



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2005132292/13, 19.10.2005

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
19.10.2005

(45) Опубликовано: 27.03.2007 Бюл. № 9

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: US 8395P, 28.09.1993. RU 2252957 C1,
27.05.2005. CA 2331471, 20.07.2001.

Адрес для переписки:

167982, г.Сыктывкар, ул. Коммунистическая,
28, Институт биологии Коми НЦ УрО РАН, пат.
пов. Л.Б. Печерской

(72) Автор(ы):

Филиппова Валерия Николаевна (RU),
Володина Светлана Олеговна (RU),
Смоленская Ирина Николаевна (RU),
Зориняц Светлана Эдуардовна (RU),
Ануфриева Эмилия Николаевна (RU),
Носов Александр Михайлович (RU),
Володин Владимир Витальевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Институт биологии Коми научного центра
Уральского отделения Российской академии
наук (RU)

(54) ШТАММ КУЛЬТИВИРОВАННЫХ КЛЕТОК РАСТЕНИЙ *AJUGA REPTANS L.*

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии и
может быть использовано в медицинской, пищевой
и парфюмерной промышленности. Штамм E IVk

суспензионной культуры растительных клеток *Ajuga reptans L.* N 63 - продуцент экдистероидов. Изобретение позволяет эффективно получить экдистероиды. 2 ил.

RUSSIAN FEDERATION



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(19) **RU** (11) **2 296 154** (13) **C1**

(51) Int. Cl.

C12N 1/00 (2006.01)

A61K 35/66 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: **2005132292/13, 19.10.2005**

(24) Effective date for property rights: **19.10.2005**

(45) Date of publication: **27.03.2007 Bull. 9**

Mail address:

**167982, g.Syktyvkar, ul. Kommunisticheskaja,
28, Institut biologii Komi NTs UrO RAN, pat.
pov. L.B. Pecherskoj**

(72) Inventor(s):

**Filippova Valerija Nikolaevna (RU),
Volodina Svetlana Olegovna (RU),
Smolenskaja Irina Nikolaevna (RU),
Zorinjants Svetlana Ehduardovna (RU),
Anufrieva Ehmilija Nikolaevna (RU),
Nosov Aleksandr Mikhajlovich (RU),
Volodin Vladimir Vital'evich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Institut biologii Komi nauchnogo tsentra
Ural'skogo otdelenija Rossijskoj akademii
nauk (RU)**

(54) **STRAIN OF THE CULTURED CELLS OF PLANTS AJUGA REPTANS L**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnological methods.

SUBSTANCE: invention is intended for use in medicinal, food processing, and perfumery industries and provides strain E IVk of

suspension culture of cells of plants Ajuga reptans L. N 63 is producer of ecdisteroids.

EFFECT: enabled preparation of ecdisteroids.
2 dwg

RU 2 2 9 6 1 5 4 C 1

RU 2 2 9 6 1 5 4 C 1

Изобретение относится к биотехнологии и может быть использовано в медицинской, пищевой и парфюмерной промышленности.

В настоящее время проводятся интенсивные исследования по получению фитозэкдистероидов из лекарственного растительного сырья (Фитозэкдистероиды / Под ред. В.В.Володина. Санкт-Петербург: Наука, 2003, 293 с.; Патент РФ №2153346, МКИ А 61 К 35/78. Способ получения экдистероидов / В.В.Володин, С.О.Володина; Патент РФ №2155599, МКИ А 61 К 35/78. Способ выделения индивидуальных соединений из смеси экдистероидов из надземной части растений *Serratula coronata*/ В.В.Володин, С.О.Володина).

Для этих соединений показана перспектива использования в составе актопротекторных, сахароснижающих и ранозаживляющих препаратов, тонизирующих пищевых добавок и косметических композиций (Фитозэкдистероиды / Под ред. В.В.Володина. Санкт-Петербург: Наука, 2003, 293 с.; Патент РФ №2119331, МКИ А 61 К 9/06, 35/78. Средство для лечения ожоговых ран "Витадерм" / В.Н.Дармограй, С.М.Потехинский и др.; Patent EP 0436650, МКИ А 61 К N 7/00. Meybeck A., Bonte F., Phases lamellaires lipidiques hydratees on liposomes a base d'ecdysteroides.; Патент РФ №1561263, МКИ А 61 К 35/78. Способ лечения инсулинзависимого сахарного диабета. / М.И.Косовский, В.Н.Сыров и др.)

