

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **040511**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.06.14

(21) Номер заявки
201891932

(22) Дата подачи заявки
2017.03.15

(51) Int. Cl. *A61K 39/00* (2006.01)
A61K 36/05 (2006.01)
A61P 31/10 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)

(54) КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ КОПЫТ И КОГТЕЙ

(31) 16160532.4

(32) 2016.03.15

(33) EP

(43) 2019.03.29

(86) PCT/EP2017/056145

(87) WO 2017/158039 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., Игнатьев
А.В. (RU)**

(56) DATABASE WPI, Week 199824, Thomson Scientific, London, GB; AN 1998-269979, XP002769357, & RU 2093178 C1 (EXPER VETERINARY RESINST), 20 October 1997 (1997-10-20), abstract

DATABASE WPI, Week 199741, Thomson Scientific, London, GB; AN 1997-446777, XP002769358, & RU 2074251 C1 (VETERINARY PREPARATIONS CONSTOL RES INST), 27 February 1997 (1997-02-27), abstract
WO-A1-9707232

(57) Изобретение относится к композиции, содержащей антигенный материал кератинофильных грибов и/или кератинофильных дрожжей, для применения в способе лечения и/или предупреждения заболеваний копыт и когтей у животных, и к новому штамму *Trichophyton verrucosum*, который, например, можно использовать в таком способе лечения и/или предупреждения.

B1**040511****040511****B1**

Настоящее изобретение относится к композиции, содержащей антигенный материал кератинофильных грибов и/или кератинофильных дрожжей, для применения в способе лечения и/или предупреждения заболеваний копыт и когтей у животных, и к новому штамму *Trichophyton verrucosum*, который, например, можно использовать в таком способе лечения и/или предупреждения.

Пальцевый дерматит (сокращенно - DD, также именуемый болезнью Мортелларо или итальянским гниением ступней), который был впервые описан в 1974 г Cheli и Mortellaro, является большой проблемой у молочных коров и мясного крупного рогатого скота, и он присутствует на многих молочных фермах. DD является очень заразным, и его сложно лечить и предупреждать. Также сложно контролировать его устранение из стада. Данное заболевание вызывает значительные экономические потери во всем мире. Разные виды бактерий ответственны за поражения кожи в межпальцевой области, которые характеризуются красными или "похожими на клубнику", безволосыми и болезненными язвами с эпителиальной гиперплазией и опуханием в пораженных местах. Они типично расположены на тыльной стороне стопы в межпальцевой области. Неактивные или подвергавшиеся лечению поражения бывает очень трудно отличать от других бородавчатых пальцевых поражений. DD следует отличать от межпальцевого дерматита (ID), который приводит к некрозу или некробациллозу дистальной кожи между пальцами. Исследования идентифицировали бактерий спирохет на срезах ткани DD. В дополнительном анализе в поражениях DD были идентифицированы многие типы бактерий. В частности, клинические признаки DD могут вызывать виды *Treponema*, такие как *T. phagedenis*, *T. vincentii* и *T. denticola*. Был обнаружен очень сложный комплекс разных этиологических факторов.

Межпальцевый дерматит (ID) обычно встречается у молочного крупного рогатого скота, и он является одной из главных инфекционных причин хромоты. Экссудативный дерматит, влажные и дурно пахнущие эрозии со струпьями или коркой и одиночными язвами характеризуют клиническое проявление поражений кожи в области пятки и в межпальцевой области. Также могут наблюдаться клинические симптомы на дорзальной поверхности пальцев. Пятки являются болезненными. Затем часто наблюдается гиперплазия (мозоли, фиброма) с хроническим раздражением межпальцевой области, приводящая к хромоте. ID вызывает смесь разных бактерий. *Dichelobacter nodosus* играет важную роль в проявлении клинических симптомов. Данный микроорганизм является анаэробом с сильными фотолитическими свойствами. Данная инфекция, главным образом, вызвана бактериями от инфицированных коров, где *D. nodosus* распространяется от инфицированных к неинфицированным животным. Несмотря на то, что данные бактерии не могут долгое время выживать в земле, они могут сохраняться в когтях. Данные бактерии разрушают эпидермис, но не проникают в дермальные слои. Разрушение границы между кожей и мягким роговым слоем пятки дает эрозии и язвы. Данные поражения вызывают ощущение дискомфорта.

Межпальцевая флегмона (сокращенно IP, также именуемая панарицием или копытной гнилью) представляет собой некротическое воспаление кожи в межпальцевой области. Данное заболевание обычно проявляется в острой или подострой форме. Поражения, эрозия и повреждение на коже между пальцами служат в качестве ворот для инфекции. Кроме того, бактериальная микрофлора может поступать в подкожную ткань и инфицировать ее. Инфицированные животные становятся хромыми, имеют целлюлит и припухлость. Клинические симптомы IP сопровождаются уменьшением продукции молока, пониженным аппетитом и лихорадкой. В IP, главным образом, участвуют микроорганизмы *Dichelobacter nodosus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Arcanobacterium pyogenes* и другие. Главной бактерией, участвующей в IP, является *Fusobacterium necrophorum*, которая представляет собой грамотрицательную, неспорообразующую, безжгутиковую, неподвижную, плейоморфную анаэробную бактерию. Данная бактерия продуцирует липополисахаридный эндотоксин, который имеет некротизирующую активность и вызывает некроз кожи и подкожной ткани.

DD, ID и IP, которые являются самыми распространенными инфекционными заболеваниями копыт и когтей, sporadически 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. IP 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 necrophorum* 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 ткани 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 предположено, 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 кро-

веосстанавливающими растворами.

Внутримышечные применения пенициллина или окситетрацеллина на протяжении 3 суток демонстрируют хорошие результаты для лечения IP, но не являются эффективными при лечении ID и DD.

Для лечения IP, ID и DD местное применение растворимых окситетрациклина, линкомицина-спектиномицина, нитрофуразона или сульфпрепаратов, а также смеси порошка сульфаметазина и безводного сульфата меди может дать достаточные результаты. Однако перед данным лечением поражение должно быть тщательно очищено, и некротическая ткань должна быть удалена.

Для предупредительного применения можно использовать ванну для ног с 7-10% сульфата меди или цинка, или 3-5%-ный раствор формальдегида. Также можно использовать ванны для ног с окситетрациклином или линкомицином-спектиномицином. Однако данные растворы могут загрязнять окружающую среду, и они являются запрещенными в некоторых областях или странах. Данный способ был принят для контроля IP и ID, но является менее эффективным для лечения DD.

Для лечения DD, ID и IP в США была разработана вакцина на основе бактерии *Treponema* spp. Было показано то, что иммунизация указанной вакциной могла уменьшать клинические симптомы DD у крупного рогатого скота. Но в клинических испытаниях было обнаружено то, что специфичные для стада патогены, включая *Treponema* spp., не могут давать достаточную защиту против DD. Коровы, которым давали бактерии во время сухого периода не имели уменьшения поражений по сравнению с невакцинированными контрольными животными. Такие же результаты были получены в Германии. Было сделано заключение о том, что данное лечение вероятно не будет эффективной терапевтической, контрольной или предупредительной стратегией для DD в будущем.

Соответствующая имеющаяся в продаже вакцина не существует на рынке.

Было проведено много исследований для индуцирования защиты против *F. necrophorum* посредством применения разных видов антигенных компонентов. Сообщали о том, что крупный рогатый скот, которому инъецировали супернатант культуры *F. necrophorum*, содержащий лейкотоксин, имел низкую заболеваемость межпальцевой флегмоной, вызванной *F. necrophorum*. Стимуляция супернатантом штамма *F. necrophorum*, продуцирующего высокий уровень лейкотоксина, смешанным с адьювантом, приводила к высокому титру антитела против лейкотоксина при инъекции бычкам и давала значимую защиту в отношении экспериментально индуцированных абсцессов печени. Бактерии *F. necrophorum* использовали в качестве агента для иммунизации крупного рогатого скота и овец против некроза печени. Кроме того, клетки из культуры вирулентных изолятов *F. necrophorum* инактивировали 0,4%-ным формалином. Мыши, иммунизированные указанными инактивированными клетками и живой *F. necrophorum*, не имели выявляемых бактерий в печени, легком или селезенке в течение вплоть до 28 суток. Было сделано заключение о том, что иммунизация мышей *F. necrophorum*, убитой формалином, давала защиту против инфекции. Инъекция эндотоксина с лейкотоксической активностью иммунизированным животным также предупреждает формирование инфекции *F. necrophorum*.

Для того чтобы произвести такую вакцину на основе лейкотоксоида, бактерии *F. necrophorum* культивировали таким способом, чтобы усилить выработку лейкотоксина в супернатанте. Бактериальный рост и высвобождение лейкотоксина прекращали, и вакцину получали инактивированием по меньшей мере супернатанта, содержащего лейкотоксин. Это делали посредством отделения супернатанта, содержащего лейкотоксин, от бактерий и затем посредством инактивации формалином, β -пропиолактоном, нагреванием, радиацией или любым другим известным способом инактивации. В качестве альтернативы, вся культура могла быть инактивирована с получением вакцины.

Также известен другой инактивированный формалином лейкоцидин-экзотоксин, полученный в результате продукции штамма *Fusobacterium necrophorum* "0-1" (Российский исследовательский институт экспериментальной ветеринарной медицины), содержащий 1-10% инактивированной бактериальной массы указанного штамма, содержащей 7,0-7,7 миллиардов клеток на 1 см, глицерин, смесь минерального масла "Маркол-52", эмульгатора, взятых в весовых соотношениях 1:(0,9-1,1), суспензию живых спор штамма 55 вакцины против сибирской язвы (Российский исследовательский институт ветеринарной вирусологии и микробиологии) в физиологическом растворе и адьювант. Таким образом, иммунизация животных против лейкотоксина *F. necrophorum* может предупреждать заболевания, ассоциированные с инфекцией *F. necrophorum*, например абсцессы печени у крупного рогатого скота и овец, и ID, а также IP у крупного рогатого скота.

Известная вакцина для предупреждения некробактериоза у крупного рогатого скота содержит антигены эндотоксина и экзотоксина, полученные из патогенов некробактериоза (*F. necrophorum*), формалиновый инактиватор, физиологический раствор и адьювант на основе минерального масла и ланолина. Известная вакцина против некробактериоза сельскохозяйственных животных содержит комплекс растворимых антигенов из штаммов *F. necrophorum* серотипов I и II, формалин, латекс и адсорбирующий адьювант. Однако данные известные вакцины содержат антигены одного типа патогена и не дают достаточной профилактической активности против некробациллоза - заболеваний с участием анаэробных микроорганизмов и гнойной раневой микрофлоры.

Также известно, по меньшей мере, несколько инактивированных имеющихся в продаже вакцин для профилактики и лечения ID и IP. Например, известна поливалентная вакцина для предупреждения нек-

робактериоза у крупного рогатого скота. Указанная вакцина содержит инаktivированные формалином антигены *Fusobacterium necrophorum*, *Staph. aureus*, *Corynebac. pyogenes*, анатоксин *Clostridium perfringes* типа A, *Clostridium perfringes* типа A, адъювант - гидроксид алюминия и иммунопотенцирующий агент GMDP (N-ацетилглюкозаминил-(1-4)-N-ацетимуромил-Z-аланин-D-изоглутамин). Также известна вакцина "Нековак", которая содержит инаktivированные культуры *Fusobacterium necrophorum* VGNKI N "Кр-1" DEP и/или *Fusobacterium necrophorum* VGNKI N "Тула" DEP, *Actinomyces (Corybacterium) pyogenes* VGNKI No. 4/2334 DEP, *Staphylococcus aureus* VGNKI No. 7315 DEP и *Clostridium perfringens* типа A VGNKI No. 28 DEP. Данная вакцина также содержит анатоксин из штамма *Clostridium perfringens* типа A VGNKI No. 28 DEP и адъювант на основе гидроксида алюминия. Кроме того, данная вакцина содержит солевой раствор, такой как физиологический раствор.

