

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **028640**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2017.12.29

(21) Номер заявки
201600409

(22) Дата подачи заявки
2016.06.22

(51) Int. Cl. **C07C 50/18** (2006.01)
C07C 50/20 (2006.01)
C07C 65/28 (2006.01)
C12P 15/00 (2006.01)
A61K 31/122 (2006.01)
A61K 31/216 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C12R 1/80 (2006.01)

**(54) КРАСНЫЙ ПИГМЕНТ ГРУППЫ АНТРАХИНОНОВ, СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ
КРАСНОГО ПИГМЕНТА ШТАММА ГРИБА *Penicillium oxalicum* var.
Armeniasa, ПРОДУКТ СПОСОБА, ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ, ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ
КОМПОЗИЦИЯ И СПОСОБ ПРОФИЛАКТИКИ И/ИЛИ ЛЕЧЕНИЯ
ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ**

(43) 2017.11.30

(96) EA/AM2016/000002 (AM) 2016.06.22

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**САРДАРЯН ГАГИК ЭДУАРДОВИЧ
(AM); САРДАРЯН ГУРГЕН
ЭДУАРДОВИЧ (CZ)**

(56) US-B2-7214713
CZ-B6-302696
EA-B1-003085

MAPARI Sameer A.S. et al.: Exploring fungal biodiversity for the production of water-soluble pigments as potential natural food colorants. Current Opinion in Biotechnology 2015, 16:231-238

(72) Изобретатель:
Сардарян Эдуард Оганестович (CZ)

(74) Представитель:
Баландина Л.А. (RU)

(57) Предложен способ получения экзогенного красного пигмента, продуцируемого штаммом ЕС ССМ 8374 гриба *Penicillium oxalicum* var. *Armeniasa*, который обладает высокой ингибирующей активностью по отношению к росту опухолевых клеток и не проявляет негативных побочных эффектов на организм человека. Препарат не обладает цитотоксическим и мутагенным эффектом и не накапливается в организме. Полученный продукт с высокой противоопухолевой активностью может применяться в качестве лечебно-профилактического средства для лечения опухолевых заболеваний, таких как рак молочной железы, рак толстой кишки, рак печени, легочная карцинома, хронический лейкоз и обширная гепатоцеллюлярная карцинома.

B1

028640

028640

B1

Область техники

Настоящее изобретение относится к области биотехнологической и фармацевтической промышленности, в частности, к способу получения экзогенного красного пигмента штамма ЕС ССМ 8374 гриба *Penicillium oxalicum* var. *Armeniaca*, продукту, полученному в соответствии с заявленным способом, фармацевтической композиции, содержащей в качестве активного агента экзогенный красный пигмент, и способу лечения онкологических заболеваний.

Уровень техники

Известен штамм ЕС ССМ 8374 гриба *Penicillium oxalicum* var. *Armeniaca*, выделенный из солончаковых почв Араратской долины, обладающий свойством продуцировать экзогенный красный пигмент, который обладает способностью ингибировать рост некоторых линии опухолевых клеток, зарегистрированный в Международном Депозитарии Чешской коллекции производственных микроорганизмов Университета имени Масарика, г. Брно, под инвентарным номером ССМ 8374 (патент CZ № 302696).

Однако противоопухолевая активность экзогенного красного пигмента, продуцируемого штаммом ЕС ССМ 8374 в соответствии с патентом CZ № 302696, не является достаточно эффективной для использования в терапевтических целях для лечения онкологических заболеваний. Следовательно, актуальной является задача получения экзогенного красного пигмента с эффективной противоопухолевой активностью, пригодной для использования в терапевтических целях.

Краткое описание изобретения

Автор изобретения впервые разработал способ получения экзогенного красного пигмента с помощью штамма ЕС ССМ 8374, который обладает эффективной противоопухолевой активностью. Относительно известного способа (патент CZ № 302696) в заявленном способе оптимизированы параметры ферментационного процесса, такие как количество растворимого кислорода (аэрация), регулирование величины рН питательной среды, которые оказывают влияние как на количество, так и на качество красного пигмента, а также очистки экзогенного красного пигмента с малым содержанием сопутствующих примесей, которые неожиданно приводят к получению пигмента, обладающего высокой противоопухолевой активностью.

Другим аспектом изобретения является продукт, полученный в соответствии с заявленным способом, имеющий ароматический скелет хиноидного типа и входящий в группу антрахинонов.

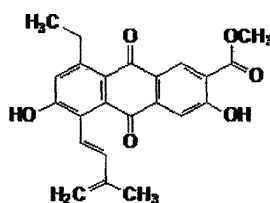
Ещё одним аспектом изобретения является фармацевтическая композиция, содержащая в качестве активного вещества экзогенный красный пигмент, полученный заявленным способом. В предпочтительном воплощении композиция представляет капсулу или таблетку, содержащую от 30 до 100 мг активного вещества (пигмента).

Изобретение также относится к применению экзогенного красного пигмента, полученного заявленным способом, в качестве противоопухолевого лечебно-профилактического средства и способу лечения онкологических заболеваний.

