



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента

2021.04.07

(21) Номер заявки

201891934

(22) Дата подачи заявки

2017.03.15

(51) Int. Cl. *A61K 31/722* (2006.01)

(54) НОВЫЕ ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОДУКТЫ

(31) 16160534.0

(32) 2016.03.15

(33) EP

(43) 2019.03.29

(86) PCT/EP2017/056146

(87) WO 2017/158040 2017.09.21

(71)(72)(73) Заявитель, изобретатель и патентовладелец:

**ПОЛЯКОВ ИГОРЬ; ИВАНОВА
ЛЮДМИЛА (DE)**

(74) Представитель:

**Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатъев
А.В. (RU)**

(56) KUEN Y.L. ET AL.: "Blood compatibility and biodegradability of partially N-acylated chitosan derivatives", BIOMATERIALS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV., BARKING, GB, vol.

16, no. 16, 1 January 1995 (1995-01-01), pages 1211-1216, XP004032853, ISSN: 0142-9612, DOI: 10.1016/0142-9612(95)98126-Y, the whole document CN-A-102727887

SEFERIAN P.G. ET AL.: "Immune stimulating activity of two new chitosan containing adjuvant formulations", VACCINE, ELSEVIER LTD, GB, vol. 19, no. 6, 8 November 2000 (2000-11-08), pages 661-668, XP004219905, ISSN: 0264-410X, DOI: 10.1016/S0264-410X(00)00248-6, the whole document

HUADONG WANG ET AL.: "An adjuvanted inactivated murine cytomegalovirus (MCMV) vaccine induces potent and long-term protective immunity against a lethal challenge with virulent MCMV", BMC INFECTIOUS DISEASES, BIOMED CENTRAL, LONDON, GB, vol. 14, no. 1, 11 April 2014 (2014-04-11), page 195, XP021184421, ISSN: 1471-2334, DOI: 10.1186/1471-2334-14-195, the whole document

WO-A2-2013033400

(57) Изобретение относится к способу, включающему стадию инкубирования хитозана в водном растворе органической карбоновой кислоты или ее соли, модифицированному хитозану, получаемому способом по изобретению, гидроколлоиду, соединению формулы [X]_n, композиции, содержащей модифицированный хитозан, гидроколлоид или соединение согласно изобретению, модифицированному хитозану, гидроколлоиду, соединению или композиции согласно изобретению для применения в человеческой и/или ветеринарной медицине, и к модифицированному хитозану, гидроколлоиду, соединению или композиции согласно изобретению для применения в способе лечения и/или предупреждения мастита, предпочтительно латентного мастита и/или острого мастита, эндометрита, предпочтительно хронического, острого и/или гнойно-катарального эндометрита, заболеваний копыт и когтей, хромоты, поражений в межпальцевой области, пальцевого дерматита, межпальцевого дерматита, межпальцевой флегмоны, трихофитоза, микроспороза, микоза кожи, аллергий, а также заболеваний, осложненных аллергиями, в частности аллергического обструктивного заболевания легких, аллергических заболеваний кожи, аллергической эритемы уха, аллергического ринита, аллергического конъюнктивита, острого аллергического контактного дерматита, хронической аллергической контактной экземы или атопической экземы, обструктивного заболевания легких, в частности хронического обструктивного заболевания легких, заболеваний кожи, в частности дерматита, эритемы уха, ринита, конъюнктивита, дерматофитоза или бородавок, в частности обыкновенных бородавок, у субъекта и для модулирования иммунного ответа у субъекта, и/или для увеличения эффективности репродукции, предпочтительно эффективности репродукции при разведении животных.

Данное изобретение относится к способу, включающему стадию инкубирования хитозана в водном растворе органической карбоновой кислоты или ее соли, модифицированному хитозану, получаемому способом по настоящему изобретению, гидроколлоиду, соединению формулы [X]_n, композиции, содержащей модифицированный хитозан, гидроколлоид или соединение согласно настоящему изобретению, модифицированному хитозану, гидроколлоиду, соединению или композиции согласно настоящему изобретению для применения в человеческой и/или ветеринарной медицине, и к модифицированному хитозану, гидроколлоиду, соединению или композиции согласно настоящему изобретению для применения в способе лечения и/или предупреждения мастита, предпочтительно латентного мастита и/или острого мастита, эндометрита, предпочтительно хронического, острого и/или гнойно-катарального эндометрита, заболеваний копыт и когтей, хромоты, поражений в межпальцевой области, пальцевого дерматита, межпальцевого дерматита, межпальцевой флегмоны, трихофитоза, микроспороза, микоза кожи, аллергий, а также заболеваний, осложненных аллергиями, в частности аллергического обструктивного заболевания легких, аллергических заболеваний кожи, аллергической эритемы уха, аллергического ринита, аллергического конъюнктивита, острого аллергического контактного дерматита, хронической аллергической контактной экземы или атопической экземы, обструктивного заболевания легких, в частности хронического обструктивного заболевания легких, заболеваний кожи, в частности дерматита, эритемы уха, ринита, конъюнктивита, дерматофитоза или бородавок, в частности обыкновенных бородавок, у субъекта и к модулированию иммунного ответа у субъекта, и/или к увеличению эффективности репродукции, предпочтительно эффективности репродукции при разведении животных.

Мастит крупного рогатого скота распространен по всему миру и вызывает крупный экономический ущерб в сельском хозяйстве. Ущерб, вызванный маститом, в частности, причиняется пониженным надоем молока и пониженным качеством молока. Мастит вызывает гипогалактию и агалактию у животных. Потеря части секреторных эпителиальных клеток приводит к регенерации соединительной ткани и к атрофии пораженной части вымени.

Эндометрит представляет собой воспаление слизистой оболочки матки, после которого следует более или менее значительное изменение эндометрия и повышенная активность здоровых или регенерировавших желез матки. После воспаления матки чаще всего следует репродукция полиморфной микрофлоры. Хронический эндометрит представляет собой очень широко распространенное гинекологическое заболевание: он регистрируется у 12-40% бесплодных коров.

Примерно 15-25% коров страдают от проявляющегося клинически и скрытого мастита, и, в частности, крупный рогатый скот с очень высокой продукцией молока является наиболее подверженным данному заболеванию. Потеря молока выздоравливающих коров составляет вплоть до 20% общего надоя молока на ферме. Существующие контрольные способы лечения мастита неизбежно приводят к большим потерям животных и молока. Послеродовые заболевания коров, включающие эндометрит в качестве самого обычного заболевания, приводят к огромному экономическому ущербу. Имеются разные причины эндометрита. Лечение ветеринарами является времязатратным и дорогим.

Самой распространенной формой мастита является скрытый (субклинический) мастит. После скрытого мастита коров следует легко протекающий воспалительный процесс лишь с небольшим числом клинических признаков мастита или без них. Лечение животных с данной формой мастита является сложным. Эта форма является очень распространенной на больших молочных комплексах и обычно диагностируется только во время проводимых ежемесячно осмотров молочного стада на скрытую форму мастита. Примерно 15% дойных коров поражаются латентным маститом во время машинного доения. Имеется множество причин развития скрытого мастита. Скрытый мастит, главным образом, появляется из-за несоблюдения правил ветеринарного здравоохранения операторами машинного доения, из-за неправильного начала и несоблюдения курса лечения животных с маститом. В то же самое время хронический эндометрит является очень распространенным гинекологическим заболеванием: он регистрируется у 12-40% бесплодных коров.

Объективным показателем вымени здоровой коровы является количество соматических клеток, содержащихся в молоке. Соматические клетки в коровьем молоке представлены лейкоцитами и эпителием молочных желез. Эпителиальные клетки доминируют при секреции молока от здоровых коров. Эпителиальные клетки образуются в тканях вымени во время процесса естественного старения и регенерации тканей. Во время мастита миграция лейкоцитов увеличивается в воспаленной области, что в конечном счете приводит к резкому повышению соматических клеток в молоке. 1 мл молока от клинически здоровых коров содержит 200-250 тысяч соматических клеток. Во время мастита их количество возрастает вплоть до 900 тысяч и более.

Молоко от коров, пораженных скрытой формой мастита, имеет пониженную кислотность, так как оно содержит повышенное содержание хлоридов, альбумина и глобулинов. Количество клеточных элементов увеличивается в несколько раз, особенно количество лейкоцитов. В то же самое время содержание твердых веществ (казеина, лактозы, кальция и фосфора) уменьшается. При объединении молока от коров, пораженных скрытой формой мастита, с молоком от здоровых коров снижается общее качество молока. Оно не может использоваться для приготовления сыра и кисломолочных продуктов и имеет крайне вредное влияние на здоровье человека.

В настоящее время для лечения разных форм мастита и эндометрита используют антибиотики, сульфаниламидные препараты или их смеси. Также используют экстракты растений, содержащие эфирные масла с противомикробным эффектом. В последние годы использовали ферментативные препараты и иммунобиологические продукты, содержащие пробиотики и интерферон.

Существует много способов и агентов для лечения мастита с клиническими признаками, но лечение скрытых форм мастита затруднено, и распространение данной формы мастита значительно выше, чем других форм. Существуют известные способы лечения субклинического мастита посредством физической терапии (нанесения на вымя озокерита, парафина, согревающих повязок, компрессов, прогревание лампами Solux, инфракрасным излучением), а также применяют лазерные устройства разных модификаций. Курс лечения состоит из 3-4 сессий, где в сутки проводится только одна сессия. Эффективность данных способов составляет 60-85%, но они являются очень времязатратными и дорогими. Также известен способ внутримышечного введения антибиотиков: доза 8-10 мл тилозина 200 один раз в сутки на протяжении трех суток, доза 0,5 мл/10 кг массы тела билозина 200 дважды в сутки (молоко не может быть использовано в пищевых целях на протяжении 7 суток), подкожная доза 1 мл/50 кг массы тела эфиркура на протяжении 2-3 суток. При использовании антибиотиков имеется потребность в предварительной проверке активаторов из пораженной четверти вымени на чувствительность к антибиотикам. Кроме того, молоко и продукты забоя животных, подвергавшихся лечению, не могут использоваться в пределах нескольких суток или недели. Также известен способ введения в молочную железу препарата мастифорте в пластмассовом шприце, который содержит окситетрациклин, неомицин, бацитрацин и преднизолон. Данный препарат является очень эффективным, но молоко и продукты забоя от животных, подвергавшихся лечению, не могут использоваться в пределах нескольких суток. Также известен способ лечения субклинического мастита посредством прокаиновой блокады вымени согласно Д.Д. Логвинову. Инъекции 0,5%-ного раствора прокаина проводят каждые 48 ч. При использовании данного способа выздоровление длится 3-5 суток. Недостатками данного способа является то, что он является трудозатратным и что он несет риск микробного загрязнения посредством инъекции. Также известен способ лечения больных коров посредством применения 1%-ного раствора колларгола и препаратов, содержащих серебро. Препараты инъецируют в брюшную аорту. При необходимости инъекцию повторяют через 48 ч. Препараты, содержащие серебро, имеют высокую антибактериальную активность и могут использоваться в лечении мастита любой этиологии. Однако данный способ является трудозатратным. Также известен способ применения введения в молочную железу парного молока (полученного от здоровых коров), содержащего большое количество лизоцима, 1-2 раза в сутки на протяжении 2-3 суток. Данный способ не является очень эффективным, но молоко и продукты забоя можно использовать после данного лечения без какого-либо ограничения. Также известен способ лечения субклинического мастита с использованием препаратов на основе пробиотиков, содержащих культуру *Str. thermophilus* и другие бифидолактобациллы. Данные лекарственные средства инъецируют интрацистернально 1-2 раза в сутки. При скрытом мастите выздоровление начинается после 1-2 инъекций в течение 2-3 суток. Недостатками данного способа являются случайное бактериальное загрязнение молока, появление нового раздражения паренхимной ткани молочной железы и, как следствие, потенциальное усугубление патологического процесса. Также известен способ лечения мастита коров посредством применения растворов интерферона. Данные растворы увеличивают защитную функцию лейкоцитов, которые в большом количестве присутствуют в молоке животных с маститом. Данные растворы содержат по меньшей мере 1000 единиц рекомбинантного коровьего интерферона, который упакован в 10 г шприцы. Данные растворы используют интрацистернально дважды в сутки с интервалом 8-14 ч в течение 3 суток или до полного выздоровления. Время выздоровления составляет 4-12 суток. Преимуществами данного способа является отсутствие каких-либо ограничений для применения молока и мяса от животных, подвергавшихся лечению, он не приводит к устойчивости патогенных организмов, и он не имеет местно раздражающих и резорбтивно-токсических свойств. Недостатками данного способа являются необходимость повторного применения препарата и присутствие белковых компонентов, которые могут провоцировать аллергические реакции.

DD (пальцевый дерматит), ID (межпальцевый дерматит) и IP (межпальцевая флегмона), которые являются самыми распространенными инфекционными заболеваниями копыт и когтей, спорадически распространяются по всему миру, но могут быть эндемичными, в частности, на комплексах для интенсивного производства говядины или молока крупного рогатого скота. Частота, среди прочих факторов, зависит от погоды, времени года, периодов выпаса и системы содержания. DD обычно приводит к хромоте и к значительному уменьшению массы тела, потере фертильности и уменьшению продукции молока. Частота может составлять от 5 до 30%. При первых эпидемических случаях примерно от 30 до 80% животных могут демонстрировать клинические признаки заболевания. Однако в среднем IP составляет лишь вплоть до 15% заболеваний когтей.

Было неожиданным то, что многие исследователи свидетельствуют о том, что этиологическими факторами DD, ID и IP являются те же самые микроорганизмы, такие как *Dichelobacter nodosus*, *Fusobacterium necroforum* и *Fusobacterium* spp., которые сначала разрушают эпидермис и позволяют спирохетам из *Treponema* spp., таким как *T. phagedenis*, *T. vincentii* и *T. denticola*, получать доступ в более глубокие тка-

ни для развития клинических признаков DD. Другими видами бактерий, выделенными из патологического материала из тканей, пораженных DD, ID и IP, являются *Campylobacter* spp., *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Arcanobacterium pyogenes* и *Prevotella* spp. Также было предложено то, что в патогенезе данных заболеваний важную роль играет вирус.

Типичной стратегией лечения в отношении DD, ID и IP является применение антибиотиков, антибактериальных препаратов и прокладок для местного нанесения с антибиотиками, антисептиками и вяжущими растворами. Все известные вакцины часто не могут стимулировать достаточный иммунный ответ и защищать животных против межпальцевого дерматита и межпальцевой флегмоны. Отсутствуют эффективные вакцины против пальцевого дерматита.

Известно много способов лечения аллергии, и они зависят от клинической картины аллергии. Для лечения острого аллергического контактного дерматита, хронической аллергической контактной экземы и/или атопической экземы обычно используют липофильные кремы, содержащие глюкокортикостероиды, противомикробные вещества, противовоспалительные лекарственные средства и/или кальций. Для лечения других аллергических дерматитов местно или парентерально применяли разные соединения, например препараты стероидов, салицилаты, масла или пептиды, выделенные из микроорганизмов. Все из приведенных выше способов лечили только симптомы, а не причины аллергии. Также известны агенты для лечения аллергии, содержащие антигенный материал из кератинофильных грибов и дрожжей, как описано в WO 97/07232. Антигенный материал, раскрытый в WO 97/07232, содержит полисахариды и/или гликопептиды, полученные из кератинофильных грибов и дрожжей. Данные антигенные препараты можно использовать в качестве фармацевтических композиций, а также вакцин для лечения животных и человека, особенно для лечения аллергий и для модуляции иммунного ответа. Они могут иметь иммунологическую, а также фармакологическую пользу.

Задачей настоящего изобретения является предложение более эффективного иммунобиологического продукта/препарата. Задачей настоящего изобретения также является предложение нового агента для применения в ветеринарной и/или человеческой медицине. Другой задачей настоящего изобретения является предложение новых агентов для лечения и/или предупреждения мастита, предпочтительно латентного мастита и/или острого мастита, эндометрита, предпочтительно хронического, острого и/или гнойно-катарального эндометрита, заболеваний копыт и когтей, хромоты, поражений в межпальцевой области, пальцевого дерматита, межпальцевого дерматита, межпальцевой флегмоны, трихофитоза, микроспороза, микоза кожи, аллергий, а также заболеваний, осложненных аллергиями, в частности аллергического обструктивного заболевания легких, аллергических заболеваний кожи, аллергической эритемы уха, аллергического ринита, аллергического конъюнктивита, острого аллергического контактного дерматита, хронической аллергической контактной экземы или атопической экземы, обструктивного заболевания легких, в частности хронического обструктивного заболевания легких, заболеваний кожи, в частности дерматита, эритемы уха, ринита, конъюнктивита, дерматофитоза или бородавок, в частности обыкновенных бородавок, у субъекта и для модулирования иммунного ответа у субъекта, и/или для увеличения эффективности репродукции, предпочтительно эффективности репродукции при разведении животных.

Данные задачи решаются посредством объекта изобретения, определенного в формуле изобретения. Следующие графические материалы служат для иллюстрации изобретения.

На фиг. 1 проиллюстрирована стандартная кривая для количественного измерения 1,3-β-D-глюкана. Показана средняя скорость изменения оптической плотности, отложенная на графике относительно известных концентраций [пг/мл] стандартных растворов 1,3-β-D-глюкана. Для получения стандартной кривой готовили растворы 1,3-β-D-глюкана 100, 50, 25, 12,5 и 6,25 пг/мл, как рекомендовано изготовителем. Измеренная кривая была линейной во всем интервале и удовлетворяла критериям принятия контроля качества (R^2 больше 0,980).

На фиг. 2 проиллюстрирована динамика интенсивности клинических симптомов аллергического бронхита у лошадей после применения композиции, полученной согласно примеру 41 (экспериментальная группа), и без вакцинации (контрольная группа). Композицию инъецировали 3 раза с интервалом 4 суток. Балл клинических симптомов является следующим: 0 - нет симптомов; 1 - слабый хрип, без кашля; 2 - слабый хрип, с кашлем; 3 - выраженный хрип; 4 - выраженный хрип с клиническими симптомами депрессии.

На фиг. 3 проиллюстрирована динамика интенсивности клинических симптомов хронического обструктивного заболевания легких у лошадей после применения композиции, полученной согласно примеру 41 (экспериментальная группа), и без вакцинации (контрольная группа). Композицию инъецировали 3 раза с интервалом 4 суток. Балл клинических симптомов является следующим: 0 - нет симптомов; 1 - слабый хрип, без кашля; 2 - слабый хрип, с кашлем; 3 - выраженный хрип; 4 - выраженный хрип с клиническими симптомами депрессии.

На фиг. 4 проиллюстрирована динамика клинических признаков кожных заболеваний у собак, иммунизированных композицией согласно примеру 42 в дозах 0,5 и 1,0 мл (был показан средний балл клинических симптомов в каждой группе; n равен 10). Композицию инъецировали 3 раза с интервалом 7

суток. Балл клинических симптомов является следующим: 0 - нет симптомов; 1 - рост волос, активное отторжение корки или обширное шелушение; 2 - алопеция, отсутствие роста волос, отторжение корки; 3 - десквамация, опухание или опухание с коркой, корка не отторгается; 4 - десквамация или опухание, боль при пальпации; 5 - воспалительный ответ, некротическая корка.

На фиг. 5 проиллюстрирована динамика клинических признаков кожных заболеваний у собак, иммунизированных композицией согласно примеру 50 в дозах 0,5 мл (был показан средний балл клинических симптомов в каждой группе; у вакцинированных n равно 15 и в контрольной группе n равно 15). Композицию инъецировали 3 раза с интервалом от 3 до 4 суток. Балл клинических симптомов является следующим: 0 - нет симптомов; 1 - рост волос, активное отторжение корки или обширное шелушение; 2 - алопеция, отсутствие роста волос, отторжение корок; 3 - десквамация, опухание или опухание с коркой, корка не отторгается; 4 - десквамация или опухание, боль при пальпации; 5 - воспалительный ответ, некротическая корка.

На фиг. 6 проиллюстрирована динамика клинических признаков кожных заболеваний у собак, иммунизированных композицией согласно примерам 41 и 43 в дозе 0,5 мл (был показан средний балл клинических симптомов в каждой группе; n равно 10). Балл клинических симптомов является следующим: 0 - нет симптомов; 1 - рост волос, активное отторжение корок или обширное шелушение; 2 - алопеция, отсутствие роста волос, отторжение корок; 3 - десквамация, опухание или опухание с коркой, корка не отторгается; 4 - десквамация или опухание, боль при пальпации; 5 - воспалительный ответ, некротическая корка.

На фиг. 7 проиллюстрирована динамика клинических признаков ринита у кошек, которых лечили композицией, приготовленной согласно примеру 42. Экспериментальную группу кошек лечили данной композицией. Осуществляли два курса согласно протоколу исследования каждые сутки 1-2 каплями в нос. Балл симптомов является следующим: 0 - нет симптомов; 1 - гиперемия и/или опухание слизистых оболочек носовых ходов; 2 - слабые выделения из носа; 3 - гиперемия и/или опухание слизистых оболочек носовых ходов, выделения из носа; 4 - затрудненное дыхание, гиперемия и опухание слизистых оболочек носовых ходов, сильные выделения из носа; 5 - смерть животных.

На фиг. 8 проиллюстрирована динамика клинических признаков ринита у собак, которых лечили композицией, приготовленной согласно примеру 43. Экспериментальную группу собак лечили данной композицией. Осуществляли два курса согласно протоколу исследования каждые сутки 1-2 каплями в нос. Балл симптомов является следующим: 0 - нет симптомов; 1 - гиперемия и/или опухание слизистых оболочек носовых ходов; 2 - слабые выделения из носа; 3 - гиперемия и/или опухание слизистых оболочек носовых ходов, выделения из носа; 4 - затрудненное дыхание, гиперемия и опухание слизистых оболочек носовых ходов, сильные выделения из носа; 5 - смерть животных.

На фиг. 9 проиллюстрирована динамика клинических признаков конъюнктивита у кошек, которых лечили композицией, приготовленной согласно примеру 54. Экспериментальную группу кошек лечили данной композицией согласно протоколу исследования каждые сутки посредством закапывания 1-2 капли на конъюнктиву. Балл симптомов является следующим: 0 - нет симптомов; 1 - гиперемия и/или опухание конъюнктивы; 2 - слабое слезотечение; выделения из глаз; 3 - гиперемия и/или опухание конъюнктивы, выделения из глаз; 4 - гиперемия и опухание конъюнктивы, интенсивные выделения из глаз; 5 - разрушение глазного яблока.

Применение слова в единственном числе при использовании в сочетании с термином "содержащий" в формуле изобретения и/или в описании может означать "один", но оно также согласуется со значением "один или более чем один", "по меньшей мере один" и "один или более чем один".

Термин "примерно" означает то, что рассматриваются заявленное значение плюс или минус 5% от заявленного значения, или стандартная ошибка для измерений данного значения.

Термин "содержащий" в том виде, в котором он здесь используется, не следует истолковывать как ограниченный значением "состоящий из" (то есть исключающий присутствие дополнительных других предметов). Скорее "содержащий" подразумевает то, что возможно могут присутствовать дополнительные предметы. Термин "содержащий" охватывает в качестве особенно рассматриваемых воплощения, попадающие в пределы его объема в "состоящий из" (то есть исключающий присутствие дополнительного другого предмета) и "содержащий, но не состоящий из" (то есть требующий присутствия дополнительного другого предмета), причем первое является более предпочтительным.

Термин "хитозан" в том виде, в котором он здесь используется, относится к сополимеру 2-амино-2-дезоксид-Д-глюкопиранозы и 2-ацетиамидо-2-дезоксид-Д-глюкопиранозы, где степень деацетилирования составляет больше чем 50%, предпочтительно больше чем 60, 70, 80 или 90%. Хитозан может быть химически получен из хитина, который представляет собой поли-1,4-β-N-ацетил-Д-глюкозамин, более конкретно N-ацетил-1,4-β-D-глюкопиранозамин, посредством деацетилирования. Типичные препараты хитозана имеют варьирующие молекулярные массы в зависимости от способа изготовления.

Термин "мастит" в том виде, в котором он здесь используется, относится к воспалению ткани молочной железы и вымени. Он предпочтительно включает латентный мастит и/или острый мастит. Латентный мастит также может называться скрытым маститом и/или субклиническим маститом. Предпоч-

тительно латентный мастит может быть диагностирован хорошо известным в данной области способом с использованием 2%-ного раствора мастидина. Острый мастит также может быть фибринозным, катаральным, гнойно-катаральным, геморрагическим маститом с визуальными типичными клиническими симптомами заболевания.

Термин "эндометрит" в том виде, в котором он здесь используется, относится к воспалению эндометрия. Более предпочтительно он относится к воспалению слизистой оболочки матки, после которого может следовать более или менее значимое изменение эндометрия и повышенная активность здоровых или регенерировавших желез матки.

Предпочтительно он включает хронический эндометрит, подострый, острый и субклинический (скрытый) эндометрит. Природа воспаления подразделяется на катаральную, катарально-гнойную, гнойную, фибринозную и скрытую. Эндометрит также может называться воспалением матки. После воспаления матки чаще всего следует репродукция полиморфной микрофлоры.

Термин "трихофитоз" в том виде, в котором он здесь используется, относится к заболеванию, обусловленному инфекцией грибами из рода *Trichophyton*. Крупный рогатый скот обычно инфицируется *Trichophyton verrucosum*, тогда как люди, собаки, кошки, лошади, пушные и другие животные обычно инфицируются *T. mentagrophytes*. Люди также могут быть инфицированы *T. rubrum*. Он также может называться заболеванием, вызванным трихофитомом.

Термины "микроспороз" или "заболевание, вызванное *Microsporum canis*" в том виде, в котором они здесь используются, относятся к заболеванию, обусловленному инфекцией родом *Microsporum*, более конкретно *Microsporum canis*. Типично данным заболеванием инфицируются кошки, собаки, лошади и другие животные. Оно является особенно распространенным у свиней, которые инфицируются, главным образом, *Microsporum nanum*.

Термин "бородавки" в том виде, в котором он здесь используется, относится, в общем, к маленьким, грубым выростам, имеющим сходство с цветной капустой или с твердым пузырем. Обычно бородавки вызваны вирусной инфекцией. Предпочтительно термин "бородавки" относится к обыкновенным бородавкам, в частности к *verrucae volgares* и к паронихиальным бородавкам.

Термин "заболевание копыт и когтей" в том виде, в котором он здесь используется, относится, в частности, к инфекционным заболеваниям копыт и когтей у полорогих и/или свиней. Указанные заболевания, в частности, вызываются бактериями, грибами и/или вирусами. В частности, термин "заболевания копыт и когтей" относится к пальцевому дерматиту, межпальцевому дерматиту и межпальцевой флегмоне.

Термин "полорогие" в том виде, в котором он здесь используется, относится, в частности, к парнокопытным жвачным млекопитающим, включающим бизона, африканского буйвола, азиатского буйвола, антилоп, газелей, овец, коз, овцебыка и крупный рогатый скот.

Термин "хромота" в том виде, в котором он здесь используется, относится, в частности, к хромоте в результате инфекции и повреждения ткани. В частности, термин "хромота" относится к хромоте, обусловленной заболеваниями копыт и когтей, более конкретно, обусловленной пальцевым дерматитом (DD), межпальцевым дерматитом (ID) и межпальцевой флегмоной (IP).

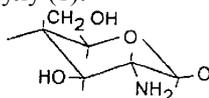
Теперь неожиданно обнаружили то, что композиция, содержащая хитозан, модифицированный органической карбоновой кислотой или ее солью, стимулирует иммунный ответ и может быть использована в способе лечения и/или предупреждения целого ряда разных заболеваний. Кроме того, неожиданно обнаружили то, что при введении уже известных активных агентов в комбинации с модифицированным хитозаном по настоящему изобретению указанные активные агенты могут быть использованы в дозе, меньшей вплоть до 50 раз.

Таким образом, настоящее изобретение относится к хитозану, модифицированному органической карбоновой кислотой или ее солью. Предпочтительно модифицированный хитозан представляет собой прозрачный гель с отсутствующим или слабым запахом уксусной кислоты. Модифицированный хитозан по настоящему изобретению предпочтительно имеет молекулярную массу или среднюю молекулярную массу от примерно 50 Да до примерно 700 кДа, в частности от примерно 15 до примерно 500 кДа, более конкретно от примерно 15 до примерно 150 кДа или от примерно 80 до примерно 200 кДа, от примерно 150 до примерно 300 кДа, от примерно 100 до примерно 250 кДа или от примерно 300 до примерно 700 кДа. Массовое содержание зольных веществ модифицированного хитозана согласно настоящему изобретению предпочтительно составляет примерно от 0,2 до 2%, более предпочтительно от примерно 0,8 до примерно 1,2% и наиболее предпочтительно 0,22%. Модифицированный хитозан согласно настоящему изобретению также может называться производным хитозана или вариантом хитозана.

Предпочтительно данный модифицированный хитозан имеет реакционноспособные аминокислотные группы в количестве от примерно 100 до примерно 500 на 100 кДа хитозана. Модифицированный хитозан согласно настоящему изобретению предпочтительно имеет степень деацетилирования от примерно 62 до примерно 98%, более предпочтительно от примерно 80 до примерно 95%, более предпочтительно от примерно 89 до примерно 93% или от примерно 89 до примерно 98%, от примерно 93 до примерно 98%, примерно от 93 до 95% или примерно от 95 до 98%.

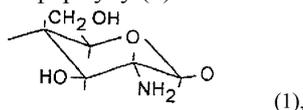
В предпочтительном воплощении настоящего изобретения модифицированный хитозан, производ-

ное хитозана или вариант хитозана представляют собой соединение формулы $[X]_n$, где n представляет собой целое число от примерно 1 до примерно 5000, в частности целое число от примерно 300 до примерно 4000, и X имеет следующую формулу (1):



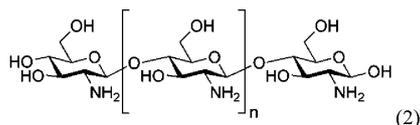
где от примерно 2 до примерно 38% остатков X , составляющих указанное соединение, модифицированы ацелированием, и где все или часть остатков X , составляющих указанное соединение, модифицированы органической карбоновой кислотой или ее солью.

Таким образом, настоящее изобретение также относится к соединению формулы $[X]_n$, где n представляет собой целое число от примерно 1 до примерно 5000, в частности целое число от примерно 300 до примерно 4000, и X имеет следующую формулу (1):



где от примерно 2 до примерно 38%, более предпочтительно от примерно 5 до примерно 20% остатков X , составляющих указанное соединение, модифицированы ацелированием, и где все или часть остатков X , составляющих указанное соединение, модифицированы органической карбоновой кислотой или ее солью.

Формула X относится к деацелированному 2-амино-2-дезоксид-Д-глюкозному звену и Д-глюкозаминному звену соответственно, которое представляет собой мономер хитозана, деацелированного на 100%. Соответственно формула X также может относиться к формуле, представленной в квадратных скобках следующей формулы (2), представляющей собой структурную формулу хитозана со степенью деацелирования 100%:



Как описано выше, n представляет собой целое число от примерно 1 до примерно 5000. В пределах данных границ n предпочтительно составляет по меньшей мере примерно 10, примерно 50, примерно 80, примерно 100, примерно 200, примерно 300, примерно 400, примерно 500, примерно 600, примерно 700, примерно 800, примерно 900 или примерно 1000 и/или самое большее примерно 4000, примерно 3000, примерно 2500, примерно 2000 или примерно 1500. В других предпочтительных воплощениях настоящего изобретения n представляет собой целое число от примерно 50 до примерно 2500, в частности от примерно 50 до примерно 1000 или от примерно 300 до примерно 1500, от примерно 1000 до примерно 2000, от примерно 400 до примерно 1700, от примерно 50 до примерно 1700 или от примерно 1000 до примерно 5000.

В другом предпочтительном воплощении настоящего изобретения от примерно 5 до примерно 35%, более предпочтительно от примерно 5 до примерно 20%, более предпочтительно от примерно 7 до примерно 11% или от примерно 2 до примерно 7%, от примерно 5 до примерно 7% или от примерно 2 до примерно 5% остатков X , составляющих соединение, как определено выше, модифицированы ацелированием, что означает то, что они являются ацелированными. Модификация ацелированием относится к введению ацетильной функциональной группы в остаток согласно формуле (1), что приводит к N-ацетил-Д-глюкозаминному остатку.

В предпочтительном воплощении настоящего изобретения органическая карбоновая кислота имеет рК от примерно 2 до примерно 5, более предпочтительно от примерно 2,3 до примерно 4,9. Более предпочтительно органическая карбоновая кислота или ее соль выбрана из группы, состоящей из валериановой кислоты, хлорида валериановой кислоты, пара-аминобензойной кислоты, глюкуроновой кислоты и молочной кислоты. Модификация органической карбоновой кислотой или ее солью предпочтительно достижима посредством контакта или реакции с указанной органической карбоновой кислотой или ее солью или водным раствором, содержащим указанную органическую карбоновую кислоту или ее соль. Предпочтительно данная модификация происходит посредством контакта с водным раствором, содержащим от примерно 0,2 до примерно 22,5 М указанной органической карбоновой кислоты или ее соли, или в водном растворе, содержащем от примерно 1 до примерно 100 мМ органической карбоновой кислоты или ее соли, более предпочтительно от примерно 1 до примерно 10 мМ.

В предпочтительном воплощении настоящей заявки модифицированный хитозан, производное хитозана или вариант хитозана представляют собой полиаминосакхарный коллоид, предпочтительно гидроколлоид. В предпочтительном воплощении настоящей заявки модифицированный хитозан, производное хитозана или вариант хитозана представляют собой гидроколлоид хитозан-глюкуроновая кислота или гидроколлоид хитозан-п-аминобензойная кислота, или гидроколлоид хитозан-валериановая кислота. В

другом предпочтительном воплощении настоящей заявки гидроколлоид хитозан-глюкуроновая кислота имеет химическую формулу $(C_6H_{11}O_4N)_x (C_8H_{13}O_5N)_y (C_6H_{10}O_7)_z (H_2O)_m$. Предпочтительно гидроколлоид хитозан-глюкуроновая кислота имеет следующую молекулярную массу: $x*(161)+y*(203)+z*(194,14)+m*(18)$. В другом предпочтительном воплощении настоящей заявки гидроколлоид хитозан-п-аминобензойная кислота имеет следующую химическую формулу: $(C_6H_{11}O_4N)_x (C_8H_{13}O_5N)_y (C_7H_7O_2N)_z (H_2O)_m$. Предпочтительно гидроколлоид хитозан-п-аминобензойная кислота имеет следующую молекулярную массу: $x*(161)+y*(203)+z*(137,14)+m*(18)$. В другом предпочтительном воплощении настоящей заявки гидроколлоид хитозан-валериановая кислота имеет следующую химическую формулу: $(C_6H_{11}O_4N)_x (C_8H_{13}O_5N)_y (C_5H_{10}O_2)_z (HCl)_z (H_2O)_m$. Предпочтительно гидроколлоид хитозан-валериановая кислота имеет следующую молекулярную массу: $x*(161)+y*(203)+z*(102)+z*(36,5)+m*(18)$.

Таким образом, настоящая заявка также относится к гидроколлоиду, содержащему:

(i) от 0,1 до 5% (мас./об.) хитозана и от 0,001 до 5% (мас./об.) валериановой кислоты или ее соли, предпочтительно хлорида валериановой кислоты, или

(ii) от 0,1 до 5% (мас./мас.) хитозана и от 0,001 до 5% (мас./мас.) глюкуроновой кислоты или п-аминобензойной кислоты или их соли.

Предпочтительное воплощение настоящего изобретения относится к гидроколлоиду, содержащему:

(i) от 0,1 до 3% (мас./об.) хитозана и от 0,001 до 2% (мас./об.) валериановой кислоты или ее соли, предпочтительно хлорида валериановой кислоты, или

(ii) от 0,1 до 3% (мас./мас.) хитозана и от 0,001 до 2% (мас./мас.) глюкуроновой кислоты или п-аминобензойной кислоты или их соли.

Другое предпочтительное воплощение настоящего изобретения относится к гидроколлоиду, содержащему:

(i) от 0,1 до 1,2% (мас./об.) хитозана и от 0,001 до 1% (мас./об.) валериановой кислоты или ее соли, предпочтительно хлорида валериановой кислоты, или

(ii) от 0,1 до 1,2% (мас./мас.) хитозана и от 0,001 до 1% (мас./мас.) глюкуроновой кислоты или п-аминобензойной кислоты или их соли.

Другое предпочтительное воплощение настоящего изобретения относится к гидроколлоиду, содержащему:

(i) от 0,1 до 1,2% (мас./об.) хитозана и

(ii) от 0,01 до 0,44% (мас./об.) валериановой кислоты или ее соли, предпочтительно хлорида валериановой кислоты.

Другое предпочтительное воплощение настоящего изобретения относится к гидроколлоиду, содержащему:

(i) от 0,1 до 1,2% (мас./мас.) хитозана и

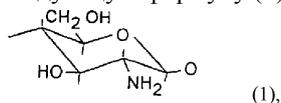
(ii) от 0,001 до 0,6% (мас./мас.) глюкуроновой кислоты или ее соли.

Другое предпочтительное воплощение настоящего изобретения относится к гидроколлоиду, содержащему:

(i) от 0,1 до 1,2% хитозана и

(ii) от 0,006 до 1% (мас./мас.) п-аминобензойной кислоты или ее соли.

Предпочтительно хитозан данного гидроколлоида представляет собой соединение формулы $[X]_n$, где n представляет собой целое число от примерно 1 до примерно 5000, в частности целое число от примерно 300 до примерно 4000, и X имеет следующую формулу (1):



где от примерно 2 до примерно 38%, более предпочтительно от примерно 5 до примерно 20% остатков X, составляющих указанное соединение, модифицированы ацетилированием, и где все или часть остатков X, составляющих указанное соединение, модифицированы органической карбоновой кислотой или ее солью.

В предпочтительном воплощении оставшаяся процентная доля гидроколлоида согласно настоящему изобретению предоставляется диспергирующей средой, предпочтительно водой или водой и соляной кислотой (HCl).

В предпочтительном воплощении гидроколлоид согласно настоящему изобретению используется в виде разведения, предпочтительно в разведении от 0 до 10 раз.

