ČESKÁ REPUBLIKA

(19)

ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ

ZVEŘEJNĚNÁ PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(12)

(22) 18.04.94

(32) 28.04.93

(31) 93/9308734

(33) GB

(40) 14.02.96

(21) 2805-95

(13) A3

6(51)

C 12 N 1/04

C 12 N 11/04

(71) ZENECA LIMITED, London, GB;

(72) Rodham David Kirk, Runcorn, GB;
Cantwell John Burnett, Merseyside, GB;

(54) Životaschopné bakterie

(57) Popisují se mikrobiální buňky stabilizované pro skladování ve formě suché kompozice ve stabilním stavu suspendované ve zhroucené matrici. Tyto kompozice se připraví smícháním mikrobiálních buněk, například gram-negativních bakteriálních buněk, jako je Pseudomonas fluorescens, s vodným roztokem obsahujícím polyhydroxylovou sloučeninu, výhodně sacharid, ze které je odvozena matrice, a tato směs se vysuší za podmínek, za kterých dochází k viskoznímu toku polyhydroxylové sloučeniny a dojde ke zhroucení matrice, přičemž buňky nejsou příliš poškozeny. Teplota skelného přechodu hmoty matrice je ideálně vyšší než je teplota, při které se kompozice skladuje.

CURRENT TEXT

28 05 95

TRAPLOVÁ • HAKR • KUBÁT
Advokátní a patentová kancelář
170 00 Praha 7, Přístavní 24

PŘÍL.
ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ
DOŠLO
26. X. 95
Č.j. 0 6 7 8 4 4

173 505/JT
PPD 37547/CZT

Životaschopné bakterie

Oblast techniky.

Vynález popisuje způsob přípravy komposic obsahujících mikrobiální buňky ve stabilisovaném stavu, těchto komposicí a živých kultur, které jsou z nich následně připraveny.

Dosavadní stav techniky.

Skladování životaschopných kultur je v současné době uznávaným problémem. Například, v US 3 897 307 se popisuje (i) použití kombinace askorbátu a glutamátu nebo aspartátu jakožto stabilisátorů pro bakteriální buňky produkující kyselinu mléčnou a (ii) používání určitých cukrů, zvláště inositolu v koncentracích 25 mg/ml roztoku, jako látek chránících buňky před škodlivým působením teplot pod bodem mrazu všude tam, kde jsou tyto bakteriální buňky lyofilisovány.

Mugnier a další, Applied and Enviromental Microbiology, 1985, strana 108 až 114, popisují použití polysacharidových gelů v kombinaci s určitými živinami, například C_1 až C_3 a C_6 až C_{12} sloučeninami, jako matric pro lyofilisované bakteriální buňky. Bylo zjištěno, že polysacharidy schopné tvořit gel se při lyofilisaci nehroutí.

Redway a další, Cryobiology, 1974, 11, strana 73 až 79 zkoušel určité monosacharidy (v koncentracích až do 150 mg/ 2 ml vzorku) a příbuzné sloučeniny jako media pro dlouhodobé přežití lyofilisovaných bakterií.

Zjistili jsme, že jsou-li mikrobiální buňky suspendovány v určité matrici zde popsaným způsobem a vysušeny za určitých podmínek, je zvýšena jejich krátkodobá životaschopnost, a že jsou-li tyto vysušené systémy skladovány a rehydratovány při určitých podmínkách zde

definovaných, pak je rovněž zvýšena dlouhodobá životaschopnost těchto mikrobiálních buněk.

Dále bylo překvapivě zjištěno, že zhroucení matrice v níž jsou mikrobiální buňky suspendovány nemá za následek nízkou krátkodobou životaschopnost.

Vynález popisuje přípravu stabilní vysušené komposice obsahující mikrobiální buňky ve stabilisovaném stavu suspendované ve zhroucené matrici.

Slovem "stabilní" se rozumí skutečnost, že je snížena degradace mikrobiálních buněk (degradace by vedla ke ztrátě obnovy životaschopnosti buněk).

Slovem "stabilisovaný stav" se rozumí skutečnost, že buňky nemetabolisují, nedělí se a nerostou (ale tyto jejich funkce lze obnovit, jestliže jsou vystaveny působení vhodných podmínek).

Spojením "životaschopnost buněk" se rozumí schopnost buněk růst a dělit se, jestliže jsou vystaveny působení vhodných podmínek (to jest rehydratace a zdroj živin).

Spojením "životaschopné buňky" se rozumí buňky schopné růst a dělit se, jestliže jsou vystaveny působení vhodných podmínek (to jest rehydratace a zdroj živin).

Slovem "zhroucené" se rozumí skutečnost, že

i) matrice se smrštila, stala se méně porézní a umožňuje jen nepatrné pronikání nízkomolekulárních difusivních látek, například, při vystavení působení účinkům vlhkého vzduchu absorbuje jen nepatrné množství vodní páry; a/nebo

ii) matrice byla vystavena teplotám přesahujícím teplotu jejího skelného přechodu (Tg), přičemž nastalý

plastický tok způsobil podstatné snížení poměru povrch/objem a zapouzdření buněk do málo porézního ochranného pouzdra.

Vynález dále popisuje způsob přípravy stabilní vysušené komposice obsahující mikrobiální buňky ve stabilisovaném stavu suspendované v matrici, sestávající z následujících kroků:

A: smíšení mikrobiálních buněk s vodným mediem obsahujícím materiál z něhož bude odvozena matrice

B: vysušení směsi za takových podmínek, aby došlo k plastickému toku materiálu a ke zhroucení matrice, ale ne k přílišnému poškození buněk.

Komposice připravené podle kroku B je výhodné skladovat při teplotách nižších než je Tg matrice, to znamená, že komposice má Tg vyšší, než je předpokládaná skladovací teplota.

U komposice připravené podle kroku B je výhodné provést ještě další sušení, takzvané "sekundární sušení", za účelem zvýšení Tg matrice, aby byla komposice stabilní ve větším rozsahu skladovacích podmínek, to jest, aby mohla být skladována při vyšší teplotě.

