



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2006103303/13, 07.02.2006

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
07.02.2006

(43) Дата публикации заявки: 20.08.2007

(45) Опубликовано: 27.10.2008 Бюл. № 30

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: Биологически активные пищевые добавки
(БАД). Научные исследования. А.М. КОТИН.
ВИТАГМАЛ. История вопроса. 20.05.2002.
[найдено 20.03.2007]. Найдено в Интернет:
[http:
//lifeukt.hl.ru/nauka/n_vitagm/istoriya.htm](http://lifeukt.hl.ru/nauka/n_vitagm/istoriya.htm).
RU 2046140 C1, 20.10.1995. SU 1039963 A,
07.09.1983.

Адрес для переписки:

101990, Москва, Петроверигский пер., 4,
Агентство по защите и внедрению
интеллектуальной собственности "Ермакова,
Столярова и партнеры", пат.пов.
Е.А.Ермаковой, рег.№ 163

(72) Автор(ы):

Котин Аркадий Михайлович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Общество с ограниченной ответственностью
"Биофармокс" (ООО "Биофармокс") (RU),
Закрытое акционерное общество "Научно-
производственная фирма "Биофармтокс" (ЗАО
"НПФ "Биофармтокс") (RU)

(54) ШТАММ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК POLYSCIAS FILICIFOLIA (MOORE EX ROUNIER) BAILEY ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ, БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ДОБАВОК И КОСМЕТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ

(57) Реферат:

Штамм культуры клеток Polyscias filicifolia (MOORE EX ROUNIER) BAILEY БФТ 01-95 получен из каллуса листа оранжерейного растения Ботанического института РАН г.Санкт-Петербург, депонирован во Всероссийской коллекции клеточных культур (специализированная коллекция

клеток высших растений, ВНИИФР им. К.А.Тимирязева) под №ВРКК-ВР №58. Изобретение может быть использовано для получения лекарственных препаратов, биологически активных добавок, продуктов функционального питания, косметических средств. 1 табл.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 337 138** ⁽¹³⁾ **C2**

(51) Int. Cl.

C12N 5/04 (2006.01)

A23L 1/30 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: **2006103303/13, 07.02.2006**

(24) Effective date for property rights: **07.02.2006**

(43) Application published: **20.08.2007**

(45) Date of publication: **27.10.2008 Bull. 30**

Mail address:

**101990, Moskva, Petroverigskij per., 4,
Agentstvo po zashchite i vnedreniju
intelektual'noj sobstvennosti "Ermakova,
Stoljarova i partnery", pat.pov.
E.A.Ermakovoj, reg.№ 163**

(72) Inventor(s):

Kotin Arkadij Mikhajlovich (RU)

(73) Proprietor(s):

**Obshchestvo s ogranichennoj otvetstvennost'ju
"Biofarmoks" (OOO "Biofarmoks") (RU),
Zakrytoe aktsionerное obshchestvo "Nauchno-
proizvodstvennaja firma "Biofarmtoks" (ZAO
"NPF "Biofarmtoks") (RU)**

(54) **STRAIN OF CELL CULTURE POLYSCIAS FILICIFOLIA (MOORE EX ROUNIER) BAILEY FOR RECEIVING MEDICINAL PREPARATION, NUTRITIONAL SUPPLEMENTS AND COSMETICS**

(57) Abstract:

FIELD: cosmetology.

SUBSTANCE: strain of cell culture Polyscias filicifolia (MOORE EX ROUNIER) BAILEY BFT 01-95 is received from tylosis of hothouse plant leaf of Botanical Institute Russian Academy of Sciences Saint-Petersburg city. It is deposited in All-Russian collection of cell culture

(specialized collection of higher plant cells, K.A. Timiryazev VNIIFR) under № БПКК-БП № 58. Invention can be used for receiving of medicinal preparations, nutritional supplements, products of functional meals, cosmetics.

EFFECT: field of invention application is extended.
1 tbl

RU 2 337 138 C2

RU 2 337 138 C2

Изобретение относится к биотехнологии, фармакологии, физиологии растений и может быть использовано для индустриального производства высокоценного сырья с целью получения лекарств, биологически активных добавок, функциональных пищевых продуктов, лечебно-профилактической и декоративной косметики и индивидуальных биологически

5 активных веществ.

Наименование штамма БФТ 01-95. Коллекционный номер 58, депонирован во Всероссийской коллекции клеточных культур (специализированная коллекция клеток высших растений, ВНИИФР им. К.А. Тимирязева, Приложение 1).

10 Заявленный штамм *Polyscias filicifolia* (MOORE EX ROUNIER) BAILEY получен в виде каллуса в 1991 г., а в 1995 г. в виде суспензии НПК «БИОФАРМТОКС», в коллекцию поступил от Научно-производственной фирмы «Биофармтокс» в 1995 г. Исходный материал - лист индивидуального оранжерейного растения Ботанического института РАН г. Санкт-Петербурга.

Заявленный штамм характеризуется следующими признаками:

15 а) характером роста:

каллус рыхлый, мягкой консистенции, обводненный, светло-соломенного цвета в начале пассажа, при старении - кремовато-коричневый. Суспензия - белая в начале цикла культивирования, темно-желтая в конце цикла. Окраска суспензии может изменяться в зависимости от состава среды. В частности, на средах с 3% сахарозой наблюдается более

20 темная окраска, чем при более низких концентрациях сахарозы. Процент живых клеток в начале выращивания: 75÷85% на 5÷15 сутки в каллусе и 80÷85% в экспоненциальной фазе роста (4÷6 сутки) в суспензии;

б) способом выращивания: выращивание в накопительном режиме на твердой или в жидкой среде;

25 в) условиями выращивания на твердой среде:

температура $26 \pm 1^\circ\text{C}$; влажность $65 \pm 5\%$, освещенность - темнота. Состав твердой среды для наращивания каллуса (в мг на л):

	NH_4NO_3	1600÷2100
	KNO_3	1800÷2400
30	$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	430÷600
	$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	350÷480
	KH_2PO_4	150÷220
	$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	8÷12
	$\text{Na}_2\text{ЭДТА}$	120÷200
35	H_3BO_3	5÷8
	$\text{MnSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	20÷100
	KJ	0,8÷1,2
	Na_2MoO_4	0,04÷0,2
	CuSO_4	0,002÷0,005
40	$\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	0,002÷0,005
	$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	80÷120
	α -нафтилуксусная кислота (α -НУК)	2÷4
	тиамин (витамин В1)	0,5÷1
	кинетин	2÷3
	сахароза	2000
45	гидролизат казеина	300÷600
	инозит	50÷100
	агар-агар	600÷1000.

