

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202191765** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
**2021.09.09**

(22) Дата подачи заявки  
**2019.12.19**

(51) Int. Cl. *A61K 8/99* (2017.01)  
*A61K 9/00* (2006.01)  
*A61K 9/50* (2006.01)  
*A61K 35/747* (2015.01)  
*A61K 47/44* (2017.01)  
*A61Q 19/00* (2006.01)  
*C12N 1/04* (2006.01)  
*A61Q 19/08* (2006.01)  
*A61K 8/11* (2006.01)

---

(54) **КОМПОЗИЦИЯ ДЛЯ НАРУЖНОГО ПРИМЕНЕНИЯ, ВКЛЮЧАЮЩАЯ  
ЖИЗНЕСПОСОБНЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ**

---

(31) **РА 2018 01052**

(32) **2018.12.21**

(33) **DK**

(86) **РСТ/EP2019/086169**

(87) **WO 2020/127637 2020.06.25**

(71) Заявитель:  
**ЛАКТОБАЙО А/С (DK)**

(72) Изобретатель:

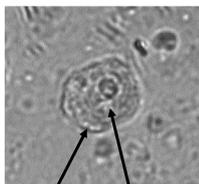
**Ведель Шарлотта, Йёргенсен Ида  
Бломквист, Керульфф Сёрен (DK)**

(74) Представитель:

**Медведев В.Н. (RU)**

---

(57) Изобретение относится к микрокапсуле, включающей покрытие на жировой основе, окружающее композицию, с получением инкапсулированной композиции, где инкапсулированная композиция включает жизнеспособный микроорганизм и имеет содержание воды ниже 5% (вес./вес.).



(2) (1)

**A1**

**202191765**

**202191765**

**A1**

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-569246EA/55

### КОМПОЗИЦИЯ ДЛЯ НАРУЖНОГО ПРИМЕНЕНИЯ, ВКЛЮЧАЮЩАЯ ЖИЗНЕСПОСОБНЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ

#### Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к композиции для наружного применения, включающей микроорганизмы. В частности, настоящее изобретение относится к композиции для наружного применения, включающей жизнеспособные микроорганизмы, где такая композиция является стабильной и может активироваться при нанесении на кожу.

#### Уровень техники

Существует значительный интерес к применению пробиотических бактерий. Пробиотики - это живые микроорганизмы, которые приносят реципиенту пользу для здоровья при введении в подходящих количествах. Однако для проявления этих преимуществ микроорганизмы должны оставаться жизнеспособными во время обработки и хранения продукта. Было проведено большое количество исследований по стабилизации пробиотиков при употреблении внутрь для обеспечения устойчивости к желудочно-кишечным жидкостям. Поскольку пробиотики чувствительны к ряду факторов, включая присутствие кислорода и кислых сред, микроинкапсулирование изучали в качестве способа повышения жизнеспособности пробиотических клеток.

Микроинкапсулирование пробиотиков - это процесс, при котором пробиотические микроорганизмы окружаются полимерной мембраной, предохраняющей их и, в некоторых случаях, позволяющей высвободить их в определенных условиях. Методы, обычно применяемые для инкапсулирования пробиотиков, включают экструзию, распыление или распылительную сушку, эмульсию, коацервацию и иммобилизацию в гранулах жира, полисахаридов или крахмала. Полисахариды, такие как альгинат, геллан, К-каррагинан и крахмал, являются наиболее часто используемыми материалами для микроинкапсулирования бифидобактерий и лактобацилл.

Таким образом, микроинкапсулирование микроорганизмов хорошо известно в уровне техники, однако эти методы разработаны не для наружного применения, и традиционно изготавливаемые микрокапсулы предназначены для растворения в кишечном тракте с высвобождением микроорганизмов в кишечнике, а не на коже. Когда на кожу наносят микрокапсулы из предшествующего уровня техники, условия на коже не будут вызывать растворение капсул и высвобождение живых микроорганизмов.

В WO18002248 раскрыта концепция включения микроорганизмов в состав двухкамерной системы, предохраняющей микроорганизмы во внутренней центральной камере от ингредиентов во внешней камере, когда содержимое обеих камер соединяется, при этом такой микроинкапсулированный материал предназначен для наружного применения, однако такое инкапсулирование состоит из микрокапсул, размер которых такой, что их можно ощутить на коже, и которые необходимо втирать в кожу, чтобы

разрушить капсулы. Капсулы, не разрушенные при растирании, не высвободят жизнеспособные микроорганизмы на поверхности кожи.

Применение живых пробиотиков для наружного применения крайне ограничено, и большинство продуктов основано на лизатах (инактивированных мертвых бактериях) пробиотического штамма (WO8200093), чтобы обойти проблемы сохранения жизнеспособности микроорганизмов в композиции для наружного применения.

