



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 59472

(13) C2

(51) 7 C12P21/00/(C12P21/00,C12R1:125)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

## (54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ РЕЧОВИНИ З ПРОТИПУХЛИННОЮ АКТИВНІСТЮ

1

(21) 2001053528

(22) 25 05 2001

(24) 15 09 2003

(46) 15 09 2003, Бюл. № 9, 2003 р.

(72) Потебня Григорій Платонович, Танасієнко Ольга Андрівна, Черемшенко Надія Леонідівна, Лісовенко Галина Степанівна, Чехун Василь Федорович

(73) ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ПАТОЛОГІЇ, ОНКОЛОГІЇ І РАДІОБІОЛОГІЇ ІМ. Р.Є. КАВЕЦЬКОГО НАН УКРАЇНИ

(56) SU A1 3507803, 25 12 1997

RU C1 2112547, 10 06 1998

SU A1 1580614, 10 03 1997

2

SU A1 1622397, 23 01 1991

RU C1 2027763, 27 01 1995

(57) Спосіб одержання речовини з протипухлинною активністю шляхом культивування мікроорганізму, відокремлення культуральної рідини, осадження, спиртової екстракції і очищення, який відрізняється тим, що як штам-продуцент використовують штам *Bac subtilis* IMB B-7025, культивують протягом 4-9 діб в середовищі Гаузе або екстракти пшеничних висівок, осадження проводять 0,4M HCl при pH 3,0-4,0 з наступним витримуванням на холоді протягом 2-3 годин, а активну речовину екстрагують бутанолом у співвідношенні до води 2:1 з подальшим очищенням.

Винахід відноситься до медицини, а саме, до онкології, і стосується технології одержання лікарських речовин бактерійного походження з протипухлинною цитотоксичною активністю.

Відомо, що особливий інтерес для онкології викликають вуглеводзв'язуючі білки - лектини, які продукуються сапрофітними бактеріями *Bac subtilis* і мають широкий спектр біологічної активності. Вони забезпечують внутрішні та міжклітинні взаємодії, проявляють протипухлинні та імуномодуючі властивості.

Враховуючи, що бактерійні лектини за хімічною природою є білки або глікопротеїди, для одержання активної речовини з культуральної рідини застосовують загальноприйняті в хімії білків методи, які ґрунтуються на здатності останніх висолюватися із водних розчинів при додаванні сульфату амонію чи інших солей, осаджуватися кислотами, рідкими об'ємами етанолу, ацетону та ін.

Відомий спосіб одержання бактерійного лектину з протипухлинною активністю із штаму *Bac subtilis* 668 IMB [Заявка №94063420 C12P1/00. Штам *Bacillus subtilis* - продуцент позаклітинного сіалоспецифічного лектину / В'юницька В.О., Коваленко Е.О., Гетьман К.І. Заявлено 30.06.94]. Проте даний лектин не забезпечує необхідний рівень цитотоксичної та гематогінінної активності по відношенню до пухлинних клітин.

Найбільш близьким аналогом до способу що

заявляється є спосіб отримання речовини з протипухлинною активністю [Патент України №19910, МПК<sup>4</sup> C12P21/00 від 25.12.97. Пріор. 26.10.82. Бюл. №6, 1997]. Прототип характеризується тим, що в якості штама-продуцента речовини з протипухлинною активністю використовують штам *Bac mesentericus* AB-56, який культивують на м'ясо-пептонному бульйоні при 28-40°C протягом 5-6 діб. Культуральну рідину центрифугують при 5000об/хв протягом 20хв. В центрифугат додають 0,6% HCl до pH 3,0, сформований осад центрифугують і обробляють 80%-ним етиловим спиртом з додаванням 8% NaOH до pH 7,2-7,6. Через 1-24 год осад відокремлюють, а спиртовий екстракт випарюють і очищають. Протипухлинна цитотоксична активність одержаної речовини в концентрації 0,06мг/мл по відношенню до асцитних пухлинних клітин становить 60-80%. Вихід 6,8мг активної речовини з 1л культуральної рідини.

