



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК  
C07K 5/0202 (2019.08); C12P 21/00 (2019.08)

(21)(22) Заявка: 2019104723, 20.02.2019

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
20.02.2019

Дата регистрации:  
26.12.2019

Приоритет(ы):  
(22) Дата подачи заявки: 20.02.2019

(45) Опубликовано: 26.12.2019 Бюл. № 36

Адрес для переписки:  
119021, Москва, Б. Пироговская, 11, стр. 1,  
Федеральное государственное бюджетное  
научное учреждение "Научно-  
исследовательский институт по изысканию  
новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе"

(72) Автор(ы):

Садькова Вера Сергеевна (RU),  
Рогожин Евгений Александрович (RU),  
Баранова Анна Александровна (RU),  
Георгиева Марина Леонидовна (RU),  
Биланенко Елена Николаевна (RU),  
Гаврюшина Ирина Александровна (RU),  
Васильченко Алексей Сергеевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное  
научное учреждение  
"Научно-исследовательский институт по  
изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф.  
Гаузе" (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете  
о поиске: А. А. Baranova et al., "Antimicrobial  
potential of alkalophilic micromycetes  
*Emericellopsis alkalina*", Applied Biochemistry  
and Microbiology, November 2017, Volume 53,  
Issue 6, pp. 703-710. RU 2316595 C1, 10.02.2008.

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ПРОТИВОГРИБКОВОГО АНТИБИОТИКА ЭМЕРИЦИЛЛИПСИНА  
А

(57) Реферат:

Изобретение относится к способу получения  
нового пептидного противогрибкового  
антибиотика эмерициллипсина А, продуцируемого  
штаммом *Emericellopsis alkalina* F -1428, с  
противогрибковой активностью в отношении  
*C.glabrata* 1402м, *Aspergillus ochraceus* 497м 2015,  
а также *Bipolaris hawaiiensis* 988м 2015 и *Aspergillus*  
*terreus* 1133м 2011, обладающих природной  
резистентностью ко всем применяемым в

химиотерапии антибиотикам - азолам. Разработан  
способ получения нового антибиотика на  
специализированной жидкой щелочной  
питательной среде с выходом противогрибкового  
пептида 0,25 г/л. Эмерициллипсин А эффективен  
при лечении бронхолегочных инвазивных  
микозов, вызываемых плесневыми грибами и  
дрожжами. 2 н.п. ф-лы, 2 ил., 4 табл., 5 пр.

RU 2 710 377 C1

RU 2 710 377 C1



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11)**2 710 377**<sup>(13)</sup> **C1**

(51) Int. Cl.  
*C07K 5/023* (2006.01)  
*C12P 21/00* (2006.01)

**(12) ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC  
*C07K 5/0202* (2019.08); *C12P 21/00* (2019.08)

(21)(22) Application: **2019104723, 20.02.2019**(24) Effective date for property rights:  
**20.02.2019**

Registration date:  
**26.12.2019**

Priority:

(22) Date of filing: **20.02.2019**(45) Date of publication: **26.12.2019 Bull. № 36**

Mail address:

119021, Moskva, B. Pirogovskaya, 11, str. 1,  
Federalnoe gosudarstvennoe byudzhethnoe  
nauchnoe uchrezhdenie "Nauchno-issledovatel'skij  
institut po izyskaniyu novykh antibiotikov imeni  
G.F. Gauze"

(72) Inventor(s):

**Sadykova Vera Sergeevna (RU),  
Rogozhin Evgenij Aleksandrovich (RU),  
Baranova Anna Aleksandrovna (RU),  
Georgieva Marina Leonidovna (RU),  
Bilanenko Elena Nikolaevna (RU),  
Gavryushina Irina Aleksandrovna (RU),  
Vasilchenko Aleksej Sergeevich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe gosudarstvennoe byudzhethnoe  
nauchnoe uchrezhdenie  
"Nauchno-issledovatel'skij institut po izyskaniyu  
novykh antibiotikov imeni G.F. Gauze" (RU)**

**(54) METHOD OF PRODUCING AN ANTIFIBIC ANTIBACTERIAL EMERICILLIPSIN A**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to a method for producing a new peptide antimycotic antibiotic emericillipsin A, produced by a strain *Emericellopsis alkalina* F-1428, with antifungal activity in relation to *C.glabrata* 1402m, *Aspergillus ochraceus* 497m 2015, as well as *Bipolaris hawaiiensis* 988m 2015 and *Aspergillus terreus* 1133m 2011, having natural

resistance to all used in chemotherapy antibiotics – azoles. A method for producing a new antibiotic on a specialized liquid alkaline nutrient medium with an output of an antifungal peptide of 0.25 g/l is developed.