Следовательно, требуется улучшенная композиция, решающая вышеупомянутые проблемы из предшествующего уровня техники, включающая живые пробиотические штаммы в маслах, эмульсиях, лосьонах и т.п., для наружного применения на коже млекопитающих. В частности, требуется улучшенная композиция, содержащая жизнеспособные штаммы пробиотиков, которая является стабильной и способной активироваться при нанесении на кожу.

Настоящее изобретение относится к композиции для наружного применения, включающей микроорганизмы. В частности, настоящее изобретение относится к композиции для наружного применения, включающей жизнеспособные микроорганизмы, где такая композиция имеет длительный срок годности и является стабильной и может активироваться при нанесении на кожу.

### **Сущность изобретения**

Таким образом, целью настоящего изобретения является композиция для наружного применения, включающая жизнеспособные микроорганизмы.

В частности, цель настоящего изобретения состоит в предоставлении композиции для наружного применения, которая решает вышеуказанные проблемы из предшествующего уровня техники благодаря присутствию жизнеспособных микроорганизмов, длительного срока годности и высокой стабильности, а также эффекта активации при нанесении на кожу млекопитающего.

Таким образом, один аспект изобретения относится к микрокапсуле, включающей покрытие на жировой основе, окружающее композицию с получением инкапсулированной композиции, включающей жизнеспособный микроорганизм и имеющей содержание воды ниже 5% (вес/вес).

Другой аспект настоящего изобретения относится к композиции для наружного применения, включающей микрокапсулу согласно настоящему изобретению.

Еще один аспект настоящего изобретения относится к композиции, включающей микрокапсулу согласно настоящему изобретению, или к композиции для наружного применения согласно настоящему изобретению, для применения в качестве лекарственного средства.

Еще один аспект настоящего изобретения относится к композиции, включающей микрокапсулу согласно настоящему изобретению, или к композиции для наружного применения согласно настоящему изобретению, для лечения, облегчения и/или профилактики заболевания кожи.

Еще один аспект настоящего изобретения относится к способу получения

микрокапсулы согласно настоящему изобретению, где способ включает следующие этапы:

- (i) получение композиции, включающей жизнеспособный микроорганизм;
- (ii) добавление жира в композицию, включающую жизнеспособный микроорганизм, с получением смешанного с жиром микроорганизма;
- (iii) перемешивание смешанного с жиром микроорганизма с получением микрокапсулы согласно настоящему изобретению.

#### **Краткое описание фигур**

На Фигуре 1 показано увеличенное изображение частицы, имеющей центр (1), включающий жизнеспособные лиофилизированные молочнокислые бактерии, окруженные покрытием на жировой основе (2),

На Фигуре 2 показаны инкапсулированные в жире лиофилизированные молочнокислые бактерии (МКБ) согласно настоящему изобретению после 3 месяцев хранения.

Далее настоящее изобретение будет описано более подробно.

#### **Подробное описание изобретения**

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что применение пробиотиков в составах для наружного применения может обладать огромным потенциалом, если бы в составах можно было сохранять жизнеспособность микроорганизмов. Однако было обнаружено, что составы для наружного применения, такие как кремы, лосьоны, аэрозоли, непременно имеют высокое содержание воды, т.е. чтобы можно было надлежащим образом изготовить крем, пену, лосьон, мазь и т.д. Очевидно, что присутствие такого высокого содержания воды в этих составах определяет сложность хранения пробиотиков в их метаболически неактивном состоянии. Вторая проблема, связанная с такими водными составами для наружного применения, может состоять в том, что эти составы обычно содержат вещества, которые не совместимы с выживанием микроорганизмов; такие как консерванты, поверхностно-активные вещества, эмульгаторы и другие компоненты для предохранения таких составов от роста нежелательных микроорганизмов, а также для формирования стабильных эмульсий. Однако эти вещества, конечно, также создают основную проблему при изготовлении составов полезных микроорганизмов.

Таким образом, крайне желательно разработать составы для наружного применения и продукты для фармацевтических или косметических целей, имеющие длительный срок хранения и стойкие к контаминации и порче, вызванной микроорганизмами.

Следовательно, целью настоящего изобретения является предоставление системы или состава, которые обеспечивают длительное хранение микроорганизмов, в частности жизнеспособных микроорганизмов, которые не наносят существенного вреда таким микроорганизмам после их применения и которые действительно высвобождают жизнеспособные микроорганизмы при их нанесении на кожу.

Предпочтительный аспект настоящего изобретения относится к микрокапсуле,

включающей покрытие на жировой основе, окружающее композицию, с предоставлением инкапсулированной композиции, включающей жизнеспособный микроорганизм и содержание воды ниже 5% (вес/вес).

