



ЕВРАЗИЙСКАЯ ПАТЕНТНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ (ЕАПО)

EURASIAN PATENT ORGANIZATION

ЕВРАЗИЙСКОЕ ПАТЕНТНОЕ ВЕДОМСТВО (ЕАПВ)

EURASIAN PATENT OFFICE

Малый Черкасский пер., д. 2, г. Москва, 109012
2 M. Cherkassky per., Moscow, 109012, Russia
Телефон/ Phone: (495) 411 6161, (495) 411 6162
Факс / Fax: (495) 621 24 23
E-mail: info@eapo.org
http://www.eapo.org

ЕАПВ/R50

Институт физиологии растений
им.К.А.Тимирязева РАН (ИФР
РАН) Ботаническая ул., д.35,
г.Москва, 127176, Россия

30.12.2013 № 14/019010-15
на № от

ЕАПВ направляет Вам патент № 019010 (заявка №201200749) на изобретение «ШТАММ КУЛЬТУРЫ КАЛЛУСНОЙ ТКАНИ ШЛЕМНИКА АНДРАХНОВИДНОГО (SCUTELLARIA ANDRACHNOIDES VVED.) - SCUT. ANDR. (ТС) - ПРОДУЦЕНТ ВОГОНОЗИДА И АКТЕОЗИДА». Выданный патент действует во всех государствах-участниках Евразийской патентной конвенции, а также на территории Республики Молдова на основании Соглашения между Евразийской патентной организацией и Правительством Республики Молдова о правовой охране изобретений на территории Республики Молдова после денонсации Республикой Молдова Евразийской патентной конвенции, до 25.04.2014.

Для продолжения действия патента в соответствии со статьями 17, 18(2) и (3) Конвенции и пунктом 10 (1) Положения о пошлинах ЕАПО Вам следует на эту дату произвести первую уплату Евразийскому патентному ведомству годовой пошлины за третий год действия патента в размере, равном сумме годовых пошлин, установленных национальным законодательством каждого указанного Вами в заявлении государства (бланк ЕАПВ/400/12), и одновременно годовые пошлины за предшествующие годы, предусмотренные национальным законодательством каждого из указанных государств.

Оформить заявление с расчетом необходимого размера годовых пошлин для представления в ЕАПВ можно в разделе «Патенты» веб-портала ЕАПВ по адресу: www.eapo.org

Приложение: евразийский патент № 019010.

Начальник Отдела реестра
евразийских патентов

Н.М. Бебрили



ЕВРАЗИЙСКАЯ ПАТЕНТНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ЕВРАЗИЙСКОЕ ПАТЕНТНОЕ ВЕДОМСТВО

ЕВРАЗИЙСКИЙ ПАТЕНТ

ЕВРАЗИЙСКИЙ ПАТЕНТ

№ 019010

Название изобретения:

«ШТАММ КУЛЬТУРЫ КАЛЛУСНОЙ ТКАНИ ШЛЕМНИКА
АНДРАХНОВИДНОГО (SCUTELLARIA ANDRACHNOIDES VVED.) -
SCUT. ANDR. (TC) - ПРОДУЦЕНТ ВОГОНОЗИДА И АКТЕОЗИДА»

Патентовладелец (льцы):

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУКИ ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ ИМ. К.А. ТИМИРЯ-
ЗЕВА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК (RU); ИНСТИТУТ
БИОТЕХНОЛОГИИ НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК
КИРГИЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ (KG)

Изобретатель (и):

Кузовкина Инна Николаевна, Прокофьева Мария Юрьевна (RU),
Умралина Анара Рустамовна, Чернышева Татьяна Петровна (KG)

Заявка №: 201200749

Приоритет изобретения:

Дата подачи заявки: 25 апреля 2012 г.

Дата выдачи патента: 30 декабря 2013 г.

Настоящим удостоверяется, что евразийский патент выдан на изобретение, изложенное в прилагаемом описании и формуле изобретения.