50 Составом жидкой среды для наращивания суспензии: аналогичен составу среды для каллусного культивирования без агар-агара, концентрация сахарозы 2÷3%, кинетина - 1÷2 мг/л, α -НУК - 1÷2 мг/л.

Сосуды для выращивания: на агаризованной среде - чашки Петри (20 мл агаризованной среды), майонезные баночки (50÷70 мл среды), бутылки из под молока (75÷100 мл); в

суспензии - от конических колб объемом 300÷1000 мл (коэффициент заполнения 10÷12%, качалки 80÷100 об/мин) до биореакторов объемом 50 и более литров (коэффициент заполнения 75%, барбатирование, механическое перемешивание).

г) кратностью посева: 1:7÷1:10.

5 д) особенностью пересадки: из-за наличия большого количества агрегатов в суспензии пересадку осуществляю разбавлением средой отмеренного количества выросшей суспензии.

На момент паспортизации номер пассажа: каллус 40÷45, суспензия - 10.

10 Хранится методом пересевов. Продолжительность цикла выращивания: каллус - 35 дней, суспензия - 14.

Заявленный штамм имеет следующие цитологические характеристики:

15 Клетки каллуса гетерогенны, неправильной формы, большей частью цилиндрические, связанные в цепочки по 10-12 клеток. Размеры клеток варьируют: по большому диаметру от 28 до 148 мкм (в среднем $58,8 \pm 2,1$) и по меньшему диаметру от 20 до 78 мкм (в среднем $41,4 \pm 1,0$). Встречаются также гигантские клетки.

20 Клетки в суспензии также сильно гетерогенны по морфологии. Наряду с мелкими клетками овальной формы встречаются достаточно крупные клетки вытянутой и извитой формы, характерной для каллусных клеток. Имеется также значительное количество (20÷30%) «лестничных» агрегатов клеток различной формы с числом клеток в агрегате не менее 30. При этом мелкие клетки сосредоточены преимущественно внутри агрегата. Клетки сильно вакуолизированы, крахмальные клетки практически отсутствуют. Соотношение типов клеток меняется в цикле выращивания.

Заявленный штамм имеет следующие кариологические характеристики:

25 а) пределы варьирования от 22 до 74 хромосом, распределение унимодально с максимальным классом 28 хромосом, в отличие от более широкого распределения в штамме *Polyscias filicifolia*, полученного Михайловой намного ранее из клеток корня растения (штамм не депонирован, образец для анализа получен на Биохимическом заводе, г.Кириши Ленинградской обл.)

30 б) маркерные хромосомы отсутствуют. Способность к морфогенезу не наблюдалась. Качественная и количественная характеристика продуктов вторичного метаболизма.

35 Продукты вторичного метаболизма не идентифицированы. При разделении этанольных экстрактов воздушно-сухой биомассы штамма из высушенных листьев *Polyscias filicifolia*, число выраженных пиков в штамме уменьшено по сравнению с листьями растения. Однако площадь фракции, в которой обнаруживается активность на центральную нервную систему в тесте Котин и др. (а.с. СССР №1265615, 1986 г.), в экстрактах штамма больше, чем в экстрактах листьев.

40 Экстракты и сама биомасса могут быть использованы в качестве средства, снижающего риск врожденных аномалий, в качестве средства, снижающего токсичность этанола и других ксенобиотиков, в качестве парафармацевтической пищевой добавки с широким спектром фармакологической активности. Парафармацевтические пищевые добавки и сама биомасса могут быть использованы как профилактические и лечебные средства при инфекционных заболеваниях, в частности при гриппозных и герпесных инфекциях; в качестве тонизирующих и антистрессорных средств, противоишемические, 45 реабилитационные средства при ослабленном организме и острых поражениях центральной нервной системы, при токсикозах, железодефицитной анемии, при всех заболеваниях, сопровождающихся генерацией свободных радикалов, как общеукрепляющие средства при переутомлении и синдроме хронической усталости, в качестве ранозаживляющего средства, при иммунодефицитах. Биомасса может быть 50 использована также для получения значительного числа различных лекарственных средств со специфическим типом действия, тонизирующих напитков с ноотропными свойствами и других лекарственных и пищевых продуктов.

Описывается пример использования штамма, линии или консорциума по заявленному назначению (с указанием условий культивирования, выделения и очистки целевого

продукта, выхода продукта, уровня активности (продуктивности) продукта или продуцента и способах ее определения (тестирования) и т.д.).

ПРИМЕРЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ШТАММА.

Примером использования штамма является разработка и производство биологически активной добавки к пище (БАД) «Витагмал». (Регистрационное удостоверение МЗ РФ №002321.Р. 643.12.2000, ЗАО «Научно-производственная фирма «Биофармтокс», Санкт-Петербург, пр.Солидарности,6) и «Витагмал (супер)» (Санитарно-эпидемиологическое заключение №77.99.915.Б.0002148.02.04 от 26.02.2004, ООО «Биофармтокс», Санкт-Петербург, пр.Энгельса, 27, лит.Ж).

БАД «Витагмал» представляет собой водно-этанольный экстракт биомассы тропического лекарственного растения из семейства аралиевых *Polyscias filicifolia* (полипсиас папоротниколистный), получаемой методом суспензионной культуры клеток высших растений в соответствии с ТУ 9154-001-06910186-2000 на основе патентуемого штамма *Polyscias filicifolia* БФТ 01-95, депонированного во Всероссийской коллекции клеточных культур ИФР РАН за №58 от 5 июня 1995 г.