Подробное описание изобретения

Автор изобретения впервые разработал способ получения экзогенного красного пигмента с помощью штамма ЕС ССМ 8374, который обладает эффективной противоопухолевой активностью.

Одним из аспектов изобретения является соединение 8-этил-3,6-дигидрокси-5-[(1E)-3-метилбута-1,3-диен-1-ил]-9,10-диоксидигидроантрацен-2-карбоновой кислоты метиловый эфир, представляющий красный пигмент группы антрахинонов и являющийся метаболитом штамма ЕС ССМ 8374 гриба *Penicillium oxalicum* var. *Armeniaca*, формулы I



Формула I

Другим аспектом изобретения является способ получения экзогенного красного пигмента штамма ЕС гриба *Penicillium oxalicum* var. *Armeniaca*, предусматривающий ферментацию штамма глубинным методом культивирования в аэробных условиях при концентрации растворимого воздуха 80-95%, при автономно регулируемого грибом рН от 5,8 до 6,4 в период культивирования гриба в жидкой органической питательной среде, выделение пигмента из культуральной жидкости с последующей очисткой, отличающийся тем, что очистку осуществляют в два этапа, причём второй этап очистки осуществляют путем нейтрализации рН культуральной жидкости до величины рН 6,8-7,2 и далее центрифугируют культуральную жидкость при 15000-20000 об/мин для удаления нерастворимых высокомолекулярных примесей при данной величине рН (пример 1).

Стадия роста гриба-продуцента составляет от 20 до 25 ч, стадия биосинтеза пигмента составляет 64-68 ч, где количество пигмента достигает в среднем 7-9 г/л.

После второго этапа очистки проводят ультрафильтрацию на мембранах 300-500 Дальтон (Да) для освобождения от низкомолекулярных солей и избыточной воды, с получением концентрата, содержащего 120-200 г/л пигмента. Продукт, полученный в соответствии с предложенным способом, имеет степень очистки 80-90% и соотношение пиков $K_a=1,45-1,55$ (пример 1).

В одном из вариантов способа в полученный концентрат, содержащий 120-150 г/л пигмента, добавляют инертные носители мальтодекстрин или крахмал и сушат в распылительной сушилке при 180 до 220°C с получением конечного продукта в виде сухого порошка от розового до темно-красного цвета, содержащего от 20 до 50% красного пигмента с носителем от 80 до 50% соответственно.

Ещё одним аспектом изобретения является продукт, полученный согласно предложенному способу со степенью очистки 80-90% и соотношением пиков $K_a=1,45-1,55$.

Ещё одним аспектом изобретения является фармацевтическая композиция, содержащая в качестве активного вещества соединение 8-этил-3,6-дигидрокси-5-[(1E)-3-метилбута-1,3-диен-1-ил]-9,10-диоксодигидроантрацен-2-карбоновой кислоты метиловый эфир или продукт предложенного способа в терапевтически эффективном количестве и фармацевтически приемлемый наполнитель.

Для получения фармацевтических композиций согласно изобретению используют любые фармацевтически приемлемые эксципиенты или растворители. Для перорального введения фармацевтическая композиция может принимать форму растворов, суспензий, таблеток, пилюль, капсул, порошков. Таблетки, содержащие различные наполнители, например цитрат натрия, карбонат кальция и фосфат кальция или любые другие фармацевтически приемлемые наполнители, могут также включать различные дезинтеграторы, например, крахмал, предпочтительно картофельный крахмал или тапиоку, сложные силикаты или любые другие фармацевтически приемлемые дезинтеграторы, вместе со связывающими веществами, например, поливинилпирролидоном, сахарозой, желатином, аравийской камедью и любыми другими фармацевтически приемлемыми связывающими веществами. Кроме того, часто применяются скользящие вещества, например, стеарат магния, лаурилсульфат натрия, тальк для таблетирования или любые другие фармацевтически приемлемые скользящие вещества. Композиции согласно изобретению также могут представлять собой мягкие или твердые заполненные желатиновые капсулы; предпочтительные в этом случае капсулы включают, например, лактозу или молочный сахар, а также полиэтиленгликоли с высоким молекулярным весом. Если для перорального введения желательны водные суспензии и/или эликсиры, заявленные композиции могут сочетаться с различными подслащивающими средствами, улучшающими вкус и запах, подкрашивающими веществами, эмульгирующими веществами и/или суспендирующими средствами, а также растворителями, такими как вода, этанол, пропиленгликоль, глицерин и различными их комбинациями. Для парентерального введения могут использоваться растворы в кунжутном или арахисовом масле или в водном пропиленгликоле, так же как и стерильные водные растворы соответствующих водорастворимых солей. Такие водные растворы могут быть соответственно буферными, если необходимо, и водный растворитель сначала изотонируют с помощью достаточного количества раствора соли или глюкозы. Эти водные растворы особенно подходят для внутривенного, внутримышечного, подкожного и внутривнутрибрюшинного введения.

Изобретение относится также к применению вышеуказанных композиций и продукта предложенного способа для лечения и/или предупреждения онкологических заболеваний. Суточная доза зависит от тяжести заболевания, веса пациента и желаемого эффекта. Дозу устанавливают индивидуально, в зависимости от переносимости и клинической эффективности. В наиболее предпочтительном варианте суточная доза составляет 30-100 мг.

