

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **037975**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2021.06.18**

**(21)** Номер заявки  
**201990163**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2017.06.29**

**(51)** Int. Cl. **C12N 1/04** (2006.01)  
**C12N 1/20** (2006.01)  
**A61K 9/00** (2006.01)  
**A61K 47/12** (2006.01)  
**A61K 35/74** (2015.01)

---

**(54) КОНСЕРВАЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ**

---

**(31)** 2016/5538

**(32)** 2016.06.30

**(33)** BE

**(43)** 2019.06.28

**(86)** PCT/EP2017/066176

**(87)** WO 2018/002248 2018.01.04

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**ЙЮН НВ; УНИВЕРСИТЕЙТ  
АНТВЕРПЕН (BE)**

**(72)** Изобретатель:  
**Кикенс Филип, Хенкенс Тим, Лебер  
Сара, Клас Ингмар (BE)**

**(74)** Представитель:  
**Носырева Е.Л. (RU)**

**(56)** ANTUNES A. E. C. ET AL.: "Acerola nectar with added microencapsulated probiotic", LWT-FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY, ACADEMIC PRESS, UNITED KINGDOM, vol. 54, no. 1, 29 April 2013 (2013-04-29), pages 125-131, XP028575692, ISSN: 0023-6438, DOI: 10.1016/J.LWT.2013.04.018, cited in the application, the whole document

US-A1-2012263826

WO-A1-2008016214

US-A1-2003152629

---

**(57)** Изобретение относится к области консервации микроорганизмов и, в частности, обеспечивает 2-камерную систему, содержащую первую камеру, содержащую микрокапсулы с микроорганизмами в неводной композиции в ядре указанных микрокапсул, и вторую камеру, содержащую водный раствор органической кислоты. Оно также предусматривает способы консервации микроорганизмов на основе таких систем, а также применения таких систем для консервации микроорганизмов.

---

**B1**

**037975**

**037975**

**B1**

### Область техники

Настоящее изобретение относится к области консервации микроорганизмов и, в частности, предусматривает 2-камерную систему, содержащую первую камеру, содержащую микрокапсулы, содержащие жизнеспособные микроорганизмы в неводной композиции в ядре указанных микрокапсул, и вторую камеру, содержащую водный раствор органической кислоты. Оно также предусматривает способы консервации микроорганизмов на основе таких систем, а также применения таких систем для консервации микроорганизмов.

### Уровень техники

Область применения полезного микроорганизма в качестве пробиотика в медицине расширялась в последние пару десятилетий. Чтобы убедиться в стабильности таких пробиотиков, бактерии необходимо высушить (например, лиофилизировать или высушить распылением) для получения метаболически неактивного состояния. При этом они могут оставаться живыми в течение десятилетий при правильных условиях хранения (например, влажность, температура,...). Путем введения воды порошок бактерий будет повторно активироваться, и бактерии могут выполнять свою функцию. До настоящего времени большинство пробиотических составов применяли для употребления в отношении желудочно-кишечного тракта. Самыми распространенными составами являются капсулы и таблетки, которые можно легко хранить в отсутствие воды и которые можно герметизировать в атмосфере инертных газов, таких как азот или диоксид углерода, чтобы установить хорошую относительную влажность для максимальной стабильности.

С другой стороны, применение пробиотиков в составах для местного применения (или других типа водных) также может иметь огромный потенциал. Одним вариантом может быть составление их в безводных веществах, таких как мази или олеогели, однако пациенты обычно не принимают такие составы. Более приемлемыми составами являются таковые в виде гелей/кремов/пен/лосьонов. Однако такие составы для местного применения по природе содержат большое количество воды, т.е. такое, чтобы подходящим образом быть составленными в гель, крем, пену, лосьон, мазь,... Очевидно, что присутствие таких больших количеств воды в этих составах создает проблему для хранения пробиотиков в их метаболически неактивном состоянии.

Второй проблемой, возникающей в таких водных (например, для местного применения) составах, является то, что они обычно содержат средства, которые не совместимы с выживанием микроорганизмов; такие как консерванты, поверхностно-активные вещества, эмульгаторы,... для защиты таких составов от роста нежелательных микроорганизмов, а также для образования стабильных эмульсий. Однако эти средства, конечно, будут также создавать основную проблему в составах полезных микроорганизмов.

Таким образом, целью настоящего изобретения было предоставление системы, позволяющей длительное хранение микроорганизмов, которая по существу не вредит таким микроорганизмам при ее применении. Неожиданно было обнаружено, что 2-камерная система, содержащая первую камеру, содержащую микрокапсулы, содержащие нерастворимую в воде и непроницаемую для воды оболочку, и микроорганизмы, содержащиеся в неводной композиции в ядре указанных микрокапсул; и вторую камеру, содержащую (или состоящую из) водную композицию, содержащую одну или более органических кислот (с pH менее 7,0 и которая по существу не содержит буферных средств), обеспечивает решение вышеуказанных проблем. В частности, было обнаружено, что такая система обеспечивает длительное хранение микроорганизмов, поскольку при хранении они защищаются от воздействия воды, поскольку содержатся в камере, не содержащей воду. Затем при объединении содержимого обеих камер для применения неожиданно было обнаружено, что органические кислоты, которые служат для консервации при хранении, не сразу повреждают высвободившиеся микроорганизмы, которые становятся активными из-за водного компонента в указанной второй композиции. Это отличает их от других классов консервантов, которые имеют очень прямой механизм действия на микроорганизмы.

Кроме того, хотя составы согласно настоящему изобретению особенно пригодны для местных применений пробиотиков, идея изобретения может также распространяться на другие области, в которых возникает проблема консервации/стабилизации микроорганизмов в водной среде. Таким образом, эти проблемы решаются посредством составления их в 2-камерной системе, как определено в настоящем изобретении.

Хотя идея составления микроорганизмов в 2-камерной системе уже была раскрыта, в уровне техники не представлено решение для защиты микроорганизмов при объединении содержимого обеих камер. В частности, водный компонент, требуемый для активации микроорганизмов, часто является очень агрессивным для микроорганизмов и главным образом содержит консерванты, поверхностно-активные вещества,... которые не совместимы с длительным временем жизни таких микроорганизмов. Напротив, из-за выбора органических кислот в качестве консерванта было обнаружено, что нет необходимости во включении дополнительных консервантов, поверхностно-активных веществ или других вредных компонентов, хотя необходимая стабильность таких составов сохраняется.

Antunes et al., 2013 (Food Science and Technology 54: 125-131) описали процесс микроинкапсуляции, в котором суспензию бактерий иммобилизируют в ацетате целлюлозы вместе с глицерином, мальтодекстрином, твином,... При сушке распылением суспензию бактерий распыляют с применением одной фор-

сунки в нагретой области (100-200°C). При этом вода в суспензии испаряется и получается сухой порошок бактерий. Полученный порошок подобен матрице, содержащей указанные микроорганизмы, вместо микрокапсул, содержащих нерастворимую в воде и непроницаемую для воды оболочку, и микроорганизмов, содержащихся в неводной композиции в ядре указанных микрокапсул.

В патенте под № US 2012263826 описан раствор для перорального применения, содержащий по меньшей мере один водный раствор и желеобразные капсулы, содержащие альгинат, сывороточные белки и пробиотики. Такие желеобразные капсулы фактически являются 1-фазной гелевой частицей (т.е. матрицей, содержащей пробиотики), а не 2-камерной системой, как раскрыто в данном документе, где пробиотики содержатся в безводном ядре указанной капсулы.

