



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **120572** (13) **C2**
(51) МПК
C12N 1/20 (2006.01)
C12R 1/125 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: **a 2018 09698**
(22) Дата подання заявки: **27.09.2018**
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **26.12.2019**
(41) Публікація відомостей про заявку: **11.03.2019, Бюл.№ 5**
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **26.12.2019, Бюл.№ 24**

(72) Винахідник(и):
**Чехун Василь Федорович (UA),
Діденко Геннадій Васильович (UA),
Черемшенко Надія Леонідівна (UA),
Круць Олена Олександрівна (UA),
Базась Володимир Миколайович (UA),
Восійкова Ірина Михайлівна (UA),
Федосова Наталія Іванівна (UA),
Караман Ольга Михайлівна (UA)**

(73) Власник(и):
**ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ПАТОЛОГІЇ,
ОНКОЛОГІЇ І РАДІОБІОЛОГІЇ ІМ. Р.Є.
КАВЕЦЬКОГО НАН УКРАЇНИ,
вул. Васильківська, 45, м. Київ, 03022 (UA)**

(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
UA 56348 C2, 15.05.2003
KR 20130071098 A, 28.06.2013
KR 20120014885 A, 20.02.2012
UA 80995 C2, 26.11.2007
UA 103574 C2, 25.10.2013
Abdel-Fattah A. M. et al. Antitumor and antioxidant activities of levan and its derivative from the isolate *Bacillus subtilis* NRC1aza. *Carbohydrate Polymers*, 2012, Vol. 89, P. 314– 322
Бомбін А.В. та ін. Підвищення ефективності лікування хворих зі злоякісними пухлинами головного мозку при застосуванні протипухлинної аутовакцини. *Онкологія*. 2008, Том. 10, №4, С. 455-460
UA 42865 C2, 15.11.2001
UA 80995 C2, 26.11.2007
UA 95357 C2, 25.07.2011
RU 21106866 C1, 20.03.1998
Діденко Г.В. та ін. Оптимізація методів виділення, електрофоретична характеристика та протипухлинна ефективність цитотоксичних метаболітів із фільтрату культуральної рідини *Bacillus subtilis* В-7025. *Доповіді Національної академії наук України*, 2012, №7, С. 185-190

(54) ШТАМ БАКТЕРІЙ *BACILLUS SUBTILIS* ІМВ В-7724 - ПРОДУЦЕНТ ЦИТОТОКСИЧНИХ РЕЧОВИН З ПРОТИПУХЛИННОЮ ДІЄЮ

(57) Реферат:

Винахід стосується штаму *Bacillus subtilis* ІМВ В-7724, що є продуцентом цитотоксичних речовин з протипухлинною дією, що зареєстрований у Депозитарії Інституту мікробіології та вірусології (ІМВ) ім. Д.К. Заболотного НАН України за номером ІМВ В-7724.

UA 120572 C2

Корисна модель, що заявляється, належить до галузі мікробіології і біотехнології, а саме культивування мікроорганізмів - штамів бактерій *Bacillus subtilis*, і може бути використаний для одержання біологічно активних речовин лектинової та протеазної природи з цитотоксичною активністю відносно до пухлинних клітин.

5 Відомі штами *Bacillus subtilis* IMB 7025, *Bacillus subtilis* 316M та *Bacillus polymyxa* 102 КДУ, які продукують біологічно активні речовини лектинової та протеазної природи з протипухлинною активністю [1]. Проте, їх продуктивність не забезпечує необхідний рівень останньої.

Найбільш близьким штамом до запропонованого є *Bacillus subtilis* IMB B-7025 [2], який продукує біологічно активні речовини лектинової природи з цитотоксичною протипухлинною активністю відносно до пухлинних клітин різного гістогенезу (саркома 37, аденокарцинома Ерліха, лімфома NK/Ly, лімфосаркома ОН-2, плазмцитома ОН-3, карцинома легені Льюїс). Порівняно з вищевказаними штамми *Bacillus subtilis* IMB B-7025 продукує більшу кількість речовини лектинової природи. Однак його використання не завжди ефективно через недостатню високу протипухлинну активність.

