

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

400-98

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **09. 08. 96**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **11.08.95**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **95/9516461**

(33) Země priority: **GB**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **15. 07. 98**
(Věstník č. 7/98)

(86) PCT číslo: **PCT/EP96/03535**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 97/07232**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

C 12 P 21/00

C 12 P 19/04

A 61 K 39/00

C 08 B 37/00

C 07 K 2/00

C 12 N 1/16

// (C 12 N 1/16,

C 12 R 1:725), (C 12 P 21/00,

C 12 R 1:645), (C 12 P 19/04,

C 12 R 1:645)

(71) Přihlášovatel:

**BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA
GMBH, Ingelheim/Rhein, DE;**

(72) Původce:

Farnow Dieter, Ingelheim/Rhein, DE;

Karla Joachim, Ruesselsheim, DE;

Poliakov Igor D., Laupheim, DE;

Ivanova Ludmilla G., Laupheim, DE;

(74) Zástupce:

**Korejzová Zdeňka JUDr., Břehová 1, Praha
1, 11000;**

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Způsob výroby rozpustného materiálu s
antigenním účinkem**

(57) Anotace:

Způsob výroby rozpustného materiálu a antigenním účinkem, obsahujícím polysacharid a/nebo glykopeptid, ASMP, při kterém se buňky hub, náležející do skupiny keratofilních hub nebo kvasinek nebo materiál z těchto buněk zpracuje působením vodného roztoku zásady, pevná a kapalná fáze směsi se oddělí, po oddělení supernatantu se supernatant zpracovává působením anorganické nebo organické kyseliny a po oddělení supernatantu se ze supernatantu vysráží ASMP. Antigenní prostředky obsahují polysacharidy a/nebo glykopeptidy a jsou získatelné z keratofilních hub a kvasinek. Jsou použitelné pro výrobu farmaceutických prostředků a vakcín pro profylaxi a léčení alergií nebo pro modulační odpovědi imunitního systému.

CZ 400-98 A3



Způsob výroby rozpustného materiálu s antigenním účinkem

Oblast techniky

Vynález se týká způsobu výroby rozpustného materiálu s antigenním účinkem, jakož i polysacharidového a/nebo glykopeptidového antialergického materiálu, získaného tímto způsobem a jeho použití pro výrobu farmaceutických prostředků.

Dosavadní stav techniky

Alergie v některé ze svých forem se vyskytuje u více než 20 % populace a znepokojující vzrůst nemocnosti i úmrtnosti v posledním desetiletí vedl k označení tohoto onemocnění jako civilizační choroby, která je převážně způsobena změnami životního prostředí, jak bylo popsáno v publikaci Sutton and Gould, Nature, 1993, 366, str. 421 až 428. Člověk i živočichové jsou při tom alergickými chorobami postiženi přibližně v odpovídajícím podílu.

Při vzniku alergií hraje klíčovou úlohu imunologické reakce, jak bylo popsáno v souhrnné publikaci Paul, William E., Ed., Fundamental Immunology, Raven Press Books Ltd., New York, 1984. Zásadně byly popsány dva odlišné typy alergických reakcí. Jedním z nich je okamžitá přecitlivělost, ITH, při níž je převážnou část alergické odpovědi na alergen možno pozorovat v průběhu minut až hodin. Druhý typ je přecitlivělost opožděného typu, DTH. V případě DTH dosahuje alergická odpověď na alergen svého maxima obvykle v průběhu 24 až 48 hodin. Pravděpodobně je odpověď typu ITH zprostředkována převážně přes IgE, kdežto v případě DTH běží o komplexnější reakci. Při vzniku reakce typu DTH je

pravděpodobná, že se celkové reakce tohoto typu účastní další odpovědi, zprostředkované buňkami, zejména B- a T-lymfocyty. Například v případě, že se lymfocyty a protilátky přenesou u živočichů z alergického dárce na nealergického příjemce, vzniká u takového příjemce DTH podle publikace Askenase P. W., 1973, J. exp. Med., 138, str. 1144 až 1155.

Vzhledem ke svému přímému vystavení působení antigenů z životního prostředí jsou tkáněmi, nejčastěji postiženými alergiemi epitheliální tkáň, zvláště pokožka. Například na kožních klinikách tvoří akutní alergická kontaktní dermatitis a chronické alergické kontaktní ekzémy až 15 % všech dermatos. Alergické asthma tvoří u člověka přibližně 20 % všech případů asthmatu.

Alergická onemocnění, která je možno klasifikovat jako ITH, jsou například atopický ekzém, alergické průduškové asthma, senná rýma, alergický zánět spojivek. Tyto choroby se mohou vyvinout také na chronické choroby a není proto možno je považovat výlučně za reakce, závislé na IgE. Jako příklady DTH je možno uvést akutní alergickou kontaktní dermatitis a chronický alergický kontaktní ekzém, který může být klasifikován jako DTH typu IV, při jehož vzniku se účastní také epidermis. Takový nemocný byl pravděpodobně dříve sensitizován stykem s alergenem a vyvinula se u něj přecitlivělost. Po dalším styku s tímto alergenem vznikala akutní, subakutní nebo chronická zánětlivá kontaktní dermatitis.

Jako příklad alergické dermatitidy z veterinární kliniky je možno uvést tak zvaný letní ekzém, běží o svědivý ekzém, rovněž označovaný jako Sweet or Queens land Itch.

Summer Eczema (svědivý letní ekzém) je alergická dermatitis u koní, považovaná za atopickou formu alergických chorob a zahrnuje reakce typu I a IV. Toto onemocnění je vyvoláno poraněním hmyzem z čeledí Culicidae a Ceratopgonidae a tvoří se při něm na kůži přetrvávající eroze, které mokvají, a to převážně v okolí ocasu a na břicho. Postižená zvířata jsou velmi citlivá na různé zevní podněty, například na dotek, působení deště a větru a podobně, takže dochází ke zhoršení celkového zdravotního stavu a výkonnosti. Stejně jako tomu je u ostatních alergických onemocnění, je vývoj této choroby patrně také ovlivněn výživou. Příznaky onemocnění je možno pozorovat pouze od března do září, kdežto alergen, vyvolávající přecitlivělost pokožky je možno pozorovat v průběhu celého roku. Toto onemocnění je tedy zajímavým obecným modelovým systémem pro výzkum alergií a pro vývoj antialergických účinných látek.

Bylo již navrženo mnoho způsobů léčení alergií v závislosti na klinickém obrazu onemocnění. V případě léčení akutní alergické kontaktní dermatitidy, chronického alergického kontaktního ekzému a/nebo atopického ekzému se obvykle užívají lipofilní krémy, obsahující glukokortikosteroidy, antimikrobiální látky, protizánětlivé látky a/nebo vápník. V případě svrchu uvedeného ekzému koní byly použity četné účinné látky místně i parenterálně. Šlo například o steroidní deriváty, insekticidy pro zábranu dalšího útoku hmyzu, různé galenické prostředky, salicyláty, oleje a také peptidy, izolované z mikroorganismů. Všechny tyto způsoby léčení pouze potlačují příznaky a nikoliv příčinu onemocnění.

Porušená odpověď imunitního systému nebo jeho nedostatečnost často hraje důležitou úlohu při vzniku alergií.



Z tohoto důvodu byly používány také imunotherapeutické postupy, byly například podávány stimulatory imunitního systému, jako BCG, levamisol a další látky, a to v případě ekzémů, atopického ekzému, kožních abscesů a také v případě autoimunitních chorob, jak je popsáno v publikaci A. M. Tschernucha, (Ed.), Koscha, Medicina 1982, Moskva.

Při léčení alergických dermatitid, způsobených blechami, byly úspěšně používány peptidy, odvozené od protilátek, například podle britské patentové přihlášky č. 8913737. V případě atopického ekzému byla s dobrým výsledkem použita také desenzitizace podle publikace A. M. Tschernucha (svrchu).

Navzdory různým přístupům k léčení alergií nebyly až dosud použity pro léčení tohoto onemocnění antigenní účinné látky, připravitelné z keratinofilních hub nebo kvasinek.

V průběhu přihlášky znamená pojem "rozpustný" nebo "nerozpustný" rozpustnost ve vodních roztocích. Pod pojmem "antigenní prostředek" se rozumí jakýkoliv prostředek nebo látka, schopná vyvolat antigenní nebo imunogenní odpověď. Pojem "modulace odpovědi imunitního systému" znamená schopnost antigenního prostředku stimulovat nebo zvýšit odpověď uvedeného systému, tato vlastnost je prokazatelná například schopností stimulovat proliferaci lymfocytů v buněčné kultuře, podrobný souhrn je možno nalézt v publikacích Strube a další, 1989, Vet. Med. Rev., 60, str. 3 až 15, a Büttner M., 1993, Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis., 16, č. 1, str. 1 až 10.

Nyní bylo neočekávaně zjištěno, že k profylaxi a léčení alergií i k modulaci odpovědi imunitního systému, zvláště u savců, je možno použít antigenní prostředky, připravitelné z kerofilních hub nebo kvasinek.

Podstata vynálezu

Podstatu vynálezu tvoří způsob výroby antigenního materiálu z keratofilních hub a kvasinek. Antigenní prostředky, které je možno získat způsobem podle vynálezu, obsahují polysacharidy a/nebo glykopeptidy. Tyto antigenní prostředky je možno použít jako farmaceutické prostředky a také jako vakcíny pro léčení živočichů i lidí, zvláště pro léčení alergických onemocnění a pro modulaci odpovědi imunitního systému. Je tedy zřejmé, že farmaceutické prostředky podle vynálezu mohou mít imunologické i farmakologické použití.

Antigenní materiál podle vynálezu je také možno připravit z materiálu, odvozeného od keratinofilních hub nebo kvasinek, například z jejich buněčných stěn.

Pro přípravu antigenních prostředků podle vynálezu byly vyvinuty tři odlišné postupy. Podle těchto postupů je možno připravit tři odlišné antigenní frakce ASMP, ANMP nebo AEMP, dále budou tyto materiály označovány společně jako "frakce", všechny tyto frakce je možno získat jak z keratofilních hub, tak z kvasinek. Ty antigenní prostředky, které obsahují více než jednu frakci, budou dále označovány jako "komplexní prostředky" nebo krátce jako "komplexy".

Způsob 1

Frakce, kterou je možno připravit tímto způsobem je tvořena antigenním rozpustným materiálem, který obsahuje polysacharidy a/nebo glykopeptidy a je označována ASMP. Tento postup, který bude podrobněji popsán v příkladu 1, je možno uskutečnit následujícím způsobem:



Keratofilní houby nebo kvasinky se pěstují na agarových plotnách, například podle EP 564 620. Výhodným prostředím je například agar s extraktem ze sladu (Oxoid). Je však možno použít i jiná prostředí, při jejichž použití je možno zajistit růst keratofilních hub nebo kvasinek. Výsledná biologická hmota se oddělí a zpracovává působením vodného roztoku zásady. Výhodnými vodnými roztoky jsou roztok hydroxidu sodného nebo draselného, výhodná koncentrace je 0,1 až 5 % hmotnostních. Roztok se nechá působit při teplotě 20 až 150°C až 30 hodin. Po zpracování ve vodném alkalickém prostředí se pevná a kapalná fáze oddělí například odstředěním, filtrací nebo usazením. S výhodou se použije odstředění, kterým je možno zajistit dobré oddělení buněčné drti hub, například při 3500 g. Působení alkalického roztoku a oddělení obou podílů je možno několikrát opakovat.

Po zpracování působením zásady se výsledný supernatant dále zpracovává vodným roztokem kyseliny, je možno použít například 0,2 až 1,5 M roztok organické kyseliny nebo 0,05 až 1 M roztok anorganické kyseliny. Je možno použít například kyselinu chlorovodíkovou nebo octovou, pH se s výhodou pohybuje v rozmezí 2,5 až 4,5. Působení vodného kyselého roztoku trvá přibližně 2 až 4 hodiny při teplotě v rozmezí 4 až 8 °C, pak se opět oddělí pevná a kapalná vrstva. Rovněž působení vodného roztoku kyseliny a následné oddělení obou podílů je možno několikrát opakovat, s výhodou za svrchu uvedených podmínek. Pak se supernatant, oddělený od pevného podílu podrobí srážecímu stupni. Srážení se s výhodou vyvolá přidáním vhodného organického rozpouštědla, například alkoholu, jako nižšího alkanolu, výhodný je methanol nebo ethanol. Při použití jednoho objemu supernatantu na 2 až 5 objemů alkoholu je možno dosáhnout dobrého vysrážení antigenního materiálu. Antigenní materiál je možno vysrážet také bez použití alkoholu jinými známými postupy, například při použití

síranu amonného nebo jiné soli, která se obvykle ke srážení obdobných materiálů užívá. Vzniklá pevná fáze se pak opět oddělí, s výhodou za svrchu uvedených podmínek. Izolovaná pevná fáze se pak popřípadě rozpustí ve vodném roztoku, s výhodou v destilované vodě, v typických případech se užije 25 až 100 ml vody. Konečně je možno získanou frakci ASMP lyofilizovat a skladovat v suchém stavu po delší dobu.

Způsob 2:

Frakce, kterou je možno získat tímto způsobem, je tvořena nerozpustným antigenním materiálem, obsahujícím polysacharidy a/nebo glykopeptidy, ANMP. Tento postup, který bude podrobněji popsán v příkladu 2, je možno uskutečnit následujícím způsobem.

Keratinofilní houby nebo kvasinky se pěstují na agarových plotnách, například podle EP 564 620. Výhodným živným prostředím je například agar s extraktem ze sladu (Oxoid). Je však možno také použít jiné živné prostředí, v němž je možno zajistit růst keratinofilních hub nebo kvasinek. Výsledná biomasa se oddělí a pak se zpracovává působením vodného roztoku zásady. Výhodnými vodnými roztoky jsou roztok hydroxidu sodného nebo draselného v koncentraci 0,1 až 5 % hmotnostních. Zpracování roztokem zásady se s výhodou provádí až 30 hodin při teplotě 20 až 150 °C. Po tomto zpracování vodným roztokem zásady se kapalná a pevná fáze oddělí například odstředěním, filtrací nebo usazením. S výhodou se k oddělení použije odstředění, jímž je možno zajistit dobré oddělení buněčné drti, například při 3500 g. Toto působení vodného roztoku zásady je možno několikrát opakovat, stejně jako oddělení pevné a kapalná fáze. Po ukončeném zpracování a oddělení se na pevnou fázi působí anorganickou nebo organickou



kyselinou. S výhodou se užije 0,2 až 1,5 M roztok kyseliny octové nebo 0,05 až 1 M roztok kyseliny chlorovodíkové. Tímto roztokem se působí na pevnou fázi 0,5 až 3 hodiny při teplotě 70 až 100 °C. Po ukončeném zpracování se pevná fáze promyje vodným roztokem, s výhodou destilovanou vodou. Toto promytí se s výhodou přibližně pětkrát opakuje. Nakonec se pevná fáze uvede do suspenze v destilované vodě.