#### **Краткое описание изобретения**

В первом аспекте настоящее изобретение предусматривает 2-камерную систему, состоящую из первой камеры, содержащей микрокапсулы, содержащие нерастворимую в воде и непроницаемую для воды оболочку, также содержащие микроорганизмы в неводной композиции в ядре указанных микрокапсул; и

второй камеры, содержащей водную композицию, характеризующуюся рН менее 7,0 и содержащую одну или более органических кислот;

где указанная вторая камера по существу не содержит буферных средств.

В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения указанная вторая водная композиция характеризуется значением рН, составляющим менее 5,5, предпочтительно менее 5,0, более предпочтительно менее 4,5.

В другом конкретном варианте осуществления указанную одну или более органических кислот выбирают из списка, включающего бензойную кислоту, сорбиновую кислоту, лимонную кислоту, уксусную кислоту, молочную кислоту, шавелевую кислоту, муравьиную кислоту, дегидроуксусную кислоту, фумаровую кислоту, анисовую кислоту, глюконовую кислоту, яблочную кислоту, янтарную кислоту, виннокаменную кислоту, фосфорную кислоту и пропионовую кислоту и их производные.

В еще одном варианте осуществления указанные микроорганизмы являются пробиотическими микроорганизмами, более предпочтительно выбранными из списка, включающего *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus rhamnosus* и *Lactobacillus plantarum*.

В конкретном варианте осуществления указанная первая камера (по существу) является непроницаемой для воды и кислорода.

В другом конкретном варианте осуществления указанная нерастворимая в воде и непроницаемая для воды оболочка микрокапсул согласно настоящему изобретению состоит из альгината, кантановой камеди, аравийской камеди, геллановой камеди, каррагена, желатина, целлюлозы или ее производных; или полимеров на основе агара, белков, полиола, желатина, PVA (поливинилового спирта), PLGA (сополимера молочной и гликолевой кислоты), PLA (полимолочной кислоты) и их производных, PCL, полиизогексилцианоакрилата, производных акрилата или крахмала, необязательно в комбинации с хитозаном, или твердыми жирами.

В конкретном варианте осуществления 2-камерная система согласно настоящему изобретению находится в форме геля, крема, пены, лосьона или мази, содержащей указанные микрокапсулы.

В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения неводная композиция выбрана из списка, включающего растительные масла, минеральные масла, силиконовые масла или гидрофильные полимеры; в частности каприновые/каприловые триглицериды, жидкий парафин, полиэтиленгликоль, силиконы или твердые жиры.

В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения указанная одна или более органических кислот служат в качестве консерванта и указанная композиция по существу не содержит дополнительных консервантов.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение предусматривает способ консервации жизнеспособного микроорганизма, предусматривающий

предоставление 2-камерной системы;

включение указанных жизнеспособных микроорганизмов в первую камеру, содержащую микрокапсулы, содержащие нерастворимую в воде и непроницаемую для воды оболочку, и микроорганизмы, содержащиеся в неводной композиции в ядре указанных микрокапсул;

включение одной или более органических кислот в водную композицию во второй камере указанной 2-камерной системы в количестве, достаточном для достижения рН менее 7,0; причем указанная вторая камера по существу не содержит буферных средств.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение предусматривает применение комбинации микрокапсул, содержащих неводную композицию, охватывающую жизнеспособные микроорганизмы; и водной композиции, содержащей одну или более органических кислот, характеризующихся рН менее 7,0, для консервации указанной водной композиции, без повреждения указанных микроорганизмов.

#### **Краткое описание графических материалов**

Посредством конкретной ссылки на фигуры подчеркивается, что показанные подробности приведены лишь с помощью примера и в целях иллюстративного рассмотрения различных вариантов осуществ-

ления настоящего изобретения. Они приведены по причине представления того, что считается наиболее применимым и легко доступным описанием идей и концептуальных аспектов настоящего изобретения. В связи с этим не предпринимается попытка показать структурные детали настоящего изобретения подробнее, чем это необходимо для фундаментального понимания настоящего изобретения. Описание, взятое совместно с графическими материалами, поясняет специалистам в данной области техники, как можно реализовать на практике несколько форм настоящего изобретения.

Фиг. 1 - стабильность микроорганизмов в силиконе; А) CF 1406, В) CF6570;

фиг. 2 - стабильность микроорганизмов в маслах; А) Подсолнечное масло, В) Miglyol 812N;

фиг. 3 - стабильность микроорганизмов в полярной среде; А) PEG400, В) Глицерин;

фиг. 4 - стабильность микроорганизмов в твердых жирах; А) Whitesol h15, В) Hydrobase 32/34.

#### **Подробное описание изобретения**

Как уже было подробно описано выше в данном документе, в первом аспекте настоящее изобретение предусматривает 2-камерную систему, состоящую из

первой камеры, содержащей микрокапсулы, содержащие нерастворимую в воде и непроницаемую для воды оболочку, и микроорганизмы, содержащиеся в неводной композиции в ядре указанных микрокапсул; и

второй камеры, содержащей водную композицию, характеризующуюся рН менее 7,0 и содержащую одну или более органических кислот;

где указанная вторая камера по существу не содержит буферных средств.

Более конкретно, настоящее изобретение обеспечивает 2-камерную систему, как определено в данном документе, состоящую из

микрокапсул, имеющих нерастворимую в воде и непроницаемую для воды оболочку, и микроорганизмов, содержащихся в неводной композиции в ядре указанной оболочки; и

водной композиции, характеризующейся рН менее 7,0 и содержащей одну или более органических кислот;

где указанная водная композиция по существу не содержит буферные средства.

Еще более конкретно, настоящее изобретение предусматривает 2-камерную систему, как определено в данном документе, состоящую из:

микрокапсул, которые могут иметь нерастворимую в воде и непроницаемую для воды оболочку, и микроорганизмов, содержащихся в неводной композиции в ядре указанной оболочки; и

водной композиции, характеризующейся рН менее 7,0 и содержащей одну или более органических кислот;

где указанная водная композиция по существу не содержит буферные средства.

В контексте настоящего изобретения термины "нерастворимые в воде" и "непроницаемые для воды" микрокапсулы следует понимать как водонепроницаемые. В частности, водонепроницаемые капсулы можно описать как не разлагающиеся при суспендировании в указанной второй водной камере. Тем не менее, микрокапсулы при использовании в данном документе могут (и обычно будут) разлагаться, например терять их нерастворимость при некоторых стрессовых условиях, таких как концентрации солей или механическое напряжение сдвига, при этом высвобождая их активное содержимое, например, с применением высвобождения капсул, как описано в данном документе.

В контексте настоящего изобретения термин "водная композиция" означает состав, содержащий воду. В частности, указанные составы содержат значительное количество воды, такое как по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% воды. Следовательно, термин "неводная композиция" означает состав, который не содержит значительных количеств воды, например, не более 10%, предпочтительно не более 5%, еще более предпочтительно не более 2%, наиболее предпочтительно он не содержит воду совсем, т.е. 0%.

В контексте настоящего изобретения термин микроорганизм относится к "жизнеспособным" микроорганизмам, которые являются живыми, и не подразумевает фрагменты, супернатанты культур или их инактивированные формы. Указанный жизнеспособный микроорганизм предпочтительно лиофилизирован для улучшения его консервации.

В контексте настоящего изобретения термин "органическая кислота" означает органическое соединение с кислыми свойствами. В контексте настоящего изобретения очевидно, что можно применять любую пригодную органическую кислоту, если она может выступать в качестве консерванта.

