретения относятся к биотехнологии и могут быть использованы для получения индольных алкалоидов, обладающих противоопухолевой активностью. Штамм - продуцент выделен из мягкого коралла *Sinularia* sp., относится к виду *Aspergillus fumigatus*, депонирован в Коллекции Морских Микроорганизмов Тихоокеанского института биоорганической химии ДВО РАН (КММ ТИБОХ) под №4631. Способ получения индольных алкалоидов предусматривает поверхностное

твердофазное культивирование указанного штамма на питательной среде, измельчение мицелия и среды, двукратную экстракцию полученной смеси системой хлороформ - этанол (2:1), концентрирование экстракта, хроматографирование его на колонке с силикагелем и последующее разделение индольных алкалоидов с помощью ВЭЖХ. Способ, основанный на применении данного штамма, обеспечивает повышение выхода индольных алкалоидов. 2 н. и 2 з.п. ф-лы, 1 табл.

(56) (продолжение):

A, B and other diketopiperazines produced by *Aspergillus fumigatus*. II. Physicochemical properties and structures. J. Antibiot. (Tokyo), 1996, Jun; 49(6): 534-40. LIU J., YANG Z.J., MENG Z.H. The isolation, purification and identification of fumitremorgin B produced by *Aspergillus fumigatus*. Biomed. Environ. Sci. 1996 Mar; 9(1): 1-11. RU 2077587 C1, 20.04.1997. RU 2203940 C1, 10.05.2003.

RU 2 256 701 C1

RU 2 256 701 C1

RUSSIAN FEDERATION



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 256 701** ⁽¹³⁾ **C1**
(51) Int. Cl.⁷ **C 12 N 1/14, C 12 P 17/10,**
7/00/(C 12 N 1/14, C 12 R 1:68)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: **2003136115/13, 11.12.2003**

(24) Effective date for property rights: **11.12.2003**

(45) Date of publication: **20.07.2005 Bull. 20**

Mail address:

**690022, g.Vladivostok, pr-kt 100 let
Vladivostoku, 159, TIBOKh DVO RAN, zav.
patentnym otdelom N.I. Stadnichenko**

(72) Inventor(s):

**Pivkin M.V. (RU),
Afijatullof Sh.Sh. (RU),
Kuznetsova T.A. (RU),
Eljakov G.B. (RU)**

(73) Proprietor(s):

**TIKHOKEANSKIY INSTITUT
BIOORGANICHESKOJ KhIMII
DAL'NEVOSTOCHNOGO OTDELENIJa RAN (RU)**

(54) **STRAIN OF FUNGUS ASPERGILLUS FUMIGATUS AS PRODUCER OF INDOLE ALKALOIDS
AND METHOD FOR THEIR PREPARING**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology, microbiology, medicine.

SUBSTANCE: the strain-producer is isolated from soft coral Sinularia sp. relating to species Aspergillus fumigatus and deposited in Collection of Marine Microorganisms of Pacific institute of bioorganic chemistry DVO RAN (KMM TIBOKH) at № 4631. Method for preparing indole alkaloids involves surface solid-phase culturing the indicated strain on nutrient medium, milling mycelium and medium, two-fold extraction of

prepared mixture with system chloroform - ethanol (2:1), concentrating extract, its chromatography on column with silica gel and the following separation of indole alkaloids by HPLC method. Method based on applying this strain provides enhancing yield of indole alkaloids. Invention can be used in preparing indole alkaloids eliciting an anti-tumor activity.

EFFECT: improved method for preparing, valuable medicinal properties of indole alkaloids.

4 cl, 1 tbl, 2 ex

RU 2 2 5 6 7 0 1 C 1

RU 2 2 5 6 7 0 1 C 1

Изобретение относится к биотехнологии и может быть использовано для получения индольных алкалоидов, обладающих противоопухолевой активностью.

Известно, что микроскопические грибы рода *Aspergillus* являются продуцентами ряда биологически активных веществ, в том числе, органических кислот, ферментов, белковых
5 и полисахаридных антигенов, антибиотиков.

Среди грибов вида *Aspergillus fumigatus* известны и продуценты индольных алкалоидов.