В другом предпочтительном воплощении настоящей заявки модифицированный хитозан, производное хитозана или вариант хитозана представляют собой вязкую жидкость от естественного белого до желтоватого цвета. Предпочтительно модифицированный хитозан, производное хитозана или вариант хитозана имеют типичный аромат карбоновой кислоты, предпочтительно типичный аромат валериановой кислоты.

В другом предпочтительном воплощении модифицированный хитозан, производное хитозана или вариант хитозана содержат примерно 0,2% пентаноилхлорида или 0,2% глюкуроновой кислоты, или

0,2% *p*-аминобензойной кислоты.

В другом предпочтительном воплощении модифицированный хитозан, производное хитозана или вариант хитозана содержат 1% остатка хитозана из высушенных хитозанов.

В другом предпочтительном воплощении модифицированный хитозан, производное хитозана или вариант хитозана имеют от примерно 10 до примерно 1000 мОсмоль, предпочтительно от примерно 10 до примерно 200 мОсмоль, наиболее предпочтительно примерно 100 мОсмоль.

В предпочтительном воплощении настоящего изобретения модифицированный хитозан дополнительно модифицирован минеральной кислотой. Указанная модификация может возникать в результате контакта или реакции с указанной минеральной кислотой или водным раствором, содержащим указанную минеральную кислоту. Указанная минеральная кислота предпочтительно представляет собой HCl или H₂SO₄. Предпочтительно модификация происходит посредством инкубирования модифицированного хитозана в водном растворе, содержащем от примерно 0,05 до примерно 1 М указанной минеральной кислоты, предпочтительно HCl или H₂SO₄.

Настоящее изобретение также относится к композиции, содержащей модифицированный хитозан, производное хитозана или вариант хитозана, или гидроколлоид согласно настоящему изобретению. Предпочтительно композиция, содержащая указанный модифицированный хитозан, представляет собой прозрачный гель с отсутствующим или слабым запахом уксусной кислоты, который является растворимым в воде и 1%-ном растворе уксусной кислоты. Данная композиция предпочтительно имеет молекулярную массу или среднюю молекулярную массу от примерно 50 Да до примерно 700 кДа, в частности от примерно 15 до примерно 500 кДа, более предпочтительно от примерно 15 до примерно 150 кДа или от примерно 80 до примерно 200 кДа или от примерно 150 до примерно 300 кДа, от примерно 100 до примерно 250 кДа или от примерно 300 до примерно 700 кДа. Массовое содержание зольных веществ композиции согласно настоящему изобретению составляет от 0,1 до 2%, предпочтительно от примерно 0,8 до примерно 1,2%, более предпочтительно примерно 0,22%.

Предпочтительно модифицированный хитозан указанной композиции имеет реакционноспособные аминокруппы в количестве от примерно 100 до примерно 500 на 100 кДа хитозана. Модифицированный хитозан композиции согласно настоящему изобретению предпочтительно имеет степень деацетилирования от примерно 65 до примерно 98%, более предпочтительно от примерно 80 до примерно 95%, более предпочтительно от примерно 89 до примерно 93%, или от примерно 89 до примерно 98%, от примерно 93 до примерно 98%, от примерно 93 до примерно 95% или от примерно 95 до примерно 98%.

В другом предпочтительном воплощении настоящего изобретения данная композиция дополнительно содержит минеральную кислоту. Указанная минеральная кислота поддерживает растворимость модифицированного хитозана и/или может дополнительно модифицировать хитозан. Указанная минеральная кислота предпочтительно представляет собой HCl или H₂SO₄. Водный раствор предпочтительно содержит от 0,05 до примерно 1 М минеральной кислоты, предпочтительно HCl или H₂SO₄.

Модифицированный хитозан согласно настоящему изобретению предпочтительно можно получать приведением в контакт хитозана с органической карбоновой кислотой или ее солью. Указанный контакт предпочтительно осуществляется посредством инкубирования хитозана в водном растворе органической карбоновой кислоты или ее соли, более предпочтительно посредством инкубирования хитозана в водном растворе валериановой кислоты, молочной кислоты, пара-аминобензойной кислоты или глюкуроновой кислоты или ее соли, в частности хлорида валериановой кислоты. Предпочтительно указанная инкубация проводится посредством смешивания и/или при перемешивании.

Таким образом, настоящее изобретение относится к модифицированному хитозану, который можно получать способом, включающим:

(а) инкубирование хитозана в водном растворе органической карбоновой кислоты или ее соли.

Настоящее изобретение также относится к способу, включающему стадию:

(а) инкубирования хитозана в водном растворе органической карбоновой кислоты или ее соли.

В предпочтительном воплощении хитозан сначала растворяют в условиях водной кислоты и затем осаждают увеличением значения pH до значения pH от примерно 8,0 до примерно 8,5 перед его инкубированием в водном растворе органической карбоновой кислоты или ее соли, как описано выше.

Таким образом, настоящее изобретение также относится к модифицированному хитозану, который можно получать способом, включающим:

(i) растворение хитозана в водном растворе кислоты,

(ii) увеличение значения pH, пока хитозан не выпадет в осадок,

(iii) выделение осажденного хитозана и

(а) инкубирование выделенного хитозана со стадии (iii) в водном растворе органической карбоновой кислоты или ее соли.

Настоящее изобретение также относится к способу, включающему следующие стадии:

(i) растворение хитозана в водном растворе кислоты,

(ii) увеличение значения pH, пока хитозан не выпадет в осадок,

(iii) выделение осажденного хитозана и

(а) инкубирование выделенного хитозана со стадии (iii) в водном растворе органической карбо-

вой кислоты или ее соли.

Органическая карбоновая кислота или ее соль со стадии (а) предпочтительно имеет рК от примерно 2 до примерно 5, более предпочтительно от примерно 2,3 до примерно 4,9. Более предпочтительно указанная органическая карбоновая кислота представляет собой валериановую кислоту, молочную кислоту, пара-аминобензойную кислоту или глюкуроновую кислоту или ее соль, в частности хлорид валериановой кислоты. Указанную органическую карбоновую кислоту или ее соль предпочтительно используют в концентрации от примерно 0,2 до примерно 22,5 М. Инкубирование хитозана и выделенного хитозана со стадии (iii) соответственно и водного раствора органической карбоновой кислоты или ее соли, как описано на стадии (а), приводит к раствору хитозана, модификации хитозана и/или к образованию геля. Предпочтительно значение рН водного раствора на стадии (а) составляет от примерно 5 до примерно 6 или примерно 5,0; 5,1; 5,2; 5,3; 5,4; 5,5; 5,6; 5,7; 5,8; 5,9 или 6,0. Предпочтительно модификация хитозана происходит в водном растворе, содержащем от примерно 1 до примерно 100 мМ органической карбоновой кислоты или ее соли, более предпочтительно от примерно 1 до примерно 10 мМ.

Предпочтительно стадия (а) проводится, пока хитозан не модифицируется и не растворяется. Она предпочтительно проводится смешиванием хитозана с водным раствором органической карбоновой кислоты или ее соли, или суспендированием хитозана в водных условиях и добавлением к суспензии органической карбоновой кислоты. Она предпочтительно проводится при перемешивании в течение от примерно 1 до примерно 72 ч, более предпочтительно в течение от примерно 24 до примерно 48 ч. Стадия (а) может включать добавление дополнительной кислоты или может проводиться в присутствии дополнительной кислоты. Указанная дополнительная кислота предпочтительно представляет собой минеральную кислоту, органическую кислоту или соль указанной минеральной кислоты или органической кислоты. Предпочтительно минеральная кислота представляет собой HCl или H₂SO₄, и органическая кислота представляет собой глутаминовую кислоту, пара-аминобензойную кислоту или молочную кислоту. Минеральную или органическую кислоту предпочтительно добавляют, или она присутствует в количестве для доведения значения рН смеси со стадии (а) до значения рН от примерно 5 до примерно 6, или примерно 5,0; 5,1; 5,2; 5,3; 5,4; 5,5; 5,6; 5,7; 5,8; 5,9 или 6,0. Добавление дополнительной кислоты может поддерживать растворение и/или модификацию хитозана, например, посредством уменьшения времени, которое необходимо для растворения модифицированного хитозана.

Концентрация хитозана на стадии (а), или, если данный способ включает стадию (i), для стадии (i) предпочтительно составляет от примерно 1 до примерно 20 г хитозана на 1 л, более предпочтительно от примерно 5 до примерно 15 г хитозана на 1 л, наиболее предпочтительно от примерно 8 до примерно 10 г хитозана на 1 л.

Хитозан, используемый для стадии (а), или, если данный способ включает стадию (i), для стадии (i) может представлять собой хитозан, имеющийся в продаже, или хитозан, выделенный из любого природного источника, содержащего хитозан, такого как биомасса, содержащая хитозан. В качестве альтернативы, можно использовать хитин, который деацетилируют с получением хитозана до стадии (а), или, если способ включает стадию (i) - до стадии (i). Указанный хитин может представлять собой хитин, имеющийся в продаже, или он может быть выделен из природного источника, содержащего хитин, такого как биомасса, содержащая хитин. Биомасса для выделения хитина и/или хитозана предпочтительно представляет собой биомассу грибов, насекомых и/или ракообразных.

Деацетилирование хитина может проводиться способами, известными в данной области, например посредством применения гидроксида натрия (NaOH) в избытке в качестве реактива и воды в качестве растворителя или посредством ферментативных способов. Также может осуществляться выделение хитозана и/или хитина из природных источников посредством способов, известных в данной области, и посредством способов, описанных в Примерах настоящего изобретения.

Хитозан, используемый для стадии (а), или, если способ включает стадию (i), для стадии (i), предпочтительно имеет степень деацетилирования от примерно 62 до примерно 95%, более предпочтительно от примерно 80 до примерно 94%, более предпочтительно от примерно 89 до примерно 93% или от примерно 93 до примерно 98%, примерно от 93 до 95%, от примерно 95 до примерно 98% или по меньшей мере 60%, более предпочтительно по меньшей мере 70, 80, 90 или 95%, или степень деацетилирования от примерно 60 до примерно 100%, более предпочтительно от примерно 80 до примерно 95%, даже более предпочтительно от примерно 90 до примерно 95%, наиболее предпочтительно от примерно 77 до примерно 80%.

Хитозан, используемый для стадии (а), или, если способ включает стадию (i), для стадии (i), предпочтительно имеет вязкость примерно от 50 до 400 МПа·с, более предпочтительно от примерно 70 до примерно 150 МПа·с или от примерно 151 до примерно 350 МПа·с.

Хитозан, используемый для стадии (а), или, если способ включает стадию (i), для стадии (i), предпочтительно имеет молекулярную массу или среднюю молекулярную массу от примерно 50 Да до примерно 700 кДа, в частности от примерно 15 до примерно 500 кДа, более конкретно от примерно 15 до примерно 150 кДа или от примерно 80 до примерно 200 кДа, от примерно 150 до примерно 300 кДа, от примерно 100 до примерно 250 кДа или от примерно 300 до примерно 700 кДа.

Перед применением хитозана на стадии (а) или, если способ включает стадию (i), на стадии (i), хи-

тозан может быть стерилизован автоклавированием. Указанная стерилизация может приводить к тому, что модифицированный хитозан согласно настоящему изобретению является менее токсичным, лучше переносится субъектом и/или приводит к меньшим непредусмотренным побочным эффектам.

Предпочтительно стадия (i) проводится посредством применения водного раствора слабой кислоты, предпочтительно органической кислоты или ее соли, более предпочтительно уксусной кислоты, валериановой кислоты, молочной кислоты, пара-аминобензойной кислоты или глюкуроновой кислоты, или их соли, в частности хлорида валериановой кислоты. Данная кислота предпочтительно используется в концентрации от примерно 0,8 до примерно 2%. Стадия (i) предпочтительно проводится при перемешивании. Перемешивание может проводиться в течение от примерно 2 до примерно 24 ч. Предпочтительно стадия (i) проводится, пока не получается гель или суспензия геля. Нерастворившиеся частицы могут быть удалены, например, посредством фильтрования. Например, для такого фильтрования можно использовать металлическую сетку с ячейкой от 200 до 300 мкм.

Стадия (ii) предпочтительно проводится посредством увеличения значения pH геля или суспензии геля, полученной на стадии (i), пока не образуется осадок. Она предпочтительно осуществляется при перемешивании. Она предпочтительно осуществляется обработкой хитозана при водных щелочных условиях, более предпочтительно при водных щелочных условиях, включающих от примерно 0,1 до примерно 25,0% щелочи. В предпочтительном воплощении щелочь представляет собой NaOH. Предпочтительно указанная стадия проводится при температуре от примерно 4 до примерно 55°C. Предпочтительно обработка проводится в течение от примерно 20 мин до примерно 2 ч, более предпочтительно в течение от примерно 30 до примерно 70 мин, но она может занимать вплоть до примерно 24 ч. Предпочтительно значение pH увеличивается посредством добавления щелочи к гелю или суспензии геля стадии (i). Предпочтительно значение pH увеличивается с получением pH от примерно 8,0 до примерно 8,5. Стадия (ii) может приводить к дополнительному деацетилированию хитозана. Она также может приводить к тому, что модифицированный хитозан согласно настоящему изобретению является менее токсичным, лучше переносится любым субъектом и/или приводит к меньшим непредусмотренным побочным эффектам.

Стадия (iii) предпочтительно проводится центрифугированием смеси или суспензии, полученной на стадии (ii). Центрифугирование предпочтительно проводится при от примерно 4000 до примерно 6000 об/мин, более предпочтительно при примерно 5000 об/мин. Центрифугирование предпочтительно проводится в течение вплоть до 60 мин.

Способы, посредством которых можно получать модифицированный хитозан по настоящему изобретению, и способы по настоящему изобретению могут включать дополнительные стадии. Например, продукт, полученный на стадии (ii), может быть гомогенизирован. Предпочтительно стадия гомогенизации проводится в закрытом стерильном гомогенизаторе.

Альтернативно или дополнительно, продукт, полученный на стадии (a), может быть диализован. Диализ предпочтительно проводится в закрытой системе для удаления свободных ионов солей и низкомолекулярных соединений. Предпочтительно диализ проводится посредством тангенциального фильтрования в течение от примерно 1 до примерно 6 ч или мембранным фильтрованием против дистиллированной воды в течение от примерно 24 до примерно 48 ч.

Альтернативно или дополнительно, способы, посредством которых можно получать модифицированный хитозан по настоящему изобретению, и способы по настоящему изобретению могут включать дополнительную стадию получения конечного продукта. Получение конечного продукта может включать разведение полученного продукта. Предпочтительно продукт разводят добавлением воды, более предпочтительно - стерильной воды для инъекции. Однако продукт также может быть разведен любым другим подходящим водным раствором. Альтернативно или дополнительно, получение конечного продукта может включать добавление одного или более чем одного дополнительного соединения, такого как разбавители, консерванты, антибиотики, дополнительные активные вещества и/или антигенный материал из микроорганизма, и/или ферменты. Подходящими консервантами являются, например, хлоркрезол, тиомерсал и формалин. Подходящими антибиотиками являются, например, неомицин, пенициллин, гентамицин, клоксациллин, цефепим и цефалоспорины. Наконец, конечный продукт может быть стерилизован. Предпочтительно стерилизацию осуществляют нагреванием, предпочтительно в течение примерно от 40 до 50 мин при температуре от примерно 65 до примерно 80°C. Предпочтительно указанную стерилизацию повторяют один, два, три, четыре или пять раз.

Предпочтительно конечный продукт имеет концентрацию от примерно 0,02 до примерно 2 г модифицированного хитозана на 1 л, более предпочтительно от примерно 0,04 до примерно 1 г модифицированного хитозана на 1 л.

В предпочтительном воплощении способы, посредством которых можно получать модифицированный хитозан по настоящему изобретению, и способы по настоящему изобретению включают стадии, описанные в примерах. Например, данные способы могут включать следующие стадии:

возможно стерилизацию хитозана, например, посредством автоклавирования,

(i) растворение хитозана в водном растворе кислоты, в частности, в присутствии уксусной кислоты, возможно удаление нерастворившихся частиц, например, фильтрованием,

(ii) увеличение значения pH, пока хитозан не выпадет в осадок,

(iii) выделение осажденного хитозана,

возможно гомогенизацию выделенного хитозана в водных условиях,

(а) инкубирование выделенного хитозана со стадии (iii) или гомогенизированного выделенного хитозана в водном растворе органической карбоновой кислоты или ее соли возможно в присутствии дополнительной минеральной кислоты или органической кислоты,

возможно проведение диализа продукта, полученного на стадии (а),

возможно добавление дополнительных соединений, таких как разбавители, консерванты, антибиотики, другие активные соединения, такие как химиотерапевтические препараты и/или антигенный материал из микроорганизма, и/или ферменты, и

возможно стерилизация конечного продукта, например, посредством нагревания.

Предпочтительно порядок стадий, как описано выше, соответствует порядку, перечисленному выше. Однако, как известно специалисту в данной области, порядок одиночных стадий может варьировать, при условии, что достигаются такие же эффекты. Например, на разных стадиях способа, как описано выше, можно добавлять разбавители, такие как вода.

Если для стадий способа, как описано выше, не приводятся конкретные интервалы температуры, данные стадии предпочтительно проводятся при комнатной температуре и/или в интервале от примерно 10 до примерно 40°C, более предпочтительно в интервале от примерно 20 до примерно 30°C.

В другом предпочтительном воплощении настоящее изобретение относится к модифицированному хитозану, производному хитозана или варианту хитозана, или к композиции, содержащей модифицированный хитозан, производное хитозана или вариант хитозана, или гидроколлоид, получаемые любым способом по настоящему изобретению.

В другом предпочтительном воплощении настоящее изобретение относится к композиции, содержащей модифицированный хитозан, производное хитозана, вариант хитозана или гидроколлоид согласно настоящему изобретению.

Кроме того, композиция по настоящему изобретению может содержать дополнительные активные вещества. Предпочтительно композиция по настоящему изобретению может дополнительно содержать химиотерапевтический препарат, в частности, при ее использовании для лечения мастита.

В другом предпочтительном воплощении настоящего изобретения композиция по настоящему изобретению может дополнительно содержать антигенный материал из микроорганизма и/или ферменты, в частности антигенный материал кератинофильных грибов и/или кератинофильных дрожжеподобных грибов, и/или дрожжей.

Антигенный материал кератинофильных грибов или дрожжей может иметь происхождение из любых частей кератинофильных грибов или дрожжей, содержащих антигены, как, например, из мицелия, артроспор, микроконидий дерматофитов, дрожжевых бластоспор или других. Антигены предпочтительно представляют собой полисахариды и/или гликопептиды. Предпочтительно антигенный материал кератинофильных грибов или дрожжей выбран из группы, состоящей из гомогенизированных инактивированных микроконидий дерматофитов, гомогенизированных инактивированных дрожжевых бластоспор, антигенного материала дрожжевых бластоспор и антигенного материала микроконидий дерматофитов. Таким образом, композиция по настоящему изобретению может дополнительно содержать гомогенизированные инактивированные микроконидии дерматофитов и/или гомогенизированные инактивированные дрожжевые бластоспоры, и/или антигенный материал из дрожжевых бластоспор и/или микроконидий дерматофитов.

Антигенный материал кератинофильных дрожжей, в частности дрожжевых бластоспор, предпочтительно принадлежит к роду *Candida* и более предпочтительно к виду *Candida albicans*. Антигенный материал кератинофильных дерматофитов, в частности микроконидий дерматофитов, предпочтительно принадлежит к родам *Trichophyton*, *Microsporum* и/или *Chrisporium*. Более предпочтительно микроконидии дерматофитов принадлежат к видам *Trichophyton verrucosum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton equinum*, *Trichophyton sarkisovii*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum canis*, *Microsporum gypsum* и/или *Chrisporium tropicum*. В частности, видом *Microsporum canis* может быть *Microsporum canis* var. *obesum* и/или *Microsporum canis* var. *distortum*.

В предпочтительном воплощении настоящего изобретения дрожжевые бластоспоры и микроконидии дерматофитов получают из штаммов вышеупомянутых видов, которые были получены посредством направленного отбора на основе продукции спор и/или ослабления. Весьма предпочтительно применять штамм, который быстрее растет в питательной среде, продуцирует больше микроконидий и бластоспор соответственно, имеет меньшую вирулентность и/или не имеет нежелательных реакций после его внутримышечного применения по сравнению с любым эпизоотическим штаммом, из которого он получен. Примерами таких штаммов являются штаммы *Trichophyton mentagrophytes* DSM-7279, *Trichophyton verrucosum* DSM-28406, *Trichophyton rubrum* DSM-9469, *Trichophyton rubrum* DSM-9470, *Trichophyton rubrum* DSM-9471, *Trichophyton rubrum* DSM-9472, *Candida albicans* DSM-9456, *Candida albicans* DSM-9457, *Candida albicans* DSM-9458 и *Candida albicans* DSM-9459, *Chrisporium tropicum* DSM-28405 и *Microsporum canis* BINO 483. Таким образом, в особенно предпочтительных воплощениях настоящего изобре-

тения дрожжевые бластоспоры и микроконидии дерматофитов получают из штаммов *Trichophyton mentagrophytes* DSM-7279, *Trichophyton verrucosum* DSM-28406, *Trichophyton rubrum* DSM-9469, *Trichophyton rubrum* DSM-9470, *Trichophyton rubrum* DSM-9471, *Trichophyton rubrum* DSM-9472, *Candida albicans* DSM-9456, *Candida albicans* DSM-9457, *Candida albicans* DSM-9458, *Candida albicans* DSM-9459, *Christophium tropicum* DSM-28405 и *Microsporium canis* BINO 483.

Штаммы *Trichophyton rubrum* DSM-9469, *Trichophyton rubrum* DSM-9470, *Trichophyton rubrum* DSM-9471, *Trichophyton rubrum* DSM-9472, *Candida albicans* DSM-9456, *Candida albicans* DSM-9457, *Candida albicans* DSM-9458 и *Candida albicans* DSM-9459 были депонированы согласно Будапештскому соглашению в "Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen" (Немецкая коллекция микроорганизмов и клеточных культур) (DSM), Mascheroder Weg 1B, W-38124 Брауншвейг, Германия (современное название и адрес которой - "Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH" (DSMZ), Inhoffenstraße 7B, 38124 Брауншвейг, Германия) 05 октября 1994 г. *Vasotherm GmbH*, Eichendorffweg 5, 88396 Biberach an der Riss. Текущими депозиторами указанных штаммов являются заявители, а именно Др. Игорь Поляков и доктор наук Людмила Иванова, Eberhardtstr. 40, 89073 Ulm.

Trichophyton rubrum, № DSM-9469.

Данный штамм депонировали в DSM 05.10.1994 г. под серийным № DSM-9469. Данный штамм получали направленным отбором на основе продукции спор и ослабления эпизоотического штамма № 533, который был идентифицирован на коже человека в 1985 г. Данный штамм был идентифицирован с использованием определителя "Rebell-Taplin" (Rebell, G., Taplin, D.: *Dermatophytes, their recognition and identification*, 3rd Print, University of Miami Press. Coral Gables, Florida, USA, 1978). Биологические свойства данного штамма описаны в табл. А. Штамм № DSM-9469 отличается от эпидемического штамма по его более быстрому росту в питательной среде, огромной продукции микроконидий и меньшей вирулентности.

Таблица А

Свойства и характеристики штаммов	№ штамма DSM-9469	Эпидемический штамм № 533
Описание культуры	Зрелая 15-суточная колония на агаре Сабуро: белая, бархатистая, плоская, край колонии бахромчатый, под поверхностью желтая, в центре – темно-пурпурная, диаметр колонии – 60-63 мм.	20-суточная колония на агаре Сабуро: белая, пушистая, приподнятая, край колонии ровный, под поверхностью – пурпурная, диаметр колонии – 30-35 мм.
Морфологические характеристики	Зрелая 15-суточная культура с разделенными перегородками ветвистыми гифами шириной 1-3 мкм, многочисленные обратные цевидные микроконидии размером 2-3 × 3-5 мкм,	20-суточная культура с разделенными перегородками ветвистыми гифами шириной 1-3 мкм, микроконидии от булабовидных до круглых в маленьких открытых кластерах и

	макроконидии длинные булавовидные карандашевидные с 4-5 поперечными стенками, имеющие размер 4-6 × 15-40 мкм.	вдоль гиф размером 2-3 × 3-6 мкм, макроконидии редкие, длинные и карандашевидные с 3-5 поперечными стенками, имеющие размер 4-7 × 15-50 мкм.
Патогенные характеристики	Штамм является слабовирулентным. Через 9-10 суток после нанесения дозы 500-600 тысяч клеток грибкового материала на см ² на пораненную кожу морских свинок образуются чешуйки. Спонтанное выздоровление через 18-20 суток.	Штамм является вирулентным. Через 9-10 суток после нанесения дозы 500-600 тысяч клеток грибкового материала на см ² на пораненную кожу морских свинок образуются тонкие некротические струпы. Спонтанное выздоровление через 25-30 суток.
Ответная реакция	Результат внутримышечной инъекции инактивированных корпускулярных антигенов из культур: нет наблюдаемых изменений в клиническом состоянии животных.	Результат внутримышечной инъекции инактивированных корпускулярных антигенов из культур: воспаление в точке инъекции, отек.
Иммуногенный ответ	Результаты иммунизации группы морских свинок инактивированным антигеном из культур (повторялась не менее, чем 5 раз): устанавливает иммунитет.	Результаты иммунизации группы морских свинок инактивированным антигеном из культур (повторялась не менее, чем 5 раз): устанавливает иммунитет.

Trichophyton rubrum, № DSM-9470.

Данный штамм депонировали в DSM 05.10.1994 г. под серийным № DSM-9470. Данный штамм получали направленным отбором на основе продукции спор и ослабления эпизоотического штамма № 535, который был идентифицирован на коже человека в 1990 г. Данный штамм был идентифицирован с использованием определителя "Rebell-Taplin" (Rebell, G., Taplin, D.: *Dermatophytes, their recognition and identification*, 3rd Print, University of Miami Press. Coral Gables, Florida, USA, 1978). Биологические свойства данного штамма описаны в табл. Б. Штамм № DSM-9470 отличается от эпидемического штамма по его более быстрому росту в питательной среде, огромной продукции микроконидий и меньшей вирулентности.

Таблица Б

Свойства и характеристики штаммов	№ штамма DSM-9470	Эпидемический штамм № 535
Описание культуры	Зрелая 15-суточная колония на агаре Сабуро: белая, бархатисто-пушистая в центре, складчатая, край колонии ровный, под поверхностью бесцветная или розовая, диаметр колонии – 25-30 мм.	20-суточная колония на агаре Сабуро: белая, пушистая, край колонии ровный, под поверхностью – желтая, диаметр – 20 мм.
Морфологические характеристики	Зрелая 15-суточная культура с разделенными перегородками ветвистыми гифами шириной 1-3 мкм, кругло-овальные гноевидные микроконидии размером 2-3 × 3-7 мкм.	20-суточная культура с разделенными перегородками гифами шириной 1-3 мкм, микроконидии от булавовидных до круглых в маленьких открытых кластерах и вдоль гиф размером 2-3 × 3-6 мкм, макроконидии отсутствуют.
Патогенные характеристики	Штамм является слабовирулентным. Через 9-10 суток после нанесения дозы 500-600 тысяч клеток грибкового материала на см ² на пораненную кожу морских свинок образуются некротические струнья. Спонтанное выздоровление через 22-25 суток.	Штамм является вирулентным. Через 9-10 суток после нанесения дозы 500-600 тысяч клеток грибкового материала на см ² на пораненную кожу морских свинок образуются тонкие некротические струнья. Спонтанное выздоровление через 25-30 суток.
Ответная реакция	Результат внутримышечной инъекции инактивированных корпускулярных антигенов из культур: нет наблюдаемых изменений в клиническом состоянии животных.	Результат внутримышечной инъекции инактивированных корпускулярных антигенов из культур: воспаление в точке инъекции, отек.
Иммуногенный ответ	Результаты иммунизации группы морских свинок инактивированным антигеном из культур (повторялась не менее, чем 5 раз): устанавливает иммунитет.	Результаты иммунизации группы морских свинок инактивированным антигеном из культур (повторялась не менее, чем 5 раз): устанавливает иммунитет.

Trichophyton rubrum, № DSM-9471.

Данный штамм депонировали в DSM 05.10.1994 г. под серийным № DSM-9471. Данный штамм получали направленным отбором на основе продукции спор и ослабления эпизоотического штамма № 620, который был идентифицирован на ногте человека в 1989 г. Данный штамм был идентифицирован с использованием определителя "Rebell-Taplin" (Rebell, G., Taplin, D.: *Dermatophytes, their recognition and identification*, 3rd Print, University of Miami Press. Coral Gables, Florida, USA, 1978). Биологические свойства штамма описаны в табл. В. Штамм № DSM-9471 отличается от эпидемического штамма по его более быстрому росту в питательной среде, огромной продукции микроконидий и меньшей вирулентности.

Таблица В

Свойства и характеристики штаммов	№ штамма DSM-9471	Эпидемический штамм № 620
Описание культуры	Зрелая 15-суточная колония на агаре Сабуро: белая, бархатистая, приподнятая, край колонии ровный, под поверхностью желтая, в центре – темно-пурпурная, диаметр колонии – 32-35 мм.	20-суточная колония на агаре Сабуро: белая, пушистая, приподнятая, край колонии ровный, под поверхностью – пурпурная, диаметр колонии – 20-25 мм.
Морфологические характеристики	Зрелая 15-суточная культура с разделенными перегородками ветвистыми гифами шириной 1-3 мкм, кругло-овальные гноевидные микроконидии размером 2-3 × 3-7 мкм.	20-суточная культура с разделенными перегородками разветвленными гифами шириной 1-3 мкм, микроконидии от булавовидных до круглых в маленьких открытых кластерах и вдоль гиф размером 2-3 × 3-6 мкм;
		макроконидии редкие, длинные и карандашевидные с 3-5 поперечными стенками, имеющие размер 4-7 × 15-50 мкм.
Патогенные характеристики	Штамм является слабовирулентным. Через 9-10 суток после нанесения дозы 500-600 тысяч клеток грибкового материала на см ² на пораненную кожу морских свинок образуются чешуйки. Спонтанное выздоровление через 18-20 суток.	Штамм является вирулентным. Через 9-10 суток после нанесения дозы 500-600 тысяч клеток грибкового материала на см ² на пораненную кожу морских свинок образуются тонкие некротические струпы. Спонтанное выздоровление через 25-30 суток.
Ответная реакция	Результат внутримышечной инъекции инактивированных корпускулярных антигенов из культур: нет наблюдаемых изменений в клиническом состоянии животных.	Результат внутримышечной инъекции инактивированных корпускулярных антигенов из культур: воспаление в точке инъекции, отек.
Иммуногенный ответ	Результаты иммунизации группы морских свинок инактивированным антигеном из культур (повторялась не менее, чем 5 раз): устанавливает иммунитет.	Результаты иммунизации группы морских свинок инактивированным антигеном из культур (повторялась не менее, чем 5 раз): устанавливает иммунитет.

Trichophyton rubrum, № DSM-9472.

Данный штамм депонировали в DSM 05.10.1994 г. под серийным № DSM-9472. Данный штамм получали направленным отбором на основе продукции спор и ослабления эпизоотического штамма № 754, который был идентифицирован на ноге человека в 1990 г. Данный штамм был идентифицирован с использованием определителя "Rebell-Taplin" (Rebell, G., Taplin, D.: *Dermatophytes, their recognition and identification*, 3rd Print, University of Miami Press. Coral Gables, Florida, USA, 1978). Биологические свойства штамма описаны в табл. Г. Штамм № DSM-9472 отличается от эпидемического штамма по его более быстрому росту в питательной среде, огромной продукции микроконидий и меньшей вирулентности.

Таблица Г

Свойства и характеристики штаммов	Штамм № DSM-9472	Эпидемический штамм № 754
Описание культуры	Зрелая 15-суточная колония на агаре Сабуро: белая, бархатистая, складчатая в центре, край колонии ровный, под поверхностью желтая, в центре – пурпурная, диаметр колонии – 35-40 мм.	20-суточная колония на агаре Сабуро: бело-розовая, пушистая, край колонии ровный, под поверхностью – пурпурная, диаметр колонии – 20-25 мм.
Морфологические характеристики	Зрелая 15-суточная культура с разделенными перегородками ветвистыми гифами шириной 1-3 мкм, кругло-овальные гноевидные микроконидии размером 2-3 × 3-7 мкм.	20-суточная культура с разделенными перегородками разветвленными гифами шириной 1-3 мкм, микроконидии от булавовидных до круглых в маленьких открытых кластерах и вдоль гиф размером 2-3 × 3-6 мкм, макроконидии редкие, длинные и карандашевидные с 3-5 поперечными стенками, имеющие размер 4-7 × 15-50 мкм.
Патогенные характеристики	Штамм является слабовирулентным. Через 9-10 суток после нанесения дозы 500-600 тысяч клеток грибкового материала на см ² на пораненную кожу морских свинок образуются чешуйки. Спонтанное выздоровление через 18-20 суток.	Штамм является вирулентным. Через 9-10 суток после нанесения дозы 500-600 тысяч клеток грибкового материала на см ² на пораненную кожу морских свинок образуются тонкие некротические струпы. Спонтанное выздоровление через 25-30 суток.
Ответная реакция	Результат внутримышечной инъекции инактивированных корпускулярных антигенов из культур: нет наблюдаемых изменений в клиническом состоянии животных.	Результат внутримышечной инъекции инактивированных корпускулярных антигенов из культур: воспаление в точке инъекции, отек.
Иммуногенный ответ	Результаты иммунизации группы морских свинок инактивированным антигеном из культур (повторялась не менее, чем 5 раз): устанавливает иммунитет.	Результаты иммунизации группы морских свинок инактивированным антигеном из культур (повторялась не менее, чем 5 раз): устанавливает иммунитет.

Candida albicans, № DSM-9456.

Данный штамм депонировали в DSM 05.10.1994 г. под серийным № DSM-9456. Данный штамм получали направленным отбором на основе стабилизации культурально-морфологических характеристик и ослабления эпидемического штамма № 008-L, который был идентифицирован на человеке в 1990 г. Данный штамм был идентифицирован с использованием определителя Лоддера (Lodder, J.: The yeast: A Taxonomic Study. North-Holland Publ. Co., Amsterdam - London (1970)). Биологические свойства данного штамма описаны в табл. Д. Штамм № DSM-9456 отличается от эпидемического штамма по его более быстрому росту в питательной среде, стабильным биологическим свойствам, огромной продукции биомассы и меньшей вирулентности.

Таблица Д

Свойства и характеристики штаммов	Штамм № DSM-9456	Эпидемический штамм № 008-L
Описание культуры	10-суточная односпоровая колония на агаре Сабуро: кремовая, гладкая и пастообразная, блестящая, приподнятая, край колонии ровный, диаметр колонии – 20-30 мм.	10-суточная односпоровая колония на агаре Сабуро: кремовая, мягкая и гладкая с пушистыми ответвлениями на краях, диаметр колонии – 10-15 мм.
Морфологические характеристики	10-суточная культура со сферическими овальными бластоспорами размером 3,5-6 × 6-10 мкм, хламидоспоры шириной 12-15 мкм, псевдогифы шириной 5-8 мкм, гифы шириной 1,5-3 мкм.	10-суточная односпоровая культура на агаре Сабуро со сферическими овальными почкующимися бластоспорами размером 3-5 × 5-8 мкм, хламидоспорами диаметром 10-15 мкм, псевдогифами шириной 5-8 мкм, гифами шириной 1,5-3 мкм.
Патогенные характеристики	Штамм является слабовирулентным. Через 30 суток после внутрибрюшинной инъекции дозы 10-100 миллионов грибковых клеток белым мышам образуется гранулема в брюшных органах 50% животных. Летальный эффект не наблюдался.	Штамм является слабовирулентным. Через 30 суток после внутрибрюшинной инъекции дозы 10-100 миллионов грибковых клеток белым мышам образуется гранулема в брюшных органах 80% животных. Летальный эффект наблюдался у 50-70%.
Ответная реакция	Результат внутримышечной инъекции инактивированных корпускулярных антигенов из культур: нет наблюдаемых изменений в клиническом состоянии животных.	Результат внутримышечной инъекции инактивированных корпускулярных антигенов из культур: воспаление в точке инъекции, отек.
Иммуногенный ответ	Результаты иммунизации группы белых мышей инактивированным антигеном из культур (повторялась не менее, чем 10 раз): устанавливает иммунитет.	Результаты иммунизации группы белых мышей инактивированным антигеном из культур (повторялась не менее, чем 10 раз): устанавливает иммунитет.

Candida albicans, № DSM-9457.

Данный штамм депонировали в DSM 05.10.1994 г. под серийным № DSM-9457. Данный штамм получали направленным отбором на основе стабилизации культурально-морфологических характеристик и ослабления эпидемического штамма № 012, который был идентифицирован на человеке в 1992 г. Данный штамм был идентифицирован с использованием определителя Лоддера (Lodder, J.: The yeast: A Taxonomic Study. North-Holland Publ. Co., Amsterdam - London (1970). Биологические свойства данного штамма описаны в табл. Е. Штамм № DSM-9457 отличается от эпидемического штамма по его более быстрому росту в питательной среде, стабильным биологическим свойствам, огромной продукции биомассы и меньшей вирулентности.