Однак відомим способом одержання речовини з протипухлинною активністю не можливо забезпечити 100%-ну протипухлинну цитотоксичну активність і високий вихід активної речовини. Крім цього, для культивування штаму необхідно використовувати дороге поживне середовище.

В основу винаходу, що заявляється, поставлено задачу вдосконалення способу одержання речовини з протипухлинною активністю шляхом підбору штама-продуцента та створення відповід-

(13) C2

(11) 59472

(19) UA

них умов його культивування і очистки культуральної рідини з тим, щоб забезпечити 100%-ну протипухлинну цитотоксичну активність по відношенню до пухлинних клітин, суттєво підвищити вихід активної речовини та знизити затрати на поживне середовище для культивування даного штаму-продуцента

Поставлена задача вирішується тим, що в якості штама-продуцента використовують штам *Bac subtilis* MB B-7025 [Заявка на винахід №2001042565 від 17 04 2001], культивують протягом 4-7 діб в середовищі Гаузе або екстракті пшеничних висівок, осадження проводять 0,4М HCL при pH 3,0-4,0 з наступним витримуванням на холоді протягом 2-3 год., а активну речовину екстрагують бутанолом у співвідношенні до води 2:1, з подальшим очищенням

Удосконалення відомого способу почали з того, що методами аналітичної селекції із штаму *Bac mesentericus* AB-56 одержали більш продуктивний штам *Bac subtilis* IMB B-7025, який синтезує цитотоксичні речовини з вищою протипухлинною активністю. Максимальний біосинтез цитотоксичних речовин штамом-продуцентом спостерігали на 4-5 добу в умовах періодичного культивування на качалках та на 6-9 добу в стаціонарних термостатних умовах при 28-40°C. Використання для культивування даного штаму дешевшого поживного середовища Гаузе, оптимізованого для синтезу лектинів, і середовища на основі пшеничних висівок, яке використовується для біосинтезу протеолітичних ферментів, підвищило гемаглютинуючу і гемолітичну активність культуральної рідини. Максимальне осадження активної речовини з культуральної рідини досягали додаванням до центрифугату 0,4М HCl при pH 3,0-4,0, а найкраще формування осаду - витримуванням на холоді протягом 2-3 годин. Повноту екстрагування активної речовини з осаду досягали бутанолом у співвідношенні до води 2:1

Спосіб одержання речовини з протипухлинною активністю здійснюють таким чином. Штам *Bac subtilis* IMB B-7025 культивують в напівсинтетичному середовищі Гаузе або екстракті пшеничних висівок при 28-40°C протягом 4-9 діб, культуральну рідину центрифугують 20 хвилин при 3000-5000об/хв для відокремлення мікробних клітин. До центрифугату культуральної рідини з pH 7,0-9,2 при постійному перемішуванні додають 0,4М розчин HCl до pH 3,0-4,0 і витримують на холоді 2-3 години. Спостерігається інтенсивне помутніння і випадання осаду, який відокремлюють від рідкої фази центрифугуванням при 5000об/хв протягом 10 хвилин. Надосадну рідину відкидають, а до осаду добавляють 80%-ний етиловий спирт та NaOH до pH 7,2-7,6. Одержаний екстракт концентрують в умовах вакууму до водного розчину і бутанолом екстрагують активну речовину. Повноту переходу активної речовини в органічну фазу досягають 3-4-кратною екстракцією при співвідношенні вода:бутиловий спирт 1:2. Із бутанольного концентрату по методу Блайя і Дайера виділяють ліпофільні речовини. Водну фракцію концентрують під вакуумом, обезсолюють шляхом діалізу проти дистильованої води або на сефадексі Г-25 і висушують в вакуумі до сухої речовини.