При уплате установленных годовых пошлин патент действует на территории государств-участников Евразийской патентной конвенции – Азербайджанской Республики, Кыргызской Республики, Республики Армения, Республики Беларусь, Республики Казахстан, Республики Таджикистан, Российской Федерации, Туркменистана, и на территории Республики Молдова на основании Соглашения между Евразийской патентной организацией и Правительством Республики Молдова.

ГРИГОРЬЕВ Александр Николаевич
Президент Евразийского патентного ведомства



(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 019010 (13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации
и выдачи патента: 2013.12.30(51) Int. Cl. C12N 5/04 (2006.01)
A01H 4/00 (2006.01)

(21) Номер заявки: 201200749

(22) Дата подачи: 2012.04.25

(54) ШТАММ КУЛЬТУРЫ КАЛЛУСНОЙ ТКАНИ ШЛЕМНИКА АНДРАХНОВИДНОГО
(SCUTELLARIA ANDRACHNOIDES VVED.) - SCUT. ANDR. (TC) - ПРОДУЦЕНТ
ВОГОНОЗИДА И АКТЕОЗИДА

(43) 2013.10.30

(96) 2012000116 (RU) 2012.04.25

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ
ИМ. К.А. ТИМИРЯЗЕВА РОССИЙСКОЙ
АКАДЕМИИ НАУК (RU); ИНСТИТУТ
БИОТЕХНОЛОГИИ НАЦИОНАЛЬНОЙ
АКАДЕМИИ НАУК КИРГИЗСКОЙ
РЕСПУБЛИКИ (KG)

(72) Изобретатель:

Кузовкина Инна Николаевна, Прокофьева
Мария Юрьевна (RU), Умралина Анара
Рустамовна, Чернышева Татьяна
Петровна (KG)

(56) КУЗОВКИНА И.Н. и др. Образование
флавоноидов в pRi Т-ДНК-трансформированных
корнях шлемника байкальского (*Scutellaria
baicalensis* Georgi) и способы его регуляции.
Физиология растений, 2001, том 48, № 4, с. 523-528

МАЛИКОВ В.М. и др. Фенольные соединения
растения рода *Scutellaria* L. Распространение,
строение и свойства. Химия природных
соединений, 2002, № 4, с. 299-324

ОЛЕННИКОВ Д.Н. и др. Фенольные
соединения шлемника байкальского (*Scutellaria
baicalensis* georgi). Химия растительного сырья,
2009, № 4, с. 89-98

KOVACS GY. et al.: HPLC Determination of
Flavonoids in Hairy-Root Cultures of *Scutellaria
baicalensis* Georgi. Chromatographia Supplement,
2004, vol 60, pp. S81-S85

КУЗОВКИНА И.Н. Культивирование
генетически трансформированных корней расте-
ний: возможности перспективы использования в
физиологии растений. Физиология растений, 1992,
том 39, вып. 6, с. 1208-1214

(57) Изобретение относится к области физиологии растений, биотехнологии и генной инженерии и может быть использовано в фармацевтической промышленности. Задачей изобретения является получение штамма недифференцированно растущей каллусной ткани шлемника андрахновидного (*Scutellaria andrachnoides* Vved.), способного к интенсивному и стабильному росту в условиях *in vitro* на безгормональных питательных средах и продуцирующего флавоноид и фенолэтаноид актеозид, обладающие высокой антиоксидантной активностью, которая обуславливает их исключительную фармакологическую ценность, находящую применение в медицинской практике. Полученный штамм каллусной ткани шлемника андрахновидного (*Scutellaria andrachnoides* Vved.) обладает признаками pRi т-ДНК трансформации, а именно: интенсивным ростом на питательных средах простого состава, не содержащих фитогормоны, генетической и биохимической стабильностью. Химический анализ вторичных метаболитов штамма каллусной ткани шлемника андрахновидного подтверждает, что штамм сохраняет способность к синтезу фенольных соединений (вогонозида и актеозид), характерных для корней проростков и корней целого растения. Установленные факты свидетельствуют об обоснованности причисления штамма каллусной ткани шлемника андрахновидного к разряду продуцентов вогонозида и актеозид, ценных природных веществ, представляющих большой интерес для медицинской практики.