Противоопухолевые свойства продукта изобретения (8-этил-3,6-дигидрокси-5-[(1E)-3-метилбута-1,3-диен-1-ил]-9,10-диоксодигидроантрацен-2-карбоновой кислоты метиловый эфир) были исследовано в экспериментах на животных с трансплантированными опухолями меланомы B16 (мышь линии C57BL6), рака толстой кишки CT26 (мышь линии BALB/c), рака молочной железы 4T1 (мышь линии BALB/c), карциномы легких Льюиса (мышь линии C57 BL/6), лейкемии L1210 (мышь линии DBA2) и рака толстой кишки HCT-116 (голые мыши) (пример 5).

Из полученных результатов видно, что протестированный препарат, полученный согласно изобретению, ингибирует рост опухолей более эффективно, чем известный продукт. В отличие от известного пигмента, он резко тормозит рост опухолевых клеток меланомы B16, карциномы Льюиса и лейкемии L1210.

Таким образом, продукт, полученный в соответствии с предложенным способом, может быть использован:

для лечения преинвазивных различных органов и дополнительного лечения злокачественных опухолей;

для ингибирования роста опухолевых клеток, блокирования образования и предотвращения роста раковых клеток;

при высоком риске развития опухолей рака молочной железы;

с целью препятствия злокачественной трансформации;

в качестве адъювантной терапии в лечении злокачественных новообразований;

для улучшения общей переносимости организма при химио- и радиотерапии.

Характеристики штамма ЕС ССМ 8374 гриба *Penicillium oxalicum* var. *Armeniaca*.

Штамм ЕС ССМ 8374 является непатогенным, не вызывает микозы и не продуцирует микотоксины: афлатоксины (В1, В2, G1, G2), Т-2 токсин, охратоксин, стергмататоксицин и D-секалоновую кислоту. Эти соединения не были обнаружены в мицелии, в культуральной жидкости и в конечном продукте (пигменте).

Производственный активированный штамм ЕС ССМ 8374 был получен из маточной культуры гриба *Penicillium oxalicum* var. *Armeniaca* методом культивирования на органических питательных средах с предшественниками, способных регулировать направленный биосинтез путем активации ферментных систем, участвующих в метаболизме экзогенного красного пигмента. Во время исследования не были использованы мутагенные химические вещества или методы вызывающие генетические изменения.

Из полученных результатов эксперимента обнаружено, что среди 39 аминокислот в формах L-, D-, и DL наиболее подходящими предшественниками являются L-тирозин и L-диоксифенилаланин, обладающие способностью биосинтеза экзогенного красного пигмента.

Культивирование проводилось в течение 7-8 поколений. Колонии переносили в среду, оптимальную для биосинтеза пигмента, т.е. в отвар капусты или кукурузный экстракт (20 г/л) или в дрожжевой экстракт (7 г/л) с добавлением сахара (20 г/л).

Штамм ЕС ССМ 8374 гриба *Penicillium oxalicum* var. *Armeniaca*, полученный из маточной культуры, держали в активном состоянии методом последующих пересевов.

Штамм ЕС ССМ 8374 продуцирует пигмент в количестве 5-10 г/л.

Морфологические признаки.

Диаметр колонии штамма ЕС ССМ 8374 в монокультуре на 3-й сутки инкубации достигает 1,5-2,0 см, а на 5-6-е сутки роста 4,0-5,0 см. Колония гладкая с ровной поверхностью, бархатистая, пушистая, невыпуклая, сегментации отсутствуют, не наблюдается появление экссудата и запаха при росте гриба.

В растущей культуре гриба наблюдается обильное спорообразование, биомасса на 5-6 сутки инкубации становится порошкообразной, рассыпчатой, сыпучей и легко распадается в виде порошка при встряхивании чашки Петри. Мицелии короткие, не прорастают в агар, на ранней фазе роста окрашены в серовато-белый цвет, в последующие стадии роста становятся зелеными, а далее при старении культуры - темно-зелеными. У растущего края колонии наблюдается присутствие белой полосы маргинальной зоны шириной 0,5-1,0 см. Хорошо растет при температуре 27-29°C.

Штамм ЕС ССМ 8374 относится к числу стабильных аэробных микроорганизмов, не растет на питательных средах с агаром при глубинном росте без доступа кислорода, а при культивировании в жидких питательных средах в отсутствие воздуха (аэрации) при глубинном росте образуется хлопкообразная масса, пигментообразование почти прекращается.

Культуральные характеристики.

При посеве нового штамма ЕС ССМ 8374 на чашки Петри на агаризованных синтетических питательных средах наблюдается сильное торможение роста в виде тонкого покрова (пленки). На органических средах в ранних стадиях развития культуры питательная среда окрашивается в розовый цвет, который в более поздних стадиях динамично усиливается и полностью диффундируется в питательную среду, интенсивно окрашивая последний в темно-красный цвет.

Примеры

Пример 1. Получение красного пигмента.