Все известные вакцины часто не могут индуцировать достаточный иммунный ответ и защищать животных против межпальцевого дерматита и межпальцевой флегмоны. Отсутствуют эффективные вакцины против пальцевого дерматита.

В данной области известны подходы, касающиеся применения инаktivированных дерматофитов в качестве вакцин против дерматомикоза. Например, описана активная иммунизация против инфекции *Trichophyton purpureum* у кроликов с использованием инаktivированной суспензии гиф *Trichophyton rubrum*. Также в EP 393371 и WO 9307894 раскрыты инаktivированные вакцины против дерматомикоза, содержащие дерматофитов рода *Trichophyton* и/или *Microsporum*. Кроме того, в WO 98/15284 описаны вакцины против микозов, которые содержат гомогенизированные инаktivированные микроконидии дерматофитов и инаktivированные гомогенизированные дрожжевые бластоспоры.

Дерматомикозы у животных представляют собой антропозоонозные заболевания кожи и родственной ткани. Клиническими симптомами являются потеря волос в пораженной области, гиперемия, шелушение и асбестовидные струпья. Телята являются более чувствительными к инфекции стригущим лишаем, чем старшие животные. Дерматомикозы часто также характеризуются локализованной инфекцией кожи. У крупного рогатого скота поражения чаще всего находятся на шее, голове и состоят из серобелых корок, поднимающихся на коже. Кроме того, дерматомикозы могут приводить к алопеции. Описывали передачу организмов, вызывающих стригущий лишай, от инфицированных животных людям. Дерматомикозы у животных имеют значительное социальноэкономическое влияние. Больные животные требуют длительного лечения и могут распространять инфекцию как животным, так и людям. До настоящего времени дерматомикозы лечили с использованием разных типов лекарственных средств, местно наносимых на пораженные участки кожи. Они включают целый ряд мазей, втираний, растворов и других веществ, содержащих фунгициды и фунгистатики. Недостатками таких лечений является то, что они не очень эффективны, они требуют принятия карантинных мер и дезинфекции областей, где содержали животных (боксов для содержания молодняка, вивариев, ферм, зоопарков, цирков и т.д.). Кроме того, они требуют затрат существенных средств на лекарственные препараты и ветеринарное лечение, и они создают сложности в иммобилизации животных (для диких животных, содержащихся в неволе). Были разработаны инаktivированные вакцины для лечения трихофитоза у крупного рогатого скота, дерматофитоза у лошадей, кошек и собак, как, например, описано в WO 93/07894, и живые вакцины для лечения пушных животных и кроликов (см. патент СССР № 835446), верблюдов (см. патент СССР № 1190574) и других животных. Также была разработана вакцина для предупреждения и лечения микоза у млекопитающих (см. WO 98/15284).

Таким образом, задачей настоящего изобретения является предложение новых композиций для применения в способе лечения и/или предупреждения заболеваний копыт и когтей у животных. Другой задачей настоящего изобретения является предложение композиций для применения в способе лечения и/или предупреждения пальцевого и/или межпальцевого дерматита, и/или межпальцевой флегмоны у животных, в частности, у полорогих и свиней. Другой задачей настоящего изобретения является предложение нового штамма *Trichophyton verrucosum*. Другой задачей настоящего изобретения является предложение композиций для применения в способе лечения и/или предупреждения дерматофитоза.

Данные задачи решаются посредством объекта изобретения, определенного в формуле изобретения.

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" (т.е. 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" (т.е. исключающий присутствие дополнительного другого предмета) и "содержащий, но не состоящий из" (т.е. требующий присутствия дополнительного другого предмета), причем первое является более предпочтительным.

Термин "заболевание копыт и когтей" в том виде, в котором он здесь используется, относится, в ча-

стности, к инфекционным заболеваниям копыт и когтей у полорогих и/или свиней. Указанные заболевания, в частности, вызваны 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, межпальцевым дерматитом и межпальцевой флегмоной.

Термин "хитозан" в том виде, в котором он здесь используется, относится к сополимеру 2-амино-2-дезоксид-Д-глюкопиранозы и 2-ацетида-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.

Теперь неожиданно обнаружили то, что вакцины, содержащие антигенный материал кератинофильных грибов или дрожжей, дают хорошую устойчивость, профилактический и целительный эффект против пальцевого дерматита, межпальцевого дерматита и межпальцевой флегмоны у животных. В частности, неожиданно обнаружили то, что вакцины, содержащие гомогенизированные инактивированные микроконидии дерматофитов и/или инактивированные гомогенизированные дрожжевые бластоспоры, дают хорошую устойчивость, профилактический и целительный эффект против пальцевого дерматита, межпальцевого дерматита и межпальцевой флегмоны у животных.

Настоящее изобретение относится к композиции, содержащей антигенный материал кератинофильных грибов или кератинофильных дрожжей, для применения в способе лечения и/или предупреждения заболеваний копыт и когтей у животных. Предпочтительно данные животные являются млекопитающими, более предпочтительно полорогими и/или свиньями, наиболее предпочтительно крупным рогатым скотом.

Антигенный материал кератинофильных грибов или дрожжей может иметь происхождение из любых частей кератинофильных грибов или дрожжей, содержащих антигены, таких как мицелий, артроспоры, микроконидии дерматофитов, дрожжевые бластоспоры или другие. Данные 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, настоящее изобретение более конкретно относится к композиции, содержащей гомогенизированные инактивированные микроконидии дерматофитов и/или гомогенизированные инактивированные дрожжевые бластоспоры, и/или антигенный материал дрожжевых бластоспор, и/или микроконидии дерматофитов.

В частности, заболевания копыт и когтей приводят к хромоте. Более конкретно, заболевания копыт и когтей представляют собой пальцевый дерматит и/или межпальцевый дерматит, и/или межпальцевую флегмону. Заболевания копыт и когтей и пальцевый дерматит, межпальцевый дерматит, межпальцевая флегмона, соответственно, могут быть вызваны *Dichelobacter nodosus*, *Fusobacterium necroforun*, *Fusobacterium spp*, *Treponema spp*, такими как *T. phagedenis*, *T. vincentii* и *T. denticola*, *Campylobacter spp*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Arcanobacterium pyogenes* и *Prevotella spp.*, и/или вирусом.

Антигенный материал кератинофильных дрожжей, в частности дрожжевых бластоспор, композиции для применения по настоящему изобретению 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* и/или *Microsporum*. Более предпочтительно микроконидии дерматофитов принадлежат к видам *Trichophyton verrucosum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton equinum*, *Trichophyton sarkisovii*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum canis* и/или *Microsporum gypseum*. 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 ru-*

brum DSM-9471, *Trichophyton rubrum* DSM-9472, *Candida albicans* DSM-9456, *Candida albicans* DSM-9457, *Candida albicans* DSM-9458 и *Candida albicans* DSM-9459. Таким образом, в особенно предпочтительных воплощениях настоящего изобретения 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 и *Candida albicans* DSM-9459.

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) (DSMZ), 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. Basotherm 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	20-суточная колония на агаре Сабуро: белая, пушистая, приподнятая, край колонии

	бахромчатый, под поверхностью желтая, в центре – темно-пурпурная, диаметр колонии – 60-63 мм.	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 обратнотрубчатые овальные микроконидии размером 2-3 × 3-5 мкм, макроконидии длинные булавовидные карандашевидные с 4-5 поперечными стенками, имеющие размер 4-6 × 15-40 мкм.	20-суточная культура с разделенными перегородками ветвистыми 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	Результаты иммунизации группы морских свинок инактивированным антигеном из культур (повторялась не менее, чем 5 раз): устанавливает
	иммунитет.	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-	Штамм является вирулентным. Через 9-10 суток после нанесения дозы 500-600 тысяч клеток
	600 тысяч клеток грибкового материала на см ² на пораненную кожу морских свинок образуются некротические струпья. Спонтанное выздоровление через 22-25 суток.	грибкового материала на см ² на пораненную кожу морских свинок образуются тонкие некротические струпья. 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 ноге 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,	20-суточная колония на агаре Сабуро: белая, пушистая,
	приподнятая, край колонии ровный, под поверхностью желтая, в центре – темно-пурпурная, диаметр колонии – 32-35 мм.	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 тонкие некротические 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 струпья. 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	Результаты иммунизации группы морских свинок инактивированным антигеном из культур (повторялась не менее, чем 5 раз): устанавливает
	иммунитет.	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 ногте 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 булабовидных 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 тонкие некротические 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 струпья. Спонтанное выздоровление через 25-30 суток.
Ответная реакция	Результат внутримышечной инъекции инаktivированных корпускулярных антигенов из культур: нет наблюдаемых изменений в клиническом состоянии животных.	Результат внутримышечной инъекции инаktivированных корпускулярных антигенов из культур: воспаление в точке инъекции, отек.
Иммуногенный ответ	Результаты иммунизации группы морских свинок инаktivированным антигеном из культур (повторялась не менее, чем 5 раз): устанавливает иммунитет.	Результаты иммунизации группы морских свинок инаktivированным 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	10-суточная односпоровая колония	10-суточная односпоровая колония
культуры	на агаре Сабуро: кремовая, гладкая и пастообразная, блестящая, приподнятая, край колонии ровный, диаметр колонии – 20-30 мм.	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 80-100% 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 10-12-15 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 продукции 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-	10-суточная односпоровая культура на агаре Сабуро со сферическими овальными почкующимися
	11 мкм, хламидоспоры шириной 12-15 мкм, псевдогифы шириной 4-8 мкм, гифы шириной 1,5-3 мкм.	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 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 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	Результаты иммунизации группы белых мышей инактивированным антигеном из культур (повторялась
	не меньше, чем 10 раз): устанавливает иммунитет.	не меньше, чем 10 раз): устанавливает иммунитет.

Штамм *Trichophyton mentagrophytes* DSM-7279 был депонирован согласно Будапештскому соглашению в "Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen" (DSMZ), 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) 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 mentagrophytes № VKPGF-930/1032, № DSM-7279

Данный штамм был депонирован в DSM 1 октября 1992 г. под серийным № DSM-7279. Штамм получали посредством направленного отбора на основе продукции спор и ослабления эпизоотического штамма № 1032, который был обнаружен на лошади в 1985 г. Данный штамм был идентифицирован, как описано выше Rebel, Taplin, местное цитирование, и Kashkin, местное цитирование). Биологические свойства описаны в табл. И. Штамм № VKPGF-930/1032, DSM-7279, отличается от эпизоотического штамма по его более быстрому росту в питательной среде, огромной продукции микроконидий, его меньшей вирулентности и отсутствию какой-либо реакции с его антигенами.

