



(51) МПК  
*C12N 1/14* (2006.01)  
*C07D 521/00* (2006.01)  
*C12R 1/80* (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,  
 ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2010127061/10, 01.07.2010

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
 01.07.2010

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 01.07.2010

(45) Опубликовано: 27.06.2011 Бюл. № 18

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: XU M. ET AL. Shearinines D-K, new indole triterpenoids from an endophytic *Penicillium* sp.(strain НК10459) with blocking activity on large-conductance calcium-activated potassium channels // *Tetrahedron*. 2007, v.63, №2, p. 435-444. СМЕТАНИНА О.Ф. ET AL. Indole alkaloids produced by a marine fungus isolate of *Penicillium janthinellum* biourge // (см. прод.)

Адрес для переписки:

690022, г.Владивосток, пр-т 100-летия  
 Владивостока, 159, Учреждение Российской  
 академии наук Тихоокеанский институт  
 биоорганической химии ДВО РАН, зав.  
 патентным отделом Н.И. Стадниченко

(72) Автор(ы):

Пивкин Михаил Викторович (RU),  
 Худякова Юлия Владимировна (RU),  
 Сметанина Ольга Федоровна (RU),  
 Кузнецова Татьяна Алексеевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Учреждение Российской академии наук  
 Тихоокеанский институт биоорганической  
 химии Дальневосточного отделения РАН  
 (ТИБОХ ДВО РАН) (RU)

(54) ШТАММ ГРИБА *Penicillium simplicissimum* (Oudem.) Thom - ПРОДУЦЕНТ ШЕРИНИНОВ

(57) Реферат:

Штамм гриба *Penicillium simplicissimum* (Oudem.) Thom выделен из морского грунта, собранного на глубине 11 м Амурского залива Японского моря и депонирован во Всероссийской коллекции микроорганизмов ИБФМ им. Г.К.Скрябина РАН под регистрационным номером ВКМ F-4116D. Для выращивания штамма используют

питательную среду, не содержащую сахаров. Штамм характеризуется высокой продуктивностью шерининов, обладающих противораковой активностью. Суммарный выход шерининов составляет 55 мг/л питательной среды, основанной на жидком пивном сусле и морской воде, и 36,5 г на 1 кг питательной среды, содержащей пшено. 1 табл.

(56) (продолжение):

*Journal of Natural Products (Lloydia)*, 2007, v.70, №6, p. 906-909. NICOLETTI R. ET AL. Antitumor extrolites produced by *Penicillium* species // *International Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences* 2(1), 2008, 1-23. Найдено в Интернете: <[http://www.globalsciencebooks.info/JournalsSup/images/0806/IJBPS\\_2\(1\)1-23o.pdf](http://www.globalsciencebooks.info/JournalsSup/images/0806/IJBPS_2(1)1-23o.pdf)>.



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,  
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.  
*C12N 1/14* (2006.01)  
*C07D 521/00* (2006.01)  
*C12R 1/80* (2006.01)

**(12) ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: **2010127061/10, 01.07.2010**

(24) Effective date for property rights:  
**01.07.2010**

Priority:

(22) Date of filing: **01.07.2010**

(45) Date of publication: **27.06.2011 Bull. 18**

Mail address:

**690022, g. Vladivostok, pr-t 100-letija  
Vladivostoka, 159, Uchrezhdenie Rossijskeoj  
akademii nauk Tikhookeanskij institut  
bioorganicheskoj khimii DVO RAN, zav.  
patentnym otdelom N.I. Stadnichenko**

(72) Inventor(s):

**Pivkin Mikhail Viktorovich (RU),  
Khudjakova Julija Vladimirovna (RU),  
Smetanina Ol'ga Fedorovna (RU),  
Kuznetsova Tat'jana Alekseevna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Uchrezhdenie Rossijskoj akademii nauk  
Tikhookeanskij institut bioorganicheskoj khimii  
Dal'nevostochnogo otdelenija RAN (TIBOKh  
DVO RAN) (RU)**

**(54) Penicillium simplicissimum (Oudem.) Thom FUNGUS STRAIN - SHERININE PRODUCER**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: *Penicillium simplicissimum* (Oudem.) Thom fungus strain is recovered from sea ground collected at depth 11 m of Amur Bay of the Sea of Japan; and it is deposited in the Russian National Collection of Microorganisms of G.K.Skryabin Institute of Microbial Biochemistry and Physiology of the Russian Academy of Sciences,

registration No. VKM F-4116D. The strain is cultivated with using a nutrient medium not containing sugars. Total yield of sherinines is 55 mg/l of the nutrient medium made of liquid wort and sea water, and 36.5 g in 1 kg of the nutrient medium containing millet.

