



NORGE

(19) [NO]

STYRET FOR DET
INDUSTRIELLE RETTSVERN

[B] (12) **UTLEGNINGSSKRIFT** (11) № 159451

(51) Int. Cl.⁴ C 12 N 1/16,
A 61 K 7/40, 35/72,
// (C 12 R 1:645)

(21) Patentsøknad nr. 811486

(22) Inngivelsesdag 30.04.81

(24) Løpedag 01.09.80

(62) Avdelt/utskilt fra søknad nr.

(86) Internasjonal søknad nr. PCT/JP80/00203

(86) Internasjonal inngivelsesdag 01.09.80

(85) Videreføringsdag 30.04.81

(41) Alment tilgjengelig fra 30.04.81

(44) Utlegningsdag 19.09.88

(72) Oppfinner Søkeren.

(71)(73) Søker/Patenthaver SHINEI KASHIWAYAMA,
No. 558 Iwasaki, Kamitonda-machi,
Nishimuro-gun, Wakayama-ken 649-21,
Japan.

(74) Fullmektig Tandbergs Patentkontor A-S, Oslo.

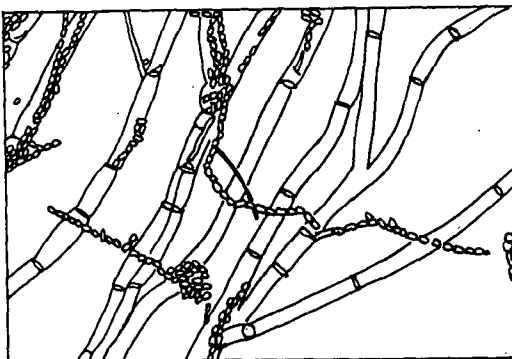
(30) Prioritet begjært 01.09.79, JP, nr.112294/79

(54) Oppfinnelsens benevnelse FREMGANGSMÅTE FOR FREMSTILLING AV ET
DYRKNINGSPRODUKT ELLER EN DYRKNINGSVÆSKE
AV EN TRICHOSPORON KASHIWAYAMA-STAMME.

(57) Sammendrag

En ny stamme, Trichosporon Kashiwayama, et dyrkningsprodukt eller dyrkningsvæske av angitte stamme, steril væske, sterilt filtrat, steril supernatant av angitte dyrkningsvæske, eller konsentrat eller tørrprodukt derav, fremgangsmåte for fremstilling derav, et hudmedikament med en lægende virkning overfor hudsykdommer, eller et kosmetisk preparat bestående utelukkende av eller omfattende som hovedbestanddel det ovenfor angitte produkt, væske, filtrat, supernatant, konsentrat eller tørrprodukt.

(56) Anførte publikasjoner Ingen.



(X75)

Foreliggende oppfinnelse angår fremgangsmåte for fremstilling av et hudmedikament bestående utelukkende av et dyrkningsprodukt eller en dyrkningsvæske av en *Trichosporon Kashiwayama*-stamme (deponert ved FRI under deponeringsnummer 4821),
5 som kan identifiseres som en stamme tilhørende slekten *Geotricum* eller *Endomycopsis*, en cellefri steril væske, sterilt filtrat eller steril supernatant av angitte dyrkningsprodukt eller væske, eller et konsentrat eller tørrprodukt derav.

Fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen er kjennetegnet ved
10 at stammen dyrkes på eller i et dyrkningsmedium som omfatter glucose, skummet melk og gjærekstrakt, under aerobe betingelser ved en pH-verdi på 4,0 - 6,0 og en temperatur på 20 - 30°C, under dannelse av et dyrkningsprodukt eller en dyrkningsvæske, at eventuelt celler fjernes fra angitte dyrkningsvæske under
15 dannelse av en cellefri steril væske, sterilt filtrat eller steril supernatant, og eventuelt at angitte cellefri sterile væske, sterile filtrat eller sterile supernatant konsentreres eller tørkes.

Mikroorganismen som anvendes ifølge foreliggende
20 oppfinnelse, dvs. *Trichosporon Kashiwayama*-stamme, betraktes å tilhøre gjærartene, men stammen er enkelte ganger klassifisert som en *fungi imperfecti*. Følgelig er den angivelse at stammen kan identifiseres som en stamme tilhørende slekten *Geotricum* eller *Endomycopsis*, basert på den vitenskapelige
25 forestilling som has av ekspertene innen faget.

Som det fremgår fra de medfølgende tegninger (fotografier) er stammen som anvendes ifølge oppfinnelsen, karakterisert ved at den har kulelignende arthrosporer og pseudomycelium. Envidere er stammen karakterisert ved at et fermenteringsprodukt av stammen, dvs. en supernatant av en
30 dyrkningsvæske av stammen, har i seg selv en iøynefallende medisinsk effekt på menneskelig hud.