Buňky obsažené ve stabilní vysušené komposici podle vynálezu jsou nejlépe bakteriální buňky, nicméně nelze vyloučit možnost využití jiných druhů mikrobiálních buněk, například hub, kvasinek a tak dále. Jestliže použité mikrobiální buňky jsou buňky bakteriální, pak vhodnější jsou gram-negativní bakteriální buňky, ačkoliv nelze vyloučit ani použití gram-positivních bakterií. Jako příklad takových gram-negativních bakterií můžeme uvést Pseudomonas fluorescens, Escherichia coli a hlízkovité bakterie.

Koncentrace mikrobiálních buněk ve směsi připravené podle kroku A podle vynálezu se pohybuje v rozmezí 10^4/ ml až 10^{13}/ml, nejlépe však v rozmezí od 10^{10}/ml do 10^{11}/ml.

Materiálem, který je smíchán s mikrobiálními buňkami způsobem podle kroku A podle vynálezu, je libovolná polyhydroxylová sloučenina, například polyalkohol jako je manitol, inositol, sorbitol, galacitol, nebo výhodněji cukr a zejména pak některý sacharid.

Tam, kde je jako materiál použit sacharid, může se jednat o disacharid, trisacharid, oligosacharid nebo výhodně o monosacharid. Jako příklad monosacharidů mohou být zmíněny hexosy, například rhamosa, xylosa, fruktosa, glukosa, manosa a galaktosa. Jako příklad disacharidů můžeme zmínit maltosu, laktosu, trehalosu a sacharosu. Jako příklad trisacharidů můžeme zmínit rafinosu. Jako příklad oligosacharidů můžeme zmínit maltodextriny.

Koncentrace polyhydroxylové sloučeniny použité ve směsi v kroku A podle vynálezu se pohybuje v rozmezí 10 mg/10^{10} a 1000 mg/10^{10} buněk, nejlépe však v rozmezí 200 mg/10^{10} buněk až 400 mg/10^{10} nelze vyloučit buněk. Odborník bude schopen pomocí jednoduchého experimentu zjistit optimální koncentrace jednotlivých polyhydroxylových sloučenin použitých k přípravě zhroucené matrice. Zjistili jsme například, že optimální koncentrace inositolu se pohybuje kolem 45 mg/ml, a že inositol v koncentracích nad 60 mg/ml způsobuje značné poškození buněk a při koncentracích nižších než přibližně 25 mg/ml nedochází ke zhroucení matrice.

Některé polyhydroxylové sloučeniny vykazují ochranné vlastnosti v širokém rozmezí koncentrací, kdežto jiné mají škodlivý vliv v koncentracích vyšších než je kritická koncentrace, která jak se zdá souvisí s rozpustností dané polyhydroxylové sloučeniny ve vodném roztoku.

Vynález je dále ilustrován prostřednictvím přiložených obrázků, které ukazují komposice podle vynálezu a jsou pouze jejich neomezujícími příklady.

Popis obrázků

Obrázek 1 ilustruje formou grafu změnu životaschopnosti bakterií Pseudomonas fluorescens v závislosti na koncentraci (přidávaného) inositolu při lyofilisaci z vodného roztoku inositolu nebo roztoku inositolu v 0,04M MgSO4. Svislá osa representuje životaschopnost v jednotkách počet částic na miliardu (to jest 1E+09=10^9 ppb, 1E+08=10^8 ppb, a tak dále) a vodorovná osa representuje koncentraci přidávané látky v miligramech na vzorek. Černé čtverečky (■) v grafu odpovídají inositolu v síranu hořečnatém a kroužky (O) odpovídají inositolu ve vodě.

Obrázky 2 až 7 ilustrují formou grafů změnu životaschopnosti lyofilisovaných bakterií Pseudomonas fluorescens v závislosti na koncentraci monosacharidu pro řadu monosacharidů. Svislá osa representuje životaschopnost v jednotkách počet částic (v miliardách) na miliardu (to jest 1E+0=1 miliarda, 5E-1=0,5 miliardy, 2E-1=0,2 miliardy a tak dále) a vodorovná osa representuje koncentraci cukru v miligramech na vzorek. Použité monosacharidy jsou :

Obrázek 2 galaktosa	Obrázek 5 xylosa
Obrázek 3 fruktosa	Obrázek 6 rhamosa
Obrázek 4 glukosa	Obrázek 7 manosa

Obrázek 8 ilustruje formou grafu změnu četnosti mrtvých buněk (k_1) v závislosti na Tg matrice a změnu Tg v závislosti na relativní vlhkosti. Levá svislá osa representuje k_1, pravá svislá osa representuje Tg (°C) a vodorovná osa representuje relativní vlhkost (%). Černé čtverečky (■) spojené plnou čárou odpovídají četnosti mrtvých buněk (k_1) a kosočtverce

spojené přerušovanou čárou odpovídají teplotě skelného přechodu (Tg).

Na obrázcích je životaschopnost vyjádřena jako počet životaschopných bakterií na 10^9 životaschopných bakterií v původní suspenzi, to jest počet přeživších bakterií z každé miliardy původně životaschopných bakterií. Životaschopnost je vyjádřena v jednotkách počet částic na miliardu (ppb), to jest 10^9 ppb odpovídá přežití 100% jedinců, 10^3 odpovídá přežití 10% jedinců a tak dále.

Z obrázku 1 můžeme vidět, že při nízkých koncentracích inositolu je zachována vysoká životaschopnost buněk, kdežto při vyšších koncentracích, například vyšších než 100 mg/vzorek (což odpovídá 50 mg/ml), se počet životaschopných buněk s rostoucí koncentrací rychle snižuje.

Z obrázků 2 až 7 můžeme vidět, že některé monosacharidy chrání buňky před poškozením v nízkých koncentracích, například nižších než 10 mg/vzorek (což odpovídá 5 mg/ml), a že tento ochranný efekt je v podstatě zachován i při vyšších koncentracích, například kolem 400 mg/vzorek (což odpovídá 130 mg/ml).