Таблица Е

Свойства и характеристики штаммов	Штамм № DSM-9457	Эпидемический штамм № 012
Описание культуры	10-суточная односпоровая колония на агаре Сабуро: кремовая, шероховатая, приподнятая, край колонии лопастной, диаметр колонии – 20-23 мм.	10-суточная односпоровая колония на агаре Сабуро: кремовая, шероховатая, приподнятая, край колонии бахромчатый и лопастной, диаметр колонии – 15-20 мм.
Морфологические характеристики	10-суточная односпоровая культура со сферическими овальными бластоспорами размером 3,5-5 × 5-10 мкм, хламидоспоры шириной 12-15 мкм, псевдогифы шириной 4-7 мкм, гифы шириной 2-3 мкм.	10-суточная односпоровая культура на агаре Сабуро со сферическими овальными почкующимися бластоспорами размером 3-5 × 5-8 мкм, хламидоспоры диаметром 10-15 мкм, псевдогифы шириной 5-8 мкм, гифы шириной 1,5-3 мкм.
Патогенные характеристики	Штамм является слабовирулентным. Через 30 суток после внутрибрюшинной инъекции дозы 10-100 миллионов грибковых клеток белым мышам образуется гранулема в брюшных органах у 30% животных. Летальный эффект не наблюдался.	Штамм является слабовирулентным. Через 30 суток после внутрибрюшинной инъекции дозы 10-100 миллионов грибковых клеток белым мышам образуется гранулема в брюшных органах у 50% животных. Наблюдался летальный эффект не больше, чем 50%.
Ответная реакция	Результат внутримышечной инъекции инактивированных корпускулярных антигенов из культур: нет наблюдаемых изменений в клиническом состоянии животных.	Результат внутримышечной инъекции инактивированных корпускулярных антигенов из культур: нет наблюдаемых изменений в клиническом состоянии животных.
Иммуногенный ответ	Результаты иммунизации группы белых мышей инактивированным антигеном из культур (повторялась не менее, чем 10 раз): устанавливает иммунитет.	Результаты иммунизации группы белых мышей инактивированным антигеном из культур (повторялась не менее, чем 10 раз): устанавливает иммунитет.

Candida albicans, № DSM-9458.

Данный штамм депонировали в DSM 05.10.1994 г. под серийным № DSM-9458.

Данный штамм получали направленным отбором на основе стабилизации культурально-морфологических характеристик и ослабления эпидемического штамма № 047, который был идентифицирован на человеке в 1989 г. Данный штамм был идентифицирован с использованием определителя Лоддера (Lodder, J.: *The yeast: A Taxonomic Study*. North-Holland Publ. Co., Amsterdam - London (1970). Биологические свойства данного штамма описаны в табл. Ж. Штамм № DSM-9458 отличается от эпидемического штамма по его более быстрому росту в питательной среде, стабильным биологическим свойствам, огромной продукцией биомассы и меньшей вирулентности.

Таблица Ж

Свойства и характеристики штаммов	Штамм № DSM-9458	Эпидемический штамм № 047
Описание культуры	10-суточная односпоровая колония на агаре Сабуро: кремовая, гладкая и пастообразная, блестящая, приподнятая, край колонии ровный, диаметр колонии – 16-18 мм.	10-суточная односпоровая колония на агаре Сабуро: кремовая, мягкая и гладкая с пушистыми ответвлениями на краях, диаметр колонии – 10-15 мм.
Морфологические характеристики	10-суточная культура со сферическими овальными бластоспорами размером 3,6-6 × 6-11 мкм, хламидоспоры шириной 12-15 мкм, псевдогифы шириной 4-8 мкм, гифы шириной 1,5-3 мкм.	10-суточная односпоровая культура на агаре Сабуро со сферическими овальными почкующимися бластоспорами размером 3-5 × 5-8 мкм, хламидоспоры диаметром 10-15 мкм, псевдогифы шириной 5-8 мкм, гифы шириной 1,5-3 мкм.
Патогенные характеристики	Штамм является слабовирулентным. Через 30 суток после внутрибрюшинной инъекции дозы 10-100 миллионов грибковых клеток белым мышам образуется гранулема в брюшных органах 50-100% животных. Летальный эффект наблюдался у 50%.	Штамм является слабовирулентным. Через 30 суток после внутрибрюшинной инъекции дозы 10-100 миллионов грибковых клеток белым мышам образуется гранулема в брюшных органах 80-100% животных. Летальный эффект наблюдался у 70-100%.
Ответная реакция	Результат внутримышечной инъекции инактивированных корпускулярных антигенов из культур: нет наблюдаемых изменений в клиническом состоянии животных.	Результат внутримышечной инъекции инактивированных корпускулярных антигенов из культур: воспаление в точке инъекции, отек.
Иммуногенный ответ	Результаты иммунизации группы белых мышей инактивированным антигеном из культур (повторялась не менее, чем 10 раз): устанавливает иммунитет.	Результаты иммунизации группы белых мышей инактивированным антигеном из культур (повторялась не менее, чем 10 раз): устанавливает иммунитет.

Candida albicans, № DSM-9459.

Данный штамм депонировали в DSM 05.10.1994 г. под серийным № DSM-9459. Данный штамм получали направленным отбором на основе стабилизации культурально-морфологических характеристик и ослабления эпидемического штамма № 158, который был идентифицирован на человеке в 1990 г. Данный штамм был идентифицирован с использованием определителя Лоддера (Lodder, J.: The yeast: A Taxonomic Study. North-Holland Publ. Co., Amsterdam - London (1970). Биологические свойства данного штамма описаны в табл. 3. Штамм № DSM-9459 отличается от эпидемического штамма по его более быстрому росту в питательной среде, стабильным биологическим свойствам, огромной продукции биомассы и меньшей вирулентности.

Таблица 3

Свойства и характеристики штаммов	Штамм № DSM-9459	Эпидемический штамм № 158
Описание культуры	10-суточная односпоровая колония на агаре Сабуро: кремовая, гладкая, пастообразная, блестящая, приподнятая, край колонии ровный, диаметр колонии – 16-18 мм.	10-суточная односпоровая колония на агаре Сабуро: кремовая, гладкая, пастообразная, край колонии лопастной и с пушистыми ответвлениями на краях, диаметр колонии – 10-15 мм.
Морфологические характеристики	10-суточная культура со сферическими овальными	10-суточная односпоровая культура на агаре Сабуро со сферическими
	бластоспорами размером 3,6-6 × 6-11 мкм, хламидоспоры шириной 12-15 мкм, псевдогифы шириной 4-8 мкм, гифы шириной 1,5-3 мкм.	овальными почкующимися бластоспорами размером 3-5 × 5-8 мкм, хламидоспоры диаметром 10-15 мкм, псевдогифы шириной 5-8 мкм, гифы шириной 1,5-3 мкм.
Патогенные характеристики	Штамм является слабовирулентным. Через 30 суток после внутрибрюшинной инъекции дозы 10-100 миллионов грибковых клеток белым мышам образуется гранулема в брюшных органах 40% животных. Летальный эффект не наблюдался.	Штамм является слабовирулентным. Через 30 суток после внутрибрюшинной инъекции дозы 10-100 миллионов грибковых клеток белым мышам образуется гранулема в брюшных органах 50% животных. Наблюдался летальный эффект у 20-50%.
Ответная реакция	Результат внутримышечной инъекции инактивированных корпускулярных антигенов из культур: нет наблюдаемых изменений в клиническом состоянии животных.	Результат внутримышечной инъекции инактивированных корпускулярных антигенов из культур: воспаление в точке инъекции, отек.
Иммуногенный ответ	Результаты иммунизации группы белых мышей инактивированным антигеном из культур (повторялась не менее, чем 10 раз): устанавливает иммунитет.	Результаты иммунизации группы белых мышей инактивированным антигеном из культур (повторялась не менее, чем 10 раз): устанавливает иммунитет.

Таблица И

Свойства и характеристики штамма	Штамм № VKPGF-930/1032	Эпизоотический штамм № 1032
Описание культуры	Зрелая 10-15 суточная колония в агаре/сусле: кремовая, бархатистая/порошковидная, белая, плоская, узкая, растущий край, под плоская со слабым плоским поднятием в поверхность красновато-коричневая, центре, узкий растущий край, бахромчатая, диаметр колонии 15-20 мм. под поверхностью светло-коричневая, диаметр колонии 25-30 мм.	Зрелая 25-30-суточная колония в агаре/сусле: бархатистая/порошковидная, белая, плоская, узкая, растущий край, под плоская со слабым плоским поднятием в поверхность красновато-коричневая, центре, узкий растущий край, бахромчатая, диаметр колонии 15-20 мм. под поверхностью светло-коричневая, диаметр колонии 25-30 мм.
Морфологические характеристики	Разделенные перегородками ветвистые гифы шириной 1-3 мкм, многочисленные прямые и спиральные гифы шириной 1-3 мкм, овальные микроконидии мкм, круглые, уплощенные гноевидные размером от 1 до 3 × от 2 до 6 мкм, нет микроконидии размером от 1 до 3 × от 2 до 6 мкм, мало удлинено-овальных макроконидий.	Разделенные перегородками ветвистые гифы шириной 1-3 мкм, многочисленные прямые и спиральные гифы шириной 1-3 мкм, овальные микроконидии мкм, круглые, уплощенные гноевидные размером от 1 до 3 × от 2 до 6 мкм, нет микроконидии размером от 1 до 3 × от 2 до 6 мкм, мало удлинено-овальных макроконидий с 2-5 перегородками, размером от 2 до 6 × от 15 до 25 мкм.
Патогенные характеристики	Некротические струнья.	Густые, асбестовидные струнья.
От 9 до 10 суток после нанесения дозы 500-600 тысяч клеток грибкового материала на см ² на пораненную кожу кролика.	22-25 суток	30-35 суток
Спонтанное выздоровление через	Нет наблюдаемых изменений в клиническом состоянии	Воспаление в точке инъекции, отек
Ответная реакция		

Результаты подкожной и внутримышечной инъекции инактивированных корпускулярных антигенов из культур		
Антигенный ответ		
От 20 до 25 суток после инъецирования кроликам корпускулярных антигенов, титры антител, наблюдаемые в сыворотке крови		
Определенные РНР	от 1:320 до 1:640	от 1:320 до 1:640
Определенные ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ)	от 1:400 до 1:1600	от 1:400 до 1:1600
Иммуногенный ответ	Устанавливает иммунитет	Устанавливает иммунитет
Иммунизация группы кроликов инактивированными антигенами из культур (повторяющаяся по меньшей мере 5 раз)		

Trichophyton mentagrophytes № VKPGF-930/1032, № DSM-7279.

Штамм *Trichophyton mentagrophytes* DSM-7279 был депонирован согласно Будапештскому соглашению в "Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen" (DSM), Mascheroder Weg 1B, W-38124 Брауншвейг, Германия (современное название и адрес которой - "Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH" (DMSZ), Inhoffenstraße 7B, 38124 Брауншвейг, ГЕРМАНИЯ) 1 октября 1992 Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, 6507 Ingelheim am Rhein (текущий адрес которой Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, 55216 Ingelheim am Rhein). Текущими депозиторами указанного штамма являются заявители, а именно Др. Игорь Поляков и доктор наук Людмила Иванова, Eberhardtstr. 40, 89073 Ulm.

Trichophyton verrucosum, № DSM-28406.

Штамм *Trichophyton verrucosum* BINO 348 был депонирован Binomed GmbH (Einsteinstraße 59, 89077 Ulm) согласно Будапештскому соглашению в Leibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstraße 7B, 38124 Брауншвейг, Германия под серийным № DSM-28406 12 февраля 2014 г. Депозитор разрешил заявителям давать ссылку на депонированный биологический материал в заявке и дал его неограниченное и не подлежащее отзыву согласие на то, чтобы депонированный материал был сделан доступным для публики согласно правилу 31 ЕРС (Европейское соглашение по патентам). Данный штамм был получен направленным отбором на основе продукции спор и ослабления эпизоотического штамма № 348, который был выделен из крупного рогатого скота в 1997 г. Данный штамм был идентифицирован с использованием определителя Rebell-Taplin (Rebell, G., Taplin, D.: *Dermatophytes, their recognition and identification*, 1978) и согласно Kashkin, P.N. et.al. (Определитель патогенных, токсических, вредных для человека грибов, 1979). Биологические свойства данного штамма описаны в табл. Й. Штамм BINO 348-DSM 28406 отличается от эпизоотического штамма по его более быстрому росту в питательной среде, огромной продукции микроконидий, меньшей вирулентности и отсутствию любых вредных реакций после внутримышечного применения антигенов.

Таблица Й

Свойства и характеристики штаммов	Штамм № DSM-28406	Эпидемический штамм № 348
Описание культуры	20-суточная колония на агаре с экстрактом солода: белая или светло-желтая, бархатистая, бороздчатая, диаметр колонии – 15-20 мм.	25-30-суточная колония на агаре с экстрактом солода: светло-желтая, кремовая, бархатистая, складчатая, бесцветная под поверхностью, диаметр колонии – 10-12 мм.
Морфологические характеристики	Зрелая 20-суточная культура с многочисленными овальными, гноевидными микроконидиями размером 1,5-3 × 3-5 мкм.	Зрелая 25-30-суточная культура с разделенным перегородками ветвистым мицелием, мало овальных, гноевидных микроконидий размером от 1 до 3 мкм × от 3 до 6 мкм, макроконидии с 2-6 перегородками, мало артроспор и хламидоспор 9-11 мкм.
Патогенные характеристики	Штамм является слабовирулентным. Через 9-10 суток после нанесения дозы 500-600 тысяч клеток грибкового материала на см ² на пораненную кожу морских свинок образуются чешуйки. Спонтанное выздоровление через 15-20 суток.	Штамм является вирулентным. Через 9-10 суток после нанесения дозы 500-600 тысяч клеток грибкового материала на см ² на пораненную кожу морских свинок образуются тонкие некротические струпы. Спонтанное выздоровление через 25-30 суток.
Ответная реакция	Результат внутримышечной инъекции инактивированных корпускулярных антигенов из культур: нет наблюдаемых изменений в клиническом состоянии животных.	Результат внутримышечной инъекции инактивированных корпускулярных антигенов из культур: воспаление в точке инъекции, отек.
Иммуногенный ответ	Результаты иммунизации группы морских свинок инактивированным антигеном из культур (повторялась не менее, чем 5 раз): устанавливает иммунитет против дерматофитоза, вызванного <i>T. verrucosum</i> .	Результаты иммунизации группы морских свинок инактивированным антигеном из культур (повторялась не менее, чем 5 раз): устанавливает иммунитет против дерматофитоза, вызванного <i>T. verrucosum</i> .

Chrisporium tropicum, № DSM-28405.

Штамм *Chrisporium tropicum* BINO 122 был депонирован Binomed GmbH (Einsteinstraße 59, 89077 Ulm) согласно Будапештскому соглашению в Leibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstraße 7B, 38124 Брауншвейг, Германия, под серийным № DSM-28405 12 февраля 2014 г. Депозитор разрешил заявителям давать ссылку на депонированный биологический материал в заявке и дал его неограниченное и не подлежащее отзыву согласие на то, чтобы депонированный материал был сделан доступным для публики согласно правилу 31 ЕРС. Данный штамм был получен направленным отбором на основе продукции спор полевого штамма № 122, который был выделен из почвы в 1993 г. Данный штамм был идентифицирован с использованием определителя Rebell-Taplin (Rebell, G., Taplin, D.: *Dermatophytes, their recognition and identification*, 1978) и согласно Carmichael, J.N. *Chrysosporium and some other aleuriosporic hyphomycetes*. - *Can. J. Bot.* 1962, 40, 1137-1173. Биологические свойства данного штамма описаны в табл. К. Штамм BINO 122-DSM 28405 отличается от полевого штамма по его более быстрому росту в питательной среде, огромной продукции конидий, слабой вирулентности и продукции ферментов.

Таблица К

Свойства и характеристики штаммов	Штамм № DSM-28405	Полевой штамм № 122
Описание культуры	15-суточная колония на агаре с экстрактом солода является белой, войлочной, порошковидной, диаметр колонии – 60-70 мм. Хороший рост при 26°C, а также при 37°C.	15-суточная колония на агаре с экстрактом солода является белой, войлочной, порошковидной, диаметр колонии – 55-65 мм. Хороший рост при 26°C и 37°C.
Морфологические характеристики	Зрелая 15-суточная культура с многочисленными концевыми и боковыми конидиями – сидячими или на коротких выступах, или на боковых ветвях, гладкостенными, булавовидными или обратнойцевидными, 3-6 × 6-9 мкм.	Зрелая 15-суточная культура с концевыми и боковыми конидиями – сидячими или на коротких выступах, или на боковых ветвях, гладкостенными, булавовидными или обратнойцевидными, 3-6 × 6-9 мкм.
Патогенные характеристики	Штамм является слабовирулентным. Через 9-10 суток после нанесения дозы 500-600 тысяч клеток грибкового материала на см ² на пораненную кожу морских свинок формируются гиперемия и чешуйки. Спонтанное выздоровление через 13-15 суток.	Штамм является слабовирулентным. Через 9-10 суток после нанесения дозы 500-600 тысяч клеток грибкового материала на см ² на пораненную кожу морских свинок формируются гиперемия и чешуйки. Спонтанное выздоровление через 13-15 суток.
Ответная реакция	Результат нанесения на кожу фильтрата культуры: быстрая регенерация эпителия.	Результат нанесения на кожу фильтрата культуры: регенерация эпителия.
Биологические свойства	- ферментативная активность; - иммуногенная активность против дерматофитоза; - иммунокоррекция при аллергии; - усиленная регенерация кожи.	- ферментативная активность; - иммуногенная активность против дерматофитоза; - иммунокоррекция при аллергии; - регенерация кожи.

Microsporum canis BINO 483.

Штамм *Microsporum canis* BINO 483 был депонирован Binomed GmbH (Einsteinstraße 59, 89077 Ulm) согласно Будапештскому соглашению в Leibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstraße 7B, 38124 Брауншвейг, Германия под серийным № DSM-32271 25 февраля 2016 г. Депозитор разрешил заявителям давать ссылку на депонированный биологический материал в заявке и дал его неограниченное и не подлежащее отзыву согласие на то, чтобы депонированный материал был сделан доступным для публики согласно правилу 31 ЕРС. Данный штамм был получен направленным отбором на основе продукции спор и ослабления эпизоотического штамма № 483, который был выделен из кошки в 1990 г. Данный штамм был идентифицирован с использованием определителя Rebell-Taplin (Rebell, G., Taplin, D.: Dermatophytes, their recognition and identification, 1978) и согласно Kashkin, P.N. et.al. (Определитель патогенных, токсических, вредных для человека грибов, 1979). Биологические свойства данного штамма описаны в табл. Л. Штамм вакцины 483 отличается от эпизоотического штамма по его более быстрому росту в питательной среде, огромной продукции микроконидий, меньшей вирулентности и отсутствию каких-либо вредных реакций после внутримышечного применения антигенов.

Таблица Л

Свойства и характеристики штаммов	Штамм вакцины № ВІНО 483	Эпидемический штамм № 483
Описание культуры	10-15-суточная колония на агаре с экстрактом солода: белая, пушистая, выгнутая, узкий растущий край, паутиновидная, под поверхностью желтоватая, диаметр колонии – 35-40 мм.	15-суточная колония на агаре с экстрактом солода: серовато-бежевая, паутиновидная, порошковидная в центре, растущий край бахромчатый, под поверхностью коричневая, диаметр колонии – 25-30 мм.
Морфологические характеристики	Зрелая 15-суточная культура с разделенными перегородками разветвленными гифами шириной от 1 до 4 мкм, многочисленными овальными, гноевидными, цилиндрическими микроконидиями размером от 1 мкм до 3 мкм × от 3 мкм до 7 мкм, мало веретеновидных макроконидий с 3-10 перегородками, размером от 10 мкм до 20 мкм × от 40 мкм до 70 мкм.	Зрелая 15-суточная культура с разветвленными гифами шириной от 2 до 6 мкм, мало гноевидных, цилиндрических микроконидий размером от 1 мкм до 3 мкм × от 3 мкм до 7 мкм, многочисленные веретеновидные макроконидий с 3-11 перегородками, размером от 10 мкм до 20 мкм × от 45 мкм до 85 мкм.
Патогенные характеристики	Штамм является слабовирулентным. Через 9-11 суток после нанесения дозы 500-600 тысяч клеток грибкового материала на см ² на пораненную кожу кролика: образуются некротические струпья. Спонтанное выздоровление через 15-25 суток.	Штамм является вирулентным. Через 9-11 суток после нанесения дозы 500-600 тысяч клеток грибкового материала на см ² на пораненную кожу кролика: образуются плотные асбестоподобные струпья. Спонтанное выздоровление через 25-38 суток.
Ответная реакция	Результат внутримышечной инъекции инактивированных	Результат внутримышечной инъекции инактивированных
	корпускулярных антигенов из культур: нет наблюдаемых изменений в клиническом состоянии животных.	корпускулярных антигенов из культур: отек и воспаление в точке инъекции.
Иммуногенный ответ	Результаты иммунизации группы кроликов (5 животных в группе) живым или инактивированным антигеном из культур: устанавливает иммунитет против дерматофитоза, вызванного <i>Microsporum canis</i> .	Результаты иммунизации группы кроликов (5 животных в группе) живым или инактивированным антигеном из культур: устанавливает иммунитет против дерматофитоза, вызванного <i>Microsporum canis</i> .

В предпочтительном воплощении композиция по настоящему изобретению содержит гомогенизированные инактивированные микроконидии дерматофита одного типа микроконидий или смесь микроконидий из двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти или десяти перечисленных выше штаммов дерматофитов. В другом предпочтительном воплощении композиция содержит смесь гомогенизированных инактивированных микроконидий дерматофитов из одного, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти или десяти из перечисленных выше дерматофитов и гомогенизированные, инактивированные дрожжевые бластоспоры из одного, двух, трех или четырех из перечисленных выше дрожжей. В другом предпочтительном воплощении композиция содержит гомогенизированные инактивированные микроконидии дерматофитов из одного или смеси двух, трех или четырех из перечисленных

выше дрожжей. Данные композиции могут дополнительно содержать антигенный материал микроконидий дерматофитов и/или антигенный материал дрожжевых бластоспор.

В другом предпочтительном воплощении композиция содержит антигенный материал микроконидий одного дерматофита или смесь антигенного материала микроконидий дерматофитов из двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти или десяти из перечисленных выше штаммов дерматофитов. В другом предпочтительном воплощении композиция содержит смесь антигенного материала микроконидий дерматофитов из одного, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти или десяти из перечисленных выше дерматофитов и антигенный материал дрожжевых бластоспор из одного, двух, трех или четырех из перечисленных выше дрожжей. В другом предпочтительном воплощении композиция содержит антигенный материал дрожжевых бластоспор одного или смеси из двух, трех или четырех из перечисленных выше дрожжей.

Данные композиции могут дополнительно содержать гомогенизированные инактивированные микроконидии дерматофитов из одного, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти или десяти из перечисленных выше дерматофитов и/или гомогенизированные инактивированные дрожжевые бластоспоры из одного, двух, трех или четырех из перечисленных выше дрожжей.

В предпочтительном воплощении композиция для применения по настоящему изобретению содержит смесь гомогенизированных инактивированных микроконидий дерматофитов *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton verrucosum*, *Trichophyton equinum*, *Trichophyton sarkisovii*, *Microsporum canis*, *Microsporum canis* var. *obesum*, *Microsporum canis* var. *distortum* и *Microsporum gypseum*. Например, вакцина Поливак-ТМ (изготовитель: ООО "Ветбиохим", Москва; дистрибьютор: ООО "Простор", Москва) соответствует данному воплощению и может содержаться в композиции по настоящему изобретению. Поливак-ТМ представляет собой вакцину, разработанную для животных, таких как кошки, собаки, лошади и другие.

В другом предпочтительном воплощении композиция по настоящему изобретению содержит смесь гомогенизированных инактивированных микроконидий дерматофитов *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton verrucosum* и *Trichophyton sarkisovii*. Например, вакцина Поливак-Т (изготовитель: ООО "Ветбиохим", Москва; дистрибьютор: ООО "Простор", Москва) соответствует данному воплощению и может содержаться в композиции по настоящему изобретению. Поливак-Т представляет собой вакцину, специально разработанную для крупного рогатого скота.

Если композиция по настоящему изобретению содержит микроконидии дерматофитов из только одного штамма или дрожжевые бластоспоры из только одного штамма, указанные микроконидии дерматофитов или дрожжевые бластоспоры могут быть получены следующим образом:

(i) выращивание дерматофита и дрожжей соответственно на подходящей твердой среде, сбор и гомогенизация дерматофита и

(ii) инактивирование гомогената, полученного на стадии (i).

Если композиция по настоящему изобретению содержит смесь микроконидий дерматофитов и/или дрожжевых бластоспор, указанная смесь может быть получена следующим образом:

(i) выращивание одного штамма дерматофита и двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти или десяти отличных штаммов дерматофитов соответственно, отдельно на подходящей твердой среде, сбор каждой культуры и отдельная гомогенизация каждой культуры, и

(ii) возможно, выращивание одного штамма дрожжей и двух, трех или четырех отличных штаммов дрожжей соответственно, отдельно на подходящей твердой среде, сбор каждой культуры и отдельная гомогенизация каждой культуры, и

(iii) объединение и инактивирование гомогенатов, полученных на стадии (i), и, возможно, полученных на стадии (ii).

Выращивание дерматофитов по описанным выше способам получения предпочтительно осуществляется на агаре и сусле в культуральных колбах. Предпочтительно культивирование проводят в течение от примерно 15 до примерно 30 суток. Предпочтительно культивирование проводят при температуре от примерно 26 до примерно 28°C. Выращивание дрожжей по описанному выше способу получения предпочтительно осуществляют на агаре с экстрактом солода или на агаре Сабуро в культуральных колбах. Предпочтительно культивирование проводят в течение от примерно 4 до примерно 7 суток. Предпочтительно культивирование проводят при температуре от примерно 28 до примерно 37°C.

После культивирования дерматофиты и дрожжи соответственно гомогенизируют с получением тонкой суспензии. Предпочтительно гомогенизацию осуществляют в деионизированной воде, в водном растворе, содержащем от примерно 0,1 до 0,3% ферментированного гидролизованного мышечного белка или примерно от 0,1 до 1% соевого или свиного пептона в комбинации с примерно от 5 до 6% глюкозы и примерно от 0,1 до 1% дрожжевого экстракта, или в водном растворе, содержащем 0,1-0,9% (мас./об.) модифицированного хитозана согласно настоящему изобретению.

Подходящие объемы для гомогенизации составляют от примерно 100 до 500 мл. Предпочтительно концентрацию микроконидий и бластоспор соответственно доводят до от примерно 30 до примерно 90 млн микроконидий и бластоспор соответственно на 1 мл или до от примерно 250 до примерно 500 тысяч, более предпочтительно от примерно 250 до примерно 400 тысяч микроконидий и бластоспор соответст-

венно на 1 мл. Затем суспензия, возможно, может быть дополнительно доведена до примерно 40, 50 или 60 млн микроконидий и бластоспор соответственно на 1 мл или до от примерно 250 до примерно 500 тысяч, более предпочтительно до от примерно 250 до примерно 400 тысяч микроконидий и бластоспор соответственно на 1 мл дистиллированной водой, физиологическим солевым раствором, например раствором хлорида натрия или другим подходящим раствором. В случае приготовления смеси одиночные суспензии предпочтительно доводят до того же самого количества микроконидий и бластоспор соответственно на 1 мл, и равные объемы каждой культуры в суспензии смешивают в одной контейнере.

Инактивацию предпочтительно проводят посредством применения тиомерсала, формальдегида и/или 2-пропиолактона. Агенты для инактивации можно добавлять непосредственно в клеточную суспензию. Предпочтительной является инактивация посредством добавления тиомерсала при отношении от примерно 1:11000 до примерно 1:2500 (мас./об.). Также предпочтительной является инактивация посредством добавления формальдегида с достижением конечной концентрации от примерно 0,2% до примерно 0,4% (об./об.). Затем смесь предпочтительно инкубируют. Инкубация может осуществляться в течение от примерно 1 до 30 суток при температуре от примерно 20 до примерно 37°C. Предпочтительно инкубация осуществляется в течение примерно от 1 до 3 суток при комнатной температуре, в течение примерно 5-7 суток при 37°C, в течение примерно 30 суток при комнатной температуре или в течение примерно 30 суток при примерно от 26 до 28°C.

В предпочтительном воплощении микроконидии композиций по настоящему изобретению находятся в набухом состоянии и/или имеют зародышевые трубки. Более предпочтительно по меньшей мере 50% бластоспор и/или микроконидий находятся в набухом состоянии и/или имеют зародышевые трубки. Набухшее состояние и/или зародышевые трубки дерматофитов могут быть получены, например, посредством второй стадии инкубации. Указанную вторую стадию инкубации предпочтительно проводят после гомогенизации и до инактивации, как описано выше. Для проведения второй стадии культивирования суспензию микроконидий помещают в отдельный сосуд, содержащий такую же среду, что и во время первой стадии инкубирования. Вторую стадию культивирования предпочтительно проводят в течение от примерно 10 до примерно 48 ч. Вторую стадию культивирования предпочтительно проводят при температуре примерно 28°C. Предпочтительно вторую стадию культивирования продолжают, пока по меньшей мере 50% микроконидий не продемонстрируют набухшего или прорастающего состояния, и не более чем примерно от 7 до 10% клеток не продемонстрируют второй мицелиальной ветви. Диаметр набухших и прорастающих микроконидий увеличивается примерно в 1,2 или более по сравнению с обычными микроконидиями.

Антигенный материал дрожжевых бластоспор и/или микроконидий дерматофитов предпочтительно содержит полисахариды и/или гликопептиды, выделенные из кератинофильных грибов или дрожжей. Предпочтительно указанный антигенный материал может быть нерастворимым антигенным материалом (ANMP), растворимым антигенным материалом (ASMP) или экзогенным антигенным материалом (AEMP). Кератинофильные грибы предпочтительно принадлежат к видам *Trichophyton* или *Microsporum*, более предпочтительно *Trichophyton verrucosum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton equinum*, *Trichophyton sarkisovii*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum gypseum*, *Microsporum canis* и *Chrisporium tropicum*, и кератинофильные дрожжи предпочтительно принадлежат к видам *Candida*, более предпочтительно *Candida albicans*. Особенно предпочтительным является антигенный материал, имеющий происхождение из *Trichophyton mentagrophytes* DSM-7279, *Trichophyton verrucosum* DSM-28406, *Trichophyton rubrum* DSM-9469, *Trichophyton rubrum* DSM-9470, *Trichophyton rubrum* DSM-9471, *Trichophyton rubrum* DSM-9472, *Chrisporium tropicum* DSM-28405, *Candida albicans* DSM-9456, *Candida albicans* DSM-9457, *Candida albicans* DSM-9458 и *Candida albicans* DSM-9459. Данный антигенный материал может быть получен, например, способом, раскрытым в WO 97/07232.

В общем, для получения ANMP грибковые клетки, принадлежащие к группе кератинофильных грибов или дрожжей, обрабатывают при водных щелочных условиях, твердую и жидкую фазы препарата разделяют, и после разделения твердую фазу обрабатывают минеральной или органической кислотой. Обработка при водных щелочных условиях предпочтительно проводится примерно от 0,1 до 5%-ной (мас./об.) KOH или NaOH при примерно от 20 до 150°C в течение вплоть до 30 ч. Твердую фазу предпочтительно обрабатывают 0,2-1,5 М органической кислотой или 0,05-1 М минеральной кислотой и промывают водным раствором. Более конкретно, кератинофильные грибы или дрожжи предпочтительно культивируют на чашках с агаром. Одной предпочтительной средой является, например, агар с экстрактом солода от Oxoid. Также можно использовать другие среды, которые будут обеспечивать рост кератинофильных грибов или дрожжей. Образующуюся грибковую биомассу отрывали и обрабатывали водным раствором щелочи. Затем твердую и жидкую фазы препарата разделяют, например, центрифугированием, фильтрованием или осаждением. Предпочтительно разделение осуществляется центрифугированием, например, при 3500 g, что обеспечивает хорошее отделение обломков грибковых клеток. И обработку при водных щелочных условиях, и стадию разделения можно проводить несколько раз. После щелочной обработки образующийся супернатант обрабатывают при водных кислотных условиях, как описано выше. Например, можно использовать HCl или уксусную кислоту.

Обработка кислотой предпочтительно проводится в течение от примерно 0,5 до примерно 3 ч. Тем-

пература предпочтительно находится в интервале от примерно 70 до примерно 100°C. Водным раствором для промывки предпочтительно является дистиллированная вода. Преимущественно промывку повторяют примерно пять раз. Наконец, твердую фазу отрывают и гомогенизируют в воде для инъекции или в водном растворе 0,1-0,9%-ного модифицированного хитозана, варианта хитозана или производного хитозана согласно настоящему изобретению. Гомогенизация предпочтительно проводится в объеме от примерно 100 до примерно 500 мл. Концентрацию частиц затем предпочтительно доводят до примерно от 30 до 90 млн частиц на 1 мл. Наконец, препарат, содержащий антигенный материал, можно лиофилизировать и хранить при сухих условиях.

ASMP обычно можно получать следующим образом: грибковые клетки кератинофильных грибов или дрожжей обрабатывают при водных щелочных условиях, твердую и жидкую фазы препарата разделяют, после разделения супернатант обрабатывают минеральной или органической кислотой, и после разделения ASMP осаждается из супернатанта. Более конкретно, кератинофильные грибки или дрожжи культивируют на чашках с агаром, например, как описано в EP 0564620. Одной предпочтительной средой является, например, агар с экстрактом солода от Oxoid. Также можно использовать другие среды, которые будут обеспечивать рост кератинофильных грибов или дрожжей. Образующуюся грибковую биомассу отрывают и обрабатывали водным раствором щелочи. Предпочтительными водными щелочными растворами являются NaOH или KOH в предпочтительных концентрациях 0,1-5% (мас./об.). Щелочную обработку предпочтительно проводят при примерно 20-150°C в течение вплоть до 30 ч. После обработки при водных щелочных условиях твердую и жидкую фазы препарата разделяют, например, центрифугированием, фильтрованием или осаждением. Предпочтительно разделение достигается центрифугированием, что обеспечивает хорошее отделение обломков грибковых клеток, например, при силах примерно 3500 g. Обработку при водных щелочных условиях, а также стадию разделения можно повторять несколько раз. После щелочной обработки и разделения образующийся супернатант обрабатывают при кислотных водных условиях, например 0,2-1,5 М органической кислотой или 0,05-1 М минеральной кислотой. Например, можно использовать HCl или уксусную кислоту, предпочтительно при значениях pH примерно от pH 2,5 до pH 4,5. Предпочтительно обработку при водных кислотных условиях осуществляют в течение примерно от 2 до 4 ч при температурах примерно от 4 до 8°C, где затем происходит разделение твердого и жидкого слоев. Обработку при водных кислотных условиях, а также стадию разделения можно повторять несколько раз, предпочтительно при указанных выше условиях. Затем супернатант от стадии разделения подвергали стадии осаждения. Предпочтительно осаждение проводили добавлением подходящего органического растворителя, например спирта, такого как низший спирт, например метанол или этанол. Отношение один объем супернатанта к 2-5 объемам спирта будет приводить к хорошему осаждению антигенного материала. Также можно использовать другие методики неспиртового осаждения, известные специалисту в данной области, например осаждение сульфатом аммония или другими солями. Твердую фазу затем подвергают стадии дополнительного разделения, предпочтительно при описанных выше условиях. Образующуюся твердую фазу выделяют и, если желательно, растворяют в водном растворе, предпочтительно в дистиллированной воде, типично в объеме примерно от 25 до 100 мл. Наконец, препарат ASMP можно лиофилизировать и хранить в течение длительных периодов времени при сухих условиях.

АЕМР обычно можно получать следующим образом: грибковые клетки кератинофильных грибов или дрожжей культивируют в жидкой среде, твердую фазу и жидкие фазы препарата разделяют, и после разделения АЕМР осаждается из супернатанта. Более конкретно кератинофильные грибки или дрожжи можно инкубировать в водном растворе или культивировать в жидкой среде. Также кератинофильные грибки можно инкубировать в водном растворе с кератином. Культивирование может осуществляться в течение вплоть до примерно 240-250 ч. Объем раствора или культуры здесь определяется как первичный объем (PV). Можно использовать дистиллированную воду, а также среды, описанные в EP 0564620. После инкубирования или культивирования грибковые клетки разделяют, например, центрифугированием, фильтрованием или осаждением, предпочтительно центрифугированием, при описанных выше условиях. Возможно образующийся супернатант затем лиофилизуют и потом растворяют в водном растворе, предпочтительно в воде. Предпочтительно объем воды составляет примерно от 0,1 до 0,2 объемов от первичного объема (PV). Образующийся раствор или образующийся супернатант, полученные после разделения, затем подвергают стадии осаждения. Предпочтительно осаждение проводят посредством добавления подходящего органического растворителя, например спирта, такого как низший спирт, например метанола или этанола. Отношение одного объема супернатанта к примерно 1-5 объемам спирта будет приводить к хорошему осаждению антигенного материала. Также можно использовать другие методики неспиртового осаждения, известные специалисту в данной области, например осаждение сульфатом аммония или другими солями. Образующийся осадок выделяют и, если желательно, растворяют в водном растворе, предпочтительно в дистиллированной воде. Предпочтительно примерно от 0,5 до 50 мг осадка растворяют в 1 мл водного растворителя. Наконец, раствор АЕМР можно лиофилизировать и хранить в течение длительных периодов времени при сухих условиях, предпочтительно при примерно 2-10°C.

В особенно предпочтительном воплощении композиция по настоящему изобретению, помимо мо-

дифицированного хитозана или гидроколлоида по настоящему изобретению, содержит инактивированные микроконидии дерматофита *Trichophyton mentagrophytes*, в частности *Trichophyton mentagrophytes* DSM-7279.

В другом особенно предпочтительном воплощении композиция по настоящему изобретению, помимо модифицированного хитозана или гидроколлоида по настоящему изобретению, содержит инактивированные микроконидии дерматофита *Trichophyton verrucosum*, в частности, *Trichophyton verrucosum* DSM-28406.

В другом особенно предпочтительном воплощении композиция по настоящему изобретению, помимо модифицированного хитозана или гидроколлоида по настоящему изобретению, содержит инактивированные дрожжевые бластоспоры *Candida albicans*, в частности *Candida albicans* DSM-9456.

В другом особенно предпочтительном воплощении композиция по настоящему изобретению, помимо модифицированного хитозана или гидроколлоида по настоящему изобретению, содержит ASMP *Candida albicans*, в частности *Candida albicans* DSM-9456.

В другом особенно предпочтительном воплощении композиция по настоящему изобретению, помимо модифицированного хитозана или гидроколлоида по настоящему изобретению, содержит ANMP *Candida albicans*, в частности *Candida albicans* DSM-9456.