Альтернативой растительному сырью могут служить культивируемые клетки растений. Известные штаммы культивируемых клеток экдистероидсодержащих растений, описанные в литературе, не продуцируют эти соединения в условиях *in vitro* либо продуцируют в концентрациях, более низких, чем дикорастущие или интродуцированные виды растений (Tomas J., Camps F., Claveria E., Coll J., Mele E., Messeguer J. Composition and location of phytoecdysteroids in *Ajuga reptans* in vivo and vitro cultures// *Phytochemistry*. 1992. V.31. No5. P.1585-1591). Ссылки на депонирование штаммов экдистероидсодержащих растений в доступных коллекциях отсутствуют.

Задачей настоящего изобретения является получение активно растущего штамма суспензионной культуры растительных клеток живучки ползучей (*Ajuga reptans* L.), характеризующегося высоким содержанием фитозэкдистероидов.

Штамм *Ajuga reptans* E IVk депонирован в Российскую коллекцию клеток высших растений при Институте физиологии им. К.А.Тимирязева РАН под коллекционным номером 63.

Описание исходного материала. Источником получения штамма суспензионной культуры *Ajuga reptans* служила длительно культивируемая каллусная культура, которая была получена в 1993 г. в лаборатории биохимии и биотехнологии растений Института биологии Коми НЦ УрО РАН из корня стерильного растения живучки ползучей, выращиваемой в научной коллекции указанного Института. Каллусную культуру выращивали на модифицированной среде Мурасиге-Скуга, с добавлением сахарозы - 30 г/л; 2,4-Д - 1 мг/мл; БАП - 0,2 г/мл; мезо-инозита - 100 мг/л и витаминов по Стаба, мг/л: фолиевой кислоты - 0,5; рибофлавина (B2) - 0,5; биотина - 1,0; Са-пантотената - 1,0; кобаламина (B 12) - 0,0015. рН до автоклавирования - 5,8. Для получения суспензионных культур каллусную культуру переносили в жидкую питательную среду, идентичную по составу среде, на которой культивировались каллусные культуры, с исключением агара. Примерно через две недели суспензионную культуру фракционировали, используя отстаивание в течение 1-2 мин (отбирали среднюю фракцию). Суспензии выращивали в конических колбах объемом 500 мл, с 60-70 мл среды при 25-26°C, относительной влажности воздуха 60%, в темноте, на качалке, 90-100 качаний в минуту. Установлен следующий режим пересева: 12±1,5 мл инокулюма на 100 мл среды. Интервал субкультивирования - 12-14 дней.

Культуральные свойства штамма.

Характер роста: суспензия белого цвета, индекс роста по сырой биомассе - 13,02±0,32, по сухой биомассе - 12,69±0,83. Удельная скорость роста по сырой биомассе - 0,36±0,03 сут⁻¹, по сухой биомассе - 0,32±0,03 сут⁻¹, по числу клеток - 0,31±0,03 сут⁻¹. Число живых клеток - 88-92%.

Цитологическая характеристика. В суспензионной культуре живучки ползучей содержание крупных агрегатов (>50 клеток в агрегате) в течение цикла культивирования изменялось от 14,6 до 63,5%, доля мелких агрегатов (1-4 и 5-20 клеток в агрегате), наоборот, уменьшалось. На фиг.1 представлена агрегированность суспензионной культуры

5 *Ajuga reptans* с циклом культивирования одна неделя

Кариологическая характеристика.

По литературным данным (Болховских З.В., Гриф В.Г., Захарьева О.И., Матвеева Т.С. Хромосомные числа цветковых растений. Л.: Наука, - 1969) число хромосом в клетках меристемы корня интактного растения *Ajuga reptans* $2n=32$. Анализ распределения числа хромосом в клетках суспензионной культуры корня *Ajuga reptans* выявил большую

10 вариабельность уровня плоидности. На фиг.2 представлено распределение числа хромосом в клетках суспензионной культуры *Ajuga reptans*.

В популяции клетки с числом хромосом, близким к диплоидному ($2n=30-34$), составляют всего 11%. В процессе длительного культивирования происходит редукция числа хромосом: модальный класс (40% популяции) представлен анеуплоидными клетками с

15 числом хромосом 25-29. Обнаружены также клетки с более низким числом хромосом 20-24 и <20 хромосом. В популяции суспензионной культуры имеются и анеуплоидные клетки с числом хромосом, значительно превышающим диплоидное: от 35 до 55 и выше. Доля таких клеток составляет приблизительно 30%.