Z obrázku 8 můžeme vidět, že tam, kde Tg klesne pod teplotu skladování (representována horní vodorovnou čárou při 21 až 22°C) dochází k podstatnému zvýšení četnosti mrtvých buněk (kl), což dokazuje důležitost udržování skelného stavu v průběhu skladování.

Koncentrace, při níž je použitý materiál účinný, to jest hroutí se, aniž by přílišně poškozoval buňky, je závislá na řadě faktorů, zahrnujících mezi jinými : objem frakce buněk v suspenzi v kroku A; vlastní teplotu skelného přechodu polyhydroxylové sloučeniny; změnu teploty skelného přechodu matrice jako funkci koncentrace vody v ní přítomné; teplotu, které je matrice vystavena v průběhu lyofilisace a po ní.

Je nutno si uvědomit, že polyhydroxylová sloučenina může fungovat (i) při nízkých teplotách jako látka chránící buňky před škodlivým působením teplot pod bodem mrazu, zvláště proti poškození způsobeným částicemi ledu během lyofilisace; a/nebo (ii) jako látka chránící buňky proti poškození způsobeném ztrátou vody během sušení a/nebo skladování; a/nebo (iii) jako zdroj výživy během regenerace buněk.

Mikrobiální buňky používané ve způsobu podle vynálezu mohou být pěstovány v obvyklých růstových mediích, například v živném bujónu nebo v tryptickém sojovém bujónu. Tyto buňky mohou být odebrány během jakékoliv vhodné fáze jejich růstu, výhodně však v časné stacionární fázi.

Například, kultura může být pěstována v nebo na vhodném mediu, například v kapalném mediu nebo na plotnách s živnou půdou, až je dosaženo žádané koncentrace buněk. Buňky jsou isolovány obvykle centrifugací. Dále jsou suspendovány ve vodném mediu, které obsahuje jednak materiál z něhož se poté vytvoří matrice, a jednak nepovinně další přísady, jak je zde zmiňováno.

Výhodně jsou mikrobiální buňky používané ve způsobuu podle vynálezu isolovány z růstového media, suspendovány v roztoku obsahujícím polyhydroxylovou sloučeninu, vhodné přísady a tak dále a vysušeny. Nicméně nevylučujeme možnost, že polyhydroxylová sloučenina a vhodné přísady, a tak dále jsou přidány k buňkám v růstovém mediu a teprve výsledná směs je vysušena. Tam, kde jsou buňky suspendovány, jsou suspendovány ve vhodném vodném mediu, například vodném roztoku $MgSO_4$ nebo ještě lépe ve vodě, obsahujícím polyhydroxylovou sloučeninu.

Sušení podle kroku B ve způsobu podle vynálezu může být prováděno například jako evaporace, vakuové sušení,

sušení rozprašováním, sušení na vzduchu nebo nejlépe lyofilisace.

Během sušení (krok B), nebo v následujícím kroku je nezbytné dosáhnout plastického toku tak, jak je řečeno v předchozím textu.

Obsah vody v komposici vysušené podle kroku B je obvykle nižší než 15 hmotnostních procent (w/w).

Tam, kde se sušení podle kroku B provádí jako lyofilisace, obsahuje komposice obvykle jednu nebo více vhodných přísad. Jako příklady vhodných přísad můžeme mezi jinými uvést jako látky chránící buňky před škodlivým působením teplot pod bodem mrazu, například cukry nebo polymerní sloučeniny jako například polyvinylalkohol, polyvinylpyrrolidon; látky chránící buňky proti poškození způsobeném ztrátou vody, například cukry nebo polymerní sloučeniny jako například polyvinylalkohol, polyethylenglykol; nebo ještě lépe antioxidanty nebo takzvané potencující látky jako například askorbát nebo glutamát. Nevylučujeme ani možnost, že mohou být přítomny i jiné přísady, například takzvané zbytňující látky, například krystalisující cukry jako například manitol, a regulanty osmotického tlaku jako například betain, močovina/trimethylamin-N-oxid, prolin, sarkosin.

Vynález je dále ilustrován prostřednictvím následujících příkladů.

Příklady 1 až 6

Tyto příklady ilustrují komposice podle vynálezu, v nichž matrice obsahuje rhamosu.

Pseudomonas fluoroscens byly pěstovány ve standardním mediu (dvojnásobně koncentrovaný živný bujón) a isolovány centrifugací v časné stacionární fázi růstu. Buněčný

koncentrát byl suspendován ve sterilní vodě a dále byl přidán koncentrovaný roztok rhamosy sterilisovaný v autoklávu, v objemu dostačujícím k přípravě přibližně 200 alikvotů o výsledné koncentraci 200 mg cukru na 2x1010 buněk v celkovém objemu 4 ml vody. Alikvoty byly umístěny do lyofilisačních lahviček o objemu 5 ml.

Lahvičky byly vloženy do komor lyofilisátoru a teplota v komorách nastavena na -30 °C, přičemž nejprve došlo ke zmrznutí obsahu lahviček a následně v průběhu dvou hodin k poklesu teploty jejich obsahu na -28 °C až -30 °C. Poté byly zavedeno vysoké vakuum a primární sušení probíhalo celkem 48 hodin. Teplota v komorách byla zvýšena na 0 °C a sekundární sušení probíhalo celkem 24 hodin. Nakonec byly lahvičky vytemperovány na pokojovou teplotu a před vyjmutím z lyofilisátoru byly pod vakuem zapečetěny.

Lahvičky byly skladovány při 4 °C ve vakuu (příklad 1) nebo na vzduchu s kontrolovanou vlhkostí při 21 °C (příklady 2 až 6).

Vzorky byly rehydratovány ve sterilní vodě a počet životaschopných bakteriálních buněk byl stanoven metodou postupného zřeďování s následným výsevem na King s B růstové medium. Počet buněk schopných vytvořit kolonie (colony forming units, cfu) na plotnách s největším zředěním byl použit ke zjištění počtu bakteriálních buněk které přežily lyofilisaci a podmínky skladování v jednotce objemu.

Okamžitě po lyofilisaci byla životaschopnost buněk $3x10^8$ ppb.