БАД «Витагмал» производится следующим образом.

1. НАРАЩИВАНИЕ БИОМАССЫ КЛЕТОК *Polyscias filicifolia*

1.1. Объект выращивания.

Использовать штамм культуры клеток *Polyscias filicifolia* БФТ 01-95 НПФ «БИОФАРМТОКС».

1.2. Среда выращивания.

1.2.1. Питательная среда приготавливается общепринятым методом смешивания концентратов макро- и микросолей среды Мурасиге и Скуга (MS-среда), витаминов и регуляторов роста.

Для этого использовать сырье следующей квалификации:

Наименование реактива	% содержания основного вещества, квалификация	
Вода	дистиллированная (деионизованная)	
Аммоний азотнокислый, NH ₄ NO ₃	99,0	х.ч.
Калий азотнокислый, KNO ₃	99,8	х.ч.
Кальций хлористый двуводный, CaCl ₂ ×2H ₂ O	99,5	ч.д.а.
Марганец сернокислый семиводный, MgSO ₄ ×7H ₂ O	99,5	х.ч.
Калий фосфорно-кислый однозамещенный, KH ₂ PO ₂	99,5	х.ч.
Натриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (Трилон Б), Na ₂ ЭДТА	99,0	х.ч.
Железо сернокислое семиводное, FeSO ₄ ×7H ₂ O	99,0	х.ч.
Борная кислота, H ₃ BO ₃	99,5	х.ч.
Магний сернокислый семиводный, MnSO ₄ ×7H ₂ O	97,5	х.ч.
Цинк сернокислый семиводный, ZnSO ₄ ×7H ₂ O	99,0	х.ч.
Калий йодистый, KI	99,5	х.ч.
Натрий молибденовокислый, Na ₂ MoO ₄ ×2H ₂ O	99,0	ч.д.а.
Медь сернокислая, CuSO ₄	99,0	ч.д.а.
Кобальт двуххлористый шестиводный, CoCl ₂ ×6H ₂ O	99,0	ч.д.а.
Сахароза 99,8	х.ч. или ч.д.а.	
Фитогормоны	остальное.	

Химические реактивы более низкой квалификации подлежат очистке двухкратной перекристаллизацией общепринятыми методами. 1.2.2. Последовательность приготовления питательной среды. В соответствии с общепринятыми методами отдельно готовят маточные растворы макро- и микросолей, а также хелатного железа и добавляют в среду в последовательности, поименованной в следующей таблице:

Последовательность	Наименование компонентов	Количество на 1 л	Кратность маточного раствора
1	Макросоли	50 мл	Концентрат ×20
2	Микросоли	1 мл	Концентрат ×100
3	Fe-хелат (Na ₂ ЭДТА) + FeSO ₄)	5 мл	Концентрат ×50
4	α-НУК	1 мл	Концентрат ×50

5	Кинетин	1 мл	Концентрат $\times 50$
6	Тиамин	1 мл	Концентрат $\times 50$
7	Инозит	60 мг	
8	Гидролизат казеина	300 мг	
9	Сахароза	30 г	

5

Гидролизат казеина, инозит и сахароза добавлять в среду в виде индивидуальных навесок.

1.2.3. Стерилизация питательной среды.

Стерилизовать среду в автоклавах в режиме 0,8-1,0 атм избыточного давления пара.

10

Для стерилизации колб со средой использовать следующую схему: 15 минут подготовительного (без давления) режима и 15 минут рабочего режима.

Для стерилизации биореакторов рабочим объемом до 15 литров использовать схему: 20 минут подготовительного (без давления режима) и 25 минут рабочего режима.

15

Для стерилизации пилотных биореакторов использовать схему: метод стерилизации *in situ* путем пропускания острого пара через рубашку и рабочую емкость биореактора. Режим и время - согласно ТУ на конкретный биореактор. Типичная схема: пропускание пара через рубашку биореактора в течение промежутка времени, необходимого для достижения температуры 95 градусов Цельсия, затем пропускание пара в емкость биореактора до достижения температуры 117-120 градусов и поддержание данного режима в течение 25 минут.

20

1.2.4. Подготовка посевного материала.

Суспензионную культуру клеток полисициаса вначале нарастить в колбах на качалке в стандартных условиях выращивания:

25

температура 26+1°C
 влажность 67+3%
 освещенность темнота.

Использовать колбы на 250 мл или 500 мл;

Объем среды - 50 или 100 мл соответственно;

30

Кратность посева - 1:7-1:10;

Начальная плотность 3-6 \times 10 клеток на миллилитр;

Технические данные качалки: 95-95 об/мин, радиус вращения 18-20 мм;

Продолжительность цикла культивирования 14 суток.

35

На 14-е сутки культивирования 15 мл средней пробы суспензионной культуры клеток в стерильных условиях переносятся стерильной пипеткой с широким носиком (не менее 3-5 мм в диаметре) в колбу со 100 мл питательной среды для последующего подготовительного цикла.

Остальная часть подрощенной суспензионной культуры используется для засева лабораторного реактора.

40

1.2.5. Засев лабораторного биореактора суспензионной культурой клеток.

Использовать стерильный биореактор со стерильной питательной средой.

В качестве лабораторного можно использовать биореакторы типа микробиологического биореактора MF-107 фирмы New Brunswick (USA) с барботером и трехъярусной турбинной мешалкой или любой другой барботажный биореактор с рабочим объемом порядка 15 литров.

45

В качестве барботажного биореактора допустимо использовать стеклянную емкость (бутыль) объемом 20 литров, в горловину которой вставлена силиконовая пробка, закрепленная металлическим бандажем, в которую вставлены четыре трубки диаметром 10-12 мм из нержавеющей стали: барботажная, инокуляторная, трубка для отбора проб и трубка для присоединения выходного фильтра.

50

Использовать режим культивирования:

Температура 26+0,25°C.