EFFECT: emericillipsin A is effective in treating bronchopulmonary invasive fungal infections caused by mold fungi and yeast.

2 cl, 2 dwg, 4 tbl, 5 ex

C 1  
7  
2  
7  
1  
0  
3  
7  
7  
R U

R U  
2  
7  
1  
0  
3  
7  
7  
C 1

Изобретение относится к биотехнологии, а именно к способу получения противогрибкового антибиотика путем культивирования штамма алкалофильного гриба *Emericellopsis alkalina* F-1428 на жидкой питательной среде и нового пептидного антибиотика эмерициллипсина А. Изобретение может быть использовано в медицинской промышленности при производстве противогрибкового антибиотика, эффективного при лечении бронхолегочных инвазивных микозов, вызываемых плесневыми грибами и дрожжами.

Поражения условно-патогенными грибами бронхов, легких и плевры относятся к вероятным инфекционным осложнениям туберкулеза, что обусловлено наличием тяжелого первичного заболевания легких (его течением и прогрессированием) и рядом предрасполагающих факторов: формированием полостных изменений и бронхоэктазов в легких; различными иммуносупрессивными состояниями, включая случаи туберкулеза, сочетанного с ВИЧ-инфекцией; длительным применением нескольких антибактериальных препаратов широкого спектра действия; наличием распространенной колонизации нижних дыхательных путей условно-патогенными грибами; проведением инвазивных процедур и другими факторами риска, связанными с пребыванием во фтизиатрическом стационаре [Климко Н.Н. Васильева Н.В., 2016; Нозокомиальная пневмония у взрослых: Российские национальные рекомендации, 2016]. Заселение и последующая колонизация нижних отделов дыхательных путей грибами родов *Aspergillus* или *Candida* может приводить к развитию аллергических форм заболеваний, способных осложнять течение туберкулезного процесса [Климко Н.Н. Васильева Н.В. Микозы легких. // В кн.: Пульмонология: Национальное руководство. Под ред. А.Г. Чучалина. - Москва: ГЭОТАР-Media. - 2016. - с. 236-249. У значительного числа пациентов наблюдаются два и более фактора, предрасполагающих к развитию микоза; особенно опасно их сочетание с наличием спор *Aspergillus spp.* и других мицелиальных грибов в воздухе лечебного стационара [Климко Н.Н. Микозы: диагностика и лечение. Руководство для врачей. 2-е изд. перераб. и доп. - М.: Ви Джи Групп, 2008. - 336 с.]

Природные антимикробные пептиды грибов являются одним из важнейших источников новых эффективных антибиотиков за счет широкого спектра действия в отношении условно-патогенных и патогенных бактерий и грибов, низкой токсичности и отсутствия формирования резистентности. Только грибы продуцируют пептаиболы - антибиотические пептиды, активные в отношении грамположительных микроорганизмов и паразитов, некоторые из них также обладают противоопухолевой активностью.

Грибы рода *Emericellopsis* давно известны как продуценты антимикробных пептидов группы пептаиболов. Наиболее изученными являются 4 гомолога зервамицина, проявляющих фунгицидную и цитотоксическую активность [Balashova, T.A., Shenkarev, Z.O., Tagev, A.A., Ovchinnikova, T.V., Raap, J. and Arseniev, A.S. (2000). "NMR structure of the channel-former zervamicin II in isotrop solvents". FEBS Letters, 466: 333 -336], выделены и описаны эмеримицины II, III, IV (продуцент *Emericellopsis microspora*). Известны бергофунгины А и В из *Emericellopsis donezkii* НКІ 0059 [Berg, A., Schlegel, B., Ihn, W., Demuth, U. and Gräfe, U. (1999). "Isolation and Structural Elucidation of New Peptaibols, Bergofungins B, C and D, from *Emericellopsis donezkii* НКІ 0059". The Journal of Antibiotics, 52(7): 666 -669]. Их гомологи, бергофунгины С и D, были обнаружены и у вида *E. salmosynnemata* [Gessmann R., Axford D., Brućkner H., Berg A., Petratos K. A natural, single-residue substitution yields a less active peptaibiotic: the structure of bergofungin A at atomic resolution/ Acta Cryst. - 2017. - P. 1-6].