Den effektive substans som utviser en medisinsk effekt er fremdeles ukjent. Hvis imidlertid en steril supernatant av en dyrkningsvæske av stammen eller et konsentrat
35 eller tørret produkt påføres huden som sådant eller etter at denne er blitt blandet med en egnet bærer og formet til et preparat egnet for påføring på den menneskelige hud, for

eksempel en salve, kan følgende medisinske effekter oppnås.

(1) Fermenteringsvæsken er svakt sur (har en pH-verdi på 4,5 - 5,0) og er ikke-toksisk for huden, og den aktiverer fettmembranens hudbeskyttende virkning, spesielt den bakterieregulerende virkning iboende i fettmembranen.

(2) Økende avskalning av keratinstykker fra hornlaget forhindres, og samtidig opprettholdes et egnet vanninnhold i hornlaget, og derfor kan hudens karakteristika slik som fuktighet og elastisitet opprettholdes i god tilstand.

(3) Lipidmetabolismen i epidermcellene reguleres til å aktivere passende dannelselse av keratin og glatt formering og differensiering av epidermcellene.

(4) Spesielt til fet hud vil økende sekresjon av sebum reguleres, og økning av fettmembranens tykkelse forhindres. Følgelig aktiveres diffusjonen av sebum i hudfolden flaten fra hårfoliclen, og en beskyttende effekt mot fattedermatitis slik som acne, erholdes.

(5) Da collagenfibre i nettlaget forsterkes eller svelles for å opprettholde et hensiktsmessig vanninnhold i de øvre lag, opprettholdes god og normal hårdhet og elastisitet i huden.

(6) Da sirkulasjon av blod forbedres, aktiveres metabolismen av huden, og transport av hudavfall til venen og ekskresjon derav aktiveres. Samtidig fremskyndes utsondring av melaninfarve til utsiden av kroppen.

(7) Overfor hudsykdommer fremkalt ved oxydasjon under actiniske stråler, virker fermenteringsvæsken eller en steril supernatant derav som antioxidant til fettmembranen og aktiverer avfarving av unormalt avsatt melaninfarve i hudflekker eller lignende. Når fermenteringsvæsken eller en steril supernatant derav administreres i forbindelse med infrarød bestrålingsbehandling eller oral administrering av vitamin E, kan det oppnås en preventiv eller legende synergistisk effekt overfor kontaktdermatitis, hudflekker og unormal farveavsettelse på grunn av solsensibilitet.

De mikrobiologiske egenskaper til Trichosporon Kashiwayama-stammen (deponert ved FRI med deponeringsnummer

4821) som anvendes ifølge oppfinnelsen, vil bli beskrevet i det etterfølgende.

(1) Morfologiske egenskaper:

(1) Form og størrelse (maltekstrakt-MY væskemedium):

5 Etter 3 dagers dyrkning ved 25° C ble det observert celler med en rektangulær eller oval form og en størrelse på (3 til 4 µm) x (3 til 20 µm), og når dyrkningen ble fortsatt i 5 dager eller mer, ble formen på cellene irregulær og til slutt ble
10 cellene mycelioide.

2) Dannelse av pseudomycelier (skråkultur på potet-ekstrakt-agar-dyrkningsmedium):

Cellene er pseudohyfale eller pseudomyceliale, og de har karakteristiske siksak -arthrosporer men
15 ingen konidier.

3) Ascosporer:

Cellene har ingen ascosporer.

4) Ballistosporer:

Cellene har ingen ballistosporer.

20 (2) Karakteristiske egenskaper av dyrkningsmedia:

1) Koloni på agarstrek-kulturmedium (maltekstrakt-MY-agar-dyrkningsmedium):

Matt, hvit, håret og ru overflate, meget myk, ikke hevet men flat, periferi med flimmerhår.

25 2) Film på væskedyrkningsmedium (maltekstrakt-MY væskedyrkningsmedium):

Hvit, håret, flokkulent og ru film dannet.

(3) Fysiologiske egenskaper:

1) Saccharid-fermentering:

30 Ikke-fermentativ overfor glucose, galactose, sucrose, lactose, treharose, raffinose og inullin.

2) Saccharid-utnyttelse (assimilasjon):

D-glucose +, D-galactose +, maltose -, raffinose -,
sucrose -, lactose -, natriumlactat +, D-xylose +,
35 erythritol -, D-mannitol +, L-sorbose +, inositol -,
treharose -, D-arabinose -, L-arabinose -, natrium-succinat +, natriumcitrat +, natriumacetat +,
inullin -, løselig stearin -, ethanol +, glycerol +,
cellobiose -,