Расход воздуха на барботаж: 1,5-2,0 л/л в минуту

Освещенность: темнота

1.2.6. Засев пилотного биореактора суспензионной культурой клеток.

В качестве пилотного биореактора используется биореактор фирмы «Electrolux», Швеция, общим объемом 75 литров (рабочий объем 50 литров) с мешалкой типа "морской винт" либо иной другой биореактор типа "Биор" из нержавеющей стали, емкостью свыше 50

литров, с рубашкой для поддержания температуры, механической мешалкой и барботажем. Пилотный биореактор засеивается из лабораторного биореактора. Для этого после 14-16 суток выращивания культуры в лабораторном биореакторе последний присоединить стерильно к пилотному биореактору путем стыковки штуцера и трубки над пламенем горелки. Суспензионную культуру перекачать из лабораторного биореактора в пилотный за счет избыточного давления (0,2-0,4 атм), создаваемого в лабораторном биореакторе стерильным воздухом.

1.2.7. Культивирование в пилотном биореакторе.

В процессе культивирования в биореакторе осуществляется контроль за концентрацией биомассы, температурой, расходом воздуха на барботаж, pH среды и концентрацией растворенного кислорода в среде. Режим культивирования:

Температура - 26°C+0,25°C;

Расход воздуха на барботаж: 0,2-0,3 л/л мин;

Скорость вращения мешалки - 60-80 об/мин;

pH - 4,6-5,0;

PO₂ - не менее 20% (в среднем 35-45%). Регулировать расходом воздуха на барботаж.

Цикл выращивания - 14-16 суток.

Цикл периодического культивирования в пилотном биореакторе считается завершенным, когда достигаются следующие значения параметров:

- содержание по сухой биомассе - не менее 10 г/л,

- по сырой биомассе - не менее 130 г/л,

- по числу клеток - не менее $1,3 \times 10$ кл/мл.

Для оптимизации выхода биомассы допустимо использовать режим полупроточного культивирования, при котором из биореактора отбирается на урожай 70-75% суспензии, к оставшейся в биореакторе культуре клеток добавляется свежая стерильная питательная среда до начального объема и цикл выращивания повторяется.

1.2.8. Отделение биомассы от культуральной среды.

Суспензия клеток полисциаса из пилотного биореактора за счет разности давления с внешней средой (но не более 0,6 атм) переливается по трубке в емкость для сбора суспензии. Отделение биомассы от культуральной среды производится на Нутч-фильтре с одним слоем бязи в качестве фильтрующего материала. Для создания разрежения в Нутч-фильтре используется вакуумный или водоструйный насос. Сырая биомасса с фильтра снимается и равномерно раскладывается на подносы для сушки.

1.2.9. Сушка биомассы.

Сушка биомассы производится на подносах в сушильном шкафу в токе горячего воздуха (не выше 60°C) в течение 12-18 часов. Высохшая биомасса размельчается и переносится для хранения в запаянные полиэтиленовые пакеты. Правильно высушенная биомасса культуры клеток полисциаса имеет серовато-желтый цвет и специфический запах. При нарушении режимов сушки из-за перегрева биомасса темнеет до темно-коричневого и даже черного цвета. Такой продукт считается браком.

1.2.10. Проверка биомассы.

Водно-этанольный экстракт биомассы, получаемый согласно настоящей технической инструкции, должен соответствовать требованиям, предъявляемым к Добавке биологически активной «Витагмал» согласно ТУ 9154-001-06910186-2000 «Добавка биологически активная «Витагмал»».

2. ЭКСТРАКЦИЯ ВОЗДУШНО-СУХОЙ БИОМАССЫ КЛЕТОК ПОЛИСЦИАСА.

2.1. Подготовка экстрактора.

Экстракцию воздушно-сухой биомассы клеток полисциас (п.1.2.9) проводят 40%

этиловым спиртом (ГОСТ 5962-67) или эквивалентной по качеству водкой (ГОСТ 12712), исходя из соотношения вес/объем - 1:10-1:12 методом перколяции.

2.1.1. Для этого биомассу помещают в перколятор, представляющий делительную воронку из стекла или нержавеющей стали с краном внизу или эквивалентные им экстракторы с приспособлениями для механического перемешивания или встряхивания.

2.1.2. Объем экстрактора выбирается из расчета 15-20 л на 1 кг биомассы. Внизу в трубку для слива перколятора поместить марлевый фильтр для исключения попадания взвеси биомассы в экстракт.

2.2. Экстракция биомассы.

2.2.1. Залить биомассу 40% этиловым спиртом (водкой) таким образом, чтобы последний полностью покрывал биомассу (5300 мл на 1 кг биомассы) и оставить на ночь.

2.2.2. На следующий день экстракт через нижний кран слить в коллекторную емкость, а биомассу залить новой порцией 40% этилового спирта (эквивалентной по качеству водки) (3300-3400 мл на 1 кг исходной биомассы) и, встряхнув, вновь оставить на ночь.

2.2.3. На следующий день настойку слить в ту же коллекторную емкость и вновь залить оставшуюся биомассу экстрагентом в таком количестве, чтобы в итоге получить 10 л настойки.

2.2.4. Третью порцию экстракта слить на следующее утро в ту же коллекторную емкость, объединив все три экстракта.

2.2.5. Объединенный экстракт выдержать в холодильнике в течение 3 суток, декантировать или отфильтровать.

2.2.6. Оставшуюся после экстракции биомассу высушить, разложив на подносы, при температуре не выше 60 градусов Цельсия.

3. РАЗЛИВ И УПАКОВКА.

3.1. Мойка и стерилизация флаконов.. 3.1.1. Добавку фасуют во флаконы из темного стекла с рабочей емкостью не менее 15 мл с притертой капельницей и полиэтиленовой пробкой, разрешенные к использованию органами Госсанэпиднадзора и ранее не бывшие в употреблении.

3.1.2. Флаконы моют на машине-автомате карусельного типа ГФ-49 по заданной циклограмме или в моечной машине аналогичного типа.