Způsob 3:

Frakce, kterou je možno získat tímto způsobem, je tvořena antigenním exogenním materiálem, který obsahuje polysacharidy a/nebo glykopeptidy AEMP. Tento postup, který bude podrobně popsán v příkladu 3, je možno uskutečnit následujícím způsobem:

Keratinofilní houby nebo kvasinky se inkubují ve vodném roztoku nebo pěstují v kapalném živném prostředí po dobu až 240 hodin (objem roztoku nebo kultury je definován jako primární objem PV). Je možno použít destilovanou vodu, tak jak je popsáno například v příkladu 3, I, nebo také prostředí, popsaná v EP 564 620. Po inkubaci nebo kultivaci se buněčný materiál oddělí například odstředěním, filtrací nebo usazením, s výhodou odstředěním za svrchu uvedených podmínek. Výsledný supernatant se pak lyofilizuje a rozpustí ve vodě. Objem použité vody je s výhodou přibližně 0,1 až 0,2 objemu primárního objemu PV. Výsledný roztok se pak podrobí srážení. Toto srážení je možno uskutečnit přidáním vhodného organického rozpouštědla, například alkoholu, jako nižšího alkanolu, výhodným alkoholem je methanol nebo ethanol. Použije se obvykle jeden objem supernatantu na dva až pět objemů alkoholu, čímž je možno dosáhnout dobrého vysrážení antigenního materiálu. Ke srážení není nezbytné použít alkohol, je možno použít také jiné známé postupy pro srážení obdobných látek,

například síran amonný nebo jiná sůl, běžně užívanou k tomuto účelu. Výsledná sraženina se oddělí a popřípadě rozpustí ve vodném rozpouštědle, s výhodou v destilované vodě. Ve výhodném provedení se 0,5 až 50 mg sraženiny rozpustí v 1 ml vodného rozpouštědla. Nakonec je možno roztok AEMP lyofilizovat a skladovat po delší časové období v suchém stavu, s výhodou při teplotě 2 až 10 °C.

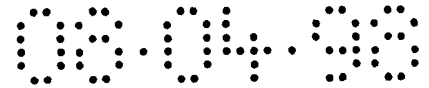
Výhodnými rody hub, z nichž je možno získat svrchu uvedené typy frakcí, jsou rody *Trichophyton*, *Microsporum* nebo *Candida*.

Výhodné jsou zejména následující čeledi:

- *Trichophyton equinum*,
- *Trichophyton mentagrophytes*,
- *Trichophyton sarkisovii*,
- *Trichophyton verrucosum*,
- *Microsporum canis*,
- *Microsporum gypseum*, nebo
- *Candida albicans*.

Výhodnými kmeny ze svrchu uvedených čeledí jsou následující kmeny:

- *Trichophyton equinum* DSM č. 7276,
- *Trichophyton mentagrophytes* DSM č. 7279,
- *Trichophyton sarkisovii* DSM č. 7278,
- *Trichophyton verrucosum*, DSM, č. 7277,
- *Microsporum canis* DSM č. 7281,
- *Microsporum canis* var. *obesum* DSM č. 7280,



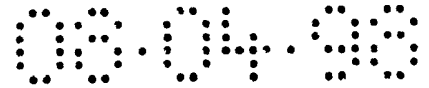
- *Microsporium canis* var. *distortum* DSM č. 7275,
- *Microsporium gypseum* DSM č. 7274, nebo
- *Candida albicans*, DSM č. 9656.

Všechny svrchu uvedené kmeny byly přihlašovatelem uloženy do veřejné sbírky DSM, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1B, D-38124 Braunschweig, SRN, podle Budapeštské úmluvy pro ukládání mikroorganismů. Všechny kmeny s výjimkou *Candida albicans* DSM č. 9656 byly dříve popsány v USSR patentové přihlášce č. 5006861, podané 21. 10. 1991 a odpovídajících přihláškách, zejména zveřejněné evropské patentové přihlášce č. 564 620, podané 17. 10. 1992.

V závislosti na čeledi, z níž byly frakce získány, budou frakce dále uváděny následujícím způsobem:

Frakce, odvozené od:

- i) *Trichophyton equinum*, budou označovány ASNP-TE, ANMP-TE nebo AEMP-TE,
- ii) *Trichophyton mentagrophytes* budou označovány ASMP-TM, ANMP-TM nebo AEMP-TM,
- iii) *Trichophyton sarkisovii* budou označovány ASMP-TS, ANMP-TS nebo AEMP-TS,
- iv) *Trichophyton verrucosum* budou označovány ASMP-TV, ANMP-TV nebo AEMP-TV,
- v) *Microsporium canis* budou označovány ASMP-MC, ANMP-MC nebo AEMP-MC,
- vi) *Microsporium gypseum* budou označovány ASMP-MG, ANMP-MG nebo AEMP-MG,



vii) *Candida albicans* budou označovány ASMP-CA, ANMP-CA nebo AEMP-CA.

V případě, že je uváděna informace, týkající se specifického kmene, je označení čeledi následováno číslem kmene ve sbírce DSM, například označení AEMP-CA9656 znamená frakci AEMP, která byla připravena při použití kmene *Candida albicans* DSM č. 9656.

Frakce, které je možno připravit tak, jak bylo popsáno ve svrchu uvedených způsobech 1 až 3 obsahují nejméně jeden antigen, obsažený v nejméně jednom ze svrchu uvedených kmenů a čeledí hub. Antigenní prostředky podle vynálezu obsahují nejméně jednu ze svrchu uvedených frakcí, mohou však obsahovat kombinace těchto frakcí.

Antigenní prostředky (ASMP a AEMP), popsané v příkladech 1 a 3:

- 1) obsahují monosacharidy, aminokyseliny a nukleotidy, které jsou do značné míry vázány na polymerní struktury, přičemž malý podíl těchto látek je přítomen ve formě volných monomerů,
- 2) převážně obsahují monosacharidové jednotky: mannosu, galaktosu, glukosu a xylosu a další jednotky v různém relativním množství,
- 3) obsahují směs polymerních struktur, vytvořených podstatným podílem těchto monosacharidů, přičemž významná část těchto polymerních struktur má molekulovou hmotnost vyšší než 20 000,
- 4) obsahují nízké množství volných nebo vázaných aminokyselin,
- 5) obsahují malé množství molekul DNA, citlivých na štěpení DN-ázou I.

NMR-spektrum antigenních prostředků ASMP a AEMP, vyjádřené ve formě NMR-spektrogramů je znázorněno na obr. 1 až 4.

Chemické posuny a vícečetné signály, které budou dále shrnuty v tabulce 12, jsou v souladu s literárními údaji pro uhlohydráty a aminokyseliny.

V případě frakcí AEMP a ASMP, například MG 7274, TM 7279, a CA 9656 překrývají signály pro uhlohydráty v rozmezí 3,2 až 5,5 ppm a signály pro aminokyseliny překrývají oblast 0,75 až 3,45 (bez alfa-protonů).

V případě frakce ASMP je rovněž možno prokázat typické signály pro methylovou skupinu acetátu při 1,92 ppm.

Frakce AEMP má také typické signály pro disacharidy a aminokyseliny. Například spektrum pro frakci TM 7279 obsahuje signály pro některé aromatické aminokyseliny, například pro fenylalanin, tyrosin a tryptofan, tyto signály jsou v oblasti 7,15 až 7,9 ppm.

Pokud jde o jednotlivé frakce typu ASMP nebo AEMP, jsou výhodné koncentrace v rozmezí 0,1 až 50 mg/ml. Pokud jde o jednotlivé frakce typu ANMP, jsou výhodné koncentrace 0,1 až 5 % objemových.

Výhodná provedení antigenních prostředků podle vynálezu obsahují například následující kombinace jednotlivých frakcí (komplexy):

Komplex 1 obsahuje ASMP-TM, ASMP-MG a ASMP-CA. Koncentrace každé z těchto frakcí se s výhodou pohybuje v rozmezí 0,1 až 50 mg/ml. Vysoce výhodné provedení komplexu 1 obsahuje kombinaci ASMP-TM7279, ASMP-MG7274 a ASMP-CA9656.



Complex 1.1 obsahuje ASMP-MG a ASMP-CA. Koncentrace každé z těchto frakcí se s výhodou pohybuje v rozmezí 0,1 až 50 mg/ml. Vysoce výhodné provedení komplexu 1.1 obsahuje kombinaci ASMP-MG 7274 a ASMP-CA 9656.

Komplex 2 obsahuje ANMP-TM, ANMP-MG a ANMP-CA. Ve výhodném provedení se koncentrace každé z uvedených frakcí pohybuje v rozmezí 0,1 až 5 % objemových. Vysoce výhodné provedení komplexu 2 obsahuje kombinaci frakcí ANMP-TM7279, ANMP-MG7274 a ANMP-CA9656.

Komplex 3 obsahuje frakce AEMP-TM, AEMP-MG a AEMP-CA. Koncentrace každé z uvedených frakcí se s výhodou pohybuje v rozmezí 0,1 až 50 mg/ml. Vysoce výhodné provedení komplexu 3 obsahuje kombinaci AEMP-TM7279, AEMP-MG7274 a AEMP-CA9656.

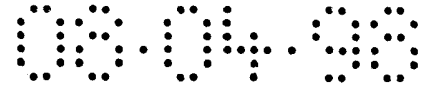
Komplex 4 obsahuje frakce ANMP a AEMP. Výhodné jsou zejména následující kombinace frakcí:

- 1) ANMP-CA a AEMP-TM nebo
- 2) ANMP-MG, ANMP-TM a AEMP-TM.

S výhodou se koncentrace frakcí ANMP pohybuje v rozmezí 0,1 až 5 % objemových a koncentrace frakce AEMP je v rozmezí 0,1 až 50 mg/ml. Ve vysoce výhodném provedení obsahuje komplex 4 následující kombinace:

- | | |
|-------------------|------------------|
| 4.1 ANMP-CA9656 a | 4.2 ANMP-MG7274, |
| AEMP-TM7279, | ANMP-TM7279 a |
| | AEMP-TM7279. |

Komplex 5 obsahuje frakce ANMP a ASMP. Ve výhodném provedení obsahuje tento komplex kombinaci ANMP-MG, ANMP-TM a ASMP-CA. Ve výhodných provedeních se koncentrace jednotlivých frakcí ANMP pohybuje v rozmezí 0,1 až 5 % objemových a kon-



centrace jednotlivých frakcí ASMP je v rozmezí 0,1 až 50 mg/ml. Vysoce výhodná je kombinace ANMP-MG7274, ANMP-TM7279 a ASMP-CA9656.

Další výhodné antigenní komplexy podle vynálezu obsahují například ASMP a AEMP nebo ASMP, AEMP a ANMP v koncentraci 0,1 až 50 mg/ml v případě ASMP a AEMP a 0,1 až 5 % objemových v případě ANMP.

Antigenní prostředky podle vynálezu je možno podávat spolu s vhodným fyziologicky přijatelným nosičem, který nevyvolává nežádoucí vedlejší účinky a obsahuje pufrы, roztoky nebo pomocné látky, například roztoky solí, laktátový roztok nebo Ringerův roztok. Z výhodných nosičů je například možno uvést následující nosiče: nosič A: vodný roztok s koncentrací 0,85 % hmotnostních chloridu sodného, nosič B: vodný roztok, obsahující 5 % hmotnostních glukosy, 0,3 % hmotnostní extraktu z masa "lab-lemco" (Oxoid), a 0,1 % hmotnostních extraktu z kvasnic (Oxoid), nosič C: živné prostředí RPMI 1640 (Serva, číslo v katalogu 12 702).

Antigenní prostředky podle vynálezu je možno podávat jako takové nebo ve formě injekčních roztoků, krémů, sprejů, aerosolů, tablet a v dalších aplikačních formách, které jsou všeobecně známé. Mimoto je možno antigenní prostředky podle vynálezu zpracovat na vysoce účinné vakcíny.

Antigenní prostředky podle vynálezu mají schopnost stimulovat proliferaci buněk imunitního systému a mohou tedy modulovat reakci imunitního systému ve formě imunitní odpovědi. Antigenní prostředky podle vynálezu dále mohou způsobit inhibici proliferace lidských keratinocytů.

Antigenní prostředky podle vynálezu je tedy možno použít k vyvolání vysokého stupně odolnosti proti alergickým



reakcím, zvláště epitheliálních tkání a specificky pokožky. Prostředky je možno použít k prevenci a léčení alergií, přičemž při testech na laboratorních zvířatech tyto látky nevyvolávají in vivo žádné nežádoucí vedlejší účinky, a to ani na malých zvířatech, jako morčatech a bílých myších, ani například koní, zkoušky byly provedeny na křížencích i na islandských koních.

Je například možno účinně léčit akutní alergické dermatitidy a poškození pokožky bez vedlejších účinků tak, že se antigenní prostředky podle vynálezu užijí například k vakcinaci. Po nitrosvalové injekci nebo injekcích antigenních prostředků podle vynálezu postupně vymizí příznaky alergického zánětu pokožky, svědění a citlivost pokožky u jednotlivců, postižených alergickou dermatitidou. Úplného vyléčení všech alergických příznaků bylo dosaženo 2 až 8 týdnů po poslední injekci a bylo tako dosaženo inhibice citlivosti pokožky na alergen, který onemocnění vyvolal. Mimoto v době 1 až 6 týdnů po poslední injekci přestalo i svědění.

Ve výhodném provedení je možno antigenní prostředky podle vynálezu využít k prevenci a léčení tak zvaného letního ekzému u koní, zvláště islandských koní. Po podání 1 až 3 nitrosvalových nebo intradermálních injekcí antigenních prostředků podle vynálezu, je možno uvedené onemocnění u koní vyléčit, zvláště výhodné jsou k tomuto účelu komplexy 1 a 1.1.

Podle dalšího výhodného provedení je možno antigenní prostředky podle vynálezu použít k prevenci a vyléčení alopecie u savců. Po podání 1 až 3 nitrosvalových nebo intradermálních injekcí antigenního prostředku podle vynálezu je možno vyléčit savce, u nichž došlo k alopecii nebo je možno je proti alopecii chránit, výhodné jsou komplexy 1 nebo 1.1.