Было обнаружено, что эти органические кислоты имеют медленный механизм действия на микроорганизмы и что они не сразу повреждают (пробиотические) микроорганизмы при вступлении их в контакт с этими органическими кислотами. После более длительного воздействия среды, такой как кожа, органические кислоты теряют свою активность, тем самым также не повреждая (пробиотические) микроорганизмы в течение более длительного периода времени. Хотя настоящее изобретение предпочтительно реализуют на практике с применением органической кислоты в качестве консерванта (поскольку было обнаружено, что она теряет свою активность после воздействия среды), его можно также реализовывать на практике посредством применения другого консерванта, если он имеет медленный механизм

действия, например, такой, что требует по меньшей мере 24 ч, чтобы стать активным.

В отношении использования органических кислот составы предпочтительно по существу не содержат буферных средств. Присутствие буферного средства будет поддерживать композиции при низком pH в течение более длительного периода времени, тем самым ингибирование консервирующего действия органических кислот занимает больше времени, и, таким образом, увеличивается риск повреждения микроорганизмов при их вступлении в контакт с органическими кислотами. Хотя большинство компонентов будут иметь небольшой эффект забуферивания, является желательным выбирать компоненты композиций так, что они значительно не снижают или не увеличивают время, необходимое для инактивации органических кислот.

Особенно пригодные органические кислоты являются такими, которые выбирают из списка, включающего бензойную кислоту, сорбиновую кислоту, лимонную кислоту, уксусную кислоту, молочную кислоту, анисовую кислоту, щавелевую кислоту, муравьиную кислоту, дегидроуксусную кислоту, фумаровую кислоту, глюконовую кислоту, яблочную кислоту, янтарную кислоту, виннокаменную кислоту, фосфорную кислоту и пропионовую кислоту и их производные. Более конкретно указанные органические кислоты выбирают из списка, включающего бензойную кислоту, сорбиновую кислоту, лимонную кислоту, уксусную кислоту, молочную кислоту, анисовую кислоту, щавелевую кислоту, муравьиную кислоту, дегидроуксусную кислоту, фумаровую кислоту, глюконовую кислоту, яблочную кислоту, янтарную кислоту, виннокаменную кислоту, фосфорную кислоту и пропионовую кислоту и их производные, такие как сорбиновая кислота.

В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения pH второй водной композиции согласно настоящему изобретению составляет менее 5,5, предпочтительно менее 5,0, более предпочтительно менее 4,5, менее 4,0 или менее 3,5. pH составов очень важен в контексте настоящего изобретения. Обычно чем ниже pH, тем выше его консервирующее действие, которое, тем самым, способствует длительной стабильности составов согласно настоящему изобретению. Желательный pH получают посредством совместного составления органических кислот, которые, таким образом, предназначены для применения в качестве консервирующего средства в составах. Из-за присутствия этих органических кислот было обнаружено, что не было дополнительной необходимости во включении дополнительных консервантов, таким образом, состав настоящего изобретения предпочтительно по существу не содержит других консервантов, кроме органических кислот. Кроме того, композиция, конечно, также по существу не содержит других компонентов, которые вредны для микроорганизмов, таких как феноксиэтанол, бренидокс, изотиазолиноны и лауретсульфат натрия; которые очень часто используют в составах для местного применения.

В предпочтительном варианте осуществления жизнеспособные микроорганизмы согласно настоящему изобретению представляют собой жизнеспособные пробиотические микроорганизмы.

В контексте настоящего изобретения термин "пробиотик" подразумевает включение микроорганизмов, которые обеспечивают полезные для здоровья эффекты при использовании в отношении людей или ветеринарии. Составы согласно настоящему изобретению являются в высокой степени пригодными в случае, когда требуется получить состав, содержащий любые известные пробиотические микроорганизмы, такие как, без ограничения, *Lactobacilli*, более конкретно *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus rhamnosus* и/или *Lactobacillus plantarum*. Очевидно, что составы согласно настоящему изобретению могут содержать только один вид пробиотических микроорганизмов, или их комбинации, в зависимости от предполагаемого использования.

Для увеличения стабильности микроорганизмов в первой камере указанная первая камера предпочтительно (по существу) является непроницаемой для воды и кислорода.

В контексте настоящего изобретения термины "микроинкапсулированный" или "микрокапсулы" означает относящийся к продуктам, полученным с помощью способа микроинкапсуляции. Это процесс, в котором частицы или капли микроразмера (в микрометровом диапазоне) окружают покрытием для получения небольших капсул со многими полезными свойствами. В контексте настоящего изобретения их используют для включения пробиотических микроорганизмов. В относительно простой форме микрокапсула является небольшой сферой с равномерной стенкой вокруг нее. Материал внутри микрокапсулы называется ядром, внутренней фазой или наполнителем; тогда как стенка называется оболочкой, покрытием или мембраной.

Специалист в данной области хорошо знает тот факт, что существует несколько способов изготовления микрокапсул и что настоящее изобретение не ограничено никаким из этих способов. Способы микроинкапсуляции, пригодные в контексте настоящего изобретения, включают, без ограничения, нанесение покрытия, нанесение покрытия методом распыления, экструзию в центрифуге, применение вибрирующей форсунки, высушивание распылением, ионотропную желатинизацию, фазовое разделение при коацервации, межфазную поликонденсацию, межфазное сшивание, полимеризацию *in-situ*, матричную полимеризацию.

Исходной целью микроинкапсуляции является отделение ядра от его окружающей среды, в настоящем изобретении в частности для защиты инкапсулированных микроорганизмов от консервирующего действия окружающих органических кислот и для защиты их от активации в водной среде. Очевидно,

что при использовании стенки микрокапсул необходимо подвергать разрыву для высвобождения микроорганизмов и позволять им действовать, как необходимо. Такой разрыв предпочтительно получают с помощью низкого давления, трения или напряжения сдвига во время применения, например, при применении составов в отношении кожи или других участков для местного применения.

В этой простейшей форме микрокапсулы согласно настоящему изобретению содержат нерастворимую в воде и непроницаемую для воды оболочку с микроорганизмами, содержащимися в неводной композиции в ядре указанных микрокапсул. При необходимости, однако, микрокапсулы могут содержать дополнительные слои, такие как, например, дополнительный покровный слой, для увеличения защиты содержимого.

В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения указанные микрокапсулы содержат нерастворимую в воде и непроницаемую для воды оболочку; и указанные микроорганизмы содержатся в неводной композиции в ядре указанных микрокапсул. Присутствие воды является достаточным для повторной активации лиофилизированных бактерий, таким образом важно составлять их в отсутствие воды, тем самым обеспечивая их длительное хранение. Указанная нерастворимая в воде и непроницаемая для воды оболочка может состоять из любых пригодных материалов, таких как, без ограничения, альгинат, ксантановая камедь, аравийская камедь, геллановая камедь, карраген, желатин, целлюлоза или ее производные; или полимеры на основе агара, белков, полиола, желатина, PVA (поливинилового спирта), PLGA (сополимера молочной и гликолевой кислоты), PLA (полимолочной кислоты) и их производных, PCL, полиизогексилцианоакрилата, производных акрилата или крахмала, или твердые жиры, такие как, например, witepsol или hydrobase.