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 Mi-

croorganism en 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. И. 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 И

Свойства и характеристики штамма	Штамм № VKPGF-930/1032	Эпизоотический штамм № 1032
Описание культуры	Зрелая 10-15 суточная колония в агаре/сусле: Зрелая 25-30-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.	
Морфологические характеристики	Разделенные перегородками ветвистые гифы шириной 1-3 мкм, многочисленные прямые и спиральные гифы шириной 1-3 гноевидные, 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 макроконидий.	Разделенные перегородками ветвистые гифы шириной 1-3 гноевидные, овальные микроконидии мкм, круглые, уплощенные гноевидные размером от 1 до 3 × от 2 до 6 мкм, мало удлинненно-овальных макроконидий с 2-5 перегородками, размером от 2 до 6 × от 15 до 25 мкм.
Патогенные характеристики	Некротические струпья.	Густые, асбестовидные струпья.
От 9 до 10 суток после нанесения дозы 500-600 тысяч клеток грибкового материала на см ² на пораненную кожу кролика.		
Спонтанное выздоровление через	22-25 суток	30-35 суток
Ответная реакция	Нет наблюдаемых изменений в клиническом состоянии	Воспаление в точке инъекции, отек
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 PHR	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)		

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 инаktivированных корпускулярных антигенов из культур: нет наблюдаемых изменений в клиническом состоянии животных.	Результат внутримышечной инъекции инаktivированных корпускулярных антигенов из культур: воспаление в точке инъекции, отек.
Иммуногенный ответ	Результаты иммунизации группы морских свинок инаktivированным	Результаты иммунизации группы морских свинок инаktivированным
	антигеном из культур (повторялась не менее, чем 5 раз): устанавливает иммунитет против дерматофитоза, вызванного <i>T. verrucosum</i> .	антигеном из культур (повторялась не менее, чем 5 раз): устанавливает иммунитет против дерматофитоза, вызванного <i>T. verrucosum</i> .

В предпочтительном воплощении композиции для применения по настоящему изобретению композиция содержит гомогенизированные инаktivированные 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 композиции содержит смесь гомогенизированных инаktivированных микроконидий дерматофитов из одного, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти или десяти из перечисленных выше дерматофитов и гомогенизированные, инаktivированные дрожжевые бластоспоры из одного, двух, трех или четырех из перечисленных выше дрожжей. В другом предпочтительном воплощении композиции содержит гомогенизированные инаktivированные 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, как здесь описано. Альтернативно или дополнительно композиции могут дополнительно содержать хитозан, модифицированный органической карбоновой кислотой или ее солью.

В другом предпочтительном воплощении композиции 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 композиции 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 инаktivированные микроконидии дерматофитов из одного, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти или десяти из перечисленных выше дерматофитов и/или гомогенизированные инаktivированные дрожжевые бластоспоры из одного, двух, трех или четырех из перечисленных выше дрожжей. Альтернативно или дополнительно композиции могут дополнительно содержать хитозан, модифицированный органической карбоновой кислотой или ее солью.

В предпочтительном воплощении композиция для применения по настоящему изобретению содержит смесь гомогенизированных инаktivированных 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 использоваться как композиция для применения по настоящему изобретению. Поливак-ТМ представляет собой вакцину, разработанную для животных, таких как кошки, собаки, лошади и другие. Данная композиция может дополнительно содержать антигенный материал, как здесь описано, и/или хитозан, модифицированный органической карбоновой кислотой или ее солью.

В другом предпочтительном воплощении композиция для применения по настоящему изобретению содержит смесь гомогенизированных инаktivированных 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 использоваться как композиция для применения по настоящему изобретению. Поливак-Т представляет собой вакцину, специально разработанную для крупного рогатого скота. Данная композиция может дополнительно содержать антигенный материал, как здесь описано, и/или хитозан, модифицированный органической карбоновой кислотой или ее солью.

В другом предпочтительном воплощении композиция для применения по настоящему изобретению содержит смесь гомогенизированных инаktivированных микроконидий дерматофитов *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton verrucosum* и *Trichophyton sarkisovii*, и гомогенизированных инаktivированных дрожжевых бластоспор *Candida albicans*. Данная композиция может дополнительно содержать антигенный материал, как здесь описано, и/или хитозан, модифицированный органической карбоновой кислотой или ее солью.

В другом предпочтительном воплощении композиция для применения по настоящему изобретению содержит гомогенизированные инаktivированные микроконидии дерматофита *Trichophyton mentagrophytes*, в частности, *Trichophyton mentagrophytes* DSM-7279. Данная композиция может дополнительно содержать антигенный материал, как здесь описано, и/или хитозан, модифицированный органической карбоновой кислотой или ее солью.

В другом предпочтительном воплощении композиция для применения по настоящему изобретению содержит гомогенизированные инаktivированные микроконидии дерматофита *Trichophyton verrucosum*, в частности, *Trichophyton verrucosum* DSM - 28406. Данная композиция может дополнительно содержать антигенный материал, как здесь описано, и/или хитозан, модифицированный органической карбоновой кислотой или ее солью.

В другом предпочтительном воплощении композиция для применения по настоящему изобретению содержит смесь гомогенизированных инаktivированных микроконидий дерматофита *Trichophyton verrucosum*, в частности, *Trichophyton verrucosum* DSM-28406, и гомогенизированных инаktivированных дрожжевых бластоспор *Candida albicans*, в частности, *Candida albicans* DSM-9456. Данная композиция может дополнительно содержать антигенный материал, как здесь описано, хитозан, модифицированный органической карбоновой кислотой или ее солью.

В другом предпочтительном воплощении композиция для применения по настоящему изобретению содержит смесь гомогенизированных инаktivированных микроконидий дерматофитов *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton verrucosum* и *Trichophyton sarkisovii*. Например, вариант вакцины Поливак-ТМ, не содержащий по сравнению с классической Поливак-ТМ *Trichophyton equinum* и штаммы *Microsporum* (изготовитель: ООО "Ветбиохим", Москва; дистрибьютор: ООО "Простор", Москва), соответствует данному воплощению и может использоваться как композиция для применения по настоящему изобретению. Данная композиция может дополнительно содержать антигенный материал, как здесь описано, и/или хитозан, модифицированный органической карбоновой кислотой или ее солью.

В другом предпочтительном воплощении композиция для применения по настоящему изобретению содержит смесь гомогенизированных инаktivированных микроконидий дерматофитов *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum canis*, *Microsporum canis* var. *obesum*, *Microsporum canis* var. *distortum* и *Microsporum gypseum*. Данная композиция может дополнительно содержать антигенный материал, как здесь описано, и/или хитозан, модифицированный органической карбоновой кислотой или ее солью.

В другом предпочтительном воплощении композиция для применения по настоящему изобретению содержит смесь гомогенизированных инаktivированных микроконидий дерматофитов *Trichophyton men-*

tagrophytes, *Trichophyton verrucosum*, *Trichophyton equimim*, *Trichophyton sarkisovii*, *Microsporum canis*, *Microsporum canis* var. *obesum*, *Microsporum canis* var. *distortion* и *Microsporum gypseum*. Данная композиция может дополнительно содержать антигенный материал, как здесь описано, и/или хитозан, модифицированный органической карбоновой кислотой или ее солью.

В другом предпочтительном воплощении композиция для применения по настоящему изобретению содержит смесь гомогенизированных инактивированных микроконидий дерматофитов *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton verrucosum* и *Trichophyton sarkisovii*. Данная композиция может дополнительно содержать антигенный материал, как здесь описано, и/или хитозан, модифицированный органической карбоновой кислотой или ее солью.

В другом предпочтительном воплощении композиция для применения по настоящему изобретению содержит гомогенизированные инактивированные дрожжевые бластоспоры *Candida albicans*, в частности, *Candida albicans* DSM-9456. Данная композиция может дополнительно содержать антигенный материал, как здесь описано, и/или хитозан, модифицированный органической карбоновой кислотой или ее солью.

В другом предпочтительном воплощении композиция для применения по настоящему изобретению содержит смесь гомогенизированных инактивированных микроконидий дерматофитов *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton verrucosum* и *Trichophyton sarkisovii*. Данная композиция может дополнительно содержать антигенный материал, как здесь описано, и/или хитозан, модифицированный органической карбоновой кислотой или ее солью.

В другом предпочтительном воплощении композиция для применения по настоящему изобретению содержит антигенный материал дрожжевых бластоспор и/или микроконидий дерматофитов. Особенно предпочтительной является композиция, содержащая антигенный материал микроконидий дерматофита *Trichophyton verrucosum*, в частности штамма *Trichophyton verrucosum* DSM-28406.

В другом предпочтительном воплощении композиция для применения по настоящему изобретению содержит смесь гомогенизированных инактивированных микроконидий дерматофитов из одного, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти или десяти из перечисленных выше дерматофитов и антигенного материала из одного, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти или десяти из перечисленных выше дерматофитов и/или одного, двух, трех или четырех из перечисленных выше дрожжей.

В другом предпочтительном воплощении композиция для применения по настоящему изобретению содержит смесь антигенного материала микроконидий дерматофитов из одного, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти или десяти из перечисленных выше дерматофитов с гомогенизированными инактивированными дрожжевыми бластоспорами одного, двух, трех или четырех штаммов *Candida*, в частности, *Candida albicans*, более конкретно, *Candida albicans* DSM-9456, *Candida albicans* DSM-9457, *Candida albicans* DSM-9458 или *Candida albicans* DSM-9459.

В другом предпочтительном воплощении композиция для применения по настоящему изобретению содержит смесь антигенного материала бластоспор одного, двух, трех или четырех штаммов *Candida*, в частности *Candida albicans*, более конкретно *Candida albicans* DSM-9456, *Candida albicans* DSM-9457, *Candida albicans* DSM-9458 или *Candida albicans* DSM-9459, с гомогенизированными инактивированными микроконидиями дерматофитов из одного, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти или десяти из перечисленных выше дерматофитов.

Антигенный материал дрожжевых бластоспор и/или микроконидий дерматофитов предпочтительно содержит полисахариды и/или гликопептиды, выделенные из кератинофильных грибов или дрожжей. Антигенный материал, содержащий такие полисахариды и/или гликопептиды, может быть нерастворимым антигенным материалом (ANMP), растворимым антигенным материалом (ASMP) или экзогенным антигенным материалом (AEMP). Кератинофильные грибки предпочтительно принадлежат к видам *Trichophyton* или *Microsporum*, более предпочтительно - *Trichophyton verrucosum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton equinum*, *Trichophyton sarkisovii*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum gypseum* и *Microsporum canis*, и кератинофильные дрожжи предпочтительно принадлежат к видам *Candida*, более предпочтительно - *Candida albicans*. Особенно предпочтительным является антигенный материал, происходящий 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, *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 грибки или дрожжи предпочтительно куль-

тивируют 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 повторять 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. Температура 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 хитозана, модифицированного органической карбоновой кислотой или ее солью. 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 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 культивируются 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 обрабатывают водным раствором щелочи. Предпочтительными водными щелочными растворами являются NaOH или KOH в предпочтительных концентрациях 0,1-5% (мас./об.). Щелочная обработка предпочтительно проводится 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 обработка при водных кислотных условиях осуществляется 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 подвергается стадии осаждения. Предпочтительно осаждение проводится 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. Твердая фаза затем подвергается 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. 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 лиофилизируют 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 проводится 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 настоящего изобретения композиция для применения по настоящему изобретению содержит штамм *Trichophyton verrucosum* BINO 348-DSM 28406, его антигенный материал и/или его гомогенизированные инактивированные микроконидии дерматофита. Данная композиция может дополнительно содержать антигенный материал, как здесь описано, и/или хитозан, модифицированный органической карбоновой кислотой или ее солью, или гидроколлоид согласно настоящему изобретению.

В других особенно предпочтительных воплощениях настоящего изобретения микроконидии дерматофита *Trichophyton verrucosum* воплощений, описанных выше, представляют собой микроконидии дерматофита *Trichophyton verrucosum* BINO 348-DSM 28406. Однако воплощения настоящего изобретения, как описано выше, могут дополнительно содержать микроконидии дерматофита штамма *Trichophyton verrucosum* BINO 348-DSM 28406.