В другом особенно предпочтительном воплощении композиция по настоящему изобретению, помимо модифицированного хитозана или гидроколлоида по настоящему изобретению, содержит смесь гомогенизированных инактивированных микроконидий дерматофита *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton verrucosum*, *Trichophyton equinum*, *Trichophyton sarkisovii*, *Microsporium canis*, *Microsporium canis* var. *obesum*, *Microsporium canis* var. *distortum* и *Microsporium gypseum* и возможно ASMP *Candida albicans*, в частности *Candida albicans* DSM-9456. Более предпочтительно композиция по настоящему изобретению содержит вакцину Поливак-ТМ и возможно ASMP *Candida albicans*, в частности *Candida albicans* DSM-9456.

В другом особенно предпочтительном воплощении композиция по настоящему изобретению, помимо модифицированного хитозана или гидроколлоида по настоящему изобретению, содержит АЕМР *Chrisporium tropicum*, в частности *Chrisporium tropicum* DSM-28405, или *Microsporium canis* BINO 483.

Концентрация инактивированных микроконидий дерматофитов и/или дрожжевых бластоспор в композиции по настоящему изобретению предпочтительно составляет от примерно 30 до примерно 90, более предпочтительно от примерно 45 до примерно 80 млн микроконидий и бластоспор соответственно на 1 мл или от примерно 250 до примерно 500 тысяч, более предпочтительно от примерно 250 до примерно 300 тысяч микроконидий и бластоспор соответственно на 1 мл. Концентрация ASMP в композиции по настоящему изобретению предпочтительно составляет от примерно 50 до примерно 500 мкг/мл, более предпочтительно от примерно 100 до примерно 400 мкг/мл. Концентрация ANMP в композиции по настоящему изобретению предпочтительно составляет от примерно 30 до примерно 90, более предпочтительно от примерно 40 до примерно 80 млн на 1 мл. Концентрация Поливак-ТМ в композиции по настоящему изобретению предпочтительно составляет от примерно 40 млн на 1 мл до примерно 50 млн на 1 мл, более предпочтительно от примерно 40 до примерно 45 млн на 1 мл. Концентрация АЕМР в композиции по настоящему изобретению предпочтительно составляет от 0,5 до примерно 2 U/мл, более предпочтительно от примерно 1 до примерно 1,2 U/мл.

Композиция по настоящему изобретению предпочтительно представляет собой фармацевтическую композицию, которая содержит фармацевтически приемлемый разбавитель, эксципиент и/или носитель. Таким образом, настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей модифицированный хитозан или гидроколлоид согласно настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый разбавитель, эксципиент и/или носитель.

Концентрация модифицированного хитозана или гидроколлоида в композициях или фармацевтических композициях по настоящему изобретению предпочтительно составляет от примерно 0,1% до примерно 2,0% (мас./об.), более предпочтительно от примерно 0,1 до примерно 1,4% (мас./об.), более предпочтительно от примерно 0,1 до примерно 1% (мас./об.), более предпочтительно от примерно 0,1 до примерно 0,5% (мас./об.), более предпочтительно от примерно 0,1 до примерно 0,3% (мас./об.).

Другим аспектом настоящего изобретения является соединение, модифицированный хитозан, гидроколлоид и/или композиция по настоящему изобретению для применения в человеческой и/или ветеринарной медицине. Предпочтительно соединение, модифицированный хитозан, гидроколлоид или композиция по настоящему изобретению предназначены для применения в качестве вакцины в человеческой и/или ветеринарной медицине.

Настоящее изобретение также относится к соединению, модифицированному хитозану, гидроколлоиду и/или композиции по настоящему изобретению для применения в способе лечения и/или предупреждения мастита, предпочтительно латентного мастита и/или острого мастита, эндометрита, предпочтительно хронического, острого и/или гнойно-катарального эндометрита, заболеваний копыт и когтей, хромоты, поражений в межпальцевой области, пальцевого дерматита, межпальцевого дерматита, межпальцевой флегмоны, трихофитоза, микроспороза, микоза кожи, аллергий, а также заболеваний, осложненных аллергиями, в частности аллергического обструктивного заболевания легких, аллергических за-

болеваний кожи, аллергической эритемы уха, аллергического ринита, аллергического конъюнктивита, острого аллергического контактного дерматита, хронической аллергической контактной экземы или атопической экземы, обструктивного заболевания легких, в частности хронического обструктивного заболевания легких, заболеваний кожи, в частности дерматита, эритемы уха, ринита, конъюнктивита, дерматофитоза или бородавок, в частности обыкновенных бородавок у субъекта.

Настоящее изобретение также относится к соединению, модифицированному хитозану, гидроколлоиду и/или композиции по настоящему изобретению для применения в способе модулирования иммунного ответа у субъекта и/или для увеличения эффективности репродукции, предпочтительно эффективности репродукции при разведении животных.

Субъектом может быть, например, человек или животное, в частности млекопитающее, более предпочтительно полорогие и/или свиньи, наиболее предпочтительно крупный рогатый скот, но также и собаки, кошки или другие сельскохозяйственные или домашние животные.

В особенно предпочтительном воплощении изобретение относится к композиции, содержащей модифицированный хитозан, гидроколлоид или соединение согласно настоящему изобретению и инактивированные микроконидии дерматофита *Trichophyton mentagrophytes*, в частности *Trichophyton mentagrophytes* DSM-7279, для применения в способе лечения и/или предупреждения межпальцевого дерматита, пальцевого дерматита и/или межпальцевой флегмоны у животных, в частности у полорогих и/или свиней, наиболее предпочтительно у крупного рогатого скота.

В другом особенно предпочтительном воплощении данное изобретение относится к композиции, содержащей модифицированный хитозан или гидроколлоид, или соединение согласно настоящему изобретению и инактивированные микроконидии дерматофита *Trichophyton verrucosum*, в частности *Trichophyton verrucosum* DSM-28406, для применения в способе лечения и/или предупреждения межпальцевого дерматита, пальцевого дерматита, межпальцевой флегмоны и/или трихофитоза у животных, в частности у полорогих и/или свиней, наиболее предпочтительно у крупного рогатого скота.

В особенно предпочтительном воплощении изобретение относится к композиции, содержащей модифицированный хитозан, или гидроколлоид, или соединение согласно настоящему изобретению и инактивированные дрожжевые бластоспоры *Candida albicans*, в частности *Candida albicans* DSM-9456, для применения в способе лечения и/или предупреждения межпальцевого дерматита, пальцевого дерматита и/или межпальцевой флегмоны, в частности у полорогих и/или свиней, наиболее предпочтительно у крупного рогатого скота.

В другом особенно предпочтительном воплощении изобретение относится к композиции, содержащей модифицированный хитозан, или гидроколлоид, или соединение согласно настоящему изобретению и ASMP *Candida albicans*, в частности *Candida albicans* DSM-9456, для применения в способе лечения и/или предупреждения аллергий, в частности аллергического обструктивного заболевания легких, аллергических заболеваний кожи, аллергической эритемы уха, аллергического ринита, аллергического конъюнктивита, острого аллергического контактного дерматита, хронической аллергической контактной экземы или атопической экземы, обструктивного заболевания легких, в частности хронического обструктивного заболевания легких, заболеваний кожи, эритемы уха, ринита, конъюнктивита, дерматофитоза или бородавок, в частности обыкновенных бородавок, обструктивного заболевания легких, в частности хронического обструктивного заболевания легких, заболеваний кожи, в частности дерматита, эритемы уха, ринита или конъюнктивита у человека и/или животных, в частности у млекопитающих, более предпочтительно у животных-спутников, наиболее предпочтительно у собак, кошек и/или лошадей, но также и у крупного рогатого скота, свиней или других сельскохозяйственных или домашних животных.

В другом особенно предпочтительном воплощении изобретение относится к композиции, содержащей модифицированный хитозан или гидроколлоид, или соединение согласно настоящему изобретению и ANMP *Candida albicans*, в частности *Candida albicans* DSM-9456, для применения в способе лечения и/или предупреждения межпальцевого дерматита, пальцевого дерматита и/или межпальцевой флегмоны у животных, в частности у полорогих и/или свиней, наиболее предпочтительно у крупного рогатого скота.

В другом особенно предпочтительном воплощении изобретение относится к композиции, содержащей модифицированный хитозан или гидроколлоид, или соединение согласно настоящему изобретению и смесь гомогенизированных инактивированных микроконидий дерматофитов *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton verrucosum*, *Trichophyton equinum*, *Trichophyton sarkisovii*, *Microsporum canis*, *Microsporum canis* var. *obesum*, *Microsporum canis* var. *distortum* и *Microsporum gypseum* и возможно ASMP *Candida albicans*, в частности *Candida albicans* DSM-9456. Более предпочтительно композиция по настоящему изобретению, помимо модифицированного хитозана или гидроколлоида, или соединения по настоящему изобретению, содержит вакцину Поливак-ТМ и возможно ASMP *Candida albicans*, в частности *Candida albicans* DSM-9456, для применения в способе лечения и/или предупреждения трихофитоза или дерматофитоза у животных, в частности у полорогих и/или свиней, наиболее предпочтительно у крупного рогатого скота.

В другом особенно предпочтительном воплощении изобретение относится к композиции, содержащей модифицированный хитозан или гидроколлоид, или соединение согласно настоящему изобретению

и АЕМР *Chrisporium tropicum*, в частности *Chrisporium tropicum* DSM-28405 или *Microsporium canis* BINO 483, для применения в способе лечения и/или предупреждения аллергий, в частности аллергического обструктивного заболевания легких, аллергических заболеваний кожи, аллергической эритемы уха, аллергического ринита, аллергического конъюнктивита, острого аллергического контактного дерматита, хронической аллергической контактной экземы или атопической экземы, обструктивного заболевания легких, в частности хронического обструктивного заболевания легких, заболеваний кожи, эритемы уха, ринита, конъюнктивита, дерматофитоза, микоза кожи или бородавок, в частности обыкновенных бородавок, обструктивного заболевания легких, в частности хронического обструктивного заболевания легких, заболеваний кожи, в частности дерматита, эритемы уха, ринита или конъюнктивита у человека и/или животных, в частности у млекопитающих, более предпочтительно у полорогих и/или свиней, наиболее предпочтительно у крупного рогатого скота или лошадей, но также и у собак, кошек или других сельскохозяйственных или домашних животных.

Модифицированный хитозан, гидроколлоид, соединение и композиции по настоящему изобретению способны модулировать иммунную систему, то есть они имеют иммуностимулирующие свойства. Они могут быть использованы в качестве вакцины для предупреждения у субъекта описанных здесь заболеваний. Альтернативно или дополнительно, их можно использовать для лечения и излечения у субъекта описанных здесь заболеваний. Модифицированный хитозан, гидроколлоид и композиции можно вводить известными путями введения, например перорально, парентерально, посредством внутримышечной инъекции, посредством внутрикожной инъекции, посредством чрескожной инъекции, посредством инстилляций, интрацестернально, внутриматочно, ректально, подкожно и/или местно, предпочтительно накожно, более предпочтительно внутримышечной инъекцией и/или внутрикожной инъекцией, и/или местно на кожу, и/или местно на слизистую оболочку. Их можно вводить в отсутствие или в присутствии одного или более чем одного дополнительного иммуностимулирующего вещества. В одном воплощении указанное одно или более чем одно дополнительное иммуностимулирующее вещество вводится отдельно по отношению к модифицированному хитозану, соединению или композициям по настоящему изобретению. В другом воплощении одно или более чем одно дополнительное иммуностимулирующее вещество содержится в композициях по настоящему изобретению или добавляется в композиции по настоящему изобретению.

Указанное одно или более чем одно иммуностимулирующее вещество предпочтительно представляет собой адъювант, предпочтительно выбранный из группы, состоящей из витамина Е ацетата, эмульсии типа "масло в воде", фосфата алюминия, оксида алюминия, гидроксида алюминия/метилцеллюлозного геля, масляной эмульсии, мурамил-дипептидов, адъювантов Фрейнда и сапонинов и/или по меньшей мере один цитокин, предпочтительно выбранный из группы, состоящей из IL-2 (интерлейкин-2), IL-12 и INF-гамма.

В предпочтительном воплощении композиции по настоящему изобретению представляют собой вакцину и/или используются в качестве вакцины.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к модифицированному хитозану, гидроколлоиду, соединению или композиции по настоящему изобретению для применения в способе лечения животного и/или человеческого организма посредством терапии. Такой способ типично включает введение субъекту эффективного количества модифицированного хитозана, композиции, предпочтительно фармацевтической композиции, или гидроколлоида по настоящему изобретению. Субъект может представлять собой, например, человека или животное, в частности млекопитающее, более предпочтительно полорогое и/или свиней, наиболее предпочтительно крупный рогатый скот, но также собак, кошек или других сельскохозяйственных или домашних животных. В частности, модифицированный хитозан, гидроколлоид или композиции, в частности фармацевтические композиции, по настоящему изобретению можно использовать в способах лечения или предупреждения описанных выше заболеваний. Данный способ лечения может включать лечение и/или предупреждение бактериальных, грибковых и/или вирусных инфекций кожи, уха, легкого, носа, ноги, копыта, когтя, тыльной стороны стопы и/или межпальцевого пространства. Указанные инфекции могут быть вызваны *Dichelobacter nodosus*, *Fusobacterium necroforum*, видами *Fusobacterium*, видами *Treponema*, такими как *T. phagedenis*, *T. vincentii* и *T. denticola*, видами *Campylobacter*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Arcanobacterium pyogenes*, видами *Prevotella*, видами *Trichophyton*, такими как *T. verrucosum*, *T. mentagrophytes*, *T. sarkisovii*, *T. equinum*, *T. schonleinii*, *T. rubrum*, *T. tonsurans*, *T. interdigitale*, и/или видами *Microsporium*, такими как *M. canis*, *M. canis var. distortum*, *M. canis var. obesum*, *M. gypseum* и/или видами *Malassezia*, такими как *M. pachydermatitis*, *M. furfur*, *M. dermatitis*, и/или HPV - человеческим папилломавирусом из родов *Papillomavirus* семейства *Papovaviridae*, таким как HPV-2, HPV-3, HPV-4, HPV-6, HPV-11.

Дозировка и путь введения, используемые в способе лечения и/или профилактики согласно настоящему изобретению, зависят от конкретного заболевания/места инфекции, подлежащей лечению. Путем введения может быть, например, пероральный, парентеральный, посредством внутримышечной инъекции, посредством внутрикожной инъекции, посредством чрескожной инъекции, посредством инстилляций, интрацестернально, внутриматочно, ректально, подкожно и/или местно, предпочтительно накожно, более предпочтительно внутримышечной инъекцией и/или внутрикожной инъекцией, и/или местно на

кожу, и/или местно на слизистую оболочку, или любой другой путь введения.

Предпочтительные дозы для композиции по настоящему изобретению составляют от примерно 0,001 до примерно 0,5 мл/кг, с концентрацией микроконидий и/или бластоспор, и/или частиц ANMP от примерно 0,1 до примерно 1,0 мг/мл и/или от примерно 30×10^6 до примерно 80×10^6 . Предпочтительно композицию по настоящему изобретению вводят от примерно 1 до примерно 5 раз. Интервал между введениями предпочтительно составляет от примерно 12 ч до примерно 21 суток.

Следующие примеры объясняют настоящее изобретение, но не рассматриваются в качестве ограничивающих.

Пример 1.

Первая стадия.

Разведение (растворение) хитозана

40 г полисахарида хитозана стерилизовали автоклавированием и добавляли при перемешивании в 8 л стерильной воды для инъекции, подкисленной 40 мл 100%-ной уксусной кислотой, с получением суспензии. Суспензию перемешивали в стерильной емкости в течение 24 ч с получением суспензии геля. Нерастворившиеся частицы удаляли фильтрованием через металлическую сетку с ячейкой 200-300 мкм. 4н. гидроксид натрия (NaOH) добавляли по каплям в гель с получением конечного pH 8,0. При этом выпадали в осадок белые хлопья. Суспензию перемешивали в течение 30 мин. Образующийся биологический материал осадка содержал в его структуре диацетилованный хитозан. Осадок отбирали центрифугированием в течение 50 мин при 4500 об/мин.

Модификация биологического материала, содержащего диацетилованный хитозан.

Полученный суспендированный материал гомогенизировали в закрытом стерильном гомогенизаторе в 7 л стерильной воды для инъекции. В суспензию добавляли по каплям при постоянном перемешивании 8 мл 98%-ного хлорида валериановой кислоты (валерил хлорид, пентаноил хлорид). Затем суспензию перемешивали в течение 24 ч. Для поддержки растворения хлопьев и нерастворившихся частиц добавляли при перемешивании 4н. раствор соляной кислоты, пока суспензия не имела pH 5,8. Добавляли стерильную воду для инъекции с получением конечного объема 8 л. После этого использовали модифицированный полисахарид для получения конечного продукта.

Характеристики полученного биологического материала, содержащего модифицированный хитозан.

Параметры	Характеристики
Химическая формула	не известна
Внешний вид	Прозрачный гель
Запах	Отсутствует или слабый
	запах уксусной кислоты
Деацетилование	более 93%
Содержание минеральных веществ	более 0,9%
Растворимость в воде	Растворимо
Растворимость в 1%-ном растворе уксусной кислоты	Растворимо

Вторая стадия.

Для получения конечного продукта 2 л биологического материала, содержащего модифицированный хитозан, доводили до объема 15 л посредством добавления стерильной воды для инъекции при перемешивании. Затем добавляли в смесь 500 мл раствора хлоркрезола, содержащего 30 г хлоркрезола. Образующуюся суспензию доводили до объема 30 л. Образующуюся суспензию стерилизовали нагреванием в течение 40 мин при 70°C три раза с интервалами 24 ч. Образующийся стерильный продукт распределяли в сосуды при асептических условиях.

Пример 2.

Разведение (растворение) хитозана

4 г полисахарида хитозана добавляли при перемешивании в 0,8 л стерильной воды для инъекции с получением суспензии. Добавляли 4 мл 100%-ной уксусной кислоты, и суспензию перемешивали в стерильной емкости в течение 24 ч с получением суспензии геля. Нерастворившиеся частицы удаляли фильтрованием через металлическую сетку с ячейкой 200-300 мкм. 4н. гидроксид натрия (NaOH) добавляли по каплям в гель с получением конечного pH 8,0. При этом выпадали в осадок белые хлопья. Суспензию перемешивали в течение 40 мин. Образующийся биологический материал осадка содержал в его структуре деацетилованный хитозан. Осадок отбирали центрифугированием в течение 45 мин при 4500 об/мин.

Модификация биологического материала, содержащего деацетилованный хитозан.

Полученный суспендированный материал гомогенизировали в закрытом стерильном гомогенизаторе в 4 л стерильной воды для инъекции. В суспензию добавляли по каплям при постоянном перемешива-

нии 0,8 мл 98%-ного хлорида валериановой кислоты (валерил хлорид, пентаноил хлорид). Затем суспензию перемешивали в течение 24 ч. Для поддержки растворения хлопьев и нерастворившихся частиц добавляли при перемешивании 4н. раствор соляной кислоты, пока суспензия не имела рН 5,5. После этого использовали модифицированный полисахарид для получения конечного продукта.

Характеристики полученного биологического материала, содержащего модифицированный хитозан.

Параметры	Характеристики
Химическая формула	не известна
Внешний вид	Прозрачный гель
Запах	Отсутствует или слабый запах уксусной кислоты
Деацетилирование	более 93%
Содержание минеральных веществ	более 0,9%
Растворимость в воде	Растворимо
Растворимость в 1%-ном растворе уксусной кислоты	Растворимо

Вторая стадия.

Для получения конечного продукта 200 мл модифицированного хитозана ресуспендировали в 1,5 л стерильной воды для инъекции, и добавляли при перемешивании 50 мл раствора хлоркрезола, содержащего 2 г активного вещества. Полученную суспензию доводили до объема 2 л. Полученную суспензию стерилизовали нагреванием в течение 40 мин при 70°C три раза с интервалами 24 ч. Образующийся стерильный продукт распределяли в сосуды при асептических условиях.

Пример 3. Разведение (растворение) хитозана.

80 г полисахарида хитозана стерилизовали автоклавированием и добавляли при перемешивании в 16 л стерильной воды для инъекции, подкисленной 80 мл 100%-ной уксусной кислоты, с получением суспензии. Данную суспензию перемешивали в стерильной емкости в течение 24 ч с получением суспензии геля. Нерастворившиеся частицы удаляли фильтрованием через металлическую сетку с ячейкой 200-300 мкм. 4н. гидроксид натрия (NaOH) добавляли по каплям в гель с получением конечного рН 8,0. При этом выпадали в осадок белые хлопья. Суспензию перемешивали в течение 50 мин. Образующийся биологический материал осадка содержал в его структуре деацетилированный хитозан. Осадок отбирали центрифугированием в течение 60 мин при 5000 об/мин.

Модификация биологического материала, содержащего деацетилированный хитозан.

Полученный суспендированный материал гомогенизировали в закрытом стерильном гомогенизаторе в 4 л стерильной воды для инъекции. В суспензию добавляли по каплям при постоянном перемешивании 16 мл 98%-ного хлорида валериановой кислоты (валерил хлорид, пентаноил хлорид). Кроме того, добавляли при перемешивании 4 л стерильной воды для инъекции и 3%-ный раствор глутаминовой кислоты, пока суспензия не имела рН 5,0. Добавляли стерильную воду для инъекции с получением конечного объема 8 л. После этого суспензию перемешивали в течение 24 ч. После этого использовали модифицированный полисахарид для получения конечного продукта.

Характеристики полученного биологического материала, содержащего модифицированный хитозан

Параметры	Характеристики
Химическая формула	не известна
Внешний вид	Прозрачный гель
Запах	Отсутствует или слабый запах уксусной кислоты
Деацетилирование	более 90%
Содержание минеральных веществ	более 0,8%
Растворимость в воде	Растворимо
Растворимость в 1%-ном растворе уксусной кислоты	Растворимо

Вторая стадия.

Для получения конечного продукта 4000 мл модифицированного хитозана ресуспендировали в 30 л стерильной воды для инъекции, и добавляли при перемешивании 50 мл раствора хлоркрезола, содержащего 40 г активного вещества. Полученную суспензию доводили до объема 40 л. Полученную суспензию стерилизовали нагреванием в течение 45 мин при 72°C три раза с интервалами 24 ч. Образующийся сте-

рильный продукт распределяли в сосуды при асептических условиях.

Пример 4.

Разведение (растворение) хитозана.

16 г полисахарида хитозана (деацетилирование 65-72%, вязкость 151-350 мПа с, 80-200 кДа) стерилизовали автоклавированием и добавляли при перемешивании в 3 л стерильной воды для инъекции, подкисленной 164 мл 100%-ной уксусной кислоты, с получением суспензии. Данную суспензию перемешивали в стерильной емкости в течение 24 ч с получением суспензии геля. Нерастворившиеся частицы удаляли фильтрованием через металлическую сетку с ячейкой 200-300 мкм. 4н. гидроксид натрия (NaOH) добавляли по каплям в гель с получением конечного pH 8,5. При этом выпадали в осадок белые хлопья. Суспензию перемешивали в течение 30 мин. Образующийся биологический материал осадка содержал в его структуре деацетилированный хитозан. Осадок отбирали центрифугированием в течение 50 мин при 5000 об/мин.

Модификация биологического материала, содержащего деацетилированный хитозан.

Полученный суспендированный материал гомогенизировали в закрытом стерильном гомогенизаторе в 1 л стерильной воды для инъекции. В суспензию добавляли по каплям при постоянном перемешивании 0,6 мл 98%-ного хлорида валериановой кислоты (валерил хлорид, пентаноил хлорид). Кроме того, добавляли при перемешивании 0,5%-ный раствор парааминобензойной кислоты, пока суспензия не имела pH 5,4. Добавляли стерильную воду для инъекции с получением конечного объема 1,6 л. После этого суспензию перемешивали в течение 24 ч. После этого использовали модифицированный полисахарид для получения конечного продукта.

Характеристики полученного биологического материала, содержащего модифицированный хитозан

Параметры	Характеристики
Химическая формула	не известна
Внешний вид	Прозрачный гель
Запах	Отсутствует или слабый запах уксусной кислоты
Деацетилирование	более 89%
Содержание минеральных веществ	более 1,0%
Растворимость в воде	Растворим
Растворимость в 1%-ном растворе уксусной кислоты	Растворим

Вторая стадия.

Для получения конечного продукта 1000 мл модифицированной фракции ресуспендировали в 8 л стерильной воды для инъекции, и добавляли при перемешивании 200 мл раствора хлоркрезола, содержащего 10 г активного вещества. Полученную суспензию доводили до объема 10 л. Полученную суспензию стерилизовали нагреванием в течение 45 мин при 65°C три раза с интервалами 24 ч.

Образующийся стерильный продукт распределяли в сосуды при асептических условиях.

Пример 5.

Продукт получают из хитозана. Продукт получают в две стадии. Первая стадия направлена на получение раствора хитозана; вторая стадия направлена на получение конечного продукта.

Первая стадия.

40 г хитозана (деацетилирование 82-87%, вязкость 151-350 мПа-с, молекулярная масса 150-300 кДа) стерилизовали автоклавированием и добавляли при перемешивании в 3,5 л стерильной воды для инъекции. Добавляли в полученную суспензию 40 мл 100%-ной уксусной кислоты, и объем доводили водой для инъекции до конечного объема 4 л. Данную суспензию перемешивали в стерильном контейнере в течение 24 ч, пока не была получена суспензия геля. 4н. гидроксид натрия (NaOH) добавляли по каплям к полученной суспензии с получением конечного pH 8,0. При этом выпадали в осадок белые хлопья. Суспензию перемешивали в течение 30 мин. Образующийся биологический материал осадка содержал в его структуре линейный деацетилированный полисахарид N-ацетил-1,4-β-D-глюкопиранозамин (хитозан). Осадок отбирали центрифугированием в течение 55 мин при 4500 об/мин.

Модификация хитозана.

Осадок суспендировали в 4 л стерильной воды для инъекций, и добавляли при перемешивании 4н. соляную кислоту с получением pH 5,4. Данную суспензию перемешивали в течение 24 ч, пока не растворились все хлопья, и получали суспензию геля. Суспензию геля использовали для получения конечного продукта.

Вторая стадия.

Для получения конечного продукта 3 л модифицированного полисахарида доводили до объема 25 л

посредством добавления стерильной воды для инъекции при перемешивании. Затем добавляли в смесь при перемешивании 500 мл раствора хлоркрезола, содержащего 30 г активного ингредиента. Образующуюся суспензию доводили до объема 30 л. Образующийся стерильный продукт распределяли в сосуды при асептических условиях.

Пример 6.

Продукт получали из хитозана. Продукт получали в две стадии. Первая стадия направлена на получение раствора модифицированного хитозана; вторая стадия направлена на получение конечного продукта.

Первая стадия.

В качестве сырья использовали хитозан с деацетилированием 62-67%, вязкостью 70-200 мПа с и молекулярной массой 100-250 кДа. 40 г данного полисахарида стерилизовали автоклавированием и добавляли при перемешивании в 3,5 л воды для инъекции. Добавляли в полученную суспензию 40 мл 100%-ной уксусной кислоты. Конечный объем доводили водой для инъекции до 4 л. Суспендированный полисахарид перемешивали в стерильном контейнере в течение 24 ч, пока не была получена суспензия геля. Нерастворившиеся частицы удаляли фильтрованием через металлическую сетку с размером ячейки 200-300 мкм.

4н. гидроксид натрия (NaOH) добавляли по каплям к полученной суспензии с получением конечного pH 8,0. При этом выпадали в осадок белые хлопья. Суспензию перемешивали в течение 30 мин. Полученный биологический материал содержал в его структуре линейный диацетилированный полисахарид N-ацетил-1,4-β-D-глюкопиранозоамин (хитозан). Осадок отбирали центрифугированием в течение 60 мин при 4500 об/мин.

Модификация хитозана.

4 мл 98%-ного хлорида валериановой кислоты добавляли по каплям в суспензию при постоянном перемешивании. Полученный суспендированный материал перемешивали в течение 1 ч. Хлопья и нерастворившиеся частицы ресуспендировали в 4 л стерильной воды для инъекций, и добавляли при перемешивании 4н. соляную кислоту с получением pH 5,0. Данную суспензию перемешивали в течение 28 ч, пока не растворились все хлопья, и не была получена суспензия геля.

Вторая стадия.

Для получения конечного продукта 3 л модифицированного полисахарида доводили до объема 25 л посредством добавления стерильной воды для инъекции при перемешивании. Затем добавляли в смесь 500 мл раствора хлоркрезола, содержащего 30 г активного ингредиента. Образующуюся суспензию доводили до объема 30 л. Образующийся стерильный продукт распределяли в сосуды при стерильных условиях.

Пример 7.

Продукт получали из хитозана. Продукт получали в две стадии. Первая стадия была направлена на получение раствора модифицированного хитозана; вторая стадия была направлена на получение конечного продукта.

Первая стадия.

В качестве сырья использовали хитозан с деацетилированием 77-82%, вязкостью 2700-3300 мПа с и молекулярной массой 300-700 кДа. 40 г данного полисахарида стерилизовали автоклавированием и добавляли при перемешивании в 3,5 л воды для инъекции. Добавляли в полученную суспензию 40 мл 100%-ной уксусной кислоты. Конечный объем доводили водой для инъекции до 4 л. Суспендированный полисахарид перемешивали в стерильном контейнере в течение 30 ч, пока не была получена суспензия геля. Нерастворившиеся частицы удаляли фильтрованием через металлическую сетку с размером ячейки 200-300 мкм. 4н. гидроксид натрия (NaOH) добавляли по каплям в полученную суспензию с получением конечного pH 8,0. При этом выпадали в осадок белые хлопья. Суспензию перемешивали в течение 30 мин. Образующийся биологический материал содержал в его структуре линейный деацетилированный полисахарид N-ацетил-1,4-β-D-глюкопиранозоамин (хитозан). Осадок отбирали центрифугированием в течение 45 мин при 5000 об/мин.

Модификация биологического материала, содержащего хитозан.

8 мл 90%-ной молочной кислоты добавляли по каплям в суспензию при постоянном перемешивании. Полученный суспендированный материал перемешивали в течение 1 ч. Хлопья и нерастворившиеся частицы ресуспендировали в 4 л стерильной воды для инъекций, и добавляли 4н. соляную кислоту при перемешивании, пока не был получен pH 5,6. Данную суспензию перемешивают в течение 48 ч, пока не растворились все хлопья, и не была получена суспензия геля.

Вторая стадия.

Для получения конечного продукта 3 л модифицированного полисахарида доводили до объема 25 л посредством добавления стерильной воды для инъекции при перемешивании. Затем добавляли в смесь 500 мл раствора хлоркрезола, содержащего 30 г активного ингредиента. Образующуюся суспензию доводили до объема 30 л. Образующийся стерильный продукт распределяли в сосуды при асептических условиях.

Пример 8.

Продукт получали из хитозана. Продукт получали в две стадии. Первая стадия была направлена на получение раствора модифицированного хитозана, вторая стадия была направлена на получение конечного продукта.

Первая стадия.

В качестве сырья использовали хитозан с деацетилизацией 82-87%, вязкостью 151-350 мПа с и молекулярной массой 150-300 кДа. 40 г данного полисахарида стерилизовали автоклавированием и добавляли в 3,5 л воды для инъекции при перемешивании. Добавляли в полученную суспензию 40 мл 100%-ной уксусной кислоты. Конечный объем доводили до 4 л водой для инъекции. Суспендированный полисахарид перемешивали в стерильном контейнере в течение 36 ч, пока не была получена суспензия геля. Нерастворившиеся частицы удаляли фильтрованием через металлическую сетку с размером ячейки 200-300 мкм. 4н. гидроксид натрия (NaOH) добавляли по каплям в полученную суспензию с получением конечного pH 8,0. При этом выпадали в осадок белые хлопья. Суспензию перемешивали в течение 30 мин. Образующийся биологический материал содержал в его структуре линейный деацетилованный полисахарид N-ацетил-1,4-β-D-глюкопиранозамин (хитозан). Осадок отбирали центрифугированием в течение 50 мин при 4500 об/мин.

Модификация биологического материала, содержащего хитозан.

0,2%-ный раствор парааминобензойной кислоты добавляли к осадку при постоянном перемешивании вплоть до достижения объема 4 л. Полученный суспендированный материал перемешивали в течение 1 ч. Хлопья и нерастворившиеся частицы суспендировали в растворе парааминобензойной кислоты, и добавляли при перемешивании 4н. соляную кислоту, пока не был получен pH 5,6. Данную суспензию перемешивали в течение 70 ч, пока не растворялись все хлопья, и не была получена суспензия геля.

Вторая стадия.

Для получения конечного продукта 3 л модифицированного полисахарида доводили до объема 25 л посредством добавления стерильной воды для инъекции при перемешивании. Затем добавляли в смесь 500 мл раствора хлоркрезола, содержащего 30 г активного ингредиента. Образующуюся суспензию доводили до объема 30 л. Образующийся стерильный продукт распределяли в сосуды при асептических условиях.

Пример 9.

Продукт получали из хитозана. Продукт получали в две стадии. Первая стадия была направлена на получение раствора модифицированного хитозана, вторая стадия была направлена на получение конечного продукта.

Первая стадия.

В качестве сырья использовали хитозан с деацетилизацией 67-72%, вязкостью 151-350 мПа с и молекулярной массой 150-300 кДа. 40 г данного полисахарида стерилизовали автоклавированием и добавляли в 3,5 л воды для инъекции при перемешивании. Добавляли в полученную суспензию 40 мл 100%-ной уксусной кислоты. Конечный объем доводили до 4 л водой для инъекции. Суспендированный полисахарид перемешивали в стерильном контейнере в течение 24 ч, пока не была получена суспензия геля. Нерастворившиеся частицы удаляли фильтрованием через металлическую сетку с размером ячейки 200-300 мкм. 4н. гидроксид натрия (NaOH) добавляли по каплям в полученную суспензию с получением конечного pH 8,0. При этом выпадали в осадок белые хлопья. Суспензию перемешивали в течение 30 мин. Образующийся биологический материал содержал в его структуре линейный деацетилованный полисахарид N-ацетил-1,4-β-D-глюкопиранозамин (хитозан). Осадок отбирали центрифугированием в течение 60 мин при 4500 об/мин.

Модификация биологического материала, содержащего хитозан.

0,1%-ный раствор натриевой соли глюкуроновой кислоты добавляли к осадку при постоянном перемешивании вплоть до достижения объема 4 л. Полученный суспендированный материал перемешивали в течение 1 ч. Хлопья и нерастворившиеся частицы ресуспендировали в растворе глюкуроновой кислоты, и добавляли при перемешивании 4н. соляную кислоту, пока не был получен pH 5,6. Данную суспензию перемешивали в течение 72 ч, пока не растворялись все хлопья, и не была получена суспензия геля.

Вторая стадия.

Для получения конечного продукта 3 л модифицированного полисахарида доводили до объема 25 л посредством добавления стерильной воды для инъекции при перемешивании. Затем добавляли в смесь 500 мл раствора хлоркрезола, содержащего 30 г активного ингредиента. Образующуюся суспензию доводили до объема 30 л. Образующийся стерильный продукт распределяли в сосуды при асептических условиях.

Пример 10.

Продукт получали из хитозана. Продукт получали в две стадии. Первая стадия была направлена на получение раствора хитозана, вторая стадия была направлена на получение конечного продукта.

Первая стадия.

В качестве сырья использовали хитозан с деацетилизацией 67-72%, вязкостью 151-350 мПа·с и молекулярной массой 150-300 кДа. 40 г данного полисахарида стерилизовали автоклавированием и добавляли при перемешивании в 3,5 л воды для инъекции. Добавляли в полученную суспензию 8 мл 98%-ной натриевой соли валериановой кислоты. Конечный объем доводили до 4 л водой для инъекции. Суспендированный полисахарид перемешивали в стерильном контейнере в течение 48 ч, пока не была получена суспензия геля. Нерастворившиеся частицы удаляли фильтрованием через металлическую сетку с размером ячейки 200-300 мкм.

Вторая стадия.

Для получения конечного продукта 3 л модифицированного полисахарида доводили до объема 25 л посредством добавления стерильной воды для инъекции при перемешивании. Затем добавляли в смесь 500 мл раствора хлоркрезола, содержащего 30 г активного ингредиента. Образующуюся суспензию доводили до объема 30 л. Образующийся стерильный продукт распределяли в сосуды при асептических условиях.

Пример 11.

Продукт получали из хитозана. Продукт получали в две стадии. Первая стадия была направлена на получение раствора хитозана; вторая стадия была направлена на получение конечного продукта.

Первая стадия.

В качестве сырья использовали хитозан с деацетилизацией 67-72%, вязкостью 151-350 мПа·с и молекулярной массой 150-300 кДа. 40 г данного полисахарида стерилизовали автоклавированием и добавляли при перемешивании в 3,9 л 0,2%-ной парааминобензойной кислоты в воде для инъекции. Добавляли при перемешивании 4н. раствор соляной кислоты, пока не получали pH 5,6, и с получением суспензии геля. Конечный объем доводили до 4 л водой для инъекции. Суспендированный полисахарид перемешивали в стерильном контейнере в течение 72 ч, пока не была получена суспензия геля. Нерастворившиеся частицы удаляли фильтрованием через металлическую сетку с размером ячейки 200-300 мкм.

Вторая стадия.

Для получения конечного продукта 3 л модифицированного полисахарида доводили до объема 25 л посредством добавления стерильной воды для инъекции при перемешивании. Затем добавляли в смесь 500 мл раствора хлоркрезола, содержащего 30 г активного ингредиента. Образующуюся суспензию доводили до объема 30 л. Образующийся стерильный продукт распределяли в сосуды при асептических условиях.

Пример 12.

Продукт получали из хитозана. Продукт получали в две стадии. Первая стадия была направлена на получение раствора хитозана; вторая стадия была направлена на получение конечного продукта.

Первая стадия.