1. Ферментация.

При глубинной ферментации штамма-продуцента в процессе культивирования большое влияние на биосинтетическую активность и на качество пигмента оказывают количество растворимого воздуха и значение рН ферментационной среды, которые способствуют балансированию окислительно-восстановительных процессов, приводящих к улучшению направленного биосинтеза, а также увеличению скорости утилизации углеводов и органического азота.

Ферментацию проводили глубинным методом в ферментерах при остаточном давлении 0,02-0,03 мПа при температуре в пределах от 27 до 29°C, при непрерывном перемешивании со скоростью 280-320 мин⁻¹ с помощью двухъярусной мешалки с подачей стерильного воздуха в количестве, обеспечивающем его растворимость от 80 до 90% в ферментационной среде.

Ферментация в указанных условиях показала, что оптимальная растворимость воздуха в питательной среде в период культивирования находится в пределах от 85 до 90%, которые следует считать оптимальными, так как увеличивается количество пигмента и показатель качества (соотношение пиков) полученного конечного продукта составляет от 1,45 до 1,55.

Количество ниже минимальной границы растворимого кислорода приводит к его дефициту, в результате чего повышаются окислительные процессы, которые способствуют снижению рН до 4,5, приводят к угнетению биосинтетической активности и значительному ухудшению качества пигмента с низким показателем от 0,9 до 1,1.

Изучение влияния как начальных величин рН от 4,0 до 8,0 ферментационной среды, так и при его регулировании в процессе ферментации в разных фазах роста и развития гриба показало, что существует

тенденция саморегулирования грибом значения рН питательной среды, т.е. в кислой среде (рН 4,0) в стадии активного роста гриба происходит нормализация рН (рН 5,5-6,4), а в среде со значениями рН 7,5-85 происходит снижение рН до стандартного критерия (рН 5,6-6,4). Однако во время нормализации при низких значениях наблюдается сильное блокирование активности ферментных систем, ответственных за метаболизм пигмента, что наблюдается также при высоких значениях рН.

Экспериментально было установлено, что штамм ЕС ССМ 8374 при ферментации обладает способностью нормализовать рН путем саморегулирования, а эффективной стабильной начальной величиной является рН 5,6-6,4, при которой поддерживается на максимальном уровне активность биосинтеза пигмента с высоким качественным показателем при нормальном росте и развитии гриба-продуцента.

Технологические показатели ферментации представлены в табл. 1.

Таблица 1

1. Продолжительность ферментационного процесса	68-72 часов
2. Средняя ферментативная активность гриба	12,0-13,5 г/л
3. Кристаллический сахар	14 - 18 г/л
4. Дрожжевой экстракт +Кукурузный экстракт	2,5-3,5+ 2,5-3,5 г/л
5. Количество образованной биомассы в конце	3,0-4,5 % от объёма
6. Количество посевного материала	2,0-3,5 % от объёма
7. Оптимальная температура культивирования	26- 30° С
8. Количество растворимого воздуха в среде	85 - 90 %
9. Интенсивность перемешивания	280-320 мин ⁻¹
10. Рабочее давление в ферментёре	0,02-0,03 мПа
11. Количество пеногасителя (полипропилен гликоль)	0,02-0,03 % от объёма
12. Начальный рН питательной среды	5,6-6,4

2. Отделение биомассы от культуральной жидкости.

С целью максимального растворения пигмента после завершения ферментации остаточное давление в ферментёре снижают до нуля добавлением раствора аммиака, рН ферментационной среды доводят до 9,0-9,5 и перемешивают 50-55 мин при 35-40°С до стабилизации рН. В случае снижения рН доводят до начальной величины и продолжают перемешивание 20-25 мин. Далее отделяют биомассу гриба от культуральной жидкости, содержащей пигмент центрифугированием при 3000-5000 об/мин.

3. Очистка.

Очистку осуществляют путем нейтрализации рН культуральной жидкости до величины 5,5-6,0 и центрифугирования при 15000-20000 об/мин для освобождения от нерастворимых высокомолекулярных примесей при данной величине рН.

Далее осуществляют нанофильтрацию с применением мембранного фильтра с пористостью 300 Да с целью удаления избыточной воды и освобождения от микромолекулярных примесей до получения концентрата в объеме 200-250 л с концентрацией пигмента в растворе до уровня 150-200 г/л.

Технологические параметры нанофильтрации представлены в табл. 2.

Таблица 2

Наименование	Показатели
1.Размеры пористости мембран	250 и 300 Дальтон
2. рН культуральной жидкости	5,5-6,0
3.Температура фильтрующей жидкости	50-60° С
4. Рабочее давление	0,55-0,60 мПа

Количество пигмента в концентрате определяют спектрометрически согласно формуле:

$$W = A \times R \times V$$

где W - количество пигмента в концентрате в г/л;

A - величина поглощения в видимой области $\lambda_{\max}=494$ нм;

R - разведение;

V - объём концентрата на 1 л.

