



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 56348

(13) C2

(51) 7 C12N1/20// (C12N1/20, C12R1:125)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД(54) ШТАМ БАКТЕРІЙ *BACILLUS SUBTILIS* - ПРОДУЦЕНТ ПРОТИПУХЛИННИХ ЦИТОТОКСИЧНИХ РЕЧОВИН

1

(21) 2001042565

(22) 17 04 2001

(24) 15 05 2003

(46) 15 05 2003, Бюл. № 5, 2003 р.

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

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

2

(56) RU 2106866, 20 03 1998

SU 16223397, 23 01 1991

JP 2000281700, 10 10 2000

Welchinskaya H V, Kuzmenko I I, Kudryavtseva I G et al. New molecular complexes of heterocyclic bis-adducts with bacterial lectins: synthesis and structure-activity relationship studies. Int J Biol Macromol - 1999, 26(4), p. 243-248

(57) Штам бактерій *Bacillus subtilis* IMB B-7025 - продуцент протипухлинних цитотоксичних речовин

Винахід відноситься до області мікробіології, а саме штамів бактерій *Bacillus subtilis* і може бути використаний для одержання біологічно активних речовин лектинової та протеазної природи з цитотоксичною активністю по відношенню до пухлинних клітин.

Відомі штами *Bac subtilis* 316M і *Bac polymyxa* 102 КДУ, які продукують біологічно активні речовини лектинової природи з протипухлинною активністю [1]. Однак продуктивність даних штамів не забезпечує необхідний рівень цитотоксичної протипухлинної активності.

Найбільш близьким штамом до запропонованого є штам *Bac subtilis* 668 1MB, який продукує біологічно активні речовини лектинової природи з цитотоксичною протипухлинною активністю по відношенню до карциноми Уокера, аденокарциноми молочної залози, саркоми 180 і саркоми 45 [2].

У порівнянні з вищеописаними штам *Bac subtilis* 668 1MB є більш ефективним по продукуванню протипухлинної лектинової активності. Однак використання цього штаму не завжди ефективне через недостатню високу його цитотоксичну протипухлинну активність.

В основу винаходу поставлена задача одержати більш продуктивний штам *Bac subtilis* (шляхом використання методів аналітичної селекції), який би синтезував цитотоксичні речовини з високою протипухлинною активністю.

Поставлена задача вирішена шляхом

одержання нового штаму *Bacillus subtilis*, який виділений методами аналітичної селекції із штаму *Bac mesentericus* АБ-56, депонований у колекції Інституту мікробіології та вірусології (1MB) НАН України під номером 1MB B-7025. Штам ідентифікований по «Краткому определителю бактерий» Бергі [3].

У результаті селекційної роботи вищезгаданий штам набуває таких культурально-морфологічних та фізіолого-біохімічних властивостей, які і забезпечують його високу продуктивність протипухлинних цитотоксичних речовин.

Культурально-морфологічні ознаки

Даний штам добре росте при температурі 28-40°C на МПБ, МПА, 5% екстракті вівсяних пластівців, 10% екстракті пшеничних висівків. Грампозитивна, паличковидна клітина, ширина - 0,7-0,8 мкм, довжина - 2-3 мкм, наявність ендоспор, які утворюються в присутності кисню, форма - овальна, клітини розташовуються поодинокі або ланцюжком.

Вирощуючи 24-48 годин на МПА, спостерігаємо дисоціацію колоній таких варіантів (типів): R-форма - плоска, шерохвата, матова, суха, порізаний край, розмір колоній 4-5 мм, O-форма - випукла, гладенька, сплизиста, рівний край, розмір колоній 3-4 мм, S-форма - плоска, гладенька, пастоподібна, злегка хвилястий край, розмір колоній 3-5 мм.

При культивуванні на рідких живильних

(13) C2

(11) 56348

(19) UA

середовищах (МПБ, 10% екстракт пшеничних висівок, 5% екстракт вівсяних пластівців) бактерії утворюють щільну поверхневу плівку. Оптимальні умови вирощування - температура 37°C, pH середовища 6,5-8,5. Фізіолого-біохімічні властивості:

Аероб. Гідролізує крохмал, зменшує в'язкість желатини, розкладає казеїн, утворює кислоту з глюкози. Генетичні особливості штаму (ауксотрофність) - неауксотрофний.