Протипухлинну цитотоксичну активність одержаної речовини по відношенню до пухлинних клітин визначали *in vitro* в цитотоксичній реакції, а гемолітичну і гемаглютинуючу активність на еритроцитах (миши, кроля) в реакції гемаглютинації. Речовина проявляла цитотоксичну активність по відношенню до асцитних пухлинних клітин різного походження (саркома-37, рак Ерліха, лімфома NK/Ly, лімфосаркома OH-2, плазмоцитома OH-3). Вона не тільки девіталізувала їх, але попередньо аглютинувала і частково лізувала пухлинні клітини, підсилюючи при цьому імуногенність останніх. Ця властивість речовини покладена в основу приготування протипухлинної вакцини, яка використовується при активній специфічній імунотерапії в онкології.

Аглютинуюча активність одержаної речовини по відношенню до еритроцитів і пухлинних клітин, а також цитотоксична дія на клітини з'являються пухлин свідчить про те, що вона належить до класу лектинів.

Для підтвердження лектинової природи і ідентичності речовин, одержаних при вирощуванні культури *Bac subtilis* IMB B-7025 на різних поживних середовищах, досліджені вуглеводзв'язуючі властивості. Дуже висока специфічність одержаної речовини до фруктозо-1,6-дифосфату - інгібуюча реакція гемаглютинації доза 0,05мМ до теперішнього часу не була відомою для лектинів. Високу спорідненість відмічено також до N-ацетилнейрамінової і D-глюкуронової кислот - інгібуючі реакцію гемаглютинації дози 1,9мМ і 7,5мМ, відповідно.

Суть способу пояснюють приклади конкретного виконання.

#### Приклад 1

Штам *Bac subtilis* IMB B-7025 культивують в поживному середовищі Гаузе при оптимальній температурі 5 діб в умовах періодичного культивування на качалках. Культуральну рідину центрифугують при 3000об/хв для відокремлення мікробних клітин. До центрифугату культуральної рідини з pH 8,0 при постійному перемішуванні додають 0,4М розчин HCl до pH 3,0 і витримують на холоді 2 години. Спостерігається інтенсивне помутніння і випадання осаду, який відокремлюють від рідкої фази центрифугуванням при 5000об/хв протягом 10 хвилин. Надосадну рідину відкидають, а до осаду добавляють 80%-ний етиловий спирт та NaOH до pH 7,2. Одержаний екстракт концентрують в умовах вакууму до водного розчину і бутанолом екстрагують активну речовину. Повноту переходу активної речовини в органічну фазу досягають 3-кратною екстракцією при співвідношенні вода:бутиловий спирт 1:2. Із бутанольного концентрату виділяють ліпофільні речовини. Водну фракцію концентрують під вакуумом, обезсолюють шляхом діалізу проти дистильованої води або на сефадексі Г-25 і висушують в вакуумі до сухої речовини.

Вихід речовини - 13,4мг з 1л культуральної рідини. Цитотоксична активність одержаної речовини в концентрації 0,06мг/мл по відношенню до пухлинних клітин становить 100%.

#### Приклад 2

Штам *Bac subtilis* IMB B-7025 культивують в

поживному середовищі Гаузе при оптимальній температурі 8 діб в стаціонарних термостатних умовах. Культуральну рідину центрифугують при 3000об/хв для відокремлення мікробних клітин. До центрифугату культуральної рідини з рН 8,0 при постійному перемішуванні додають 0,4М розчин HCl до рН 3,0 і витримують на холоді 2 години. Спостерігається інтенсивне помутніння і випадання осаду, який відокремлюють від рідкої фази центрифугуванням при 5000об/хв протягом 10 хвилин. Надосадау рідину відкидають, а до осаду добавляють 80%-ний етиловий спирт та NaOH до рН 7,2.