Fotnoter

+: utnyttet

-: ikke utnyttet

- 3) Utnyttelse av nitrater:
5 ikke utnyttet
- 4) Utnyttelse av nitriter:
ikke utnyttet
- 5) Utnyttelse av ethylamin-hydroklorid:
ikke utnyttet
- 10 6) Spaltning av glucosid (Arbutin):
spaltet
- 7) Dannelse av stivelseanaloger:
ikke dannet.
- 8) Dannelse av pigment:
15 ikke dannet.
- 9) Dannelse av estere:
dannet.
- 10) Lacmusmelkreaksjon:
ikke koagulert.
- 20 11) Vitamin-behov:
ikke krevet.
- 12) Saltresistens:
kritisk konsentrasjon på 6 til 8 W/v %
- 13) Optimal temperatur:
25 25° C.
- 14) Optimal pH-verdi:
5,0.
- 15) Spaltning av urea:
ikke spaltet
- 30 16) Vekst på 50 % (w/w) glucoseagar eller 60 % (w/w)
gjærekstraktagar-medium:
ingen vekst
- 17) Vekst ved 37° C:
ingen vekst
- 35 18) Dannelse av syre fra glucose:
ikke dannet
- 19) Resistens overfor cycloheximid:
resistent
- 20) Spaltning av olje og fett:
spaltet

(4) Andre mykologiske karakteristika:

1) Produksjon av duft:

Den foreliggende stamme er karakterisert ved produksjon av en duftkomponent. Fra resultatene av gasskromatografisk analyse ble det funnet at duftkomponenten er sammensatt hovedsakelig av ethanol, ethylacetat, isopropylalkohol, isopropylacetat, isobutylalkohol, isobutylacetat, isoamylalkohol og isoamylacetat. Duften er en såkalt epleduft. Den foreliggende stamme er karakterisert i forhold til kjente gjærsorter med duftproduserende egenskaper ved at dannelsesforholdene er høye ikke bare for høyere alkoholer, men også deres estere.

Optimale betingelser for produksjon av disse nøytrale duftbestanddeler er som følger.

a) Begynnelses-pH-verdi på 4,0 til 5,0 og opprettholdelse av en lav pH-verdi under fermenteringen.

b) Totalt nitrogeninnhold på 400 til 500 mg/liter dyrkningsmedium.

Som uorganisk nitrogenkilde anvendes fortrinnsvis ammoniumsulfat, ammoniumnitrat og ammoniumklorid, og som organisk nitrogenkilde anvendes fortrinnsvis gjærekstrakt, casaminosyre og pepton. Ennvidere erholdes gode resultater når aminosyre slik som leucin, isoleucin, valin og fenylalanin tilsettes.

c) Valg av carbonkilder.

Glucose, galactose, ethanol og glycerol er egnet. En foretrukket konsentrasjon er 5 %.

d) Celle-inokulasjonsforhold på 1 til 2 %.

Dyrkningstemperatur på 25 til 30° C.

Stasjonær dyrkning foretrekkes.

2) Dannelse av organiske syrer:

Maurisyre, propionsyre, n-smørsyre, ravsyre og sitronsyre dannes fra glucose.

De ledsagende tegninger (fotografier) illustrerer vekst av *Trichosporon Kashiwayama*-stammen som anvendes ifølge oppfinnelsen, på et potetekstrakt-agar dyrkningsmedium når preparatglassdyrkning ble utført ved 25° C i 3 dager. Fig. 1 er et mikroskopfotografi (75 ganger forstørrelse) som

viser adhesjonstilstanden av arthrosporer fra hyfeceller under aerobe betingelser. Fra fig. 1 sees det at arthrosporene ikke adherer på conidioforer men strekker seg lateralt ut i kjeder fra skilleveggdelene av hyfeceller.

5 Fig. 2 er et forstørret mikroskopfotografi (300 gangers forstørrelse) som viser arthrosporene. Fig. 3 er et mikroskopfotografi (300 gangers forstørrelse) som viser cellene og okulasjonstilstanden under aerobe betingelser.

Vanlig gjær dyrkningsmedium kan anvendes for dyrking av Trichosporon Kashiwayama-stammen ifølge oppfinnelsen. Ifølge en fore-
10 trukket utførelsesform utføres stasjonær dyrkning eller ristedyrkning ved 20 - 30° C i ca. 24 timer i et fast eller flytende medium omfattende 0,3 % (w/v) glucose, 0,5 % (w/v) skummet melk og 0,05 % (w/v) gjærekstrakt, og med en pH-verdi på 4,0 - 6,0, og det samme dyrkningsmedium som oven-
15 for angitt inokuleres med det resulterende dyrkningsprodukt som kimstoff, og stasjonær dyrkning eller ristedyrkning utføres ved 20 - 30° C i 3 - 7 dager.

Dyrkningsvæsken underkastes filtrering og fjerning
20 av cellene etter kjente prosedyrer, for eksempel ved anvendelse av et membranfilter, og den cellefri supernatant konsentreres, for eksempel under redusert trykk, fortrinnsvis ved en konsentrasjonshastighet på 4 - 25. Det resulterende konsentrat steriliseres etter velkjente prosedyrer og lagres
25 ved romtemperatur eller i en fryser.

Den cellefri supernatant fremstilles ifølge oppfinnelsen og har de egenskaper som er vist i tabell 1.