В качестве сырья использовали хитозан с деацетилизацией 67-72%, вязкостью 151-350 мПа·с и молекулярной массой 150-300 кДа. 40 г данного полисахарида стерилизовали автоклавированием и добавляли при перемешивании в 3,5 л 0,1%-ного раствора натриевой соли глюкокуроновой кислоты. Для получения суспензии геля добавляли при перемешивании 4н. раствор соляной кислоты, пока не получали pH 5,0. Конечный объем доводили до 4 л водой для инъекции. Суспендированный полисахарид перемешивали в стерильном контейнере в течение 78 ч, пока не была получена суспензия геля. Нерастворившиеся частицы удаляли фильтрованием через металлическую сетку с размером ячейки 200-300 мкм.

Вторая стадия.

Для получения конечного продукта 3 л модифицированного полисахарида доводили до объема 25 л посредством добавления стерильной воды для инъекции при перемешивании. Затем добавляли в смесь 500 мл раствора хлоркрезола, содержащего 30 г активного ингредиента. Образующуюся суспензию доводили до объема 30 л. Образующийся стерильный продукт распределяли в сосуды при асептических условиях.

Пример 13.

Продукт получали из хитозана. Продукт получали в две стадии. Первая стадия была направлена на получение раствора хитозана; вторая стадия была направлена на получение конечного продукта.

Первая стадия.

В качестве сырья использовали хитозан с деацетилизацией 67-72%, вязкостью 151-350 мПа·с и молекулярной массой 150-300 кДа. 40 г данного полисахарида стерилизовали автоклавированием и добавляли при перемешивании в 3,5 л воды для инъекции. Добавляли в полученную суспензию 8 мл 90%-ной молочной кислоты. Для растворения хлопьев и частиц добавляли 4н. раствор соляной кислоты, пока не получали pH 5,7. Конечный объем доводили до 4 л водой для инъекции. Суспендированный полисахарид перемешивали в стерильном контейнере в течение 36 ч, пока не была получена суспензия геля. Нерастворившиеся частицы удаляли фильтрованием через металлическую сетку с размером ячейки 200-300 мкм.

Вторая стадия.

Для получения конечного продукта 3 л модифицированного полисахарида доводили до объема 25 л

объема 6 л. Образующийся стерильный продукт распределяли в сосуды при асептических условиях.

Пример 31.

Продукт получали согласно примеру 9 с тем различием, что на второй стадии приготовления для получения образующегося продукта 3 л модифицированного полисахарида доводили до объема 5 л посредством добавления стерильной воды для инъекции при перемешивании. Затем добавляли в смесь 500 мл раствора мертиолатата, содержащего 0,24 г активного вещества. Образующуюся суспензию доводили до объема 6 л. Образующийся стерильный продукт распределяли в сосуды при асептических условиях.

Пример 32.

Продукт получали согласно примеру 8 с тем различием, что на второй стадии приготовления для получения образующегося продукта 3 л модифицированного полисахарида доводили до объема 10 л посредством добавления стерильной воды для инъекции при перемешивании. Затем добавляли в смесь 500 мл раствора неомицина, содержащего 150 г активного вещества. Образующуюся суспензию доводили до объема 15 л. Образующийся стерильный продукт распределяли в сосуды при асептических условиях.

Пример 33.

Продукт получали согласно примеру 8 с тем различием, что на второй стадии приготовления для получения образующегося продукта 3 л модифицированного полисахарида доводили до объема 10 л посредством добавления стерильной воды для инъекции при перемешивании. Затем добавляли в смесь 500 мл раствора натриевых и калиевых солей пенициллина, содержащего 300 г (300000000 UE) активного вещества. Образующуюся суспензию доводили до объема 15 л. Образующийся стерильный продукт распределяли в сосуды при асептических условиях.

Пример 34.

Продукт получали согласно примеру 8 с тем различием, что на второй стадии приготовления для получения образующегося продукта 3 л модифицированного полисахарида доводили до объема 10 л посредством добавления стерильной воды для инъекции при перемешивании. Затем добавляли в смесь 500 мл раствора натриевых и калиевых солей пенициллина, содержащего 300 г (300000000 UE) активного вещества, и 500 мл раствора неомицина, содержащего 150 г активного вещества. Образующуюся суспензию доводили до объема 15 л. Образующийся стерильный продукт распределяли в сосуды при асептических условиях.

Пример 35.

Продукт получали проведением 1-й стадии примера 7 в объеме 2 л и посредством его смешивания с 2 л продукта, полученного согласно примеру 8.

Вторая стадия.

Для получения конечного продукта 4 л модифицированного полисахарида доводили до объема 15 л посредством добавления стерильной воды для инъекции при перемешивании. Затем добавляли в смесь 500 мл раствора формалина, содержащего 30 мл активного вещества. Образующуюся суспензию доводили до объема 20 л. Образующийся стерильный продукт распределяли в сосуды при асептических условиях.

Пример 36.

Продукт получали проведением 1-й стадии примера 7 в объеме 2 л и посредством его смешивания с 2 л продукта, полученного согласно примеру 6.

Вторая стадия.

Для получения конечного продукта 4 л модифицированного полисахарида доводили до объема 15 л посредством добавления стерильной воды для инъекции при перемешивании. Затем добавляли в смесь 500 мл раствора формалина, содержащего 30 мл активного вещества. Образующуюся суспензию доводили до объема 20 л. Образующийся стерильный продукт распределяли в сосуды при асептических условиях.

Пример 37.

Продукт получали проведением 1-й стадии примера 7 в объеме 5 л.

Вторая стадия.

Для получения конечного продукта 4 л модифицированного полисахарида доводили до объема 15 л посредством добавления стерильной воды для инъекции при перемешивании. Затем добавляли в смесь 500 мл раствора формалина, содержащего 30 мл активного вещества. Образующуюся суспензию доводили до объема 20 л. Образующийся стерильный продукт распределяли в сосуды при асептических условиях.

Пример 38.

Культуру дерматофита вида *Trichophyton mentagrophytes* DSM-7279 культивировали на агаре/сусле, например в 3-10 колбах Ру. Культуру культивировали в течение 15-30 суток при 26-28°C. Грибковые массы дерматофита отрывали и гомогенизировали в водном растворе (например, в 100-500 мл) продукта, полученного согласно примеру 6, но со следующим отличием на второй стадии.

Вторая стадия.

Для получения конечного продукта 3 л модифицированного полисахарида доводили до объема 25 л посредством добавления стерильной воды для инъекции при перемешивании. Затем добавляли в смесь

500 мл раствора хлоркрезола, содержащего 30 г активного ингредиента. Образующуюся суспензию доводили до объема 30 л. Образующийся стерильный продукт добавляли в грибковую суспензию с получением концентрации 45-80 млн микроконидий на 1 мл для каждого гомогената. Гомогенаты инактивировали добавлением формальдегида непосредственно в клеточную суспензию, таким образом, что клеточная суспензия содержала в конце 0,2% (об./об.) формальдегида. Данную смесь инкубировали в течение 5-7 суток при 37°C.

Вакцину, приготавливаемую согласно данному способу, можно, например, использовать для профилактики и лечения межпальцевого и/или пальцевого дерматита, и/или межпальцевой флегмоны у животных.

Пример 39.

Культуру дерматофита вида *Trichophyton verrucosum* DSM-28406 культивировали на агаре/сусле, например в 3-10 колбах Ру. Культуру культивировали в течение 15-30 суток при 26-28°C. Грибковые массы дерматофита отрывали и гомогенизировали в водном растворе (например, в 100-500 мл) продукта, полученного согласно примеру 8, но со следующим отличием на второй стадии: Вторая стадия. Для получения конечного продукта 3 л модифицированного полисахарида доводили до объема 25 л посредством добавления стерильной воды для инъекции при перемешивании. Затем добавляли в смесь 500 мл раствора хлоркрезола, содержащего 30 г активного ингредиента. Образующуюся суспензию доводили до объема 30 л. Образующийся стерильный продукт добавляли в суспензию с получением концентрации 45-80 млн на 1 мл для гомогената. Гомогенаты инактивировали добавлением формальдегида непосредственно в клеточную суспензию, таким образом, что клеточная суспензия содержала в конце 0,4% (об./об.) формальдегида. Данную смесь инкубировали в течение 5-7 суток при 37°C.

Вакцину, приготавливаемую согласно данному способу, можно, например, использовать для профилактики и лечения межпальцевого и/или пальцевого дерматита, и/или межпальцевой флегмоны, и/или трихофитоза у животных.

Пример 40.

Вид *Candida albicans* DSM-9456 культивировали на агаре с экстрактом солода или агаре Сабуро, например в 3-10 колбах Ру. Культуру культивировали в течение 4-7 суток при 28-37°C. Бластоспоры отмывали физиологическим раствором хлорида натрия или другим подходящим раствором. Грибковые массы дерматофита отрывали и гомогенизировали в водном растворе (например, в 100-500 мл) продукта, полученного согласно примеру 9, но со следующим отличием на второй стадии.

Вторая стадия.

Для получения конечного продукта 3 л модифицированного полисахарида доводили до объема 25 л посредством добавления стерильной воды для инъекции при перемешивании. Затем добавляли в смесь 500 мл раствора хлоркрезола, содержащего 30 г активного ингредиента. Образующуюся суспензию доводили до объема 30 л. Образующийся стерильный продукт добавляли в суспензию с получением концентрации 40-90 млн микроконидий на 1 мл для гомогената. Гомогенаты инактивировали добавлением формальдегида непосредственно в клеточную суспензию, таким образом, что клеточная суспензия содержала в конце 0,3% (об./об.) формальдегида. Данную смесь инкубировали в течение 5-7 суток при 37°C.

Вакцину, приготавливаемую согласно данному способу, можно, например, использовать для профилактики и лечения межпальцевого и/или пальцевого дерматита, и/или межпальцевой флегмоны у животных.

Пример 41.

Первая стадия: вид *Candida albicans* DSM-9456 культивировали на агаре с экстрактом солода от Oxo-oid в 40 колбах Ру. Культуру культивировали в течение 4-7 суток при 28-37°C, как описано в EP 0564620. Образующуюся грибковую биомассу отрывали и обрабатывали водным раствором NaOH с концентрацией 3% (мас./об.). Указанную щелочную обработку проводили при 80°C в течение 6 ч. После обработки при водных щелочных условиях твердую и жидкую фазы препарата разделяли центрифугированием при 3500 g. После щелочной обработки образующийся супернатант обрабатывали при кислотных водных условиях, например 50%-ной уксусной кислотой при pH 4,0 в течение 2 ч при температурах от 4 до 8°C, после чего происходило разделение твердого и жидкого слоев. Затем супернатант со стадии разделения подвергали стадии осаждения. Осаждение проводили посредством добавления этанола. Отношение один объем супернатанта к 3 объемам спирта приводило к хорошему осаждению антигенного материала. Наконец, препарат ASMP лиофилизировали. Наконец твердую фазу отрывали и гомогенизировали в продукте, полученном согласно примеру 6, но со следующим отличием от второй стадии:

Вторая стадия.

Для получения конечного продукта 3 л модифицированного полисахарида доводили до объема 25 л посредством добавления стерильной воды для инъекции при перемешивании. Затем добавляли в смесь 500 мл раствора хлоркрезола, содержащего 30 г активного ингредиента. Образующуюся суспензию доводили до объема 30 л. Концентрацию ASMP доводили до 400 мкг на 1 мл.

Вакцину, приготавливаемую согласно данному способу, можно, например, использовать для профилактики и лечения аллергий.

Пример 42.

Первая стадия.

Вид *Candida albicans* DSM-9456 культивировали на агаре с экстрактом солода от Oxoid в 50 колбах Ру. Культуру культивировали в течение 4-7 суток при 28-37°C, как описано в EP 0564620. Образующуюся грибковую биомассу отрывали и обрабатывали водным раствором NaOH с концентрацией 3% (мас./об.). Щелочную обработку проводили при 80°C в течение 6 ч. После обработки при водных щелочных условиях твердую и жидкую фазы препарата разделяли центрифугированием при 3500 g. После щелочной обработки образующийся супернатант обрабатывали при кислотных водных условиях, например 50%-ной уксусной кислотой при pH 4,0 в течение 2 ч при температурах от 4 до 8°C, после чего происходило разделение твердого и жидкого слоев. Затем супернатант со стадии разделения подвергали стадии осаждения. Осаждение проводили посредством добавления этанола. Отношение один объем супернатанта к 3 объемам спирта приводило к хорошему осаждению антигенного материала. Наконец, препарат ASMP лиофилизировали.

Наконец, твердую фазу отрывали и гомогенизировали в продукте, полученном согласно примеру 8, но со следующим отличием на второй стадии.

Вторая стадия.

Для получения конечного продукта 3 л модифицированного полисахарида довели до объема 25 л посредством добавления стерильной воды для инъекции при перемешивании. Затем добавляли в смесь 500 мл раствора хлоркрезола, содержащего 30 г активного ингредиента. Образующуюся суспензию довели до объема 30 л. Концентрацию ASMP довели до 200 мкг на 1 мл.

Вакцину, приготовляемую согласно данному способу, можно, например, использовать для профилактики и лечения аллергий.

Пример 43.

Первая стадия: вид *Candida albicans* DSM-9456 культивировали на агаре с экстрактом солода от Oxoid в 50 колбах Ру. Культуру культивировали в течение 4-7 суток при 28-37°C, как описано в EP 0564620. Образующуюся грибковую биомассу отрывали и обрабатывали водным раствором NaOH с концентрацией 3% (мас./об.). Щелочную обработку проводили при 80°C в течение 6 ч. После обработки при водных щелочных условиях твердую и жидкую фазы препарата разделяли центрифугированием при 3500 g. После щелочной обработки образующийся супернатант обрабатывали при кислотных водных условиях, например 50%-ной уксусной кислотой при pH 4,0 в течение 2 ч при температурах от 4 до 8°C, после чего происходило разделение твердого и жидкого слоев. Затем супернатант со стадии разделения подвергали стадии осаждения. Осаждение проводили посредством добавления этанола. Отношение один объем супернатанта к 3 объемам спирта приводило к хорошему осаждению антигенного материала. Наконец, препарат ASMP лиофилизировали.

Наконец, твердую фазу отрывали и гомогенизировали в продукте, полученном согласно примеру 9, но со следующим отличием на второй стадии.

Вторая стадия.

Для получения конечного продукта 3 л модифицированного полисахарида довели до объема 25 л посредством добавления стерильной воды для инъекции при перемешивании. Затем добавляли в смесь 500 мл раствора хлоркрезола, содержащего 30 г активного ингредиента. Образующуюся суспензию довели до объема 30 л. Концентрацию ASMP довели до 100 мкг на 1 мл.

Вакцину, приготовляемую согласно данному способу, можно, например, использовать для профилактики и лечения аллергий.

Пример 44.

Фракция, получаемая согласно данному способу, состоит из нерастворимого антигенного материала, содержащего полисахарид и/или гликопептиды (ANMP) согласно PCT/EP96/03535. Вид *Candida albicans* DSM-9456 культивировали на агаре с экстрактом солода от Oxoid в 50 колбах Ру. Культуру культивировали в течение 4-7 суток при 28-37°C, как описано в EP 0564620. Образующуюся грибковую биомассу отрывали и обрабатывали водным раствором щелочи с концентрацией 4% (мас./об.) NaOH. Обработку проводили при 80°C в течение вплоть до 6 ч. После обработки при водных щелочных условиях твердую и жидкую фазы препарата разделяли центрифугированием при силах примерно 3500 g. После щелочной обработки твердую фазу обрабатывали 50%-ным раствором уксусной кислоты. После кислотной обработки твердую фазу пять раз промывали дистиллированной водой. Наконец, твердую фазу отрывали и гомогенизировали в продукте, полученном согласно примеру 6, но со следующим отличием на второй стадии: Вторая стадия. Для получения конечного продукта 3 л модифицированного полисахарида довели до объема 25 л посредством добавления стерильной воды для инъекции при перемешивании. Затем добавляли в смесь 500 мл раствора хлоркрезола, содержащего 30 г активного ингредиента. Образующуюся суспензию довели до объема 30 л. Концентрацию частиц довели до 30-90 млн на 1 мл.

Вакцину, приготовляемую согласно данному способу, можно, например, использовать для профилактики и лечения межпальцевого и/или пальцевого дерматита, и/или межпальцевой флегмоны у животных.

Пример 45.

Культуру дерматофита вида *Trichophyton verrucosum* DSM-28406 культивировали на агаре/сусле, например в 3-10 колбах Ру. Культуру культивировали в течение 15-30 суток при 26-28°C. Грибковые массы дерматофита отрывали и гомогенизировали в водном растворе (например, в 100-500 мл) продукта, полученного согласно примеру 6, но со следующим отличием на второй стадии.

Вторая стадия.

Для получения конечного продукта 3 л модифицированного полисахарида доводили до объема 10 л посредством добавления стерильной воды для инъекции при перемешивании. Затем добавляли в смесь 500 мл раствора хлоркрезола, содержащего 30 г активного ингредиента. Образующуюся суспензию доводили до объема 15 л. Образующийся стерильный продукт добавляли в грибковую суспензию с получением концентрации 45-60 млн микроконидий на 1 мл для каждого гомогената. Гомогенаты инактивировали добавлением формальдегида непосредственно в клеточную суспензию, таким образом, что клеточная суспензия содержала в конце 0,2% (об./об.) формальдегида. Данную смесь инкубировали в течение 5-7 суток при 37°C.

Вакцину, приготовляемую согласно данному способу, можно, например, использовать для профилактики и лечения трихофитоза у крупного рогатого скота.

Пример 46.

Раствор биологического материала, содержащего в его структуре линейный полисахарид N-ацетил-1,4-β-D-глюкопиранозамин, модифицированный 0,2%-ной парааминобензойной кислотой, добавляли в вакцину Поливак-ТМ против дерматофитоза животных (изготовитель: ООО "Ветбиохим", Москва; дистрибьютор: ООО "Простор", Москва) с достижением конечной концентрации 0,3% (мас./об.). pH данного раствора составлял примерно 5,6. Концентрация микроконидий составляла 40 млн на 1 мл.

Вакцину, приготовляемую согласно данному способу, можно использовать для профилактики и лечения дерматофитоза у животных.

Пример 47.

Candida albicans DSM-9456 культивировали на чашках с агаром, как описано в EP 0564620. Одной предпочтительной средой был, например, агар с экстрактом солода от Oxoïd. Образующуюся грибковую биомассу отрывали и обрабатывали водным раствором NaOH с концентрацией 3% (мас./об.). Щелочную обработку проводили при 80°C в течение 6 ч. После обработки при водных щелочных условиях твердую и жидкую фазы препарата разделяли центрифугированием при 3500 g. После щелочной обработки образующийся супернатант обрабатывали при кислотных водных условиях, например 50%-ной уксусной кислотой при pH 4,0 в течение 2 ч при температуре от 4 до 8°C, после чего происходило разделение твердого и жидкого слоев. Затем супернатант со стадии разделения подвергали стадии осаждения. Отношение один объем супернатанта к 3 объемам спирта приводило к хорошему осаждению антигенного материала. Наконец, препарат ASMP лиофилизировали.

Раствор биологического материала, содержащего в его структуре линейный полисахарид N-ацетил-1,4-β-D-глюкопиранозамин, модифицированный 0,5%-ной парааминобензойной кислотой, добавляли в вакцину Поливак-ТМ против дерматофитоза животных (изготовитель: ООО "Ветбиохим", Москва; дистрибьютор: ООО "Простор", Москва) с достижением конечной концентрации 0,3% (мас./об.). pH данного раствора составлял примерно 5,8. Концентрация микроконидий составляла 40 млн на 1 мл. Наконец, твердую фазу ASMP смешивали с модифицированной вакциной Поливак-ТМ. Концентрацию ASMP доводили до 400 мкг на 1 мл.

Вакцину, приготовляемую согласно данному способу, можно использовать, например, для профилактики и лечения дерматофитоза у животных.

Пример 48.

Кератиназу Pure 70, произведенную PROTEOS Biotech, 14 Almansa Street, 02006 Albacete, Испания, использовали для приготовления раствора, содержащего 2 U/мл. *Candida albicans* DSM-9456 культивировали на чашках с агаром, как описано в EP 0564620. Одной предпочтительной средой был, например, агар с экстрактом солода от Oxoïd. Образующуюся грибковую биомассу отрывали и обрабатывали водным раствором NaOH с концентрацией 3% (мас./об.). Щелочную обработку проводили при 80°C в течение 6 ч. После обработки при водных щелочных условиях твердую и жидкую фазы препарата разделяли центрифугированием при 3500 g. После щелочной обработки образующийся супернатант обрабатывали при кислотных водных условиях, например 50%-ной уксусной кислотой при pH 4,0 в течение 2 ч при температурах от 4 до 8°C, после чего происходило разделение твердого и жидкого слоев. Затем супернатант со стадии разделения подвергали стадии осаждения. Отношение один объем супернатанта к 3 объемам спирта приводило к хорошему осаждению антигенного материала. Наконец, препарат ASMP лиофилизировали.

Раствор кератиназы Pure 70 смешивали с водным раствором (например, со 100-500 мл 0,3%-ного раствора биологического материала, содержащего в его структуре линейный полисахарид N-ацетил-1,4-β-D-глюкопиранозамин, модифицированный парааминобензойной кислотой, приготовленный согласно примеру 8) (первая стадия). Концентрацию кератиназы Pure 70 доводили до 1-1,2 U на 1 мл. Добавляли

формалин с достижением 0,2% (об./об.) в конечной суспензии. Данную смесь инкубировали в течение 5-7 суток при 37°C. Наконец, твердую фазу ASMP отрывали и гомогенизировали в водной суспензии модифицированного линейного полисахарида N-ацетил-1,4-β-D-глюкопиранозамина. Концентрацию ASMP доводили до 200 мкг на 1 мл.

Вакцину, приготовляемую согласно данному способу, можно использовать, например, для профилактики и лечения дерматофитоза у животных.

Пример 49.

Культуру дерматофита вида *Microsporum canis* BINO 483 культивировали на агаре/сусле, например в 3-10 колбах Ру, в течение 21 суток при 26-28°C. Суспензию микроконидий культивировали в средах с кератином, и экзоантигены дерматофитов получали согласно патенту РФ (Российская Федерация) № 2219945 следующим образом: полученную суспензию с концентрацией микроконидий от 40×10^6 до 50×10^6 культивировали в течение 7 суток при перемешивании при температуре 29°C. Затем добавляли формалин с получением конечной концентрации 0,4%. Жидкую фазу разделяли тремя стадиями фильтрации - через металлическую сетку с ячейкой 200-300 мкм, затем через бумажный фильтр Whatman № 4 (размер от 20 до 25 мкм) и в конце через нейлоновый фильтр для стерилизации с размером пор 0,22 мкм, но в процессе консервирования формалином неожиданно обнаружили повышенную антигенную активность полученных фракций (АЕМР). АЕМР экзоантигенов дерматофитов отрывали и гомогенизировали в водном растворе (например, в 100-500 мл) 0,2%-ного раствора биологического материала, содержащего в его структуре линейный полисахарид N-ацетил-1,4-β-D-глюкопиранозамин, модифицированный парааминобензойной кислотой, согласно примеру 8. Концентрацию АЕМР доводили до 1-1,2 U на 1 мл. Формалин добавляли с достижением 0,2% (об./об.) в конечной суспензии. Данную смесь инкубировали в течение 5-7 суток при 37°C.

Вакцину, приготовляемую согласно данному способу, можно использовать, например, для профилактики и лечения дерматофитоза у животных.

Пример 50.

Культуру грибка вида *Chrisporium tropicum* DSM-28405 культивировали на агаре/сусле, например в 3-10 колбах Ру в течение 21 суток при 26-28°C. Затем полученную суспензию микроконидий культивировали в средах с кератином, и экзоантигены получали согласно патенту РФ № 2219945 следующим образом: полученную суспензию с концентрацией микроконидий от 50×10^6 до 60×10^6 культивировали в течение 7 суток при перемешивании при температуре 30°C. Затем добавляли формалин в конечной концентрации 0,4%. Жидкую фазу разделяли тремя стадиями фильтрации - через металлическую сетку с ячейкой 200-300 км, затем через бумажный фильтр Whatman № 4 (размер от 20 до 25 мкм) и в конце через нейлоновый фильтр для стерилизации с размером пор 0,22 мкм, но в процессе консервирования формалином неожиданно обнаружили повышенную антигенную активность фракций экзоантигенов (АЕМР). Растворимые экзоантигены АЕМР грибков отрывали и гомогенизировали в водном растворе (например, в 100-500 мл) 0,2%-ного раствора биологического материала, содержащего в его структуре линейный полисахарид N-ацетил-1,4-β-D-глюкопиранозамин, модифицированный парааминобензойной кислотой, согласно примеру 8. Концентрацию АЕМР доводили до 1-1,2 U на 1 мл. Формалин добавляли с достижением 0,2% (об./об.) в конечной суспензии. Данную смесь инкубировали в течение 5-7 суток при 37°C.

Вакцину, приготовляемую согласно данному способу, можно использовать, например, для лечения дерматофитоза и аллергических заболеваний у животных.

Пример 51.

Культуру дерматофита вида *Trichophyton verrucosum* DSM-28406 культивировали на агаре/сусле, например в 3-10 колбах Ру. Культуру культивировали в течение 15-30 суток при 26-28°C. Грибковые массы дерматофита отрывали и гомогенизировали в водном растворе (например, в 100-500 мл) 0,2%-ного раствора биологического материала, содержащего в его структуре линейный полисахарид N-ацетил-1,4-β-D-глюкопиранозамин, модифицированный хлоридом валериановой кислоты, согласно примеру 6. Концентрацию микроконидий доводили до 250-300 тысяч на 1 мл. Гомогенаты инактивировали добавлением формальдегида непосредственно в клеточную суспензию с достижением в конце 0,2% (об./об.). Данную смесь инкубировали в течение 5-7 суток при 37°C.

Вакцину, приготовляемую согласно данному способу, можно, например, использовать для профилактики и лечения межпальцевого и/или пальцевого дерматита, и/или межпальцевой флегмоны у животных.

Пример 52.

Культуру дерматофита вида *Trichophyton mentagrophytes* DSM-7279 культивировали на агаре/сусле, например в 3-10 колбах Ру. Культуру культивировали в течение 15-30 суток при 26-28°C. Грибковые массы дерматофита отрывали и гомогенизировали в водном растворе (например, в 100-500 мл) 0,2%-ного раствора биологического материала, содержащего в его структуре линейный полисахарид N-ацетил-1,4-β-D-глюкопиранозамин, модифицированный парааминобензойной кислотой, согласно примеру 8. Концентрацию микроконидий доводили до 250-300 тысяч на 1 мл. Гомогенаты инактивировали добавлением формальдегида непосредственно в клеточную суспензию с достижением в конце 0,2% (об./об.). Данную

смесь инкубировали в течение 5-7 суток при 37°C. Вакцину, приготовляемую согласно данному способу, можно, например, использовать для профилактики и лечения межпальцевого и/или пальцевого дерматита, и/или межпальцевой флегмоны у животных.

Пример 53.

Культуру дерматофита вида *Trichophyton verrucosum* DSM-28406 культивировали на агаре/сусле, например в 3-10 колбах Ру. Культуру культивировали в течение 15-30 суток при 26-28°C. Грибковые массы дерматофита отрывали и гомогенизировали в водном растворе (например, в 100-500 мл) 0,2%-ного раствора биологического материала, содержащего в его структуре линейный полисахарид N-ацетил-1,4-β-D-глюкопиранозамин, модифицированный глюкуроновой кислотой, согласно примеру 9. Концентрацию микроконидий доводили до 250-300 тысяч на 1 мл. Гомогенаты инактивировали добавлением формальдегида непосредственно в клеточную суспензию с достижением в конце 0,1% (об./об.). Данную смесь инкубировали в течение 5-7 суток при 37°C.

Вакцину, приготовляемую согласно данному способу, можно, например, использовать для профилактики и лечения межпальцевого и/или пальцевого дерматита, и/или межпальцевой флегмоны у животных.

Пример 54.

Первая стадия.

В качестве сырья использовали хитозан с деацетилированием 67-72%, вязкостью 151-350 мПа·с и молекулярной массой 150-300 кДа. 40 г данного полисахарида стерилизовали автоклавированием и добавляли при перемешивании 3,9 л 0,2%-ной парааминобензойной кислоты в воде для инъекции. Для получения суспензии геля добавляли при перемешивании 4н. раствор соляной кислоты, пока не был получен pH 5,6. Конечный объем доводили водой для инъекции до 4 л.

Суспензированный полисахарид перемешивали в стерильном контейнере в течение 72 ч, пока не была получена суспензия геля. Нерастворившиеся частицы удаляли фильтрованием через металлическую сетку с размером ячейки 200-300 мкм. *Candida albicans* DSM-9456 культивировали на чашках с агаром, как описано в EP 0564620. Одной предпочтительной средой был, например, агар с экстрактом солода от Oxoïd. Образующуюся грибковую биомассу отрывали и обрабатывали водным раствором NaOH с концентрацией 3% (мас./об.). Щелочную обработку проводили при 80°C в течение 6 ч. После обработки при водных щелочных условиях твердую и жидкую фазы препарата разделяли центрифугированием при 3500 g. После щелочной обработки образующийся супернатант обрабатывали при кислотных водных условиях, например 50%-ной уксусной кислотой при pH 4,0 в течение 2 ч при температуре от 4 до 8°C, после чего происходило разделение твердого и жидкого слоев. Затем супернатант со стадии разделения подвергали стадии осаждения. Осаждение проводили посредством добавления этанола. Отношение один объем супернатанта к 3 объемам спирта приводило к хорошему осаждению антигенного материала. Наконец, препарат ASMP лиофилизировали. Твердую фазу отрывали и гомогенизировали в продукте, полученном согласно примеру 6, но со следующим отличием на второй стадии.

Вторая стадия.

Для получения конечного продукта 0,3 л модифицированного полисахарида доводили до объема 2,5 л посредством добавления стерильной воды для инъекции при перемешивании. Затем добавляли в смесь 500 мл раствора тиомерсала, содержащего 0,24 г активного ингредиента. Образующуюся суспензию доводили до объема 6 л. Концентрацию ASMP доводили до 100 мкг на 1 мл.

Вакцину, приготовляемую согласно данному способу, можно использовать, например, для профилактики и лечения аллергий.

Пример 55.

Проводили анализ на присутствие глюканов.

Описание анализа.

1,3-β-D-анализы (Care Cod, США). Данный анализ проводили, как описано в инструкции изготовителя. Содержание глюкана в образцах антигенов определяли с использованием анализа Fungitell®, меченного SE, согласно инструкциям для сыворотки. Вкратце, данный анализ представляет собой колориметрический анализ на основе профермента протеазы, и в нем используется модификация пути лизата амебоцитов мечехвоста (LAL). Реактив Fungitell модифицируется для устранения фактора С и, таким образом, реагирует только с 1,3-β-D-глюканом. Неизвестные образцы смешивают с реактивом для анализа, и для всех точек данных на протяжении интервала 40 мин рассчитывают среднюю скорость изменения оптической плотности. Количество 1,3-β-D-глюкана в образцах может быть рассчитано посредством сравнения с полученной параллельно стандартной кривой.

Опытные растворы антигенов № 1-13 готовили в стерильной ddH₂O (бидистиллированная вода), и затем готовили дополнительные разведения в апиrogenной воде уровня качества для реактива LAL. На основе результатов тестирования эндотоксинов, в анализе Fungitell измеряли наивысшее разведение с выявляемым сгустком на геле и одно разведение выше и ниже его. Каждый образец измеряли в двойной повторности с 20 с интервалом всего в течение 40 мин.

Результаты анализа.

Для получения стандартной кривой готовили растворы 1,3-β-D-глюкана с концентрацией 100, 50, 25, 12,5 и 6,25 пг/мл, как рекомендовано изготовителем (фиг. 1). Измеренная кривая была линейной во всем интервале, и она удовлетворяет критериям принятия контроля качества (R^2 больше 0,980). Данная стандартная кривая показана на фиг. 1.

Таблица 1

На основе показанной выше кривой в опытных растворах проанализированных образцов были выявлены следующие содержания 1,3-β-D-глюкана

№	Пример	Содержание 1,3-β-D-глюкана	Проанализированные разведения на основе опытного раствора (жирный шрифт показывает разведение для расчета)
1	1	115 нг/мл	1:100, 1:1000, 1:10000
2	2	133 нг/мл	1:100, 1:1000, 1:10000
3	3	123 нг/мл	1:100, 1:1000, 1:10000
4	4	110 нг/мл	1:100, 1:1000, 1:10000
5	7	45 пг/мл	1:10, 1:100, 1:1000
6	20	55 пг/мл	1:10, 1:100, 1:1000
7	18	25 пг/мл	1:10, 1:100, 1:1000
8	20	21 пг/мл	1:10, 1:100, 1:1000
9	26	50 пг/мл	1:10, 1:100, 1:1000
10	27	70 пг/мл	1:10, 1:100, 1:1000
11	28	110 пг/мл	1:10, 1:100, 1:1000
12	29	90 пг/мл	1:10, 1:100, 1:1000
13	30	120 пг/мл	1:10, 1:100, 1:1000
14	31	132 пг/мл	1:10, 1:100, 1:1000

мг больше мкг больше нг больше пг

Пример 56.

Был проведен анализ на присутствие эндотоксинов.

Содержание эндотоксинов в образцах антигенов определяли с использованием гель-тромб способа согласно ЕР (Европейская Фармакопея) 2.6.14.

Опытные растворы антигенов № 1-7 готовили в стерильной H_2O , и затем получали разведения от 1:10 до 1:10000000 в апиrogenной воде уровня качества для реактива LAL. Разведения измеряли в двойной повторности, и концентрацию эндотоксина рассчитывали с использованием следующей формулы: концентрация эндотоксина = 0,06 IU/мл × кратность разведения с образованием по меньшей мере одного гель-тромба.

Данный полуколичественный анализ имеет чувствительность LAL 0,06 IU/мл. Результаты показаны в табл. 4.

Результаты анализа.

Таблица 2

№	Пример	Содержание эндотоксина [IU/мл]	Наивысшая кратность разведения с образованием гель-тромба
1	1	60-600	1:1000
2	2	60-600	1:1000
3	3	60-600	1:1000
4	4	60-600	1:1000
5	7	0,06-6	меньше 1:100
6	20	60-600	1:1000
7	18	6-60	1:100
8	20	0,06-6	меньше 1:100
9	26	0,06-6	меньше 1:100
10	27	0,06-6	меньше 1:100
11	28	0,06-6	меньше 1:100
12	29	0,06-6	меньше 1:100
13	30	0,06-6	меньше 1:100
14	31	0,06-6	меньше 1:100

IU - международные (эндотоксиновые) единицы.

Пример 57.

Провели анализ противомикробной активности.

Описание анализа.

Противомикробную активность соединений анализировали посредством "Анализа эффективности противомикробной консервации" согласно следующей методике. Для подсчета жизнеспособных микроорганизмов в инокулированных продуктах использовали агаризованную среду, используемую для исходного культивирования соответствующих микроорганизмов. Каждый из серии контейнеров с продуктом, подлежащим анализу, инокулировали суспензией одного из опытных организмов с получением инокулята из 10^5 - 10^6 микроорганизмов на 1 мл или на 1 г препарата. Объем суспензии инокулята не превышал 1 процент от объема продукта. Для обеспечения гомогенного распределения его тщательно перемешивали. Инокулированный продукт поддерживали при 20-25°C, защищенным от света. Подходящий образец удаляли из каждого контейнера, типично 1 мл или 1 г, в час ноль и с подходящими интервалами согласно типу продукта, и число жизнеспособных микроорганизмов определяли посредством чашечного способа или мембранной фильтрации (2.6.12). Обеспечивали то, что любая остаточная противомикробная активность продукта устранялась разведением, посредством фильтрования или посредством применения специфичного инактиватора. При использовании методик разведения делали надлежащую поправку на пониженную чувствительность при выделении малого количества жизнеспособных микроорганизмов. При использовании специфичного инактиватора способность системы поддерживать рост тестируемых организмов подтверждали применением подходящих контролей. Данная методика была утверждена для подтверждения ее способности демонстрировать требуемое уменьшение числа жизнеспособных микроорганизмов.

Вкратце, каждый из 4×10 мл опытного раствора (приготовленного с ddH₂O) инокулировали с 0,1 мл (1% об./об.) опытных микроорганизмов *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* и *Aspergillus brasiliensis*. Через 6 hpi (часов после инокуляции), 24 hpi, 7 dpi (суток после инокуляции) и 14 dpi образцы отбирали, и число жизнеспособных микроорганизмов определяли посредством посева серий разведения на чашки с агаром. Перед определением эффективности анализа было доказано устранение предположительной остаточной противомикробной активности опытных соединений посредством разведения.

Таблица 3

Время	Микроорганизм	Соединение согласно Примеру 6	Соединение согласно Примеру 8	Соединение согласно Примеру 15
		Выделенные жизнеспособные микроорганизмы и факторы снижения в log ₁₀ [КОЕ/мл]		
0 hpi	<i>P. a.</i>	2,00	2,30	2,40
	<i>S. a.</i>	3,97	4,30	4,50
	<i>C. a.</i>	5,18	4,82	4,95
	<i>A. b.</i>	5,79	5,72	5,79
6 hpi	<i>P. a.</i>	0,00 (2,00)	0,00 (2,30)	0,00 (2,30)
	<i>S. a.</i>	0,00 (3,97)	2,74(1,56)	0,00(2,30)
	<i>C. a.</i>	3,04 (2,14)	0,00 (4,82)	0,00 (4,82)
	<i>A. b.</i>	5,70 (0,09)	5,61 (0,11)	5,61 (0,11)
24 hpi	<i>P. a.</i>	0,00 (2,00)	0,00 (2,30)	0,00 (2,30)
	<i>S. a.</i>	1,20 (2,77)	1,82 (2,48)	1,82 (2,48)
	<i>C. a.</i>	0,00 (5,18)	0,00 (4,82)	0,00 (4,82)
	<i>A. b.</i>	5,70 (0,09)	5,75 (-0,03)	5,75 (-0,03)
7 dpi	<i>P. a.</i>	0,00 (2,00)	0,00 (2,30)	0,00 (2,30)
	<i>S. a.</i>	0,00 (3,97)	0,00 (4,30)	0,00 (4,30)
	<i>C. a.</i>	0,00 (5,18)	0,00 (4,82)	0,00 (4,82)
	<i>A. b.</i>	5,82 (-0,03)	5,83 (-0,11)	5,83 (-0,11)
14 dpi	<i>P. a.</i>	0,00 (2,00)	0,00 (2,30)	0,00 (2,30)
	<i>S. a.</i>	0,00 (3,97)	0,00 (4,30)	0,00 (4,30)
	<i>C. a.</i>	0,00 (5,18)	0,00 (4,82)	0,00 (4,82)
	<i>A. b.</i>	5,89 (-0,10)	5,72 (0,00)	5,72 (0,00)

P. a., *Pseudomonas aeruginosa*; *S. a.*, *Staphylococcus aureus*; *C. a.*, *Candida albicans*; *A. b.*, *Aspergillus brasiliensis*; множители уменьшения по отношению к 0 hpi указаны в скобках.