Даний штам продукує комплекс цитотоксичних лектинів та протеаз.

Культуральна рідина має вибірково антимікробну активність тільки у відношенні до *Bac megaterium* H, який властива антигенна схожість з пухлинними клітинами, та протипухлинну цитотоксичну і цитолітичну активність по відношенню до пухлинних клітин різного походження (саркома 37, аденокарцинома Ерліха, лімфома NK/Ly, лімфосаркома ОН-2, плазмацитома ОН-3, карцинома Л'юїс).

Ефективність процесів бактеріального біосинтезу залежить від багатьох причин. Суттєво впливають різні фактори зовнішнього середовища та умови культивування. Під впливом різних умов вирощування одна і та ж бактеріальна культура може повністю припинити утворення тих чи інших біологічно активних речовин і навпаки - одночасно продукувати різні сполуки.

До зовнішніх факторів, що впливають на біосинтетичну активність бактерій, відносяться склад поживного середовища, природа і концентрація джерел вуглецю і азоту, pH середовища, а також способи ведення процесу культивування. Для відпрацювання режиму культивування *Bac subtilis* 1MB B-7025 ми використали загальноприйняте стандартне середовище - м'ясо-пептонний бульон (МПБ).

Суттєвий вплив на біосинтез цитотоксичних речовин чинить вік і кількість посівного матеріалу. Для засіву живильного середовища МПБ використовували вегетативні (20-24-годинні) форми культури, попередньо вирощені в стаціонарних умовах при 37°C. Одержану культуру вносили в середовище для культивування в кількості від 1,5 до 15% (об'ємних) і визначали в динаміці інтенсивність накопичення синтезованих цитотоксичних речовин. З одержаних даних було встановлено, що максимальний біосинтез цитотоксичних речовин продуцентом спостерігався при використанні 7-10% посівного матеріалу.

При вирощуванні штаму *Bac subtilis* 1MB B-7025 в стаціонарних умовах в термостаті оптимальні параметри біосинтезу цитотоксичних речовин були майже такими, як і в умовах періодичного культивування з тією тільки різницею, що ріст і розвиток продуценту в термостаті, тобто накопичення активних речовин, подовжувалось в часовому проміжку.

В подальших дослідженнях нами було встановлено, що цитотоксична дія культуральної рідини *Bac subtilis* 1MB B-7025 на пухлинні клітини складається з двох етапів: на першому етапі інкубації - пухлинні клітини аглютинуються,

утворюючи конгломерати клітин, на другому - при більш тривалій інкубації відбувається лізис пухлинних клітин. Це може свідчити про те, що культуральна рідина має як аглютинуючу, так і ферментативну активність, в даному випадку протеолітичну, тобто є біфункціональною або містить, як мінімум, дві речовини з різною біологічною активністю.

Виходячи з цього, для культивування даного штаму нами були досліджені поживні середовища, оптимізовані для синтезу лектинів - напівсинтетичне середовище Гаузе, і середовище на основі пшеничних висівок - 10% екстракт, яке використовують для біосинтезу протеолітичних ферментів.

В процесі росту *Bac subtilis* 1MB B-7025 на досліджуваних живильних середовищах вивчали гемаглютинуючу активність (ГАА) культуральної рідини на еритроцитах кролика [4] і цитотоксичну активність *in vitro* на асцитних клітинах саркоми 37 та аденокарциноми Ерліха [5].

Порівняльне вивчення динаміки накопичення цитотоксичних речовин в культуральній рідині *Bac subtilis* 1MB B-7025 показало, що вони синтезуються на всіх досліджуваних середовищах.

Пік цитотоксичної дії на пухлинні клітини культуральної рідини бактерій, які вирощені на всіх трьох поживних середовищах (МПБ, Гаузе і 10% екстракт пшеничних висівок), спостерігаємо на 5-7 добу росту культури, однак кількісне співвідношення синтезованих цитотоксичних речовин, а можливо і їх природа, різні.

Суть винаходу підтверджують приклади (1,2), таблиці (1-3) і рисунки (1,2).