Хотя эти компоненты можно использовать как таковые, их можно также объединять друг с другом или можно сшивать с полимерами или хитозаном. Такое дополнительное сшивание может усиливать прочность микрокапсул. Кроме того, для защиты содержимого микрокапсул (т.е. микроорганизмов) еще больше от воды и воздуха капсулы могут необязательно быть покрыты пригодным покрытием.

Как указано ранее в данном документе, микроорганизмы следует хранить в отсутствие воды для обеспечения длительного хранения. Таким образом, ядро микрокапсул настоящего изобретения предпочтительно является безводной средой, такой как, без ограничения, растительные масла, минеральные масла, силиконовые масла или гидрофильные полимеры; в частности каприновые/каприловые триглицериды, жидкий парафин, полиэтиленгликоль, силиконы или твердые жиры, такие как, например, witepsol или hydrobase.

Присутствие консерванта, конечно, очень важно для длительного хранения составов, однако вызывает серьезную проблему для составления микроорганизмов, таких как пробиотики. В качестве решения этого было обнаружено, что микроинкапсуляция (пробиотических) микроорганизмов и обеспечение таких микрокапсул в составе, содержащем органические кислоты, достаточно для гарантии длительного хранения составов, без препятствования активности микроорганизмов. Даже при применении состава и высвобождении микроорганизмов последние не задерживаются совместно составленными органическими кислотами, поскольку они быстро теряют свою активность при использовании, например, из-за буферизирующей способности кожи. Таким образом, органические кислоты согласно настоящему изобретению предназначены для применения в целях консервации и состав по существу не содержит дополнительных консервантов, которые могут препятствовать активности микроорганизмов после высвобождения из микрокапсул.

Таким образом, в конкретном варианте осуществления настоящего изобретения указанная органическая кислота служит для консервации и состав по существу не содержит дополнительных консервантов.

Составы согласно настоящему изобретению являются особенно пригодными для местного применения, поскольку такие составы обычно содержат большого количества воды. Таким образом, в конкретном варианте осуществления водный состав согласно настоящему изобретению является водным составом для местного применения.

В контексте настоящего изобретения термин "местный" означает местную доставку в определенном месте на теле, в частности нанесение на конкретное место на или в теле. В частности, это включает нанесение на слизистые мембраны водных, т.е. нетвердых, составов, таких как кремы, пены, гели, лосьоны или мази, или любой другой тип содержащего воду состава. Очевидно, что термин "местный" не подразумевает включение доставки в виде твердых препаратов, таких как капсулы, таблетки, ...

Составы пробиотиков для местного применения согласно настоящему изобретению могут быть в любой пригодной форме, такой как, без ограничения, гель, крем, пена, лосьон или мазь, содержащей указанные микрокапсулы.

Как подробно описано выше в данном документе, открытие согласно настоящему изобретению состоит в том, что состав микроорганизмов такой, что не вступает в контакт с водным компонентом в 2-камерной системе, в комбинации с применением органической кислоты является достаточным для обеспечения длительного хранения состава, по существу не повреждая (пробиотические) микроорганизмы.

При этом в дополнительном аспекте настоящее изобретение предусматривает способ консервации жизнеспособного микроорганизма, предусматривающий

предоставление 2-камерной системы;

включение указанных жизнеспособных микроорганизмов в первую камеру, содержащую микрокапсулы, содержащие нерастворимую в воде и непроницаемую для воды оболочку, и микроорганизмы, содержащиеся в неводной композиции в ядре указанных микрокапсул;

включение одной или более органических кислот в водную композицию во второй камере указанной 2-камерной системы в количестве, достаточном для достижения pH менее 7,0; причем указанная вторая камера по существу не содержит буферных средств.

В конечном аспекте настоящее изобретение предусматривает применение комбинации микрокапсул, охватывающих жизнеспособный (пробиотический) микроорганизм, и одной или более органических кислот в водном составе с pH менее 7; более конкретно для консервации водной композиции без повреждения указанных микроорганизмов в указанных микрокапсулах.

Составы согласно настоящему изобретению являются, в частности, в высокой степени пригодными для местного введения, которое включает непосредственное нанесение на кожу или слизистую оболочку, такую как влагалище.

Пригодные формы введения - которые могут быть полутвердыми или жидкими, в зависимости от способа введения - а также способы и носители, разбавители и вспомогательные вещества для применения при их получении, будут очевидны специалисту в данной области; ссылку снова делают, например, на US-A-6372778, US-A-6369086, US-A-6369087 и US-A-6372733, а также на стандартные справочники, такие как последнее издание Remington's Pharmaceutical Sciences.

Некоторые предпочтительные, но неограничивающие примеры таких препаратов включают эликсиры, суспензии, эмульсии, растворы, сиропы, мази, крема, лосьоны, которые можно составлять с носителями, вспомогательными веществами и разбавителями, которые являются пригодными сами по себе для таких составов, такие как лактоза, декстроза, сахароза, сорбит, маннит, крахмалы, аравийская камедь, альгинаты, трагакант, желатин, полиэтиленгликоль, целлюлоза, (стерильная) вода, метилцеллюлоза, пищевые масла, растительные масла и минеральные масла или их пригодные смеси.

Составы согласно настоящему изобретению могут необязательно содержать другие компоненты, такие как лекарственные средства и/или пребиотики, например, для стимуляции роста микроорганизмов.

Составы могут необязательно содержать другие вещества, которые обычно применяют в фармацевтических составах, такие как смачивающие средства, эмульгирующие и суспендирующие средства, диспергирующие средства. Однако очень важно, чтобы такие дополнительные вещества по существу не повреждали пробиотические организмы ни при хранении композиции, ни при ее применении.

Более конкретно, композиции могут состояться в фармацевтический состав, содержащий частицы, состоящие из твердой дисперсии микроорганизмов согласно настоящему изобретению и одного или более фармацевтически пригодных растворимых в воде полимеров.

Термин "твердая дисперсия" определяет систему в твердом состоянии (в отличие от жидкого или газообразного состояния), содержащую по меньшей мере два компонента, причем один компонент диспергируется более или менее равномерно в другом компоненте или компонентах.

Также может быть удобно составлять микроорганизмы в виде микрочастиц, которые имеют модификатор поверхности, адсорбированный на их поверхности в количестве, достаточном для поддержания эффективного среднего размера частиц, составляющего приблизительно 1-5000 мкм. Пригодные модификаторы поверхности можно предпочтительно выбирать из известных органических и неорганических фармацевтических вспомогательных веществ. Такие вспомогательные вещества включают различные полимеры, низкомолекулярные олигомеры, натуральные продукты и поверхностно-активные вещества, такие как неионные и анионные поверхностно-активные вещества.

Настоящее изобретение будет теперь проиллюстрировано с помощью следующих синтетических и биологических примеров, которые никоим образом не ограничивают объем настоящего изобретения.

### **Примеры**

Пример 1. Выбор неводной композиции для первой камеры

Целью этого примера был выбор пригодной неводной композиции для включения жизнеспособных микроорганизмов, которая обеспечивает их длительную стабильность и жизнеспособность.