В другом особенно предпочтительном воплощении композиция для применения по настоящему изобретению содержит смесь гомогенизированных инактивированных микроконидий дерматофита *Trichophyton verrucosum* BINO 348-DSM 28406 и гомогенизированных инактивированных дрожжевых blastospores *Candida albicans*. Данная композиция может дополнительно содержать антигенный материал, как здесь описано, и/или хитозан, модифицированный органической карбоновой кислотой или ее солью, или гидроколлоид согласно настоящему изобретению.

Таким образом, настоящее изобретение также относится к штамму *Trichophyton verrucosum* DSM-28406. В другом аспекте настоящее изобретение относится к гомогенизированным инактивированным микроконидиям дерматофита *Trichophyton verrucosum* DSM-28406. Кроме того, настоящее изобретение относится к антигенному материалу, включающему ANMP, АЕМР и ASMP микроконидий дерматофита *Trichophyton verrucosum* DSM-28406.

Кроме того, настоящее изобретение относится к штамму *Trichophyton verrucosum* DSM-28406, гомогенизированным инактивированным микроконидиям дерматофита *Trichophyton verrucosum* DSM-28406 и антигенному материалу, включающему ANMP, АЕМР и ASMP микроконидий дерматофита *Trichophyton verrucosum* DSM-28406, для применения в человеческой и/или ветеринарной медицине. В частности, настоящее изобретение относится к штамму *Trichophyton verrucosum* DSM-28406, гомогенизированным инактивированным микроконидиям дерматофита *Trichophyton verrucosum* DSM-28406 и антигенному материалу микроконидий дерматофита *Trichophyton verrucosum* DSM-28406, для применения в способе лечения и/или предупреждения заболеваний копыт и когтей у животных, хромоты, пальцевого дерматита, межпальцевого дерматита, межпальцевой флегмоны и дерматофитоза у животных, и бородавок у человека. Животные предпочтительно представляют собой млекопитающих, более предпочтительно полорогих и/или свиней, наиболее предпочтительно - крупный рогатый скот.

Кроме того, настоящее изобретение относится к композиции, содержащей гомогенизированные инактивированные микроконидии дерматофита штамма *Trichophyton verrucosum* DSM-28406. Настоящее изобретение также относится к композиции, содержащей антигенный материал микроконидий дерматофита штамма *Trichophyton verrucosum* DSM-28406. Композиции по настоящему изобретению предпочтительно представляют собой фармацевтические композиции. Настоящее изобретение также относится к композиции, содержащей гомогенизированные инактивированные микроконидии дерматофита штамма *Trichophyton verrucosum* DSM-28406 для применения в человеческой и/или ветеринарной медицине, в частности, для применения в способе лечения и/или предупреждения заболеваний копыт и когтей у животных, и хромоты, пальцевого дерматита, межпальцевого дерматита, межпальцевой флегмоны, дерматофитоза у животных, и бородавок у человека. Настоящее изобретение также относится к композиции, содержащей антигенный материал микроконидий дерматофита штамма *Trichophyton verrucosum* DSM-28406 для применения в человеческой и/или ветеринарной медицине, в частности для применения в способе лечения и/или предупреждения заболеваний копыт и когтей у животных, и хромоты, пальцевого дерматита, межпальцевого дерматита, межпальцевой флегмоны, дерматофитоза у животных, и бородавок у человека. Животные предпочтительно представляют собой млекопитающих, более предпочтительно полорогих и/или свиней, наиболее предпочтительно - крупный рогатый скот.

Антигенный материал, включающий ANMP, ASMP и АЕМР микроконидий дерматофита штамма *Trichophyton verrucosum* DSM-28406 можно получать таким же способом, что и описанный в общем выше для антигенного материала дрожжевых blastospores и/или микроконидий дерматофита.

Композиция для применения по настоящему изобретению и композиция по настоящему изобретению кратко излагаются далее как "композиции по настоящему изобретению". Композиции по настоящему

му изобретению, содержащие микроконидии дерматофита только одного штамма или дрожжевые бластоспоры только одного штамма, можно получать следующим образом:

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

(б) инаktivирование гомогената, полученного на стадии (а).

Композиции по настоящему изобретению, содержащие смесь микроконидий дерматофита и/или дрожжевых бластоспор, можно получать следующим образом:

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

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

(в) объединение и инаktivирование гомогенатов, полученных на стадии (а), и, возможно, полученных на стадии (б).

Выращивание дерматофитов по вышеописанному способу получения предпочтительно осуществляется на агаре и сусле в культуральных колбах. Предпочтительно культивирование проводится в течение от примерно 15 до примерно 30 суток. Предпочтительно культивирование проводится при температуре от примерно 26 до примерно 28°C.

Выращивание дрожжей по вышеописанным способам получения предпочтительно осуществляется на агаре с экстрактом солода или на агаре Сабуро в культуральных колбах. Предпочтительно культивирование проводится в течение от примерно 4 до примерно 7 суток. Предпочтительно культивирование проводится 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 примерно от 0,1 до 0,3% ферментированного гидролизованного мышечного белка или примерно от 0,1 до 1% соевого или свиного пептона в комбинации с примерно 5-6% глюкозы и примерно 0,1-1% дрожжевого экстракта, или в водном растворе, содержащем 0,1-0,9% (мас./об.) хитозана, модифицированного органической карбоновой кислотой или ее солью.

Подходящие объемы для гомогенизации составляют примерно от 100 до 500 мл. Предпочтительно концентрацию микроконидий и бластоспор доводят, соответственно, до от примерно 30 до примерно 90 млн микроконидий и бластоспор, соответственно, на мл, или до от примерно 250 до примерно 500 тысяч, более предпочтительно от примерно 250 до примерно 400 тысяч микроконидий и бластоспор, соответственно, на мл. Затем суспензия возможно может быть дополнительно доведена до примерно 40, 50 или 60 миллионов микроконидий и бластоспор, соответственно, на 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 мл дистиллированной водой, физиологическим солевым раствором, как, например, хлоридом натрия или другим подходящим раствором.

В случае приготовления смеси одиночные суспензии предпочтительно доводят до того же количества микроконидий и бластоспор, соответственно, на мл, и равные объемы каждой культуры в суспензии смешивают в одном контейнере.

Инаktivацию предпочтительно проводят с использованием тиомерсала, формальдегида и/или 2-пропиолактона. Агенты для инаktivации можно добавлять непосредственно в суспензию клеток. Предпочтительной является инаktivация посредством добавления тиомерсала в соотношении от примерно 1:11000 до примерно 1:25000 (мас./об.). Также предпочтительной является инаktivация посредством добавления формальдегида с достижением конечной концентрации от примерно 0,2 до примерно 0,4% (об./об.). Затем данную смесь предпочтительно инкубируют. Инкубация может осуществляться в течение примерно от 1 до 30 суток при температуре от примерно 20 до примерно 37°C. Предпочтительной является инкубация в течение примерно 1-3 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 26-28°C.

В предпочтительном воплощении микроконидии композиции по настоящему изобретению находятся в набухшем состоянии и/или имеют зародышевые трубки. Более предпочтительно по меньшей мере 50% бластоспор и/или микроконидий находятся в набухшем 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 перед инаktivацией, как описано выше. Для проведения второй стадии культивирования суспензию микроконидий помещают в отдельный сосуд, содержащий такую же среду, что и на первой стадии инкубации. Вторую стадию культивирования предпочтительно проводят в течение от примерно 10 до примерно 48 ч. Вторую стадию культивирования предпочтительно проводят при темпе-

ратуре примерно 28°C. Предпочтительно вторая стадия культивирования продолжается до тех пор, пока 50% микроконидий не продемонстрируют набухшего или прорастающего состояния, и не больше, чем примерно от 7 до 10% клеток не продемонстрируют второй мицелиальной ветви. Диаметр набухших и прорастающих микроконидий увеличивается примерно в 1,2 раза или более по сравнению с обычными микроконидиями.

Хитозан, модифицированный органической карбоновой кислотой или ее солью, также можно называть вариантом хитозана или производным хитозана. Его 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 указанную инкубацию проводят посредством смешивания и/или при перемешивании.

Таким образом, хитозан, модифицированный органической карбоновой кислотой или ее солью, предпочтительно можно получать способом, включающим:

(а) инкубирование 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, хитозан, модифицированный органической карбоновой кислотой или ее солью, предпочтительно 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.

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 pH 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 до примерно 10 мМ.

Предпочтительно стадию (а) проводят, пока хитозан не модифицируется и не растворяется. Ее предпочтительно проводят смешиванием хитозана с водным раствором органической карбоновой кислоты или ее соли, или суспендированием хитозана в водных условиях и добавлением к суспензии органической карбоновой кислоты. Ее предпочтительно проводят 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 глютаминовую кислоту, пара-аминобензойную кислоту или молочную кислоту. Минеральную или органическую кислоту предпочтительно добавляют, или она присутствует в количестве для доведения значения pH смеси со стадии (а) до значения pH 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 литр, более предпочтительно от примерно 5 г до примерно 15 г хитозана на литр, наиболее предпочтительно - от примерно 8 до примерно 10 г хитозана на литр.

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.

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 молекулярную массу или среднюю молекулярную массу от примерно 50 до примерно 700 кДа, в частности от примерно 15 а 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.

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.

Перед применением хитозана на стадии (а), или, если способ включает стадию (i) - на стадии (i), хитозан может быть стерилизован автоклавированием. Указанная стерилизация может приводить к тому, что модифицированный хитозан 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, полученных 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 также 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 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, 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 (а), 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 модифициро-

ванные хитозан, могут включать дополнительную стадию получения конечного продукта. Получение конечного продукта может включать разведение полученного продукта. Предпочтительно продукт разводится 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 или консерванты. Подходящими консервантами являются, например, хлоркрезол, тиомерсал и формалин. Наконец, конечный продукт может быть стерилизован. Предпочтительно стерилизация осуществляется 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 литр, более предпочтительно от примерно 0,04 до примерно 1 г модифицированного хитозана на литр.

В предпочтительном воплощении способы, посредством которых можно получать модифицированный хитозан, 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, (a) 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 (a), возможно добавление дополнительных соединений, таких как разбавители или консерванты, 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.

В предпочтительном воплощении настоящей заявки модифицированный хитозан, производное хитозана или вариант хитозана представляет собой полиаминосахарный коллоид, предпочтительно гидроколлоид. В другом предпочтительном воплощении настоящей заявки гидроколлоид представляет 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: $x*(161)+y*(203)+z*(102)+z*(36,5)+m*(18)$.

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

В другом предпочтительном воплощении модифицированный хитозан, производное хитозана или вариант хитозана содержит примерно 0,2% пентаноилхлорида или 0,2% глюкуроновой кислоты, или 0,2% п-аминобензойной кислоты.

В другом предпочтительном воплощении модифицированный хитозан, производное хитозана или вариант хитозана содержит примерно 1,0% пентаноилхлорида.

В другом предпочтительном воплощении модифицированный хитозан, производное хитозана или вариант хитозана содержит 1,0% остатка хитозана из высушенных хитозанов.

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

В другом предпочтительном воплощении модифицированный хитозан, производное хитозана или вариант хитозана представляет собой гидроколлоид, содержащий:

(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.

В другом предпочтительном воплощении модифицированный хитозан, производное хитозана или вариант хитозана представляет собой гидроколлоид, содержащий:

(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.