Приклад 1

Культуральна рідина бактерій, культивованих на МПБ і середовищі Гаузе, в перші 10-15 хвилин інкубації з пухлинними клітинами аглютинувала 90-100% їх, а в кінці інкубації викликала повний або частковий лізис пухлинних клітин (табл. 1,2). Для дослідження гемаглютинуючих властивостей культуральної рідини використовували реакцію гемаглютинації, в основі якої лежить специфічне зв'язування лектинів з розміщеними на поверхні еритроцитів вуглеводами і виражали як титр РГА (рис. 1,2).

На рис. 1 та 2 показана порівняльна характеристика лектинової активності культуральної рідини прототипу - штаму *Bac subtilis* 668 1MB та заявляемого штаму *Bac subtilis* 1MB B-7025. Як бачимо з наведених графіків, ГАА культуральної рідини заявляемого штаму була в 2 рази вищою у порівнянні з ГАА культуральної рідини штаму прототипу.

Приклад 2

Культуральна рідина бактерій, які вирощували на 10% екстракті пшеничних висівок, проявляла 100%-ну лізуючу дію на пухлинні клітини при повній відсутності аглютинуючої активності по відношенню до останніх (табл. 3). Це пов'язано з синтезом на даному середовищі окрім цитотоксичних речовин з лектиновою активністю, також речовин з протеолітичною активністю. Підтвердженням цього є наявність в культуральній рідині загальної протеолітичної

активності, виявленої електрофоретичне з
використанням желатини в якості субстрату [6]

Таблиця 1

Цитотоксична та аглютинуюча активність культуральної
рідини *Bac subtilis* 1MB B-7025 при культивуванні на середовищі МП

Доба	Культуральна рідина	Кількість пухлинних клітин (%)		
		девіталізо-ваних	лізованих	аглютинованих
1	нативна	0	0	0
	1 2	0	0	0
2	нативна	60	0	60
	1 2	30	0	10
3	нативна	100	40	90
	1 2	40	0	40
4	нативна	100	50	98
	1 2	45	0	55
5	нативна	100	100	100
	1 2	90	40	60
6	нативна	100	100	100
	1 2	90	90	85
7	нативна	100	100	100
	1 2	100	80	90
8	нативна	100	100	100
	1 2	70	40	90
9	нативна	100	100	98
	1 2	50	50	85
10	нативна	100	100	95
	1 2	70	50	80

Таблиця 2

Цитотоксична та аглютинуюча активність культуральної
рідини *Bac subtilis* 1MB B-7025 при культивуванні на середовищі Гаузе

Доба	Культуральна рідина	Кількість пухлинних клітин (%)		
		девіталізо-ваних	лізованих	аглютинованих
1	нативна	0	0	40
	1 2	0	0	0
2	нативна	0	0	70
	1 2	0	0	20
3	нативна	98	45	98
	1 2	15	0	45
4	нативна	100	100	100
	1 2	15	10	40
5	нативна	100	100	100
	1 2	20	20	60
6	нативна	100	100	100
	1 2	20	20	70
7	нативна	100	100	100
	1 2	30	30	90
8	нативна	100	100	98
	1 2	20	20	90
9	нативна	100	100	98
	1 2	15	15	85
10	нативна	100	100	95
	1 2	10	10	80

Таблиця 3

Цитотоксична та аглютинуюча активність культуральної рідини *Bac subtilis* 1MB B-7025 при культивуванні на 10% екстракті пшеничних висівків

Доба	Культуральна рідина	Кількість пухлинних клітин (%)		
		девіталізованих	лізованих	аглютинованих
1	нативна	0	0	0
	1 2	0	0	0
2	нативна	95	85	0
	1 2	10	20	0
3	нативна	100	100	0
	1 2	95	20	0
4	нативна	100	100	0
	1 2	98	30	0
5	нативна	100	100	0
	1 2	100	35	0
6	нативна	100	100	0
	1 2	100	80	0
7	нативна	100	100	0
	1 2	100	60	0
8	нативна	100	60	0
	1 2	100	15	0
9	нативна	100	60	0
	1 2	70	10	0
10	нативна	65	60	0
	1 2	50	10	0

Таким чином, заявляемый штам *Bac subtilis* 1MB B-7025 продукує цитотоксичні протипухлинні речовини при використанні всіх досліджуваних поживних середовищ (МПБ, Гаузе, 10% екстракт пшеничних висівків). Це свідчить про те, що штам не вимогливий до поживних речовин, необхідних для біосинтезу біологічно активних речовин, що дає можливість використовувати доступні і дешеві поживні середовища. Культуральна рідина штаму має біфункціональну активність аглютинуючу та ферментативну по відношенню до пухлинних клітин.