15 В основу корисної моделі була поставлена задача одержати штам *Bacillus subtilis*, більш ефективний та стабільний по продукуванню цитотоксичної речовини, зокрема лектинової та протеазної природи, з високою протипухлинною активністю.

Поставлена задача вирішена шляхом одержання за допомогою методів аналітичної селекції нового штаму *Bacillus subtilis*. Новий штам виділений із штаму *Bacillus subtilis* Z шляхом відбору окремих колоній з підвищеною здатністю до продукції цитотоксичних речовин при культивуванні в конкурентних умовах із штамми мікроорганізмів *Streptococcus pyogenis* та *Serratia marcescens* і депонований у колекції Інституту мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного (IMB) НАН України під номером IMB B-7724 (Свідоцтво про первісне депонування штаму мікроорганізму від 12.03.2018 року). Штам ідентифікований за "Кратким определителем бактерий Берги" [3]. В результаті селекційної роботи даний штам набуває таких культурально-морфологічних та фізіолого-біохімічних властивостей, які забезпечують його здатність до високої продуктивності цитотоксичних речовин з протипухлинною активністю.

Культурально-морфологічні ознаки. Даний штам *Bacillus subtilis* добре росте при температурі 28-40 °С на м'ясо-пептонному бульйоні (МПБ), м'ясо-пептонному агарі (МПА), напівсинтетичному середовищі Гаузе, 10 % екстракті пшеничних висівок. Мікроорганізм являє собою грампозитивну, паличковидну клітину шириною 0,7-0,8 мкм та довжиною 2-3 мкм; характерною ознакою є наявність ендоспор, які утворюються в присутності кисню, форма - овальна. Клітини розташовуються поодинокі або ланцюжком.

Оптимальні умови вирощування наступні: температура 37 С; рН середовища 6,5-8,5.

35 При вирощуванні протягом 24-48 год. на твердому живильному середовищі (МПА) спостерігається дисоціація колоній наступних варіантів/типів: R-форма - пласка, з шорсткою поверхнею, матова, суха, має порізаний край, розмір колоній 4-5 мм; O-форма - випукла, гладенька, слизиста, має рівний край, розмір колоній 3-4 мм; S-форма - пласка, гладенька, пастоподібна, має злегка хвилястий край, розмір колоній 3-5 мм.

40 При культивуванні на рідких живильних середовищах (МПБ, середовище Гаузе, 10 % екстракт пшеничних висівок) бактерії утворюють щільну поверхневу плівку.

Фізіолого-біохімічні властивості. Мікроорганізм має аеробні властивості, гідролізує крохмаль, зменшує в'язкість желатини, розкладає казеїн, утворює кислоту з глюкози. Генетичні особливості штаму (ауксотрофність) - неауксотрофний. Даний штам продукує комплекс цитотоксичних лектинів та протеаз.

45 Культуральна рідина має антимікробну активність відносно до *St. aureus* (в розведенні 1:100), аглютинуючу активність до еритроцитів крові та протипухлинну цитотоксичну і цитолітичну активність відносно до пухлинних клітин різного гістогенезу (аденокарциноми Ерліха, карциносаркоми Уокер, карциноми легені Льюїс, меланоми B-16).

50 На ефективність процесів бактеріального біосинтезу суттєво впливають фактори зовнішнього середовища та умови культивування. За 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, належать склад поживного середовища, природа і концентрація джерел вуглецю і азоту, рН середовища, а також способи ведення процесу культивування.

60 Для відпрацювання режиму культивування *Bacillus subtilis* IMB B-7724 використано загальноприйняте стандартне середовище - МПБ та напівсинтетичне середовище Гаузе. Суттєвий вплив на біосинтез цитотоксичних речовин чинить вік і кількість посівного матеріалу. Для засіву живильного середовища (МПБ та середовище Гаузе) використовували вегетативні

(20-24-годинні) форми культури, попередньо вирощені в стаціонарних умовах при 37 °С. 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. Встановлено, що максимальний біосинтез цитотоксичних речовин продуцентом спостерігався при використанні 7-10 % посівного матеріалу.