3.1.3. На выходе из машины флаконы поступают в специальные приемные бункеры - «магазины», которые ставят на просушку в сушильно-стерилизационный шкаф СШ-50 на 20-30 мин при температуре 100+5°C, после чего флаконы в тех же «магазинах» передают на стерилизацию в сушильно-стерилизационные шкафы СШ-51-55, в которых они стерилизуются при температуре 180+5 градусов Цельсия в течение 2 часов. После остывания простерилизованные флаконы в закрытых «магазинах» выгружают в шлюз, соединяющий бокс сухой стерилизации с боксом разлива, оборудованный бактерицидной лампой.

3.1.4. Полиэтиленовые пробки и капельницы стерилизуют спиртом, для чего их достают стерильным пинцетом из стерилизующего спирта непосредственно перед укупориванием флаконов.

3.2. Розлив добавки

3.2.1. Экстракт, полученный согласно п.2.2., разливают в стерильные флаконы.

(п.3.1.1) на разливочной машине АFW-1010 (ГФ 58) или аналогичного типа по 15 мл.

Предел допустимых отклонений при разливе не более плюс-минус 2%.

Подготовку оборудования и помещений к розливу осуществляют следующим образом.

По окончании розлива предыдущей партии машину для заполнения флаконов чистят от стекла, пыли, смазки. Снимают обе половины поворотной звездочки, тщательно промывают теплой дистиллированной водой, добиваясь легкого хода подшипников для поддержки флаконов, после чего протирают салфеткой из батиста с заделанными краями, смоченной этиловым спиртом с объемной долей основного вещества 70%. Все поверхности машины, находящиеся в «чистой камере», обрабатывают аналогичным образом. Дозирующий насос снимают, разбирают; цилиндры, поршни и трубки тщательно моют дистиллированной

водой, затем 4-4 раз прополаскивают в воде со спиртом и в разобранном виде укладывают на специальный поддон бикса так, чтобы металлические части насоса не могли ударяться друг о друга со стенками бикса, для чего их отделяют силиконовыми трубками.

5 Стерилизуют насос в биксе автоклавированием при 2 атм и температуре 132 градуса Цельсия в течение 1 часа. Сборку насоса производят после его полного остывания в асептических условиях непосредственно перед началом розлива препарата.

Наружные поверхности машины вне «чистой зоны» моют дистиллированной водой с помощью салфетки из капрона арт.56326 или шелка с заделанными краями, затем обрабатывают 3% раствором перекиси водорода.

10 Слесарный инструмент после окончания работы обрабатывают 3%-ным раствором перекиси водорода и подвергают облучению бактерицидными лампами не менее чем 30 мин.

Одновременно ведут подготовку помещений.

15 Над узлом розлива установлена «чистая камера» (Ф-59), обеспечивающая 1 класс чистоты. Обеспыленная атмосфера в рабочем пространстве камеры обеспечивается путем непрерывного продувания воздуха из помещения 2 класса чистоты через фильтр с ультратонким волокном. Воздух направлен сверху вниз и имеет ламинарный характер течения. Основной элемент камеры - фильтровальная ячейка - образует потолок камеры. Включение «чистой камеры» производят через 10-15 минут после включения приточной

20 вентиляции и она должна работать постоянно до конца розлива. Розлив «Витагмала» осуществляют на машине АFW-1010 ГФ-58 или аналогичного типа, установленной в чистой камере» бокса розлива. Накануне розлива бутыл с Витагмалом тщательно просматривают на целостность бутылки, соответствие объема, указанного на этикетке, отсутствию механических включений и взвеси в препарате. Наружную

25 поверхность бутылки обрабатывают 35%-ным раствором перекиси водорода и помещают в шлюз, оборудованный бактерицидной лампой и выходящий в бокс розлива. Стерильные флаконы оператор берет из «флаконового» шлюза в процессе розлива. В асептических условиях оператор собирает насос и присоединяет к нему бутыл с Витагмалом через промежуточный фильтр Шотта, который стерилизуют накануне вместе с насосом. Затем

30 осуществляют эксплуатационный пуск автомата. В процессе розлива 3-4 раза калиброванным шприцем проверяют дозу на соответствие требуемому объему - 15 мл.

Флаконы с препаратом автоматически поступают в «магазин», который оператор после заполнения закрывает крышкой и помещает в шлюз. По окончании розлива флаконы с препаратом из шлюза передают на упаковку и бракераж.

35 3.2.2. Разлитые флаконы укупоривают согласно п.3.1.4.

ПРИМЕРЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ШТАММА (ПОЛУЧЕННОЙ НА ЕГО ОСНОВЕ БАД «ВИТАГМАЛ») В МЕДИЦИНЕ

1. Снижение вероятности врожденных аномалий развития и патологии беременности.

40 Экспериментальные доказательства возможности использовать штамм БФТ 01-95 для снижения тератогенного действия алкоголя приведены в Патенте РФ №2058786 (Котин А.М., Бичева Н.К., «Антитератогенное средство»).

45 Клинические доказательства использования БАД «Витагмал» (штамма БФТ 01-95) получены в работе Е.Г.Гавриловой (НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О.Отта РАМН, Санкт-Петербург; Городская больница им. С.П.Боткина, г.Орел) Кошелева Н.Г., Е.Г.Гаврилова «Профилактика неблагоприятных экологических воздействий у беременных женщин». Журнал акушерства и женских болезней, выпуск 1, 2005: 35-41).

В этой работе биомасса *Polyscias filicifolia* наращивалась на основе штамма БФТ 01-95, как описано ранее. БАД «Витагмал» изготовлена НПФ «БИОФАРМТОКС» согласно ТУ 9154-001-06910186-2000, как описано ранее.