Výsledky získané použitím bakterií skladovaných při 4°C ve vakuu jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1

Příklad číslo	Životaschopnost (ppb)	
	skladování po dobu (týdnů)	
	30	50
1	ND	$5x10^8$
CT1	0	-

ND: nestanoveno

CT1 je srovnávací test bez přítomnosti rhamosy.

Z tabulky 1 je patrné, že přítomnost rhamosové matrice podstatně zlepšila životaschopnost bakterií.

Výsledky získané použitím bakterií skladovaných při 21 °C v komůrkách s kontrolovanou vlhkostí vzduchu jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 2

Příklad číslo:	Relativní vlhkost (RH%)	Životaschopnost (ppb)		
		skladování po dobu (dnů)		
		13	27	3
2	1	8×10^7	3×10^7	4×10^7
3	4	3×10^7	7×10^7	2×10^7
4	9	9×10^7	5×10^7	4×10^7
5	23	4×10^7	4×10^7	8×10^7
6	44	3×10^7	1×10^7	3×10^7
CT2	1	10^3		

CT2 je srovnávací test bez přítomnosti rhamosy.

Z tabulky 2 můžeme vidět, že přítomnost cukru podstatně zlepšila životaschopnost bakterií dokonce při nízké relativní vlhkosti, což je patrné ze srovnání příkladu 2 s CT2.

Příklady 7 až 10

Tyto příklady ilustrují komposice podle vynálezu, v nichž matrice obsahuje rhamosu a síran hořečnatý.

Postup byl stejný jako v příkladech 1 až 6 až na skutečnost, že buněčný koncentrát byl namísto ve sterilní vodě suspendován v 0,04M síranu hořečnatém a teprve poté byl přidán roztok rhamosy.

Okamžitě po lyofilisaci byla životaschopnost buněk $5x10^8$ ppb.

Lyofilisované buňky byly skladovány při různých teplotách a po různě dlouhou dobu jak je uvedeno v tabulce 3.

Tabulka 3

Příklad číslo:	Teplota skladování	Životaschopnost (ppb) po dnech			
		50	100	175	365
7	-20	5×10^8	5×10^8	5×10^8	5×10^8
8	4	2×10^8	2×10^8	1×10^8	
9	15	2×10^8	1×10^8	5×10^8	
10	20	2×10^8	2×10^8		

Z tabulky 3 můžeme vidět, že tyto směsi poskytují podstatnou ochranu v celém rozsahu teplot.

Příklady 11 až 15

Tyto příklady ilustrují komposice podle vynálezu, v nichž matrice obsahuje askorbát sodný a glutamát sodný.

Postup byl stejný jako v příkladech 1 až 6 vyjma skutečnosti, že k buněčnému koncentrátu a rhamose byly přidány vodné roztoky askorbátu sodného a glutamátu sodného.

Okamžitě po lyofilisaci byla životaschopnost buněk $2x10^8$ ppb.

Vzorky byly skladovány na vlhkém vzduchu při teplotě 21°C.

Tabulka 4

Příklad číslo:	Relativní vlhkost (RH%)	Životaschopnost (ppb) skladování po dobu (dnů)		Tg °C
		34	128	
11	0	1×10^8	1×10^8	25
12	14	1×10^8	1×10^8	24
13	30	1×10^8	4×10^7	14
14	40	9×10^7	5×10^6	12
15	53	3×10^7	3×10^3	8

Z příkladů 11 a 12 a v tabulce 4 můžeme vidět, že skladování vysušených buněk při teplotách nižších než je Tg matrice stabilisuje buňky během dlouhého období.

Výsledky naznačují, že kombinace zhroucené matrice ve skelném stavu a přítomnost antioxidantů poskytují matrici, která může na dlouhou dobu zachovat životaschopné buňky a to i při relativně nepříznivých podmínkách.

Příklad 16

4 gramy pelety Pseudomonas fluorescens obsahující 5.10^{12} životaschopných buněk byly centrifugací odděleny od růstového media a smíchány se 14 gramy maltodextrinu komerční kvality (Glucidex IT19) a 1,6 gramy askorbátu sodného a tento materiál byl vysoušen za sníženého tlaku nejdříve při pokojové teplotě, přičemž odpařená voda kondenzovala ve vymrazovací kapse, kde byly teplota udržována na -50 °C.

Sušení bylo ukončeno přibližně po 18 hodinách, když hodnota vakua dosahovala řádově 1 mbar.

Vzorky byly rehydratovány v čisté vodě a vysety na živný agar, který obvykle vykazuje 50 až 90% přežití původně životaschopných buněk.

Materiály připravené tímto způsobem se jeví jako zhroucené amorfní matrice se skelným přechodem vyšším než 20 °C (jestliže byly vzorky vystaveny standardním laboratorním relativním vlhkostem).

JUDr. Jarmila Traplová

2805-95

SUBSTITUTE SHEET

PŘÍL. ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ 26. X. 95 DOŠLO 1678 41 č.j.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Stabilisovaná, vysušená komposice v y z n a č u j í c í s e t í m , že obsahuje mikrobiální buňky v stabilisovanémním stavu suspendované ve zhroucené matrici, přičemž mikrobiální buňky jsou gram-negativní bakterie.

2. Komposice podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m , že gram-negativní buňky jsou Pseudomonas fluorescens, Escherichia coli nebo hlízkovité bakterie.

3. Způsob přípravy stabilisované, vysušené komposice obsahující mikrobiální buňky v y z n a č u j í c í s e t í m , že mikrobiální buňky jsou gram-negativní bakterie ve stabilizovaném stadiu suspendované v matrici, přičemž tento způsob zahrnuje tyto kroky:

   A: smíšení mikrobiálních buněk s vodným roztokem, obsahujícím hmotu, ze které je odvozena matrice

   B: sušení této směsi za podmínek, za kterých dochází k viskósnímu toku hmoty matrice tak, že dojde ke zhroucení matrice, přičemž buňky nejsou příliš poškozeny.