Так известно, что штамм гриба *Aspergillus fumigatus* DSM 790, выделенный из почвы, является продуцентом 12, 13-дигидро-фумитреморгина С. Получение 12,13-дигидро-
10 фумитреморгина С предусматривает предварительное выращивание продуцента на среде следующего состава: 1% глюкоза, 1% пептон, 2% экстракт мальтозы и 0,3% дрожжевой экстракт. Культивирование проводится в течение 48 часов при 27° С и скорости перемешивания 100 об/мин. Полученный мицелий отфильтровывается, дважды промывается Трис -буфером (0,05 М, рН 7,0) и снова суспендируется в 200 мл того же
15 буфера, содержащего 0,5% глюкозы. После 10 дней культивирования мицелий отделяется фильтрованием, мицелий и культуральный фильтрат трижды экстрагируются этилацетатом. Экстракт упаривается, а остаток наносится на RP-8 колонку в системе H₂O- MeOH, 30:70. Выход 12,13-дигидро-фумитреморгина С составляет всего 1,5 мг/л [Arfmann, H. - A. 12,13-dihydroxy-fumitremorgin C from *Aspergillus fumigatus*. *Phytochemistry* 1990, 29, 1025-1026].

20 Недостатками известного штамма гриба и способа получения является низкий выход целевого продукта.

Наиболее близкими к заявляемому штамму и способу получения индольных алкалоидов является штамм гриба *Aspergillus fumigatus* BM 939, выделенный из морских донных осадков Японского моря с глубины 760 м, продуцирующий циклопростатины А, В, С и D и
25 способ их получения. Для получения этих алкалоидов предусматривается культивирование микроскопического гриба при 28° С в течение 28 часов методом глубинного культивирования на среде следующего состава: глюкоза 3%, растворимый крахмал 2%, соевая мука 2%, K₂HPO₄ 0,5% и MgSO₄ · 7H₂O 0,05, с непрерывным перемешиванием при 350 об/мин, и аэрацией 200 л/мин, и последующее извлечение продукта из культуральной
30 жидкости. Для этого мицелий отделяется фильтрованием, экстрагируется 90%-ным водным ацетоном, экстракт упаривается до водного раствора. Водный раствор и культуральный фильтрат экстрагируются этилацетатом, а объединенный экстракт упаривается до маслообразного остатка. Остаток дважды распределяется между хлороформом и гексаном, а хлороформный экстракт очищается на колонке с силикагелем. Выделенные алкалоиды
35 разделяются методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на колонках CAPCELL PAK C-18. Выход циклопростатина А - 2,5 мкг/л культуральной жидкости, циклопростатина В - 11 мкг/л, выходы циклопростатинов С и D незначительны [Cui, С.-В., Kakeya, H., Osada, H. Novel Mammalian Cell Cycle Inhibitors, Cycloprostatins A-D, Produced by *Aspergillus fumigatus*, Which Inhibit Mammalian Cell
40 Cycle at G2/M Phase. *Tetrahedron* 1997, 53, 59-72].

Известный штамм *Aspergillus fumigatus* BM 939 также при определенных условиях культивирования продуцирует 12,13-дигидро-фумитреморгин С. Для этого культивирование осуществляется в ферментере (30 л), содержащем 18 литров культуральной жидкости, на
45 среде следующего состава: глюкоза 3%, растворимый крахмал 2%, соевая мука 2%, K₂HPO₄ 0,5%, MgSO₄ · 7H₂O 0,05. Культивирование проводится при 28° С в течение 72 часов, при скорости перемешивания 350 об/мин, и скорости аэрации 7 л/мин. Извлечение продукта осуществляется также, как при получении циклопростатинов. Выход 12,13-дигидро-фумитреморгина С - 1,8 мг/л [Cui, С.-В., Kakeya, H., Okada, G., Onose, R., Osada, H. Novel Mammalian Cell Cycle Inhibitors, Tryptostatins A, B and Other
50 Diketopiperazines Produced by *Aspergillus fumigatus*. *J. Antibiotics* 1996, 49, 527-533].

К недостаткам известного штамма *Aspergillus fumigatus* BM 939 можно отнести его низкую продуктивность в отношении индольных алкалоидов.