019010

B1

B1

019010

Область применения

Изобретение относится к области физиологии растений, биотехнологии и генной инженерии и может быть использовано в фармацевтической промышленности, так как фенольные соединения шлемников, к которым относятся такие вещества как флавоны (вогонозид) и фенилэтаноиды (актеозид), обладают высокой антиоксидантной активностью, которая обуславливает их исключительную фармакологическую ценность, находящую применение в медицинской практике.

Уровень техники

Шлемник андрахновидный (*Scutellaria andrachnoides* Vved.) - многолетнее эндемичное травянистое растение, относящееся к семейству губоцветных (*Lamiaceae*) и к роду *Scutellaria* (Флора СССР, Москва, Ленинград, 1954, том 20, стр. 514).

Растение имеет ограниченный, почти "точечный" ареал распространения и встречается в Кыргызстане в районе Атойнокского и Ферганского хребтов на высоте 900-1600 м над уровнем моря.

Это невысокое многолетнее растение высотой 4-12 см, которое растет в каменисто-скалистых местах, цветёт в мае-июне, плодоносит в июле (Абдуллаева М.Н. Род *Scutellaria* L., Шлемник. Определитель растений Средней Азии, Ташкент, 1987, том 9, стр. 13-37; Умралина А.Р., Лазьков Г.А. Эндемики и редкие виды растений Кыргызстана (Атлас), Бишкек, 2008, стр. 96-97).

Растение включено в Красную Книгу Кыргызской республики. Сведения о его культивировании отсутствуют, и семена растения как эндемика сохраняются в семенном банке Института Биотехнологии Национальной Академии Кыргызской Республики. Шлемник андрахновидный относится к числу декоративных растений. Сведений о составе вторичных веществ в надземной части и в корневой системе растения нет даже в последней обширной сводке узбекских фитохимиков, опубликовавших данные химического состава 57 видов шлемников (Маликов В.М., Юлдашев М.П. Фенольные соединения растений рода *Scutellaria*. Распространение, строение и свойства. Химия природных соединений 2002 г., т. 4: 299-324 и т. 5: 385-409).

Редкая встречаемость растения и отсутствие данных о содержащихся в его органах низкомолекулярных соединениях послужили причиной для введения в культуру *in vitro* штамма каллусной ткани шлемника андрахновидного с целью изучения состава вторичных метаболитов в недифференцированно растущих клетках растения, а также попытки его микроклонального размножения в случае сохранения каллусной ткани способности к проявлению органогенеза.

Известен пример получения и культивирования каллусной ткани другого вида шлемника - шлемника байкальского, имевший место в бывшем СССР в 1982 году (Трофимова Н.А. Шлемник байкальский в изолированной культуре тканей. Вестник Томского государственного университета, 1982 г., стр.80-81). Автору удалось получить каллусную культуру от стерильных проростков шлемника байкальского, которую выращивали на агаризованной питательной среде, содержащей ростовые гормоны - кинетин и 2,4-дихлорфеноксусусную кислоту (2.4-Д). Присутствие в питательной среде ростовых гормонов, обеспечивающих рост культивируемых клеток, исключает перспективу возможности практического использования экстрактов полученной каллусной культуры ввиду канцерогенного действия экзогенных ростовых веществ. В полученной автором культуре каллусной ткани шлемника байкальского были с помощью тонкослойной хроматографии обнаружены вторичные флавоны, но не был определен их качественный состав и количественное содержание отдельных компонентов.