4. Způsob podle nároku 3 v y z n a č u j í c í s e t í m , že komposice připravená v kroku B je dále vysoušena tak, aby se dosáhlo zvýšení teploty skelného přechodu hmoty matrice, čímž je komposice stabilisována v širším rozsahu skladovacích podmínek.

5. Způsob podle nároku 3 v y z n a č u j í c í s e t í m , že koncentrace mikrobiálních buněk ve směsi připravené v kroku A je v rozsahu mezi 10^4/ml a 10^{13}/ml.

SUBSTITUTE SHEET

6. Způsob podle nároku 5 v y z n a č u j í c í s e t í m , že koncentrace mikrobiálních buněk A je v rozsahu mezi 10^{10}/ml a 10^{11}/ml.

7. Způsob podle nároku 3 v y z n a č u j í c í s e t í m , že hmota, která je v kroku A smíšena s bakteriálními buňkami, je polyhydroxylová sloučenina.

8. Způsob podle nároku 7 v y z n a č u j í c í s e t í m , že polyhydroxylová sloučenina je monosacharid.

9. Způsob podle nároku 7 v y z n a č u j í c í s e t í m , že koncentrace polyhydroxylové sloučeniny použité ve směsi podle kroku A je rozsahu mezi 10 mg/10^{10} buněk a 1000 mg/10^{10} buněk.

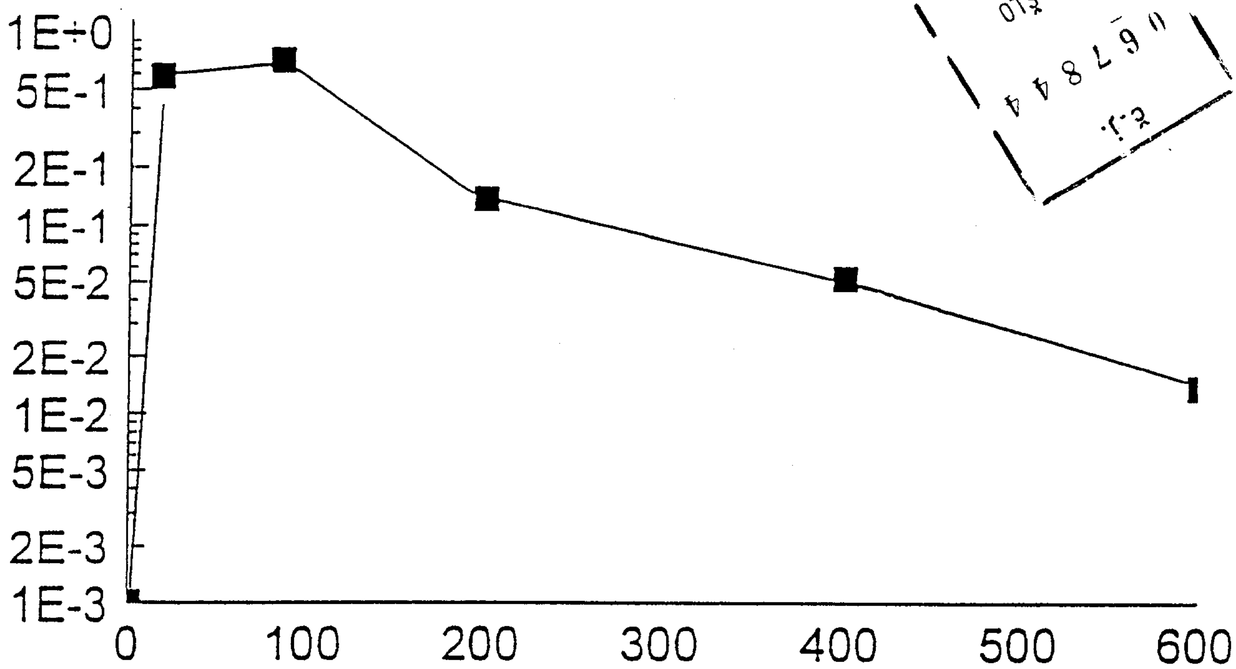
10. Způsob podle nároku 9 v y z n a č u j í c í s e t í m , že koncentrace polyhydroxy sloučeniny je v rozsahu mezi 200 mg/10^{10} buněk a 400 mg/10^{10} buněk.

11. Komposice připravená podle nároku 3 v y z n a č u j í c í s e t í m , že teplota jejího skelného přechodu je vyšší než předpokládaná skladovací teplota.