Podle dalšího výhodného provedení vynálezu je možno použít antigenní prostředky podle vynálezu ke zlepšení stavu vlasů nebo ke zlepšení kvality srsti a výměně srsti u některých savců. Po 1 až 3 nitrosvalových nebo intradermálních injekcích je možno podstatně zlepšit stav srsti u některých živočichů a u těch zvířat, u nichž došlo k neúplné výměně srsti, je možno vyvolat ukončení výměny srsti v souvislosti s ročním obdobím. Výhodné jsou k tomuto účelu zejména komplexy 1 nebo 1.1.

Podle dalšího výhodného provedení vynálezu je antigenní prostředky podle vynálezu možno využít k léčení a prevenci výskytu ekzémů. Po podání 1 až 3 nitrosvalových nebo intradermálních injekcí nebo po místním podávání antigenních prostředků podle vynálezu je možno vyléčit savce s ekzematickým onemocněním včetně člověka nebo je možno je proti vzniku ekzému chránit, k tomuto účelu jsou vhodné zejména frakce ASMP-MG, ASMP-CA a ASMP-TM a z nich zejména frakce ASMP-MG7274, ASMP-CA9656 a ASMP-TM7279 nebo také svrchu uvedené komplexy 1 a 1.1.

Podle dalšího výhodného provedení poskytují antigenní prostředky podle vynálezu ochranu proti vzniku neurodermitidy nebo je možno tyto prostředky užít k léčení této choroby. Po místním podání antigenních prostředků podle vynálezu je možno vyléčit tuto chorobu u savců včetně člověka nebo je možno savce včetně člověka proti vzniku této choroby chránit, k tomuto účelu jsou vhodné zejména frakce ASMP-MG, ASMP-CA a ASMP-TM a z nich frakce ASMP-MG7274, ASMP-CA9656 a ASMP-TM7279 nebo komplexy 1 a 1.1.

Antigenní prostředky podle vynálezu je možno použít k léčení různých chorob, tak jak byly popsány například v publikaci Klinische Immunologie, Peter H. H., (ed.). 1991, Urban a Schwarzenberg, Mnichov, SRN, například:



1. Alergická onemocnění dýchacích cest

1.1 Alergická rýma a zánět spojivek

1.1.1 Sezonní rhino-conjunctivitis

1.1.2 Celoroční rýma

1.2 Průduškové asthma

1.3 Status asthmaticus

1.4 Asthma u dětí

1.4.1 Obstruktivní plicní onemocnění po infekční bronchiolitidě

1.4.2 Mírné episodické nebo mírné celoroční průduškové asthma

1.4.3 Silné celoroční průduškové asthma

2. Alergická bronchopulmonární aspergilosa

3. Potravinové alergie

3.1 Potravinové alergie, zprostředkované IgE

3.1.1 Potravinová alergie, zprostředkovaná IgE u novorozenců

3.1.2 Potravinová alergie, zprostředkovaná IgE u dorostu a u dospělých

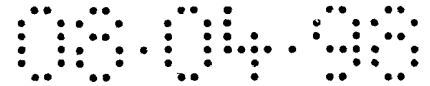
3.2. Potravinové alergie, zprostředkované IgG a T-buňkami

3.3 Nesnášenlivost kravského mléka

3.4 Heinerův syndrom

3.5 Eosinofilní gastroenteropathie

3.6 Coeliakální onemocnění



4. Alergie na kousnutí/bodnutí hmyzem

5. Všechny formy kopřivky

5.1 Kontaktní kopřivka

5.2 Kopřivka, vyskytující se současně s alergickou reakcí

5.3 Kopřivka, vyskytující se současně s nesnášenlivostí různých látek a inhibitorů syntézy prostaglandinu, pseudoalergie

5.4 Kopřivka po fyzikálních podnětech

5.4.1 Dermografie (urticaria factitia)

5.4.2 Cholinergní a adrenergní kopřivka

5.4.3 Kopřivka, vyvolaná chladem

5.4.4 Kopřivka, vyvolaná působením světla

5.4.5 Kopřivka, vyvolaná tlakem

5.4.6 Jiné vzácné formy kopřivky po fyzikálních podnětech

5.5 Kopřivková vasculitis

5.6 Mastocytosis a urticaria pigmentosa

5.7 Kopřivka spolu s infekčním onemocněním

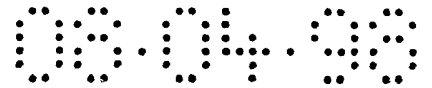
5.8 Kopřivka společně s immunothyroiditidou

5.9 Kopřivka s amyloidosou

6. Angioedem

6.1 Vrozený angioneurotický edem (HANE)

6.2 Získaný angioneurotický edem



7. Atopická dermatitis, atopický ekzém

8. Alergie na léčiva

V následující tabulce budou uvedeny některé vlastnosti pathogenních kmenů kvasinek v kultuře.

T a b u l k a 1

Vlastnosti *Candida albicans* DSM č. 9656

Vlastnosti kmene	DSM č. 9656	Epidemický kmen 008
Popis kultury	10-denní kolonie na Sabouraudově agaru je smetanově hladká, pastovitá, lesklá, zvrásněná, s centrální depresí, okraj pravidelný, průměr 18 až 22 mm	10-denní kolonie na Sabouraudově agaru je smetanově hladká, pastovitá, lesklá, se zvrásněnými segmenty, okraj nepravidelný, průměr 15 až 18 mm
Morfologické vlastnosti	sferické až oválné blastospory 3,5 až 5x5 až 8,um, pseudohyfy, šířka 5 až 8,um, chlamydo-spory na rýžovém agaru, průměr 13 až 16,um	sferické až oválné blastospory, 3,5 až 5x5 až 8,um, pseudohyfy, šířka 5 až 8,um, chlamydo-spory na rýžovém agaru, průměr 13 až 16,um
Pathogenní vlastnosti	30 dnů po i.p.injekci 10 až 100 milionů buněk bílým myším mělo 80 % zvířat břišní granulomy, bez uhynutí	30 dnů po i.p. injekci 10 až 100 milionů buněk bílým myším mělo 80 % zvířat břišní granulomy, 40 % uhynutí



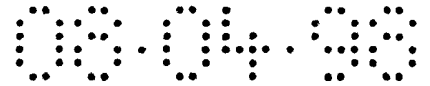
Podstatu vynálezu tvoří také kmen *Candida albicans* DSM č. 9656, který byl získán přímou selekcí na bazi stabilizace vlastností v kultuře a morfologických vlastností a zeslabením epidemického kmene č. 008, izolovaného u člověka v roce 1990.

Kmen *Candida albicans* DSM č. 9656 se liší od epidemického kmene také svojí stabilitou a morfologickými vlastnostmi, které si uchovává po dlouhém pasážování živným prostředím a také nízkou virulencí. Z tohoto kmene je možno připravit způsobem podle vynálezu vysoce účinné a zcela bezpečné antigenní prostředky.

Odborníkům bude zřejmé, že způsob podle vynálezu je snadno proveditelný za dosažení svrchu uvedených výsledků. Uvedená výhodná provedení, jednotlivé postupy a použité materiály jsou uvedeny pouze jako příklad, nejsou však určeny pro omezení rozsahu vynálezu.

Praktické provedení způsobu podle vynálezu bude osvětleno následujícími příklady, které rovněž mají sloužit pouze k ilustraci, nikoliv však k omezení způsobu podle vynálezu na uvedená provedení.

Ve všech uvedených příkladech bylo odstředění prováděno 30 až 50 minut při 3000 až 3500 g. Živná prostředí byla získávána od firem Oxoid (Unipath GmbH, Am Lippeglacis 6-8, 46483 Wesel, SRN), nebo Serva (Serva Feinbiochemica GmbH und Co. KG, Carl-Benz-Str. 7, 69115 Heidelberg, SRN). Není-li uvedeno jinak, byly houby pěstovány tak, jak je popsáno v katalogu firmy Oxoid, "5. aktualisierte deutsche Ausgabe" nebo v EP 564 620. Kmeny hub, použité pro výrobu antigenních prostředků podle vynálezu byly získány selekcí nebo zeslabením kmenů hub, jak bylo popsáno v publikaci N. V. Mazkevitch,



1981, "Spontannaja ismentchivost i kariologia nesovershennich gribov", vydáno Isdatelstvo Nauka, Moskva a Ivanova L. G., 1992, "Sistematika, morphologitvheskaja charakteristika, biologitcheskii svojstva vosbuditelej dermatophitosov, obshih dlja givotnich i tcheloveka", Moskva, knihovna Moskevské university. Základní techniky pěstování buněčných kultur savců je možno nalézt v souhrnné publikaci Doyle, Griffiths a Newell, Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures, Hohn Wiley and Sons, 1995. Pro testy s keratinocyty byly použity buňky HaCaT podle publikací Boukamp a další, 1988, J. Cell. Biol., 106, str. 761 až 771, a Ryle a další, 1989, Differentiation, 40, str. 42 až 54. Stejně dobře je však možno užít také izolované keratinocyty nebo jiné buněčné linie keratinocytů. Koňské lymfocyty byly izolovány a pěstovány podle publikace Friemel H., "Immunologische Arbeitsmethoden", VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 1984 nebo Paul E., "Fundamental Immunology", Raven Press, New York, 1984. Radiologické zkoušky byly prováděny v podstatě podle publikace Boehncke a další, 1994, Scand. J. Immunol., 39, str. 327 až 332 a podle literárních údajů v této publikaci. Byly užity vodné roztoky hydroxidu sodného nebo draselného a kyseliny chlorovodíkové. Pokud není výslovně uvedeno jinak, rozumí se rozpustností rozpustnost ve vodném roztoku. Fyziologickými nosiči při provádění dále popsaných pokusů jsou například nosič A: vodný roztok s koncentrací 0,85 % hmotnostních chloridu sodného, nosič B: vodný roztok s obsahem 5 % hmotnostních glukosy, 0,3 % hmotnostní extraktu z masa "lab-lemco" (Oxoid) a 0,1 % hmotnostních extraktu z kvasnic (Oxoid), nosič C: živné prostředí RPMI 1640 (Serva).

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Rozpustný antigenní materiál, obsahující polysacharidy a/nebo glykopeptidy typu ASMP byl připraven z:

Trichophyton mentagrophytes, ASMP-TM, Microsporium gypseum, ASMP-MG nebo Candida albicans, ASMP-CA následujícím způsobem:

Houby byly pěstovány na agarových plotnách způsobem, popsaným v EP 564 620. Výsledná biomasa hub byla oddělena a použita pro výrobu následujících materiálů:

I. ASMP-TM

i) Biomasa Trichophyton mentagrophytes byla zpracována působením roztoku NaOH s koncentrací 4,5 % hmotnostních 1 hodinu při teplotě 140 °C, pak byla směs odstředěna 45 minut. K supernatantu byl přidán 4M roztok kyseliny octové až do dosažení konečného pH 3,5. Po 2 hodinách byla usazenina oddělena odstředěním a na jeden objem supernatantu byly přidány 3 objemy ethanolu. Usazenina ze dvou šarží srážení alkoholem byla odstředěna a sediment byl rozpuštěn v destilované vodě. Nakonec byly jednotlivé šarže, obsahující frakci ASMP lyofilizovány.

ii) Biomasa Trichophyton mentagrophytes byla zpracována působením roztoku KOH s koncentrací 0,2 % hmotnostní 1 hodinu při teplotě 140 °C a pak byla směs odstředěna. Supernatant byl zpracován působením 1M roztoku HCl 4 hodiny do konečného pH 3,5 při teplotě 4 až 10 °C. Pak byla usazenina oddělena odstředěním a na jeden objem supernatantu byly



přidány dva objemy ethanolu. Usazenina ze dvou šarží srážení alkoholem byla oddělena odstředěním a rozpuštěna v destilované vodě. Nakonec byly jednotlivé vzorky s obsahem frakce ASMP lyofilizovány.

II. ASMP-MG

i) Biomasa *Microsporium gypseum* byla zpracována působením roztoku NaOH s koncentrací 0,2 % hmotnostních při teplotě 140 °C po dobu 2 hodin a pak byla směs odstředěna. Usazenina byla znovu zpracována roztokem NaOH s koncentrací 0,2 % hmotnostní další 2 hodiny při teplotě 140 °C, pak byla směs odstředěna a postup byl ještě potřetí opakován. Konečný supernatant byl zpracován působením 8M roztoku kyseliny octové při konečném pH 3,5 celkem 3 hodiny při teplotě 18 až 20 °C. Usazenina byla oddělena odstředěním a na jeden objem supernatantu byly přidány tři objemy ethanolu. Usazenina, získaná srážením alkoholem byla odstředěna a pak rozpuštěna v destilované vodě. Nakonec byly jednotlivé šarže s obsahem frakce ASMP lyofilizovány.

ii) Biomasa *Microsporium gypseum* byla zpracovávána působením roztoku KOH s koncentrací 3 % hmotnostní při teplotě 75 °C celkem 6 hodin a pak byla směs odstředěna. Usazenina byla znovu zpracována působením roztoku NaOH s koncentrací 3 % hmotnostní dalších 6 hodin při teplotě 75 °C a pak byla směs znovu odstředěna. Výsledný supernatant byl pak zpracováván působením 0,5 M roztoku kyseliny chlorovodíkové při konečném pH 3,5 celkem 4 hodiny při teplotě 4 až 10 °C. Usazenina byla oddělena odstředěním a na jeden objem supernatantu byly přidány tři objemy methanolu. Usazenina, vzniklá po srážení alkoholem byla oddělena odstředěním a rozpuštěna v destilované vodě. Nakonec byly jednotlivé šarže s obsahem frakce ASMP lyofilizovány.