Апробация малоизвестного вида шлемника - андрахновидного, как объекта для введения в культуру *in vitro* штамма каллусной ткани представляет большой теоретический и практический интерес с точки зрения оценки возможности индуцированного гормононезависимого роста недифференцированных клеток шлемника андрахновидного и их способности к сохранению способности к синтезу вторичных метаболитов, типичных для корней ювенильного растения.

Почти все виды шлемников относятся к числу исчезающих растений (шлемник байкальский) или эндемиков (шлемник андрахновидный), что диктует необходимость введения в культуру *in vitro* их клеток и тканей особенно корневого происхождения, так как именно в корнях синтезируются флавоны. Именно поэтому нами был использован для введения в культуру *in vitro* эндемичный вид шлемника андрахновидного - *Scutellaria andrachnoides*.

Задача изобретения

Задачей изобретения является получение штамма недифференцированно растущей каллусной ткани шлемника андрахновидного *Scutellaria andrachnoides*, способного к интенсивному и стабильному росту в условиях *in vitro* на безгормональных питательных средах и сохраняющего при этом способность к синтезу основных фенольных соединений, характерных для клеток корней целого растения.

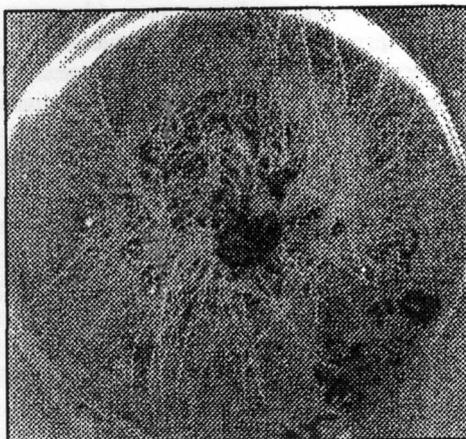
Решение задачи

Поставленная задача решается созданием нового штамма культуры каллусной ткани шлемника андрахновидного *Scut. andr. (TC)* (*Scutellaria andrachnoides* Vved) - продуцента флавона вогонозида и фенилэтаноида актеозида.

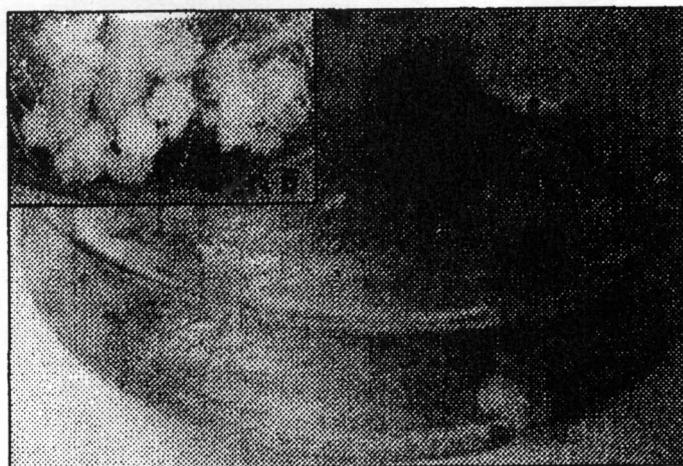
Штамм культуры каллусной ткани шлемника андрахновидного *Scut.andr.(TC)* (*Scutellaria andrachnoides* Vved.) депонирован в Коллекции генетически трансформированных корней растений при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте физиологии растений Российской



Фиг. 2. Первый пассаж культуры корня на агаризованной среде без антибиотика

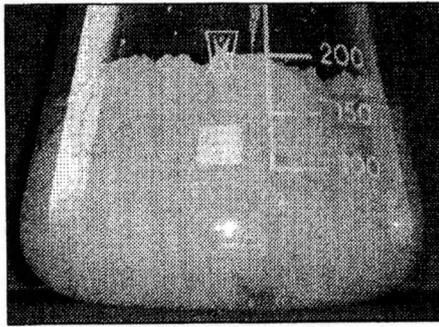


Фиг. 3. Первый пассаж культуры корня в жидкой питательной среде

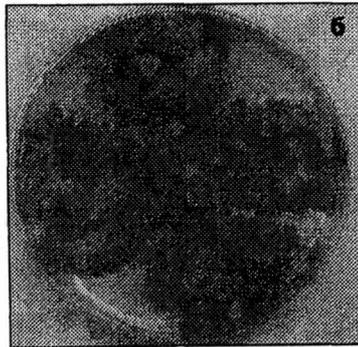


Фиг. 4, 5. Проявление каллусогенеза у культуры корня во время третьего пассажа в жидкой среде