Одержаний екстракт концентрують в умовах вакууму до водного розчину і бутанолом екстрагують активну речовину. Повноту переходу активної речовини в органічну фазу досягають 3-кратною екстракцією при співвідношенні вода:бутиловий спирт 1:2. Із бутанольного концентрату виділяють ліпофільні речовини. Водну фракцію концентрують під вакуумом, обезсолюють шляхом діалізу проти дистильованої води або на сефадексі Г-25 і висушують в вакуумі до сухої речовини.

Вихід речовини - 13,5мг з 1л культуральної рідини. Цитотоксична активність одержаної речовини в концентрації 0,06мг/мл по відношенню до пухлинних клітин становить 100%.

#### Приклад 3

Штам *Bac subtilis* IMB B-7025 культивують в екстракті пшеничних висівок при оптимальній температурі 5 діб в умовах періодичного культивування на качалках. Культуральну рідину центрифугують при 3000об/хв для відокремлення мікробних клітин. До центрифугату культуральної рідини з рН 8,0 при постійному перемішуванні додають 0,4М розчин HCl до рН 3,0 і витримують на холоді 2 години. Спостерігається інтенсивне помутніння і випадання осаду, який відокремлюють від рідкої фази центрифугуванням при 5000об/хв протягом 10 хвилин. Надосадау рідину відкидають, а до осаду добавляють 80%-ний етиловий спирт та NaOH до рН 7,2.

Одержаний екстракт концентрують в умовах вакууму до водного розчину і бутанолом екстрагують активну речовину. Повноту переходу активної речовини в органічну фазу досягають 4-кратною екстракцією при співвідношенні вода:бутиловий спирт 1:2. Із бутанольного концентрату виділяють

ліпофільні речовини. Водну фракцію концентрують під вакуумом, обезсолюють шляхом діалізу проти дистильованої води або на сефадексі Г-25 і висушують в вакуумі до сухої речовини.

Вихід речовини - 27,5мг з 1л культуральної рідини. Цитотоксична активність одержаної речовини в концентрації 0,06мг/мл по відношенню до пухлинних клітин становить 100%.

#### Приклад 4

Штам *Bac subtilis* IMB B-7025 культивують в екстракті пшеничних висівок при оптимальній температурі 8 діб в стаціонарних термостатних умовах. Культуральну рідину центрифугують при 3000об/хв для відокремлення мікробних клітин. До центрифугату культуральної рідини з рН 8,0 при постійному перемішуванні додають 0,4М розчин HCl до рН 3,0 і витримують на холоді 2 години. Спостерігається інтенсивне помутніння і випадання осаду, який відокремлюють від рідкої фази центрифугуванням при 5000об/хв протягом 10 хвилин. Надосадау рідину відкидають, а до осаду добавляють 80%-ний етиловий спирт та NaOH до рН 7,2.

Одержаний екстракт концентрують в умовах вакууму до водного розчину і бутанолом екстрагують активну речовину. Повноту переходу активної речовини в органічну фазу досягають 4-кратною екстракцією при співвідношенні вода:бутиловий спирт 1:2. Із бутанольного концентрату виділяють ліпофільні речовини. Водну фракцію концентрують під вакуумом, обезсолюють шляхом діалізу проти дистильованої води або на сефадексі Г-25 і висушують в вакуумі до сухої речовини.

Вихід речовини - 27,3мг з 1л культуральної рідини. Цитотоксична активність одержаної речовини в концентрації 0,06мг/мл по відношенню до пухлинних клітин становить 100%.

Таким чином, заявлений спосіб одержання речовини з протипухлинною активністю дозволяє суттєво підвищити кількісний вихід активної речовини та забезпечити її 100%-ну протипухлинну цитотоксичну активність. При цьому знижуються затрати на поживне середовище, необхідне для культивування штаму-продуцента. Спосіб не вимагає додаткового спеціального обладнання і може широко застосовуватися при виробництві лікарських речовин бактерійного походження.