III. ASMP-CA:

i) Biomasa *Candida albicans* byla zpracovávána působením roztoku NaOH s koncentrací 3,0 % hmotnostních 6 hodin při teplotě 75 °C a pak byla směs odstředěna. Usazenina byla znovu zpracována působením NaOH s koncentrací 3,0 % hmotnostních dalších 6 hodin při teplotě 75 °C a pak byla směs znovu odstředěna. Výsledný supernatant byl zpracován přidáním 12M roztoku kyseliny octové do konečného pH 3,5, zpracování trvalo 2 hodiny při teplotě 4 až 10 °C. Usazenina byla oddělena odstředěním a pak byly na jeden objem supernatantu přidány dva objemy methanolu. Usazenina, vzniklá srážením alkoholem byla oddělena odstředěním a rozpuštěna v destilované vodě. Pak byly jednotlivé šarže s obsahem frakce ASMP lyofilizovány.

ii) Biomasa *Candida albicans* byla zpracována působením roztoku KOH s koncentrací 4,5 % hmotnostních celkem 3 hodiny při teplotě 35 °C a pak byla směs odstředěna. Usazenina byla zpracovávána působením roztoku NaOH s koncentrací 4,5 % hmotnostních 3 hodiny při teplotě 35 °C, pak byla směs odstředěna a celý postup byl opakován potřetí. Výsledný supernatant pak byl zpracováván přidáním 0,25 M roztoku HCl 4 hodiny při pH 3,5 a při teplotě 18 až 20 °C. Usazenina byla oddělena odstředěním a pak byly na jeden objem supernatantu přidány dva objemy ethanolu. Usazenina, která vznikla srážením alkoholem byla oddělena odstředěním a pak byla rozpuštěna v destilované vodě. Nakonec byly jednotlivé šarže s obsahem frakcí ASMP lyofilizovány.

Příklad 2

Antigenní nerozpustný materiál, obsahující polysacharidy a/nebo glykopeptidy, ANMP byl připraven z:

Trichophyton mentagrophytes, ANMP-TM, Microsporum gypseum, ANMP-MG nebo Candida albicans, ANMP-CA při použití následujícího postupu:

Houby byly pěstovány na agarových plotnách způsobem, popsaným v EP 564 620. Biomasa hub byla oddělena a použita pro výrobu následujících materiálů:

I. ANMP-TM:

i) Trichophyton mentagrophytes bylo zpracovááno působením roztoku NaOH s koncentrací 0,2 % hmotnostních 24 hodin při teplotě 35 °C a pak byla směs odstředěna. Usazenina byla zpracovávána 0,3M roztokem kyseliny octové 3 hodiny při teplotě 60 °C a pak byla pětkrát promyta destilovanou vodou. Každý promývací stupeň byl následován odstředěním. Konečná usazenina byla znovu uvedena do suspenze ve vodném roztoku s koncentrací 0,85 % hmotnostních NaCl (nosič A) do konečné koncentrace ANMP-TM 0,5 % objemových. Prostředek s obsahem ANMP-TM byl pak uložen ve formě suspenze při teplotě v rozmezí 2 až 10 °C.

ii) Biomasa Trichophyton mentagrophytes byla zpracována působením roztoku KOH s koncentrací 0,2 % hmotnostních 24 hodin při teplotě 35 °C a pak byla směs odstředěna. Usazenina byla zpracována působením 0,1 M roztoku HCl celkem 30 minut při 70 °C a pak byla pětkrát promyta destilovanou vodou. Každý promývací stupeň byl následován odstředěním. Konečná usazenina byla znovu uvedena do suspenze v živném prostředí RPMI 1640 (nosič C) do konečné koncentrace ANMP-TM 1,5 % objemových. Tento prostředek s obsahem ANMP-TM byl pak uložen ve formě suspenze při teplotě 2 až 10 °C.



II. ANMP-MG:

i) Biomasa *Microsporium gypseum* byla zpracovávána působením roztoku NaOH s koncentrací 3 % hmotnostní 6 hodin při teplotě 75 °C a pak byla směs odstředěna. Sediment se znovu zpracovává 3% roztokem NaOH dalších 6 hodin při teplotě 75 °C a pak se směs znovu odstředí. Na výslednou usazeninu se působí 0,7M roztokem kyseliny octové 4 hodiny při teplotě 60 °C a pak se směs 5x promyje destilovanou vodou. Po každém promytí se směs odstředí. Konečná usazenina se znovu uvede do suspenze ve vodném roztoku, obsahujícím 5 % hmotnostních glukosy, 0,1 % hmotnostních extraktu z kvasnic (Oxoid) a 0,3 % hmotnostních z extraktu z masa "lab lemco" (Oxoid) jako nosiče B až do konečné koncentrace 2,5 % objemových ANMP-MG. Antigenní prostředek ANMP-MG se pak skladuje ve formě suspenze při teplotě 2 až 10 °C.

ii) Biomasa *Microsporium gypseum* byla zpracovávána roztokem KOH s koncentrací 3 % hmotnostní 3 hodiny při teplotě 35 °C a pak byla směs odstředěna. Postup byl ještě dvakrát opakován. Výsledná usazenina byla zpracovávána působením 0,5 M kyseliny chlorovodíkové 30 minut při teplotě 80 °C a pak byla 5x promyta destilovanou vodou. Každý promývací stupeň byl následován odstředěním. Konečná usazenina byla znovu uvedena do suspenze v živném prostředí RPMI 1640 (nosič C) až do konečné koncentrace 2,0 % objemových ANMP-MG. Antigenní přípravek ANMP-MG pak byl skladován ve formě suspenze při teplotě v rozmezí 2 až 10 °C.

III. ANMP-CA:

i) Biomasa *Candida albicans* byla zpracovávána působením roztoku NaOH s koncentrací 4,5 % hmotnostních 2 hodiny při teplotě 140 °C a pak byla směs odstředěna. Usazenina byla znovu zpracovávána působením roztoku NaOH s koncentrací

4,5 % hmotnostních 2 hodiny při teplotě 140 °C a pak se směs znovu odstředí. Stejný postup se opakuje ještě potřetí. Výsledná usazenina se zpracovává působením 1M roztoku kyseliny octové 1 hodinu při teplotě 60 °C a pak se 5x promyje destilovanou vodou. Po každém promývacím stupni se směs odstředí. Výsledná usazenina se znovu uvede do suspenze ve vodném roztoku chloridu sodného s koncentrací 0,85 % hmotnostních (nosič A) do konečné koncentrace 1,5 % objemových ANMP-CA. Antigenní prostředek ANMP-CA byl pak skladován ve formě suspenze při teplotě 2 až 10 °C.

ii) Biomasa *Candida albicans* se zpracovává působením roztoku KOH s koncentrací 4,5 % hmotnostních 2 hodiny při teplotě 140 °C a pak se směs odstředí. Usazenina se znovu zpracovává působením 4,5% roztoku NaOH další 2 hodiny při teplotě 140 °C a výsledná usazenina se zpracovává působením 0,1 M roztoku kyseliny chlorovodíkové 30 minut při teplotě 100 °C a pak se směs 5x promyje destilovanou vodou. Po každém promývacím stupni se směs odstředí. Konečná usazenina se znovu uvede do suspenze v živném prostředí RPMI 1640 (nosič C) do konečné koncentrace 2,5 % objemových ANMP-CA. Získaný antigenní prostředek ANMP-CA se pak uloží ve formě suspenze při teplotě 2 až 10 °C.

Příklad 3

Antigenní exogenní materiál obsahující polysacharid a/nebo glykopeptidy, AEMP, byl připraven při použití kapalných kultur:

Trichophyton mentagrophytes AEMP-TM, *Microsporum gypseum* AEMP-MG nebo *Candida albicans* AEMP-CA.

Kapalné kultury byly pěstovány za podmínek, popsaných v EP 564 620. Jednotlivé prostředky typu AEMP byly získány následujícími postupy:

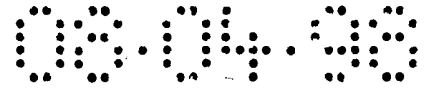
I. AEMP-TM: *Trichophyton mentagrophytes* se inkubuje 240 hodin při teplotě 26 °C v 1000 ml destilované vody. Pak se kultura, obsahující přibližně $1,2 \times 10^8$ buněk/ml odstředí. Supernatant se lyofilizuje a rozpustí ve 100 ml destilované vody, přidají se tři objemy methanolu a vzniklá sraženina se rozpustí ve vodném roztoku. Supernatant se lyofilizuje, čímž se získá AEMP-TM.

II. AEMP-MG: *Microsporum gypseum* se pěstuje 50 hodin při teplotě 28 °C ve 200 ml nosiče C, kterým je prostředí RPMI 1640 (Serva). Kultura, která obsahuje přibližně 3×10^7 buněk/ml se pak odstředí. Supernatant se lyofilizuje a pak se rozpustí ve 20 ml destilované vody, přidají se dva objemy methanolu a vzniklá sraženina se rozpustí ve vodném roztoku. Supernatant se lyofilizuje, čímž se získá antigenní prostředek AEMP-MG.

III. AEMP-CA: *Candida albicans* se pěstuje 30 hodin v 800 ml nosiče B, který obsahuje 1 % hmotnostní extraktu z masa lab-lemco (Oxoid), 0,1 % hmotnostní extraktu z kvasnic (Oxoid) a 5 % hmotnostních dextrosy, teplota v průběhu pěstování je 37 °C. Pak se kultura, obsahující přibližně 10^8 buněk/ml odstředí. Supernatant se lyofilizuje, rozpustí se v malém množství destilované vody, přidají se dva objemy methanolu a vzniklá sraženina se rozpustí ve vodném roztoku. Supernatant se lyofilizuje, čímž se získá AEMP-CA.

Příklad 4

V tomto příkladu byl sledován vliv různých antigenních prostředků na růst keratinocytů v buněčné kultuře (kultury buněk HaCaT).



I. Při těchto pokusech byly použity v různých koncentracích antigenní frakce ASMP-TM, ANMP-TM a AEMP-TM, připravené z *Trichophyton mentagrophytes* DSM č. 7279, ASMP-MG, ANMP-MG a AEMP-MG, připravené z *Microsporum gypseum* DSM č. 7274 a ASMP-CA, ANMP-CA a AEMP-CA, připravené z *Candida albicans* DSM č. 9656. Frakce ANMP byly připraveny způsobem podle příkladu 2, byly lyofilizovány a znovu uvedeny do suspenze v PBS; jde o fyziologický roztok chloridu sodného s fosfátovým pufrům v koncentraci 6,7 mM při fyziologickém pH přibližně 7,2 (Serva, číslo v katalogu 17-516).

Pro pěstování byly užity plotny pro tkáňové kultury s dvanácti vyhloubeními (Falcon) s plochým dnem a povrchovou plochou 9,6 cm². Do každého vyhloubení bylo uloženo 0,15 ml suspenze keratinocytů, buněk HaCaT s obsahem přibližně 1 milion buněk/ml živného prostředí, kterým bylo prostředí RPMI 1640, doplněné 10 % hmotnostními fetálního telecího séra, dále byly do vyhloubení uloženy 2 ml živného prostředí a 0,02 až 0,1 ml antigenní frakce, rozpuštěné v PBS. Do kontrolních vyhloubení nebyl přidán žádný antigenní materiál. Pěstování bylo uskutečněno v inkubátoru v přítomnosti 5 % objemových oxidu uhličitého při teplotě 37 °C po dobu přibližně 48 hodin až do vytvoření souvislé jednoduché vrstvy buněk v kontrolních vyhloubeních.

Inhibice růstu buněk byla určována tak, že byly srovnávány plochy, překryté buňkami na plotnách s obsahem antigenních frakcí a v kontrolních vyhloubeních, přičemž plocha, překrytá kontrolními buňkami bez antigenních frakcí byla považována za 100 %. Získané výsledky jsou dále shrnuty v tabulkách 2 a 3.

Inhibice buněčného růstu byla pozorována pro frakci ASMP-MG v koncentraci 0,1 mg/ml, pro frakci ASMP-TM v koncentraci 0,3 mg/ml a pro frakci ASMP-CA v koncentraci 1 mg/ml.



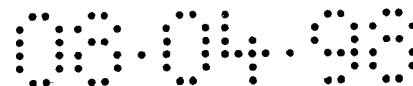
Pro frakci ANMP (MG, TM i CA) bylo možno pozorovat inhibici růstu buněk pro koncentraci 1 mg/ml. Pro AEMP-MG bylo možno pozorovat inhibici buněčného růstu v koncentraci 0,3 mg/ml a pro frakci AEMP-TM a AEMP-CA byla pozorována inhibice růstu buněk pro koncentraci 1 mg/ml.

Příklad 5

Byl stanoven vliv různých antigenních frakcí na proliferaci koňských lymfocytů.

K tomuto pokusu byly užity antigenní frakce ASMP a AEMP kmenů *T. mentagrophytes* DSM č. 7279, *M. gypseum* DSM č. 7274 a *C. albicans* DSM č. 9656. Byla připravena suspenze, obsahující lymfocyty z islandských koní v množství 40 000/ml v živném prostředí. Bylo užito živné prostředí RPMI 1640, doplněné 10 % hmotnostními fetálního telecího séra. Lymfocyty byly pěstovány při použití ploten pro tkáňové kultury s 96 vyhloubeními, jejichž dno mělo zaoblený tvar U (Falcon č. 3077). Do každého vyhloubení bylo uloženo 200 mikrolitrů buněčné suspenze a 20 mikrolitrů antigenní frakce, rozpuštěné v PBS. Do kontrolních vyhloubení nebyl přidán antigenní materiál.

Plotny s tkáňovými kulturami byly inkubovány při teplotě 37 °C v přítomnosti 5 % objemových oxidu uhličitého 72 hodin. Pak bylo živné prostředí vyměněno a do každého vyhloubení byl přidán 1 mikrolitr roztoku s obsahem H^3 -thymidinu. Pak byly buňky dále pěstovány ještě 12 hodin, načež byly kultury promyty při použití PBS. Proliferace buněk byla stanovena radiologickými zkouškami způsobem podle publikace Boehncke a další, 1994, *Scand. J. Immunol.*, 39, str. 327 až 332. Určování proliferace buněk bylo prováděno srovnáním zkušebních kultur s kontrolními kulturami, k nimž nebyl přidán antigenní materiál. Hodnoty pro kontrolní kultury byly považovány za



100 %. Výsledky těchto testů jsou shrnuty v tabulce 4. Jednotlivé antigenní frakce měly na proliferaci lymfocytů inhibiční nebo stimulační účinek.

Příklad 6

V tomto příkladu jsou popsány typické komplexní prostředky. Komplexy 1 až 5, popsané v tomto příkladu byly připraveny z *Trichophyton mentagophytes* DSM č. 7279, *Microsporum gypseum* DSM č. 7274 nebo *Candida albicans* DSM č. 9656.