20 Характеристика биосинтеза экидистероидов в суспензионной культуре клеток.

Анализ биомассы клеток на содержание экидистероидов проводили методом обращенно-фазной ВЭЖХ на аналитической системе ВЭЖХ Varian, Pro Star (США).

Состав элюента: вода - ацетонитрил (100:20), скорость элюирования 1,5 мл/мин; $\lambda=242$ нм; колонка Diasorb C₁₆/T (150×4 мм; 7 мкм). Основным компонентом клеточной биомассы,

25 как и в интактных растениях, является 20-гидроксиэкидизон (используется в качестве субстанции известного тонизирующего препарата "Экидистен"). В проанализированных образцах биомассы присутствовали минорные количества полиподина В, 29-

норгсенгостерона и аюголактона, также характерные для интактных растений живучки ползучей. Динамика накопления экидистероидов в цикле выращивания носит периодический

30 характер. Максимум синтеза экидистероидов приходился, как правило, на конец экспоненциальной фазы (в среднем 0,5%). В первые дни культивирования наблюдалось снижение уровня биосинтеза 20Е. В течение экспоненциальной фазы роста наблюдались всплески биосинтетической активности.

Пример конкретного выполнения.

35 Штамм суспензионной культуры растительных клеток живучки ползучей культивируют на среде указанного выше состава при 26°C в темноте. В фазу замедления роста (12-14 сутки) биомассу клеток отделяют от жидкой среды фильтрованием под вакуумом. 500 г сырой биомассы промывают дистиллированной водой и разрушают гомогенизатором при скорости 15 тыс. об/мин в течение 5 минут при комнатной температуре. В гомогенат

40 добавляют двойной объем водного этанола или метанола. Экстракцию проводят в течение 2 часов при перемешивании при температуре 20-40°C. После отделения осадка проводят вторичную экстракцию биомассы водным этанолом или метанолом. Экстракты объединяют и упаривают под вакуумом. Сгущение экстракта проводят не досуха, а оставляют 10% от

45 исходного количества жидкой фазы. Остаток трижды экстрагируют гексаном для удаления побочных веществ липидной природы, а затем дважды смесью этилацетат:метанол для извлечения целевого продукта. Органические извлечения упаривают досуха, наносят на оксид алюминия и проводят колоночную хроматографию смесью хлороформ-метанол

50 возрастающей полярности. Определение целевых фракций, содержащих сумму экидистероидов, проводят с помощью ТСХ и ВЭЖХ-хроматографии. Целевые фракции упаривают и перекристаллизовывают в смеси этилацетат-метанол 9:1. Получают 0,03 г 20-

гидроксиэкидизона (чистота продукта - 92%), содержащего в качестве сопутствующих экидистероидов - полиподин В, 29-норгсенгостерон и аюголактон, в минорных концентрациях. По своему составу экидистероидный препарат, выделенный из биомассы

культивируемых клеток, идентичен препарату, получаемому из нативных растений серпухи венценосной, что указывает на возможность использования суспензионной культуры клеток в качестве альтернативного источника 20-гидроксиэкдизона - субстанции актопротекторных и тонизирующих экдистероидсодержащих лекарственных препаратов.

5

Формула изобретения

Штамм E IVk суспензионной культуры растительных клеток *Ajuga reptans* L. N 63 - продуцент экдистероидов (Российская коллекция клеток высших растений при Институте физиологии им. К.А.Тимирязева РАН).