### **Материал и способы**

#### **Исследование стабильности**

В данном исследовании стабильности применяли три штамма:

Самокультивируемый *L. pentosus* (т.е. *lac4* или *Lp*)

Самокультивируемый LGG (т.е. *lac7* или LGG)

#### **Закупаемый лиофилизированный LGG**

Восемь различных безводных сред для суспензии для консервации бактерий тестировали при комнатной температуре (+/- 20°C). Применяемую среду для суспензии можно подразделить на 4 типа, для которых в каждой группе 2 подтипа сравнивали следующим образом:

Силиконы:

Косметическая жидкость 1406 (диметиконол и диметикон) - от Chemsil

Косметическая жидкость 6570 (дисилоксан, трисилоксан, циклопентасилоксан и диметикон) - от Chem-

sil

Масла:

Подсолнечное масло - от Everyday Migyol 812 N - от Hüls

Полярные растворители: PEG 400 - от Roth Глицерин - от Fagron

Твердые жиры:

Witepsol H15 - от VW chemicals Hydrobase 32/34 - от Prod'hyg laboratoires

Образцы получали в 9 заранее определенных моментах времени:

T0 = перед суспендированием в среде для суспензии

T1 = 1 день после суспендирования

T2 = 1 неделя после суспендирования

T3 = 2 недели после суспендирования

T4 = 1 месяц после суспендирования

T5 = 2 месяца после суспендирования

T6 = 6 месяцев после суспендирования

T7 = 12 месяцев после суспендирования

T8 = 24 месяца

Все применяемые материалы стерилизовали перед применением посредством автоклавирования.

Все применяемые компоненты, ингредиенты,... автоклавировали по возможности, и в ином случае фильтровали в стерильных условиях.

#### **Определение CFU в момент T0**

Лас 4 и Лас 7 культивировали в жидкой среде MRS (de MAN, Rogosa & Sharpe) (37°C) до полного вырастания. Среду центрифугировали в течение 10 мин при 2780 G. Супернатант удаляли и гранулы бактерий применяли далее.

100 мг взвешивали и разбавляли физиологическим раствором (0,85% NaCl) для получения общего объема, составляющего 10 мл. Из трех штаммов (лас 4, лас 7 и LGG) получали серии разбавлений (10-кратные серийные разбавления) и чашечный подсчет проводили согласно поверхностному методу (обусловленному методами 2.6.12 и 2.6.13 фармакопеи). Измерения проводили в трех повторностях. Результаты выражены как КОЕ/г порошка.

#### **Суспендирование бактерий в среде для суспензии**

С полученными бактериальными массами гомогенное разбавление 1/10 (мас./мас.%) получали с различными безводными средами для суспензии. 1 г указанной суспензии взвешивали в пробирке falcon и герметизировали в алюминиевом пакете (RH = 20%). Каждый образец содержал 100 мг бактерий для дальнейшего тестирования. Алюминиевые пакеты открывали через определенные интервалы времени для тестирования жизнеспособности.

#### **Тестирование после истечения времени хранения**

Герметичные пакеты открывали в определенные моменты времени для тестирования стабильности. Пробирку falcon, содержащую 1 г безводного вещества, дополнительно обрабатывали путем добавления 1 г смеси эмульгаторов (состоящей из полисорбата 80 и сорбитансесквиолеата) и 8 г физиологического раствора. Это образовало эмульсию, с помощью которой бактерии могли вступать в контакт с водой и повторно активироваться. Дальнейшее получение образца и чашечный подсчет проходили, как описано выше и как обусловлено методом 2.6.12 фармакопеи: микробиологическое исследование нестерильных продуктов: тесты подсчета микробов и 2.6.13: микробиологическое исследование нестерильных продуктов: тест для определенных микроорганизмов.

#### **Результаты и обсуждение**

Стабильность лиофилизированного порошка была значительно более высокой, чем предполагалось по сравнению со стабильностью штаммов "как таковых". Только через 1 месяц, было в среднем зафиксировано 3-кратное логарифмическое снижение, тогда как не было обнаруживаемого снижения для лиофилизированного штамма. При этом доказано, что важно начинать составление с надлежащим образом лиофилизированным (или высушенным с помощью другого метода сушки) порошком, чтобы обеспечить стабильный состав жизнеспособных микроорганизмов с течением времени.

Таким образом, только результаты лиофилизированного штамма LGG будут обсуждаться далее.

Результаты касательно стабильности были сравнимы для силиконовых смесей (фиг. 1), масел (фиг. 2) и твердых жиров (фиг. 3). Из гидрофильных сред (фиг. 3) только PEG 400 представлялся пригодным в качестве суспендирующей среды, в отличие от глицерина, который отрицательно влиял на стабильность FD 1GG.

В среднем фиксировали 1-кратное логарифмическое снижение стабильности было через 1 год для различных безводных сред. Это оставляет достаточно жизнеспособных микроорганизмов для местного нанесения и оказывает положительное воздействие на кожу.

При этом доказано, что работая с надлежащим образом лиофилизированным порошком, суспендированным в безводной среде, защищенным от света, влаги и консервантов, можно получить фазу/камеру со стабильными пробиотиками. Эта камера может быть или в 2-фазной системе, где присутствуют *in situ* смешанные водная и безводная фаза, или в виде капсул, суспендированных в составе.

## Пример 2. Выбор водной композиции для второй камеры

Целью является получение состава для местного применения с жизнеспособными микроорганизмами, который можно наносить на кожу, где они будут проявлять положительное воздействие. Состав для местного применения, такой как крем, обычно содержит масло, воду, консерванты и эмульгаторы. Присутствие эмульгаторов и консервантов может отрицательно влиять на стабильность присутствующих лиофилизированных микроорганизмов. Одним из способов гарантировать определенный срок годности является суспендирование лиофилизированных пробиотиков в безводной среде (см. также пример 1). Эта безводная суспензия будет обеспечивать хорошую стабильность для лиофилизированных микроорганизмов. Для предотвращения отрицательного влияния других компонентов в составе для местного применения указанную безводную суспензию лучше всего отделять от остатка состава, или посредством физического разделения фаз, или посредством инкапсуляции указанной безводной суспензии. Капсулы можно затем суспендировать в составе для местного применения.

При условии, что фазы разделяются, можно получить продукт для местного применения с длительным сроком годности с жизнеспособными микроорганизмами. Проблема может возникнуть, когда 2 фазы смешиваются перед нанесением на кожу. Лиофилизированные пробиотики будут активироваться посредством поглощения воды из состава, но также сталкиваясь с присутствующими эмульгаторами и консервантами, уничтожая активированные микроорганизмы и предотвращая их положительное воздействие на кожу.

Этот эксперимент представляет собой скрининг для определения краткосрочного эффекта (10 мин - > 1 день) различных составов на выживание лиофилизированных пробиотиков.

### 1. Метод

#### 1.1 Эксперимент А

Этот эксперимент являлся имитацией, где жизнеспособные, лиофилизированные микроорганизмы сохраняли стабильными в безводной суспензии, а затем смешивали с составом, содержащим различные консерванты и эмульгаторы. Три стандартных препарата TMF инкубировали с 10% (мас./мас.) лиофилизированным LGG. Составы TMF широко используются (Бельгия) и рассматриваются в качестве безопасных и стабильных составов для местной доставки лекарственных средств. Образец состава отбирали через 10 мин и через 24 ч для определения жизнеспособности, и, таким образом, краткосрочного бактерицидного действия указанных составов. Нанесение местных для местного применения обычно происходит каждый день. Таким образом, образцы не отбирали после 24 ч. Получение образца и определение КОЕ (чашечный подсчет) проводили согласно поверхностному методу (обусловленному методами 2.6.12 и 2.6.13 фармакопей). Измерения проводили в трех повторностях. Результаты выражены как КОЕ/грамм порошка.