I. Komplex 1 obsahuje ASMP-TM, ASMP-MG a ASMP-CA, příklady vhodných nosičů a koncentrace jednotlivých frakcí jsou uvedeny v následující tabulce:

	Koncentrace (mg/ml)		
	A	B	C
ASMP-TM7279	5	10	30
ASMP-MG7274	5	10	30
ASMP-CA9656	5	10	30
	v nosiči	v nosiči	v nosiči
	A nebo B	A nebo B	A nebo B
	nebo C	nebo C	nebo C

Komplex 1.1 obsahuje ASMP-MG a ASMP-CA ve vhodném nosiči, příklady nosičů a koncentrace jednotlivých frakcí jsou uvedeny v následující tabulce:

	Koncentrace (mg/ml)		
	A	B	C
ASMP-MG7274	5	10	30
ASMP-CA9656	5	10	30
	v nosiči	v nosiči	v nosiči
	A nebo B	A nebo B	A nebo B
	nebo C	nebo C	nebo C

II. Komplex 2 obsahuje ANMP-TM, ANMP-MG a ANMP-CA ve vhodném nosiči, příklady nosičů a koncentrace jednotlivých frakcí jsou shrnuty v následující tabulce:

	Koncentrace (% objemová)			
	A	B	C	D
ANMP-TM7279	0,5	1,0	1,5	2,5
ANMP-MG7274	0,5	1,0	1,5	2,5
ANMP-CA9656	0,5	1,0	1,5	2,5
	suspenze	suspenze	suspenze	suspenze
	v nosiči	v nosiči	v nosiči	v nosiči
	A nebo B	A nebo B	A nebo B	a nebo B
	nebo C	nebo C	nebo C	nebo C

III. Komplex III obsahuje frakce AEMP-TM, AEMP-MG a AEMP-CA ve vhodném nosiči, příklady koncentrací frakcí a nosičů jsou uvedeny v následující tabulce:

	Koncentrace (mg/ml)		
	A	B	C
AEMP-TM7279	5	10	30
AEMP-MG7274	5	10	30
AEMP-CA9656	5	10	30
	v nosiči A nebo B nebo C	v nosiči A nebo B nebo C	v nosiči A nebo B nebo C

IV. Komplex 4 obsahuje frakce ANMP a AEMP ve vhodném nosiči, příklady složení těchto komplexů a koncentrace jednotlivých frakcí budou dále uvedeny.

i) Komplex 4.1

ANMP-CA9656 2,5 % objemových

AEMP-TM7279 7,1 mg/ml

v nosiči A nebo B nebo C.

ii) Komplex 4.2

	Koncentrace	
	A	B
ANMP-MG7274	2,5 % obj.	3,0 % obj.
ANMP-TM7279	2,5 % obj.	3,0 % obj.
AEMP-TM7279	10,5 mg/ml v nosiči A nebo B nebo C	18,5 mg/ml v nosiči A nebo B nebo C

V. Komplex 5 obsahuje ASMP a ANMP ve vhodném nosiči, příklady složení tohoto komplexu jsou uvedeny v následující tabulce:

	Koncentrace	
	A	B
ANMP-MG7274	1,75 % obj.	3 % obj.
ANMP-TM7279	1,75 % obj.	3 % obj.
ASMP-CA9656	15,6 mg/ml v nosiči A nebo B nebo C	15,6 mg/ml v nosiči A nebo B nebo C

Příklad 7

Bezpečnost podávání různých antigenních prostředků byla zkoumána pokusy s očkováním na různých živočišných modelech, šlo o bílé myši, morčata a koně.

Antigenní frakce byly připraveny způsobem podle příkladu 1 až 3 a 6 z *Trichophyton mentagrophytes* DSM č. 7279, *Microsporium gypseum* DSM č. 7274 nebo *Candida albicans* DSM č. 9656.

U všech očkovaných zvířat bylo 1 až 5 dnů po očkování sledováno každý den několik následujících parametrů, kterými byl vyhodnocen celkový stav očkovaných zvířat.

1. Celkový stav

- chuť k jídlu
- ovlivnění hybnosti.

2. Místní reakce

- otok a zánět v místě injekce,
- změna teploty v místě injekce
- bolestivost v místě injekce
- nezbytnost léčení místa injekce.

I. Antigenní prostředky byly podávány injekčně jednou nebo dvakrát v intervalu 10 dnů, a to intraabdominálně bílým myším a intraabdominálně a podkožně morčatům. Antigenní prostředky, jejich koncentrace a zjištěné výsledky jsou shrnuty dále v tabulkách 5 a 6 A a B. Podkožní nebo intraabdominální injekce houbových antigenů ve formě jednotlivých frakcí nebo komplexních prostředků většinou neměly žádný nežádoucí vliv na celkový stav zvířat a nebyla pozorována ani místní reakce v místě injekce.

II. Komplexní prostředky s antigeny hub, popsané v příkladu 6, to znamená komplexy 4.1, 4.2 a 5 byly aplikovány injekčně těmto koni na různá místa, šlo o levou a pravou stranu šíje a jeden z hrudních svalů. K vakcinaci byla užita tři zvířata: i) březí klisna, ii) hříbě ve stáří 7 až 8 měsíců, iii) hřebec ve stáří 6 let. Antigenní prostředky, jejich koncentrace a získané výsledky jsou shrnuty v tabulce 7.

Nitrosvalová injekce antigenů hub ve formě komplexního prostředku neovlivnila celkový stav koní a místní reakce v místě injekce rovněž nebyla pozorována. Tyto zkoušky tedy prokazují velmi dobrou bezpečnost podávání antigenních prostředků podle vynálezu.

Příklad 8

Vliv různých antigenních prostředků na stav pokožky a srsti byl sledován u bílých myší.

Antigenní prostředky byly připraveny způsobem podle příkladů 1 až 3 a 6 z *Trichophyton mentagrophytes* DSM č. 7279, *Microsporum gypseum* DSM č. 7274 nebo *Candida albicans* DSM č. 9656.

Antigenní prostředky byly vstříkovány dvakrát v intervalu 10 dnů intraabdominálně bílým myším. Pak byl 5 dnů pozorován stav pokožky a srsti. Antigenní prostředky, jejich koncentrace a získané výsledky jsou shrnuty v tabulce 8. Z tabulky je zřejmé, že injekce antigenních prostředků zlepšily stav pokožky i srsti bílých myší ve srovnání s kontrolními zvířaty, postiženými dermatitidou.

Příklad 9

Účinnost tří různých antigenních prostředků byla sledována tak, že prostředky byly použity k očkování islandských koní, trpících letním ekzémem. Kontrolním zvířatům bylo podáváno placebo.

Antigenní prostředky byly připraveny způsobem podle příkladů 1 až 3 a 6 z *T. mentagrophytes* DSM č. 7279, *M. gypseum* DSM č. 7274 a *C. albicans* DSM č. 9656. V průběhu pokusu byl třikrát vstříknut každý antigenní prostředek nitrosvalově v objemu 1 ml. Interval mezi injekcemi byl 5 dnů. Injekce byly podávány střídavě na pravou a levou stranu do hrudního svalu. Antigenní prostředky, jejich koncentrace a získané výsledky jsou dále shrnuty v tabulkách 9 a 10.

Po podávání antigenních prostředků s obsahem ASMP-MG 7274, ASMP-TM7279 a ASMP-CA 9656 došlo u všech tří očkovaných koní k úplnému vyléčení do 4 týdnů po třetí injekci. U koní z kontrolní skupiny, jimž byl vstříknut nosič A bez antigenu nebylo možno pozorovat žádné známky vyléčení.

Příklad 10

Bezpečnost podávání tří různých antigenních prostředků byla sledována očkováním islandských koní, trpících letním ekzémem, kontrolním zvířatům bylo podáváno placebo.

Antigenní prostředek byl připraven způsobem podle příkladů 1 až 3 a 6 z *T. mentagrophytes* DSM č. 7279, *M. gypseum* DSM č. 7274 a *C. albicans* DSM č. 9656. Očkování probíhalo tak, že byl třikrát nitrosvalově vstříknut 1 ml nosiče A s obsahem příslušného antigenního prostředku. Interval mezi injekcemi byl 5 dnů. Injekce byly podávány střídavě na pravou a levou stranu do hrudních svalů. Zvířata byla pozorována ke zjištění případných vedlejších účinků 3 dny po každé injekci. Použité antigenní prostředky, jejich koncentrace a dosažené výsledky jsou shrnuty v tabulce 11. Nebylo možno pozorovat žádné vedlejší účinky, jako zvýšenou teplotu nebo ztrátu chuti k jídlu. Pouze v případě jednoho antigenního prostředku došlo v místě injekce v místě otoku. Tento mírný vedlejší účinek byl pozorován pouze u jednoho koně. U žádného z koní nebyla pozorována bolestivost v místě podání.

Příklad 11

Antialergická účinnost jednotlivých frakcí ASMP-TM7279, ASMP-MG7274 a ASMP-CA9656 a také účinnost komplexu 1, obsahujícího ASMP-TM7279, ASMP-MG7274 a ASMP-CA9656 byla sledována na laboratorních zvířatech jako na živočišném modelu.



Jednotlivé frakce byly připraveny způsobem podle příkladu 1. Komplex 1 byl připraven způsobem, popsáním v příkladech 1 a 6.

Myši CF-1 byly sensitizovány podle postupu, uvedeného pro zkoušku na otok myšího ucha v publikaci Gad SC., Dimm BK, Dobbs DW, Reilly C, Walsh RD, Development and Validation of an Alternative Dermal Sensitization Test: The Mouse Ear Swelling Test, MEST, Toxicology and Applied Pharmacology, 84, 93 až 114, 1986. Jde o dobře známý, uznávaný a také OECD přijímaný test pro zjištění účinnosti alergických látek. Aby bylo možno prokázat účinnost komplexu nebo jeho jednotlivých frakcí proti alergickým reakcím u laboratorních zvířat, mělo by dojít k prevenci otoku uší, k němuž by jinak došlo působením alergenu. Současně byla provedena slepá zkouška při použití dvou odlišných alergenů.

Zkouška MEST byla prováděna na myších CF-1, které jsou na působení alergenů nejcitlivější. Byly užity myši CF-1 ve stáří 6 až 10 týdnů, jimž bylo po vyholení pokožky břicha injekčně podáno 0,05 ml Freundova pomocného prostředku a pak bylo nanášeno 100 mikrolitrů 1-chlor-2,4-dinitrochlorbenzenu DNCB jako alergenu v jednom pokusu, v dalším pokusu byl místně nanášen alergen z roztoče v období ve dni 0 až 4. Po 7 dnech bylo 20 mikrolitrů alergenu podáno místně do jednoho ucha, na druhé ucho byl nanášen roztok, v němž byly alergeny rozpuštěny. Po 24 a 48 hodinách byla měřena tloušťka ucha. Tentýž postup byl proveden u kontrolní skupiny, jíž byl místo komplexu účinných látek nebo jeho frakcí podán pouze roztok jako placebo.

Bylo prokázáno, že po podání jednotlivých frakcí ASMP-TM7279, ASMP-MG7274 a ASMP-CA9656 i po podání komplexu

1, obsahujícího ASMP-TM7279, ASMP-MG7274 a ASMP-CA9656 dochází v 90 % ke snížení otoku ucha po sensitizaci alergenem z roztočů a v 87,5 % ke snížení otoku ucha po sensitizaci DNCB 48 hodin po opětovém nanesení alergenu ve srovnání s kontrolními skupinami.

Příklad 12

Účinnost komplexního prostředku, obsahujícího antigenní frakce ASMP-MG7274 a ASMP-CA9656, připravené podle příkladu 1, byla prokázána očkováním islandských koní, trpících letním ekzémem.

Po podání intradermálních injekcí s objemem 0,4 ml a s obsahem nosiče A, obsahujícího 0,2 mg MG a 0,2 mg CA 3x po sobě s intervalem 5 dnů mezi jednotlivými injekcemi došlo k vyléčení očkovaných koní 3 týdny po poslední injekci, jak je možno prokázat podstatným snížením klinických příznaků. Při tom nebyly pozorovány žádné vedlejší účinky.

Příklad 13

Účinnost antigenního prostředku, připraveného způsobem podle příkladu 1 (ASMP) z *Microsporium gybseum* DSM č. 7274 byla prokázána tak, že prostředek byl použit k očkování muže ve stáří 41 let, trpícího ekzémem se zánětlivou reakcí, svěděním a erozemi pokožky mezi čtvrtým a pátým prstem u nohou.

Tomuto muži byl pouze jednou intradermálně vstříknut objem 0,1 ml nosiče A s obsahem 0,4 mg ASMP-MG7274. Po 4 až 5 dnech po injekci bylo místo infekce vyléčeno.



Svědění vymizelo již 24 hodin po podání injekce. Nebyly pozorovány žádné závěžné vedlejší účinky.

Příklad 14

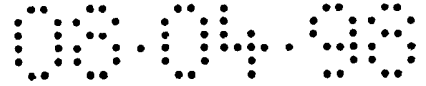
Účinnost antigenního prostředku, připraveného způsobem podle příkladu 1 (ASMP) z *Candida albicans* DSM č. 9656 při léčení neurodermitidy byla prokázána v průběhu následující zkoušky.

Prostředek ASMP-CA9656 byl přidán do krému na ruce, "Kamill Hand und Nagelcreme" (Procter und Gamble) do konečné koncentrace 60 mg ASMP-CA9656/ml krému. Prostředek byl nanášen místně na pokožku v blízkosti obou uší tříletého děvčátka, trpícího v tomto místě neurodermitidou s tvorbou žlutavých strupů. Krém byl nanášen místně pouze na porušenou oblast pokožky po dobu 30 dnů jednou denně. Po této době byl vzhled pokožky zcela normální. Nebyly pozorovány žádné vedlejší účinky.

Příklad 15

Byla prokazována účinnost antigenního prostředku, připraveného způsobem podle příkladu 1 (ASMP) z *Microsporum gypseum* DSM č. 7274 při léčení ekzému.

ASMP-MG7274 byl přidán do krému, byl užit krém "Kamil Hand und Nagelcreme" (Procter und Gamble) do konečné koncentrace 60 mg ASMP-CA9656/ml krému. Tento krém byl jednou denně pod obou 30 dní nanášen na prsteník pravé ruky 30 letého muže, trpícího ekzémem se zánětem, svěděním a erozí pokožky v této oblasti. Po uvedeném časovém období došlo k úplnému vyléčení. Svědění vymizelo již po několika dnech. Vedlejší účinky nebyly pozorovány.



Příklad 16

Účinnost antigenních prostředků, připravených způsobem podle příkladu 1 (ASMP) z *Microsporium gypseum* DSM č. 7274, *Trichophyton mentagrophytes* DSM č. 7279 a *Candida albicans* DSM č. 9656 byla zkoumána vakcinací koně ve stáří 5 let, u nějž nedošlo až do června k výměně zimní srsti. Byly užity tři injekce nitrosvalově v intervalu 5 dnů, byl užit objem 1 ml nosiče A, obsahujícího 15 mg každého z antigenních prostředků ASMP-MG7274, ASMP-TM7279 a ASMP-CA9656, konečná koncentrace byla 45 mg ASMP/ml. V průběhu 15 dnů došlo k úplné výměně srsti, tak jak k ní v tomto období má dojít. Nebyly pozorovány žádné vedlejší účinky.