Оптимальні параметри біосинтезу цитотоксичних речовин при вирощуванні штаму *Bacillus subtilis* IMB B-7724 в стаціонарних умовах (термостат) та в умовах періодичного культивування (качалки) були практично однаковими. Відмінність полягала лише в тому, що ріст і розвиток (тобто накопичення активних речовин) продуценту в термостаті подовжувалось в часовому проміжку.

Встановлено, що цитотоксичний вплив культуральної рідини *Bacillus subtilis* IMB B-7724 на пухлинні клітини складається з двох етапів: на першому етапі інкубації відбувається аглютинація пухлинних клітин, утворення конгломератів 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 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 *Bacillus subtilis* IMB B-7724 на досліджуваних живильних середовищах вивчали гемаглютинуючу активність (ГАА) культуральної рідини мікроорганізму відносно до еритроцитів кроля [4] та цитотоксичну активність *in vitro* відносно до клітин різних модельних пухлин (асцитна форма аденокарциноми Ерліха, саркома-37, карциносаркома Уокер) [5].

Порівняльне вивчення динаміки накопичення цитотоксичних речовин в культуральній рідині *Bacillus subtilis* IMB B-7724 показало, що такі речовини синтезуються при рості даного мікроорганізму на всіх досліджуваних середовищах. Пік цитотоксичної дії на пухлинні клітини культуральної рідини бактерій, які вирощені на трьох поживних середовищах (МПБ, Гаузе, 10 % екстракт пшеничних висівок), спостерігається на 5-8 добу росту культури, однак кількісне співвідношення синтезованих цитотоксичних речовин, а, можливо і їх природа, різні.

Суть корисної моделі підтверджують приклади 1 і 2, таблиці (табл. 1, табл. 2 і табл. 3) та креслення.

Приклад 1.

Культуральна рідина бактерій, культивованих на МПБ і середовищі Гаузе, в перші 10-15 хвилин інкубації з пухлинними клітинами призводила до аглютинації 90-100 %, а в кінці інкубації викликала повний або частковий лізис пухлинних клітин (табл. 1, табл. 2).

Таблиця 1

Цитотоксична та аглютинуюча активність культуральної рідини штамів *Bacillus subtilis* IMB B-7025 (прототип) та *Bacillus subtilis* IMB B-7724 (що заявляється) при культивуванні на середовищі МПБ

Доба	Культуральна рідина (розведення)	Кількість пухлинних клітин (%)					
		девіталізованих		лізованих		аглютинованих	
		прототип	що заявляється	прототип	що заявляється	прототип	що заявляється
1	Нативна	0	0	0	0	0	0
	1:2	0	0	0	0	0	0
2	Нативна	60	65	0	0	60	65
	1:2	30	40	0	0	10	20
3	Нативна	100	100	40	50	90	100
	1:2	40	50	0	0	40	50
4	Нативна	100	100	50	60	98	99
	1:2	45	55	0	0	55	60
5	Нативна	100	100	100	100	100	100
	1:2	90	95	40	50	60	70
6	Нативна	100	100	100	100	100	100
	1:2	90	95	90	95	85	90
7	Нативна	100	100	100	100	100	100
	1:2	100	100	80	85	90	95
8	Нативна	100	100	100	100	100	100
	1:2	70	80	40	50	90	95
9	Нативна	100	100	100	100	98	100
	1:2	50	60	50	60	85	90
10	Нативна	100	100	100	100	95	100
	1:2	70	75	50	60	80	85

Таблиця 2

Цитотоксична та аглютинуюча активність культуральної рідини штамів *Bacillus subtilis* IMB B-7025 (прототип) та *Bacillus subtilis* IMB B-7724 (що заявляється) при культивуванні на середовищі Гаузе

Доба	Культуральна рідина (розведення)	Кількість пухлинних клітин (%)					
		девіталізованих		лізованих		аглютинованих	
		прототип	що заявляється	прототип	що заявляється	прототип	що заявляється
1	Нативна	0	0	0	0	40	45
	1:2	0	0	0	0	0	0
2	Нативна	0	0	0	0	70	80
	1:2	0	0	0	0	20	30
3	Нативна	98	100	45	55	98	100
	1:2	15	30	0	0	45	50
4	Нативна	100	100	100	100	100	100
	1:2	15	35	10	30	40	50
5	Нативна	100	100	100	100	100	100
	1:2	20	50	20	50	60	70
6	Нативна	100	100	100	100	100	100
	1:2	20	45	20	40	70	80
7	Нативна	100	100	100	100	100	100
	1:2	30	70	30	60	90	95
8	Нативна	100	100	100	100	98	100
	1:2	20	60	20	50	90	98
9	Нативна	100	100	100	100	98	100
	1:2	15	30	15	25	85	95
10	Нативна	100	100	100	100	95	98
	1:2	10	40	10	40	80	85