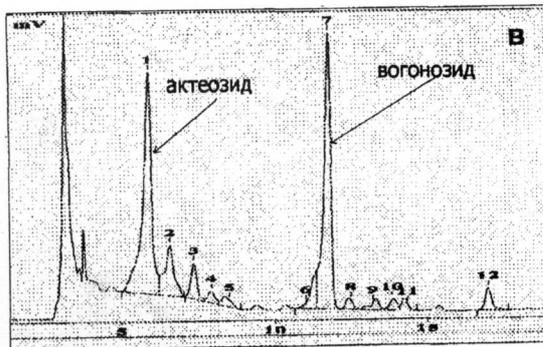
Фиг. 1-5. Последовательность образования каллусной ткани при получении генетически трансформированных корней шлемника андрахновидного (*Scutellaria andrachnoides* Vved.)



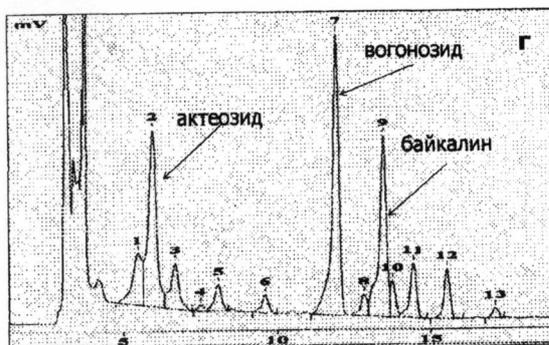
Фиг. 6. Четырехнедельный штамм каллусной ткани, растущий в течение 4 лет в жидкой питательной среде



Фиг. 7. Трехнедельный штамм каллусной ткани шлемника при выращивании на свету

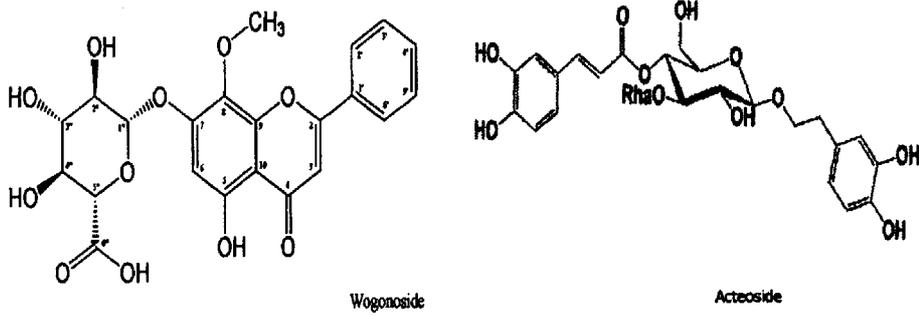


Фиг. 8. ВЭЖХ профиль метанольного экстракта штамма культуры каллусной ткани



Фиг. 9. ВЭЖХ профиль метанольного экстракта штамма культуры корня шлемника

Фиг. 6-9. Стабильно растущий штамм культуры каллусной ткани шлемника при выращивании в разных условиях и ВЭЖХ профили экстрактов штамма культуры каллусной ткани и штамма культуры корня.



Фиг. 10. Структурные формулы двух основных фенольных метаболитов, идентифицированных в штамме культуры каллусной ткани *Scut. andr.* (СТ) - флавоноид вогонозид и фенолэтанол гликозид актеозид.