Было неожиданно обнаружено, что покрытие микроорганизмов жиром, например молочным жиром, который является твердым при температуре хранения, но плавится при температуре кожи (при нанесении на кожу), обеспечивает стабильность жизнеспособных микроорганизмов, а также высвобождение и активацию микроорганизмов непосредственно при нанесении на кожу.

В рамках настоящего изобретения термин "непосредственно" относится к высвобождению и активации микроорганизмов из покрытия на жировой основе в момент нанесения инкапсулированного микроорганизма на кожу. Плавление может быть вызвано температурой кожи и теплом, выделяемым при растирании во время нанесения инкапсулированного микроорганизма на кожу.

В рамках настоящего изобретения термин "покрытие" относится жировому слою, окружающему жизнеспособный микроорганизм. Покрытие согласно настоящему изобретению окружает жизнеспособный микроорганизм, полностью отделяя жизнеспособные микроорганизмы, находящиеся внутри покрытия, от внешней среды снаружи покрытия. Покрытие согласно настоящему изобретению отличается тем, что является твердым или частично твердым при комнатной температуре и растворяется при нанесении на кожу млекопитающего.

В данном контексте термины "заливка" или "залитый", которые используются взаимозаменяемо, относятся к дисперсии покрытых микроорганизмов в гидрофобной фазе и/или гидрофильной фазе согласно настоящему изобретению.

В варианте осуществления настоящего изобретения инкапсулированная композиция может включать меньше 5% (вес/вес) воды; например, меньше 4% (вес/вес); например, меньше 3% (вес/вес); например, меньше 2% (вес/вес); например, меньше 1% (вес/вес); например, меньше 0,5% (вес/вес); например, меньше 0,1% (вес/вес); например, меньше 0,05% (вес/вес); например, меньше 0,01% (вес/вес).

Содержание воды можно измерять с помощью анализа Карла Фишера, который известен специалисту в данной области.

Может быть изготовлена микрокапсула и/или композиция согласно настоящему изобретению с приятным вкусом и длительной стабильностью, поскольку покрытие на жировой основе с низкой водной активностью ( $A_w$ ) предохраняет сухие жизнеспособные культуры от влаги. Дополнительным преимуществом является то, что жир, например молочный жир, используемый для получения покрытия на жировой основе, может оказывать смягчающее действие на кожу.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения микрокапсула включает по меньшей мере  $10^2$  КОЕ/г; например, по меньшей мере  $10^3$  КОЕ/г; например, по меньшей мере  $10^4$  КОЕ/г; например, по меньшей мере  $10^5$  КОЕ/г; например, по меньшей мере  $10^6$  КОЕ/г; например, по меньшей мере  $10^7$  КОЕ/г; например, по меньшей

мере  $10^8$  КОЕ/г; например, по меньшей мере  $10^{10}$  КОЕ/г; например, по меньшей мере  $10^{12}$  КОЕ/г; например, в пределах  $10^2$ - $10^{14}$  КОЕ/г; например, в пределах  $10^3$ - $10^{12}$  КОЕ/г; например, в пределах  $10^4$ - $10^{10}$  КОЕ/г; например, в пределах  $10^5$ - $10^9$  КОЕ/г; например, в пределах  $10^6$ - $10^{10}$  КОЕ/г; например, в пределах  $10^7$ - $10^9$  КОЕ/г.

Для достижения надлежащего распределения при нанесении на кожу и обеспечения быстрой активации и высвобождения жизнеспособных микроорганизмов, может быть важен размер частиц микрокапсул.

Как было указано выше, покрытие на жировой основе согласно настоящему изобретению может характеризоваться тем, что оно является твердым или частично твердым при комнатной температуре и растворяется при нанесении на кожу млекопитающего. Таким образом, в варианте осуществления настоящего изобретения покрытие на жировой основе имеет температуру плавления в пределах  $25$ - $37^\circ\text{C}$ ; такую как температуру плавления в пределах  $28$ - $36^\circ\text{C}$ ; например, температуру плавления в пределах  $29$ - $35^\circ\text{C}$ ; такую как температуру плавления в пределах  $31$ - $34^\circ\text{C}$ .

В другом варианте осуществления настоящего изобретения покрытие на жировой основе может включать триглицерид с составом жирных кислот, содержащим по меньшей мере 30% олеиновой кислоты (C18:1) и по меньшей мере 30% стеариновой кислоты (C18:0).

Предпочтительно покрытие на жировой основе может включать жир, выбранный из масла дерева ши, масла ореха бассии, масла манго, масла панья и масла какао или их любых комбинаций.

Еще более предпочтительно покрытие на жировой основе может быть маслом дерева ши.