Новый вид *Emericellopsis alkalina* впервые описан в 2013 г., его изоляты выделены из содовых солончаков Кулундинской степи и Забайкалья (Россия). Известно, что алкалофильные грибы вида *Emericellopsis alkalina* способны к синтезу биологически активных пептидных соединений, которые содержатся в культуральной жидкости и вегетативном мицелии [Баранова А.А., Рогожин Е. А., Георгиева М. Л., Биланенко Е. Н., Кулько А. Б., Якушев А. В., Алферова В. А., Садыкова В. С. Антимикробные пептиды алкалофильных грибов *Emericellopsis alkalina*: Биосинтез и биологическая активность в отношении патогенных грибов с множественной резистентности/ Прикл. биохимия и микробиология. 2019. - том 55. №2. -с.151-157].

Известны способы получения пептидов и фармацевтических композиций на их основе химическим синтезом или химической модификацией антибиотиков полимиксина и октапептина, включая циркулин А, полимиксин А, полимиксин В, полимиксин D, октапептин В, октапептин С и полимиксин В<sub>1</sub>; обладающих антибактериальными свойствами [Патент WO 2006/083317(10.08.2006)].

Известны способы получения природных пептидов из органов и тканей сельскохозяйственных животных [патенты РФ №№2075944, 2104702, 2161501, 2043364]. Недостатком этого способа является дефицит этого вида природного сырья.

Известен способ получения природных комплексов пептидов с противогрибковой активностью, предназначенных для лечения бактериальных и грибковых инфекций человека и животных, включая устойчивые к антибиотикам формы из жирового тела насекомых [Патент РФ №2552157].

Наиболее близким к предлагаемому изобретению является способ получения противогрибкового пептида ареницина микробиологическим синтезом из генно-модифицированного штамма *Escherichia coli* BL21(DE3)/pE-His8-TrxL-Ar2 [Патент РФ №2316595].

Недостатком этого способа является дорогостоящая очистка рекомбинатного пептида и отсутствие противогрибковой активности в отношении резистентных патогенных мицелиальных и дрожжевых грибов -возбудителей системных и инвазивных микозов.

Изобретение решает задачу расширения ассортимента природных пептидов и получение пептида с противогрибковой активностью.

Техническим результатом описываемого изобретения является получение из штамма *Emericellopsis alkalina* F -1428 микробиологическим синтезом нового противогрибкового пептида эмерициллипсина А, подавляющего возбудителей инвазивных бронхолегочных микозов, резистентных к используемым в клинической практике антибиотикам - азолам.

Приведенные ниже примеры иллюстрируют изобретение.

Пример 1. Культивирование штамма *Emericellopsis alkalina* F -1428

Штамм F -1428 галофильного микромицета *Emericellopsis alkalina* относится к митоспоровым грибам - анаморфам аскомицетного аффинитета: рода *Hypocrea*, семейства *Bionectriaceae*, порядка *Hypocreales*, класса *Sordariomycetes*, отдела *Ascomycota* [Grum-Grzhimaylo A.A., Georgieva M.L., Debets A.J.M., Bilanenko E.N. Are alkalotolerant fungi of the *Emericellopsis* lineage {*Bionectriaceae*) of marine origin? // IMA Fungus. Vol. 4. N. 2. 2013. P. 211-226. DOI: 10.5598/ima fungus.2013.04.02.07

<http://www.ima fungus.org/Issue/42/17.pdf1>.

В качестве посевного материала используют споровую суспензию 5-суточной культуры гриба, полученной на сусло-агаре.

Культивирование штамма F -1428 *Emericellopsis alkalina* осуществляют в аэробных условиях стационарным способом на специализированной щелочной среде (г/л):

минеральная основа:  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  - 24,  $\text{NaHCO}_3$  - 6,  $\text{NaCl}$  - 6,  $\text{KNO}_3$  - 1,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  - 1; солодовый экстракт (15°Б) - 200 мл, дрожжевой экстракт - 1, агар - 20;  $\text{H}_2\text{O}$  дистиллированная 800 мл. Для приготовления отдельно стерилизуют минеральную основу и остальные компоненты в течение 30 мин при избыточном давлении 0.5 атм. Все компоненты среды объединяют при 50°С. Данную среду разливают в колбы, стерилизуют и засевают споровой суспензией гриба из расчета  $1 \times 10^4$  КОЕ мл среды. Стационарное культивирование продуцента проводят в течение 14 суток, затем биомассу мицелия и спор отделяют центрифугированием на центрифуге. Для получения целевого пептидного противогрибкового антибиотика эмерициллипсина А используют культуральную жидкость.