В другом предпочтительном воплощении модифицированный хитозан, производное хитозана или вариант хитозана представляет собой гидроколлоид, содержащий:

(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.

В другом предпочтительном воплощении модифицированный хитозан, производное хитозана или вариант хитозана представляет собой гидроколлоид, содержащий:

(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.

В другом предпочтительном воплощении модифицированный хитозан, производное хитозана или вариант хитозана представляет собой гидроколлоид, содержащий:

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

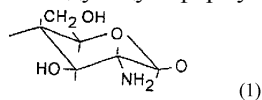
(ii) от 0,001 до 0,6% (мас./мас.) глюкуроновой кислоты или ее соли.

В другом предпочтительном воплощении модифицированный хитозан, производное хитозана или вариант хитозана представляет собой гидроколлоид, содержащий:

(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 $[X]_n$, в котором 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 остальная процентная доля гидроколлоида согласно настоящему изобретению предоставлена 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 типичном воплощении модифицированный хитозан можно получить следующей методикой:

В качестве сырья можно использовать хитозан с деацетилированием, например 67%, вязкостью 50-200 МПа·с. 40 г хитозана стерилизуют автоклавированием и добавляют в 3,5 л воды для инъекции при перемешивании. В полученную суспензию добавляют 40 мл уксусной кислоты. Конечный объем доводят до объема 4 л водой для инъекции. Данную смесь перемешивают в стерильном контейнере в течение примерно 24 ч, пока не получается суспензия геля. Нерастворившиеся частицы удаляются фильтрованием через металлическую сетку с размером ячейки 200-300 мкм. 4 н. гидроксид натрия (NaOH) добавляют по каплям в полученную суспензию с получением конечного pH 8,0. При этом выпадают в осадок белые хлопья, которые содержат хитозан. Суспензию перемешивают в течение примерно 30 мин. 4 мл хлорида валериановой кислоты добавляют по каплям в суспензию при постоянном перемешивании. Полученный суспендированный материал перемешивают в течение одного часа. Хлопья и нерастворившиеся частицы отделяют и затем ресуспендируют в 4 л стерильной воды для инъекций. Добавляют при перемешивании 4 н. соляную кислоту с получением pH 5,0. Образующийся гель диализируют в закрытой системе для удаления свободных ионов солей и низкомолекулярных соединений. После диализа получают конечный продукт. Для получения конечного продукта 3 л геля модифицированного хитозана доводят до объема 25 л посредством добавления стерильной воды для инъекции при перемешивании. Затем добавляют в смесь 500 мл раствора хлоркрезола, содержащего 30 г хлоркрезола. Образующуюся суспензию доводят до объема 30 л. Образующийся стерильный продукт распределяют в сосуды при стерильных условиях.

Если для стадий способа, как здесь описано, 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 предпочтительном воплощении композиции по настоящему изобретению имеют концентрацию от примерно 40 до примерно 90 млн blastospores на мл, весьма предпочтительно концентрацию примерно от 40 до 60 млн спор на мл. Данные концентрации являются особенно предпочтительными, если композиции предназначены для внутримышечного введения. В другом предпочтительном воплощении композиции по настоящему изобретению имеют концентрацию от примерно 0,2 до примерно 0,4 млн спор на мл, весьма предпочтительно концентрацию от примерно 0,25 до примерно 0,3 млн спор на мл. Данные концентрации являются особенно предпочтительными, если композиции предназначены для внутрикожного, внутримышечного введения.

В другом предпочтительном воплощении композиции по настоящему изобретению имеют концентрацию от примерно 40 до примерно 60 млн частиц антигенного материала микроконидий дерматофита и/или дрожжевых blastospores на мл.

В другом предпочтительном воплощении концентрация хитозана, модифицированного органической карбоновой кислотой или ее солью, предпочтительно находится в интервале от примерно 0,1 до примерно 0,9% (мас./об.), более предпочтительно в интервале от примерно 0,1 до примерно 0,3% (мас./об.), более предпочтительно в интервале от примерно 0,1 до примерно 0,3% (мас./об.).

Неожиданно обнаружили то, что если композиция по настоящему изобретению дополнительно содержит хитозан, модифицированный органической карбоновой кислотой, или ее солью, гомогенизированные инактивированные микроконидии дерматофитов и/или инактивированные гомогенизированные дрожжевые микроспоры можно использовать в примерно 50 раз меньшей дозе.

Композиции по настоящему изобретению могут дополнительно содержать фармацевтически приемлемый носитель, эксципиенты и/или поддерживающие агенты.

Композиции по настоящему изобретению способны модулировать иммунную систему, т.е. они имеют иммуностимулирующие свойства. Они могут быть использованы в качестве вакцины для предупреждения у субъекта описанных выше заболеваний. Альтернативно или дополнительно, их можно использовать для лечения и излечения у субъекта описанных выше заболеваний. Данные композиции можно вводить известными путями введения, например парентерально, посредством внутримышечной инъекции, посредством внутрикожной инъекции, посредством чрескожной инъекции и/или местно, предпочтительно на кожу. 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 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 более предпочтительном воплощении композиции по настоящему изобретению дополнительно содержат хитозан, модифицированный органической карбоновой кислотой, или его соль, или гидроколлоид согласно настоящему изобретению.

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

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей антигенный материал кератинофильных грибов или кератинофильных дрожжей, как описано выше. Такая фармацевтическая композиция может дополнительно содержать фармацевтически приемлемый разбавитель, эксципиент или носитель.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к композиции, содержащей антигенный материал кератинофильных грибов или кератинофильных дрожжей, как описано выше, для применения в способе лечения животного организма посредством терапии. Такой способ типично включает введение субъекту эффективного количества антигенного материала кератинофильных грибов или кератинофильных дрожжей, как описано выше, или композиции, или фармацевтической композиции, как описано выше. Субъект может представлять собой, например, животное, в частности млекопитающее, более предпочтительно полорогое и/или свиней, наиболее предпочтительно крупный рогатый скот. В частности, антигенный материал кератинофильных грибов или кератинофильных дрожжей, как описано выше, или композицию, или фармацевтическую композицию, как описано выше, можно использовать в способах лечения или предупреждения описанных выше заболеваний копыт и когтей, как описано выше. Данный способ лечения может включать лечение и/или предупреждение бактериальных, грибковых и/или

вирусных инфекций кожи, ноги, копыта, когтей, тыльной стороны стопы и/или межпальцевой области. Указанные инфекции могут быть вызваны *Dichelobacter nodosus*, *Fusobacterium necroforun*, *Fusobacterium spp*, *Treponema spp*, как, например, *T. phagedenis*, *T. vincentii* и *T. denticola*, *Campylobacter spp*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Arcanobacterium pyogenes* и *Prevotella spp.*, и/или вирусом.

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, парентеральный, посредством внутримышечной инъекции, посредством внутривенной инъекции, посредством чрескожной инъекции, местно, на кожу или посредством любого другого пути введения.

Например, дозировка и путь введения, используемые в способе лечения и/или предупреждения заболеваний копыт и когтей, в частности ID, DD и/или IP, у крупного рогатого скота могут быть следующими:

путь введения	концентрация [миллионов бластоспор/микроконидию/мл]	частота введения лекарственного средства	число сайтов	интервал между введениями лекарственного средства [сутки]	доза [мл]
внутримышечное	10-150, более предпочтительно 30-90, более предпочтительно 40-60 или 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, или 100	1, 2, 3, 4 или 5	1 или 2	5-21 суток, более предпочтительно 7-10 суток или 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, или 14 суток	0,5 — 10, более предпочтительно 1-5 или 0,5, 1, 2, 2,5, 3, 4, 5 или 6
внутрикожное	0,1 — 0,6, более предпочтительно 0,25-0,4 или 0,1, 0,2, 0,25, 0,3, 0,4, 0,5, или 0,6	1, 2, 3, 4 или 5	1, 2 или 3	5-21 суток, более предпочтительно 7-10 суток или 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 21 суток	0,2 — 0,6, более предпочтительно 0,3-0,5 или 0,2, 0,3, 0,4, 0,5 или 0,6

Следующие примеры поясняют настоящее изобретение, но их не следует рассматривать как ограничивающие.

Пример 1.

Вакцину Поливак-ТМ (изготовитель: ООО "Ветбиохим", Москва; дистрибьютор: ООО "Простор", Москва) против дерматофитоза животных использовали для профилактики и лечения пальцевого и/или межпальцевого дерматита, и/или межпальцевой флегмоны у крупного рогатого скота, как описано ниже.

Пример 2.

Вакцину Поливак-Т (изготовитель: ООО "Ветбиохим", Москва; дистрибьютор: ООО "Простор", Москва) против дерматофитоза крупного рогатого скота использовали для профилактики и лечения межпальцевого и/или пальцевого дерматита, и/или межпальцевой флегмоны у крупного рогатого скота, как описано ниже.

Пример 3.

Культуру дерматофита вида *Trichophyton mentagrophytes* DSM - 7279 культивируют на агаре/сусле, например в 4 колбах Ру. Каждая культура культивируется в течение 18 суток при 28°C.

Грибковые массы отрывают и гомогенизируют в 500 мл деионизированной воды. Затем суспензию микроконидий доводят до 60 млн микроконидий на мл физиологическим раствором соли - хлорида натрия. Гомогенат инактивируют добавлением в конце формальдегида до 0,4% (об./об.) непосредственно в клеточную суспензию. Данную смесь инкубируют в течение 5-7 суток при 37°C. Образующуюся композицию разливают в бутылки, проверяют на стерильность, безопасность и количество микроконидий согласно обычным известным способам, и ее можно хранить охлажденной при 4-10°C. Вакцину, пригото-

ляемую согласно данному способу, использовали для профилактики и лечения межпальцевого, пальцевого дерматита, и/или межпальцевой флегмоны у крупного рогатого скота, как описано ниже.

Пример 4.

Культуру дерматофита вида *Trichophyton verrucosum* DSM-28406 культивируют на агаре/сусле, например в 10 колбах Ру. Каждая культура культивируется в течение 25 суток при 26°C.

Грибковые массы отрывают и гомогенизируют в 300 мл деионизированной воды. Концентрацию микроконидий доводят до 80 млн на мл для каждого гомогената. Затем суспензию микроконидий доводят до 40 млн микроконидий на мл дистиллированной водой. Гомогенат инактивируют добавлением формальдегида с достижением 0,5% (об./об.) непосредственно в клеточную суспензию. Данную смесь инкубируют в течение 5 суток при 37°C. Образующуюся композицию разливают в бутылки, проверяют на стерильность, безопасность и количество микроконидий согласно обычным способам и хранят при 4-8°C. Вакцину, приготовляемую согласно данному способу, использовали для профилактики и лечения межпальцевого, пальцевого дерматита и межпальцевой флегмоны у крупного рогатого скота, как описано ниже.

Пример 5.

Культуру дерматофита вида *Trichophyton verrucosum* DSM-28406 культивируют на агаре/сусле, например в 8 колбах Ру. Каждая культура культивируется в течение 30 суток при 27°C.

Грибковые массы отрывают и гомогенизируют в 400 мл деионизированной воды. Концентрацию микроконидий доводят до 70 млн на мл для каждого гомогената. Затем суспензию микроконидий доводят до 60 млн микроконидий на мл дистиллированной водой. Гомогенат инактивируют добавлением формальдегида с достижением 0,3% (об./об.) непосредственно в клеточную суспензию. Данную смесь инкубируют в течение 7 суток при 37°C. Образующуюся композицию разливают в бутылки, проверяют на стерильность, безопасность и количество микроконидий согласно обычным способам и хранят при 4-8°C. Вакцину, приготовляемую согласно данному способу, использовали для профилактики и лечения межпальцевого, пальцевого дерматита и межпальцевой флегмоны у крупного рогатого скота, как описано ниже.