10

15

20

25

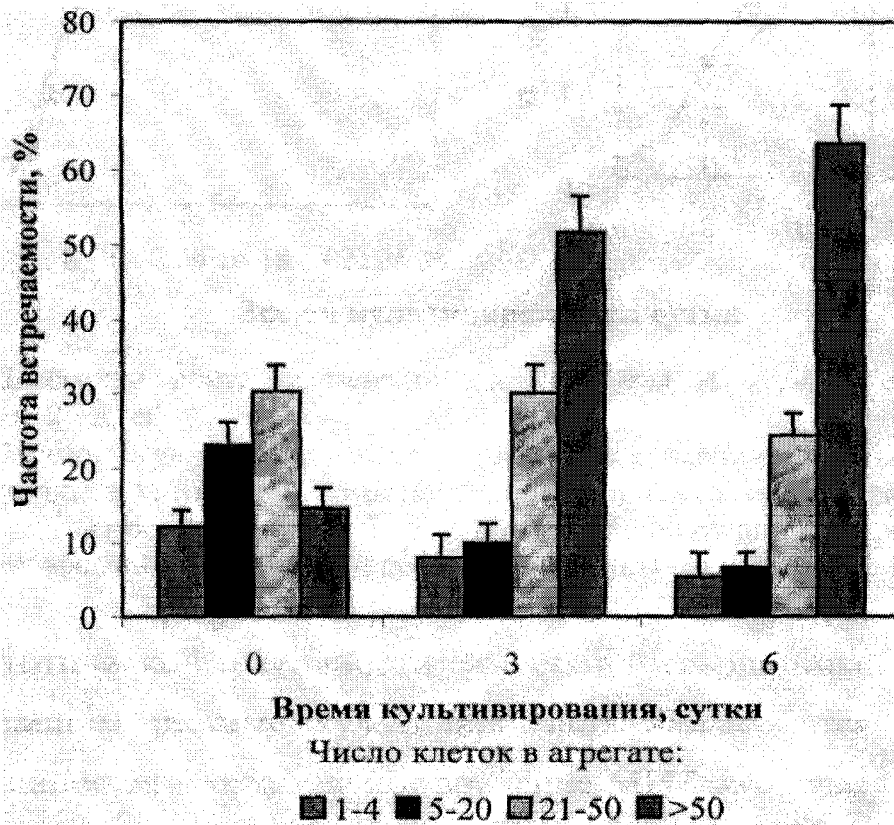
30

35

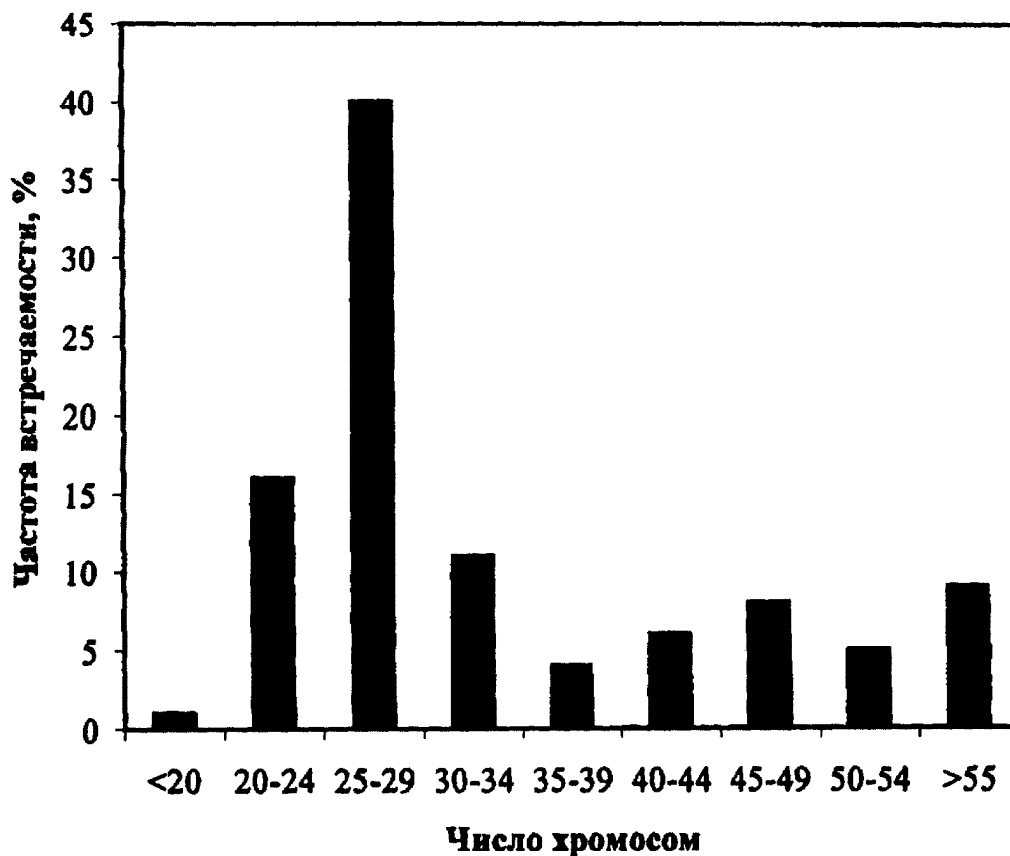
40

45

50



Фиг. 1



Фиг. 2