Пример 2. Выделение пептидного антибиотика эмерициллипсина А

Культуральную жидкость продуцента экстрагируют этилацетатом в соотношении органический растворитель - культуральная жидкость 5:1. Полученные экстракты упаривают в вакууме на роторном испарителе "Rotavapor-RBüchi" (Швейцария) при 42°С досуха, остаток растворяют в водном 70%-ном этаноле и получают спиртовые концентраты антибиотика.

Для фракционирования антибиотического комплекса фракции разделяют с помощью прямофазной флэш-хроматографии последовательно в системах: хлороформ-метанол (50:1 → 20:1 → 10:1 → 3:1), 96% этанол и этанол-вода (7:3).

Дальнейшее разделение активной фракции после флэш-хроматографии проводят путем аналитической обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ) с использованием колонки XBridge 5 мкм 100А размером 250×4.6 мм в растущем линейном градиенте концентрации ацетонитрила в качестве подвижной фазы (элюент А - 0.1%-ная трифторуксусная кислота (ТФУ) в воде MQ, элюентом В - 80%-ный ацетонитрил с 0.1%-ной водной ТФУ) при скорости потока 950 мкл/мин. Для ОФ-ВЭЖХ используют ультраградиентный ацетонитрил фирмы «Panreac» (Испания) и ТФУ производства «Sigma-Aldrich» (США). С целью получения индивидуального антибиотика эмерициллипсина А проводят разделение методом полупрепаративной ОФ-ВЭЖХ на колонке XBridge 10 мкм 100А (250×10 мм). Поглощение определяют при длине волны 214 нм и скорости потока подвижной фазы 4 мл/мин (рисунок 1). Выход антибиотика эмерициллипсина А составляет 0,25 г/л.

Пример 3. Определение структуры эмерициллипсина А

Масс-спектрометрический анализ эмерициллипсина А проводят с использованием установки для хроматомасс-спектрометрии LC-MS/MS (Agilent Technologies, США). Раствор пептида объемом 40 мкл и концентрацией 1 мг/мл наносят с помощью системы автоматического ввода образцов на колонку ОФ-ВЭЖХ Zorbax 300SB-C18, 5 мкм, размерами 0.75×150 мм и разделяют в системе «подвижная фаза», содержащей смесь 96.9% воды MQ, 3% ацетонитрила и 0.1% муравьиной кислоты (v/v) (буфер А) и 99,9% ацетонитрила в присутствии 0.1% муравьиной кислоты (v/v) (буфер Б), скорость потока 300 нл/мин, линейный градиент: 15-85% буфера Б в течение 30 минут.

Запись спектров ЯМР осуществляют на приборе Avance Bruker 800 МГц (Bruker Biospin, Германия). Концентрация пептида составляет примерно 3 мг/мл DMSO. Структуру эмерициллипсина А расшифровывают путем анализа гомоядерных (2D COSY, 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC, 2D 1H-15N HSQC, 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC, 2D 1H-15N HMBC) и гетероядерных (2D 1H-13C HSQC-TOCSY) спектров. Дополнительно записывают спектр 2D ROESY с целью выявления конфигурации стереоцентров данной молекулы.

Сигналы в спектрах ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  представлены в Таблице 4. Структура соединения представлена на рисунке 2.

Таблица 4

Данные ЯМР эмерициллипсина А

№	Amino acid	Position	$^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$	$^1\text{H}$	HMBC*
1	(2R)-2-methyl decanoic acid	C1	176.05	-	-
		C2	37.159	2.627	C1, C3, C3', C4
		C3	33.833	1.27/1.51	C1, C2, C3, C3', 5
		C3'	17.435	1.022	C1, C2, C3
		C4	27.084	1.196/1.276	C5
		C5	29.542	1.237	C4, C6, C7
		C6	29.382	1.238	C4, C5, C7, C8
		C7	29.07	1.239	C5, C6, C8
	C8	31.729	1.237	C7, C9, C10	