EFFECT: strain is characterised by high-efficiency sherinines exhibiting anticancer activity.

1 tbl, 2 ex

Изобретение относится к биотехнологии и касается нового штамма гриба - продуцента шерининов D, E и F, обладающих противораковой активностью.

Известен штамм *Penicillium* sp., продуцирующий шеринины A, B, C [Belofsky G.N., Gloer J.B., Wicklow D.T., Dowd J.B. Antiinsectan alkaloids: sherinines A-C and a new paxilline derivative from the ascomata of *Eupenicillium shearii*. // *Tetrahedron*. 1995. Vol.51. N 14. P.3959-3968]. Недостатком известного штамма является низкий выход целевого продукта.

В качестве прототипа выбран известный продуцент шерининов D - K, обладающих блокирующей активностью кальций активируемых калиевых каналов, штамм гриба *Penicillium* sp. (strain НКІ0459), поскольку этот штамм, как и заявляемый штамм, получают в культуре [Xu M., Gessner G., Groth I., Lange C., Christner A., B. Torsten, e Deng Z., Li X., Heinemann S.H., Grabley S., Bringmann G., Sattlerb I.,\* and Lina W. Shearinines D-K, new indole triterpenoids from an endophytic *Penicillium* sp. (strain НКІ0459) with blocking activity on large-conductance calcium-activated potassium channels. // *Tetrahedron*. 2007. V.63. P.435-444]. К недостаткам известного штамма можно отнести его низкую продуктивность в отношении биологически активных веществ - 0,123 мг/л среды.

В связи с тем, что шеринины, относящиеся к группе индольных алкалоидов, обладают противораковой активностью, и поэтому представляют значительный интерес, как перспективные противораковые препараты, ставится задача получения продукта с более высоким выходом.

Поставленная задача решена выявлением нового штамма гриба *Penicillium simplicissimum*, продуцирующего шеринины, обладающие противораковой активностью.

Штамм *Penicillium simplicissimum* выделен из морского грунта, собранного на глубине 11 м Амурского залива (Японское море), и хранится в Коллекции Морских Микроорганизмов (КММ) Учреждения Российской академии наук Тихоокеанский институт биорганической химии ДВО РАН под номером 4635.

Штамм *Penicillium simplicissimum* (Oudem.) Thom депонирован Всероссийской коллекцией микроорганизмов ИБФМ им. Г.К.Скрябина РАН под регистрационным номером ВКМ F-4116D.

Штамм характеризуется следующими свойствами.

Культуральные и морфологические признаки.

Колонии, выращенные на среде Чапека, 5-7 см в диаметре, слегка войлочные, морщинистые в центре, по краю радиально-складчатые, с широким растущим краем, сначала белые, затем оранжево-красные, в конидиальной зоне зеленовато-серые; экссудат в мелких каплях, оранжевый или красный. Обратная сторона колонии оранжево-красная. Конидиеносцы поднимаются от субстрата 400-500×3,5 мкм, или от воздушных гиф 10-15×2-2,5 мкм, фиалиды 8-10×2 мкм, с длинной конидиогенной шейкой. Конидии эллипсоидные, шероховатые, 3-3,5 мкм длиной, в расходящихся или спутанных цепочках.

Колонии гриба при выращивании на среде «сусло-агар на натуральной морской воде» серые, зеленовато-серые. Реверзум не окрашенный или оранжевый.

Микроскопические признаки те же, что и на среде Чапека.

Физиолого-биохимические признаки.

Штамм хорошо растет и образует конидии как на агаризованных средах (картофельно-сахарозный (глюкозный), приготовленной на натуральной морской воде агар, агар Чапека), так и на жидких средах того же состава (в стационарной культуре и на качалке). На среде Чапека максимальный рост отмечен на среде с

мальтозой, на втором месте по усвояемости находятся сахароза и глюкоза. Из источников азота лучше всего усваиваются нитрат натрия и пептон. Среди источников углерода наибольшая интенсивность конидиообразования ( $1,6-2,8 \times 10^5$  конидий/см<sup>2</sup>) отмечена на средах с мальтозой сахарозой и глюкозой (таблица).