Инкапсулированная композиция согласно настоящему изобретению может быть залита в гидрофобную фазу.

В варианте осуществления настоящего изобретения гидрофобная фаза может быть маслом. Масло может быть комбинацией двух или больше масел, таких как три или больше масел, например, 4 или больше масел, таких как 5 или больше масел.

В варианте осуществления настоящего изобретения инкапсулированная композиция и/или инкапсулированная композиция, залитая в гидрофобную фазу, могут быть эмульгированы в гидрофильной фазе.

Структура и функция большинства микроорганизмов могут зависеть от их водной среды. Поэтому изменения их водной среды в результате процессов замораживания и/или сушки, часто могут привести к серьезным последствиям для биологического материала.

Кроме того, лиофилизация объединяет в себе стрессы и в результате замораживания, и сушки. Этап замораживания в этом процессе может приводить к нежелательным побочным эффектам, таким как денатурация белков и ферментов и разрушение клеток. Эти эффекты возникают вследствие механических, химических и осмотических стрессов, вызванных кристаллизацией льда в этих материалах. В результате жизнеспособность микроорганизма при регидратации снижается либо до полной потери,

либо до такой значительной степени, что микроорганизм становится уже не жизнеспособным.

Для улучшения стабильности инкапсулированной композиции и сохранения стабильности жизнеспособных микроорганизмов, жизнеспособный микроорганизм может быть высушен.

Сушка жизнеспособных микроорганизмов может быть выполнена различными способами, такими как лиофилизация; сушка атмосферным воздухом; вакуумная сушка или сушка распылением. Предпочтительно жизнеспособный микроорганизм лиофилизирован.

Для предотвращения или снижения побочных эффектов при восстановлении или регидратации, можно использовать защитные средства, такие как криопротекторы или лиопротекторы (лиофилизация). Чтобы такие защитные средства были эффективными в настоящем изобретении, они должны быть нетоксичными для микроорганизмов в концентрациях, применяемых при консервации, а также должны хорошо взаимодействовать с водой и с микроорганизмом. В уровне техники с разной степенью успеха применялись различные защитные средства.

В варианте осуществления настоящего изобретения инкапсулированная композиция может включать защитное средство. Защитное средство может быть криопротектором, лиопротектором или комбинацией согласно настоящему документу.

В варианте осуществления настоящего изобретения инкапсулированная композиция включает защитное средство, выбранное из группы, состоящей из белков, таких как рыбные белки; полимеры; обезжиренное молоко; глицерин; диметилсульфоксид; и полигидроксисоединения. Инкапсулированная композиция включает защитное средство, которое предпочтительно является полигидроксисоединениями.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения полигидроксисоединения могут быть выбраны из сахаров или углеводов.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения полигидроксисоединения могут быть выбраны из моносахаридов, дисахаридов или полисахаридов.

В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения полигидроксисоединения могут быть выбраны из мальтозы; лактозы; сахарозы; трегалозы; сухого обезжиренного молока; декстрана; декстрозы; пептона; глутамата; полиэтиленгликоля (ПЭГ); или любой комбинации согласно настоящему документу. Предпочтительно комбинация полигидроксисоединений включает комбинацию сахарозы и трегалозы.

Инкапсулированная композиция согласно настоящему изобретению включает в пределах 10-95% (вес/вес) защитного средства по весу инкапсулированной композиции, например, в пределах 20-80% (вес/вес); например, в пределах 30-70% (вес/вес); например, в пределах 40-60% (вес/вес); например, в пределах 45-55% (вес/вес).

Количество защитного средства, такого как полигидроксисоединение, может быть определено по количеству, присутствующему в защитном средстве, и/или по количеству, присутствующему в композиции, включающей жизнеспособный микроорганизм. Также количество защитного средства, такого как полигидроксисоединение, в инкапсулированной композиции может быть определено с помощью аналитических методов, известных в данной области, таких как колоночная хроматография.

В варианте осуществления настоящего изобретения инкапсулированная композиция может дополнительно включать соль, такую как фосфатную соль, например фосфат натрия. Фосфат натрия предпочтительно может быть гидрофосфатом натрия; гидрофосфатом динатрия; или их комбинацией.

Предпочтительный аспект настоящего изобретения относится к композиции для наружного применения, включающей микрокапсулу согласно настоящему изобретению.

В варианте осуществления настоящего изобретения композиция для наружного применения может быть эмульсией, включающей гидрофильную фазу и гидрофобную фазу. Гидрофобная фаза включает микрокапсулу согласно настоящему изобретению.

Гидрофильная фаза может составлять 5-75% (вес/вес) композиции для наружного применения; например, 10-50% (вес/вес); например, 15-40% (вес/вес); например, 20-30% (вес/вес).