Пример 6.

Культуру дерматофита вида *Trichophyton verrucosum* DSM-28406 культивируют на агаре/сусле, например в 9 колбах Ру. Каждая культура культивируется в течение 25 суток при 28°C.

Грибковую массу дерматофита отрывают и гомогенизируют в 500 мл водного раствора 0,3% ферментированного гидролизованного мышечного белка в комбинации с 5% глюкозы и 0,1% дрожжевого экстракта. Концентрацию микроконидий доводят для гомогената до 40 млн на мл. Затем суспензию микроконидий ферментируют в течение 1 суток при 28°C, пока 65% микроконидий не будут иметь зародышевые трубки. После ферментации клеточную суспензию промывают физиологическим раствором хлорида натрия. Гомогенат инактивируют добавлением тиомерсала в соотношении 1:25000 (мас./об.) непосредственно в клеточную суспензию. Данную смесь инкубируют в течение 30 суток при комнатной температуре. Образующуюся композицию разливают в бутылки, проверяют на стерильность, безопасность и иммуногенные свойства согласно принятым способам, и ее можно хранить охлажденной при 4-10°C. Композицию, приготовляемую согласно данному способу, использовали для профилактики и лечения межпальцевого, пальцевого дерматита, межпальцевой флегмоны и дерматофитоза у крупного рогатого скота, как описано ниже.

Пример 7.

Вариант вакцины Поливак-ТМ против дерматофитоза животных, не содержащий по сравнению с классической Поливак-ТМ *Trichophyton equinum* и штаммы *Microsporium* (изготовитель: ООО "Ветбиохим", Москва; дистрибьютор: ООО "Простор", Москва), использовали для профилактики и лечения межпальцевого и/или пальцевого дерматита, и/или межпальцевой флегмоны у крупного рогатого скота, как описано ниже.

Пример 8.

Вакцину Поливак-ТМ против дерматофитоза животных (изготовитель: ООО "Ветбиохим", Москва; дистрибьютор: ООО "Простор", Москва) использовали для профилактики и лечения межпальцевого и/или пальцевого дерматита, и/или межпальцевой флегмоны у крупного рогатого скота, как описано ниже.

Пример 9.

Вакцину Поливак-ТМ против дерматофитоза животных (изготовитель: ООО "Ветбиохим", Москва; дистрибьютор: ООО "Простор", Москва) использовали для профилактики и лечения пальцевого и/или межпальцевого дерматита, и/или межпальцевой флегмоны у крупного рогатого скота, как описано ниже.

Пример 10.

Вакцину Поливак-Т против дерматофитоза крупного рогатого скота (изготовитель: ООО "Ветбиохим", Москва; дистрибьютор: ООО "Простор", Москва) использовали для профилактики и лечения межпальцевого и/или пальцевого дерматита, и/или межпальцевой флегмоны у крупного рогатого скота, как описано ниже.

Пример 11.

Культуру дерматофита вида *Trichophyton verrucosum* DSM - 28406 культивируют на агаре/сусле, например в 10 колбах Ру. Культура культивируется в течение 28 суток при 28°C.

Грибковую массу отрывают и гомогенизируют в 500 мл деионизированной воды. Концентрацию микроконидий в гомогенате доводят до 50 млн на мл. Затем суспензию микроконидий доводят до 50 млн микроконидий на мл дистиллированной водой.

Вид *Candida albicans* DSM-9456 культивируют на агаре с экстрактом солода или агаре Сабуру, например, в 3 колбах Ру. Культуру культивируют в течение 4 суток при 30°C. Бластоспоры отмывают физиологическим раствором хлорида натрия. Концентрацию бластоспор в суспензии доводят до 60 млн на мл. Равные объемы каждой культуры в суспензии смешивают в одном контейнере. Гомогенаты инактивируют добавлением формальдегида с достижением 0,4% (об./об.) в клеточной суспензии. Данную смесь инкубируют в течение 6 суток при 37°C. Композицию, приготовляемую согласно данному способу, использовали для профилактики и лечения межпальцевого и/или пальцевого дерматита, и/или межпальцевой флегмоны у крупного рогатого скота, как описано ниже.

Пример 12.

Вид *Candida albicans* DSM-9456 культивируют на агаре Сабуру, например в 7 колбах Ру. Культуру культивируют в течение 7 суток при 37°C. Бластоспоры отмывают стерильной водой. Концентрацию бластоспор в суспензии доводят до 40 млн на мл. Гомогенат инактивируют добавлением формальдегида с достижением 0,5% (об./об.) в клеточной суспензии. Данную смесь инкубируют в течение 7 суток при 37°C. Композицию, приготовляемую согласно данному способу, использовали для профилактики и лечения межпальцевого и/или пальцевого дерматита, и/или межпальцевой флегмоны у крупного рогатого скота, как описано ниже.

Пример 13.

Раствор хитозана, модифицированного хлоридом валериановой кислоты, добавляли в вакцину Поливак-Т против дерматофитоза крупного рогатого скота (изготовитель: ООО "Ветбиохим", Москва; дистрибьютор: ООО "Простор", Москва) с достижением конечной концентрации 0,1% (мас./об.). Концентрация микроконидий составляла 40 млн на мл. Композицию, приготовляемую согласно данному способу, использовали для профилактики и лечения межпальцевого и/или пальцевого дерматита, и/или межпальцевой флегмоны у крупного рогатого скота, как описано ниже.

Пример 14.

Культуру дерматофита вида *Trichophyton verrucosum* DSM-28406 культивируют на агаре/сусле, например в 7 колбах Ру. Данная культура культивируется в течение 27 суток при 26°C.

Грибковые массы дерматофита отрывают и гомогенизируют в 500 мл водного раствора 0,2% хитозана, модифицированного пара-аминобензойной кислотой. Концентрацию микроконидий доводят до 50 миллионов на мл для каждого гомогената. Гомогенат инактивируют добавлением формальдегида с достижением конечной концентрации 0,5% (об./об.) непосредственно в клеточную суспензию. Данную смесь инкубируют в течение 7 суток при 37°C. Композицию, приготовляемую согласно данному способу, использовали для профилактики и лечения межпальцевого и/или пальцевого дерматита, и/или межпальцевой флегмоны, и/или дерматофитоза у крупного рогатого скота, как описано ниже.

Пример 15.

Вид *Candida albicans* DSM-9456 культивируют на агаре с экстрактом солода для 6 колб Ру. Культуру культивируют в течение 7 суток при 35°C. Бластоспоры отмывают физиологическим раствором хлорида натрия.

Грибковые массы отрывают и гомогенизируют в 500 мл водного раствора 0,1% хитозана, модифицированного хлоридом валериановой кислоты. Концентрацию микроконидий доводят в гомогенате до 80 млн на мл. Гомогенат инактивируют добавлением непосредственно в клеточную суспензию формальдегида с достижением в конце 0,2% (об./об.). Данную смесь инкубируют в течение 7 суток при 37°C. Композицию, приготовляемую согласно данному способу, использовали для профилактики и лечения межпальцевого и/или пальцевого дерматита, и/или межпальцевой флегмоны у крупного рогатого скота, как описано ниже.

Пример 16.

Фракция, получаемая согласно данному способу, состоит из нерастворимого антигенного материала, содержащего полисахарид и/или гликопептиды (ANMP), как раскрыто в WO 97/07232. Культуру дерматофита вида *Trichophyton verrucosum* DSM-28406 культивируют на агаре/сусле, например в 10 колбах Ру. Данная культура культивируется в течение 28 суток при 28°C.

Образующуюся грибковую биомассу отрывают и обрабатывают водным раствором щелочи. Предпочтительными водными щелочными растворами являются NaOH в концентрации 3% (об.). Щелочная обработка предпочтительно проводится при 80°C в течение вплоть до 6 ч. После обработки при водных щелочных условиях твердую и жидкую фазы препарата разделяют центрифугированием при силах примерно 3500 g. После щелочной обработки твердую фазу обрабатывают 0,2 М уксусной кислотой добавленной к твердой фазе на 1 ч при температуре 70°C. После кислотной обработки твердую фазу промыв-

вают дистиллированной водой. Промывку повторяют три раза. Наконец твердую фазу отрывают и гомогенизируют в 500 мл воды для инъекции. Концентрацию частиц доводят до 60 млн на мл конечного продукта. Композицию, приготовляемую согласно данному способу, использовали для профилактики и лечения межпальцевого и/или пальцевого дерматита, и/или межпальцевой флегмоны у крупного рогатого скота, как описано ниже.

Пример 17

Фракция, получаемая согласно данному способу, состоит из нерастворимого антигенного материала, содержащего полисахарид и/или гликопептиды (ANMP), как раскрыто в WO 97/07232. Культуру дерматофита вида *Trichophyton verrucosum* DSM -28406 культивируют на агаре/сусле в 9 колбах Ру. Данная культура культивируется в течение 25 суток при 27°C. Образующуюся грибковую биомассу отрывают и обрабатывают водным раствором щелочи. Предпочтительными водными щелочными растворами являются КОН в предпочтительных концентрациях 2% (мас./об.). Щелочная обработка предпочтительно проводится при 60°C в течение вплоть до 10 ч. После обработки при водных щелочных условиях твердую и жидкую фазы препарата разделяют центрифугированием при силах примерно 3500 g. Обработку при водных щелочных условиях повторяли два раза, а также стадию разделения посредством центрифугирования при силах примерно 3500 g. После щелочной обработки твердую фазу обрабатывают 0,5 М HCl, добавленной к твердой фазе на 1,5 ч при температуре 80°C. После кислотной обработки твердую фазу промывают дистиллированной водой два раза. Наконец твердую фазу отрывают и гомогенизируют в 500 мл водного раствора, содержащего 0,3% хитозана, модифицированного хлоридом валериановой кислоты. Концентрацию частиц для каждого гомогената доводят до 60 миллионов на мл. Композицию, приготовляемую согласно данному способу, использовали для профилактики и лечения межпальцевого и/или пальцевого дерматита, и/или межпальцевой флегмоны у крупного рогатого скота, как описано ниже.

Пример 18.

Продукт получают из хитозана. Данный продукт получают в две стадии. На первой стадии получают концентрированный гель модифицированного хитозана, на второй стадии - конечный продукт, который можно использовать для введения.

Первая стадия. В качестве сырья используется хитозан с деацетилированием 80%, вязкостью 2751-3250 МПа·с. 40 граммов полисахарида стерилизуют автоклавированием, и добавляют при перемешивании 3,5 литра воды для инъекции. В полученную суспензию добавляют 40 мл уксусной кислоты. Конечный объем доводят водой для инъекции до 4 л. Суспендированный полисахарид перемешивают в стерильном контейнере в течение 24 ч с получением суспензии геля. Нерастворившиеся частицы удаляют фильтрованием через металлическую сетку с размером пор 200-300 мкм. 4 н. гидроксид натрия (NaOH) добавляют по каплям в полученную суспензию, пока данная суспензия не будет иметь pH 8,0. При этом выпадают в осадок белые хлопья, содержащие хитозан. Суспензию перемешивают в течение 30 мин. 8 мл молочной кислоты добавляют в суспензию по каплям при постоянном перемешивании. Полученное суспендированное вещество перемешивают в течение еще одного часа. Хлопья и нерастворившиеся частицы отделяют от суспензии и ресуспендируют в 4 л воды для инъекции. Добавляют при перемешивании 4 н. соляную кислоту, пока не достигается pH 5,6. Образующуюся суспензию диализируют в закрытой системе с удалением свободных ионов солей и низкомолекулярных соединений. Образующаяся суспензия представляет собой концентрированный гель модифицированного хитозана. Концентрация модифицированного хитозана составляет от примерно 0,8 до примерно 1%. После диализа данный полисахарид используется для получения конечного продукта.