Příklad 17

Byla prokazována účinnost komplexního antigenního prostředku, připraveného způsobem podle příkladu 1 (ASMP) z *Microsporium gypseum* DSM č. 7274, *Trichophyton mentagrophytes* DSM č. 7279 a *Candida albicans* DSM č. 9656 při léčení alopecie.

K pokusu byli užiti dva koně ve stáří 7 let, trpící alopecií. Jeden z nich měl tři až pět a druhý sedm až deset ložisek alopecie na různých místech povrchu těla. Byla užita vakcína, obsahující 10 mg každého antigenního prostředku ASMP-MG7274, ASMP-TM7279 a ASMP-CA9656 v 1 ml nosiče A, konečná koncentrace prostředku byla 30 mg/ml. Tato vakcína byla podávána nitrosvalovou injekcí celkem třikrát, interval mezi jednotlivými injekcemi byl 5 dnů. Došlo k vymizení všech ložisek alopecie u obou koní do 10 dnů po posledním podání očkovací látky. V průběhu léčení nebyly pozorovány žádné vedlejší příznaky.



Příklad 18

Byla prokazována účinnost komplexního antigenního prostředku, připraveného způsobem podle příkladu 1 (ASMP) z *Microsporum gypseum* DSM č. 7274, *Trichophyton mentagrophytes* DSM č. 7279 a *Candida albicans* DSM č. 9656 při léčení alopecie u koní.

Kůň ve stáří 10 let trpěl alopecií na 10 až 12 různých místech na povrchu celého těla. K léčení byla použita vakcína, obsahující 15 mg každého antigenního prostředku ASMP-MG 7274, ASMP-TM7279 a ASMP-CA9656 v 1 ml nosiče A, konečná koncentrace prostředku byla 45 mg/ml. Vakcína byla podána nitrosvalově 3x, interval mezi jednotlivými injekcemi byl 5 dnů. Došlo k úplnému vymizení alopecie na celém povrchu těla do 15 dnů po podání poslední injekce. Nebyly pozorovány židné vedlejší účinky.

Příklad 19

Byla prokazována účinnost komplexního antigenního prostředku, připraveného způsobem podle příkladu 1 (ASMP) z *Microsporum gypseum* DSM č. 7274, *Trichophyton mentagrophytes* DSM č. 7279 a *Candida albicans* DSM č. 9656 při léčení alopecie u psů.

Fena ve stáří 3 roky trpěla alopecií na dvou až třech různých místech po celém těle. K léčení byla užita vakcína, která obsahovala 10 mg každého z antigenních prostředků ASMP-MG7274, ASMP-TM7279 a ASMP-CA9656 v 1 ml nosiče A, konečná koncentrace prostředku byla 30 mg/ml. Vakcína byla podána třikrát nitrosvalově, interval mezi jednotlivými injekcemi byl 5 dnů. K úplnému vymizení míst bez srsti došlo do 15 dnů po poslední injekci. Vedlejší účinky nebyly pozorovány.

Příklad 20

Byla prokazována účinnost antigenních prostředků, připravených způsobem podle příkladu 1 (ASMP) z *Microsporum gypseum* DSM č. 7274, *Trichophyton mentagrophytes* DSM č. 7279 a *Candida albicans* DSM č. 9656 při léčení alopecie u psa.

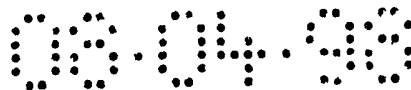
Prostředek byl použit u dvou psích samců ve stáží 5 a 8 let, trpících alopecií na dvou až čtyřech různých místech na povrchu těla. Vakcína obsahovala 15 mg každého antigenního prostředku ASMP-MG7274, ASMP-TM7279 a ASMP-CA9656 v 1 ml nosiče A, konečná koncentrace prostředku byla 45 mg/ml. Vakcína byla podána nitrosvalově celkem třikrát, intervaly mezi jednotlivými injekcemi byly 5 dnů. Do 30 dnů po posledním podání vakcíny došlo k úplnému vymizení míst bez srsti. Nebyly pozorovány žádné vedlejší účinky.

T a b u l k a 2

Vliv koncentrace různých antigenních frakcí na růst keratinocytů v buněčné kultuře (buňky HaCaF v % ve srovnání s kontrolami bez antigenní frakce (souvislá vrstva kontrolních buněk = 100 %)

antigenní frakce	Koncentrace antigenní frakce mg/ml													
	0.003	0.007	0.01	0.015	0.03	0.1	0.3	0.45	0.6	1.0	1.25	1.5	1.75	2
ASMP-MG7274	100	100	100	100	100	75	50	25	25	25	0	0	0	0
ASMP-TM7279	100	100	100	100	100	100	75	50	25	0	0	0	0	0
ASMP-CA9656	100	100	100	100	100	100	100	100	100	75	50	25	25	0
ANMP-MG7274	100	100	100	100	100	100	100	100	100	75	75	50	25	0
ANMP-TM7279	100	100	100	100	100	100	100	100	100	75	50	25	25	0
ANMP-CA9656	100	100	100	100	100	100	100	100	100	75	75	50	25	0
AEMP-MG7274	100	100	100	100	100	100	75	75	50	25	0	0	0	0
AEMP-TM7279	100	100	100	100	100	100	100	100	100	75	75	50	25	0
AEMP-CA9656	100	100	100	100	100	100	100	100	100	75	50	25	0	0

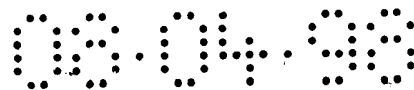
Plocha, pokrytá buňkami v % ve srovnání s kontrolou



T A B U L K A 3

Koncentrace různých antigenních frakcí, snižující
na 50 % růst keratinocytů (buněk HaCaT)

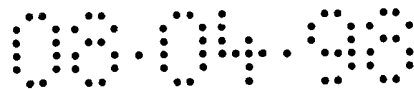
kmen	koncentrace antigenní frakce mg/ml		
	ASMP	ANMP	AEMP
MG7274	0.3	1.5	0.6
TM7279	0.45	1.25	1.5
CA9656	1.25	1.5	1.25



T A B U L K A 4

Vliv různých antigenních frakcí na proliferaci koňských lymfocytů

koncentrace antigenní frakce	. Proliferace koňských lymfocytů v % (kontroly bez antigenní frakce = 100 %)							
	ASMP- MG7274	ASMP- TM7279	ASMP- CA9656	AEMP- MG7274	AEMP- TM7279	AEMP- CA9656		
500	81.5	36.2	37.8	19.4	7.0	1.08		
50	117	106.9	109.8	76.1	10.2	46.9		
5	181	172.8	119.8	129.7	47.3	138.3		
0.5	98.6	93.8	134.1	147.8	133.3	138.3		
0.05	271.3	94.3	181.5	143.5	94.8	149.8		
0.005	146.7	207.6	144.7	104.7	109.9	146.3		



T A B U L K A 5A

Reakce pokusných zvířat (bílé myši, hmotnost 12 až 14 g) po první injekci jednotlivých antigenních frakcí

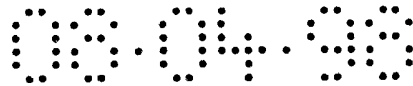
antigenní frakce	koncentrace [mg/ml] nebo % obj.	objem injekce [ml]	počet očkovanych zvířat	místní bolest	počet zvířat majících			
					místní reakce	místní vzestup teploty	ztráta chuti k jídlu	poruchy hybnosti
ASMP-MG7274	10.5mg/ml	0.5	10	0	0	0	0	0
ASMP-TM7279	12.5mg/ml	0.5	10	0	0	0	0	0
ASMP-CA9656	15.5mg/ml	0.5	9	0	0	0	0	0
ANMP-MG7274	3.3%	0.5	8	0	1	0	0	0
ANMP-TM7279	3.3%	0.5	10	0	2	0	0	0
ANMP-CA9656	3.3%	0.5	10	0	1	0	0	0
AEMP-MG7274	15.5mg/ml	0.5	10	0	1	0	0	0
AEMP-TM7279	11.3mg/ml	0.5	10	0	1	0	0	0
AEMP-CA9656	13.5mg/ml	0.5	10	0	1	0	0	0



T A B U L K A 5B

Reakce pokusných zvířat na první injekci komplexních prostředků

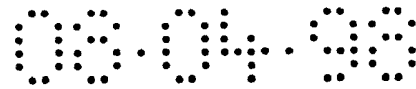
komplex	č.	koncentrace [mg/ml] nebo % obj.	objem injekce [ml]	počet očkovaných zvířat	počet zvířat, majících		počet zvířat, majících ztráta poruchy chuti k jídlu	uhynutí
					místní bolest	místní reakce		
Bílé myši (hmotnost 12 až 14 g)								
ANMP-MG7274	4.2	2.5%	0.5	10	0	0	0	0
ANMP-TM7279		2.5%						
AEMP-TM7279		10.5mg/ml						
ANMP-CA9656	4.1	2.5%	0.5	10	0	0	0	0
AEMP-TM7279		7.1mg/ml						
ANMP-MG7274	5	1.75%	0.5	10	0	0	0	0
ANMP-TM7279		1.75%						
ASMP-CA9656		15.6mg/ml						
Morčata (hmotnost 150 až 200 g)								
ANMP-MG7274	4.2	2.5%	0.5	5	0	0	0	0
ANMP-TM7279		2.5%						
AEMP-TM7279		10.5mg/ml						
ANMP-CA9656	4.1	2.5%	0.5	5	0	0	0	0
AEMP-TM7279		7.1mg/ml						
ANMP-MG7274	5	1.75%	0.5	5	0	0	0	0
ANMP-TM7279		1.75%						
ASMP-CA9656		15.6mg/ml						



T A B U L K A 6A

Reakce pokusných zvířat (bílé myši, hmotnost 12 až 14 g) po druhé injekci jednotlivých antigenních frakcí

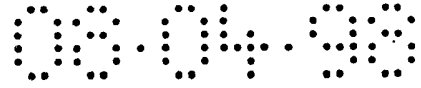
antigenní frakce	koncentrace [mg/ml] nebo % obj.	objem injekce [ml]	počet očkovaných zvířat	místní bolest	místní reakce	počet zvířat, majících		
						místní vzestup teploty	ztráta chuti k jídlu	poruchy hybnosti
ASMP-MG7274	10.5mg/ml	1.0	10	0	0	0	0	0
ASMP-TM7279	12.5mg/ml	1.0	10	0	0	0	0	0
ASMP-CA9656	15.5mg/ml	1.0	9	0	0	0	0	0
ANMP-MG7274	3.3%	0.5	8	0	1	0	0	0
ANMP-TM7279	3.3%	0.5	10	0	2	0	0	0
ANMP-CA9656	3.3%	1.0	10	0	1	0	0	0
AEMP-MG7274	15.5mg/ml	0.5	10	0	1	0	0	0
AEMP-TM7279	11.3mg/ml	1.0	10	0	1	0	0	0
AEMP-CA9656	13.5mg/ml	0.5	10	0	1	0	0	0



T A B U L K A 6B

Reakce pokusných zvířat po druhé injekci komplexních prostředků

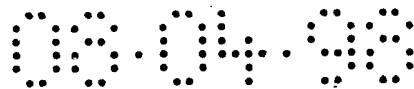
komplex	č.	koncentrace [mg/ml] nebo % obj.	objem injekce [ml]	počet očková- ných zvířat	počet zvířat, majících			uhynutí
					místní poolest	místní reakce	místní vzestup teploty	
Bílé myši (hmotnost 12 až 14 g)								
ANMP-MG7274	4.2	2.5%	0.5	10	0	0	0	0
ANMP-TM7279		2.5%						
AEMP-TM7279		10.5mg/ml						
ANMP-CA9656	4.1	2.5%	0.5	10	0	0	0	0
AEMP-TM7279		7.1mg/ml						
ANMP-MG7274	5	1.75%	0.5	10	0	0	0	0
ANMP-TM7279		1.75%						
ASMP-CA9656		15.6mg/ml						
Morčata (hmotnost 150 až 200 g)								
ANMP-MG7274	4.2	2.5%	1.0	5	0	0	0	0
ANMP-TM7279		2.5%						
AEMP-TM7279		10.5mg/ml						
ANMP-CA9656	4.1	2.5%	1.0	5	0	0	0	0
AEMP-TM7279		7.1mg/ml						
ANMP-MG7274	5	1.75%	1.0	5	0	0	0	0
ANMP-TM7279		1.75%						
ASMP-CA9656		15.6mg/ml						



T A B U L K A 7

Reakce koní po jediné injekci komplexních prostředků (každému koni byly podány komplexy č. 4.1, 4.2 a 5 současně v oddělených injekcích na různá místa)

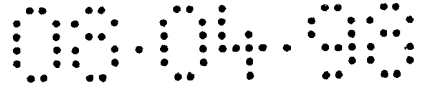
komplex	č.	koncentrace [mg/ml] nebo % obj.	objem injekce [ml]	počet očkovaných koní	počet koní s míst-			počet koní s celkovou reakcí		
					bolest	otok/zánět	zvýšení teploty	ztráta chuti k jídlu	poruchy hybnosti	uhynu- tí
ANMP-MG7274	4.2	3.0%	0.5	3	0	0	0	0	0	0
ANMP-TM7279		3.0%								
AEMP-TM7279		18.5mg/ml								
ANMP-CA9656	4.1	3.0%	0.5	3	0	0	0	0	0	0
AEMP-TM7279		15.6								
ANMP-MG7274	5	3.0%	0.5	3	0	0	0	0	0	0
ANMP-TM7279		3.0%								
ASMP-CA9656		15.6								



T A B U L K A 8

Stav pokožky a srsti po injekci komplexních antigenních prostředků bílým myším (hmotnost 12 až 14 g)