Пример 58.

Лечили коров с латентным (субклиническим) маститом. Диагноз был поставлен посредством применения обычной методики с 2%-ным раствором мастидина. Животных делили на 13 групп с 6 животными в каждой группе. Все группы коров лечили 10 мл препарата с двукратным введением интрацистернально с интервалом 24 ч. Всех животных подвергали повторному анализу с использованием 2%-ного раствора мастидина посредством стандартной методики в сутки 7 и 14.

Результаты показаны в табл. 4.

№ группы	№ примера	Число животных	Частота введения лекарственного средства	Количество здоровых животных	
				в сутки 7 после последнего введения	в сутки 14 после последнего введения
1	1	6	2	3	4
2	2	6	2	4	4
3	3	6	2	3	3
4	4	6	2	3	3
5	5	6	2	3	3
6	6	6	2	4	3
7	7	6	2	4	4
8	8	6	2	4	4
9	9	6	2	4	4
10	10	6	2	4	4
11	11	6	2	4	4
12	12	6	2	4	4
13	16	6	2	4	4

Пример 59.

Лечили коров с латентным (субклиническим) маститом. Диагноз был поставлен посредством обычной методики с 2%-ным раствором мастидина. Животных делили на 14 групп с 10 животными в каждой группе. Все группы коров лечили 10 мл препарата с трехкратным введением интрацистернально с интервалом 24 ч. Всех животных подвергали повторному анализу с использованием 2%-ного раствора мастидина посредством стандартной методики в сутки 5.

Результаты показаны в табл. 5.

№ группы	№ примера	Число животных	Частота введения лекарственного средства	Количество здоровых животных
				в сутки 5 после последнего введения
1	8	10	3	6
2	13	10	3	6
3	14	10	3	5
4	16	10	3	8
5	17	10	3	5
6	18	10	3	6
7	19	10	3	5
8	20	10	3	6
9	25	10	3	8
10	26	10	3	6
11	27	10	3	6
12	32	10	3	10
13	33	10	3	10
14	34	10	3	10

Пример 60.

Лечили коров с латентным (субклиническим), клиническим маститом и гнойно-катаральным эндометритом. Диагноз был поставлен посредством обычной методики с использованием 5%-ного раствора димастина для мастита и клинических симптомов для эндометрита. Всем коровам вводили 10 мл препарата, изготовленного согласно примеру 13, интрацистернально или внутриматочно, дважды или трижды

с интервалом 24 ч. Всех животных подвергали повторному анализу с использованием 5%-ного раствора димастина посредством стандартной методики и клинического обследования в сутки 7.

Результаты показаны в табл. 6.

№	Идентификационный № (Id) животного	Заболевание	Частота введения лекарственного средства	в сутки 7 после последнего введения
1	2273	Клинический мастит	3	Выздоровление
2	2547	Клинический мастит	2	Выздоровление
3	2234	Клинический мастит	3	Выздоровление
4	2451	Латентный мастит	3	Выздоровление
5	2664	Латентный мастит	3	Выздоровление и рецидив в сутки 5
6	2510	Латентный мастит	3	Выздоровление
7	2523	Гнойно-катаральный эндометрит	3	Выздоровление
8	2653	Латентный мастит	3	Выздоровление
9	2463	Латентный мастит	3	Выздоровление

Пример 61.

Лечили коров с латентным (субклиническим) маститом. Диагноз был поставлен посредством обычной методики с использованием 5%-ного раствора димастина для мастита и клинических симптомов для эндометрита. Всем коровам вводили 10 мл препарата, изготовленного согласно примеру 26, интрацистернально или внутриматочно, дважды или трижды с интервалом 24 ч. Всех животных подвергали повторному анализу с использованием 5%-ного раствора димастина посредством стандартной методики и клинического обследования в сутки 7.

Результаты показаны в табл. 7.

№	Id № животного	Заболевание	Частота введения лекарственного средства	в сутки 1 после последнего введения
1	1201	Латентный мастит	3	Латентный мастит
2	9262	Латентный мастит	3	Выздоровление
3	1180	Латентный мастит	3	Выздоровление
4	5324	Латентный мастит	3	Латентный мастит
5	1101	Латентный мастит	3	Выздоровление
6	1363	Латентный мастит	3	Латентный мастит
7	9249	Латентный мастит	3	Выздоровление
8	9210	Латентный мастит	3	Выздоровление
9	7250	Латентный мастит	3	Латентный мастит
10	0127	Латентный мастит	3	Выздоровление

Таким образом, полученный иммунобиологический препарат делает возможным лечение мастита коров, что может широко использоваться в осуществлении контроля этого широко распространенного заболевания.

Пример 62.

Лечили коров с латентным (субклиническим) маститом. Диагноз был поставлен посредством обычной методики с использованием 5%-ного раствора димастина для мастита и клинических симптомов для эндометрита. Всем коровам вводили 10 мл препарата, изготовленного согласно примеру 26, интрацистернально или внутриматочно, дважды или трижды с интервалом 24 ч. Всех животных подвергали повторному анализу с использованием 5%-ного раствора димастина посредством стандартной методики и клинического обследования в сутки 7. После лечения выздоравливало 59% животных.

Количество животных	Заболевание	Число четвертей матки с маститом	Частота введения лекарственного средства	в сутки 1 после последнего введения
53	Латентный мастит	1	3	Выздоровление
6	Латентный мастит	2	3	Выздоровление
36	Латентный мастит	1	3	Латентный мастит
5	Латентный мастит	2	3	Латентный мастит

Пример 63.

Коров с клиническим доказательством хромоты, поражений межпальцевой области, которые типичны для DD, ID и IP, лечили разными лекарственными средствами. Терапевтическое применение вакцины: 3 раза с интервалом 7 суток с дозой 5 мл. Вакцину готовили согласно примерам 45, 40 и 6.

Клиническое проявление заболевания:

+ выздоравливающие или серые, нет боли,

++ в состоянии излечения, меньше 2 см, желтые, легкая боль,

+++ поражения больше 2 см, желтые, умеренная боль,

++++ острое заболевание, больше 2 см, красные, значительная боль.

Результаты показаны в табл. 9.

№ группы	№ примера	Число животных/ клиническое проявление	Частота введения лекарственного средства	Количество здоровых животных	
				В 30-35 суток после первого применения	В 53-55 суток после первого применения
1	45	10/ 6 ++ 4 +++	3	10	10
2	40	10/ 5 ++ 4 +++ 1 ++++	3	10	10
3	6	10/ 7 ++ 3 +++	3	10	10

Не наблюдали общей или местной реакции после применения. Эффективность вакцинации составляла примерно 100%

Пример 64.

Коров с клиническим доказательством хромоты, поражений межпальцевой области, которые типичны для DD, ID и IP, лечили разными лекарственными средствами. Терапевтическое применение вакцины: 3 раза с интервалом 10 суток вакцины, полученной согласно примеру 45.

Клиническое проявление заболевания:

+ выздоравливающие или серые, нет боли,

++ в состоянии излечения, меньше 2 см, желтые, легкая боль,

+++ поражения больше 2 см, желтые, умеренная боль,

++++ острое заболевание, больше 2 см, красные, значительная боль.

Результаты показаны в табл. 10.

№ группы	Количество животных	Число животных с клиническим проявлением	Частота введения лекарственного средства/ доза	Количество животных с клиническим проявлением	
				В 33 суток после первого применения	В 60 суток после первого применения
1	17	5 ++ 12 ++++	3/ 5 мл	11/+ 7/++	17/+

2	23	7 ++ 8 +++ 8 ++++	3/ 2,5 мл	9/+ 5/++ 9/+++	23/+
---	----	-------------------------	-----------	----------------------	------

Не наблюдали общей или местной реакции после применения. Эффективность вакцинации составляла примерно 80-100% после применения вакцины в дозе 5 мл.

Пример 65.

Коров с клиническим доказательством хромоты, поражений межпальцевой области, которые типичны для DD, ID и IP, лечили разными лекарственными средствами. Терапевтическое применение вакцины: 3 раза с интервалом 10 суток вакцины, полученной согласно примеру 45.

Клиническое проявление заболевания:

+ выздоравливающие или серые, нет боли,

++ в состоянии излечения, меньше 2 см, желтые, легкая боль,

+++ поражения больше 2 см, желтые, умеренная боль,

++++ острое заболевание, больше 2 см, красные, значительная боль.

Результаты показаны в табл. 11.

№ группы	Количество животных	Число животных с клиническим проявлением	Частота введения лекарственного средства/ доза	Количество животных с клиническим проявлением	
				В 51 сутки после первого применения	после первого применения
1	19	19 ++++	3/ 5 мл	5/+ 7/++ 5/+++ 2 – отобраны для забоя	
2	18	18 ++++	3/ 3,0 мл	1/+ 4/++ 6/+++ 2/++++ 5 – отобраны для забоя	

Не наблюдали общей или местной реакции после применения. Эффективность вакцинации составляла примерно 60-63% после применения вакцины в дозе 5 мл.

Пример 66.

Коров с клиническим доказательством хромоты, поражений межпальцевой области, которые типичны для DD, ID и IP, лечили разными лекарственными средствами.

Терапевтическое применение вакцины: 3 раза с интервалом 7 суток в дозе 5 мл. Вакцину получали согласно примерам 38, 39, 40 и 44.

Клиническое проявление заболевания:

+ выздоравливающие или серые, нет боли,

++ в состоянии излечения, меньше 2 см, желтые, легкая боль,

+++ поражения больше 2 см, желтые, умеренная боль,

++++ острое заболевание, больше 2 см, красные, значительная боль.

Результаты показаны в табл. 12.

№ группы	№ примера	Число животных/ клиническое проявление	Частота введения лекарственного средства	Количество здоровых животных	
				В 30-35 суток после первого применения	В 53-55 суток после первого применения
1	38	10/ 5 ++ 5 +++	3	5/+ 5/++	7/+ 3/++
2	39	10/ 5 ++ 5 +++	3	6/+ 4/++	6/+ 4/++
3	40	10/ 6 ++ 4 +++	3	5/+ 5/++	7/+ 3/++
4	44	10/ 4 ++ 6 +++	3	4/+ 5/++ 1/+++	6/+ 4/++

Не наблюдали общей или местной реакции после применения. Эффективность вакцинации составляла примерно от 60 до 70% во всех группах вакцинируемых.

Пример 67.

Коров с клиническим доказательством хромоты, поражений межпальцевой области, которые типичны для DD, ID и IP, лечили разными лекарственными средствами. Терапевтическое применение вакцины: 3 раза, 0,4 мл внутривожно с интервалом 7 суток. Вакцину получали согласно примерам 51 и 52.

Клиническое проявление заболевания:

+ выздоравливающие или серые, нет боли,

++ в состоянии излечения, меньше 2 см, желтые, легкая боль,

+++ поражения больше 2 см, желтые, умеренная боль,

++++ острое заболевание, больше 2 см, красные, значительная боль.

Результаты показаны в табл. 13.

№ группы	№ примера	Число животных/ клиническое проявление	Частота введения лекарственного средства	Количество здоровых животных	
				В 35-40 суток после первого применения	В 55-60 суток после первого применения
1	51	100/	3	50/+	70/+
		50 ++		50/++	30/++
		50 +++			
2	52	100/	3	60/+	60/+
		50 ++		40/++	40/++
		50 +++			

Не наблюдали общей и местной реакции после применения. Эффективность вакцинации составляла примерно от 60 до 70% во всех группах вакцинированных.

Пример 68.

Исследование по титрованию дозы. Осуществляли вакцинацию коров против DD, ID и IP. Профилактическое применение вакцины: 2 раза с интервалом 10 суток вакцины, полученной согласно примеру 6.

Исследовали клиническое проявление заболевания:

+ выздоравливающие или серые, нет боли,

++ в состоянии излечения, меньше 2 см, желтые, легкая боль,

+++ поражения больше 2 см, желтые, умеренная боль,

++++ острое заболевание, больше 2 см, красные, значительная боль.

Результаты показаны в табл. 14.

73 суток после применения		
Доза 1 мл 100 животных	Доза 2,5 мл 100 животных	Контроль 215 животных
7 животных +	7 животных +	21 животное +
		18 животных ++
		6 животных +++

Не наблюдали общих и местных реакций после применения вакцины.

Эффективность вакцинации дозами 1 и 2,5 мл в этот раз составляла примерно 93%. 45 животных (примерно 21%) из контрольной группы были с клиническими симптомами DD, ID и IP.

Результаты показаны в табл. 15.

107 суток после применения вакцины		
Доза 1 мл 100 животных	Доза 2,5 мл 100 животных	Контроль 215 животных
7 животных +	9 животных +	11 животных +
		12 животных ++
4 животных – отобраны для забоя	4 животных – отобраны для забоя	9 животных +++ 27 животных – отобраны для забоя

Эффективность вакцинации дозами 1 и 2,5 мл в этот раз составляла примерно 87-89%. 59 животных

(примерно 27%) из контрольной группы были с клиническими симптомами DD, ID и IP. Результаты показаны в табл. 16.

170 суток после применения вакцины		
Доза 1 мл 100 животных	Доза 2,5 мл 100 животных	Контроль 215 животных
25 животных +	41 животное +	112 животных +
Дополнительные 6 животных – отобраны для забоя	Дополнительные 3 животных – отобраны для забоя	Дополнительные 42 животных – отобраны для забоя

Эффективность вакцинации дозами 1 мл составляла примерно 70% и 2,5 мл - примерно 53%. 154 животных (примерно 72%) из контрольной группы были с клиническими симптомами DD, ID и IP.

Данное исследование продемонстрировало профилактическую вакцинацию животных дозой 1,0 мл. Продолжительность иммунитета составляла примерно 5,5 месяцев.

Пример 69.

Осуществляли вакцинацию коров против DD, ID и IP. Профилактическое применение вакцины: 3 раза внутривенно дозой 0,4 мл с интервалом 10 суток вакцины, полученной согласно примеру 51.

Резюме исследования.

Были вакцинированы животные в группе 1.

Наблюдение перед вакцинацией.

Количество животных/клинических проявлений DD, ID и IP 200/100

В 160-175 суток после последней вакцинации

Количество животных/количество конечностей с хромотой 200/20

Количество здоровых животных 180

Эффективность вакцинации 90%

Животных в группе 2 не вакцинировали (контроль)

Наблюдение перед вакцинацией

Количество животных/клинических проявлений DD, ID и IP 200/100

В 160-175 суток после последнего применения плацебо

Количество животных/количество животных с проявлениями
клинических симптомов DD, ID и IP 200/132

Количество здоровых животных 68

Количество больных животных на протяжении времени наблюдения 66%

Всех животных с клиническим симптомом заболеваний лечили местным нанесением асептического лекарственного средства или антибиотиков. В случае IP использовали внутримышечную инъекцию антибиотиков.

Пример 70.

Осуществляли вакцинацию коров против DD, ID и IP. Профилактическое применение вакцины: 3 раза внутривенно дозой 0,4 мл с интервалом 10 суток вакцины, полученной согласно примеру 52.

Резюме исследования.

Были вакцинированы животные в группе 1.

Наблюдение перед вакцинацией.

Количество животных/клинических проявлений DD, ID и IP 150/80

В 160-190 суток после последней вакцинации

Количество животных/количество конечностей с хромотой 150/15

Количество здоровых животных 135

Эффективность вакцинации 90%

Животных в группе 2 не вакцинировали (контроль)

Наблюдение перед вакцинацией

Количество животных/клинических проявлений DD, ID и IP 150/70

В 160-175 суток после последнего применения плацебо

Количество животных/количество животных с проявлениями
клинических симптомов DD, ID и IP 150/118

Количество здоровых животных 32

Количество больных животных на протяжении времени наблюдения 78,7%

Всех животных с клиническим симптомом заболеваний лечили местным нанесением асептического лекарственного средства или антибиотиков. В случае IP использовали внутримышечную инъекцию антибиотиков.

Пример 71. Эффективность вакцинации после заражения *Trichophyton* и *Microsporum* у морских свинок (данный способ был описан в WO 98/15284).

Заражение микроконидиями *Trichophyton mentagrophytes* и *Microsporum canis* заключалось в местном нанесении на каждое животное 100-200 тысяч микроконидий на 1 см² (300-600 тысяч микроконидий). Заражение *Trichophyton verrucosum* заключалось в местном нанесении на каждое животное 500 тысяч микроконидий на 1 см² (1,5 млн микроконидий). Одну дозу 1,0 мл вакцины применяли посредством внутримышечной инъекции в те же самые сутки, что и заражение, а вторую дозу - через 7 суток. Наблюдение продолжали в течение 4 недель после исходной инъекции вакцины. Тестировали вакцины, полученные согласно примерам 38, 39, 46, 47, 48, 49, 50 (см. табл. 17-30).

Одну дозу 1,0 мл вакцины применяли посредством внутримышечной инъекции в те же самые сутки, что и заражение, а вторую дозу - через 7 суток. Наблюдение продолжали в течение 4 недель после исходной инъекции вакцины.

Суспензия клеток заражающего штамма.

Для инфицирования животных в качестве грибковых патогенов использовали *Trichophyton verrucosum* (Tv), *Trichophyton mentagrophytes* (Tm) и *Microsporum canis* (Mc). Данные об этих штаммах показаны ниже.

<u>1. Вид:</u>	<i>Trichophyton verrucosum</i>
Номер штамма:	1220
Объем:	0,5 мл
Инфекционная доза (1000 клеток):	500-600/см ²
Площадь кожи для инфекции:	2-4 см
<u>2. Вид:</u>	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>
Номер штамма:	1440
Объем:	0,5 мл
Инфекционная доза (1000 клеток):	100-200/см ²
Площадь кожи для инфекции:	2-4 см ²
<u>3. Вид:</u>	<i>Microsporum canis</i>
Номер штамма:	724
Объем:	0,5 мл
Инфекционная доза (1000 клеток):	100-200/см ²
Площадь кожи для инфекции:	2-4 см ²

Оценка грибковой инфекции.

На 7-, 15-, 22-, 29- и 36-е сутки исследования животных наблюдали, и клинические симптомы оценивали на основе следующей бальной системы:

0 - нет симптомов,

1 - гиперемия кожи в области грибковой инфекции,

2 - одиночные пятна чешуек,

3 - чешуйки кожи в области грибковой инфекции,

4 - тонкие маленькие струпы в области грибковой инфекции,

5 - коростовидные струпы в области грибковой инфекции.

Схема лечения 1.

Группа	Сутки 1	Сутки 15	Сутки 22	Сутки 29	Сутки 36
	Вакцинация Заражение	Вакцинация 1-е наблюдение	2-е наблюдение	3-е наблюдение	4-е наблюдение
Пример 38	1-я инъекция вакцины: внутримышечная, 1 мл	2-я инъекция вакцины: внутримышечная, 1 мл			

	Заражение: нанесение суспензии клеток грибка на кожу	Оценка клинических симптомов инфекции <i>Trichophyton verrucosum</i>	
Пример 39	1-я инъекция вакцины: внутримышечная, 1 мл Заражение: нанесение суспензии клеток грибка на кожу	2-я инъекция вакцины: внутримышечная, 1 мл	
		Оценка клинических симптомов инфекции <i>Trichophyton verrucosum</i>	
Пример 50	1-я инъекция вакцины: внутримышечная, 1 мл Заражение: нанесение суспензии клеток грибка на кожу	2-я инъекция вакцины: внутримышечная, 1 мл	
		Оценка клинических симптомов инфекции <i>Trichophyton verrucosum</i>	
Контроль	1-я инъекция растворителя: внутримышечная, 1 мл	2-я инъекция растворителя: внутримышечная, 1 мл	
		Оценка клинических симптомов инфекции <i>Trichophyton verrucosum</i>	
	Заражение: нанесение суспензии клеток грибка на кожу	Оценка клинических симптомов инфекции <i>Trichophyton verrucosum</i>	

Схема лечения 2.

Группа	Сутки 1	Сутки 15	Сутки 22	Сутки 29	Сутки 36
	Вакцинация Заражение	Вакцинация 1-е наблюдение	2-е наблюдение	3-е наблюдение	4-е наблюдение
Пример 46	1-я инъекция вакцины: внутримы- шечная, 1 мл Заражение: нанесение суспензии клеток грибка на кожу	2-я инъекция вакцины: внутримы- шечная, 1 мл	Оценка клинических симптомов инфекции <i>Trichophyton mentagrophytes</i>		
Пример 47	1-я инъекция вакцины: внутримы- шечная, 1 мл Заражение: нанесение суспензии клеток грибка на кожу	2-я инъекция вакцины: внутримы- шечная, 1 мл	Оценка клинических симптомов инфекции <i>Trichophyton mentagrophytes</i>		
Пример 50	1-я инъекция вакцины: внутримы- шечная, 1 мл Заражение: нанесение суспензии клеток грибка на кожу	2-я инъекция вакцины: внутримы- шечная, 1 мл	Оценка клинических симптомов инфекции <i>Trichophyton mentagrophytes</i>		
Контроль	1-я инъекция растворите- ля: внутримы- шечная, 1 мл Заражение: нанесение суспензии клеток грибка на кожу	2-я инъекция растворите- ля: внутримы- шечная, 1 мл	Оценка клинических симптомов инфекции <i>Trichophyton mentagrophytes</i>		

Схема лечения 3.

Группа	Сутки 1	Сутки 15	Сутки 22	Сутки 29	Сутки 36
	Вакцинация Заражение	Вакцинация 1-е наблюдение	2-е наблюдение	3-е наблюдение	4-е наблюдение
Пример 48	1-я инъекция вакцины: внутримышечная, 1 мл Заражение: нанесение суспензии клеток грибка на кожу	2-я инъекция вакцины: внутримышечная, 1 мл	Оценка клинических симптомов инфекции <i>Microsporium canis</i>		
Пример 49	1-я инъекция вакцины: внутримышечная, 1 мл Заражение: нанесение суспензии клеток грибка на кожу	2-я инъекция вакцины: внутримышечная, 1 мл	Оценка клинических симптомов инфекции <i>Microsporium canis</i>		
Пример 50	1-я инъекция вакцины: внутримышечная, 1 мл Заражение: нанесение суспензии клеток грибка на кожу	2-я инъекция вакцины: внутримышечная, 1 мл	Оценка клинических симптомов инфекции <i>Microsporium canis</i>		
Контроль	1-я инъекция растворителя: внутримышечная, 1 мл Заражение: нанесение суспензии клеток грибка на кожу	2-я инъекция растворителя: внутримышечная, 1 мл	Оценка клинических симптомов инфекции <i>Microsporium canis</i>		

Таблица 17

Клинические симптомы заболевания *Trichophyton verrucosum* у морских свинок

	Дата наблюдения				
		Сутки 15	Сутки 22	Сутки 29	Сутки 36
Вакцина, приготовленная согласно					
Примеру 38	среднее	2,2	3,4	1,4	0
Примеру 39	среднее	3,0	3,2	1,0	0
Необработанный контроль	среднее	2,4	4,0	4,0	2,2

Тяжесть клинических симптомов инфекции *Trichophyton verrucosum* у зараженных морских свинок показана после разных периодов наблюдения. По сравнению с вакцинированными животными невакцинированные контрольные животные имели более тяжелые клинические симптомы в 29 и 36 суток.

Таблица 18

Число морских свинок с клиническими симптомами заболевания *Trichophyton verrucosum*

Группа	Комплекс / вакцина	Дата наблюдения			
		Сутки 15	Сутки 22	Сутки 29	Сутки 36
1	Пример 38	3/5	5/5	3/5	0/5
2	Пример 39	3/5	5/5	1/5	0/5
3	Необработанный контроль	4/5	5/5	5/5	4/5

(Примечание: число животных с клиническими симптомами/число зараженных.) По сравнению с контрольной группой меньше вакцинированных животных имело клинические симптомы в сутки 29 и 36.

Таблица 19

Клинические симптомы заболевания *Trichophyton mentagrophytes* у морских свинок

	Дата наблюдения				
		Сутки 15	Сутки 22	Сутки 29	Сутки 36
Вакцина, полученная согласно					
Примеру 46	среднее	3,0	3,2	1,6	0
Примеру 47	среднее	3,0	3,6	1,2	0
Необработанный контроль	среднее	4,0	4,8	3,8	2,0

Тяжесть клинических симптомов инфекции *Trichophyton mentagrophytes* у зараженных морских свинок показана после разных периодов наблюдения. По сравнению с вакцинированными животными невакцинированные контрольные животные имели более тяжелые клинические симптомы в 29 и 36 суток.

Таблица 20

Число морских свинок с клиническими симптомами заболевания *Trichophyton mentagrophytes*

Группа	Комплекс / вакцина	Дата наблюдения			
		Сутки 15	Сутки 22	Сутки 29	Сутки 36
1	Пример 46	5/5	5/5	5/5	0/5
2	Пример 47	5/5	5/5	3/5	0/5
3	Необработанный контроль	5/5	5/5	5/5	4/4

(Примечание: число животных с клиническими симптомами/число зараженных.) По сравнению с контрольной группой меньше вакцинированных животных имело клинические симптомы в сутки 29 и 36.

Таблица 21

Клинические симптомы заболевания *Microsporum canis* у морских свинок

	Дата наблюдения				
		Сутки 15	Сутки 22	Сутки 29	Сутки 36
Вакцина, приготовленная согласно					
Примеру 46	среднее	3,2	3,8	2,0	0,2
Примеру 47	среднее	3,2	3,4	1,8	0
Необработанный контроль	среднее	3,4	4,2	2,2	2,0

Тяжесть клинических симптомов инфекции *Microsporum canis* у зараженных морских свинок показана после разных периодов наблюдения. По сравнению с вакцинированными животными невакциниро-

ванные контрольные животные имели более тяжелые клинические симптомы в 36 суток.

Таблица 22

Число морских свинок с клиническими симптомами заболевания *Microsporum canis*

Группа	Комплекс / вакцина	Дата наблюдения			
		Сутки 15	Сутки 22	Сутки 29	Сутки 36
1	Пример 46	5/5	5/5	4/5	1/5
2	Пример 47	5/5	5/5	4/5	0/5
3	Необработанный контроль	5/5	5/5	4/5	4/4

(Примечание: число животных с клиническими симптомами/число зараженных.) По сравнению с контрольной группой меньше вакцинированных животных имело клинические симптомы в сутки 36.

Таблица 23

Клинические симптомы заболевания *Microsporum canis* у морских свинок

Вакцина, приготовленная согласно		Дата наблюдения			
		Сутки 15	Сутки 22	Сутки 29	Сутки 36
Примеру 48	среднее	3,4	3,6	1,0	0
Примеру 49	среднее	3,0	3,2	1,6	0
Необработанный контроль	среднее	3,6	4,2	2,2	2,2

Тяжесть клинических симптомов инфекции *Microsporum canis* у зараженных морских свинок показана после разных периодов наблюдения. По сравнению с вакцинированными животными невакцинированные контрольные животные имели более тяжелые клинические симптомы в 29 и 36 суток.

Таблица 24

Число морских свинок с клиническими симптомами заболевания *Microsporum canis*

Группа	Комплекс / вакцина	Дата наблюдения			
		Сутки 15	Сутки 22	Сутки 29	Сутки 36
1	Пример 48	4/5	5/5	3/5	0/5
2	Пример 49	4/5	5/5	4/5	0/5
3	Необработанный контроль	5/5	5/5	4/5	4/5

(Примечание: число животных с клиническими симптомами/число зараженных.) По сравнению с контрольной группой меньше вакцинированных животных имело клинические симптомы в сутки 29 и 36.

Таблица 25

Клинические симптомы заболевания *Trichophyton verrucosum* у морских свинок

Вакцина, приготовленная согласно		Дата наблюдения			
		Сутки 15	Сутки 22	Сутки 29	Сутки 36
Примеру 50	среднее	2,2	3,6	1,6	0
Необработанный контроль	среднее	2,2	4,2	4,0	2,0

Тяжесть клинических симптомов инфекции *Trichophyton verrucosum* у зараженных морских свинок показана после разных периодов наблюдения. По сравнению с вакцинированными животными невакцинированные контрольные животные имели более тяжелые клинические симптомы в 29 и 36 суток.

Таблица 26

Число морских свинок с клиническими симптомами заболевания *Trichophyton verrucosum*

Группа	Комплекс / вакцина	Дата наблюдения			
		Сутки 15	Сутки 22	Сутки 29	Сутки 36
1	Пример 50	3/5	5/5	2/5	0/5
2	Необработанный контроль	4/5	5/5	5/5	3/5

(Примечание: число животных с клиническими симптомами/число зараженных.) По сравнению с контрольной группой меньше вакцинированных животных имело клинические симптомы в сутки 29 и 36.

Таблица 27

Клинические симптомы заболевания *Trichophyton mentagrophytes* у морских свинок

		Дата наблюдения			
Вакцина, приготовленная согласно		Сутки 15	Сутки 22	Сутки 29	Сутки 36
Примеру 50	среднее	3,0	3,4	2,0	0
Необработанный контроль	среднее	4,0	4,8	4,0	2,0

Тяжесть клинических симптомов инфекции *Trichophyton mentagrophytes* у зараженных морских свинок показана после разных периодов наблюдения. По сравнению с вакцинированными животными невакцинированные контрольные животные имели более тяжелые клинические симптомы в 29 и 36 суток.

Таблица 28

Число морских свинок с клиническими симптомами заболевания *Trichophyton mentagrophytes*

		Дата наблюдения			
Группа	Комплекс / вакцина	Сутки 15	Сутки 22	Сутки 29	Сутки 36
1	Пример 50	3/5	5/5	5/5	0/5
2	Необработанный контроль	4/5	5/5	5/5	4/5

(Примечание: число животных с клиническими симптомами/число зараженных.) По сравнению с контрольной группой меньше вакцинированных животных имели клинические симптомы в сутки 29 и 36.

Таблица 29

Клинические симптомы заболевания *Microsporum canis* у морских свинок

		Дата наблюдения			
Вакцина, приготовленная согласно		Сутки 15	Сутки 22	Сутки 29	Сутки 36
Примеру 50	среднее	3,2	3,4	1,0	0
Необработанный контроль	среднее	3,8	4,0	2,4	2,0

Тяжесть клинических симптомов инфекции *Microsporum canis* у зараженных морских свинок показана после разных периодов наблюдения. По сравнению с вакцинированными животными невакцинированные контрольные животные имели более тяжелые клинические симптомы в 29 и 36 суток.

Таблица 30

Число морских свинок с клиническими симптомами заболевания *Microsporum canis*

		Дата наблюдения			
Группа	Комплекс / вакцина	Сутки 15	Сутки 22	Сутки 29	Сутки 36
1	Пример 50	4/5	5/5	3/5	0/5
2	Необработанный контроль	4/5	5/5	4/5	4/5

(Примечание: число животных с клиническими симптомами/число зараженных.) По сравнению с контрольной группой меньше вакцинированных животных имели клинические симптомы в сутки 29 и 36.

Пример 72. Эффективность лечения аллергических заболеваний.

Таблица 31

Динамика интенсивности клинических симптомов аллергического бронхита у лошадей после применения вакцины, приготовленной согласно примеру 41 (экспериментальная группа) и без вакцинации (контрольная группа)

Группа животных	№	Сутки 1	Сутки 15	Сутки 22	Сутки 29	Сутки 36	Сутки 50
Применение вакцины (n равно 10)	1	3	2	0	0	1	1
	2	2	1	0	0	0	1
	3	3	2	0	0	0	1
	4	2	1	0	0	0	0
	5	3	1	0	0	0	0
	6	4	2	1	0	0	0
	7	3	1	0	0	0	0
	8	4	3	2	0	0	0
	9	2	1	0	0	0	0
	10	2	1	0	0	0	0
	Среднее	2,8	1,5	0,3	0	0,1	0,3
Отклонение	0,79	0,71	0,67	0,0	0,32	0,48	
Контроль (n равно 5)	11	3	2	2	2	2	3
	12	4	2	1	1	1	2
	13	4	2	1	1	2	2
	14	2	1	1	0	1	1
	15	2	1	1	0	0	0
	Среднее	3,0	1,6	1,2	0,8	1,2	1,6
	Отклонение	1,0	0,55	0,45	0,84	0,84	1,14

Вакцину инъецировали внутримышечно 3 раза с интервалом 4 суток в дозе 1,0 мл.

Баллы клинических симптомов:

0 - нет симптомов,

1 - слабый хрип, без кашля,

2 - слабый хрип, с кашлем,

3 - выраженный хрип,

4 - выраженный хрип с клиническими симптомами депрессии.

Динамика интенсивности клинических симптомов аллергического бронхита у лошадей показана на фиг. 2.

Таблица 32

Динамика интенсивности клинических симптомов хронического обструктивного заболевания легких у лошадей после применения вакцины, приготовленной согласно примеру 41 (экспериментальная группа) и без вакцинации (контрольная группа)

Группа животных	№	Сутки 1	Сутки 15	Сутки 22	Сутки 29	Сутки 36	Сутки 50
Применение вакцины (n равно 10)	1	3	1	0	1	1	1
	2	2	1	0	0	0	1
	3	3	2	1	0	0	0
	4	2	1	1	0	0	0
	5	3	1	0	0	0	0
	6	4	2	1	0	1	1
	7	3	1	0	0	0	0
	8	4	1	2	0	0	0
	9	2	1	0	0	0	0
	10	2	1	0	0	0	0
	Среднее	2,8	1,2	0,5	0,1	0,2	0,3

	Отклонение	0,79	0,42	0,71	0,32	0,42	0,48
Контроль (n равно 5)	11	3	2	0	0	0	0
	12	4	1	2	1	1	1
	13	4	1	1	1	1	1
	14	2	1	1	0	1	1
	15	2	1	1	0	0	0
	Среднее	3,0	1,2	1,0	0,4	0,6	0,6
Отклонение	1,0	0,45	0,71	0,55	0,55	0,55	

Вакцину инъекцировали внутримышечно 3 раза с интервалом 4 суток в дозе 1,0 мл. Результаты также показаны на фиг. 3

Баллы клинических симптомов:

- 0 - нет симптомов,
- 1 - слабый хрип, без кашля,
- 2 - слабый хрип, с кашлем,
- 3 - выраженный хрип,
- 4 - выраженный хрип с клиническими симптомами депрессии.

Таблица 33

Динамика клинических признаков заболеваний кожи у собак, иммунизированных вакциной согласно примеру 42 в дозах 0,5 и 1,0 мл (был показан средний балл клинических симптомов в каждой группе; n равно 10)

Группы	Доза в мл	Сутки 1 (1)	Сутки 7 (2)	Сутки 15 (3)	Сутки 21 (4)	Сутки 30 (5)
1	0,5	3,6	2,6	1,2	0	0
2	1,0	3,9	2,0	1,2	0	0
3	Контроль	3,8	3,8	3,6	3,6	3,4

Вакцину инъекцировали внутримышечно 3 раза с интервалом 7 суток в дозе 1,0 мл. Динамика также показана на фиг. 4.

Балл клинических симптомов:

- 0 - нет симптомов,
- 1 - рост волос, активное отторжение струпьев или обширное отслаивание,
- 2 - алопеция, нет роста волос, отторжение струпьев,
- 3 - десквамация, припухлость или припухлость со струпьями, струпья не отторгаются,
- 4 - десквамация или припухлость, боль при пальпации,
- 5 - воспалительный ответ, некротические струпья.

Таблица 34

Динамика клинических признаков заболеваний кожи у собак, иммунизированных вакциной согласно примеру 50 внутримышечно в дозах 0,5 мл (был показан средний балл клинических симптомов в каждой группе; у вакцинированных n равно 15 и в контрольной группе n равно 15)

Группы		Сутки 1	Сутки 7	Сутки 15	Сутки 21	Сутки 30
1 Вакциниро- ванные	Среднее	3,5	2,8	1,6	0,67	0
	Отклонение	0,83	1,01	0,99	0,72	0,0
2 Контроль	Среднее	3,8	3,8	3,6	3,6	3,4
	Отклонение	0,84	0,84	0,55	0,89	0,55

Вакцину инъекцировали 3 раза с интервалом от 3 до 4 суток. Результаты также показаны на фиг. 5.

Балл клинических симптомов:

- 0 - нет симптомов,
- 1 - рост волос, активное отторжение струпьев или обширное отслаивание,
- 2 - алопеция, нет роста волос, отторжение струпьев,
- 3 - десквамация, припухлость или припухлость со струпьями, струпья не отторгаются,
- 4 - десквамация или припухлость, боль при пальпации,
- 5 - воспалительный ответ, некротические струпья.

Таблица 35

Анализ опухания уха мышей. Реакция на провоцирование у мышей, подкожно вакцинированных продуктом согласно примеру 41, по сравнению с обработанными хостакортином® Н (кортикостероид)

Лекарственное средство	Доза (мл)	∑ толщины уха через 2 часа после заражения (мкм)		∑ толщины уха через 24 часа после заражения (мкм)		∑ толщины уха через 48 часов после заражения (мкм)	
		Левое	Правое	Левое	Правое	Левое	Правое
		Пример 41	0,1	322	330	315	335
Хостакортин® Н	0,1	335	345	330	360	326	355
Контроль	0,1	320	375	320	405	325	387

Таблица 36

Противоаллергическая активность вакцины, полученной согласно примеру 41

Лекарственное средство	Доза (мл)	Противоаллергическая активность в анализе опухания уха (%)		
		через 2 часа после заражения	через 24 часа после заражения	через 48 часов после заражения
		Пример 41	0,1	14,7
Хостакортин® Н	0,1	14,2	17,5	10,7

Эритему уха определяли визуальной проверкой и выявлением присутствия (+) или отсутствия (-) признаков.