Нарушение начальной величины рН питательной среды и количества растворенного кислорода оказывает большое влияние на производительность штамма и, при отклонении от нормального, приводит к резкому угнетению ферментативной активности, в результате чего снижается не только количество пигмента, но и происходит его качественное изменение, которое выражается в снижении соотношения пиков максимумов $\lambda_{\max} A2: \lambda_{\max} A1$ до величины 0,9-1,1, тогда как этот показатель в конечном продукте в соответствии с предложенным способом доходит до 1,45-1,55.

Качество пигмента определяют спектрометрически по соотношению величины пиков в видимой области спектра $\lambda_{\max} A2=494/\lambda_{\max} A1=420$, где величина, достигаемая согласно заявленному способу, составляет 1,45-1,55.

$$K_a = \lambda_{\max} A2 : \lambda_{\max} A1$$

Контроль стандарта качества пигмента в процессе ферментации осуществляют определением соот-

ношения пиков поглощения в видимой области $\lambda_{\max} A2/\lambda_{\max} A1$, которое изменяется в зависимости от срока ферментации: через 32 ч инкубации составляет 0,9; через 48 ч соотношение пиков увеличивается на 1,20, а в конце ферментации достигает величины от 1,45 до 1,55. При остаточном количестве углеводов 0,15-0,2 г/л в ферментационной среде при таких показателях конечный продукт считается качественным.

4. Сушка.

После получения концентрата в раствор пигмента добавляют инертные носители (мальтодекстрин, крахмал или поваренная соль). Содержание пигмента в концентрированном растворе с носителем от 70 до 50% составляет от 30 до 50%. Пигмент высушивают с помощью распылительной сушилки при температуре 280-320°C. Высыхая, продукт под действием силы тяжести опускается на дно сушильной камеры, где он собирается и непрерывно выводится из зоны сушилки, что позволяет получить высококачественный сухой порошкообразный продукт без вкуса и запаха темно-красного цвета и кроваво-красный в водном растворе с влажностью от 5 до 6%. Во время высушивания происходит интенсивный массо- и теплообмен, где диспергированные частицы пигмента теряют влагу за довольно небольшой промежуток времени.

Сушка проходит практически мгновенно, при этом температура частиц продукта в сушильной камере практически равна температуре испарения чистой влаги. Такой метод сушки не вызывает потерю свойств или качественные изменения пигмента.

5. Оценка свойств конечного продукта.

Производство красного пигмента является экологически чистым и безопасным, так как в качестве компонентов ферментационной питательной среды используются кристаллический сахар и дрожжевой экстракт, а при выделении применяются методы центрифугирования и нанофильтрации без применения агрессивных химических соединений.

В пигменте содержится определенное количество аминного азота, которое при перерасчете на общий белок (N×6,25) составляет 4,35%. Содержание неутрализованного грибом сахара в конце ферментации в культуральной жидкости составляет 0,2-0,25 г/л, что одновременно является показателем качества конечного продукта.

В конечном продукте содержится низкое количество вредных элементов (кадмия, ртути, свинца, мышьяка), которое соответствует допустимым стандартам.

В продукте не обнаружено присутствие щавелевой кислоты, микотоксинов и прочих биологически активных соединений, которые могут сформироваться грибом в процессе ферментации.

Продукт не содержит наиболее распространенные микотоксины: афлатоксины B1, B2, G1 и G2, охратоксин, токсин T-2, стеригматоксидин и д-секалоновая кислота. Эти соединения не были обнаружены как в биомассе гриба в культуральной жидкости, так и в конечном продукте.

Процесс ферментации протекает в асептических условиях и полученный концентрат, который является основным продуктом перед добавлением инертного носителя, практически является стерильным, а процесс сушки может только способствовать уменьшению количества микроорганизмов, которые могут присутствовать в виде случайного загрязнения от инертного носителя.

Красный пигмент, полученный в соответствии с заявленным способом, не обладает цитотоксической активностью.

6. Определение содержания красного пигмента в образце.

Взвешивают 10 мг сухого порошка пигмента и растворяют при перемешивании в 100 мл дистиллированной воды. Полученный раствор переносят в мерную колбу, дистиллированной водой доводят объем до 1000 мл и перемешивают. После полного растворения пигмента измеряют максимум поглощения в видимой области при длине волны $\lambda_{\max}=494$ нм против дистиллированной воды.

Процентное содержание вещества (X %) рассчитывают согласно формуле

$$X (\%) = \frac{100 \times A \times 100}{1,05 \times W}$$

где A - величина поглощения при длине волны;

1,05 - константа;

W - вес образца (10 мг в 1000 мл дистиллированной воды).

7. Физико-химические свойства продукта, полученного согласно предложенному способу.

В видимой области спектра поглощения вещество имеет два характерных пика максимумов поглощения при $\lambda_{\max} A1=420$ нм и $\lambda_{\max} A2=494$ нм, последний из которых является доминирующим. Соотношение A2 и A1 пиков определяет качество пигмента.

Растворимость: в воде, в ледяной уксусной кислоте, в этаноле и в изопропиловом спирте.

Стабильность: вещество устойчиво в нейтральном (pH 7,0-7,2), в щелочном (pH 8,0-9,0), водных растворах и в ледяной уксусной кислоте. При кипячении в течение 30-35 мин не наблюдается как количественное, так и качественное изменение спектра поглощения в видимой области.