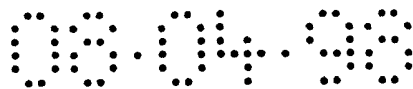
komplex	č.	koncentrace [mg/ml] nebo % obj.		injekce /ml/		počet zvířat	počet zvířat, u nichž jevíla pokožka po očkování		počet zvířat, u nichž pokožka byla po očkování	
		první	druhá	první	druhá		hladká, hladká, pokožka	hladká, lesklá	zacuchaná, matná	
ANMP-MG7274	4.2	2.5%	1.0	0.5	2	0	2	2	0	
ANMP-TM7279		2.5%								
AEMP-TM7279		10.5mg								
ANMP-CA9656	4.1	2.5%	1.0	0.5	3	0	3	3	0	
AEMP-TM7279		7.1mg								
ANMP-MG7274	5	1.75%	1.0	0.5	1	0	1	1	0	
ANMP-TM7279		1.75%								
ASMP-CA9656		15.6mg								
bez vakcinace	-	-	-	-	3	3	0	2	1	



T A B U L K A 9

Účinnost očkování různými komplexními prostředky u islandských koní s letním ekzémem

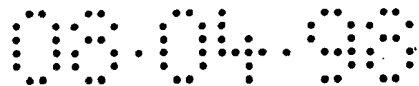
komplex	č.	koncentrace [mg/ml] nebo % obj.	objem injekce [ml]	počet injekcí	počet očkováných koní	4 týdny po očkování počet koní vyléčených nevyлéčených z ekzému
ASMP-MG7274		10 mg/ml				
ASMP-TM7279	1	10 mg/ml	1	3	3	0
ASMP-CA9656		10 mg/ml				
ANMP-MG7274		1%				
ANMP-TM7279	2	1%	1	3	0	3
ANMP-CA9656		1%				
AEMP-MG7274		10 mg/ml				
AEMP-TM7279	3	10 mg/ml	1	3	1	2
AEMP-CA9656		10 mg/ml				



T A B U L K A 10

Účinnost očkování různými komplexními prostředky na islandských koních,
trpících letním ekzémem

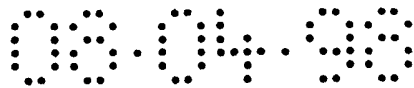
komplex	č.	konzentrace jednotlivých frakcí [mg/ml] nebo % obj.	objem injekce [ml]	počet injekcí	počet očkovaných koní	4 týdny po třetí injekci počet koní, vyléčených ze svědění ekzému
ASMP-MG7274		10mg/ml				
ASMP-TM7279	1	10mg/ml	1	3	3	3
ASMP-CA9656		10mg/ml				
ANMP-MG7274		1 %				
ANMP-TM7279	2	1 %	1	3	3	0
ANMP-CA9656		1 %				
AEMP-MG7274		10mg/ml				
AEMP-TM7279	3	10mg/ml	1	3	3	1
AEMP-CA9656		10mg/ml				
bez antigenu (jen nosič A)	-	- (kontrola)	1	3	3	0



T A B U L K A 11

Bezpečnost očkování různými antigenními prostředky u islandských koní, trpících letním ekzémem

komplex	č.	koncentrace [mg/ml] nebo % obj.	objem injekce [ml]	počet injekcí	počet očkova- ných koní	počet koní, mají- cích 1 až 3 dny po 1. až 3. injekci		počet koní, mají- cích 1 až 3 dny po 1. až 3. injekci celkovou reakci
						místní reakci	horečka	
ASMP-MG7274		10mg/ml						
ASMP-TM7279	1	10mg/ml	1	3	3	0	0	0
ASMP-CA9656		10mg/ml						
ANMP-MG7274		1 %						
ANMP-TM7279	2	1 %	1	3	3	0	0	0
ANMP-CA9656		1 %						
AEMP-MG7274		10mg/ml						
AEMP-TM7279	3	10mg/ml	1	3	3	1	0	0
AEMP-CA9656		10mg/ml						
bez antigenu (jen nosič A)	-	(kontrola)	1	3	3	0	0	0



T A B U L K A 12

NMR-Spektrum

antigenní příprava	acetát	dublet aminokyseliny	triplet aminokyseliny	multiplet uhlohydráty	izolované CH ₂ amino- kyseliny	koncové CH, aminokyseliny	H arylamino kyseliny
ASMP							
MG 7274/ 9-18-1 (Obr. 4)	1.92ppm	CH3 (d, 6.8 Hz) 1.33ppm CH3 (d, 7.5 Hz) 1.48ppm	CH3 (t, 7.1 Hz) 1.18ppm	3.2 - 4.3 ppm 4.9 - 5.4 ppm	1.7 - 3.45ppm	0.95ppm	
CA 9656/ b008 (Obr. 2)	1.92ppm	CH3 (d, 7.0Hz) 1.33ppm CH3 (d, 7.3Hz) 1.48ppm	CH3 (t, 7.0Hz) 1.18ppm	3.4-4.6 ppm 4.9-5.24 ppm	CH2(AcB, 16Hz) 2.7ppm/2.5ppm 3.28 ppm	0.95 ppm	
TM 7279/ 32-m-1-5 (Obr. 3)	1.92 ppm	CH3 (d, 7.1 Hz) 1.33ppm CH3 (d, 7.1 Hz) 1.48ppm	CH3 (t, 7.1 Hz) 1.18ppm	3.5 - 4.35ppm 5.0 - 5.25 ppm	2.1 - 3.3 ppm	0.85 - 0.95 ppm	
AEMP							
TM 7279/ p32-5-1 (Obr. 1, A- C)		CH3 (d, 6.5 Hz) 1.33 ppm CH3 (d, 7.5 Hz) 1.48 ppm		3.2 - 4.07 ppm	1.6 - 3.12 ppm	0.84 - 1.08 ppm	7.15 - 7.9 ppm
				CH (d, 8.2Hz) 4.65 ppm CH (d, 4.0Hz) 5.23 ppm			



Přehled obrázků na výkresech

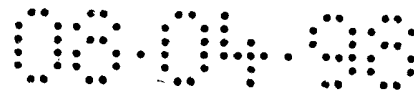
Na obr. 1 až 4 je znázorněno NMR-spektrum frakcí ASMP a AEMP, získané údaje byly zaznamenány za následujících podmínek:

Spektra byla stanovena v D_2O při 250 MHz a při použití digitálního NMR-spektrometru BRUKER, model DRX 400 a při 1H -frekvenci, rovné 400,13 Mc. Teplota při záznamu byla 300 K, šířka šablony byla 14,5 ppm. Chemické posuny jsou zaznamenány prostřednictvím rozpouštědla.

Standardní 1H -jednorozměrné spektrum bylo získáno při použití příslušného pulsního programu BRUKER.

Dále jsou uvedeny kopie dokladů o uložení jednotlivých kmenů, použitých v průběhu přihlášky pro přípravu jednotlivých frakcí a antigenních prostředků.

Zastupuje:



P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Způsob výroby rozpustného materiálu s antigenním účinkem, obsahujícího polysacharid a/nebo glykopeptid, ASMP s rozpustností ve vodě, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se buňky hub, náležející do skupiny keratofilních hub nebo kvasinek nebo materiál, odvozený z těchto buněk

- zpracuje působením vodného roztoku zásady,
- pevná a kapalná fáze směsi se oddělí,
- po oddělení supernatantu se supernatant zpracovává působením anorganické nebo organické kyseliny a
- po oddělení supernatantu se ze supernatantu vysráží ASMP.

2. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se buňky hub nebo materiál, odvozený z těchto buněk

- zpracovává působením vodného roztoku KOH nebo NaOH s koncentrací 0,1 až 5 % hmotnostních při teplotě 20 až 150 °C až 30 hodin,
- směs se odstředí,
- supernatant se zpracovává působením 0,2 až 1,5 M organické kyseliny nebo 0,05 až 1 M anorganické kyseliny,
- po odstředění se supernatant zpracovává působením organického roztoku nebo soli, například působením alkoholu, jako nižšího alkanolu nebo působením síranu amonného a

- sraženina se oddělí a popřípadě se rozpustí ve vodném roztoku.

3. Způsob výroby antigenního materiálu, nerozpustného ve vodních roztocích, obsahujícího polysacharid a/nebo glykopeptid, ANMP, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se buňky hub, náležející do skupiny keratofilních hub nebo kvasinek nebo materiál, odvozený z těchto buněk

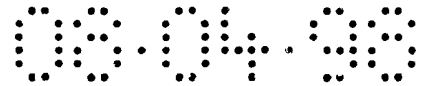
- zpracovává alkalickým vodným roztokem,
- pevná a kapalná fáze směsi se oddělí a
- pevná fáze se zpracovává působením anorganické nebo organické kyseliny.

4. Způsob podle nároku 3, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se na buňky hub nebo na materiál, odvozený z těchto buněk

- působí KOH nebo NaOH v koncentraci 0,1 až 5 % hmotnostních při teplotě 20 až 150 °C až 30 hodin;
- pevná fáze se zpracuje působením 0,2 až 1,5 M organické kyseliny nebo 0,05 až 1 M anorganické kyseliny a
- promyje se vodným roztokem.

5. Způsob výroby antigenního exogenního materiálu, obsahujícího polysacharid a/nebo glykopeptid AEMP, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se buňky hub, náležející do skupiny keratinofilních hub nebo kvasinek nebo materiál, odvozený z těchto buněk,

- pěstuje v kapalném prostředí,
- pevná a kapalná fáze směsi se oddělí a
- po oddělení se AEMP ze supernatantu vysráží.



6. Způsob podle nároku 5, v y z n a č u j í c í s e t í m , že

- kultivace trvá až 250 hodin,
- po oddělení se k supernatantu přidá alkohol a
- sraženina se oddělí a popřípadě se rozpustí ve vodném roztoku.

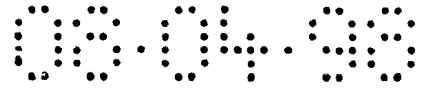
7. Způsob podle nároku 5 nebo 6, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se

- po oddělení supernatant lyofilizuje,
- rozpustí se ve vodném roztoku,
- po vysrážení přibližně 1 až 5 objemy alkoholu se sraženina rozpustí ve vodném roztoku a
- roztok se lyofilizuje.

8. Způsob podle některého z nároků 1 až 7, v y z n a - č u j í c í s e t í m , že se užijí keratinofilní houby, náležející do nejméně jednoho z následujících rodů hub Trichophyton a/nebo Microsporum a/nebo jde o kvasinky, náležející do rodu Candida.

9. Způsob podle některého z nároků 1 až 7, v y z n a - č u j í c í s e t í m , že se užije houba, náležející do některé z následujících čeledí hub:

- Trichophyton equinum,
- Trichophyton mentagrophytes,
- Trichophyton sarkisovii,
- Trichophyton verrucosum,
- Microsporum canis,
- Microsporum gypseum nebo
- Candida albicans.



10. Způsob podle některého z nároků 1 až 7, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se užije houba, náležející k některému z následujících kmenů hub:

- *Trichophyton equinum* DSM č. 7276,
- *Trichophyton mentagrophytes* DSM č. 7279,
- *Trichophyton sarkisovii* DSM č. 7278,
- *Trichophyton verrucosum* DSM č. 7277,
- *Microsporum canis* DSM č. 7281,
- *Microsporum canis* var. *obesum* DSM č. 7280,
- *Microsporum canis* var. *distortum* DSM č. 7275,
- *Microsporum gypseum* DSM č. 7274 nebo
- *Candida albicans*, DSM č. 9656.

11. Materiál s antialergickou účinností u savců, obsahující polysacharid a/nebo glykopeptid, v y z n a č u j í c í s e t í m , že je odvozen nebo je možno jej odvodit z keratofilních hub nebo kvasinek nebo z materiálu těchto hub způsobem podle některého z nároků 1 až 10.

12. Materiál ASMP, získatelný podle nároku 1 nebo 2 nebo některého z nároků 8 až 10.

13. Materiál ANMP, získatelný podle nároku 3 nebo 4, nebo některého z nároků 8 až 10.

14. Materiál AEMP, získatelný podle některého z nároků 5 až 7, nebo některého z nároků 8 až 10.

15. Materiál podle nároku 11 nebo 12, v y z n a č u j í c í s e t í m , že obsahuje ASMP z kmene *T. mentagrophytes* DSM č. 7279, ASMP z kmene *M. gypseum* DSM č. 7274 a ASMP z kmene *C. albicans* DSM č. 9656.

16. Materiál podle nároku 11 nebo 13, v y z n a č u -
j í c í s e t í m , že obsahuje ANMP z kmene T. mentagro-
phytes DSM č. 7279, ANMP z kmene M. gypseum DSM č. 7274 a
ANMP z kmene C. albicans DSM č. 9656.

17. Materiál podle nároku 11 nebo 14, v y z n a č u -
j í c í s e t í m , že obsahuje AEMP z kmene T. mentagro-
phytes DSM č. 7279, AEMP z kmene M. gypseum DSM č. 7274 a
AEMP z kmene C. albicans DSM č. 9656.

18. Materiál, v y z n a č u j í c í s e t í m , že
je tvořen jakoukoliv kombinací materiálů podle některého z
nároků 11 až 17.

19. Materiál podle nároku 18, v y z n a č u j í c í
s e t í m , že obsahuje ASMP a AEMP.

20. Materiál podle nároku 18, v y z n a č u j í c í
s e t í m , že obsahuje ASMP a AEMP a ANMP.

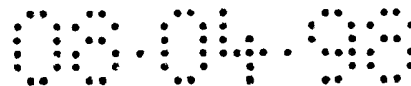
21. Materiál podle nároku 18, v y z n a č u j í c í
s e t í m , že obsahuje AEMP a ANMP.

22. Materiál podle nároku 18, v y z n a č u j í c í
s e t í m , že obsahuje ASMP a ANMP.

23. Vakcína, v y z n a č u j í c í s e t í m , že
obsahuje materiál podle některého z nároků 1 až 22.

24. Vakcína, v y z n a č u j í c í s e t í m , že
obsahuje materiál podle některého z nároků 11 až 23 spolu
s vhodným fyziologickým nosičem.

25. Roztok pro injekční podání, v y z n a č u j í c í
s e t í m , že obsahuje materiál podle některého z nároků
11 až 24.



26. Materiál podle některého z nároků 11 až 25 pro farmaceutické použití.

27. Použití materiálu, obsahujícího polysacharidy a glykopeptidy a připraveného nebo připravitelného z keratofilních hub nebo kvasinek pro výrobu farmaceutického prostředku pro profylaxi a/nebo léčení alergie.

28. Použití materiálu podle některého z nároků 11 až 25 pro výrobu farmaceutického prostředku pro profylaxi a/nebo léčení alergie.

29. Použití materiálu podle některého z nároků 11 až 25 pro výrobu farmaceutického prostředku pro modulaci odpovědi imunitního systému.