В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения композиция для наружного применения включает 5-75% (вес/вес) воды; например, 10-50% (вес/вес) воды; например, 15-40% (вес/вес) воды; например, 20-30% (вес/вес) воды.

Композиция для наружного применения согласно настоящему изобретению включает консервант, поверхностно-активное вещество и/или эмульгатор. Предпочтительно консервант, поверхностно-активное вещество и/или эмульгатор присутствует в масле или в гидрофильной фазе, предпочтительно в гидрофильной фазе.

В рамках настоящего изобретения термин "покрытие на жировой основе" и "жир" относится к веществу, включающему, прежде всего, атомы углерода и водорода, и которое является гидрофобным и растворимым в органических растворителях и нерастворимым в воде.

Покрытия на жировой основе согласно настоящему изобретению предпочтительно могут быть по существу твердыми при комнатной температуре и плавятся на коже только при температуре тела. "Комнатная температура" при использовании в настоящем документе обычно относится к температурам в помещении, как правило, порядка приблизительно 20°C. Типичный жир, используемый в покрытии, будет иметь температуру плавления от приблизительно 25°C до приблизительно 37°C.

В предпочтительном варианте осуществления жир является твердым или частично твердым при температурах ниже 25°C.

В варианте осуществления покрытие на жировой основе или жир могут быть выбраны из масла дерева ши, масла ореха бассии, масла какао, масла манго, масла панья.

Предпочтительно покрытие на жировой основе или жир могут характеризоваться образованием по существу сплошной жировой фазы.

Предпочтительно, чтобы микроорганизм мог быть продуктом пробиотической культуры. Также предпочтительно, что продукты пробиотической культуры, раскрытые в настоящем документе, остаются по существу сухими, и что они содержат не больше, чем следовые количества воды. Использование существенных количеств воды при обработке обычно несовместимо с жирами покрытия и стабильностью продукта.

Инкапсулированная в жире композиция, включающая жизнеспособные микроорганизмы, может применяться для наружного применения непосредственно в виде жировой композиции.

Инкапсулированная в жире композиция, включающая жизнеспособные микроорганизмы, может быть дополнительно обработана (залита) в жидком масле, где инкапсулированная в жире композиция, включающая микроорганизмы, присутствует в концентрации от 0,1 до 95% залитой композиции.

Инкапсулированная в жире композиция, включающая жизнеспособные пробиотики, может быть дополнительно переработана в эмульсию, включающую гидрофильную фазу, составляющую от 0,1 до 95% эмульсии.

Масло, включающее инкапсулированную в жире композицию, включающую жизнеспособные пробиотики (залитую композицию), может быть дополнительно переработано в эмульсию, включающую гидрофильную фазу, составляющую от 0,1 до 95% эмульсии.

В одном предпочтительном варианте осуществления изобретения композиция для наружного применения представляет собой эмульсию, состоящую из гидрофильной фазы и гидрофобной фазы, где гидрофобная фаза включает инкапсулированную в жире композицию, включающую жизнеспособные микроорганизмы.

Эмульгаторы могут использоваться для стабилизации композиции для наружного применения и/или эмульсий для наружного применения, при этом эмульгаторы для получения эмульсий для наружного применения известны в уровне техники и могут быть выбраны из фракционированных лецитинов, обогащенных фосфатидилхолином и/или фосфатидилэтаноламином; их моно- и диглицеридов; моносодиевых фосфатных производных моно- и диглицеридов пищевых жиров или масел; лактилированных сложных эфиров жирных кислот глицерина и пропиленгликоля; гидроксиглицеринированных лецитинов; полиглицериновых сложных эфиров жирных кислот; пропиленгликоля; моно- и диэфиров жирных кислот; DATEM (сложных эфиров диацетилвинной кислоты и моно- и диглицеридов); PGPR (полиглицерилполирицинолеата); полисорбата 20, 40, 60, 65 и 80; сорбитан моностеарата; сорбитан тристеарата, экстракта овса; и т.п. Эмульгатор не ограничивается данным перечнем.

Настоящее изобретение может относиться к живым или жизнеспособным микроорганизмам, в том числе любым бактериям, археям, бактериофагам, вирусам, дрожжам или грибам, или их любым комбинациям.

В варианте осуществления настоящего изобретения жизнеспособный микроорганизм может быть пробиотическим микроорганизмом.