Способ получения, предусматривающий культивирование штамма на жидкой

питательной среде требует больших энергозатрат на перемешивание и аэрацию, так как выращивание продуцентов проводится методом глубинного культивирования.

Последующее выделение и очистка целевых продуктов характеризуются длительностью и трудоемкостью, так как включают несколько стадий экстракции мицелия разными

5 растворителями, и довольно сложный процесс очистки алкалоидов.

В связи с тем, что индольные алкалоиды такие, как циклопростатины А и В, 12,13-дигидрокси-фумитреморгин С, фумитреморгин С и веррукулоген, обладают противоопухолевой активностью и потому представляют значительный интерес как перспективные противораковые препараты, ставится задача получения продуктов с

10 высоким выходом.

Поставленная задача решена выявлением нового штамма гриба *Aspergillus fumigatus*, обладающего способностью продуцировать индольные алкалоиды, и разработкой нового способа получения индольных алкалоидов, предусматривающий культивирование

15 продуцента на питательной среде, экстракцию мицелия и среды органическим растворителем и выделение целевых продуктов посредством их хроматографической очистки на силикагеле и разделения методом ВЭЖХ, в котором в качестве продуцента используют штамм гриба *Aspergillus fumigatus* КММ 4631, а культивирование осуществляют на твердой питательной среде.

В способе используют питательные среды RM или MM (Monaghan R.L, Can. J. Bot. 1995.

20 V. 73. Supl. I.Sect. E-H. P. 925-931), модифицированные авторами, в которых вместо пресной воды в качестве источника минеральных солей используют натуральную морскую воду. Эти среды авторы обозначили, как RMM или MMM. Питательная среда RMM характеризуется следующим составом: рис - 1,0 кг, натуральная морская вода - 2,0 л, дрожжевой экстракт - 1,0 г, натрий виннокислый - 0,5 г, KH_2PO_4 - 0,5 г. Питательная

25 среда MMM характеризуется следующим составом: пшено - 1,5 кг, натуральная морская вода - 2,0 л, натрий виннокислый - 0,5 г, KH_2PO_4 - 0,1 г, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,1 г, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,01 г.

Оптимум температуры при выращивании гриба на этих средах 20-22° С.

30 Экстракцию мицелия и среды осуществляют смесью хлороформ-этанол 2:1. Разделение целевых продуктов осуществляют последовательно на силикагеле Силасорб Si (12 мкм, колонка 4× 250 мм, производитель фирма ELSICO, HPLC&LC COMPANY, г. Москва) и на обращенно-фазном силикагеле Диасфер-110-С18 (6 мкм, колонка 4,0× 250 мм, производитель АО БиохимМакСТ, г. Москва).

35 Новый штамм *Aspergillus fumigatus* выделен из мягкого коралла *Sinularia* sp., собранного на глубине 52 м возле побережья острова Кунашир (Курильские острова).

Штамм *Aspergillus fumigatus* хранится в Коллекции Морских Микроорганизмов Тихоокеанского института биоорганической химии ДВО РАН (КММ ТИБОХ) под №4631.

Штамм *Aspergillus fumigatus* КММ 4631 характеризуются следующими свойствами.

40 Культуральные и морфологические признаки.

На среде Чапека колонии 3,7-4,2 см в диаметре за две недели роста, широко распростертые, ровные, бархатистые, в центральной части войлочные, сначала белые, по мере формирования конидий становятся серо-зелеными, до серо-голубовато-зеленых в центре колоний. Конидиальные головки колонковидные, компактные, варьирующие в размерах от 40 до 400 мкм длины. Конидиеносцы отходят прямо от погруженных гиф или

45 как очень короткие веточки воздушного мицелия, или как короткие, 300-400× 5-8 мкм, постепенно расширяющиеся к верхушке, с гладкой оболочкой зеленых оттенков, особенно интенсивных в верхней части. Апикальная часть конидиеносца бутылковидная, 20-30 мкм в диаметре. Стеригмы одноярусные, формируются только в центре апикальной части, занимая не более 2/3 ее поверхности, скученные, располагаются по оси, параллельной

50 оси конидиеносца; 6-8× 2-4 мкм. Конидии шаровидные, 2,5-3 мкм, в массе темно-зеленые, гладкие или неясно шероховатые. Реверзум желтый, по мере старения культуры становится красно-коричневым.