Химическая чистота	Содержание	Метод определения
Влажность	5%	Аналитический
Содержание пигмента	84,42 %	Спектрометрия
Зола	12 %	Гравиметрия
Азот (аминный)	2,94 (N x 6,25)	Титрование
Тяжелые металлы:		
Мышьяк	не более 0,015 мг / кг	AAS-гибриды
Свинец	не более 0,009 мг / кг	AAS-кювета
Ртуть	не более 0,0048 мг / кг	AAS-AMA
Кадмий	не более 0,036 мг / кг	AAS-кювета
Микробиологическая чистота:-		
Всего бактерий	5 000 / г	
Общее количество грибов и дрожжей	100 / г	
Сальмонелла	не присутствует в 25 г образца	
E.coli	не присутствует в 25 г образца	

Пример 2. Определение структуры красного пигмента продуцируемого штаммом гриба ЕС ССМ 8374 *Penicillium oxalicum* var. *Armeniaca*.

Определение структуры осуществлялось с помощью хроматографического разделения и спектральных анализов (ИК, УФ, ЯМР, ВЭЖХ системы с нормальной фазой и использованием диода детектора - DAD и ИК-спектра). Характеристика молекулярной массы пигмента была получена методами LDI (Laser Desorption Ionization) и MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization).

Согласно данным, полученным методом MALDI масс-спектров, молекулярная масса хромофора равна 392 и этот хромофор, по крайней мере, имеет три в значительной степени кислые группы для того, чтобы связывать катионы натрия (щелочных металлов); одна группа сильнее, а две другие, в соответствии с высокой насыщенностью, слабее; это может касаться, например, карбоксильной или карбонильной групп, фенольных гидроксидов, которые в газовой фазе переходят в енольное состояние.

Из полученных данных ¹³C-ЯМР-спектров можно сделать вывод, что только 3 синглета (изолированных, не связанных протонами) и по крайней мере один дублет неароматических СН=СН групп принадлежат к основным хромофорам, и именно этот хромофор содержит скелетные карбонилы и не менее двух фенольных гидроксильных групп, прикрепленных к нему, а именно к его четвертичным атомам углерода.

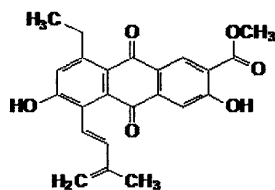
На основе полученных спектральных анализов было установлено, что изолированный пигмент, продуцируемый штаммом ЕС ССМ 8374 гриба *Penicillium oxalicum* var. *Armeniaca* по химической структуре имеет ароматический скелет хиноидного типа и как новое своеобразное, индивидуальное производное входит в группу антрахинонов.

Класс: антрахинон.

Химическая суммарная формула: C₂₃H₂₀O₆.

Молярная масса: 392 г·моль⁻¹.

Химическая структура:



Химическое название (согласно IUPAC): 8-этил-3,6-дигидрокси-5-[(1E)-3-метилбута-1,3-диен-1-ил]-9,10-диоксидигидроантрацен-2-карбоновой кислоты метиловый эфир.

Пример 3. Токсикологические исследования.

Токсикологические исследования были проведены в соответствии с руководящими принципами ОЭСР (OECD) для тестирования химических веществ, которые обеспечивают полный спектр токсикологических исследований, сосредоточенных на выявлении побочных эффектов пигмента на живые организмы.

1. Острая оральная токсичность на мышах.
2. Острое раздражение глаз/острое кожное раздражение.
3. 90-дневное хроническое токсикологическое исследование на крысах.
4. Потенциальный токсический эффект.
5. 14-дневное экспериментальное исследование на крысах и на собаках.
6. Псевдоаллергические реакции (острые и хронические воспаления).
7. Бактериальный тест обратной мутации.
8. Микроядерный тест на эритроцитах.

Полученные результаты токсикологических исследований показали, что пигмент не оказывает ток-

сического действия и не имеет побочного негативного влияния:

на состав и реологические параметры крови, уровень молочной кислоты в мышцах и уровень гемоглобина;

коронарное и мозговое кровообращение, артериальное давление;

функцию печени, почек, желудка, кишечника и надпочечников;

в высоких концентрациях (1000мг/кг/день) не оказывает негативного влияния на количество эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов, гемоглобина, и на биохимические показатели глюкозы, натрия, калия, мочевины, креатинина, ALP, АЛТ, АСТ, билирубина, холестерина, общего белка, альбумина и глобулинов;

не обнаружено побочных реакций как, например, кожной сыпи, аллергии, раздражения или других негативных симптомов.

Пример 4. Цитотоксичность.

Цитотоксическая активность пигмента проявляется при невероятно высоких концентрациях (0,83-1,12 мг/мл), в то время как у известных антибиотиков, она проявляется при концентрациях 0,001-0,01 мг/мл. Т.е. критическая концентрация, необходимая для цитотоксической активности красного пигмента, ниже примерно на шесть порядков критической концентрации известных антибиотиков.