Примеры подходящих пробиотических микроорганизмов могут включать дрожжи, такие как *Saccharomyces*, *Debaromyces*, *Candida*, *Pichia* и *Torulopsis*, плесневые грибы, такие как *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor* и *Penicillium*, а также *Torulopsis* и бактерии, такие как из рода *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Fusobacterium*, *Melissococcus*, *Propionibacterium*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Staphylococcus*, *Peptostreptococcus*, *Bacillus*, *Pediococcus*, *Micrococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Aerococcus*, *Oenococcus* и *Lactobacillus*. Конкретными примерами подходящих пробиотических микроорганизмов являются: *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium longum*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus alimentarius*, *Lactobacillus casei* подв. *casei*, *Lactobacillus casei* Shirota, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus delbrueckii* подв. *lactis*, *Lactobacillus farciminus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus* (*Lactobacillus* GG), *Lactobacillus sake*, *Lactococcus lactis*, *Micrococcus varians*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus halophilus*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus thermophilus*, *Staphylococcus carnosus* и *Staphylococcus xylosum*.

Пробиотические микроорганизмы согласно настоящему изобретению предпочтительно могут находиться в порошкообразной форме, высушенной форме; или в форме споры (для микроорганизмов, которые формируют споры).

В варианте осуществления настоящего изобретения пробиотический микроорганизм или жизнеспособный микроорганизм может быть штаммом молочнокислых бактерий (МКБ). В частности, пробиотический микроорганизм или жизнеспособный микроорганизм могут быть штаммом молочнокислых бактерий (МКБ), выбранных из следующих: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Bifidobacterium*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Sporolactobacillus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* и *Weissella*.

Пробиотический микроорганизм или жизнеспособный микроорганизм может включать семейства *Lactobacillaceae*, *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Leuconostocaceae* и *Streptococcaceae*. Это семейство микроорганизмов считается непатогенным и в целом используется в качестве пробиотических бактерий для улучшения микрофлоры желудочно-кишечного тракта и лечения симптомов желудочно-кишечных расстройств. Лактобациллы важны, в частности, в пищевой промышленности, где они играют важную роль в области "функциональных продуктов питания". Раньше виды *Bifidobacterium bifidum* относили к лактобактериям (*Lactobacillus bifidum*), но согласно сегодняшней концепции данный вид филогенетически не имеет близкого родства с этим отрядом. Однако с точки зрения метаболизма он все еще считается молочнокислой бактерией. Молочнокислые бактерии классифицируются как

непатогенные.

Молочнокислые бактерии действительно также находят потенциальное применение в уходе за кожей и в фармацевтических продуктах для наружного применения, и применялись в предшествующем уровне техники в качестве мертвых инактивированных клеток или нестабильных составов.

Настоящее изобретение относится стабилизации любого жизнеспособного микроорганизма, такого как бактерии, в композиции для наружного применения. Бактерии предпочтительно выбраны из родов *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Bifidobacterium*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Sporolactobacillus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* и *Weissella*. Предпочтительными могут быть *Lactobacillus*.

Предпочтительные микроорганизмы могут быть бактериями. Предпочтительно бактерии могут быть пробиотической бактерией. В варианте осуществления настоящего изобретения пробиотические бактерии предпочтительно могут быть выбраны из группы, включающей: *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus amylolyticus*, *Lactobacillus alimentarius*, *Lactobacillus aviaries*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus diolivorans*, *Lactobacillus farciminis*, *Lactobacillus gallinarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Lactobacillus kefiri*, *Lactobacillus mucosae*, *Lactobacillus panis*, *Lactobacillus paraplanarum*, *Lactobacillus pontis*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus saliverius*, *Lactobacillus sanfranciscensis*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus cellobiosus*, *Lactobacillus collinoides*, *Lactobacillus coryniformis*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus fructivorans*, *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus ingluviei*, *Weissella viridescens*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium animalis*, *Carnobacterium divergens*, *Corynebacterium glutamicum*, *Leuconostoc citreum*, *Leuconostoc lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Oenococcus oeni*, *Pasteuria nishizawae*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus dextrinicus*, *Pediococcus parvulus*, *Pediococcus pentosaceus*, *Probionibacterium freudenreichii*, *Probionibacterium acidipropionici*, *Streptococcus thermophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus flexus*, *Bacillus fusiformis*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus mojavensis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus smithii*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus vallismortis*, *Geobacillus stearothermophilus* или их мутанты.

В другом аспекте настоящего изобретения пробиотический микроорганизм может быть выбран из родов, связанных с естественным здоровым микробиомом кожи, включая рода *Probionibacterium*, *Cutibacterium*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Malassezia*, *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula* и/или *Epicoccum*.

В варианте осуществления настоящего изобретения пробиотическим штаммом может быть *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hominis*, *Cutibacterium acnes* (*Probionibacterium acnes*) или их любые комбинации.

В варианте осуществления настоящего изобретения пробиотическим штаммом могут быть грамотрицательные бактерии.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения пробиотический штамм может быть аммонийоокисляющими бактериями.