Tabell 1

Et cellefritt rensset filtrat av supernatanten av
30 dyrkningsproduktet av foreliggende stamme omfatter små mengder av aminosyrer, saccharider og lipider. Når filtratet bestemmes kvantitativt, sees det at det totale nitrogeninnhold er 0,005 til 0,015 %, og det totale fosforinnhold er 0,004 til 0,014 %.

35 1. Art og tilstand:

Filtratet er en farveløs til svakt gulaktig gjennomskinnelig væske og har en svak duft.

2. Bekreftelsestester:

- (1) 20 ml av filtratet ble fordampet på et vannbad inntil volumet var redusert til ca. 50 ml. Deretter ble tilsatt 1 ml ninhydrintestløsning til konsentratet. Når blandingen ble oppvarmet i 30 minutter, fikk væsken en fiolett farve.
- (2) 5 ml salpetersyre ble tilsatt til konsentratet dannet ved fordampning på samme måte som beskrevet i punkt (1) ovenfor, og blandingen ble kokt i 20 minutter. Etter at blandingen var avkjølt, ble den nøytralisert med en 10 %-ig løsning av natriumhydroxyd. Deretter ble 2 ml av en ammoniummolybdat-testløsning tilsatt til blandingen. Hvis blandingen ble oppvarmet ble væsken gul. Hvis en 10 %-ig løsning av natriumhydroxyd ble tilsatt til væsken, ble den farveløs.
- (3) 10 mg indol og 2 ml saltsyre ble tilsatt til 5 ml av filtratet, og blandingen ble ristet tilstrekkelig. Når blandingen deretter ble oppvarmet i 10 minutter ble væsken rød.

3. Fysikalske egenskaper:

- (1) Egenvekt (d_{25}^{25}): 1000 til 1015
- (2) Brytningsindeks (n_D^{25}): 1330 til 1340
- (3) pH (25° C): 4,5 til 5,5

4. Fordampningsrest:

0,5 til 2,0 %

Analyseverdien av et eksempel av konsentratet (konsentreringshastighet på 2) av den cellefri supernatant fremstilt ifølge oppfinnelsen er vist i tabell 2.

30 Tabell 2

Vanninnhold (tørkning ved atmosfæretrykk):	98,7 %
Protein (koeffisient på 6,25):	spor
Lipid-innhold (ved Soxhlet-ekstraksjonsmetoden):	0,2 %
Fiberinnhold:	0 %
35 Askeinnhold:	0,1 %
Sukkerinnhold:	1,0 %
Totalt tørrstoff ^x	1,3 %

159451

8

Tabell 2 (forts.)

	Nitrogeninnhold i form av amino:	10 mg %
	Titrerings-surhet:	0,6 ^{xx}
	Nitrogeninnhold i form av flyktig base:	1 mg %
5	Arsenikkinnhold (som As ₂ O ₃):	ikke påvist
	(påvisningsgrense:	0,1 ppm)
	Tungmetall-innhold (som Pb):	ikke påvist
	(påvisningsgrense: 1 ppm)	
10	Totalt kvikksølv-innhold:	ikke påvist
	(påvisningsgrense: 0,01 ppm)	
	Cadmium-innhold	ikke påvist
	(påvisningsgrense: 0,01 ppm)	
	Calcium-innhold:	14,7 mg %
15	Fosfor-innhold:	9,8 mg %
	Maursyre-innhold:	ikke påvist
	(påvisningsgrense: 0,1 %)	
	Eddiksyre-innhold:	ikke påvist
	(påvisningsgrense: 0,01 %)	
20	Smørsyre-innhold:	ikke påvist
	(påvisningsgrense: 0,01 %)	
	Melkesyre-innhold:	0,06 %
	Sitronsyre-innhold:	0,02 %
	Antall levende celler:	mindre enn 30
25		celler pr. ml.
	<u>E. coli</u> : (-)	
	<u>Staphylococcus aureus</u> : (-)	
	Antall fungi : (-)/ml	
	Antall gjær : (-)/ml	
30	Propionsyre-innhold : ikke påvist	ikke påvist
	(påvisningsgrense: 0,02 g/kg)	
	Sorbinsyre-innhold:	ikke påvist
	(påvisningsgrense: 0,005 g/kg)	
	Benzoesyre:	0,42 g/kg
35	p-hydroxybenzoesyreester:	ikke påvist
	(påvisningsgrense: 0,005 g/kg)	
	Vitamin B ₁ -innhold:	ikke påvist
	(påvisningsgrense: 0,01 mg%)	

Tabell 2 (forts.)