Для вивчення властивостей культуральної рідини мікроорганізмів обох штамів використовували реакцію гемаглютинації, в основі якої лежить специфічне зв'язування лектинів з розміщеними на поверхні еритроцитів вуглеводами, і виражали як титр⁻¹ РГА (креслення). На кресленні представлені графіки виявлення гемаглютинуючої лектинової активності культуральної рідини штамів *Bacillus subtilis* IMB B-7025 (прототип) та *Bacillus subtilis* IMB B-7724 (що заявляється) при культивуванні на середовищі Гаузе.

Штам, що заявляється, має більшу стабільність в продукуванні цитотоксичних речовин ніж штам-прототип, що наглядно видно з представлених графіків.

Приклад 2.

Культуральна рідина бактерій, які вирощували на 10 % екстракті пшеничних висівок, проявляла лізуючу дію на пухлинні клітини (100 % клітин) при повній відсутності аглютинуючої активності відносно до останніх (табл. 3). Це може свідчити про синтез на даному середовищі, головним чином, речовин з протеолітичною активністю нелектинової природи. Підтвердженням цього висновку є наявність в культуральній рідині мікроорганізму, вирощеного на цьому середовищі, загальної протеолітичної активності, виявленої електрофоретично з використанням желатини як субстрату [6].

Таблиця 3

Цитотоксична та аглютинуюча активність культуральної рідини штамів *Bacillus subtilis* IMB B-7025 (прототип) та *Bacillus subtilis* IMB B-7724 (що заявляється) при культивуванні на 10 % екстракті пшеничних висівок

Доба	Культуральна рідина (розведення)	Кількість пухлинних клітин (%)					
		девіталізованих		лізованих		аглютинованих	
		прототип	що заявляється	прототип	що заявляється	прототип	що заявляється
1	Нативна	0	25	0	40	0	0
	1:2	0	0	0	10	0	0
2	Нативна	95	98	85	90	0	0
	1:2	10	20	20	30	0	0
3	Нативна	100	100	100	100	0	0
	1:2	95	98	20	30	0	0
4	Нативна	100	100	100	100	0	0
	1:2	98	98	30	40	0	0
5	Нативна	100	100	100	100	0	0
	1:2	100	100	35	50	0	0
6	Нативна	100	100	100	100	0	0
	1:2	100	100	80	90	0	0
7	Нативна	100	100	100	100	0	0
	1:2	100	100	60	70	0	0
8	Нативна	100	100	60	75	0	0
	1:2	100	100	15	25	0	0
9	Нативна	100	100	60	70	0	0
	1:2	70	80	10	20	0	0
10	Нативна	65	75	60	70	0	0
	1:2	50	60	10	20	0	0

Таким чином, штам *Bacillus subtilis* IMB B-7724, що заявляється, продукує цитотоксичні речовини з протипухлинною властивістю при вирощуванні на всіх досліджуваних поживних середовищах (МПБ, середовище Гаузе та 10 % екстракт пшеничних висівок). Тобто, штам є невимогливим до поживних речовин, які необхідні для біосинтезу біологічно активної речовини. Ця властивість дає можливість використовувати для культивування мікроорганізму доступні і дешеві поживні середовища. Культуральна рідина штаму має біфункціональну активність (аглютинуючу та цитотоксичну) відносно до пухлинних клітин. При вирощуванні штаму *Bacillus subtilis* IMB B-7724 на середовищах МПБ і Гаузе культуральна рідина аглютинувала 90-100 % пухлинних клітин (що було пов'язано з синтезом на даних середовищах речовин лектинової природи з цитотоксичною активністю). При вирощуванні штаму на 10 % екстракті пшеничних висівок культуральна рідина проявляла 100 % лізуючу дію на пухлинні клітини (що пов'язано з синтезом на даному середовищі речовин з протеолітичною активністю). Штам, що заявляється, має більшу стабільність в продукуванні цитотоксичних речовин ніж штам-прототип.