Потенциальная цитогенетическая активность.

Было установлено, что пигмент не обладает цитогенетической активностью в тесте на индукцию хромосомных aberrаций в клетках костного мозга мышей во всех диапазонах изученных доз.

Иммунотоксичность.

Введение пигмента во всех исследованных дозах не оказывало влияния на жизнеспособность клеточных элементов исследованных органов иммунной системы, пигмент не оказал влияния на массу и на клеточные структуры органов иммунной системы (в селезенке, лимфоузлах), а также костном мозге экспериментальных мышей.

Антибиотическая активность.

Были исследованы тест-микроорганизмы: Staphylococcus aureus ATCC 6538, Escherichia coli ATCC 11229, Bacillus cereus ATCC 2, Bacillus circulans Bac 6/79, Staphylococcus pyogenes ATCC 12344 и Serratia marcescens 14041.

В опытах не наблюдается подавления зоны роста ни у одного из тест-бактериальных штаммов, что указывает на отсутствие антибиотической активности испытуемого красителя. Полученные результаты эксперимента показывают, что пигмент не оказывает угнетающего влияния на вышеупомянутые микроорганизмы.

Пример 5. Противоопухолевая активность.

Влияние продукта изобретения на рост следующих опухолей проводился согласно методике, описанной в патенте CZ 302696.

1. Меланома В16-мышь линии С57В16.
2. Рак толстой кишки СТ26-мышь линии ВАLB/с.
3. Рак молочной железы 4Т1 - мышь линии ВАLB/с.
4. Карцинома легких Льюиса - мышь линии С57 ВL/6.
5. Лейкемия L1210 - мышь линии DBA2.
6. Рак толстой кишки (линия НСТ-116) на голых мышах.

Опухолевые клетки вводились мышам подкожно в правый бок в количестве 1×10^7 клеток/мышь, за исключением меланомы В16, где вводили 2×10^6 опухолевых клеток. В исследованиях использовали самок инбредных мышей с весом 18-20 г линий DBA 2, ВАLB/С и С57В16. За день до инокуляции осуществляли анализ крови, полученной из глазного сплетения. Спустя 24 ч после забора крови вводили перорально ежедневно пигмент согласно изобретению в дозе 200 мг/кг. Контрольным мышам вводили физ. раствор в том же объеме. Другой группе мышей вводили известный продукт (патент CZ 302696).

Расчет проводили в соответствии с процентом TGI (ингибирование роста опухоли):

$\% TGI = V$ (экспериментальная группа)/ V_1 (контрольная группа-мышь без применения препарата, трансплантированные соответствующими опухолевыми клетками) $\times 100$.

Достигнутый % торможения роста опухоли (%TGI)

Опухоль	10-й день	21-й день	31-й день
Меланома В16	20,68* 27,8	36,06 * 39,15	16,36* 26,30
Рак толстой кишки СТ26	52,33* 56,27	48,76 * 58,76	56,29* 79,12
Рак молочной железы 4Т1	33,21* 41,27	34,41* 37,01	30,19* 35,39
Карцинома легких Льюиса	14,89* 24,80	1,89* 11,58	- -
Лейкемия L1210	57,18* 67,18	15,08* 35,28	7,0* 27,05
Рак толстой кишки (НСТ-116)	- 84,03	- 79,48	- 68,36

* Данные согласно патенту CZ 302696.

Из полученных результатов очевидно, что тестируемый препарат, полученный согласно изобре-

тению, ингибирует рост опухолей более эффективно, чем известный продукт. В отличие от известного пигмента, продукт согласно изобретению резко тормозит рост опухолевых клеток меланомы B16, карциномы Льюиса и лейкемии L1210.

Таким образом, данные, представленные в таблице, свидетельствуют, что продукт, полученный согласно изобретению, обладает высокой противоопухолевой активностью, значительно подавляя рост раковых клеток, тем самым сильно снижая риск формирования различных линий опухолей.

Продукт, полученный в соответствии с предложенным способом, может быть использован:

для лечения предраковых состояний различных органов;

для ингибирования роста опухолевых клеток, блокирования образования и предотвращения роста раковых клеток;

при высоком риске развития опухолей рака молочной железы;

с целью препятствия злокачественной трансформации;

в качестве адъювантной терапии в лечении злокачественных новообразований;

для улучшения общей переносимости организма при химио- и радиотерапии.

Пример 6. Ферментационные питательные среды.

1.

Сахар 10 - 15 г / л

Кукурузный экстракт 5 - 10 г / л

2.

Сахар 11 - 17 г / л

Дрожжевой экстракт 6 - 7 г / л

3.

Сахар 12 - 20 г / л

Дрожжевой автолизат 8 - 10 г / л

4.

Комбинированная питательная среда Дрожжевой автолизат +

Кукурузный экстракт

Сахар 10 г/л

Дрожжевой автолизат 2-5 г/л

Кукурузный экстракт 2-5 г/л

Пример 7. Варианты ферментации.

1. Ферментацию гриба осуществляют, как описано в примере 1, в ферментере в аэробных условиях при значениях pH 6,0 до 6,2 при 27 до 29°C с получением пигмента при $K_a=1,55$.