На среде сусло-агар колонии 3,8-4,6 см в диаметре за две недели роста, широко

распростерты, ровные, войлочные, до пушистых, сначала белые, по мере формирования конидий становятся серо-голубовато-зеленые. Микроскопические признаки такие же, как и при выращивании на среде Чапека. Реверзум неокрашенный.

5 На среде картофельно-декстрозный агар колонии 3,2-4,0 см в диаметре за две недели роста, широко распростерты, ровные, бархатистые, сначала белые, по мере формирования конидий становятся темно серо-зелеными, до темно оливково-серых в центре колоний. Микроскопические признаки идентичны характеристикам штамма, выращенного на вышеназванных средах. Реверзум неокрашенный или желтый.

10 Новый штамм *Aspergillus fumigatus* продуцирует индольные алкалоиды: циклопростатины А и В с выходом 115,0 мг на 1 кг питательной среды RMM, фумитреморгин С с выходом 42,0 мг/кг питательной среды RMM и 102,0 мг/кг питательной среды MMM, а также продуцирует 12,13-дигидро-фумитреморгин С с выходом 98,0 мг/кг питательной среды RMM и 125,0 мг/кг питательной среды MMM и веррукулоген с выходом 70,0 мг/кг питательной среды RMM и 100,0 мг/кг питательной среды MMM.

15 Заявляемый способ получения индольных алкалоидов: циклопростатинов А и В (1 и 2), фумитреморгина С (3), 12,13-дигидро-фумитреморгина С (4) и веррукулогена (5), отличается от известного способа использованием нового, более продуктивного штамма *Aspergillus fumigatus* KMM 4631, который выращивается на питательной среде методом поверхностного твердофазного культивирования, и менее длительными и трудоемкими
20 процедурами экстракции и очистки целевых продуктов. Выходы индольных алкалоидов: 12,13-дигидро-фумитреморгина С, циклопростатинов А и В в заявляемом способе превышают выходы в способах-аналогах в 60-25000 раз. Кроме того, исключаются затраты на аэрацию культуры и дорогостоящие сахара, что снижает затраты на получение продукта в 10-20 раз, по сравнению с получением продукта на жидких питательных средах в
25 известных способах.

Технический результат штамма *Aspergillus fumigatus* KMM 4631, выращенного на твердых питательных средах, заключается в его высокой продуктивности. Новый штамм может использоваться для промышленного получения индольных алкалоидов, обладающих противоопухолевой активностью.

30 Авторами предлагаемого изобретения проведено сравнительное исследование количества продуцируемых штаммом гриба KMM 4631 индольных алкалоидов на жидкой и твердых питательных средах. Использовалась жидкая питательная среда, содержащая натуральную морскую воду, глюкозу - 30,0 г/л, пептон - 1,0 г/л, дрожжевой экстракт 0,5 г/л, K_2HPO_4 - 1,0 г/л, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,5 г/л, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,02 г/л. Культивирование
35 проводили в колбах на качалке 180-200 об/мин в течение 168 час, при температуре 20° С и рН 7,8. Культуральную жидкость хроматографировали на колонке с полихромом-1, элюируя фракции последовательно водой и 50%-ным этиловым спиртом. Водно-спиртовый элюат упарили, остаток экстрагировали этилацетатом. Экстракт концентрировали в вакууме до минимального объема и делили методом высокоэффективной жидкостной
40 хроматографии (ВЭЖХ) на силикагеле в системе этилацетат-гексан, 4;1. Полученные данные сведены в таблицу.

В примерах 1 и 2 представлены данные по получению алкалоидов в результате их продуцирования заявляемым штаммом на твердых питательных средах и выделения заявляемым способом. Полученные данные сведены в таблицу.