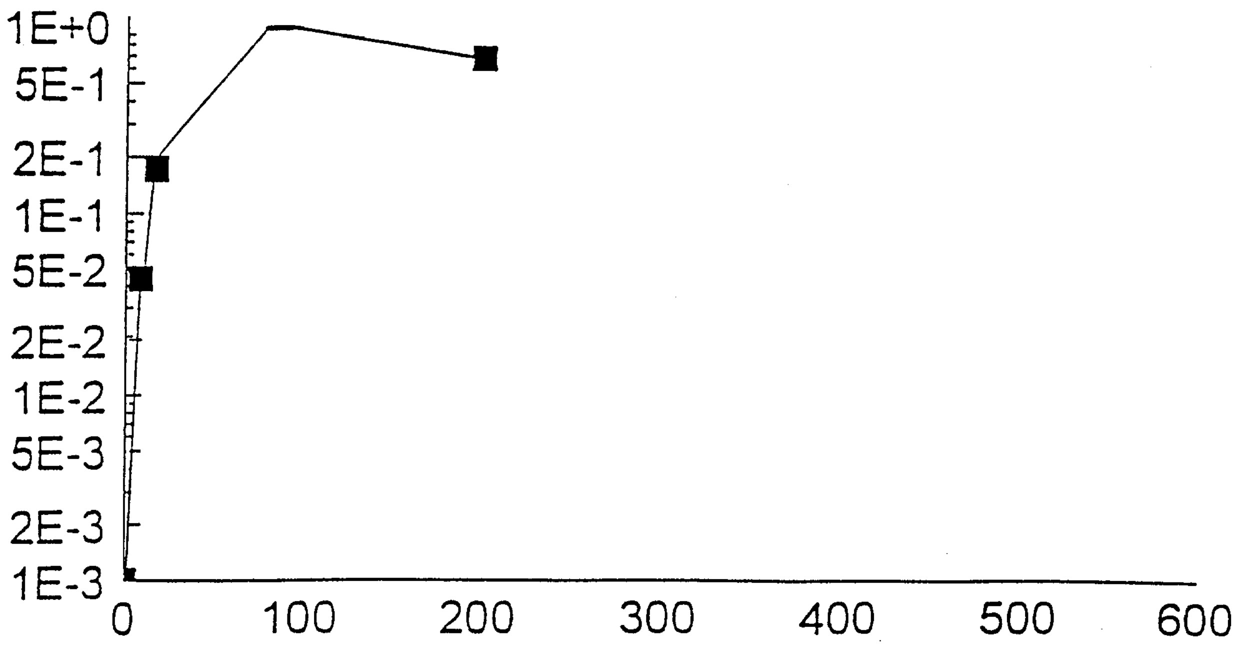
JUDr. Jarmila Traplová

2805-95

ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ
PŘÍL.
26. X. 95
DOŠLO
067844
č.j.



OBR. 2

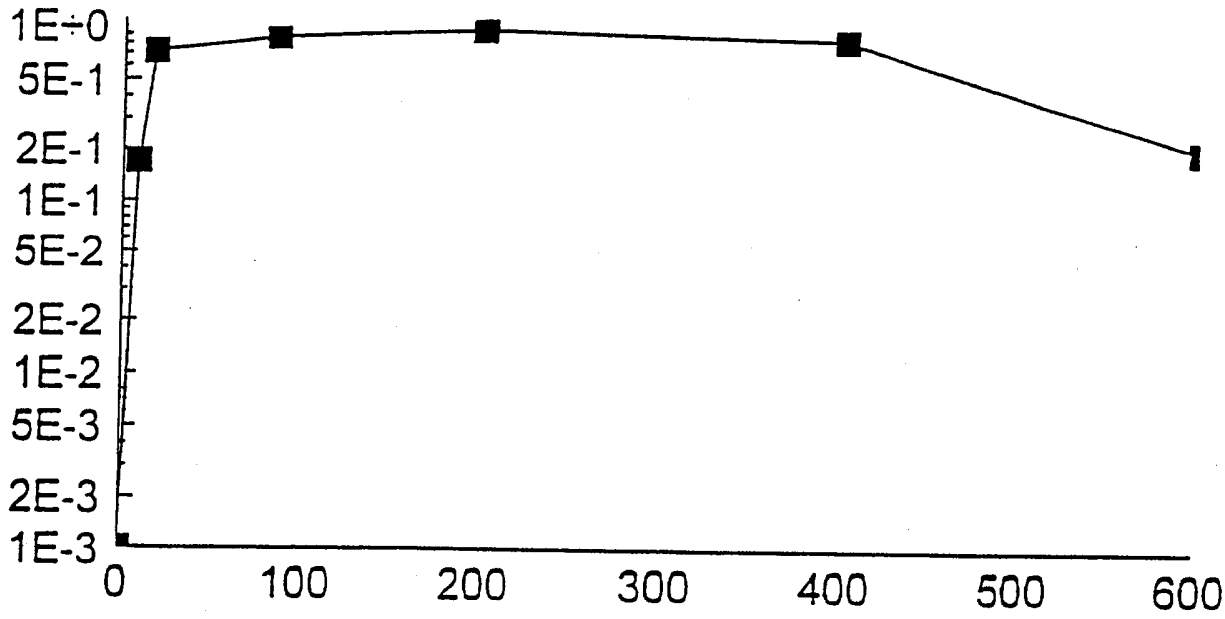


OBR. 3

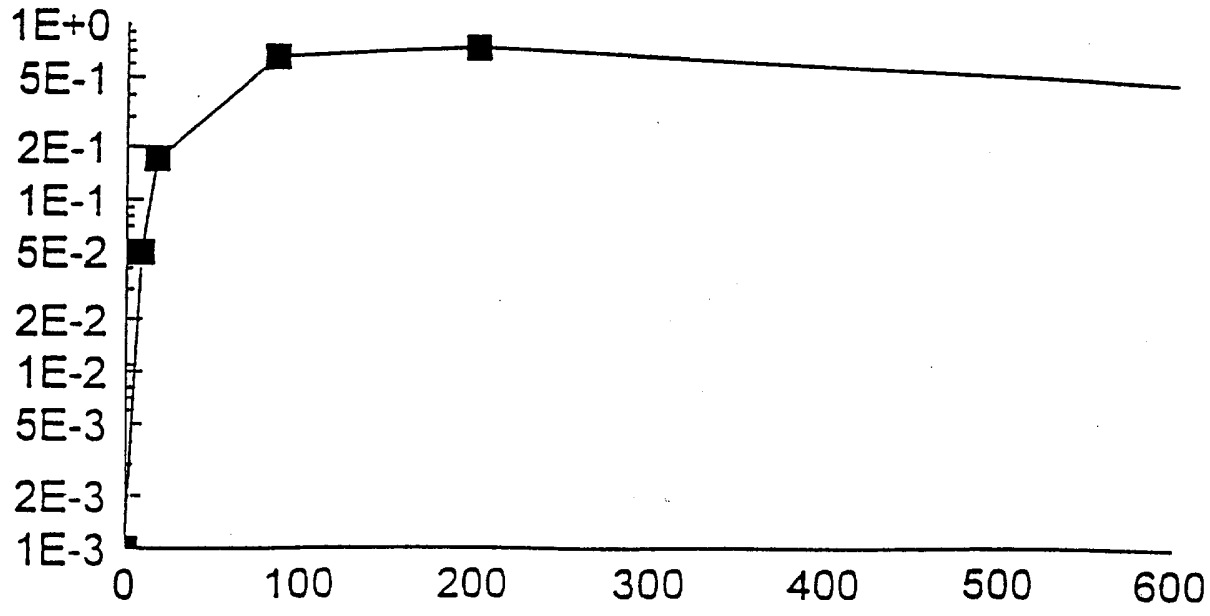
i.s. [signature]
JUDr. Jarmila Traplová

2805-95

ČJ. 67844
DOŠLO 26. X. 95
ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ
PŘÍL.