		C9	22.556	1.262	C7, C8, C10	
		C10	14.421	0.856	C8, C9	
5	2	(3R)-3-methylproline	C	172.9	-	-
10			C $\alpha$	67.9	3.72	1-C1, C, C $\beta$ , C $\gamma$ 1, C $\gamma$ 2, C $\delta$ 1
			C $\beta$	37.7	2.2	C $\alpha$ , C $\gamma$ 1, C $\gamma$ 2, C $\delta$ 1
15			C $\gamma$ 1	32.7	1.577/2.08	N, C $\alpha$ , C $\beta$ , C $\gamma$ 2, C $\delta$ 1
			C $\gamma$ 2	17.9	1.056	C $\alpha$ , C $\beta$ , C $\gamma$ 1
			C $\delta$ 1	46.7	3.62/3.685	C $\beta$ , C $\gamma$ 1
20			N	132.000	-	-
	№	Amino acid	Position	13C/15N	1H	HMBC*
25	3	(2S,4S)-2-Amino-4-methyl-6-hydroxy-8-oxodecanoic acid (AHMOD)	C	174.067	-	-
			C $\alpha$	52.617	4.126	2-C, C, N, C $\beta$ , C $\gamma$
30			N	115.241	8.069	2-C, C, C $\alpha$ , C $\beta$
			C $\beta$	37.586	1.449/1.731	N, C, C $\alpha$ , C $\gamma$ , C $\delta$ 1, C $\delta$ 2
35			C $\gamma$	26.587	1.663	C $\alpha$ , C $\beta$ , C $\delta$ 1, C $\delta$ 2, C $\epsilon$ 1
			C $\delta$ 1	45.186	1.294	C $\gamma$ , C $\beta$ , C $\delta$ 2, C $\epsilon$ 1, C $\xi$ 1
40			C $\delta$ 2	19.88	0.862	C $\beta$ , C $\gamma$ , C $\delta$ 1
			C $\epsilon$ 1	65.402	3.988	C $\gamma$ , C $\delta$ 1, C $\xi$ 1, C $\eta$ 1
45		C $\xi$ 1	50.634	2.445	C $\delta$ 1, C $\epsilon$ 1, C $\eta$ 1, C $\theta$ 1	

		Oξ2	-	4.623	Cγ, Cδ1, Cε1, Cξ1	
5		Cη1	210.532	-	-	
		Cө1	36.425	2.445	Cη1, Cι1	
10		Cι1	7.917	0.907	Cη1, Cө1	
	4	L-Alanine	C	173.798	-	
			Cα	51.023	3.993	C, N, Cβ
15			N	120.328	7.85	C, Cα, Cβ
			Cβ	16.964	1.313	C, N, Cβ

В соответствии с ЯМР-спектрами эмерициллипсин А представляет собой линейный полипептид, с 2-метилдекановой кислотой (2MDA) на N-конце и N-(2-гидроксиэтил)-1,2-пропандиамина на C-конце. Пептид образует альфа-спираль и содержит 8 карбоксильных и кетонных групп. Из 7 аминокислотных остатков два представлены аланином и изолейцином, а остальные - 3-метилпролином (ЗМП), 2-амино-4-метил-6-гидрокси-8-оксодекановой кислотой (АНМОД), 2-аминоизобутиратом (АИБ), изовалином и β-аланином. ЯМР-спектры показывают молекулярную формулу C<sub>54</sub>H<sub>99</sub>N<sub>9</sub>O<sub>11</sub> с изотопной молекулярной массой 1049,746.

Эмерициллипсин А является типичным представителем липоаминопептидов. Эти пептиды характеризуются присутствием альфа-метилразветвленной жирной кислоты на N-конце, с последующим производным пролина в положении 2 и АНМОД в положении 3.

Для оценки противогрибковых свойств полученного вышеописанным способом пептидного антибиотика эмерициллипсина А проводят тесты на условно-патогенных и патогенных клинических грибах, оценивающих активность противогрибкового антибиотика.

Пример 4. Оценка фунгицидной активности эмерициллипсина А в отношении штаммов условно-патогенных и токсигенных мицелиальных и дрожжевых грибов

Тест-объектами берут коллекционные штаммы условно - патогенных мицелиальных и дрожжевых микроскопических грибов *Aspergillus niger* INA 00760, *Candida albicans* ATCC 2091, *S. tropicales* INA 00763 и условно-патогенных микромицетов - *A. oryzae* 1К, *A. niger* 2К, *A. fumigatus* 4К, *A. terreus* 4К, *A. fisheri* 3К, *A. flavus* 7К, *A. ustus* 8К. Контролем служат стандартные диски с амфотерицином В («НИИ Пастера», 40 мкг/мл). Величину диаметра зоны подавления роста тест-культур оценивают на 5-7 сутки. Чашки Петри с дрожжами инкубируют при 37°C на среде Сабуро, с патогенными и условно-патогенными микроскопическими грибами при 28°C на среде Чапека. Эмерициллипсин А обладает широким спектром фунгицидной активности в отношении условно-патогенных грибов (таблица 2).

Таблица 2

Противогрибковая активность эмерициллипсина А из *Emericellopsis alkalina* ВКПМ F-1428 в отношении токсигенных плесневых грибов.