Композиция тестируемых кремов была следующей:

Крем А: забуференный цетомacroголевый крем – С органической кислотой	
Ингредиент	%
Цетостеариловый спирт	7,2
Цетомacroгол	1,8
Белый вазелин	15
Жидкий парафин	6
Сорбат калия	0,27
Дигидрофосфат натрия	0,3
NaOH/ фосфорная кислота в количестве, достаточном для обеспечения pH 5	Достаточное количество

Очищенная вода	до 100
----------------	--------

Крем В: Анионный гидрофильный крем – БЕЗ органической кислоты	
Ингредиент	%
Цетостеариловый спирт	15
Глицерин	5
Лаурилсульфат натрия	1,5
Метилпарабены	0,06
Пропилпарабены	0,03
Очищенная вода	до 100

Крем С : АВА крем - С органической кислотой	
Ингредиент	%
Белый вазелин	54
Сорбитансесквиолеат	6
Сорбиновая кислота	0,27
Очищенная вода	до 100

## 1.2 Эксперимент В

Для расширения платформы скрининга эксперимента А эксперимент А повторяли с коммерчески доступными составами, содержащими различные консерванты и эмульгаторы. Проведение эксперимента является таким же, как описано в 2.1. Крем А из эксперимента А брали в качестве эталона. Другие фармацевтические основы для кремов (1-5) отбирали, а также сравнивали с коммерчески доступными косметическими составами (6-11), как подробно описано в следующей таблице:

1) Забуференный цетомacroголевый крем
2) Крем Lanette
3) Карбомер-гель
4) Nourivan
5) Pentravan
6) Коммерческая косметическая композиция 1 (CCC1)
7) CCC2
8) CCC3
9) CCC4
10) CCC5
11) CCC6

## 2. Результаты

### 2.1 Эксперимент А

Выживание	10 минут	24 часа
Холостой образец	2,0E+11	9,5E+10
Крем А	1,7E+11	7,9E+10
Крем В	1,0E+11	3,1E+08
Крем С	1,2E+11	3,2E+10

Выживание лиофилизированного LGG, как было видно, только минимально изменялось после суспендирования в течение 10 мин в вышеуказанных составах. Не было заметно практически никакого снижения для крема А через 24 ч. Незначительное снижение ( $\pm 0,5$ -кратное логарифмическое снижение) отмечали для крема С и большое снижение ( $\pm 3$ -кратное логарифмическое снижение) для крема В. Как крем А, так и крем С содержат органическую кислоту - сорбиновую кислоту - в качестве консерванта, в отличие от крема В, который содержит парабены в качестве консерванта и лаурилсульфат натрия (анионный эмульгатор с известными противомикробными свойствами).

В целом можно сделать вывод, что органические кислоты имеют медленный механизм действия

(время, необходимое, чтобы быть эффективными, составляет 1-3 дня (данные не показаны)) и могут, таким образом, рассматриваться как безопасный консервант для использования в составах для местного применения в комбинации с лиофилизированными микроорганизмами. Состав А предлагается для дальнейших испытаний касательно комбинации лиофилизированных пробиотиков в составе для местного применения.

## 2.2 Эксперимент В

Выживание	10 минут	24 часа
Холостой образец	9,4E+10	
1) Забуференный цетомacroголевый крем	1,2E+11	7,8E+10
2) Крем Lanette	2,8E+10	0,0E+00
3) Карбомер-гель	2,3E+10	5,1E+09
4) Nourivan	4,9E+10	1,8E+10
5) Pentravan	4,0E+10	1,6E+08
6) CCC1	0	0
7) CCC2	0	0
8) CCC3	0	0
9) CCC4	0	0
10) CCC5	0	0
11) CCC6	0	0

\*Применяемый способ имеет предел обнаружения, который представляет собой 4-кратное логарифмическое снижение. Число КОЕ 0 означает, что было обнаружено менее 1,0E+07 КОЕ/грамм порошка.

На начальном этапе отмечается, что фармацевтические основы для крема (1-5), как видно, являются менее антибактериальными в течение короткого срока, чем протестированные косметические составы (6-10). Косметические составы являются очень антибактериальными (снижение > 4-кратного логарифмического снижения через 10 мин) и их ингредиенты (эмульгаторы и консерванты) считаются непригодными для целей составления. Основные проблемные ингредиенты были определены как феноксиэтанол, бромидокс, изотиазолиноны и лауретсульфат натрия. Другие ингредиенты с антибактериальными свойствами также присутствуют, но имеют меньшую степень важности.

Самый лучший состав (через 24 ч) снова представлял забуференный цетомacroголевый крем, с сорбиновой кислотой в качестве единственного консерванта ( $\pm$  0,15-кратное логарифмическое снижение через 24 ч). Состав со 2-ой лучшей выживаемостью представлял фармацевтическую основу Nourivan, содержащую только сорбиновую кислоту в качестве консерванта. 3-ий лучший состав представляет собой карбомер-гель, содержащий парабыны, а четвертый лучший состав представляет собой крем pentravan, содержащий сорбиновую кислоту и бензойную кислоту в качестве консервантов. Крем Lanette содержит парабыны и сорбиновую кислоту в качестве консерванта.

Ясно, что органические кислоты (и парабыны) являются медленно работающими консервантами в отличие от обычно находящихся в косметических составах, и по существу не вредят пробиотикам после нанесения на кожу. Составы 1, 4 и 5, содержащие только консерванты на основе органических кислот, показывают наименьшее снижение через 10 мин. Хотя парабыны могут также быть пригодными для применения в качестве консервантов, они, как известно, являются аллергенами и, таким образом, предпочтительно не применяются в косметической промышленности. Таким образом, делают вывод о том, что консерванты на основе органических кислот являются пригодным вариантом для совместного составления с пробиотиками.

### Пример 3. Анализы стабильности

Капсулы согласно настоящему изобретению образуют однородную стенку (оболочку) вокруг внутреннего ядра, которое содержит пробиотические бактерии. Эта оболочка защищает бактерии и отвечает за то, что они не сразу высвобождаются в водную среду, как только капсулы согласно настоящему изобретению суспендируют.

Можно обеспечить хорошую стабильность как при охлаждении, так и при комнатной температуре, как видно из таблицы ниже:

(КОЕ/г крема)							
Время	4°C	A	B	c		Среднее	Стандартное отклонение
0 недель						4,7E+09	4,2E+08
2 недели		3,7E+09	3,8E+09	3,7E+09		3,7E+09	4,7E+07
1 месяц		3,0E+09	2,9E+09	2,9E+09		2,9E+09	4,7E+07
2 месяца		9,3E+08	1,9E+09	8,5E+08		1,2E+09	4,8E+08
3 месяца		5,0E+08	5,7E+08	4,5E+08		5,1E+08	4,9E+07
6 месяцев		3,4E+06	5,5E+07	3,6E+06		2,1E+07	2,4E+07
Время	25°C	A	B	c		Среднее	Стандартное отклонение
0 недель						4,7E+09	4,2E+08
2 недели		2,0E+09	2,6E+09	1,4E+09		2,0E+09	4,9E+08
1 месяц		7,5E+08	2,4E+09	1,9E+09		1,7E+09	6,9E+08
2 месяца		1,0E+08	5,4E+08	1,4E+08		2,6E+08	2,0E+08
3 месяца		1,8E+06	6,0E+07	2,2E+07		2,8E+07	2,4E+07
6 месяцев		3,3E+06	7,5E+06	1,8E+06		4,2E+06	2,4E+06

Пример 4. Анализы выживаемости в кремах, содержащих органические кислоты в качестве консерванта

Целью этого примера было определение эффективности капсул пробиотиков, при суспендировании в креме масло/вода в присутствии консерванта на основе сорбиновой кислоты в различных концентрациях. Второй целью было доказать, что выбранные консерванты являются пригодными для защиты крема. Было доказано путем проведения теста с нагрузкой с кремом (без капсул пробиотиков) с различными концентрациями консервантов, согласно Европейской фармакопеи (5.1.3).