45

| Таблица | | | | | | |
|--------------------|------------------------------|--|-------|-------|-------|---|
| Питательная среда | Время культивирования (час.) | Выход алкалоидов (мг/л для жидкой среды и мг/кг для твердой среды) | | | | Общее количество алкалоидов (мг/л для жидкой среды и мг/кг для твердой среды) |
| | | 1 и 2 | 3 | 4 | 5 | |
| Жидкая | 168 | | | 2,5 | 5,0 | 7,5 |
| Твердая (пример 1) | 504 | 115,0 | 42,0 | 98,0 | 70,0 | 325,0 |
| Твердая (пример 2) | 504 | | 102,0 | 125,0 | 100,0 | 327,0 |

50

Изобретение иллюстрируется следующими примерами.

Пример 1. Штамм *Aspergillus fumigatus* KMM 4631 выращивают методом поверхностного твердофазного культивирования при температуре 20° С на питательной среде RMM следующего состава: рис - 1,0 кг; натуральная морская вода - 2,0 л, дрожжевой
 5 экстракт - 1,0 г, натрий виннокислый - 0,5 г, KH_2PO_4 - 0,5 г, при комнатной температуре в течение 504 часов. Мицелий вместе со средой измельчают и дважды экстрагируют смесью хлороформ-этанол 2:1. Экстракт упаривают, остаток хроматографируют на колонке с силикагелем L (40/100 мкм), элюируя последовательно хлороформом и системами хлороформ-этанол 10:1, 5:1 и 2:1. Фракции, элюируемые системой хлороформ-этанол 2:1,
 10 объединяют, концентрируют в вакууме до минимального объема и разделяют методом ВЭЖХ на колонках Силасорб Si (этилацетат-гексан, 4:1) и Диасфер-110-С18 (55% MeOH).

Выход циклопростатина А (65,0 мг/кг), циклопростатина В (50 мг/кг), 12,13-дигидрокси-фумитреморгина С (98 мг/кг), фумитреморгина С (42 мг/кг) и веррукулогена (70 мг/кг). Строение выделенных алкалоидов установлено на основании данных MS-, ^1H
 15 и ^{13}C ЯМР спектроскопии.

Пример 2. Штамм *Aspergillus fumigatus* KMM 4631 выращивают методом поверхностного твердофазного культивирования при температуре 22° С на питательной среде MMM следующего состава: пшено - 1,5 кг; натуральная морская вода - 2,0 л, натрий
 20 виннокислый - 0,5 г, KH_2PO_4 - 0,1 г, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,1 г, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,01 г при комнатной температуре в течение 504 часов. Далее процесс выделения целевых продуктов осуществляют так, как описано в примере 1. Выход 12,13-дигидрокси-фумитреморгина С (125,0 мг/кг), фумитреморгина С (102,0 мг/кг) и веррукулогена (100,0 мг/кг). Строение выделенных алкалоидов установлено на основании данных MS-, ^1H и ^{13}C ЯМР
 25 спектроскопии.

Формула изобретения

1. Штамм гриба *Aspergillus fumigatus* (в КММ ТИБОХ №4631) - продуцент индольных алкалоидов.

30 2. Способ получения индольных алкалоидов, предусматривающий культивирование продуцента на питательной среде, экстракцию мицелия и среды органическим растворителем и выделение целевых продуктов посредством их хроматографической очистки на силикагеле и разделения методом ВЭЖХ, отличающийся тем, что в качестве продуцента используют штамм гриба *Aspergillus fumigatus* KMM 4631, а культивирование
 35 осуществляют на твердой питательной среде следующего состава: рис - 1,0 кг, натуральная морская вода - 2,0 л, дрожжевой экстракт - 1,0 г, натрий виннокислый - 0,5 г, KH_2PO_4 - 0,5 г (RMM) или на твердой питательной среде следующего состава: пшено - 1,5 кг, натуральная морская вода - 2,0 л, натрий виннокислый - 0,5 г, KH_2PO_4 - 0,1 г, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,1 г, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,01 г (MMM).

40 3. Способ по п.2, отличающийся тем, что экстракцию осуществляют смесью хлороформ-этанол 2:1.

4. Способ по п.2, отличающийся тем, что разделение целевых продуктов осуществляют последовательно на колонках Силасорб Si и Диасфер - 110-С18.

45

50