Вторая стадия. Для получения конечного продукта, содержащего модифицированный хитозан, полученный на первой стадии, образующуюся суспензию первой стадии доводят до объема 25 л посредством добавления стерильной воды для инъекции при перемешивании. Затем добавляют в данную смесь 500 мл раствора хлоркрезола, содержащего 30 г хлоркрезола, в качестве консерванта. Полученную суспензию доводят до объема 30 л. Полученный стерильный продукт распределяют в сосуды при асептических условиях. Композицию, приготовляемую согласно данному способу, использовали для профилактики и лечения межпальцевого и/или пальцевого дерматита, и/или межпальцевой флегмоны у крупного рогатого скота, как описано ниже.

Пример 19.

Культуру дерматофита вида *Trichophyton verrucosum* DSM - 28406 культивируют на агаре/сусле, например в 8 колбах Ру. Культуру культивируют в течение 30 суток при 28°C.

Грибковые массы дерматофита отрывают и гомогенизируют в 500 мл водного раствора 0,1% хитозана, модифицированного хлоридом валериановой кислоты. Концентрацию микроконидий доводят до 400 тысяч на мл для каждого гомогената. Гомогенаты инактивируют добавлением непосредственно в клеточную суспензию формальдегида с достижением в конце 0,4% (об./об.). Данную смесь инкубируют в течение 7 суток при 37°C. Композицию, приготовляемую согласно данному способу, использовали для профилактики и лечения межпальцевого и/или пальцевого дерматита, и/или межпальцевой флегмоны, и/или дерматофитоза у крупного рогатого скота, как описано ниже.

Пример 20.

Культуру дерматофита вида *Trichophyton mentagrophytes* DSM-7279 культивируют на агаре/сусле в 6 колбах Ру. Культуру культивируют в течение 20 суток при 26°C.

Грибковые массы дерматофита отрывают и гомогенизируют в 400 мл водного раствора 0,2% хитозана, модифицированного пара-аминобензойной кислотой. Концентрацию микроконидий доводят до 250 тысяч на мл для каждого гомогената. Гомогенаты инактивируют добавлением непосредственно в клеточную суспензию формальдегида с достижением в конце 0,3% (об./об.). Данную смесь инкубируют в течение 6 суток при 37°C. Композицию, приготовляемую согласно данному способу, использовали для профилактики и лечения межпальцевого и/или пальцевого дерматита, и/или межпальцевой флегмоны, и/или дерматофитоза у крупного рогатого скота, как описано ниже.

Пример 21.

Коров с клиническим доказательством хромоты и поражениями межпальцевой области, которые типичны для DD, ID и IP, лечили разными композициями. Композицию вводили посредством внутримышечной инъекции два раза с интервалом 10 суток. Доза для композиции составляла 5 мл для каждого применения.

Результаты показаны в табл. 2.

№ группы	Композиция в том виде, в котором она получена в примере	Число животных	Частота введения лекарственного средства	Количество здоровых животных	
				В 30-35 суток после первого применения	В 53-55 суток после первого применения
1	1	10	2	4	5
2	2	10	2	4	5
3	3	10	2	5	5
4	4	10	2	4	5
5	5	15	2	7	7
6	6	13	2	6	6
7	7	10	2	4	5
8	8	11	2	5	6
9	9	12	2	5	6
10	10	13	2	6	6
11	11	14	2	7	7
12	12	13	2	6	7
13	13	10	2	5	7
14	14	12	2	5	7
15	15	14	2	6	8
16	16	10	2	5	5
17	17	12	2	6	6
18	18	14	2	7	9

Не наблюдали общих или локальных реакций после применения данных композиций. Терапевтические эффективности лечения разными композициями, полученными, как описано в примерах 1-18, составляли 40-64%.

Пример 22.

Коров с клиническим доказательством хромоты и поражениями межпальцевой области, которые типичны для DD, ID и IP, лечили разными композициями. Композицию вводили посредством внутримышечной инъекции два раза с интервалом 7-10 суток. Доза композиции составляла в общем 0,4 мл, которые инъецировали животному в два места.

Результаты показаны в табл. 3.

№ группы	Композиция в том виде, в котором она получена в примере	Число животных	Частота введения лекарственного средства	Количество здоровых животных	
				В 30-35 суток после первого применения	В 53-55 суток после первого применения
1	19	100	2	60	85
2	20	100	2	58	87

Не наблюдали общих или местных реакции после применения данных композиций. Терапевтическая эффективность лечения разными композициями, полученными согласно примерам 19 и 20, составляла примерно 85-87%.

Пример 23.

Коров с клиническим доказательством хромоты и поражениями межпальцевой области, которые типичны для DD, ID и IP, лечили разными лекарственными средствами. Композицию, полученную согласно примеру 15, вводили следующим образом: 2 раза внутримышечно в дозе 5 мл в одно место с интервалом 10 суток.

Клиническое проявление заболевания:

+ Выздоровливающие или серые, нет боли

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

+++ Выздоровливающие, или больше 2 см, желтые, умеренная боль

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

Результаты показаны в табл. 4.

До лечения	30 суток после лечения	58 суток после лечения
12 животных ++	4 животных – здоровые 4 животных + 6 животных ++	11 животных – здоровые 3 животных +
4 животных +++	2 животных +++	3 животных ++
4 животных ++++	2 животных ++++	
	всего 2 животных были отобраны для забоя	всего 3 животных были отобраны для забоя

Не наблюдали общих или местных реакций после применения. Эффективность лечения составляла примерно 70%.

Пример 24. Исследование по титрованию дозы

Коров с клиническим доказательством хромоты, поражениями межпальцевой области, которые типичны для DD, ID и IP, лечили разными лекарственными средствами. Терапевтическое применение композиции, полученной согласно примеру 14: 3 раза внутримышечно в одно место с интервалом 7 суток.

Клиническое проявление заболевания:

+ Выздоровливающие или серые, нет боли

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

+++ Выздоровливающие, или больше 2 см, желтые, умеренная боль

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

Результаты показаны в табл. 5.

До лечения	51 суток после лечения Доза – 5 мл	До лечения	51 суток после лечения Доза – 3 мл
19 животных +++	5 животных – здоровые 7 животных +	18 животных +++	1 животное – здоровые 4 животных +
	5 животных ++		6 животных ++
			2 животных +++
	2 животных были отобраны для забоя		5 животных были отобраны для забоя

Не наблюдали общих или местных реакций после применения. Эффективность лечения дозой 5 мл составляла примерно 63%, а дозой 3 мл - 28%.

Пример 25.

Лечили коров с клиническим доказательством хромоты и поражениями межпальцевой области, которые типичны для DD, ID и IP. Терапевтическое применение композиции, полученной согласно примеру 14: внутримышечно, 2 раза в одно место в дозе 5 мл с интервалом 10 суток.

Резюме исследования:

До лечения

Количество животных/количество хромотых конечностей 100/138

От 52 до 54 суток после последнего лечения

Количество животных/количество хромотых конечностей 29/29

Количество здоровых животных 71

Уменьшение числа хромотых конечностей 78,99%

Пример 26. Исследование по титрованию дозы

Осуществляли лечение коров против DD, ID и IP. Профилактическое применение композиции, полученной согласно примеру 14: внутримышечно, 2 раза с интервалом 10 суток.

Исследовали клиническое проявление заболевания:

+ Выздоровливающие или серые, нет боли

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

+++ Выздоровливающие, или больше 2 см, желтые, умеренная боль

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

Результаты показаны в табл. 6.

Через 73 суток после нанесения		
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 или местных реакции после применения. Эффективность лечения дозами 1 мл

и 2,5 мл составляла примерно 93%. 45 животных (примерно 21%) из контрольной группы были с клиническими симптомами DD, ID и IP.

Результаты показаны в табл. 7.

Через 107 суток после применения		
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 лечения дозами 1 и 2,5 мл составляла примерно 87-89%. 59 животных (примерно 27%) из контрольной группы были с клиническими симптомами DD, ID и IP.

Результаты показаны в табл. 8.

Через 170 суток после применения композиции		
Доза 1 мл 100 животных	Доза 2,5 мл 100 животных	Контроль 215 животных
25 животных +	41 животное +	112 животных +
6 дополнительных животных были отобраны для забоя	3 дополнительных животных были отобраны для забоя	42 дополнительных животных были отобраны для забоя

Эффективность лечения дозами 1 мл составляла примерно 70%, а дозами 2,5 мл - примерно 53%. 154 животных (примерно 72%) из контрольной группы были с клиническими симптомами DD, ID и IP. Данное исследование демонстрирует профилактическое лечение животных дозой 1,0 мл. Продолжительность иммунитета составляла примерно 5,5 месяцев.

Пример 27.

Осуществляли лечение коров против DD, ID и IP. Профилактическое применение композиции, полученной согласно примеру 14: внутримышечно, 2 раза в дозе 5 мл с интервалом 10 суток.

Резюме исследования:

Лечили животных в группе 1

Наблюдение перед лечением

Количество животных/клинические проявления DD, ID и IP 100/100

От 160 до 175 суток после последнего лечения

Количество животных/количество хромот конечностей 100/10

Количество здоровых животных 90

Эффективность лечения 90%

Животных в группе 2 обрабатывали плацебо (контроль)

Наблюдение перед обработкой

Количество животных/клинические проявления DD, ID и IP 100/100

От 160 до 175 суток после последнего применения плацебо

Количество животных/количество животных с проявлениями

клинических симптомов DD, ID и IP 100/48

Количество здоровых животных 52

Количество больных животных на протяжении периода наблюдения 48%

Всех животных контрольной группы (плацебо) с клиническим симптомом заболеваний обрабатывали местным нанесением асептического лекарственного средства или антибиотиков. В случае IP использовали внутримышечную инъекцию антибиотиков.

Пример 28.

Коров с клиническим доказательством хромоты и поражений межпальцевой области, которые типичны для DD, ID и IP, лечили разными композициями. Композицию вводили посредством внутримышечной инъекции два раза в одно место с интервалом 10 суток. Доза композиции составляла 5 мл для каждого применения.

Результаты показаны в табл. 9.