Материал и методы:

#### Применяемые композиции

Основной крем без консервантов/отдушки применяли как основу для дальнейших тестов. Протестированным консервантом была сорбиновая кислота (2,4-гексадиеновая кислота), органическая кислота с рКа 4,76 при 25°C при различных концентрациях. рН крема для всех протестированных условий довели до 4,5 при помощи HCl/NaOH.

#### Тесты с нагрузкой и эффективность концентраций консерванта на основе органической кислоты

Тесты с нагрузкой применяли для определения эффективности противомикробной системы консервации для дерматологических продуктов. Целью было повышение безопасности и срока годности продукта.

Сорбиновую кислоту тестировали в концентрациях: 0,5%-0,3%-0,1%-0% (контроль).

Тестовыми организмами были *E. coli* (DSM1576), *Ps. Aeruginosa* (DSM1128), *C. albicans* (DSM 1386), *St. aureus* (DSM 799), *As. Niger* (DSM 1988).

Добавление тестовых организмов (в 100 г продукта) происходило при 10 КОЕ/мл. Отбор образцов происходил через 6, 24 ч, 7-14 и 28 дней. Тест с нагрузкой был успешным, если по меньшей мере 3-кратное логарифмическое снижение было видно через 7 дней для бактерий и 2-кратное логарифмическое снижение для дрожжей/плесени через 14 дней - 3-кратное логарифмическое снижение через 4 недели. Показаны результаты через 4 недели после отбора образцов.

#### Выживаемость капсул пробиотиков в основе для крема с различными консервантами

Капсулы пробиотиков суспендировали 15% (мас./мас.) в основе для крема с различными концентрациями консервантов. Для симуляции высвобождения пробиотиков *in vivo* применяли буфер на основе лимонной кислоты *in vitro*. Лимонная кислота будет растворять мембрану капсулы и при этом высвобождать пробиотики, находящиеся внутри капсулы. Буфер СА получали растворением 31,2 г Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> и 1,25 г лимонной кислоты в 971,54 г стерильной воды. Конечный раствор был изотоническим с рН 7,4 ± 0,2.

Образцы крема отбирали дважды, после чего их растворяли в буфере СА. Получали дополнительные серии разбавлений 1/10 и 0,1 мл распределяли на MRS планшетах с агаром при помощи "поверхностного метода копакабана" с 5 стеклянными гранулами диаметром 4 мм. Посев выполняли дважды и результаты (через 3 дня инкубации при 37°C) рассчитывали как КОЕ/грамм крема. Хранение выполняли

при 4 и 25°C. Отбор образцов выполняли через 1-2-3 месяца. Показаны результаты стабильности капсул через 3 месяца при хранении в холодильнике.

### Результаты

#### Результаты теста с нагрузкой

Результаты теста с нагрузкой для основы для крема (исключая капсулы пробиотиков) через 4 недели.

Протестированный консервант	Концентрация организма		Ps. Aeruginosa	St. Aureus	C. Albicans	As. Niger
		E.Coli				
Сорбиновая кислота	0,5	0	0	0	0	0
Сорбиновая кислота	0,3	0	0	0	0	0
Сорбиновая кислота	0,1	0	0	0	0	0
Сорбиновая кислота	0	1	3	0	3	1

\* Тест с нагрузкой является успешным, если получают более чем 3-кратное логарифмическое снижение. Числа следует интерпретировать следующим образом: 3 = менее 1-кратного логарифмического снижения; 2 = от 1 до 2-кратного логарифмического снижения; 1 = от 2 до 3-кратного логарифмического снижения; 0 = более 3-кратного логарифмического снижения по сравнению с исходной бактериальной нагрузкой.

#### Выживаемость капсул пробиотиков в креме с различными концентрациями сорбиновой кислоты

Выживаемость капсул пробиотиков через 3 месяца в основе для крема в присутствии различных концентраций консерванта на основе сорбиновой кислоты.

	Концентрация %	КОЕ/г	Стандартное отклонение	% выживаемости
Холостая проба	0	9,Е+07	1,Е+07	100
Сорбиновая кислота	0,3	7,Е+07	1,Е+07	76
Сорбиновая кислота	0,1	7,Е+07	2,Е+07	79
Сорбиновая кислота	0,03	6,Е+07	4,Е+07	68

#### Вывод

Органические кислоты (такие как сорбиновая кислота) являются важными консервантами для дерматологических составов. Сорбиновая кислота характеризуется хорошим консервирующим эффектом при концентрациях всего лишь 0,1%. Отсутствие сорбиновой кислоты привело к неудаче теста с нагрузкой, поскольку, по-видимому, при его проведении не удастся устранить все тестируемые микроорганизмы в предусмотренном диапазоне времени. Таким образом, применение органических кислот в качестве единственного консерванта в составе, по-видимому, является пригодным для предотвращения порчи или бактериями, или дрожжами, или плесенью, когда они присутствуют в подходящей концентрации.

Суспендирование капсул пробиотиков (15% мас./мас.) в той же основе для крема, которую применяли для тестов с нагрузкой, показало, что на капсулы пробиотиков не влияли любые концентрации консервантов. КОЕ бактериальной нагрузки крема, содержащего различные консерванты, изменялись не более чем на 32% (менее чем 0,3-кратное логарифмическое снижение) по сравнению с холостой пробой. Это нормально в пределах отклонения и не представляет значительной разницы.

Отсюда следует, что капсулы пробиотиков предлагают хорошую защиту от органических кислот, тестируемых в этом эксперименте в этом составе крема, тогда как в то же время консерванты способны предотвращать рост экзогенных организмов в креме.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. 2-Фазная система для консервации микроорганизмов, состоящая из первой фазы, представляющей собой микрокапсулы, содержащие нерастворимую в воде и непроницаемую для воды оболочку, и микроорганизмы, содержащиеся в неводной композиции в ядре указанных микрокапсул; и

второй фазы, представляющей собой водную композицию, характеризующуюся рН, составляющим менее 7,0, и содержащую одну или более органических кислот;

где указанная вторая фаза не содержит буферных средств и где указанные микрокапсулы содержатся в указанной водной композиции.

2. 2-Фазная система по п.1, где указанная водная композиция второй фазы характеризуется рН, составляющим менее 5,5, предпочтительно менее 5,0, более предпочтительно менее 4,5.

3. 2-Фазная система по любому из пп.1 или 2, где указанная одна или более органических кислот выбраны из списка, включающего бензойную кислоту, сорбиновую кислоту, лимонную кислоту, уксусную кислоту, молочную кислоту, анисовую кислоту, щавелевую кислоту, муравьиную кислоту, дегидроуксусную кислоту, фумаровую кислоту, глюконовую кислоту, яблочную кислоту, янтарную кислоту, виннокаменную кислоту, фосфорную кислоту и пропионовую кислоту и их производные.

4. 2-Фазная система по любому из пп.1-3, где указанные микроорганизмы являются жизнеспособными пробиотическими микроорганизмами, более предпочтительно выбранными из списка, включающего *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus rhamnosus* и *Lactobacillus plantarum*.

5. 2-Фазная система по любому из пп.1-4, где указанная представляющая собой микроорганизмы первая фаза является непроницаемой для воды и кислорода.