Толщину контрольного и экспериментального уха у всех животных измеряли микрометром. Результаты измерений суммировали (∑) отдельно для правых и левых ушей в группах. Процент опухания ушей и ряды активностей рассчитывают с использованием следующих формул:

$$1. \quad \% \text{ опухания уха} = \frac{\sum \text{толщины уха после стимуляции аллергеном}}{\sum \text{толщины уха после стимуляции растворителем}} \times 100$$

(контрольная группа)

$$2. \quad \% \text{ опухания уха} = \frac{\sum \text{толщины уха после стимуляции аллергеном}}{\sum \text{толщины уха после стимуляции растворителем}} \times 100$$

(вакцинированные)

$$3. \quad \text{Активность вакцины \%} = \% \text{ опухания уха в контрольной группе} - \% \text{ опухания уха у вакцинированных}$$

На всех стадиях эксперимента наблюдали положительную динамику уменьшения воспалительного ответа после вакцинации и применения преднизолон-21-ацетила. Наиболее выраженным ингибирование воспалительной реакции было через 24 ч после провоцирования. Следует отметить то, что реакция в виде эритемы была обнаружена у всех контрольных животных при инъекции в сосуды правого уха (место провоцирования реакции аллергеном). У вакцинированных животных аллергическая реакция немедленного типа не была выражена. Интенсивная эритема на ухе после применения аллергена не наблюдалась. Интенсивность отека уха была значительно выше у контрольных животных, чем у вакцинированных мышей, и была больше, чем порог - 10%. Также следует отметить то, что более сильное ингибирование провоцирований наблюдалось у вакцинированных животных, чем у обработанных преднизолон-21-ацетатом. Количество непрореагировавших животных в контрольной и опытной группах варьировало от 56 до 80%, что допускалось данным способом.

Таблица 37

Анализ опухания уха мышей. Реакция на провоцирование у мышей, подкожно вакцинированных разными дозами продукта согласно примеру 41

Лекарственное средство	Доза (мл)	Σ толщины уха через 2 часа после стимулирования (мкм)		Σ толщины уха через 24 часа после стимулирования (мкм)		Σ толщины уха через 48 часов после стимулирования (мкм)	
		Левое	Правое	Левое	Правое	Левое	Правое
		Пример (разведенный в 5 раз)	0,1	352	394	346	415
Пример	0,1	346	375	349	367	345	358
Пример	0,5	340	368	338	351	340	352
Пример	1,0	332	375	329	389	325	386
Контроль	1,0	338	379	341	408	342	410

Таблица 38

Противоаллергическая активность вакцины, приготовленной согласно примеру 41

Лекарственное средство	Доза (мл)	Противоаллергическая активность в анализе опухания уха (%)		
		через 2 часа после стимулирования	через 24 часа после стимулирования	через 48 часов после стимулирования
		Пример (разведенный в 5 раз)	0,1	0,2
Пример	0,1	3,7	14,4	17,0
Пример	0,5	3,9	15,8	16,4
Пример	1,0	-0,9	1,4	1,1

Следует отметить то, что несмотря на небольшое отличие в толщине уха контрольных и вакцинированных мышей при дозе 0,1 и 0,5 мл через 2 ч после стимулирования, все контрольные животные демонстрировали эритему на правом ухе при инъекции в сосуды (провоцирование аллергеном). У вакцинированных животных немедленный тип аллергической реакции не был выражен.

Аллергическая реакция в 24 и 48 ч наблюдалась в результате провоцирования у контрольных и вакцинированных при дозе 0,1 мл разведенной вакцины и с использованием неразведенной вакцины в дозе 1,0 мл. Реакция после провоцирования аллергической реакции у мышей, вакцинированных дозой 0,1 и 0,5 мл, отсутствовала или была слабо выраженной. Интенсивность отека уха была значимо выше у контрольных животных и в группах вакцинированных при использовании разведенной вакцины и вакцины в дозе 1,0 мл, чем у других вакцинированных. Количество непрореагировавших животных в контрольной и опытной группах варьировало от 65 до 81%, что допускалось данным способом.

Таблица 39

Динамика клинических признаков кожных заболеваний у собак, внутримышечно иммунизированных вакциной согласно примерам 41 и 43 в дозе 0,5 мл (был показан средний балл клинических симптомов в каждой группе; n равно 10). Вакцину инъекцировали 3 раза с интервалом 7 суток

Группы	Пример	Сутки 1 (1)	Сутки 7 (2)	Сутки 15 (3)	Сутки 21 (4)	Сутки 30 (5)
1		4,0	2,2	1,4	0	0
2		4,0	2,6	1,6	0	0
3	Контроль	3,8	3,8	3,8	3,6	3,4

Балл клинических симптомов:

0 - нет симптомов,

1 - рост волос, активное отторжение струпьев или обширное отслаивание,

2 - алопеция, нет роста волос, отторжение струпьев,

3 - десквамация, припухлость или припухлость со струпьями, струнья не отторгаются,

4 - десквамация или припухлость, боль при пальпации,

5 - воспалительный ответ, некротические струнья.

Таблица 40

Динамика клинических признаков ринита у кошек, которых лечили вакциной, приготовленной согласно примеру 42

№	Кличка	Сутки 1	Сутки 5	Сутки 10	Сутки 20	Сутки 30
1	Барс	4	0	1	0	0
2	Венс	4	0	3	0	0
3	Маша	4	2	0	0	0
4	Мика	3	0	2	0	0
5	Ника	4	0	0	0	0
6	Нелс	4	2	0	0	0
7	Рома	4	0	2	0	0
8	Тимоша	4	0	2	0	0
9	Томка	4	2	0	0	0
10	Нюша	4	0	0	0	0
	Среднее	3,9	0,6	1,0	0	0
	Отклонение	0,28	1,8	1,0	0,0	0,0
11	Дуся	4	4	4	4	-
12	Макс	4	3	4	3	-
13	Пушок	4	3	4	4	-
14	Филка	4	4	3	3	-
15	Руди	4	4	4	4	-
	Среднее	4,0	3,6	3,8	3,6	-
	Отклонение	0,0	0,3	0,5	0,3	-

Животных лечили закапыванием в нос вакцины в течение пяти суток в дозе 1-2 капли в каждый носовой ход 1-2 раза в сутки, других животных из контрольной группы обрабатывали таким же способом, но с использованием физиологического раствора хлорида натрия (плацебо). Животных обследовали с описанием клинических проявлений заболевания перед лечением и в сутки 5, 10, 20 и 30 после первого применения. В случае усугубления аллергического ринита осуществляли второй курс лечения в течение пяти суток. Результаты также показаны на фиг. 7.

0 - Нет симптомов,

1- гиперемия и/или опухание слизистых оболочек носовых ходов,

2 - легкие выделения из носа,

3 - гиперемия и/или опухание слизистых оболочек носовых ходов, выделения из носа,

4 - затруднения в дыхании, гиперемия и опухание слизистых оболочек носовых ходов, тяжелые выделения из носа,

5 - смерть животных.

Таблица 41

Динамика клинических признаков ринита у собак, которых лечили вакциной, приготовленной согласно примеру 43

№	Кличка	Сутки 1	Сутки 5	Сутки 10	Сутки 20	Сутки 30
1	Мара	4	1	0	0	0
2	Парамон	4	0	2	0	0
3	Зоран	3	0	0	0	0
4	Бред	3	0	2	0	0
5	Рембо	4	0	0	0	0
6	Торнадо	3	0	1	0	0
7	Тропка	3	0	2	0	0
8	Атаман	3	2	0	0	0
9	Аркан	4	0	0	0	0
10	Барбос	4	0	0	0	0
	Среднее	3,5	0,3	0,7	0	0
	Отклонение	0,28	0,98	0,87	0,0	0,0
11	Серас	4	4	4	4	-
12	Бинго	3	3	3	3	-
13	Дружок	3	2	3	3	-
14	Ракета	4	3	3	3	-
15	Бернт	4	4	4	4	-
	Среднее	3,6	3,2	3,4	3,4	-
	Отклонение	0,3	0,63	0,55	0,68	-

Животных лечили закапыванием в нос вакцины в течение пяти суток в дозе 1-2 капли в каждый носовой ход 1-2 раза в сутки, других животных из контрольной группы обрабатывали таким же способом, но с использованием физиологического раствора хлорида натрия (плацебо). Животных обследовали с описанием клинических проявлений заболевания перед лечением и в сутки 5, 10, 20 и 30 после первого применения. В случае усугубления аллергического ринита осуществляли второй курс лечения в течение пяти суток. Результаты также показаны на фиг. 8.

Балл симптомов:

0 - нет симптомов,

1- гиперемия и/или опухание слизистых оболочек носовых ходов,

2 - легкие выделения из носа,

3 - гиперемия и/или опухание слизистых оболочек носовых ходов, выделения из носа,

4 - затруднения в дыхании, гиперемия и опухание слизистых оболочек носовых ходов, тяжелые выделения из носа,

5 - смерть животных.

Таблица 42

Динамика клинических признаков конъюнктивита у кошек, которых лечат вакциной, приготовленной согласно примеру 54

№	Кличка	Сутки 1	Сутки 2	Сутки 3	Сутки 4	Сутки 5	Сутки 10
1	Дарк	4	2	1	1	0	0
2	Феликс	4	1	0	0	0	2
3	Барса	3	2	1	0	0	0
4	Май	4	2	2	0	0	1
5	Руди	4	0	0	0	0	0
6	Борис	4	2	1	0	0	0
7	Заника	4	2	1	1	1	0
8	Плакса	4	1	0	0	0	0
9	Грей	4	2	0	0	0	2
10	Маркиза	4	2	1	0	0	0
	Среднее	3,9	1,6	0,7	0,2	0,1	0,3
	Отклонение	0,28	1,2	0,5	0,5	0,8	0,9
11	Задира	4	4	4	4	-	-
12	Визи	4	4	4	4	-	-
13	Тринди	4	4	4	4	-	-
14	Рини	4	4	4	4	-	-
15	Фили	4	4	4	4	-	-
	Среднее	4,0	4,0	4,0	4,0	-	-
	Отклонение	0,0	0,0	0,0	0,0	-	-

Десять кошек лечили закапыванием вакцины в течение трех-пяти суток в дозе 1-2 капли в каждый глаз 2-3 раза в сутки. При отсутствии клинических признаков лечение прерывали. Других 5 животных обрабатывали физиологическим раствором хлорида натрия (плацебо), также как и экспериментальных животных экспериментальной группы. Животных обследовали с описанием клинических проявления заболевания до лечения и каждые сутки во время лечения. Затем животных обследовали в сутки 10. Результаты также показаны на фиг. 9.

Баллы симптомов:

0 - нет симптомов,

1 - гиперемия и/или опухание конъюнктивы,

2 - легкое слезотечение, выделения из глаз,

3 - гиперемия и/или опухание конъюнктивы, выделения из глаз,

4 - гиперемия и опухание конъюнктивы, интенсивные выделения из глаз,

5 - разрушение глазного яблока.

Пример 73. Эффективность лечения обыкновенных бородавок.

Случай 1.

Эффективность вакцины, приготовленной, как описано в примере 38, была продемонстрирована вакцинацией 16-летней девушки с обыкновенными бородавками (*Verucae vulgares* и паронихиальные бородавки). Вакцину применяли 5 раз с интервалом 24 ч местно с пластырем и каплями под пораженный ноготь, приводя к значимому уменьшению количества бородавок после последнего применения, и бородавки исчезали примерно через две недели после последней обработки. Не наблюдали тяжелых побочных эффектов.

Случай 2.

Эффективность вакцины, приготовленной, как описано в примере 39, была продемонстрирована вакцинацией 12-летней девочки с обыкновенными бородавками (*Verucae vulgares*). Вакцину применяли 7 раз с интервалом 24 ч местно с пластырем, приводя к значимому уменьшению количества бородавок после последнего применения, и бородавки исчезали примерно через две недели после последней обработки. Не наблюдали тяжелых побочных эффектов.

Случай 3.

Эффективность вакцины, приготовленной, как описано в примере 40, была продемонстрирована вакцинацией 6-летнего мальчика с обыкновенными бородавками (*Verucae vulgares*). Вакцину применяли 6 раз с интервалом 24 ч местно с пластырем, приводя к значимому уменьшению количества бородавок после последнего применения, и бородавки исчезали примерно через две недели после последней обработки. Не наблюдали тяжелых побочных эффектов.

Пример 74. Гидроколлоиды.

Химическая номенклатура: гидроколлоид хитозан-валериановая кислота.

Подзаголовок: гидрокомплекс полиаминосахар-валериановая кислота.

Структурная формула



Химическая формула: $(C_6H_{11}NO_4)_x(C_8H_{13}NO_5)_y(C_5H_{10}O_2)_z(HCl)_z(H_2O)_m$.

Общие свойства.

Молекулярная масса: $x*(161)+y*(203)+z*(102)+z*(36,5)+m*(18)$.

Внешний вид: вязкая жидкость от естественного белого до желтоватого цвета с типичным запахом.

Растворимость: растворимо в воде.

Запах: типичный, аналогичный валериановой кислоте.

Плотность: 1,002.

Значение pH: 5,5.

Хранение: хранить защищенным от света; хранить в контейнере, защищенном от воздуха, в холодильнике при 4-8°C.

Стабильность: 36 месяцев при условиях, описанных выше.

Химическая номенклатура: гидроколлоид хитозан-4-аминобензойная кислота.

Подзаголовок: гидрокомплекс полиаминосахар-п-аминобензойная кислота.

Структурная формула



Химическая формула: $(C_6H_{11}NO_4)_x(C_8H_{13}NO_5)_y(C_7H_7NO_2)_z(H_2O)_m$.

Общие свойства.

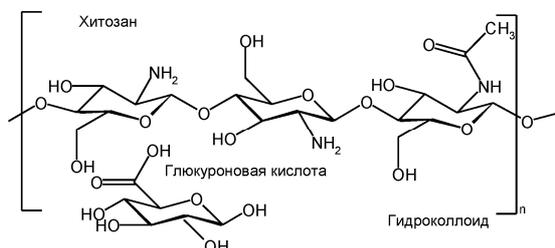
Молекулярная масса: $x*(161)+y*(203)+z*(137,14)+m*(18)$.

Внешний вид: вязкая жидкость от желтоватой до желтой.

Химическая номенклатура: гидроколлоид хитозан-глюкуроновая кислота.

Подзаголовок: гидрокомплекс полиаминосахар-глюкуроновая кислота.

Структурная формула



Химическая формула: $(C_6H_{11}NO_4)_x(C_8H_{13}NO_5)_y(C_6H_{10}O_7)_z(H_2O)_m$.

Общие свойства.

Молекулярная масса: $x*(161)+y*(203)+z*(194,14)+m*(18)$.

Внешний вид: вязкая жидкость от желтоватой до желтой.

Пример 75. Изготовление гидроколлоида хитозан-валериановая кислота.

Очистка хитозана 80/100 и 80/200, AS-№: 9012-76-4,

Амино-N-ацетил-D-глюкозамин стерилизуют в отдельном сосуде и проводят манипуляции для получения хитозана фармацевтического уровня качества.

Раствор реактива.

Стерильный амино-N-ацетил-D-глюкозамин ресуспендируют при перемешивании в течение 15 мин в данной стерильной воде. Добавляют в суспензию 400 мл уксусной кислоты при перемешивании (24 ч),

пока не получается прозрачный раствор.

Стадия очистки.

К данному раствору (аккуратно) капля за каплей добавляют 4н. раствор гидроксида натрия с получением рН от 8,0 до 8,5. Образующийся раствор осаждается до белой массы. Полученную суспензию перемешивают не меньше чем 30 мин. Осадок отделяют от жидкой фазы фильтрованием.

Ресуспендирование.

Осадок ресуспендируют в равном количестве очищенной (стерильной) воды (вода для инъекции (Европейская Фармакопея)) (40 л, исходное количество). Отмеряют 80 мл пентаноилхлорида. Пентаноилхлорид добавляют в суспензию капля за каплей в условиях перемешивания. Полученную суспензию перемешивают, пока раствор не становится прозрачным. Добавляют 1,6 г тиомерсала (40 мкг/мл). Данный прозрачный раствор представляет собой активный ингредиент (гидроколлоид). Полученный коллоид полисахарида (CVHC) хранят при 4-8°C. Для конечного продукта готовят водный раствор с определенной биологической активностью.

Обзор стадий реакции изготовления.

1. Хитозан + вода → суспензия.

Суспензия + НАс (24 ч) → раствор хитозан-НАс.

2. Стадия очистки.

2.1. Раствор хитозан-НАс + 4н. NaOH → (рН 8-8,5) хитозан + NaAc + H₂O.

2.2. Хитозан + NaAc + H₂O → H₂O + NaAc → хитозан (твердый, очищенный).

3. Производство.

Хитозан (твердый) + H₂O + пентаноилхлорид →.

Хитозан + валериановая кислота + H₂O + HCl → CVHC (гидроколлоид хитозан-валериановая кислота).

Производство представляет собой комбинацию стадии очистки исходного вещества хитозана и реакцию в ходе данного процесса со вторым реактивом - пентаноилхлоридом.

Этой первой критической стадией является осаждение хитозана с получением общего количества очищенного хитозана с фармацевтическим качеством.

Контроль по ходу процесса: время реакции и значение рН отслеживаются для получения количественного осаждения.

Анализ фармацевтического качества хитозана.

Анализ качества промежуточного соединения (хитозана фармацевтического качества).

Растворимость в воде: примерно 250 мг образец осадка хитозана ресуспендируют в 1 мл очищенной воды.

Цель: растворимость не может быть получена.

Качество: выполняется, если не может быть выявлено уменьшение количества твердого вещества.

Растворимость в более сильных кислотах: параллельно такое же количество осадка суспендируют в 1 мл HCl (3н.).

Цель: полное растворение.

Качество: выполняется, если может быть выявлен раствор общего количества твердого вещества.

Второй критической стадией является процесс растворения активного ингредиента. Контроль осуществляется визуально: общее количество осадка должно быть солюбилизировано.

Пример 76. Проверка идентичности с использованием спектроскопии в УФ (ультрафиолетовой)/видимой области.

Использовали способ анализа согласно Европейской Фармакопее 2.2.25.

Прибор: спектрофотометр Jasco 7800.

Условия измерения.

Ширина полосы 2 нм.

Интервал 200-600 нм.

Коррекция на пустой образец с использованием растворителя.

Температура: 25°C.

УФ ячейка: 12,5×45 мм полумикро, длина пути 10 мм, диоксид кремния УФ-класса.

Растворитель: H₂O.

Анализируемый раствор: адекватный образец хитозан-HCl, хитозан-НАс, хитозана, гидроколлоида хитозан-валериановая кислота и валериановой кислоты соответственно растворяли в приведенном выше растворителе. Данную смесь встряхивали и затем обрабатывали ультразвуком в ультразвуковой бане в течение 5 мин.

Согласно общим положениям спектроскопии и химической структуры со специфическими хромофорными группами и заместителями для хитозан-HCl, хитозан-НАс, гидроколлоида хитозан-валериановая кислота и валериановой кислоты соответственно можно ожидать максимумы поглощения при 200 нм.

УФ- максиум	Хитозан НСI	Хитозан НAc	Хитозан	CVHC	Валериановая кислота
нм	200	200	-	200	211

Максимумы поглощения хитозана не могли быть проанализированы, так как хитозан представляет собой нерастворимое в воде твердое вещество, которое также не может быть солубилизировано в типичных органических растворителях.

Сравнение всех спектров не показывает значимости или структурной модификации, подобной ароматическим связям и т.д. На основе измеренных спектров и литературных данных по сырью измеренный спектр соответствует искомым спектрам. Таким образом, приведенные выше измеренные данные подтверждают идентичность искомой структуры.

Пример 77. Абсорбционная ИК (инфракрасная область)-спектрофотометрия.

Использовали способ анализа согласно Европейской Фармакопее 2.2.24.

Для идентификации активного начала гидроколлоида хитозан-валериановая кислота сравниваются серии ИК-спектров разных производных хитозана со спектром продукта и валериановой кислоты.

1. Способ и параметры.

Прибор: инфракрасный спектрометр FT/IR 410 Jasco.

Интервал: от 4000 до 600 см⁻¹.

Анализируемый образец: смесь 4,8 мг хитозана или смесь 4 мг хитозан-НСI, или смесь 3,8 мг хитозана ацетата и 100 мг КВг тщательно размалывают и прессуют в подходящий диск на основе бромида калия или пленку гидроколлоида хитозан-валериановая кислота, или пластинку на основе NaCl для валериановой кислоты.

Условия измерения.

Поправка на фон: актуальная.

Температура: 20°C.

Измеренный спектр прямо соответствует литературным спектрам из базы данных.

Результат: приведенные выше измеренные данные подтверждают идентичность протестированных соединений.

2. Данные по разным ИК-спектрам.

Хитозан- основание	Хитозан -НСI	Хитозан -НAc	Высушенный коллоид хитозан- валериановая кислота	Валериановая кислота
3398	3365	3424	3426	
2919/2875	2887	2926/	2960-2872	2960-2875
				2673
	2018	2092	2130	

		1708		1717
1665				
1596	1606			
1562		1561	1569	
	1509			
				1467 / 1456
1421	1410	1408	1424	1413
1377	1380			1381
1320	1320	1336	1315	
				1279
1256	1246	1254	1236	1215
1154	1155	1155	1154	
1079 / 1032	1084	1089	1076-1013	1109
897	896	890	926	940

ИК-сигналы валериановой кислоты в активном начале находятся в интервале от очень маленьких до невидимых.

Сравнение с литературными данными: на основе измеренных спектров и литературных данных по сырью, измеренный спектр CVHC соответствует искомому спектру.

Результат: приведенные выше измеренные данные подтверждают идентичность предложенной структуры.

Пример 78. Анализ С-ЯМР (ядерный магнитный резонанс) спектроскопией.

Использовали способ анализа согласно Европейской Фармакопее 2.2.33.

а) ^{13}C -ЯМР спектр хитозана.

1. Способ и параметры.

Прибор Bruker AMX 500 AVANCE.

Условия измерения.

Частота сканирования: 125 МГц для хитозана, хитозан-НСI, хитозан-НАс, глюкозамин-НСI, N-ацетилглюкозамина, гидроколлоида хитозан-валериановая кислота, валериановой кислоты.

Температура: 300 К для хитозана, хитозан-НСI, хитозан-НАс, гидроколлоида хитозан-валериановая кислота, валериановой кислоты; 301 К для глюкозамин-НСI и N-ацетилглюкозамина.

Растворитель: D_2O для хитозана, хитозан-НСI, хитозан-НАс, глюкозамин-НСI, N-ацетилглюкозамина; DMSO (диметилсульфоксид)- D_6 для гидроколлоида хитозан-валериановая кислота.

CDCl_3 для валериановой кислоты.

Концентрация: для хитозана, хитозан-НСI, хитозан-НАс, гидроколлоида хитозан-валериановая кислота; приблизительно 15 мг/0,5 мл для глюкозамин-НСI, N-ацетилглюкозамина и валериановой кислоты.

Калибровка: для хитозана, хитозан-НСI, хитозан-НАс, глюкозамин-НСI, N-ацетилглюкозамина.

DMSO-D_6 для гидроколлоида хитозан-валериановая кислота.

CDCl_3 для валериановой кислоты.

1. Результаты.

а) Анализ хитозана ^{13}C -ЯМР-спектроскопией.

Измерение в растворе: измерение в растворе не возможно согласно отсутствующей растворимости в нейтральных растворителях.

Измерение в твердом состоянии: измерение в твердом состоянии не было возможным. Также после условий длительного измерения (время) приемлемые сигналы не появлялись.

Результат: идентификация хитозана посредством ЯМР не возможна.

б) Анализ хитозан-НСI ¹³C-ЯМР-спектроскопией.

Результаты	[d]	Классификация (номер углерода)
	97,67	
76,41 / 74,80		C5
	70,28	C3
	64,41	C4
	60,11	C6
	56,06	C2
Цель	Следующие характерные химические сдвиги согласно общим положениям спектроскопии и химическому скелету с заместителями можно ожидать при:	[млн ⁻¹]
		100
		70
	56	
Общая литература: Hesse, Meier, Zeeh Spekr. Methoden Thieme Verlag 5.Auflage 1995		

Результат: приведенные выше измеренные данные подтверждают идентичность протестированного вещества.

в) Анализ хитозан-НАс ¹³C-ЯМР-спектроскопией

Результаты	[d]	Классификация (номер углерода)
	98,39	
Скелет глюкозамина	74,79	C5
	-	C3
	-	C4
	-	C6
	-	C2
Уксусная кислота	23,82	CH ₃
	180,31	>C=O
Цель	Следующие характерные химические сдвиги согласно общим положениям спектроскопии и химическому скелету с заместителями можно ожидать при:	[млн ⁻¹]
		98,39
		23,82
	180,31	
Общая литература: Hesse, Meier, Zeeh Spekr. Methoden Thieme Verlag 5.Auflage 1995		

Результат: приведенные выше измеренные данные подтверждают идентичность протестированного вещества.

г) Анализ глюкозамин-НСI ¹³C-ЯМР-спектроскопией.

Результаты	[d]	Классификация (номер углерода)
	92,94 / 89,34	
76,25		C5
72,28 / 71,69		C3
69,85 / 69,77		C4
60,66 / 60,51		C6
54,62 / 57,08		C2

Цель	Следующие характерные химические сдвиги согласно общим положениям спектроскопии и химическому скелету с заместителями можно ожидать при:	[млн ⁻¹]
		92,94/ 89,34
		60,66/ 60,51
		54,62/ 57,08
Общая литература: Hesse, Meier, Zeeh Spektr. Methoden Thieme Verlag 5.Auflage 1995		

Сравнение с литературными данными: измеренный спектр непосредственно соответствует литературным спектрам из базы данных.

Результат: приведенные выше измеренные данные подтверждают идентичность протестированного вещества.

д) Анализ N-ацетилглюкозамина ¹³C-ЯМР-спектроскопией

Результаты	[d]	Классификация (номер углерода)
	95,06 / 90,95	C1
	76,01 / 74,08	C5
	71,64 / 70,86	C3
	70,22 / 69,99	C4
	60,89 / 60,74	C6
	56,90 / 54,26	C2
	22,29 / 22,03	CH ₃
		3
	174,85 / 174,59	C=O
Цель	Следующие характерные химические сдвиги согласно общим положениям спектроскопии и химическому скелету с заместителями можно ожидать при:	95,06/ 90,95
		22,29/ 22,03
		174,85/ 174,59
Общая литература: Hesse, Meier, Zeeh Spektr. Methoden Thieme Verlag 5.Auflage 1995		

Результат: приведенные выше измеренные данные подтверждают идентичность протестированного вещества.

е) Анализ гидроколлоида хитозан-валериановая кислота ¹³C-ЯМР-спектроскопией

Результаты	[d]	Классификация (номер углерода)
Скелет глюкозамина	100,95	C1
	78,57	C5
	76,10	C3
	73,10	C4
	61,40	C6
	57,57	C2
Валериановая кислота	180,66	C5´
	29,23	C4´
	24,85	C3´
	23,37	C2´
	14,87	C1´
Цель	Следующие характерные химические сдвиги согласно общим положениям спектроскопии и химическому скелету с заместителями можно	[млн ⁻¹]
		100,95
		61,40

	ождать при:	57,57
		180,66
		14,87
Общая литература: Hesse, Meier, Zeeh Spektr. Methoden Thieme Verlag 5.Auflage 1995		

Результат: приведенные выше измеренные данные подтверждают идентичность предложенной структуры.

ж) Анализ валериановой кислоты ¹³C-ЯМР-спектроскопией

Результаты	[d]	Классификация (номер углерода)
	180,5	C5
	33,8	C4
	26,7	C3
	22,2	C2
	10,6	C1
Цель	Следующие характерные химические сдвиги согласно общим положениям спектроскопии и химическому скелету с заместителями можно ожидать при:	[млн ⁻¹]
		180
		10,6
Общая литература: Hesse, Meier, Zeeh Spektr. Methoden Thieme Verlag 5.Auflage 1995		

Сравнение с литературными данными: измеренный спектр прямо соответствует литературным спектрам из базы данных.

Результат: приведенные выше измеренные данные подтверждают идентичность протестированного вещества.

3. Сравнение спектров ЯМР.

	Хитозан-НСI	Хитозан-НАс	Глюкозамин-НСI	N-Acetyl-глюкозамин	Гидроколлоид хитозан-валериановая кислота	Валериановая кислота	Классификация (номер углерода)
	97,7	98,4	92,9 / 89,3	95,0 / 91,0	101,0		C1
	56,1		54,6 / 57,1	54,3 / 56,9	57,6		C2
	70,3		71,7 / 72,3	71,6 / 70,9	76,1		C3
	64,4		69,9 / 69,8	70,2 / 70,0	73,1		C4
	76,4 / 74,8	74,8	76,3	76,0 / 74,1	78,6		C5
	60,1		60,5 / 60,7	60,9 / 60,7	61,4		C6
		22,7					
		23,8					
		180,3		174,9 / 174,6			
					14,9	13,06	
					23,4	22,02	
					24,9	26,07	
					29,2	33,8	
					108,7	180,5	
Литература	-	-	X	-	-	X	

Сравнение с литературными данными: не доступны или основываются на измеренных спектрах и литературных данных по сырью, причем измеренный спектр прямо соответствует искомым спектрам.

Результат: приведенные выше измеренные данные подтверждают идентичность предложенной структуры.

Пример 79. Способ TLC (тонкослойная хроматография) для анализа хитозана и примесей в новом продукте - гидроколлоиде хитозан-валериановая кислота (CVHC).

Использовали способ анализа согласно Европейской Фармакопее 2.2.27.

В данной части представлены методики и данные тонкослойной хроматографии для идентификации CVHC, наряду со значениями R_f (коэффициент удерживания) в использованных смесях растворителей и цветом пятен при выявлении под УФ-светом (365 и 254 нм), видимым светом и с использованием типичных реактивов для визуализации.

Исходным основным сырьем для любого типа глюкозаминов является природное вещество хитин из насекомых или крабов. Мономерной структурой данных биополимеров является N-ацетил-глюкозамин. Для фармацевтических и других применений в большинстве случаев типичным является деацетилованный хитин. Этим образующимся биополимером является так называемый хитозан, который может быть модифицирован до водорастворимых ионных соединений. Мономерной структурой этого хитозана теоретически должен быть глюкозамин. Поскольку стадия деацетилирования не идет полностью, хитозан имеет смешанную структуру из звеньев N-ацетилглюкозамина (ацетилированного) и глюкозамина (деацетилированного). Гидроколлоид хитозан-валериановая кислота представляет собой новый гидрокомплекс полиаминосахар-валериановая кислота. Следовательно, не должны быть возможными

положительные результаты аналитического анализа на N-ацетилглюкозамин и глюкозамин. При вкраплении мономерных фрагментов в виде остаточных примесей может быть возможной идентификация хитозана в виде его водорастворимых ионных соединений хитозан-НСl и хитозан-НАс.

1. Способ.

Прибор	Система хроматографических емкостей Camag
Пластика для TLC	Предварительно покрытые пластинки Merck Si 60 F 254
Условия	Защищенные от солнечного света и с насыщением камеры
Температура	20 – 25°C
Проявление:	Вертикальное проявление

Хроматографические условия.

Образец-раствор	См. одиночные аналиты
Нанесение	30 мкл
Сушка	Минимум 2 минуты в струе воздуха
Интервал перемещения	80 мм

Подвижная фаза.

Растворители	Ацетон	Вода	25%-ный водн. аммоний	-
Смесь	20	10	5	-

2. Анализ и реактивы.

А) Хитозан.

Приготовление образца.

Образец: хитозан, суспендированный в воде.

1) Прибор: обратный холодильник.

Условия: нагревание в течение примерно 30 мин с обратным холодильником (145°C).

2) Прибор: ультразвуковая баня.

Условия: обработка ультразвуком в течение примерно 30 мин при 45°C.

3) Прибор: обратный холодильник.

Условия: нагревание в течение примерно 30 мин с обратным холодильником (145°C).

4) Фильтрование: 0,45-мкм фильтр.

Для анализа использовали прозрачный фильтрат.

Выявление с использованием УФ-флуоресценции и в видимой области.

Длина волны флуоресценции	254 нм	365 нм	Видимая область
Сигнал соединения	Нет	Нет	Нет
Примеси	Нет	Нет	Нет

Выявление с визуализирующими реактивами.

Видимый свет	Специфичный в отношении группы реактив 1	Специфичный в отношении группы реактив 2	Реактив на основе анисового альдегида-серной кислоты	Йод
Сигнал соединения	Нет	Нет	Нет	Нет
Примеси	Нет	Нет	Нет	Нет
Специфичный в отношении группы реактив 1: реактив Naturstoff / DT / 366 нм				
Специфичный в отношении группы реактив 2: 5% нингидрин / EtOH				
Значение Rf	Не может быть идентифицирован сигнал для хитозана			-
	Неспецифические примеси:			Не выявлены

Альтернатива: солубилизация в органических растворителях демонстрирует такие же результаты из-за отсутствующей растворимости хитозана.

Результат: приемлемый раствор хитозана в воднистых или органических растворителях, подобных метанолу и т.д. не возможен. Подходящая солубилизация хитозана возможна только в более сильных кислотах, подобных HCl или HAc при продукции хитозан-HCl или хитозан-HAc.

б) Хитозан-HCl.

Для анализа использовали 5 мг хитозан-HCl/мл H₂O.

Выявление с использованием УФ-флуоресценции и в видимой области.

Длина волны флуоресценции	254 нм	365 нм	Видимая область
Сигнал соединения	Нет	Нет	Нет
Примеси	Нет	Нет	Нет

Выявление с визуализирующими реактивами.

Видимый свет	Специфичный в отношении группы реактив 1	Специфичный в отношении группы реактив 2	Реактив на основе анисового альдегида-серной кислоты	Йод
Сигнал соединения	Нет	Нет	Серое пятно	Коричневое пятно
Примеси	Нет	Нет	Нет	Нет
Специфичный в отношении группы реактив 1: реактив Naturstoff / DT / 366 нм				
Специфичный в отношении группы реактив 2: 5% нингидрин / EtOH				
Значение Rf	Хитозан-HCl			0,0
	Неспецифические примеси:			Не выявлены

Цель	Чистота соединения	Одно главное пятно		
	Реактив на основе анисового альдегида-серной кислоты и йод, соответственно, в качестве неселективных реактивов для выявления неспецифических примесей не должны показывать более значительного содержания примесей.			
	Относительный коэффициент удерживания (Rf) данного соединения согласно химическому скелету при данных описанных хроматографических условиях для такого полимера может ожидать при:			
	0,0	-	-	-

Результат: чистота соединения; одно главное пятно.

в) Хитозан-Нас.

Для анализа использовали 5 мг хитозан-Нас/мл H₂O.

Выявление с использованием УФ-флуоресценции и в видимой области.

Длина волны флуоресценции	254 нм	365 нм	Видимая область
Сигнал соединения	Нет	Нет	Нет
Примеси	Нет	Нет	Нет

Выявление с визуализирующими реактивами.

Видимый свет	Специфичный в отношении группы реактив 1	Специфичный в отношении группы реактив 2	Реактив на основе анисового альдегида-серной кислоты	Йод
Сигнал соединения	Нет	Нет	Серое пятно	Коричневое пятно
Примеси	Нет	Нет	Нет	Нет
Специфичный в отношении группы реактив 1: реактив Naturstoff / DT / 366 нм				
Специфичный в отношении группы реактив 2: 5% нингидрин / EtOH				
Значение Rf	Хитозан-Нас			0,0

	Неспецифические примеси:	Не выявлены
--	--------------------------	-------------

Значение из литературы	Не доступно	данные из	-
------------------------	-------------	-----------	---

Цель	Чистота соединения	Одно главное пятно	
	Реактив на основе анисового альдегида-серной кислоты и йод, соответственно, в качестве неселективных реактивов для выявления неспецифических примесей не должны показывать более значительного содержания примесей.		
	Относительный коэффициент удерживания (Rf) данного соединения согласно химическому скелету при данных описанных хроматографических условиях для такого полимера может ожидать при:		
	0,0	-	-

Результат: чистота соединения; одно главное пятно.

г) Глюкозамин-НСI.

Для анализа использовали 5 мг глюкозамин-НСI/мл H₂O.

Выявление с использованием УФ-флуоресценции и в видимой области.

Длина волны флуоресценции	254 нм	365 нм	Видимая область
Сигнал соединения	Нет	Нет	Нет
Примеси	Нет	Нет	Нет

Выявление с визуализирующими реактивами.

Видимый свет	Специфичный в отношении группы реактив 1	Специфичный в отношении группы реактив 2	Реактив на основе анисового альдегида-серной кислоты	Йод
Сигнал соединения	Синее пятно	Красное пятно	Серое пятно	Коричневое пятно
Примеси	Нет	Нет	Нет	Нет

Специфичный в отношении группы реактив 1: реактив Naturstoff / DT / 366 нм

Специфичный в отношении группы реактив 2: 5% нингидрин / EtOH

Значение Rf	Глюкозамин-НСI	0,67
	Неспецифические примеси:	Не выявлены

Значение из литературы	Не доступно	данные из	-
------------------------	-------------	-----------	---

Цель	Чистота соединения	Одно главное пятно	
	Реактив на основе анисового альдегида-серной кислоты и йод, соответственно, в качестве неселективных реактивов для выявления неспецифических примесей не должны показывать более значительного содержания примесей.		
	Относительный коэффициент удерживания (Rf) данного соединения согласно химическому скелету при данных описанных хроматографических условиях может ожидать при:		
	0,6	и	0,8

Результат: чистота соединения; одно главное пятно.

д) N-Ацетилглюкозамин.

Для анализа использовали 5 мг N-ацетилглюкозамина/мл H₂O.

Выявление с использованием УФ-флуоресценции и в видимой области.

Длина волны флуоресценции	254 нм	365 нм	Видимая область
Сигнал соединения	Нет	Нет	Нет
Примеси	Нет	Нет	Нет

Выявление с визуализирующими реактивами.