При вирощуванні штаму на середовищах МПБ і Гаузе культуральна рідина аглютиновала 90-100% пухлинних клітин (що було пов'язано з синтезом на даних середовищах цитотоксичних речовин з лектиновою активністю) і проявляла 100% лізуючу дію на пухлинні клітини при культивуванні штаму на 10% екстракті пшеничних висівків (що пов'язано з синтезом на даному середовищі цитотоксичних речовин з протеолітичною активністю). Гемаглютинуюча активність культуральної рідини заявляемого штаму була в 2 рази вищою у порівнянні з гемаглютинуючою активністю культуральної рідини штаму прототипу.

Отже заявляемый штам *Bac subtilis* 1MB B-

7025 є більш ефективним відносно синтезу продукування протипухлинних цитотоксичних речовин в порівнянні з прототипом.

Використані джерела

1 Коваленко ЕО. Позаклітинні лектини бактерій роду *Bacillus*. Дис докт біол наук, Київ, 1999.

2 Welchinskaya NV, Kuzmenko II, Kudryavtseva IG, et al. New molecular complexes of heterocyclic bis-adducts with bacterial lectins: synthesis and structure-activity relationship studies. *Int J Biol Macromol* 1999;26(4), p243-8.

3 Bergey's manual of determinative bacteriology - Edition 8-th/ Ed Buchanan PE, Gibbons KE - Baltimore, Williams S Wilkins, 1974 1268p.

4 Луцик МД, Панасюк ЕН, Луцик АД. Лектины. Львов: Вища школа, 1981. 155с.

5 Айзенман БЕ, Мандрик ТП, Швайгер МО. Быстрый метод выявления in vitro поврежденных и мертвых клеток карциномами Эрлиха. *Антибиотики* 1960, N3 97-102.

6 Moll UM, Youngleib GL, Rosinsky KB, Quigley JP. Tumor promoter-stimulated Mr 92000 gelatinase secreted by normal and malignant human cells. Isolation and characterization of enzyme from HT 1080 tumor cells. *Cancer Res* 1990, 58(19) 6162-70.

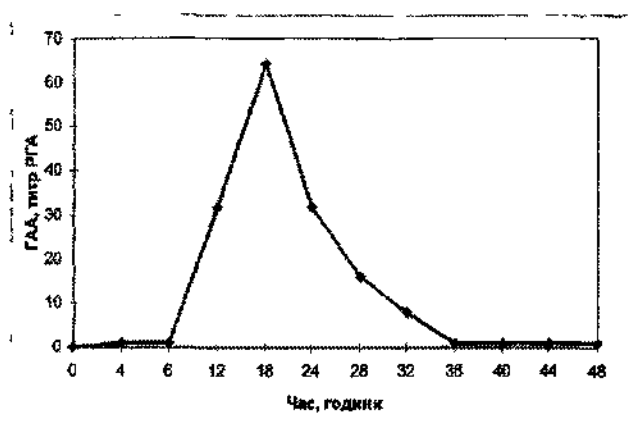


Рис.1. Динаміка виявлення лектинової активності в культуральній рідині штаму *Bac.subtilis* 668 IMB при вирощуванні на середовищі Гаузе (прототип).

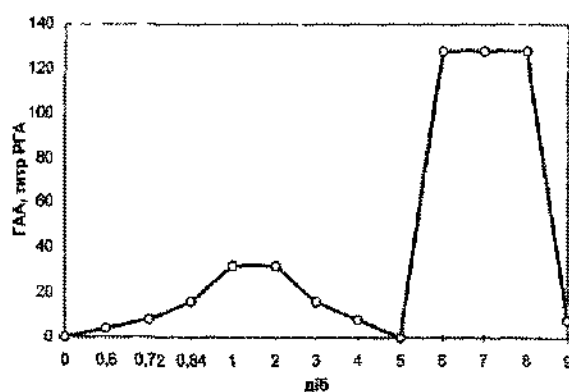


Рис.2. Динаміка виявлення лектинової активності в культуральній рідині штаму *Bac.subtilis* IMB B-7025 при вирощуванні на середовищі Гаузе (заявляємий).