50 На протяжении длительного времени изучали состояние беременных и исходы беременности у 298 жительниц экологически благоприятного и неблагоприятного районов г.Орла и их 294 новорожденных. У жительниц экологически неблагоприятного района в ходе беременности наблюдали достоверное снижение содержания эритроцитов,

гемоглобина, тромбоцитов и сывороточного железа, значимые изменения в белковом и липидном обменах, достоверное снижение CD³⁺, CD⁴⁺ и увеличение CD⁸⁺ лимфоцитов, дефицит Т-клеточного иммунитета. Частота осложнений в родах у этой группы беременных была повышена за счет несвоевременного излития околоплодных вод - в 2,5 раза, патологии плаценты (задержка частей последа, аномалии прикрепления плаценты, преждевременной отслойки) в 3 раза, острой гипоксии плода - в 5 раз, частота оперативного родоразрешения - в 2,5 раза выше. В послеродовом периоде у жительниц экологически неблагоприятного района была увеличена частота гнойно-септических осложнений в 2,5 раз, гипогалактии в 1,5 раза, достоверно чаще отмечались гипотрофия плода - в 2,2 раза; у детей первого года жизни чаще отмечались аллергические заболевания - в 3 раза и заболевания ЖКТ - в 2,2 раза. «Витагмал» применяли в комплексном лечении осложнений беременности женщин этого же экологически неблагоприятного района по схеме: по 15 капель в течение 14 дней в первом триместре - с 10-12 недель, во втором - с 20-22 недель и в третьем - с 32-34 недель беременности.

Зарегистрировано, что «Витагмал» снижал угрозу прерывания, невынашивания беременности, анемии, гестозов и ОРВИ в 2,1-2,6 раза, хроническую плацентарную недостаточность - в 1,8 раза, несвоевременное излитие околоплодных вод - в 2,5 раза, патологии плаценты в 2,7 раза, гипотонические кровотечения в 2,5 раза, острая гипоксию плода - в 5 раз. Кесарево сечение в родах проводилось в 8,4 раза реже у женщин, получавших «Витагмал». Кроме того, частота послеродовых гнойно-септических осложнений была в 4,8 раза ниже; гипотрофия плодов в 1,4 раза реже; врожденных пороков развития у плодов женщин неблагоприятного района, получавших «Витагмал», не было, тогда как у не получавших «Витагмал» пороки развития встречались у 6% детей; аллергические заболевания у детей первого года жизни отмечались в 2,8 раза реже, часто болеющих в 4,7 раза меньше по сравнению с детьми женщин, не получавших «Витагмал».

Таким образом, клинические исследования подтвердили высокую эффективность применения БАД «Витагмал», приготовленной на основе штамма БФТ 01-95, в комплексной профилактике осложнений беременности и здоровья детей первого года жизни.

2. Лечебно-профилактическая эффективность БАД «Витагмал» (производимой на основе штамма БФТ 01-95) против гриппозных заболеваний и их осложнений, а также лечения тонзиллита.

Клинико-эпидемиологические доказательства эффективности использования штамма БФТ 01-95 для получения антигриппозных средств (в частности, БАД «ВИТАГМАЛ») получены в ряде работ под руководством проф. В.М.Гагариновой - Руководителем лаборатории неспецифической резистентности НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера («Инфекционная заболеваемость в Северо-Западном Федеральном округе России МЗ РФ, Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, 2001, стр.46-48; «Грипп: Руководство для врачей». Под ред. Г.И.Карпухина, изд. Гиппократ, 2001; Распоряжение Комитета по здравоохранению администрации Санкт-Петербурга №397-р/48 от 21.11.2001 г.).

В этих работах биомасса *Polyscias filicifolia* наращивалась на основе штамма БФТ 01-95 как описано ранее. БАД «Витагмал» изготовлен НПФ «БИОФАРМТОКС» согласно ТУ 9154-001-06910186-2000, как описано ранее.

Антигриппозное действие «Витагмала» исследуется с 1997 г. сотрудниками Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера и врачами Медицинского центра «Адмиралтейские верфи» под руководством д.м.н., проф. Гагариновой на взрослых и детях дошкольного возраста, а также в Детском садике-яслях Выборгского района г.Санкт-Петербурга врачом-педиатром Р.С.Николаевой. Установлено, что «Витагмал» при курсе 10-15 капель однократно в день 14-20 дней снижает заболеваемость гриппом и ОРЗ в 2,5-4 раза, уменьшает продолжительность нетрудоспособности на 4,3 дня и уменьшает частоту осложненных случаев в последующие за курсом два месяца: трахеиты, бронхиты,

пневмонии в незащищенной группе встречались с частотой 13% и полностью отсутствовали в защищенной группе. Аналогичные экстракты биоженьшеня уменьшали частоту осложненных случаев в 2,4 раза («Инфекционная заболеваемость в Северо-Западном Федеральном округе России МЗ РФ, Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, 2001, стр.46-48; «Грипп: Руководство для врачей». Под ред. Г.И.Карпухина, изд. Гиппократ, 2001; Распоряжение Комитета по здравоохранению администрации Санкт-Петербурга №397-р/48 от 21.11.2001; В.М.Гагаринова. От неспецифической резистентности организма к неспецифической профилактике инфекционных заболеваний: возможности и перспективы. Санкт-Петербург, 2002, стр.17-18; В.М.Гагаринова, ..., А.М.Котин и др. Новые противовоспалительные препараты в профилактике вирусных инфекций у лиц с хронической патологией. «Фундаментальные и клинические аспекты хронического воспаления», Тез. Докладов II Всероссийского симпозиума «Хроническое воспаление», 2000 г., с.125).

Обстоятельные клинико-лабораторные испытания БАД «Витагмал» были проведены в Санкт-Петербургском Институте уха, горла, носа и речи научным сотрудником Отдела «Фармакопрофилактики, терапии и инноваций», к.м.н. В.В.Власовой при лечении тонзиллита.

Схема лечения пациентов включала ежедневный прием 10-12 капель «Витагмала» сублингвально (под язык) за 1 час до еды утром и днем и смазывание слизистой оболочки небных миндалин раствором «Витагмала» один раз в день после санации лакун антисептическим раствором. Курс лечения 14 дней. Клинико-лабораторное обследование больных проводили до лечения и через 1 месяц после лечения.