Тест-организм	Диаметр зоны подавления*, мм	
	Эмерициллипсин А	Амфотерицин В
<i>A.fumigatus</i> 4К	25±0,2	8
<i>A.oryzae</i> 1К	16±0,4	9
<i>A.ustus</i> 8К	22±0,5	9
<i>A.terreus</i> 4К	11±0,6	9
<i>A.fisheri</i> 3К	28±0,6	11
<i>A.niger</i> 2К	22±0,6	21
<i>A.flavus</i> 7К	20±0,6	7
<i>A.niger</i> INA 00760	25±0,6	14
<i>P.brevicompactum</i> VKM F-4481	21±0,3	15
<i>P.chrysogenum</i> VKM F-4499	25±0,6	17
<i>C. albicans</i> ATCC 2091	20±0,1	11
<i>C.tropicales</i> INA 00763	31±0,2	10

\* - ошибка измерения зоны подавления 1-2 мм.

Антибиотик ингибирует рост всех условно-патогенных и токсигенных тест-культур мицелиальных грибов, особенно эффективен против *A. fumigatus* 4К, *A.niger* INA 00760, *P.chrysogenum* VKM F-4499. Активность антибиотика в большинстве случаев превышает активность амфотерицина В.

Пример 5. Оценка фунгицидной активности эмерициллипсина А в отношении клинических изолятов мицелиальных и дрожжевых грибов, резистентных к азолам.

Опыт проводят согласно примеру 4, но в качестве тест-объектов используют клинические изоляты дрожжевых грибов, возбудителей инвазивных кандидозов с множественной резистентностью к применяемым антибиотикам - азолам: *Candida albicans* 1582м 2016 - возбудитель кандидоза пищевода на фоне туберкулеза, туберкулезом селезенки и ВИЧ, *Candida glabrata* 1402м 2016 - возбудитель кандидоза легких, *Candida krusei* 1447м 2016 - фиброзно-кавернозный туберкулез легких, *Saccharomyces cerevisiae* 775м 2017 - туберкулезный плеврит, *Cryptococcus laurentii* 801м 2017 - туберкулез легких. Также используют изоляты мицелиальных грибов - возбудителей инвазивных аспергиллезов с множественной резистентностью к применяемым антибиотикам - азолам: *Aspergillus fumigatus* 163м 2016 - фиброзно-кавернозный туберкулез легких; *Aspergillus flavus* 905м 2016 - фиброзно-кавернозный туберкулез легких; *Aspergillus terreus* 1133м 2011 - туберкулез легких; *Aspergillus ochraceus* 497м 2015 - туберкулез легких; *Aspergillus niger* 219\_2016 фиброзно-кавернозный туберкулез легких; *Bipolaris hawaiiensis* 988м 2015 - фиброзно-кавернозный туберкулез легких.

Эмерициллипсин А эффективен против *C.glabrata* 1402м, *Aspergillus ochraceus* 497м 2015, обладающих природной резистентностью ко всем применяемым в химиотерапии

антибиотикам - азолам, а также *Bipolaris hawaiiensis* 988м 2015 к *Aspergillus terreus* 1133м 2011 (таблица 3 и 4).

Таблица 3

Противогрибковая активность эмерициллипсина А из *Emericellopsis alkalina* ВКПМ F-1428 в отношении клинических патогенных грибов с множественной резистентностью к азолам.

Тест-организм	Диаметр зоны подавления, мм			
	Эмерицил липсин А	Амфотерицин В	Флуконазол	Вориконазол
<i>A. fumigatus</i> 163м	24±0,1	0	0	0
<i>A. flavus</i> 905м	28±0,1	10±0,6	0	0
<i>A. terreus</i> 1133м	30±0,3	Природная	0	0

		резистентность		
<i>A. ochraceus</i> 497м	27±0,4	0	0	0
<i>A. niger</i> 219	32±0,6	17±0,2	0	0
<i>Curv. hawaiiensis</i> 988м	26±0,6	15±0,1	0	0
<i>S. cerevisiae</i> 77м	22,5±0,8	0	0	0
<i>Cr. laurentii</i> 801м	24±0,4	0	0	0
<i>C. glabrata</i> 1402м	27±0,2	18 ±0,3	0	0
<i>C. albicans</i> 1582	30±0,1	18±0,6	0	0
<i>C. tropicalis</i> 1402м	21±0,6	12±0,6	0	0
<i>C. krusei</i> 1447м	26±0,1	10±0,8	0	0

\* - ошибка измерения зоны подавления 1-2 мм.