	Vitamin B ₂ -innhold:	0,02 mg %
	Totalt vitamin C-innhold:	ikke påvist (påvisningsgrense: 2 mg %)
5	Vitamin B ₆ -innhold:	ikke påvist (påvisningsgrense: 5 µg %)
	Vitamin B ₁₂ -innhold:	ikke påvist (påvisningsgrense: 0,05 µg %)
	Pantothensyre-innhold:	0,09 mg %
10	Cholin-innhold:	ikke påvist (påvisningsgrense: 0,03 %)
	Folinsyre-innhold:	ikke påvist (påvisningsgrense: 1 µg %)
	Niacin-innhold:	ikke påvist (påvisningsgrense: 0,03 mg %)
15	Totalt caroten-innhold:	ikke påvist (påvisningsgrense: 0,02 mg %)
	pH-verdi:	4,9
	Aminosyre-sammensetning ^{xxx} :	
20	Arginin	under 0,01
	Lysin	under 0,01
	Histidin	under 0,01
	Fenylalanin	under 0,01
	Tyrosin	under 0,01
25	Leucin	under 0,01
	Isoleucin	under 0,01
	Methionin	under 0,01
	Valin	under 0,01
	Alanin	under 0,01
30	Glycin	under 0,01
	Prolin	under 0,01
	Glutaminsyre	under 0,01
	Serin	under 0,01
	Threonin	under 0,01
35	Asparaginsyre	under 0,01
	Tryptofan	under 0,01
	Cystin	under 0,01

Fotnoter

* : % basert på vann

** : antall ml 1N alkali titrert for nøytralisering
av 100 g prøve

- 5 ***: g aminosyre i 100 g prøve (cystin: permaursyre-
oxydasjonmetode, tryptofan: mikroorganisme-
prøving).

- Selvsagt kan den cellefri sterile supernatant anvendes som hudmedikament uten konsentrering. Fra et lagrings-
10 synspunkt er det imidlertid foretrukket at den cellefri, sterile supernatant konsentreres. Ennvidere kan et høykonsentrat med en konsentreringsgrad på mer enn 25 eller et tørrprodukt anvendes. Slike konsentrater, høykonsentrat eller tørrprodukt, kan anvendes som hudmedikament som sådant.
15 Ennvidere kan et hudmedikament dannes ved å blande et slikt konsentrat, høykonsentrat eller tørrprodukt med en krem, en salvebase eller annen bærer.

- Når et konsentrat dannet ved konsentrering av den cellefri sterile supernatant til en konsentreringsgrad på 4
20 analyseres, sees det at forskjellige aminosyrer og vitaminer er inneholdt deri. Da imidlertid analysen gjøres for fellesbetegnelser vil det lett forstås at selv om de respektive komponenter blandes i henhold til de fundne analyseverdier, kan et hudmedikament ifølge oppfinnelsen ikke fremstilles.
25 Med andre ord er det antatt at aktivitetene av hudmedikamentet fremstilt ifølge oppfinnelsen skyldes ukjente komponenter utenfor analyseresultatene.

- Resultater av toksisitetstesten under anvendelse av kyllingfoster viser at det ovenfor angitte cellefri,
30 sterile konsentrat (konsentreringsgrad på 4) ikke har noen toksisitet. Ennvidere har resultater fra lappetest på det menneskelige legeme og kontinuerlig irritasjonstest på menneskehud vist at konsentratet ikke er toksisk for menneskehud. Ennvidere har resultater fra øyeirritasjonstest på
35 kaniner vist at konsentratet ikke er irriterende. Resultater av antibiotikumtesten har vist at konsentratet ikke inneholder noen antibiotisk substans.

Det er blitt fastslått at hudmedikamentet fremstilt ifølge oppfinnelsen har en legende effekt overfor hudflekker, sprukken hud, kontaktdermatitis og brent hud. Disse legende effekter vil nå bli beskrevet under henvisning til de følgende forsøk.

Lappetest på det menneskelige legeme

50 kvinner (som led av enkelte hudsykdommer eller annet og som gikk til dermatologiske sykehus), som var 23 til 44 år gamle, ble valgt for testen. Klebplaster med en størrelse på 4 x 4 cm og inneholdende ca. 0,2 g konsentrat (konsentrasjonsgrad på 2) fremstilt ifølge oppfinnelsen ble påført på innsiden av venstre overarm og området nær ryggspylen, og etter 48 timer ble plastrene fjernet og de påførte områder ble undersøkt. Hos alle pasienter var innsiden av venstre overarm eller området nær ryggspylen ikke skadelig påvirket.

Kontinuerlig irritasjonstest på menneskehud

Steriliserte gassbiter med et areal på 10 cm² ble impregnert med ca. 5 ml av konsentratet (konsentrasjonsgrad på 2) fremstilt ifølge oppfinnelsen, og de ble påført høyre kinnområde på 45 kvinner som var fra 23 til 45 år gamle (35 kvinner led av en eller annen hudsykdom eller annet og mottok medisinsk behandling ved et dermatologisk hospital, og de gjenværende 10 kvinner var ansatt ved dette hospital) i 15 minutter. Behandlingen ble utført kontinuerlig i 40 dager. Ingen reaksjon ble obsertert hos noen av disse kvinner, og problemer slik som erytheme ble ikke fremkalt.