В ходе лечения больные отмечали исчезновение гиперчувствительности слизистой глотки, небных миндалин, исчезли болезненные явления в горле. Глотание стало безболезненным. Отмечалось уменьшение гиперемии слизистой небных миндалин и небных дужек. Лакуны миндалин очистились от кареозного и гнойного содержимого, не отмечалось отека слизистой, миндалины сократились в размерах. Из 16 исследованных пациентов полное выздоровление наблюдали у 15 (95%) и у одного (5%) существенное улучшение.

Помимо свидетельств купирования местных признаков воспаления в тканях и слизистой лимфоидной ткани глотки клинико-лабораторные анализы показали и другие важные терапевтические эффекты «Витагмала» у этой группы больных, а именно:

1. Установлено улучшение клинических показателей крови.
2. Нормализацию иммунологических показателей с восстановлением локомоторной активности клеток системы мононуклеарных фагоцитов с выраженной десенсибилизацией организма и нормализацией выработки антител, в том числе нормализацию иммунореактивности миндалин.

3. Нормализация уровня С-реактивного белка, ревматоидного фактора.
4. Снижение количества патогенных форм *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus agalactiae* (pneumonia, anginosus) и восстановление нормальной микрофлоры (*Neisseria (mucosa, lactamica)*).

Таким образом, перспективность использования штамма БФТ 01-95 для разработки и производства антигриппозных и антитонзиллитных средств можно считать доказанной.

ПРИМЕРЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ШТАММА БФТ 01-95 В КОСМЕТИКЕ

На основе водных и этанольных экстрактов биомассы *Polyscias filicifolia*, получаемой на основе штамма БФТ 01-95 вышеописанным способом, зарегистрированы и производятся крема серии «Витагмалин» с лечебно-профилактическими свойствами (Гигиеническое заключение на продукцию №78.1.5.915.П.5027.6.0 от 15.06.2000).

Продукция:

1. Крем питательно-очищающий, антиаллергический «Витагмалин-1»;
2. Крем питательно-укрепляющий для ног «Витагмалин-2»;
3. Крем профилактический для ног, антисептический «Витагмалин-5»;
4. Крем противовоспалительный «Витагмалин-3»;

5. Крем питательно-очищающий для проблемной кожи «Витагмалин-4»;

6. Крем массажный для тела «Витагмалин-6».

Крема готовили по ГОСТ 29189-91.

Все разновидности содержали общую основу: пентол, ланолин, пальмовое масло, воск
5 пчелиный, масло оливковое, вазелин МЭБОК и ПЭБОК в качестве консервантов, воду и
экстракт «Витагмала», изготовленного на основе штамма БФТ 01-95 вышеописанным
способом. Различаются крема различным содержанием экстрактов других природных трав.
Примеры клинических испытаний приведены ниже:

Аллергия. Крем «Витагмалин-1» (антиаллергический) испытывали в Аллергологическом
10 кабинете поликлиники ЦМСУ-122 (врач-аллерголог С.А.Пинчук) на 23 пациентах в возрасте
от 3 до 58 лет. После использования в течение 5-10 дней (в зависимости от состояния
кожи) положительные результаты отмечены у 17 пациентов с аллергическим дерматитом, у
3 с нейродермитом, у 3 с хронической атопической экземой). У 5 пациентов (3 с
15 аллергическим дерматитом и 2 с экземой) существенных улучшений за период испытаний
не произошло. У 2-х наблюдали реакцию на ланолин. Кроме того, крем «Витагмалин-1»
использовали в комплексе лечебных мероприятий, проводимых 15 больными с гнойно-
воспалительными осложнениями «Синдрома Диабетической стопы» в возрасте от 53 до 77
лет в Отделении хирургической инфекции городской больницы №5 СПб Центра для
лечения Хирургических Инфекций (Зав. отделением хирургических инфекций горбольницы
20 №5, проф. Кафедры общей хирургии СПбГПМА Ю.А.Спесивцев).

Гнойно-воспалительные раны - синдром диабетической стопы. Крем применяли в
качестве средства для ухода за кожей стоп в области послеоперационных ран. Тонкий
слой крема наносили на кожу стоп ежедневно, утром, в период выполнения
регламентированных перевязок, после выполнения физиотерапевтических процедур. При
25 использовании этого крема отмечено быстрое (в течение 7-9 дней) восстановление
эластичности кожи стоп, особенно на подошвенной поверхности, эффективное устранение
в эти сроки же сроки участков гиперкератоза и дермальных трещин. Таким образом была
показана эффективность использования крема «Витагмалин», созданного на базе штамма
БФТ 01-95 для оптимизации местного лечения длительно существующих гнойных ран в
30 области нижних конечностей и для более качественного ухода за кожей в области этих ран.

Псориаз. Исследование эффективности кремов (мазей), разработанных на основе
штамма БФТ 01-95 серии «Витагмалин», равно как и таблеток «Нейровит», содержащих
биомассу *Polyscias fillicifolia*, наращенную на основе этого штамма, в лечении псориаза
(кожных проявлений псориаза) изучали в Дерматологическом отделении ЦМСЧ-122 (зав.
35 Отделением к.м.н., Куликова Л.Р). Крем «Витагмалин - 4» использовали у 27 пациентов с
распространенным псориазом, из них 17 мужчин и 10 женщин в возрасте от 17 до 80 лет.
У всех пациентов процесс носил распространенный характер, был в стадии обострения,
причем у 5 больных - универсальный псориаз, у 2-х пациентов пустулезный. 12 пациентов
получали препараты («Витагмал» по 20 капель в день и «Витагмалин» смазывание очагов
40 поражения) в стационаре наряду с комплексным лечением псориаза. 15 больных лечились
амбулаторно. На фоне использования «Витагмала» и «Витагмалина-4» у 19 человек
отмечено улучшение процесса на коже в виде уменьшения зуда, отечности, шелушения,
гиперемии. У 5 пациентов процесс на коже регрессировал полностью, причем у одной
больной только на фоне этих препаратов без дополнительной терапии. У трех человек
45 наблюдали обострение.