Видимый свет	Специфичный в отношении группы реактив 1	Специфичный в отношении группы реактив 2	Реактив на основе анисового альдегида-серной кислоты	Йод
Сигнал соединения	Синее пятно	Нет	Серое пятно	Коричневое пятно
Примеси	Нет	Нет	Нет	Нет
Специфичный в отношении группы реактив 1: реактив Naturstoff / DT / 366 нм				
Специфичный в отношении группы реактив 2: 5% нингидрин / EtOH				

Значение Rf	N-ацетилглюкозамин	0,72
	Неспецифические примеси:	Не выявлены

Цель	Чистота соединения	Одно главное пятно	
	Реактив на основе анисового альдегида-серной кислоты и йод, соответственно, в качестве неселективных реактивов для выявления неспецифических примесей не должны показывать более значительного содержания примесей.		
	Относительный коэффициент удерживания (Rf) данного соединения согласно химическому скелету при данных описанных хроматографических условиях может ожидать при:		
	0,6	и	0,8

Результат: чистота соединения; одно главное пятно.

е) Гидроколлоид хитозан-валериановая кислота (CVHC).

CVHC представляет собой высоковязкий водянистый гель. Для анализа использовали две капли CVHC.

Выявление с использованием УФ-флуоресценции и в видимой области.

Длина волны флуоресценции	254 нм	365 нм	Видимая область
Сигнал соединения	Нет	Нет	Нет
Примеси	Нет	Нет	Нет

Выявление с визуализирующими реактивами.

Видимый свет	Специфичный в отношении группы реактив 1	Специфичный в отношении группы реактив 2	Реактив на основе анисового альдегида-серной кислоты	Йод
Сигнал соединения	Нет	Нет	Серое пятно	Коричневое пятно
Примеси	Нет	Нет	Нет	Нет

Специфичный в отношении группы реактив 1: реактив Naturstoff / DT / 366 нм
Специфичный в отношении группы реактив 2: 5% нингидрин / EtOH

Значение Rf	Гидроколлоид хитозан-валериановая кислота	0,0
	Неспецифические примеси:	Не выявлены

Значение из литературы	Не доступно	данные из	-
------------------------	-------------	-----------	---

Цель	Чистота соединения	Одно главное пятно	
	Реактив на основе анисового альдегида-серной кислоты и йод, соответственно, в качестве неселективных реактивов для выявления неспецифических примесей не должны показывать более значительного содержания примесей.		
	Относительный коэффициент удерживания (Rf) данного соединения согласно химическому скелету при данных описанных хроматографических условиях для такого полимера может ожидать при:		
	0,0	-	-

Результат: чистота соединения; одно главное пятно.

ж) Валериановая кислота.

Для анализа использовали 1 мкл валериановой кислоты (чистой).

Выявление с использованием УФ-флуоресценции и в видимой области.

Длина волны флуоресценции	254 нм	365 нм	Видимая область
Сигнал соединения	Нет	Нет	Нет
Примеси	Нет	Нет	Нет

Выявление с визуализирующими реактивами.

Видимый свет	Специфичный в отношении группы реактив 1	Специфичный в отношении группы реактив 2	Реактив на основе анисового альдегида-серной кислоты	Йод
Сигнал соединения	Нет	Нет	Нет	Желтое пятно
Примеси	Нет	Нет	Нет	Нет
Специфичный в отношении группы реактив 1: реактив Naturstoff / DT / 366 нм				
Специфичный в отношении группы реактив 2: 5% нингидрин / EtOH				

Значение Rf	Валериановая кислота	0,0
	Неспецифические примеси:	Не выявлены

Значение из литературы	Не доступно	данные из	-
------------------------	-------------	-----------	---

Цель	Чистота соединения	Одно главное пятно	
	Реактив на основе анисового альдегида-серной кислоты и йод, соответственно, в качестве неселективных реактивов для выявления неспецифических примесей не должны показывать более значительного содержания примесей.		
	Относительный коэффициент удерживания (Rf) данного соединения согласно химическому скелету при данных описанных хроматографических условиях может ожидать при:		
	0,0	-	-

Результат: чистота соединения; одно главное пятно.

3. Сравнение результатов анализа TLC.

	Хитозан	Хитозан-НCl	Хитозан-НAc	Глюкозамин-НCl	N-ацетил-глюкозамин-НCl	Коллоид хитозан-валериановая кислота	Валериановая кислота
Значение Rf	Не возможно	0	0	0,67	0,72	0	0
Выявление	Сигнал соединения						
УФ 254 нм	-	-	-	-	-	-	-
УФ 365 нм	-	-	-	-	-	-	-
Видимый свет	-	-	-	-	-	-	-
Реактив							
Naturstoff	-	-	-	Синее пятно	Синее пятно	-	-
Нингидриновый реактив	-	-	-	Красное пятно	-	-	-
Реактив на основе анисового альдегида-серной кислоты	-	Серое пятно	Серое пятно	Серое пятно	Серое пятно	Серое пятно	-
Реактив на основе йода	-	Коричневое пятно	Коричневое пятно	Коричневое пятно	Коричневое пятно	Коричневое пятно	Желтое пятно

Приведенные выше результаты TLC показывают то, что отсутствует доказательство присутствия мономерной или димерной структуры, которая могла бы быть выявлена с использованием специфических производных реактивов, протестированных выше. Выявление и значение Rf "0" показывают сходство гидроколлоида хитозан-валериановая кислота с родственными соединениями хитозан-НCl и хитозан-НAc. Специфичная идентификация валериановой кислоты с использованием данной системы TLC потерпела неудачу. Гидроколлоид хитозан-валериановая кислота может представлять собой только коллоид полиаминосахара, но не раствор хитозана или производного хитозана с валериановой кислотой в воде.

Пример 80. Способ TLC для аналитического выявления валериановой кислоты в гидроколлоиде хитозан-валериановая кислота.

1. Способ и параметры.

Создали новую систему TLC для идентификации и анализа чистоты составного компонента - валериановой кислоты.

Прибор	Система хроматографических емкостей Camag
Пластика для TLC	Предварительно покрытые пластинки Merck Si 60 F 254
Условия	Защищенные от солнечного света и с насыщением камеры
Температура	20 – 25°C
Проявление:	Вертикальное проявление

Хроматографические условия.

Сушка	Минимум 2 минуты в струе воздуха
Интервал перемещения	80 мм

Подвижная фаза.

Растворители	Этилацетат	-	-	-
Смесь	100	-	-	-

2. Результаты.

а) Валериановая кислота (чистая).

Для анализа использовали 2 мкл валериановой кислоты (чистой).

Выявление с использованием УФ-флуоресценции и в видимой области.

Длина волны флуоресценции	254 нм	365 нм	Видимая область
Сигнал соединения	Нет	Нет	Нет
Примеси	Нет	Нет	Нет

Выявление с визуализирующими реактивами.

Видимый свет	Специфичный в отношении группы реактив	Реактив на основе анисового альдегида-серной кислоты	Йод
Сигнал соединения	Желтое пятно/синий фон	Розовое пятно	Желтоватое пятно
Примеси	Нет	Нет	Нет
Специфичный в отношении группы реактив: реактив на основе бромкрезолового зеленого /бромфенолового синего/перманганата калия [Jork et al.]			

Значение Rf	Валериановая кислота	0,56
	Неспецифические примеси:	Не выявлены

Значение из литературы	Не доступно	данные из	-
------------------------	-------------	-----------	---

Порог выявления валериановой кислоты с использованием данного визуализирующего реактива после TLC хроматографии: 0,03 мкг.

б) Гидроколлоид хитозан-валериановая кислота (CVHV).

Для анализа использовали 45 мкл гидроколлоида хитозан-валериановая кислота, чистого (это примерно в 850 раз большее количество валериановой кислоты по сравнению с анализами, приведенными ранее).

Выявление с использованием УФ-флуоресценции и в видимой области.

Длина волны флуоресценции	254 нм	365 нм	Видимая область
Сигнал соединения	Нет	Нет	Нет
Примеси	Нет	Нет	Нет

Выявление с визуализирующими реактивами.

Видимый свет	Специфичный в отношении группы реактив	Реактив на основе анисового альдегида-серной кислоты	Йод
Сигнал соединения	Синее пятно/синий фон	Серое пятно	Коричневое пятно
Примеси	Нет	Нет	Нет
Специфичный в отношении группы реактив: реактив на основе бромкрезолового зеленого /бромфенолового синего/перманганата калия [Jork et al.]			

Цель	Чистота соединения	Одно главное пятно
	Реактивы на основе анисового альдегида-серной кислоты и йод, соответственно, в качестве неселективных реактивов для выявления неспецифических примесей не должны показывать более значительного содержания примесей.	
	Специфичный в отношении группы реактив на основе бромкрезолового зеленого /бромфенолового синего/перманганата калия должен показывать типичные результаты для соединений	
	Относительный коэффициент удерживания (Rf) данного соединения согласно химическому скелету при данных описанных хроматографических условиях может ожидать при:	
	0,0	для производных хитозана
	прибл. 0,6	для валериановой кислоты, если доступен
Значение Rf	Валериановая кислота	Не выявлены
	Неспецифические примеси:	Не выявлены

Значение из литературы	Не доступно	данные из	-
------------------------	-------------	-----------	---

Порог выявления валериановой кислоты с использованием данного визуализирующего реактива после TLC хроматографии: 0,03 мкг.

Чистая валериановая кислота может быть идентифицирована с использованием данной системы TLC. Коллоидная интегрированная валериановая кислота может быть не выявлена в чистом соединении - гидроколлоиде хитозан-валериановая кислота. Выявление и значение Rf "0" показывают сходство гидроколлоид хитозан-валериановая кислота с другими родственными соединениями хитозана. Гидроколлоид хитозан-валериановая кислота может представлять собой только коллоид полиаминосахара, но не раствор хитозана или производного хитозана с валериановой кислотой в воде. Приведенные выше результаты подтверждают идентичность предложенной структуры.

Пример 81. Устранение валериановой кислоты из гидроколлоид хитозан-валериановая кислота с использованием сильного вакуума и повышенной температуры.

Способ: оценка потери при сушке (специальный способ).

Прибор: скоростной концентратор с циркулирующим вакуумом.

Условия: 5 Па.

Температура: 60°C.

Время: 1 неделя.

Ожидаемый результат: постоянная масса.

Внешний вид: стекловидная масса.

Полученный в результате запах: нет типичного запаха валериановой кислоты.

Приготовление образца.

Повторное растворение, частично водой.

Внешний вид: высоковязкий гель.

Анализ TLC.

Прибор: система хроматографических емкостей Camag.

Пластика для TLC: предварительно покрытые пластинки Merck Si 60 F 254.

Условия: защищенные от солнечного света и с насыщением камеры.

Температура: 20-25°C.

Проявление: вертикальное проявление.

Хроматографические условия.

Образец-раствор: см. выше.

Нанесение: 5 мкл.

Сушка: минимум 2 мин в струе воздуха.

Интервал перемещения: 80 мм.

Подвижная фаза.

Растворители	Этилацетат	-	-	-
Смесь	100	-	-	-

Выявление с использованием УФ-флуоресценции и в видимой области.

Длина волны флуоресценции	254 нм	365 нм	Видимая область
Сигнал соединения	Нет	Нет	Нет
Примеси	Нет	Нет	Нет

Выявление с визуализирующими реактивами.

Видимый свет	Специфичный в отношении группы реактив	Реактив на основе анисового альдегида-серной кислоты	Йод
Сигнал соединения	Синее пятно/синий фон	серое пятно	коричневое пятно
Примеси	Нет	Нет	Нет
Специфичный в отношении группы реактив: реактив на основе бромкрезолового зеленого /бромфенолового синего/перманганата калия [Jork et al.]			

Значение R _f	пятно	0
-------------------------	-------	---

Порог выявления валериановой кислоты с использованием данного визуализирующего реактива после TLC хроматографии: 0,03 мкг.

Результаты: при использовании сильного вакуума и высокой температуры имеет место диспропорция гидроколлоида хитозан-валериановая кислота. Устранение валериановой кислоты может быть продемонстрировано по абсолютному отсутствию типичного запаха валериановой кислоты. Устранение валериановой кислоты может быть продемонстрировано анализом TLC: по отсутствию типичного пятна свободной валериановой кислоты при значении R_f 0,56. Хитозан или соединения хитозана могут быть идентифицированы при значении R_f 0. Гидроколлоид хитозан-валериановая кислота может представлять собой только коллоид полиаминосахара, но не раствор хитозана или производного хитозана с валериановой кислотой в воде.

Пример 82. Диспропорция гидроколлоида хитозан-валериановая кислота при использовании растворителей.

Структура гидроколлоида хитозан-валериановая кислота распадается в этилацетате до валериановой кислоты и соединения хитозана.

Приготовление образца.

Прибор: делительная воронка, испаритель.

Распределение жидкость-жидкость: 20 мл гидроколлоида хитозан-валериановая кислота и 10 мл этилацетата.

Условия: встряхивание в течение примерно 5 мин и ожидание для разделения фаз.

Разделение фаз: отбирали фазу этилацетата.

Стадия концентрирования: примерно 10 мл концентрировали до жидкого остатка (водянистого) с использованием испарителя.

Повторное растворение: в 1 мл метанола.

Гомогенизация: стадия центрифугирования в течение примерно 5 мин при 12000 об/мин.

Разделение фаз: верхняя фаза - прозрачный метанольный раствор.

Нижняя фаза: сильно вязкий гель.

Анализ TLC верхней и нижней фаз (см. выше).

а) Анализ верхней фазы (прозрачный метанольный раствор).

Анализ TLC.

Прибор: система хроматографических емкостей Camag.

Пластика для TLC: предварительно покрытые пластинки Merck Si 60 F 254.

Условия: защищенные от солнечного света и с насыщением камеры.

Температура: 20-25°C.

Проявление: вертикальное проявление.

Хроматографические условия.

Образец-раствор: прозрачный метанольный раствор.

Нанесение: 5 мкл.

Сушка: минимум 2 мин в струе воздуха.

Интервал перемещения: 80 мм.

Подвижная фаза.

Растворители	Этилацетат	-	-	-
Смесь	100	-	-	-

Выявление с использованием УФ-флуоресценции и в видимой области.

Длина волны флуоресценции	254 нм	365 нм	Видимая область
Сигнал соединения	Нет	Нет	Нет
Примеси	Нет	Нет	Нет

Выявление с визуализирующими реактивами.

Видимый свет	Специфичный в отношении группы реактив	Реактив на основе анисового альдегида-серной кислоты	Йод
Сигнал соединения	Желтое пятно/синий фон	Нет	Светло-желтоватое пятно
Примеси	Нет	Нет	Нет
Специфичный в отношении группы реактив: реактив на основе бромкрезолового зеленого /бромфенолового синего/перманганата калия [Jork et al.]			

Значение Rf	Валериановая кислота	0,57
	Неспецифические примеси:	-

Порог выявления с использованием визуализирующего реактива: 0,03 мкг.

Результат: верхняя фаза представляет собой прозрачный метанольный раствор. Валериановая кислота может быть идентифицирована после распада гидроколлоида в данном растворе с использованием TLC. Посредством TLC не могут быть выявлены хитозан или соединение хитозана.

б) Анализ нижней фазы (сильно вязкий гель).

Анализ TLC.

Прибор: система хроматографических емкостей Camag.

Пластинка для TLC: предварительно покрытые пластинки Merck Si 60 F 254.

Условия: защищенные от солнечного света и с использованием камеры.

Температура: 20-25°C.

Проявление: вертикальное проявление.

Хроматографические условия.

Образец-раствор: высоковязкий гель, полностью повторно растворенный в воде.

Нанесение: 30 мкл.

Сушка: минимум 2 мин в струе воздуха.

Интервал перемещения: 80 мм.

Подвижная фаза.

Растворители	Этилацетат	-	-	-
Смесь	100	-	-	-

Выявление с использованием УФ-флуоресценции и в видимой области.

Длина волны флуоресценции	254 нм	365 нм	Видимая область
Сигнал соединения	Нет	Нет	Нет
Примеси	Нет	Нет	Нет

Выявление с визуализирующими реактивами.

Видимый свет	Специфичный в отношении группы реактив	Реактив на основе анисового альдегида-серной кислоты	Йод
Сигнал соединения	Синее пятно/синий фон	Серое пятно	Коричневое пятно
Примеси	Нет	Нет	Нет
Специфичный в отношении группы реактив: реактив на основе бромкрезолового зеленого /бромфенолового синего/перманганата калия [Jork et al.]			

Значение Rf	Пятно	0
	Неспецифические примеси:	-

Порог выявления с использованием визуализирующего реактива: 0,03 мкг.

Результаты: нижняя фаза представляет собой высоковязкий гель, растворимый в воде. Валериановая кислота не может быть выявлена в данной фазе посредством TLC. Хитозан или соединение хитозана может быть идентифицировано в нижней фазе (геле) посредством TLC.

Результаты из анализа TLC	Возможна диспропорция гидроколлоида хитозан-валериановая кислота с использованием типичных растворителей, подобных этилацетату и, затем, метанола	
	Повторное растворение из диспропорционированного гидроколлоида хитозан-валериановая кислота может осуществляться с использованием метанола	
	Разделение гидроколлоида хитозан-валериановая кислота в этилацетате	
	демонстрирует две фазы	
	Верхняя фаза	Нижняя фаза
	Фаза этилацетата	Водный коллоидный остаток
	После концентрирования фазу этилацетата повторно растворяли в метаноле, и это также приводило к двум фазам	
	Верхняя фаза	Нижняя фаза
	прозрачный метанольный раствор	высоковязкий гель Этот гель может быть полностью повторно растворен в воде
	может быть идентифицирован	Не может быть идентифицирован
Не может быть выявлен хитозан или соединение хитозана	Может быть выявлен хитозан или соединение хитозана	

Резюме результатов.

	Чистая валериановая кислота	Гидро- коллоид хитозан- валериановая кислота (чистый CVHC)	Устранение из CVHC с использо- ванием сильного вакуума	Гидроколлоид хитозан- валериановая кислота (разделенный этилацетатом)		
				Верхняя фаза (метанол)	Нижняя фаза (вода)	
Значение Rf	0,56	+	-	-	+	-
Значение Rf	0	-	+	+	-	+
Выявление	Сигнал соединения					
УФ 254 нм	-	-	-	-	-	-
УФ 365 нм	-	-	-	-	-	-
Видимый свет	-	-	-	-	-	-
Реактив на основе анисового альдегида-серной кислоты	<i>Розовое пятно</i>	Серое пятно	Серое пятно	-	-	Серое пятно
Иодный реактив	<i>Желтоватое пятно</i>	Коричневое пятно	Коричневое пятно	<i>Светло- желтоватое пятно</i>	-	Коричневое пятно
Реактив на основе бромкрезолового зеленого – бромфенолового синего	<i>Желтое пятно</i>	Синее пятно	Синее пятно	<i>Желтое пятно</i>	-	Синее пятно

Результат: гидроколлоид хитозан-валериановая кислота может представлять собой только коллоид полиаминосахара, но не раствор хитозана или производного хитозана с валериановой кислотой в воде. Приведенные выше результаты подтверждают идентичность предложенной структуры.

Пример 83. Оценка относительной плотности.

Из-за высокой вязкости гидроколлоида хитозан-валериановая кислота оценка плотности не возможна с использованием сосуда для определения плотности/пикнометра согласно способу анализа Европейской Фармакопеи 2.2.5.

1. Способ анализа по весу.

Прибор: 250 мл мерная колба.

Весы: Sartorius MC 1 LC 2200S.

Термометр: термометр с градуировкой шкалы (минимум 0,5°C) и интервалом измерения не больше чем 60°C.

Результаты 1,001 [d_{20}^{20}].

Активным началом является гидрогель, таким образом, теоретическая плотность должна быть больше чем 1,0. Измеренные данные подтверждают идентичность предложенного вещества.

2. Способ анализа с использованием гидрометра.

Использовали способ анализа согласно Европейской Фармакопеи 2.2.5.

Прибор: 250-мл мерная колба.

Гидрометр: Widder 1573°, 20°C-M100-DIN 12791 класс Н.

Термометр: термометр с градуировкой шкалы (минимум 0,5°C) и интервалом измерения не больше чем 60°C.

Условия измерения: температура 20 плюс/минус 0,5°C с электронным термостатом.

Результаты 1,002 [d_{20}^{20}].

Активным началом является гидрогель, таким образом теоретическая плотность должна быть больше чем 1,0. Измеренные данные подтверждают идентичность предложенного вещества.

Пример 84. Сульфатированная зола.

Использовали способ анализа согласно Европейской Фармакопее 2.4.14.

Проведение анализа.

Прибор	Подходящий тигель (фарфоровый или платиновый) раскаляли при 600+/- 50°C в течение 30 мин в муфельной печи
	Дать охладиться в эксикаторе над силикагелем или другим подходящим осушителем
	Оценка веса тигля
Масса	Взвешивание тигля 1: 52,0120 [г]
	Взвешивание тигля 2: 57,6055 [г]
Способ 2 (нерастворимая в кислоте зола)	Дополнительную для данного гидрогеля стадию концентрирования досуха осуществляли посредством сушки при 105°C в нормальной печи
	Образец: 25 мл гидрогеля CVHC, обычно 1-2 г
	Масса образца: обычно 1-2 г или достаточное количество для получения остатка минимум 1 г.
	Смочить образец небольшим количеством серной кислоты R [95-97% масс./масс.] (обычно 1 мл) и нагревать при такой низкой температуре, какая является практичной, пока остаток не обуглится
	После охлаждения смочить остаток небольшим количеством серной кислоты R [95-97% масс./масс.] (обычно 1 мл)
	Нагревать до тех пор, пока больше не выделяются белые дымы
	Раскалять при 600+/- 50°C в течение 30 мин, пока остаток не станет полностью озоленным.
	В любое время на протяжении данной процедуры не допускается образование пламени
	Дать охладиться в эксикаторе над силикагелем или другим подходящим осушителем
	Взвесить и рассчитать процентную долю остатка
Определение общей массы	Общая масса тигля 1: 52,0668 г
	Общая масса тигля 2: 57,6612 г
Содержание сульфатированной золы	Значение 1: 0,0548 г
	Значение 2: 0,0557 г
	Среднее: 0,05525 г / 25 мл
Расчет содержания сульфатированной золы	$0,05525 \text{ г} / 25,05 \text{ г} = 0,0022055 \text{ г/г}$
	$= 2,2055 \text{ мг/г}$
	0,22%

Пример 85. Потеря при сушке.

На основе этого Phytochem® создали подходящие способы для определения потери при сушке.

1. Способ и параметр для анализа хитозан-HCl, хитозана и хитозан-Нас.

Приготовление образца.

Предобработка контейнера: вещество помещают в подходящую бутылку для взвешивания, предварительно высушенную при условиях, используемых впоследствии.

Заполнение: вещество заполняют не выше чем на 5 мм.

Транспортировка: бутылку для взвешивания закрывают подходящей крышкой.

Способ РС: "под сильным вакуумом" - модифицированный способ Фармакопее 2.2.32 (EP) "в вакууме в эксикаторе".

Прибор: эксикатор.

Время сушки: до постоянной массы.

Температуре сушки: 25°C плюс/минус 2°C.

Вакуум: постоянный 400-800 Па, полученный с использованием специальных насосов.

Осушительный реактив: дифосфорпентоксид (свежеприготовленный).

2. Оценка потери при сушке хитозана в гидроколлоиде хитозан-валериановая кислота (специальный способ).

Содержание хитозана в гидроколлоиде хитозан-валериановая кислота оценивается с использованием гравиметрического измерения.

Прибор: скоростной циркуляционный вакуумный концентратор.

Способ: оценка потери при сушке (специальный способ).

Условия измерения.

Давление: 500 Па.

Температура: 60°C.

Время: 1 неделя.

Ожидаемый результат: постоянная масса.

Внешний вид: стекловидная масса.

Измерение: опытный раствор - 4 мл гидроколлоида хитозан-валериановая кислота.

Повторность: 10 раз.

Формирующийся запах: нет типичного запаха от валериановой кислоты.

Взвешивание

1	40,20 мг	6	40,10 мг
2	39,80 мг	7	39,90 мг
3	40,20 мг	8	39,60 мг
4	39,90 мг	9	40,20 мг
5	40,10 мг	10	40,40 мг

Среднее 40,04 мг.

Стандартное отклонение 0,236643191.

Относительное стандартное отклонение 0,591016961.

Дисперсия 0,056.

Результаты: взвешивание высушенного вещества показывает хорошее сходство. На основе данных измерений содержание хитозана в гидроколлоиде хитозан-валериановая кислота составляет 1%.

Сравнение результатов.

	Хитозан, твердое вещество	Хитозан-НСI, твердое вещество	Хитозан-НАс, твердое вещество	Гидроколлоид хитозан-валериановая кислота
Потеря при сушке	7,2%	7,9%	20,3%	-
Остаток от сушки	-	-	-	1%
Целевой показатель EP	-	<10%	-	-

Активное начало должно представлять собой гель гидроколлоида. Измеренные данные подтверждают структуру соединения.

Пример 86. Оценка осмолярности.

Оценка осмолярности, которая могла быть проведена, представляла собой не прямое измерение уменьшения температуры плавления раствора.

Прибор: Halbmicro Osmometer Knauer.

Условия измерения: внешняя охлаждающая система.

Интервал: 0-1600 мОсмоль.

Способ: замораживание.

Методика анализа.

Калибровка со стандартным раствором 400 мОсмоль/кг: 12,687 г NaCl в 1 л воды при 20°C.

Повторность: 2 раза.

Сосуд: флакон из специального стекла.

Образец: гидроколлоид хитозан-валериановая кислота.

Опытный раствор: 1 - без разведения, 2 - разведение 1:5.

Количество: по 150 мкл каждого.

Калибровка.

Образец	Спецификация	Заданное значение	Измеренное значение
Калибровка 1	Бидистиллированная вода	0 мОсмоль	0 мОсмоль
Калибровка 2	400 мОсмоль/кг	400 мОсмоль	400 мОсмоль

Измерение.

Номер	Образец	Измеренное значение
1a	Гидроколлоид хитозан-валериановая кислота	100 мОсмоль
1б	Гидроколлоид хитозан-валериановая кислота	110 мОсмоль
2a	Гидроколлоид хитозан-валериановая кислота	1:5 20 мОсмоль
2б	Гидроколлоид хитозан-валериановая кислота	1:5 20 мОсмоль

Результаты: измерение осмолярности гидроколлоида хитозан-валериановая кислота показывает относительно низкое содержание. Измеренное содержание осмотически активных компонентов может быть таким низким, только если отсутствует раствор или суспензия хитозанов и валериановой кислоты. Высоковязкое гелеобразующее соединение может быть только гидроколлоидом.

Результат: приведенные выше измеренные данные подтверждают идентичность предложенного вещества.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения модифицированного хитозана, включающий стадию:

(а) инкубирования хитозана в водном растворе органической карбоновой кислоты или ее соли, где органическая карбоновая кислота выбрана из группы, состоящей из валериановой кислоты, пара-аминобензойной кислоты, глюкуроновой кислоты или соли любой из указанных кислот, где хитозан имеет степень деацетилирования от 62 до 98%.

2. Способ по п.1, где хитозан имеет степень деацетилирования от 80 до 95% и/или где хитозан имеет молекулярную массу или среднюю молекулярную массу от 80 до 700 кДа.

3. Способ по п.1 или 2, который включает следующие стадии до стадии (а):

(i) растворение хитозана в водном растворе кислоты, в частности в водном растворе уксусной кислоты,

(ii) увеличение значения pH, в частности до значения pH от примерно 8,0 до примерно 8,5, пока хитозан не выпадет в осадок, и

(iii) выделение осажденного хитозана,

где выделенный хитозан стадии (iii) используется на стадии (а).

4. Способ по любому из пп.1-3, где стадия (а) дополнительно включает добавление или присутствие минеральной кислоты, в частности HCl или H₂SO₄, или органической кислоты, в частности молочной кислоты, пара-аминобензойной кислоты или глюкуроновой кислоты.

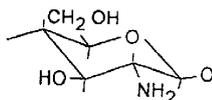
5. Модифицированный хитозан, получаемый способом по любому из пп.1-4.

6. Модифицированный хитозан, получаемый способом по п.1, представляющий собой гидроколлоид, содержащий:

(i) от 0,1 до 5% (мас./об.) хитозана и от 0,001 до 5% (мас./об.) валериановой кислоты, или

(ii) от 0,1 до 5% (мас./мас.) хитозана и от 0,001 до 5% (мас./мас.) глюкуроновой кислоты или пара-аминобензойной кислоты.

7. Соединение формулы [X]_n, где n представляет собой целое число от 50 до 5000 и X имеет следующую формулу (1):



где от 2 до 38% остатков X, составляющих указанное соединение, модифицированы ацелированием группы NH₂ в формуле (1), и где все или часть остатков X, составляющих указанное соединение, модифицированы органической карбоновой кислотой, выбранной из группы, состоящей из валериановой кислоты, пара-аминобензойной кислоты, глюкуроновой кислоты или соли любой из указанных кислот.

8. Фармацевтическая композиция, содержащая модифицированный хитозан по п.5 или 6 или соединение по п.7 и фармацевтически приемлемый разбавитель, эксципиент и/или носитель.

9. Композиция по п.8, где данная композиция дополнительно содержит антигенный материал из микроорганизмов и/или ферменты, в частности антигенный материал кератинофильных грибов и/или кератинофильных дрожжей, консерванты и/или антибиотики.

10. Композиция по п.9, где антигенный материал имеет происхождение из одной или более чем одной Candida, в частности Candida albicans, Trichophyton, в частности Trichophyton verrucosum, Trichophyton mentagrophytes, Trichophyton equinum, Trichophyton sarkisovii, Trichophyton rubrum и/или Trichophyton mentagrophytes, Microsporum, в частности Microsporum canis, как, например, Microsporum canis var. obesum и/или Microsporum canis var. distortum, и/или Microsporum gypseum, и/или Chrisporium, в частности Chrisporium tropicum.

11. Композиция по п.10, где антигенный материал имеет происхождение из одного или более чем одного из следующих штаммов: Trichophyton mentagrophytes DSM-7279, Trichophyton verrucosum DSM-28406, Trichophyton rubrum DSM-9469, Trichophyton rubrum DSM-9470, Trichophyton rubrum DSM-9471,

Trichophyton rubrum DSM-9472, Candida albicans DSM-9456, Candida albicans DSM-9457, Candida albicans DSM-9458, Candida albicans DSM-9459, Crisporium tropicum DSM-28405 и Microsporum canis DSM-32271.

12. Композиция по любому из пп.8-11, где модифицированный хитозан или соединение присутствует в концентрации от примерно 0,1 до примерно 2,0% (мас./об.), в частности от примерно 0,1 до примерно 1,4% (мас./об.), более конкретно от примерно 0,1 до примерно 0,3% (мас./об.).

13. Композиция по любому из пп.8-12 для лечения или предупреждения заболеваний у человека и/или животного, в частности в качестве вакцины.

14. Композиция по любому из пп.8-13 для лечения и/или предупреждения мастита, предпочтительно латентного мастита и/или острого мастита, эндометрита, предпочтительно хронического, острого и/или гнойно-катарального эндометрита, заболеваний копыт и когтей, хромоты, поражений в межпальцевой области, пальцевого дерматита, межпальцевого дерматита, межпальцевой флегмоны, трихофитоза, микроспороза, микоза кожи, аллергий, а также заболеваний, осложненных аллергиями, в частности аллергического обструктивного заболевания легких, аллергического заболевания кожи, аллергической эритемы уха, аллергического ринита, аллергического конъюнктивита, острого аллергического контактного дерматита, хронической аллергической контактной экземы или атопической экземы, обструктивного заболевания легких, в частности хронического обструктивного заболевания легких, заболеваний кожи, в частности дерматита, эритемы уха, ринита, конъюнктивита, дерматофитоза или бородавок, в частности обыкновенных бородавок, у субъекта или для модулирования иммунного ответа у субъекта.

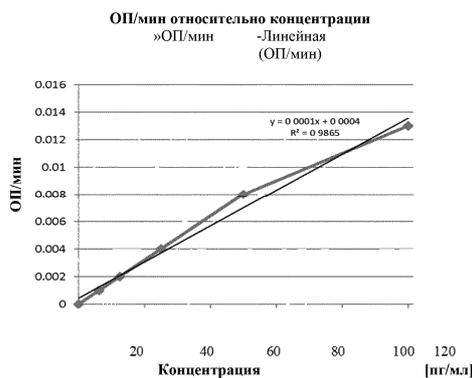
15. Композиция по любому из пп.8-12 для увеличения эффективности репродукции, предпочтительно эффективности репродукции при разведении животных.

16. Применение модифицированного хитозана по п.5 или 6 или соединения по п.7 в качестве активного агента в человеческой и/или ветеринарной медицине.

17. Применение по п.16 для лечения и/или предупреждения мастита, эндометрита, заболеваний копыт и когтей, хромоты, поражений в межпальцевой области, пальцевого дерматита, межпальцевого дерматита, межпальцевой флегмоны, трихофитоза, микроспороза, микоза кожи, аллергий, а также заболеваний, осложненных аллергиями, обструктивного заболевания легких, заболеваний кожи у субъекта или для модулирования иммунного ответа у субъекта.

18. Применение по п.16 для увеличения эффективности репродукции, предпочтительно эффективности репродукции при разведении животных.

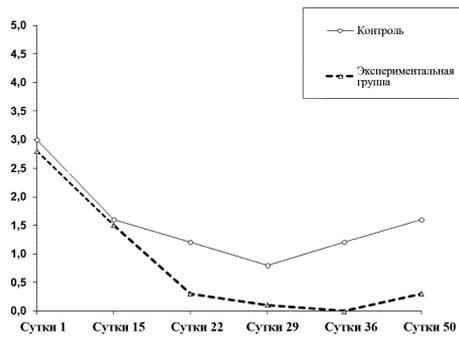
19. Применение по п.17 для лечения и/или предупреждения латентного мастита, острого мастита, хронического, острого и/или гнойно-катарального эндометрита, аллергического обструктивного заболевания легких, аллергических заболеваний кожи, аллергической эритемы уха, аллергического ринита, аллергического конъюнктивита, острого аллергического контактного дерматита, хронической аллергической контактной экземы, атопической экземы, хронического обструктивного заболевания легких, дерматита, эритемы уха, ринита, конъюнктивита, дерматофитоза или бородавок, в частности обыкновенных бородавок.



Фиг. 1

Интенсивность клинических симптомов

Средний балл

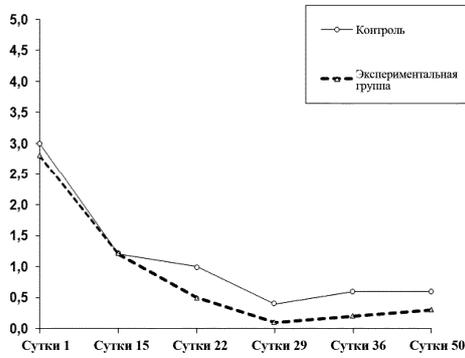


Сутки клинических наблюдений

Фиг. 2

Интенсивность клинических симптомов

Средний балл

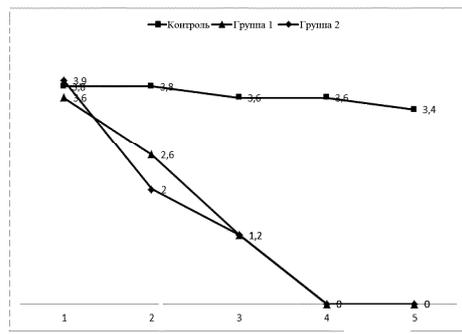


Сутки клинических наблюдений

Фиг. 3

Интенсивность клинических симптомов

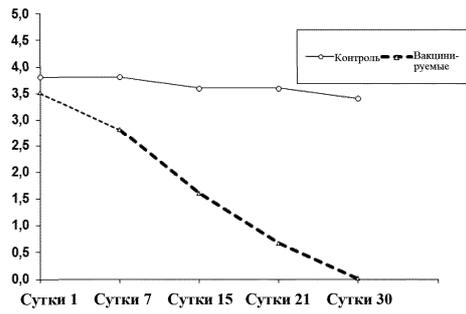
Средний балл



Сутки клинических наблюдений

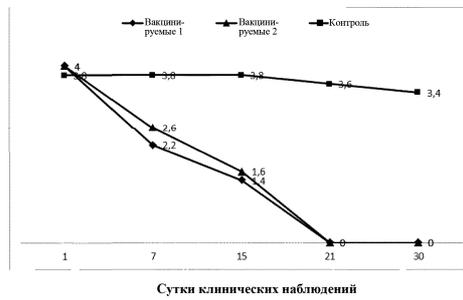
Фиг. 4

Интенсивность клинических симптомов
Средний балл



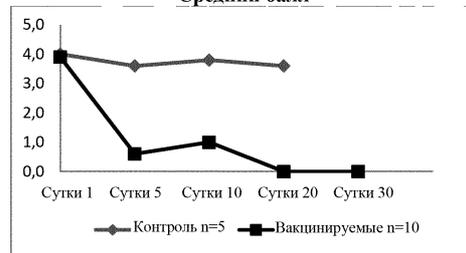
Сутки клинических наблюдений
Фиг. 5

Интенсивность клинических симптомов
Средний балл



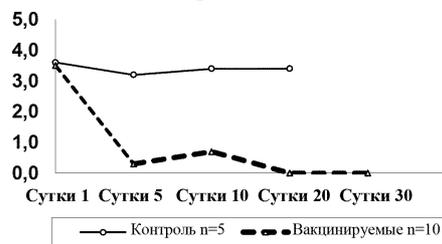
Фиг. 6

Интенсивность клинических симптомов
Средний балл

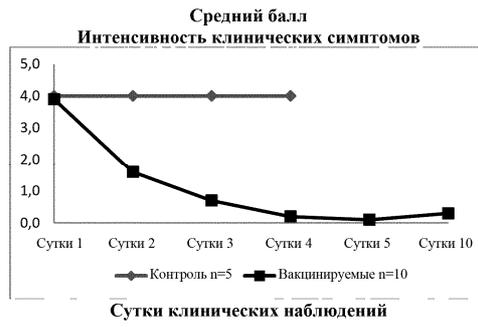


Сутки клинического наблюдения
Фиг. 7

Интенсивность клинических симптомов
Средний балл



Сутки клинических наблюдений
Фиг. 8



Фиг. 9