Таблица 4

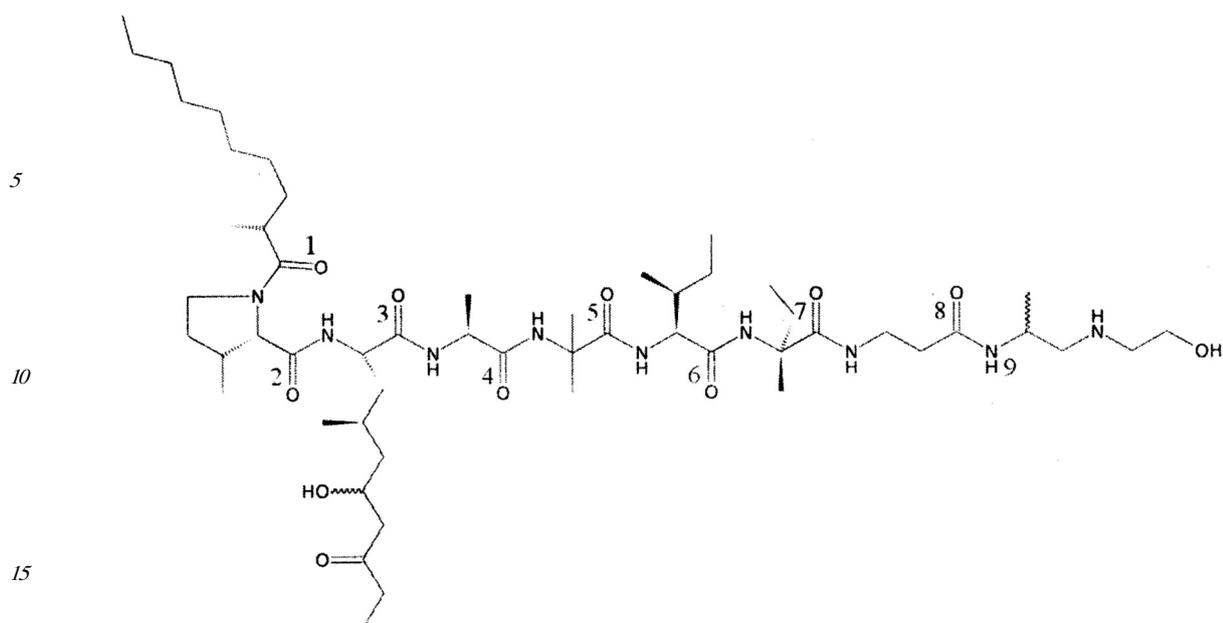
Минимальная подавляющая концентрация липопептидола эмерициллипсина А из *E. alkalina* ВКПМ F-1428 .

Тест-организм	Эмерициллипсин А	Амфотерицин В
<i>C. albicans</i> 1582м	2	1
<i>A. niger</i> 219	1	0.25
<i>A. fumigatus</i> 163м	2	1

Приведенные в таблицах результаты позволяют сделать вывод о наличии достаточно высокой противогрибковой активности нового пептидного антибиотика эмерициллипсина А, полученного описываемым способом.

### (57) Формула изобретения

1. Способ получения противогрибкового антибиотика эмерициллипсина А формулы



путем приготовления споровой суспензии микромицета *Emicelopsis alkalina* штамма ВКПМ F-1428, приготовления специализированной щелочной среды (г/л): минеральная основа:  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -24,  $\text{NaHCO}_3$ -6,  $\text{NaCl}$ -6,  $\text{KNO}_3$ -1,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ -1; солодовый экстракт (15°Б) - 200 мл, дрожжевой экстракт-1, агар-20;  $\text{H}_2\text{O}$  дист. 800 мл, ее стерилизации, засева