30. Kmen *Candida albicans*, uložený ve sbírce Deutsche Sammlung für Mikroorganismen, DSM pod přírůstkovým číslem 9656 a jeho mutanty s nízkou patogenitou a s obsahem materiálu podle nároku 11.

31. Materiál podle nároku 11 nebo 12, v y z n a č u - j í c í s e t í m , že obsahuje ASMP z kmene *M. gypseum* DSM č. 7274 a ASMP z kmene *C. albicans* DSM č. 9656.

32. Použití materiálu podle některého z nároků 11 až 25 nebo 31, pro výrobu farmaceutického prostředku pro profylaxi nebo léčení letního ekzému.

33. Použití materiálu podle některého z nároků 11 až 25, nebo 31 pro výrobu farmaceutického prostředku pro profylaxi nebo léčení alopecie.



64

- VII -

34. Použití materiálu podle některého z nároků 11 až 25 nebo 31 pro výrobu farmaceutického prostředku pro profylaxi nebo léčení ekzému.

35. Použití materiálu podle některého z nároků 11 až 25 nebo 31 pro výrobu farmaceutického prostředku pro profylaxi nebo léčení neurodermitidy.

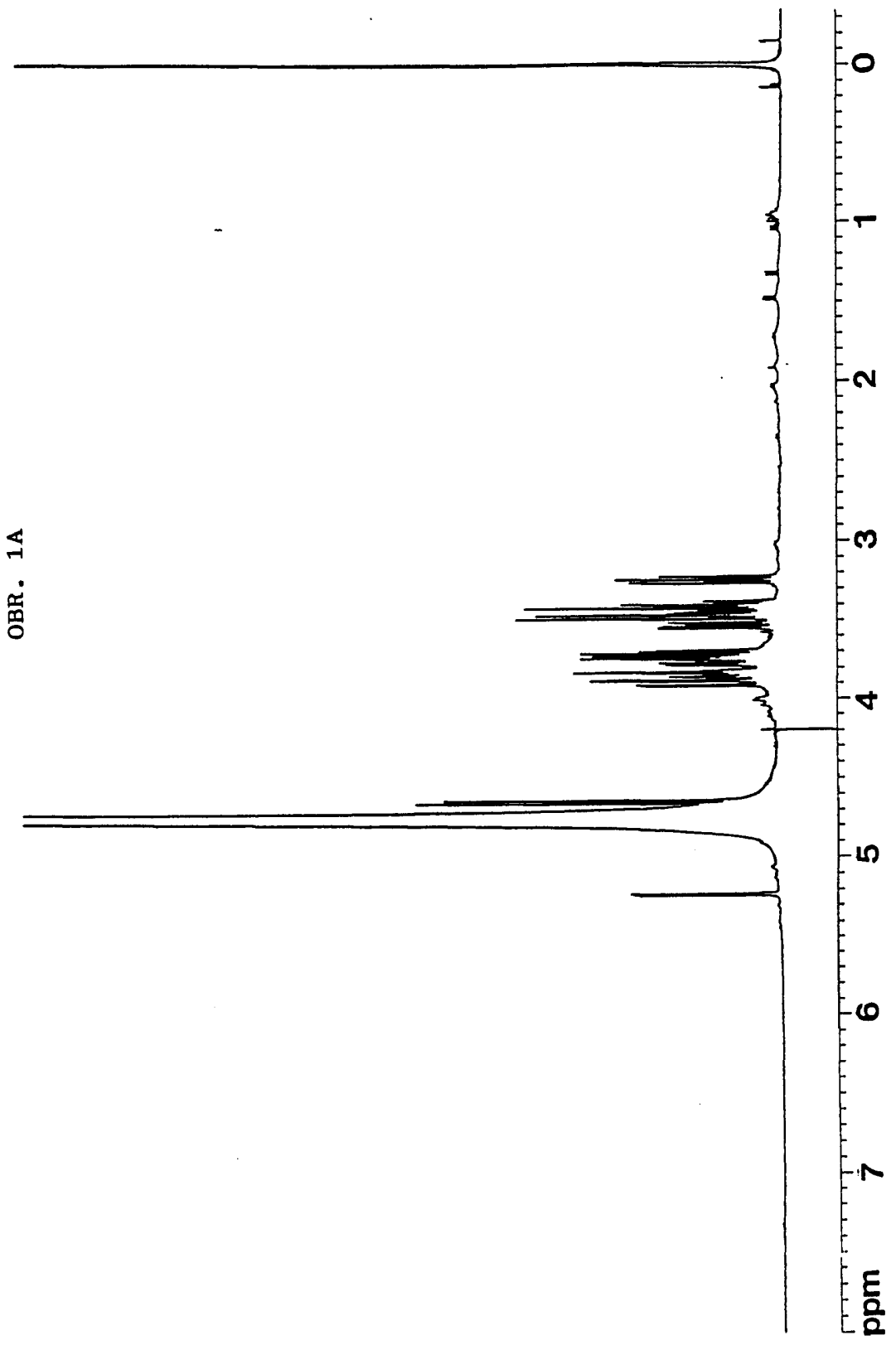
36. Použití materiálu podle některého z nároků 11 až 25 nebo 31 pro výrobu farmaceutického prostředku pro zlepšení srsti savce.

Zastupuje:

08.04.98

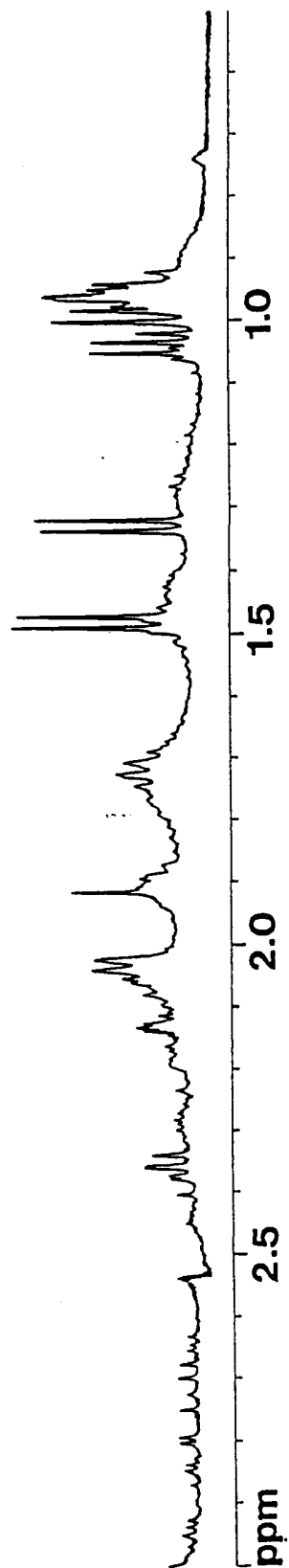
1/6

OBR. 1A



08.04.98

OBR. 1B



00400-98

08.04.98

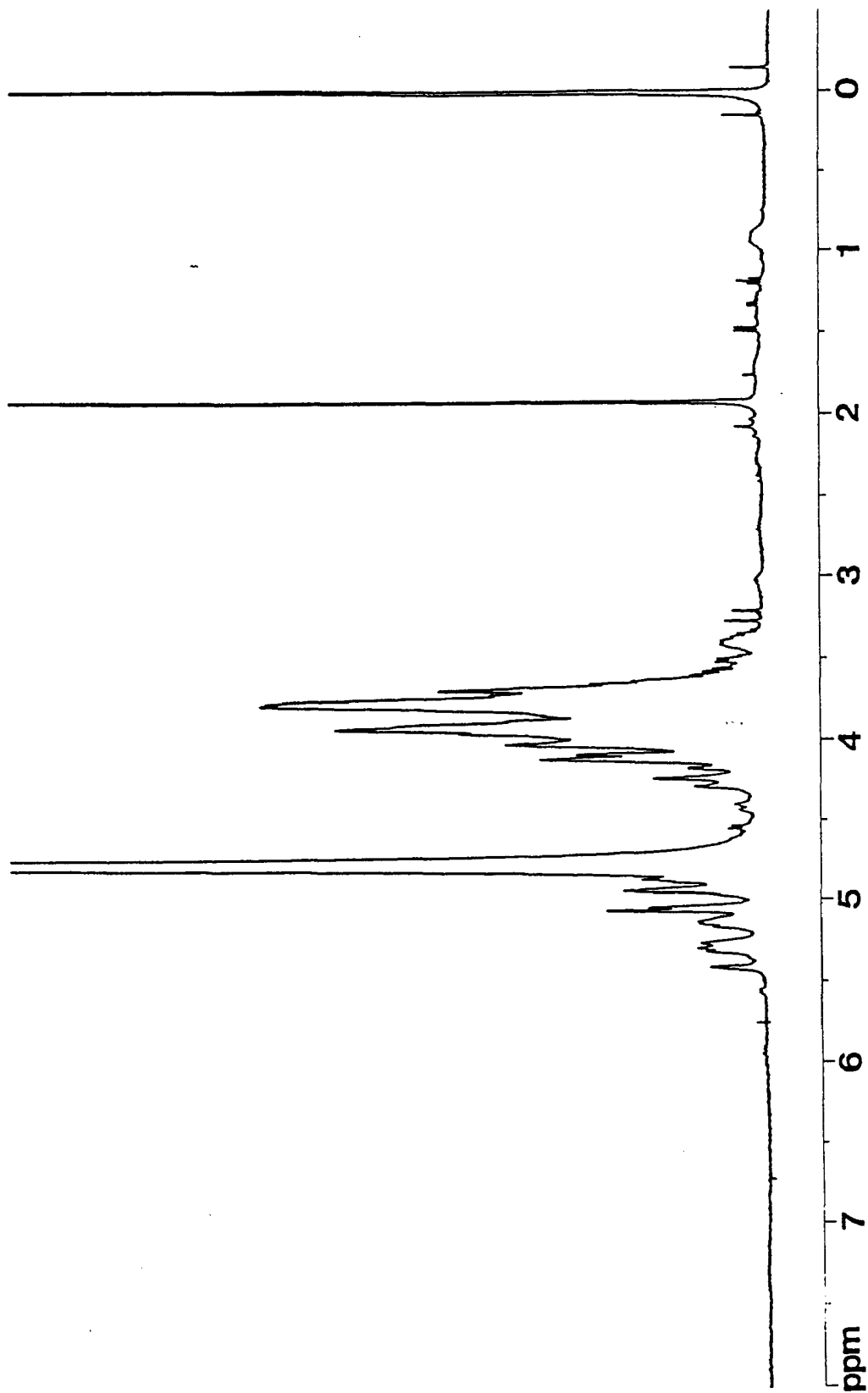
3/6

OBR. 1C



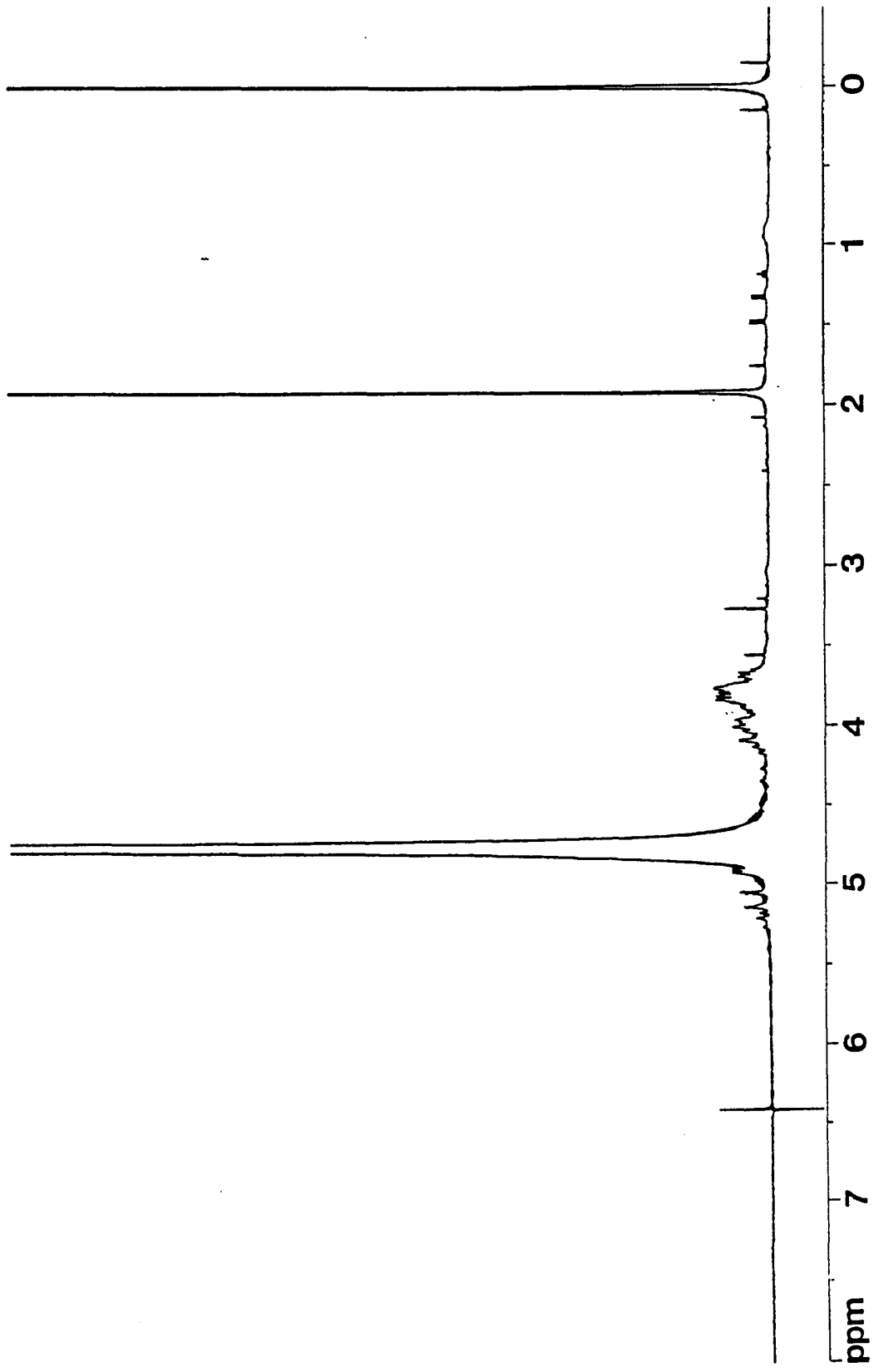
08.04.98

OBR. 2



08.04.98

OBR. 3



08.04.98

6/6

OBR. 4