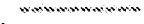

Отже, штам *Bacillus subtilis* IMB B-7724, що заявляється, є більш ефективним та стабільним по продукуванню цитотоксичних речовин, зокрема лектинової та протеазної природи з високою протипухлинною активністю. Технічного результату корисної моделі досягнуто.

Джерела інформації:

1. Коваленко Е.О. Позаклітинні лектини бактерій роду *Bacillus*. Дис. ... д. біол. н. - Київ, 1999.
2. Патент №56348 UA. Штам бактерій *Bacillus subtilis* - продуцент протипухлинних цитотоксичних речовин / Потебня Г.П., Лісовенко Т.С, Черемшенко Н.Л. та ін. // Бюл. промислової власності. - 2003. - № 5.
3. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Edition 8-th / Ed. Buchanan P.E., Gibbons K.E. - Baltimore, Williams S. Wilkins, 1974. - 1268 p.
4. Луцик М.Д., Панасюк Е.Н., Луцик А.Д. Лектины. Львів: Вища школа, 1981. - 155 с
5. Дж Клаус. Лимфоциты. Методы. М.: Мир, 1990. - 395 с.

6. Moll U.M., Youngleib G.L., Rosinsky K.B., Quigley J.P. Tumor promoter-stimulated Mr 92000 gelatinase secreted by normal and malignant human cells. Isolation and characterisation of enzyme from HT 1080 tumor cells // Cancer Res. - 1990. - V. 58, № 19. - P. 6162-6170.

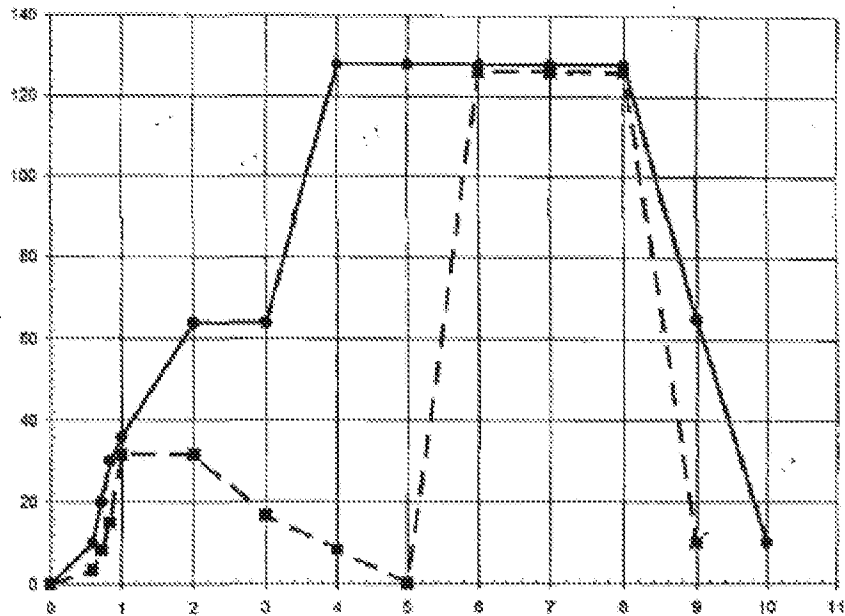
5 Фіг. Динаміка виявлення гемаглютинуючої лектинової активності культуральної рідини штамів *Bacillus subtilis* IMB B-7025 (прототип) та *Bacillus subtilis* IMB B-7724 (що заявляється) при культивуванні на середовищі Гаузе

Позначення: по осі абсцис - час (доба), по осі ординат - ГАА (титр⁻¹ РГА),  штамп-прототип,  - штамп, що заявляється.

10

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

Штам бактерій *Bacillus subtilis* IMB B-7724 - продуцент цитотоксичних речовин з протипухлинною дією, що зареєстрований у Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України за номером IMB B-7724.



Комп'ютерна верстка О. Рябко

Міністерство розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України,
вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601