6. 2-Фазная система по любому из пп.1-5, где указанная нерастворимая в воде и непроницаемая для воды оболочка состоит из альгината, ксантановой камеди, арабийской камеди, геллановой камеди, каррагена, желатина, целлюлозы или ее производных; или полимеров на основе агара, белков, полиола, желатина, PVA (поливинилового спирта), PLGA (сополимера молочной и гликолевой кислоты), PLA (поли-молочной кислоты) и их производных, PCL, полиизогексилцианоакрилата, производных акрилата или крахмала, необязательно в комбинации с хитозаном, или твердых жиров.

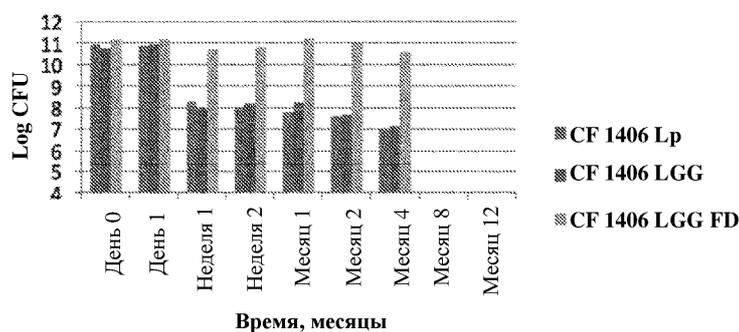
7. 2-Фазная система по любому из пп.1-6, которая находится в форме геля, крема, пены, лосьона или мази, содержащих указанные микрокапсулы.

8. 2-Фазная система по любому из пп.1-7, где указанная неводная композиция выбрана из списка, включающего растительные масла, минеральные масла, силиконовые масла или гидрофильные полимеры; в частности каприновые/каприловые триглицериды, жидкий парафин, полиэтиленгликоль, силиконы или твердые жиры.

9. 2-Фазная система по любому из пп.1-8, где указанная органическая кислота служит в качестве консерванта и где водная композиция по существу не содержит дополнительных консервантов.

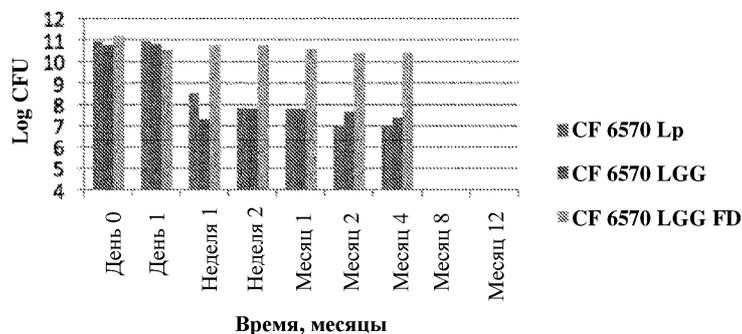
10. Применение 2-фазной системы по п.1 для консервации содержащихся в ней микроорганизмов.

#### Стабильность микроорганизмов в силиконе: CF 1406



А

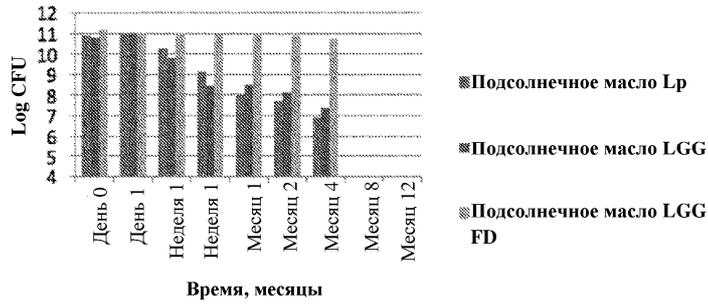
#### Стабильность микроорганизмов в силиконе: CF 6570



В

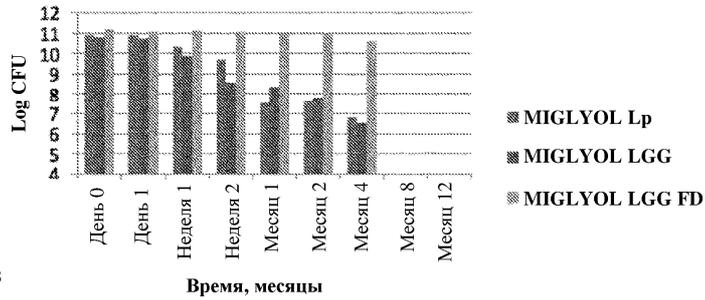
Фиг. 1

Стабильность микроорганизмов в масле: подсолнечное масло



A

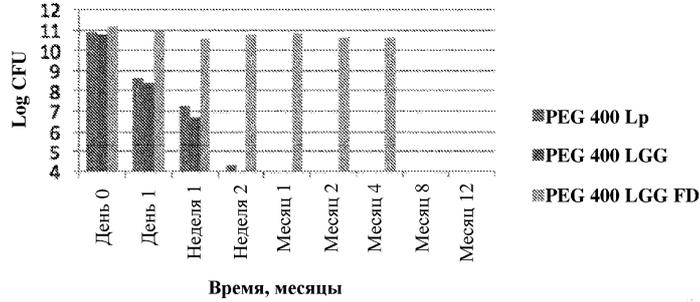
Стабильность микроорганизмов в масле: miglyol 812N



B

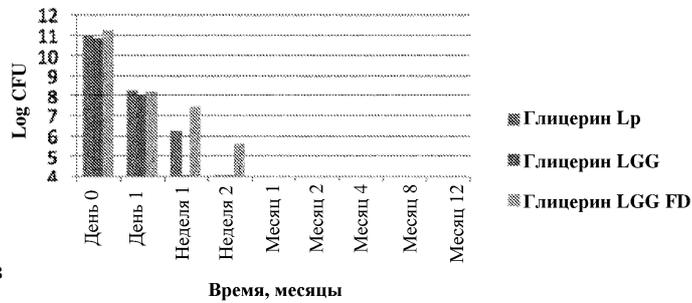
Фиг. 2

Стабильность микроорганизмов в полярной среде: Peg 400



A

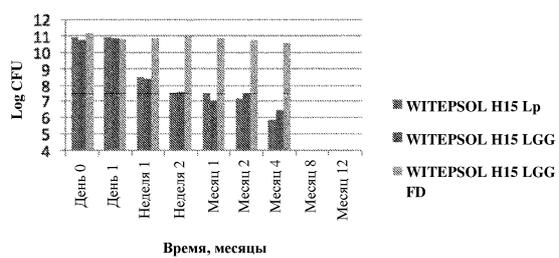
Стабильность микроорганизмов в полярной среде: глицерин



B

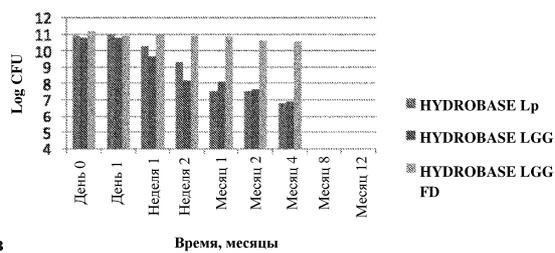
Фиг. 3

## Стабильность микроорганизмов в твердых жирах: Witepsol h15



A

## Стабильность микроорганизмов в твердых жирах: Hydrobase 32/34



B

Фиг. 4



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2