Øye-irritasjonstest på kanin

3 hvite kaniner ble anvendt som testdyr. På forhånd ble det fastslått at øynene ikke hadde noen unormale tegn. På hver kanin ble det dryppet 0,1 ml av konsentratet (konsentrasjonsgrad på 2) fremstilt ifølge oppfinnelsen i høyre øye, og 0,1 ml av en blindvæske ble dryppet i venstre øye. Umiddelbart etter drypping, og 3, 6, 24, 48 og 72 timer etter drypping, ble begge øyne skjøvet ved anvendelse av en spaltelampe. Unormale tegn slik som kongestion av cornea, iris eller conjunctiva ble ikke observert.

Hudflekktest

621 kvinner som hadde hudflekker i ansiktet, unntatt

pasienter med leversykdommer eller gynekologiske forstyrrelser og gravide kvinner, som fikk behandling mot hudflekker, ble valgt. Etter vasking av ansiktet ble hudporene åpnet med ozon og damp, og gass impregnert med konsentratet (konsentrasjonsgrad 2) av den cellefri supernatant fremstilt ifølge oppfinnelsen ble påført på området med flekker. Den påførte gass ble dekket med en tape av "Saran-Wrap" og infrarød bestråling ble utført i 15 til 20 minutter for å bevirke at konsentratet trengte inn i huden. Denne behandling ble utført én gang i uken og fortsatt i 3 måneder. Det ble funnet at tilstanden var sterkt forbedret hos 363 kvinner (58,4 %), tilstanden var relativt forbedret hos 122 kvinner (19,8 %), ingen forbedring ble observert hos 133 kvinner (21,4 %), tilstanden var forværret i ett tilfelle (0,01 %) og kontakt-dermatitis ble observert hos de gjenværende 2 kvinner (0,03 %) (det ble konstatert at kontakt-dermatitis var blitt fremkalt av grunner som ikke skyldtes denne behandling). Graden av pasienter hvori tilstanden ble betydelig eller relativt forbedret var således så høyt som 80 %. I 60 % av 365 kvinner hvori tilstanden var sterkt forbedret, forsvant ennvidere hudflekkene fullstendig.

Virkning overfor sprukken hud og fine rynker

Vanligvis er kvinner på mer enn 25 til 30 år nervøse når det gjelder sprukken hud og fine rynker, og spesielt hos kvinner på 35 til 40 år er denne tendens iøyenfallende, og selv kvinner på mer enn 40 år er nervøse for sprukken hud og fine rynker. I denne test ble det valgt 962 kvinner som gikk til dermatologisk behandling (150 kvinner på 25 til 30 år, 218 kvinner på 30 til 35 år, 248 kvinner på 35 til 40 år, 172 kvinner på 40 til 50 år og 174 kvinner som var mer enn 45 år gamle). Etter vasking av ansiktet ble hudporene åpnet med ozon og damp, og gass impregnert med konsentratet (konsentrasjonsgrad 2) av den cellefri supernatant fremstilt ifølge oppfinnelsen ble påført tett til huden og gassbindet ble dekket med en tape av "Saran-Wrap". Infrarød bestråling ble utført i 15 til 20 minutter for å bevirke at konsentratet trengte inn i huden. Det ble funnet at etter én behandling var den sprukne hud betydelig forbedret hos 698 kvinner (73 %),

- den sprukne hud var relativt godt forbedret hos 156 kvinner (16 %), tilstanden var ikke forandret hos 72 kvinner (7 %) og tilstanden var ikke forværret hos noen av de testede kvinner hvor de resterende var 36 kvinner (4 %). I lys av
5 det faktum at sprukken hud fører til fine rynker, antas det at konsentratet fremstilt ifølge oppfinnelsen, som er effektivt for behandling av sprukken hud, har en preventiv effekt når det gjelder dannelse av fine rynker.

En test av den legende effekt overfor kontakt-dermatitis

- 10 En 21 års gammel kvinne som hadde utviklet hud-utslett og fnatt på begge øyelokk fra den ene dag til den neste, etter å ha gått over fra én øyenskygge fra firma A til en annen øyenskygge fra firma B, og som ble diagnostisert som kontakt-dermatitis, ble valgt for testen. Gass-
15 bind impregnert med konsentratet (konsentrasjonsgrad 2) av den cellefri supernatant fremstilt ifølge oppfinnelsen ble påført de rammede områder av en dermatolog. Noe steroidmedikament, et anti-inflammatorisk middel eller et anti-histaminmiddel, ble ikke anvendt. Ca. 20 ml av konsentratet ble gitt pasien-
20 ten, og konsentratet ble belagt eller påført i 30 minutter to ganger pr. dag, dvs. morgen og kveld. 48 timer etter starten av behandlingen var fnatt fjernet, og etter 96 timer var hudutslettene hovedsakelig forsvunnet. Etter 1 uke ble det ikke observert noe hudutslett.