Таблица

Влияние источников азота и углерода на рост штамма *Penicillium simplicissimum* ВКМ F-4116D

Источники азота и углерода	Диаметр колонии, мм на 7 сутки роста	Продуктивность конидиообразования, конидий/см <sup>2</sup>	Морфолого-культуральные особенности колоний
Без сахаров	1,2±2,8	0,9×10 <sup>5</sup>	Хлопьевидные, белые
Мальтоза	5,5±0,0	2,8×10 <sup>5</sup>	Хлопьевидные, серо-зеленые, голубовато-зеленые
Сахароза	4,5±1,3	1,9×10 <sup>5</sup>	Хлопьевидные, серо-зеленые, радиально-складчатые
Глюкоза	4,3±2,3	1,6×10 <sup>5</sup>	Хлопьевидные, серо-зеленые, радиально-складчатые
Лактоза	2,7±1,5	1,2×10 <sup>5</sup>	Хлопьевидные, серо-зеленые
Галактоза	3,7±1,3	0,9×10 <sup>5</sup>	Хлопьевидные, серо-зеленые
Манит	2,6±2,3	0,6×10 <sup>5</sup>	Хлопьевидные, белые
NaNO <sub>3</sub>	4,2±1,4	0,9×10 <sup>5</sup>	Хлопьевидные, белые
Мочевина	5,9±2,5	0,2×10 <sup>5</sup>	Хлопьевидные, белые
Пептон	4,4±1,8	0,2×10 <sup>5</sup>	Хлопьевидные, белые
Аспарагин	3,6±1,2	0,6×10 <sup>5</sup>	Хлопьевидные, белые
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	3,5±1,7	0,9×10 <sup>5</sup>	Хлопьевидные, белые

Штамм хранится на картофельно-морковной среде (20 г картофеля, 20 г моркови, 1 л натуральной морской воды, 10 г агар-агара) под минеральным маслом [Семенов С.М. Лабораторные среды для актиномицетов и грибов. Справочник - М.: Агропромиздат, 1990. - 240 с.]. Время пересева - раз в три года.

Новый штамм продуцирует суммарное количество шерининов, обладающих противораковой активностью, с выходом  $55 \pm 2,4$  мг/л питательной среды «жидкое сусло на морской воде» и  $36,5 \pm 0,12$  г на 1 кг питательной «просяной» среды.

Технический результат штамма гриба *Penicillium simplicissimum* ВКМ F-4116D заключается в его более высокой продуктивности. Продуктивность этого штамма в десять раз превосходит продуктивность известного грибного штамма. Кроме того, преимуществом заявляемого штамма по сравнению с прототипом является то, что для его выращивания требуется среда с меньшим числом компонентов и, что особенно важно, не включает в себя сахаров. Затраты на сахара составляют основную статью расходов на выращивание культур в промышленных масштабах. Таким образом, производство штамма гриба *Penicillium simplicissimum* ВКМ F-4116D с экономической точки зрения более выгодно по сравнению с производством штамма-прототипа.

Новый штамм может использоваться для промышленного получения шерининов, обладающих противораковой активностью.

Изобретение иллюстрируется следующими примерами.

Пример 1. Штамм *Penicillium simplicissimum* ВКМ F-4116D выращивают методом глубинного культивирования на питательной среде «жидкое сусло на морской воде» следующего состава: сусло пивное неохмеленное, разбавленное натуральной морской водой до 4 градусов по Баллингу (в трипликате) (рН 7,8-8,2). Культивирование осуществляют при 22°C в колбах на качалке 180-200 об/мин в течение 168 часов.

Мицелий с культуральной жидкостью экстрагируют 24 часа этилацетатом. После выпаривания проводят делипидизацию путем приготовления эмульсии в системе вода-этанол (4:1) и последующей переэкстракцией 1:1 последовательно гексаном, затем хлороформом. Хлороформенный экстракт выпаривают и очищают на колонке с

силикагелем в градиенте гексан - этилацетат 100:0; 95:5; 90:10; 87:13; 85:15; 80:20. Фракции 2, 4, 5 и 7 содержат шеринины. Суммарный выход шерининов после выпаривания составляет 55 мг/л среды.

5 Пример 2. Штамм *Penicillium simplicissimum* ВКМ F-4116D выращивают методом твердофазного культивирования в течение трех недель при температуре 30°C на «просяной» питательной среде следующего состава: пшено 1 кг, натрий виннокислый 0,067 г,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,067 г,  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  0,067 г,  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  0,007 г, натуральная морская вода 134 мл. Выделение шерининов проводят описанным в  
10 примере 1 способом. Суммарный выход шерининов составляет  $36,5 \pm 0,12$  г на 1 кг среды.

Полученные шеринины были исследованы на противораковую активность. Шеринины А, D и Е индуцировали апоптоз клеток лейкемии линии HL-60 в  
15 концентрации 100  $\mu\text{M}$  на 10%, 39% и 34% соответственно.

#### Формула изобретения

Штамм гриба *Penicillium simplicissimum* (Oudem.) Thom ВКМ F-4116D - продуцент шерининов.  
20

25

30

35

40

45

50