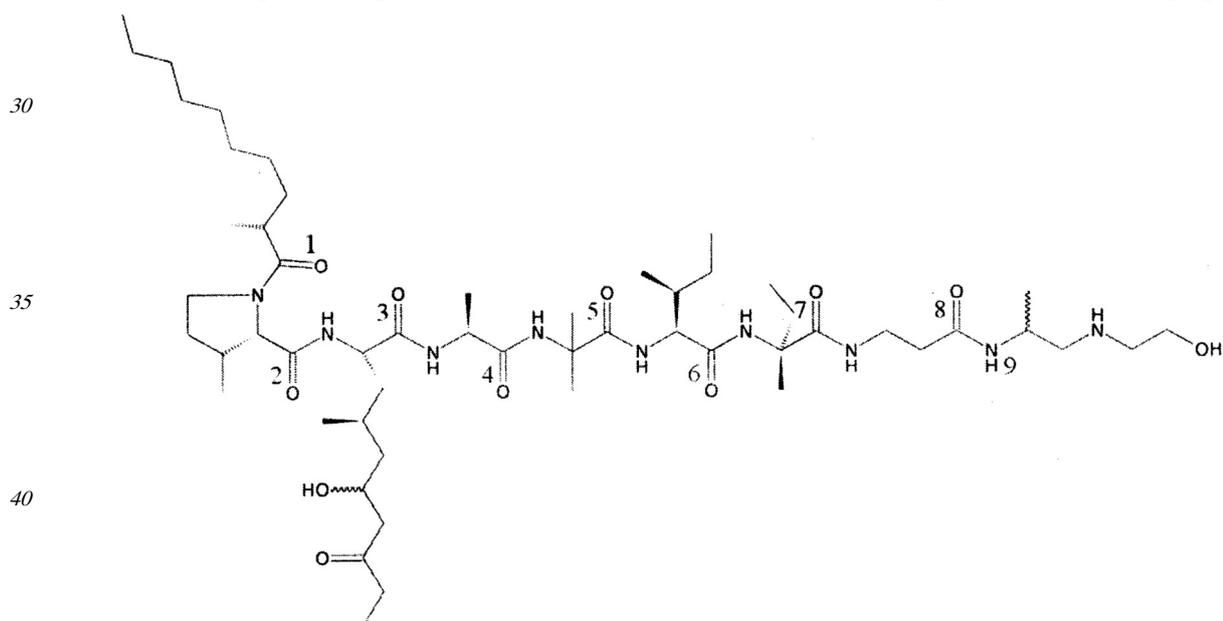
20

приготовленным посевным мицелием стерильной жидкой питательной среды, культивирования в ней гриба в аэробных условиях стационарно, с последующим разделением на биомассу и культуральную жидкость, разделение и очистку целевого

25

продукта посредством колоночной и ВЭЖХ хроматографии с получением противогрибкового антибиотика эмерициллипсина А.

## 2. Новый противогрибковый пептидный антибиотик - эмерициллипсин А формулы



полученный по способу п. 1, активный в отношении возбудителей бронхолегочных инвазивных микозов с множественной резистентностью.

45

1

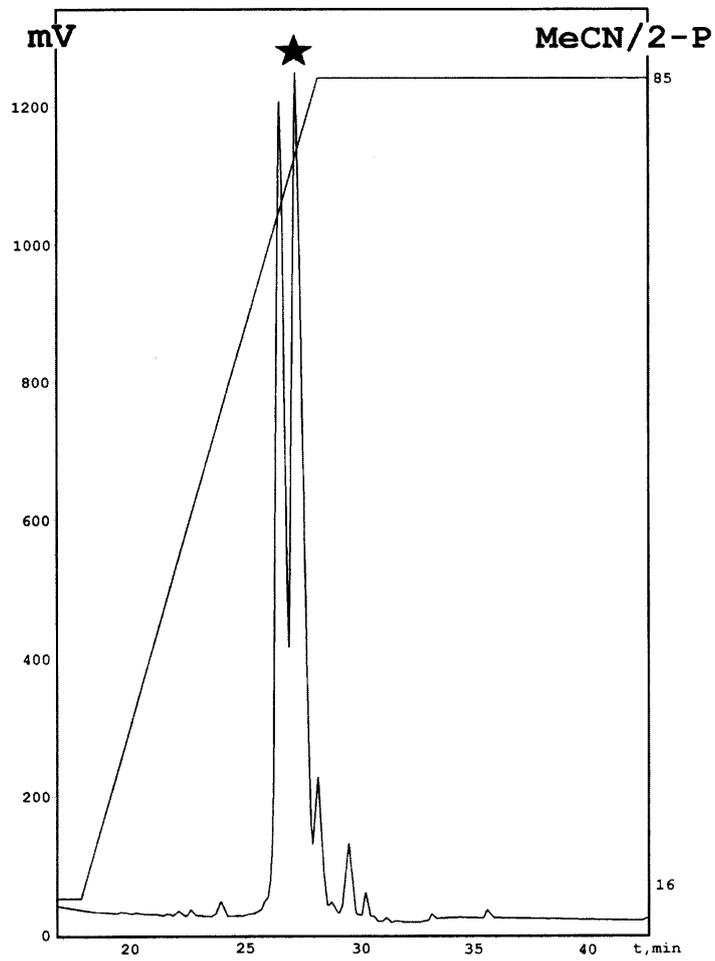


Рис. 1 Профиль ВЭЖХ противогрибкового антибиотика эмерициллипсина А, активного в отношении мультирезистентных возбудителей бронхолегочных микозов

2