В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения пробиотическим штаммом является *Nitrosomonas eutropha*.

В одном предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения инкапсулированная композиция включает по меньшей мере один штамм (предпочтительно жизнеспособный штамм) выбранный из группы, состоящей из *Weissella viridescens* LB10G (DSM 32906), *Lactobacillus plantarum* LB113R (DSM 32907), *Lactobacillus plantarum* LB244R (DSM 32996), *Lactobacillus paracasei* LB116R (DSM 32908), *Lactobacillus paracasei* LB28R (DSM 32994), *Lactobacillus brevis* LB152G (DSM 32995), *Lactobacillus plantarum* LB316R (DSM 33091), *Leuconostoc mesenteroides* LB349R (DSM 33093), *Lactobacillus plantarum* LB356R (DSM 33094), *Lactobacillus plantarum* LB312R (DSM 33098) и *Leuconostoc mesenteroides* LB276R (DSM 32997) или мутантных штаммов.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения инкапсулированная в жире композиция включает жизнеспособный микроорганизм, выбранный из следующего неограничивающего перечня: *Bifidobacterium lactis* DSM10140, *B. lactis* LKM512, *B. lactis* DSM 20451, *Bifidobacterium bifidum* BB-225, *Bifidobacterium adolescentis* BB-102, *Bifidobacterium breve* BB-308, *Bifidobacterium longum* BB-536 от Zaidanhojin Nihon Bifizusukin Senta (Japan Bifidus Bacteria Center), *Bifidobacterium* NCIMB 41675 описанная в EP2823822. *Bifidobacterium bifidum* BB-225, *Bifidobacterium adolescentis* BB-102, *Bifidobacterium breve* BB-308, *Bifidobacterium lactis* HN019 (Howaru), доступная от DuPont Nutrition Biosciences ApS, *Bifidobacterium lactis* DN 173 010, доступная от Groupe Danone, *Bifidobacterium lactis* Bb-12, доступная от Chr. Hansen A/S, *Bifidobacterium lactis* 420, доступная от DuPont Nutrition Biosciences ApS, *Bifidobacterium breve* Bb-03, *B. lactis* HN019, *B. lactis* BI-04, *B. lactis* Bi-07, доступная от DuPont Nutrition Biosciences ApS, *Bifidobacterium bifidum* Bb-02, *Bifidobacterium bifidum* Bb-06, *Bifidobacterium longum* KC-1 и *Bifidobacterium longum* 913 (DuPont Nutrition Biosciences ApS), *Bifidobacterium breve* M-16V (Morinaga) и/или *Lactobacillus*, имеющая пробиотическое действие, и может быть любым из следующих штаммов; *Lactobacillus rhamnosus* LGG (Chr. Hansen), *Lactobacillus acidophilus* NCFM (DuPont Nutrition Biosciences ApS), *Lactobacillus bulgaricus* 1260 (DuPont Nutrition Biosciences ApS), *Lactobacillus paracasei* Lpc-37 (DuPont Nutrition Biosciences ApS), *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (Howaru), доступная от DuPont Nutrition Biosciences ApS, *Streptococcus thermophilus* 715 и *Streptococcus thermophilus* ST21, доступная от DuPont Nutrition Biosciences ApS, *Lactobacillus paracasei* подв. *paracasei*

CRL431 (ATCC 55544), *Lactobacillus paracasei* штамма F-19 от Medipharm, Inc., *L. paracasei* LAFTI L26 (DSM Food Specialties, the Netherlands) и *L. paracasei* CRL 431 (Chr. Hansen), *Lactobacillus acidophilus* PTA-4797, *L. salivarius* Ls-33 и *L. curvatus* 853 (DuPont Nutrition Biosciences ApS). *Lactobacillus casei* подв. *rhamnosus* LC705 описана в патенте Финляндии 92498, Valio Oy. *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) (ATCC 53103) описана в патенте США 5,032,399 и *Lactobacillus rhamnosus* LC705 (DSM 7061), пропионовокислая бактерия, например, *Propionibacterium freudenreichii* подв. *shermanii* PJS (DSM 7067), описана более подробно в патенте Финляндии 92498, Valio Oy, *Nitrosomonas eutropha* D23 (ABiome), *Staphylococcus hominis* штаммов A9, C2, AMT2, AMT3, AMT4-C2, AMT4-G1 и/или AMT4-D12 (все Matrisys Bioscience), *Staphylococcus epidermidis* штаммов M034, M038, A11, AMT1, AMT5-C5 и/или AMT5-G6 (все Matrisys Bioscience), *L. plantarum* YUN-V2.0 (BCCM LMG P-29456), *L. pentosus* YUN-V1.0 (BCCN LMG P-29455), *L. rhamnosus* YUN-S1.0 (BCCM LMG P-2961) и/или любые комбинации согласно настоящему документу.