25 Aktivitet overfor brannsåar og skoldesår

- En 47 år gammel kvinne som var blitt skoldet av varmt vann på den ytre del av venstre underarm (forbrenningsgrad II) med utslett og svelling med størrelse av en plomme og med små blemmer, kom til dermatolog ca. 1 time etter at
30 hun var skoldet. Det angrepne område ble umiddelbart avkjølt med rennende vann, og gass impregnert med konsentratet (konsentrasjonsgrad 2) av den cellefri, sterile supernatant fremstilt ifølge oppfinnelsen ble påført det angrepne område og oljepapir ble belagt derpå. Deretter ble det angrepne område
35 bandasjert. Etter 24 timer ble det funnet at små blemmer var fullstendig forsvunnet selv om utslett og opphovning fremdeles var til stede, og pasienten klaget ikke lenger på smerte.

En 30 års gammel mann som var blitt skoldet av varmt vann på bakkdelen av høyre fot (forbrenningsgrad II) med utslett og opphovning med en størrelse som et kyllingegg, ble behandlet med konsentratet (konsentrasjonsgrad 2) av den cellefri, sterile supernatant fremstilt ifølge oppfinnelsen på samme måte som ovenfor beskrevet. Etter 24 timer var opphovningen forsvunnet selv om det fremdeles var utslett, og pasienten klaget ikke lenger på noen smerte.

Således ble det bekreftet at konsentratet fremstilt ifølge oppfinnelsen har en legende effekt overfor brannsåre og skoldesår.

Hudmedikamentet og det kosmetiske preparat fremstilt ifølge oppfinnelsen vil bli ytterligere beskrevet i de etterfølgende eksempler.

Eksempel 1

En fermenteringstank med omrører og gjennomluftning og kapasitet på 1 Kl ble fylt med 800 liter av et dyrkningsmedium med samme sammensetning som tidligere beskrevet, og etter varmesterilisering og naturlig avkjøling, ble dette dyrkningsmedium inoculert med podestoff dannet ved utførelse av en preliminær dyrkning ved 28° C i ca. 30 timer i 10 liter av det samme dyrkningsmedium i en liten fermenteringstank med omrøring og gjennomluftning. Deretter ble dyrkningen utført ved 28° C i ca. 70 timer under omrøring og gjennomluftning. Etter endt fermentering ble dyrkningsvæsken ført gjennom en filteranordning modell MP 293-16 (filterpapir Gl-90; 0,5 µm) og gjennom en filteranordning modell MP 293-4 (membranfilter TM-2; 0,45 µm) for å fjerne faste partikler og celler. Det beholdte filtrat ble konsentrert etter den omvendte osmosemembranmetoden under anvendelse av en omvendt osmoseapparat Modell RO-T10 slik at volumet ble redusert til 200 liter. Det beholdte konsentrat ble sterilisert med en varmeveksler av platetypen, pakket sterilt i glasskar og lagret i et kjøleskap (5° C).

Eksempel 2

Det steriliserte konsentrat beholdt i eksempel 1 ble frysetørket, og det beholdte pulver ble blandet med en steril salvebase under dannelsen av en hudsalve.

Eksempel 3

Et kosmetisk preparat ble fremstilt ved å innarbeide 1 g av det steriliserte konsentrat erholdt i eksempel 1 i en kosmetikkbase omfattende 1 g stearinsyre, 7 g bivoks, 4 g selvemulgerbart glycerol-monostearat, 30 g flytende paraffin, 0,1 g vandig lanolin og 40 g destillert vann, hvorpå blandingen ble eltet etter vanlige prosedyrer. Materialet ble helt over i og pakket i ampuller, og de pakkede ampuller ble markedsført.

Eksempel 4

Et medikament for behandling av huden ble fremstilt ved å innarbeide egnede mengder av pyridoxin-hydroklorid, γ -oryzanol, allantoin, DL- α -tocofenol (vitamin E) og minkolje i materialet fremstilt i eksempel 3.

Hudmedikamentet fremstilt ifølge oppfinnelsen som er avledet fra en naturlig forekommende substans, og som har vist seg å være uskadelig, kan anvendes for behandling av hudsykdommer, for behandling av sykdommer på slimhinner og for beskyttelse av epitelet mot miljøforurensning.

P a t e n t k r a v

Fremgangsmåte for fremstilling av et dyrkningsprodukt eller en dyrkningsvæske av en Thricosporon Kashiwayama-stamme
5 (deponert ved FRI under deponeringsnummer 4821), som kan identifiseres som en stamme tilhørende slekten Geotricum eller Endomycopsis, en cellefri steril væske, sterilt filtrat eller steril supernatant av angitte dyrkningsprodukt eller væske, eller et konsentrat eller tørrprodukt derav,
10 k a r a k t e r i s e r t v e d at stammen dyrkes på eller i et dyrkningsmedium som omfatter glucose, skummet melk og gjærekstrakt, under aerobe betingelser ved en pH-verdi på 4,0-6,0 og en temperatur på 20 - 30°C, under dannelse av et dyrkningsprodukt eller en dyrkningsvæske, at eventuelt celler
15 fjernes fra angitte dyrkningsvæske under dannelse av en cellefri steril væske, sterilt filtrat eller steril supernatant, og eventuelt at angitte cellefri sterile væske, sterile filtrat eller sterile supernatant konsentreres eller tørkes.