OBR. 6

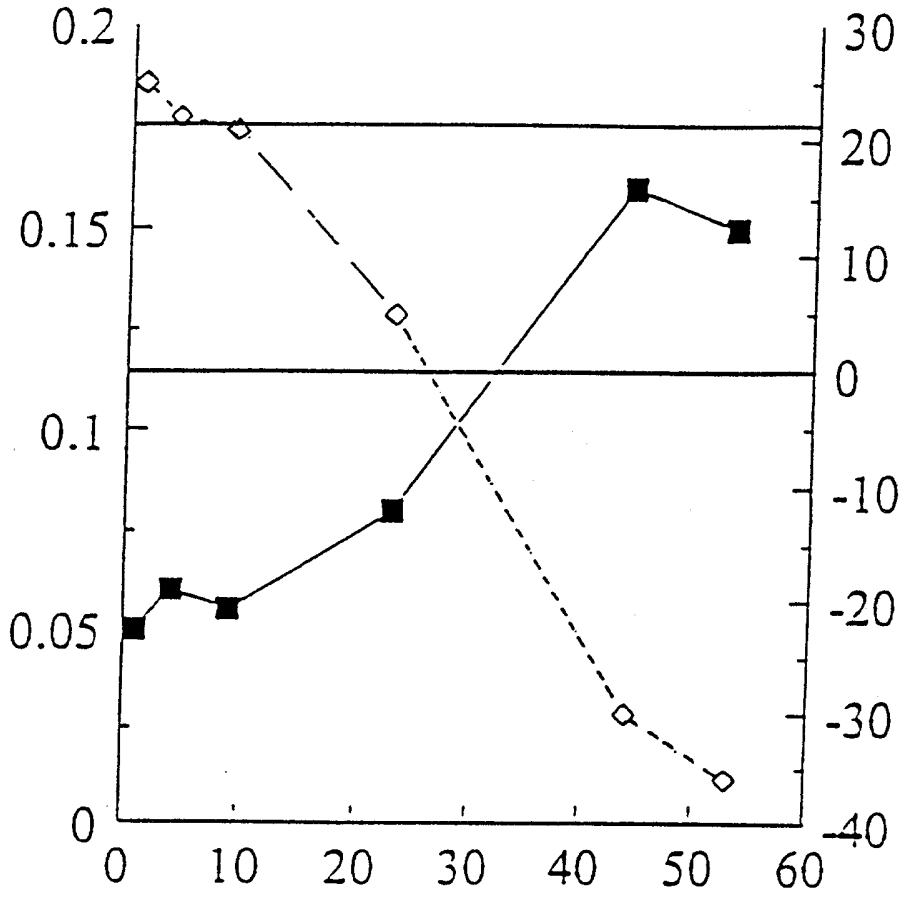


OBR. 7

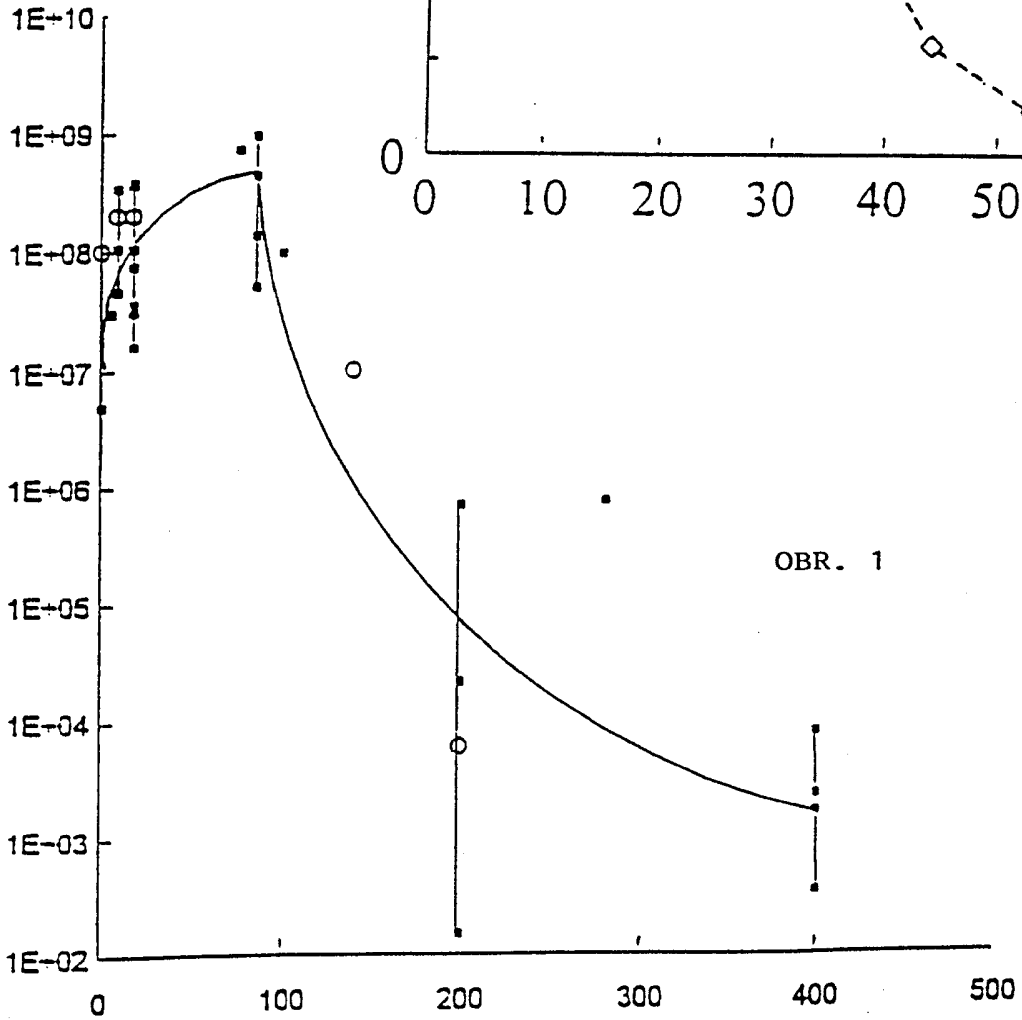
2805-95

ČJ. 067844
DOŠLO 26. X. 95
ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ
PŘÍL.