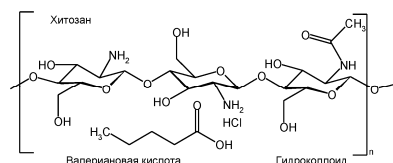
№ группы	Композиция, в том виде, в котором она получена в примере	Число животных	Частота введения лекарственного средства	Количество здоровых животных	
				В 30-35 суток после первого применения	В 53-55 суток после первого применения
1	14	10	2	10	10
2	15	10	2	9	9
3	18	10	2	10	10
4	Контроль подвергавшиеся лечению обычными способами	10	-	3	5

Пример 29. 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

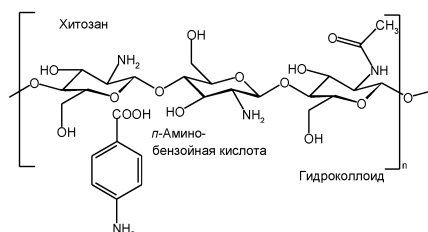
Хранение: хранить защищенным от света; хранить в контейнере, защищенном от воздуха, в холодильнике при 4°C-8°C

Стабильность: 36 месяцев при условиях, описанных выше

Химическая номенклатура: гидроколлоид хитозан-4-аминобензойная кислота

Подзаголовок: гидрокомплекс полиаминосахар-п-аминобензойная кислота

Структурная формула:



Химическая формула: $(C_6H_{11}NO_4)_x(C_8H_{13}NO_5)_y(C_7H_7O_2)_z(H_2O)_m$

Общие свойства:

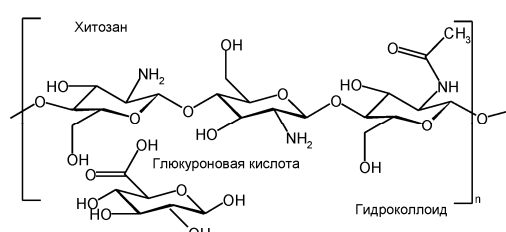
Молекулярная масса: $x*(161)+y*(203)+z*(137,14)+m*(18)$

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 30. Изготовление гидроколлоида хитозан-валериановая кислота

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

Амино-N-ацетил-D-глюкозамин стерилизуется в отдельном сосуде, и проводятся манипуляции для

получения хитозана фармацевтического уровня качества.

Раствор реактива

Стерильный аминокс-Н-ацетил-Д-глюкозамин ресуспендируют при перемешивании в течение 15 минут 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 4 н. 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 + HAc (24 ч) → раствор хитозан-HAc

2. Стадия очистки

2.1. Раствор хитозан-HAc + 4 н. 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 (3 н.).

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 31. 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-HAc, 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 хромо-

формными группами и заместителями для хитозан-НСI, хитозан-НАс, гидроколлоида хитозан-валериановая кислота и валериановой кислоты, соответственно, можно ожидать максимумы поглощения при 200 нм.

УФ- максимум	Хитозан НСI	Хитозан НАс	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 32. Абсорбционная ИК (инфракрасная)-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 размалывается и прессуется в подходящий диск на основе бромид 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 -НАс	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 33. Анализ ^{13}C -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-НCl, хитозан-НАс, глюкозамин-НCl, N-ацетилглюкозамина, гидроколлоида хитозан-валериановая кислота, валериановой кислоты.

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

Растворитель: D_2O для хитозана, хитозан-НCl, хитозан-НАс, глюкозамин-НCl, N-ацетилглюкозамина;

DMSO (диметилсульфоксид)-D6 для гидроколлоида хитозан-валериановая кислота

CDCl_3 для валериановой кислоты.

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

Калибровка: для хитозана, хитозан-НCl, хитозан-НАс, глюкозамин-НCl, N-ацетилглюкозамина

DMSO-D6 для гидроколлоида хитозан-валериановая кислота

CDCl_3 для валериановой кислоты.

2. 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-НCl ^{13}C -ЯМР-спектроскопией

Результаты	[d]	Классификация (номер углерода)
	97,67	C1
	76,41 / 74,80	C5
	70,28	C3
	64,41	C4
	60,11	C6
	56,06	C2

Цель	Следующие характерные химические сдвиги	[млн ⁻¹]
	согласно общим положениям спектроскопии и химическому скелету с заместителями можно ожидать при:	100
		70
		56
Общая литература: Hesse, Meier, Zeeh Spektr. 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)
Скелет глюкозамина	98,39	C1
	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 Spektr. 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	C1
	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 ^{13}C -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 Spekt. Methoden Thieme Verlag 5.Auflage
1995

Результат: приведенные выше измеренные данные подтверждают идентичность протестированного вещества.

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

Идентификация химической Валериановой кислоты с помощью спектроскопии		
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 ожидать при:	[млн ⁻¹]
		100,95
		61,40
		57,57
		180,66
		14,87
Общая литература: Hesse, Meier, Zeeh Spekt. Methoden Thieme Verlag 5.Auflage 1995		

Результат: приведенные выше измеренные данные подтверждают идентичность предложенной структуры.

ж) Анализ валериановой кислоты ^{13}C -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- HCl	Хитозан-НАс	Глюкозамин- HCl	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 34. 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 нм 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 деацетилированный 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, должна быть возможной идентификация хитозана в виде его водорастворимых ионных соединений хитозан-HCl 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) Фильтрация: 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 R _f	Не может быть идентифицирован сигнал для хитозана			-
	Неспецифические примеси:			Не выявлены

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

Результат: приемлемый раствор хитозана в водянистых или органических растворителях, подобных метанолу и т.д. не возможен. Подходящая солюбилизация 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-HCl

Для анализа использовали 5 мг глюкозамин-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	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-HCl	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 ожидаться 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- HCl	Хитозан- HAc	Глюкозамин- HCl	N-ацетил- глюкозамин- -HCl	Коллоид хитозан- валери- ановая кислота	Валери- ановая 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	-	-
Нингидри- новый реактив	-	-	-	Красное пятно	-	-	-
Реактив на основе анисового альдегида- серной кислоты	-	Серое пятно	Серое пятно	Серое пятно	Серое пятно	Серое пятно	-
Реактив на основе йода	-	Корич- невое пятно	Корич- невое пятно	Коричневое пятно	Коричневое пятно	Корич- невое 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-HCl и хитозан-HAc. 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 35. 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 база

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 ожидаться при:			
	0,0	для производных хитозана		
	прибл. 0,6	для валериановой кислоты, если она доступна		
Значение Rf				
Гидроколлоид хитозан-валериановая кислота		0,0		
		Неспецифические примеси:		Не выявлены
Значение Rf				
Валериановая кислота		Не выявлена		
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 не может быть выявлена в чистом соединении - гидроколлоиде хитозан-валериановая кислота. Выявление и значение Rf "0" показывают сходство гидроколлоида 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 36. Устранение валериановой кислоты из гидроколлоида хитозан-валериановая кислота с использованием сильного вакуума и повышенной температуры

Способ: оценка потери при сушке (специальный способ)

Прибор: скоростной концентратор с циркулирующим вакуумом

Условия: 500 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 Rf	пятно		0

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

Результат: 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 Rf 0,56. Хитозан или соединения хитозана могут быть идентифицированы при значении Rf 0. Гидроколлоид хитозан-валериановая кислота может представлять собой только коллоид полиаминосахара, но не раствор хитозана или производного хитозана с валериановой кислотой в воде.

Пример 37. 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

Пластика 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	
	Распад 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	Гидроколлоид хитозан-валериановая кислота (чистый CVHC)	Устранение из CVHC с использованием сильного вакуума	Гидроколлоид хитозан-валериановая кислота (подвергнувшийся распаду с использованием этилацетата)	
				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	Розовое пятно	Серое пятно	Серое пятно	-	Серое пятно
Иодный реактив	Желтоватое пятно	Коричневое	Коричневое	Светло-желтоватое пятно	Коричневое
Реактив на основе бромкрезолового зеленого – бромфенолового синего	Желтое пятно	Синее пятно	Синее пятно	Желтое пятно	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 38. 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 Евро-

пейской 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 Фармакопее 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 39. 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 массы 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
	Раскалить 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 г / 25,05 г = 0,0022055 г/г	
= 2,2055 мг/г	
0,22%	

Пример 40. Потеря при сушке

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

1. Способ и параметр для анализа хитозан-НCl, хитозана и хитозан-НAc

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 Фармакопеи 2.2.32 (EP) "в вакууме в эксикаторе".

Прибор: эксикатор.

Время сушки: до постоянной массы.

Температура 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 гидроколлоид 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%.

3. Сравнение результатов

	Хитозан, твердое вещество	Хитозан-НCl, твердое вещество	Хитозан-НAc, 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 гидроколлоид. Измеренные данные подтверждают структуру соединения.

Пример 41. 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. Применение композиции, содержащей антигенный материал кератинофильных грибов и/или кератинофильных дрожжей, для лечения и/или предупреждения заболеваний копыт и когтей у полорогих и/или свиней, где заболевания копыт и когтей выбраны из группы, состоящей из пальцевого дерматита, межпальцевого дерматита и/или межпальцевой флегмоны, и антигенный материал содержит антигены кератинофильных грибов и/или кератинофильных дрожжей.

2. Применение композиции по п.1, где полорогие представляют собой крупный рогатый скот.

3. Применение композиции по п.1 или 2, где антигенный материал кератинофильных грибов и/или дрожжей содержит гомогенизированные инактивированные микроконидии дерматофитов и/или гомогенизированные инактивированные дрожжевые бластоспоры, и/или антигенный материал микроконидий дерматофитов, и/или антигенный материал дрожжевых бластоспор, в частности, где антигенный материал микроконидий дерматофитов и/или антигенный материал дрожжевых бластоспор содержит антигенный материал, не растворимый в водных растворах, содержащий полисахарид и/или гликопептид (ANMP), антигенный материал, растворимый в водных растворах, содержащий полисахарид и/или гликопептид (ASMP), или антигенный экзогенный материал, содержащий полисахарид и/или гликопептид (AEMP).

4. Применение композиции по любому из пп.1-3, где антигенный материал кератинофильных грибов и/или кератинофильных дрожжей имеет происхождение из видов *Trichophyton*, в частности *Trichophyton verrucosum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton equinum*, *Trichophyton sarkisovii*, *Trichophyton rubrum* или *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum*, в частности *Microsporum gypseum*, *Microsporum canis*, в частности *Microsporum canis* var. *obesum* или *Microsporum canis* var. *distortum*, и/или *Candida*, в частности *Candida albicans*, в частности, где антигенный материал кератинофильных грибов имеет происхождение из штаммов *Trichophyton mentagrophytes* DSM-7279, *Trichophyton verrucosum* DSM-28406, *Trichophyton rubrum* DSM-9469, *Trichophyton rubrum* DSM-9470, *Trichophyton rubrum* DSM-9471 или *Trichophyton rubrum* DSM-9472, и/или антигенный материал кератинофильных дрожжей имеет происхождение из штаммов *Candida albicans* DSM-9456, *Candida albicans* DSM-9457, *Candida albicans* DSM-9458 или *Candida albicans* DSM-9459.

5. Применение композиции по любому из пп.3, 4, где микроконидии находятся в набухшем состоянии и/или имеют зародышевые трубки.

6. Применение композиции по любому из пп.3-5, где бластоспоры и/или микроконидии были инактивированы тиомерсалом, формальдегидом и/или 2-пропиолактоном.

7. Применение композиции по любому из пп.1-6, где данная композиция дополнительно содержит одно или более чем одно иммуномодулирующее вещество.

8. Применение композиции по любому из пп.1-7, где данная композиция дополнительно содержит хитозан, модифицированный валериановой кислотой, молочной кислотой, пара-аминобензойной кислотой, глюкуроновой кислотой или хлоридом валериановой кислоты, или гидроколлоид, содержащий:

(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% глюкуроновой кислоты или (мас./мас.) пара-аминобензойной кислоты, или их соли.

9. Применение композиции по любому из пп.1-8, где данная композиция представляет собой фармацевтическую композицию, предпочтительно вакцину.

10. Применение штамма *Trichophyton verrucosum* DSM-28406, гомогенизированных инаktivированных микроконидий дерматофита *Trichophyton verrucosum* DSM-28406 или антигенного материала, содержащего антигены штамма *Trichophyton verrucosum* DSM-28406, включающего ANMP, AEMP и ASMP микроконидий дерматофита *Trichophyton verrucosum* DSM-28406, для лечения и/или предупреждения заболеваний копыт и когтей у животных, где заболевания копыт и когтей выбраны из группы, состоящей из пальцевого дерматита, межпальцевого дерматита и/или межпальцевой флегмоны.