Кольпиты и цервициты - см. Е.Г.Гаврилова. «Применение экстрактов природных
лекарственных трав для лечения кольпитов и цервицитов» в сборнике «Актуальные
вопросы клинической и экспериментальной медицины - 2002. Санкт-Петербург, СПбМАПО,
2002. Различные крема серии «Витагмалин» использовали у 32 женщин с
50 воспалительными заболеваниями влагалища и шейки матки. 1-я группа из 9 женщин с
кандидозным кольпитом, подтвержденным лабораторно, применяли крем «Витагмалин-5».
Контрольные обследования проводили через 5 и 10 дней от начала лечения. Исчезновение
местных симптомов заболевания пациентки отмечали через 3 дня. Лабораторно, через 5

дней грибок молочницы не обнаруживался, однако сохранялась кокковая флора. Через 10 дней от начала лечения лабораторно подтверждено полное выздоровление с нормализацией влагалищной микрофлоры. Рецидива в течение 1 месяца наблюдения не было. 2-я группа - 15 женщин - применяли крем «Витагмалин-4» с лабораторно-

5 подтвержденным диагнозом бактериального вагиноза. Ключевые клетки обнаруживались в мазках в 25-100% случаев. Контрольные обследования проведены через 5, 10 и 15 дней от начала заболевания. Через 5 дней у всех пациенток в мазках отсутствовали ключевые клетки, но сохранялась кокковая флора. Через 10 дней от начала лечения у 9 женщин отмечено клиническое и лабораторное выздоровление. Остальным 6 пациенткам курс
10 лечения продлен еще на 5 дней. Через 15 дней от начала лечения отмечено полное клиническое и лабораторное выздоровление. Контрольными наблюдениями в течение последующих 3 месяцев рецидивов ни у одной из женщин не установлено. 3-я группа - 6 женщин с атрофическим кольпитом использовали крем «Витагмалин-1». При лабораторном
15 обследовании определялась кокковая форма и лейкоциты, покрывающие все поле зрения. Выраженные местные симптомы и субъективные жалобы включали: гиперимию, сухость влагалища с атрофическими явлениями на шейке матки, зуд и жжение во влагалище. Контрольные обследования проводили через 5 и 10 дней от начала лечения. Исчезновение субъективных симптомов заболевания пациентки отмечали через 5 дней. Местные проявления улучшились уже через 10 дней. Отмечен положительный эффект в течение 2-х
20 месяцев. Таким образом, показана эффективность использования штамма БФТ 01-95 для разработки и производства лечебно-косметических средств и мазей, пригодных для лечения и профилактики таких распространенных заболеваний кожи, как аллергические, гнойно-воспалительные, в том числе «диабетическая стопа», псориаз и некоторые
инфекционные гинекологические заболевания.

25 ПРИМЕРЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ШТАММА БФТ 01-95 В ВЕТЕРИНАРИИ.

Примерами применения штамма БФТ 01-95 в ветеринарной практике могут служить: использование крема «Витагмалин» для лечения заболеваний кожи у животных. Исследования проведены в ветеринарной клинике доктора Тиханина, Санкт-Петербург (к.вет.наук Н.Л.Карпетской и ветврачом Трепещовой Ю.А.). Мазь «Витагмалин» применяли
30 при болезнях кожи у 21 животного, в т.ч. у 16 собак и 5 кошек. Среди них 4 ротвейлера, 2 немецкие овчарки, 2 спаниеля, 5 беспородных собак, 1 чау-чау, 2 бультерьера, 3 персидские кошки и 2 русско-европейские. Наблюдали следующие заболевания: 6 животных с послеоперационными ранами (абдоминальные, новообразования, купирование ушей), 3 животных с кусаными ранами, 3 животных с
35 аллергическим блошинным дерматитом (расчесы, разлизывание), 2 собаки с гнойным отитом (эрозирование кожи ушных раковин), 3 - маллацециоз (грибковое поражение в области брылей, ануса, межпальцевый аллацеозный дерматит), 1 животное - нейродерматит, 3 - поражения кожи не выявленной этиологии. Перед нанесением мази предварительно очищали пораженную кожу дезинфицирующими растворами, тампонами
40 подсушивали и затем наносили мазь, Рекомендовали владельцам животных повторять процедуру на протяжении 2-5 дней. При контрольном посещении выявлено, что у 15 животных заживление ран наступило после 3-х дней лечения, у остальных - после 5-ти дней. Пол, возраст, порода значения не имели;

включение БАД «Витагмал» в состав многокомпонентных кормовых добавок для кошек и
45 собак, производимых фирмой «НПФ «БИОФАРМТОКС», а именно: «ФИТОКАЛЬЦЕВИТ» (Регистрационное удостоверение Департамента ветеринарии РФ №Р078-2-1.0-0651 от 03 июля 2000 г., № препарата ПВР-2-1.000329); «Кальцефит-1» (Рег. удостоверение Департамента ветеринарии РФ №Р078-2-1.0-0650 от 03 июля 2000 г., № препарата ПВР-2-1.000328); Альгаферрин (Регистрационное удостоверение Департамента ветеринарии РФ №Р078-2-1.0-0648 от 03 июля 2000 г., № препарата ПВР-2-1.0/00319); «Фитобактрин»
50 (Регистрационное удостоверение Департамента ветеринарии РФ №Р078-2-1.0-0649 от 04 июля 2000 г., № препарата ПВР-2-1.0/00320).

ПРИМЕРЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ШТАММА БФТ 01-95 В ПИЩЕВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ.

Примерами применения штамма БФТ 01-95 в пищевой промышленности (создание функциональных пищевых продуктов) является разработка спиртных напитков с низкой токсичностью (Котин А.М., Патент РФ №2066686, «Способ получения низкотоксичных спиртных напитков» и Котин А.М., патент РФ №2111244, «Способ производства водки «Катрин».

5

Формула изобретения

Штамм *Polyscias filicifolia* (MOORE EX ROUNIER) BAILEY ВРКК-ВР №58, используемый для получения лекарственных препаратов, биологически активных добавок и косметических средств.

10

15

20

25

30

35

40

45

50