OBR. 8



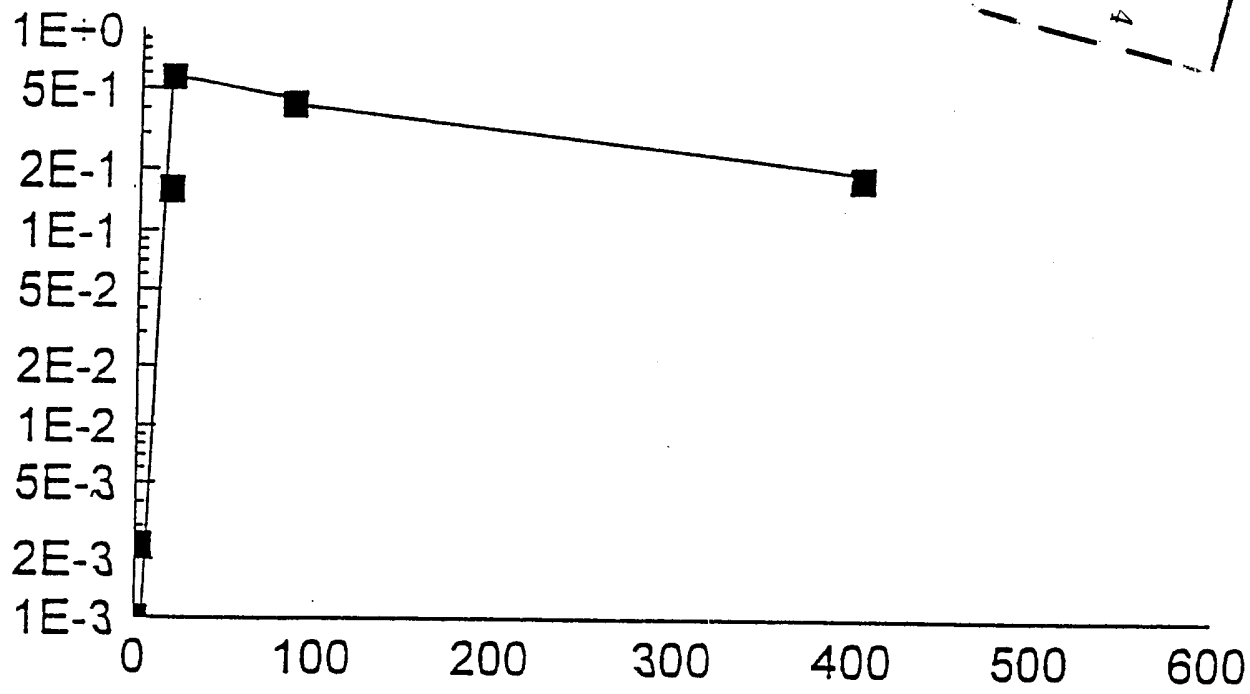
OBR. 1



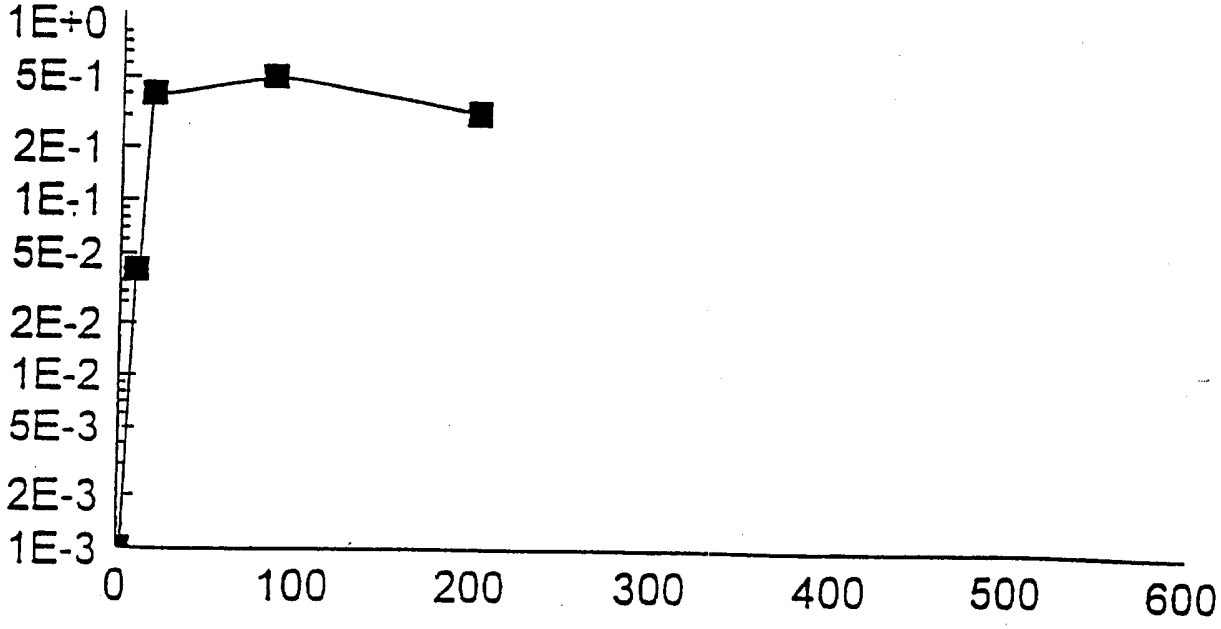
JUDr. Jarmila Traclová

2805-9

ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ
PŘÍL.
DOŠLO 26. X. 95
č.j. 0 6 7 8 4 4



OBR. 4



OBR. 5

JUDr. Jarmila Trojtlová