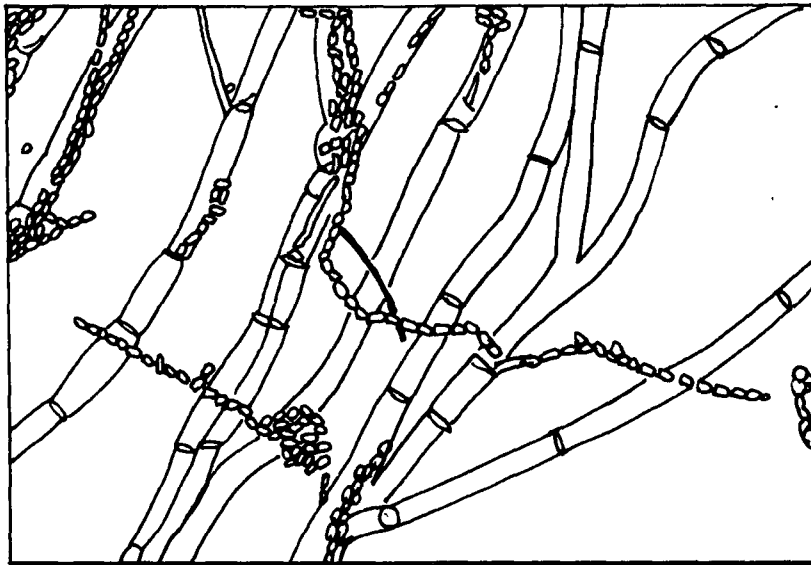
20

25

30

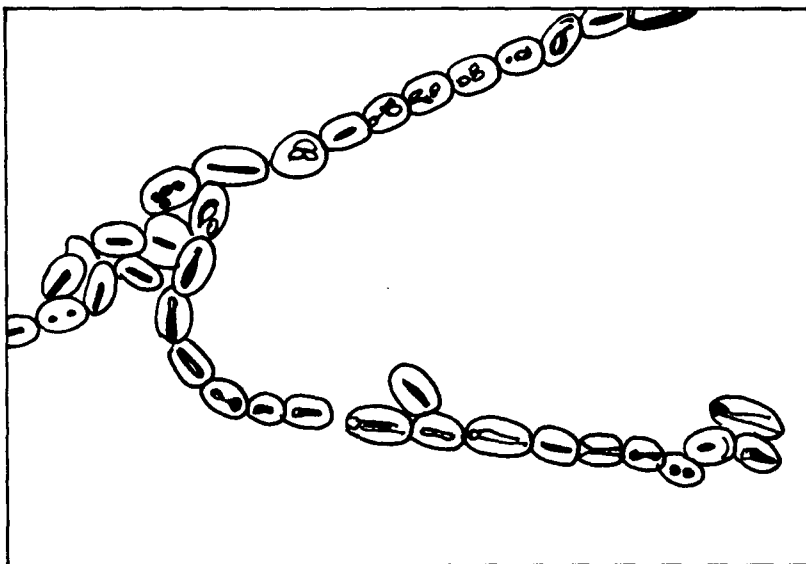
35

FIG. 1



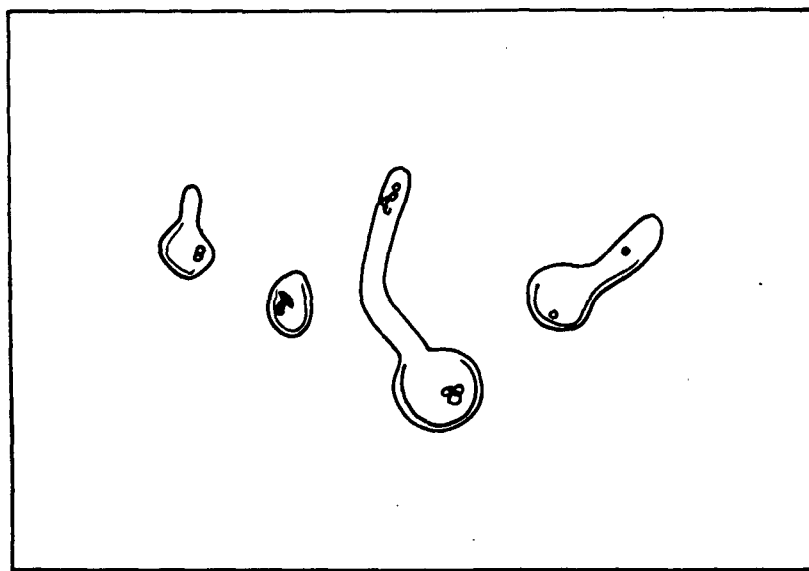
(X 75)

FIG. 2



(X 300)

FIG. 3



(X 300)