2. Ферментацию гриба осуществляют, как описано в примере 1. В процессе ферментации растворимость кислорода составляет 80-90%.

$K_a=1,45-1,5$.

Остаточное количество углеводов 0,6-0,8 г/л.

Ферментация завершается через 68-72 ч.

3. Ферментацию гриба осуществляют в условиях примера 1. Для отделения от биомассы гриба и от макрочастиц осуществляют первичное центрифугирование при высоких значениях pH 8,0-9,5.

$K_a=1,5-1,55$.

4. Ферментацию гриба осуществляют в условиях примера 1. Вторичное центрифугирование осуществляют при нейтральных значениях pH 6,0-7,0 с целью освобождения от нерастворимых примесей при данном pH.

$K_a=1,5-1,55$.

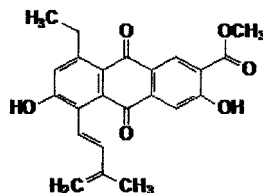
Пример 8. Фармацевтические композиции.

1. Продукт, полученный в соответствии с предложенным способом, гомогенизируют с фармацевтическим инертным наполнителем мальтодекстрином, получают в виде капсул или прессуют в таблетки, содержащие активное вещество в количестве 30 и 40 мг как противоопухолевый лечебный препарат.

2. Продукт, полученный в соответствии с предложенным способом, гомогенизируют с фармацевтическим инертным наполнителем мальтодекстрином, получают в виде капсул или прессуют в таблетки, содержащие активное вещество в количестве 100 мг как противоопухолевый лечебный препарат.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение 8-этил-3,6-дигидрокси-5-[(1E)-3-метилбута-1,3-диен-1-ил]-9,10-диоксодигидроантрацен-2-карбоновой кислоты метиловый эфир, представляющий собой красный пигмент группы антрахинонов и являющийся метаболитом штамма ЕС ССМ 8374 гриба *Penicillium oxalicum* var. *Armeniaca*, формулы I



Формула I

2. Способ получения красного пигмента штамма по п.1, предусматривающий ферментацию штамма глубинным методом культивирования в аэробных условиях при концентрации растворимого воздуха 80-95%, при автономной регуляции грибом pH от 5,8 до 6,4 в период культивирования гриба в жидкой органической питательной среде, отделение биомассы от среды после завершения ферментации и выделение пигмента из культуральной жидкости с последующей очисткой, которую проводят путем нейтрализации pH культуральной жидкости до величины pH 6,8-7,2 и далее центрифугируют культуральную жидкость при 15000-20000 об/мин для удаления нерастворимых высокомолекулярных примесей при данной величине pH.

3. Способ по п.2, отличающийся тем, что стадия роста гриба-продуцента в процессе ферментации составляет от 20 до 25 ч, стадия биосинтеза пигмента составляет 64-68 ч, где количество получаемого пигмента достигает в среднем 7-9 г/л.

4. Способ по п.2, отличающийся тем, что после завершения ферментации pH среды доводят до 8,5-9,0 для увеличения растворимости пигмента, отделяют биомассу и нерастворимые макрочастицы от культуральной жидкости центрифугированием при 3000-5000 об/мин.

5. Способ по п.2, отличающийся тем, что проводят дополнительную очистку путем ультрафильтрации на мембранах 300-500 Да для удаления низкомолекулярных солей и избыточной воды, с получением концентрата, содержащего 120-200 г/л пигмента.

6. Способ по п.5, отличающийся тем, что в полученный концентрат, содержащий 120-150 г/л пигмента, добавляют инертные носители мальтодекстрин или крахмал и сушат в распылительной сушилке от 180 до 220°C с получением конечного продукта в виде сухого порошка от розового до темно-красного цвета, содержащего от 20 до 50% красного пигмента с носителем от 80 до 50% соответственно.

7. Продукт, полученный в соответствии со способом по любому из пп.2-6, со степенью очистки 80-90% и соотношением пиков $K_a=1,45-1,55$.

8. Применение соединения по п.1 в качестве лечебно-профилактического противоопухолевого средства для профилактики и/или лечения онкологических заболеваний.

9. Применение по п.8, где онкологические заболевания выбирают из группы, включающей рак молочной железы, толстой кишки, рак печени, легочную карциному, хронический лейкоз и обширную гепатоцеллюлярную карциному.

10. Способ лечения онкологических заболеваний, отличающийся тем, что пациенту вводят соединение по п.1 или продукт по п.7 в терапевтически эффективном количестве.

11. Способ по п.10, где онкологические заболевания выбирают из группы, включающей рак молочной железы, толстой кишки, рак печени, легочную карциному, хронический лейкоз и обширную гепатоцеллюлярную карциному.

12. Фармацевтическая композиция для лечения онкологических заболеваний, содержащая в качестве активного вещества соединение по п.1 или продукт по п.7 в терапевтически эффективном количестве и фармацевтически приемлемый наполнитель.

13. Фармацевтическая композиция по п.12, представляющая собой раствор для инъекций, или твердую лекарственную форму, или капсулу.