Применение жизнеспособных пробиотиков для наружного применения сегодня очень ограничено, причем такие продукты либо нестабильны, либо изготовлены на основе лизатов инактивированных пробиотических штаммов, чтобы исключить проблемы, связанные с сохранением стабильности и жизнеспособности микроорганизмов в композиции для наружного применения. Проблемами, наблюдаемыми в случае традиционных составов при включении живых пробиотических штаммов в масла, сыворотки, эмульсии, лосьоны и т.п. для наружного применения на коже млекопитающих, являются отсутствие жизнеспособности и стабильности.

Композиции для наружного применения, как правило, должны быть стабильными в течение приблизительно месяца при комнатной температуре, это представляет основную сложность при сохранении жизнеспособности живого пробиотика в продуктах для ухода за кожей.

В варианте осуществления настоящего изобретения композиция для наружного применения может быть стабильной в течение по меньшей мере 2 месяцев в условиях хранения при 25°C; например, в течение по меньшей мере 3 месяцев в условиях хранения при 25°C; например, в течение по меньшей мере 4 месяцев в условиях хранения при 25°C; например, в течение по меньшей мере 5 месяцев в условиях хранения при 25°C; например, в течение по меньшей мере 6 месяцев в условиях хранения при 25°C; например, в течение по меньшей мере 7 месяцев в условиях хранения при 25°C; например, в течение по меньшей мере 8 месяцев в условиях хранения при 25°C; например, в течение по меньшей мере 9 месяцев в условиях хранения при 25°C; например, в течение по меньшей мере 10 месяцев в условиях хранения при 25°C; например, в течение по меньшей мере 11 месяцев в условиях хранения при 25°C.

Другой наблюдаемой проблемой может быть активация пробиотического штамма при нанесении на кожу млекопитающего. Если пробиотический штамм заключен в микрокапсулы, например, согласно методикам, используемым для стабилизации

пробиотиков для употребления внутрь, то микрокапсулы разработаны таким способом, чтобы защищать живой пробиотический штамм в желудочно-кишечных соках, и, таким образом, не растворяются на поверхности кожи. Поэтому пробиотический штамм не будет высвобождаться из капсул, и, таким образом, это не позволит обеспечить связывание, метаболизм или колонизацию пробиотического штамма на поверхности кожи.

Настоящее изобретение решает данную проблему стабилизации путем инкапсулирования живых пробиотических штаммов в твердом покрытии на жировой основе, которое может применяться в композиции для наружного применения.

Настоящее изобретение относится к живым микроорганизмам для наружного применения на коже млекопитающего. Кожа может быть внешней оболочкой тела и является самым большим органом покровной системы. Кожа содержит до семи слоев эктодермальной ткани и защищает подлежащие мышцы, кости, связки и внутренние органы.

Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что инкапсулирование жизнеспособных микроорганизмов в покрытии на жировой основе согласно настоящему изобретению привело к сохранению жизнеспособности и поспособствовало пробиотическому действию на поверхности кожи.

Следует понимать, что далее предпочтительные варианты осуществления, указанные в отношении одного широкого аспекта изобретения, в равной степени применимы к каждому из других широких аспектов настоящего изобретения, описанных выше. Также следует понимать, что если из контекста не следует иное, предпочтительные варианты осуществления, описанные ниже, можно комбинировать. При использовании в настоящем документе термин "наружный" включает ссылки на составы, которые пригодны для нанесения на поверхности тела (в частности, на кожу или слизистые оболочки). Слизистые оболочки, которые могут быть указаны в этом отношении, включают слизистую оболочку влагалища, полового члена, уретры, мочевого пузыря, ануса, носа и уха.

В настоящем изобретении также предложена терапевтическая композиция для лечения или профилактики кожного заболевания, включающая терапевтически эффективную концентрацию одного или более живых видов или штаммов в фармацевтически приемлемом носителе, подходящем для нанесения на кожу млекопитающего и/или наружного применения на коже или слизистых оболочках млекопитающего, где указанный пробиотический штамм обладает способностью оставаться жизнеспособным в композиции при комнатной температуре и высвобождаться при нанесении на поверхность кожи.

В другом аспекте изобретение относится к композиции, включающей фармацевтически или косметически приемлемый разбавитель или вспомогательное вещество.

Композиция согласно настоящему изобретению может находиться в твердой, жидкой, вязкой форме или в виде крема. Композиция предпочтительно находится в форме

эмульсии. Более предпочтительно композиция представляет собой крем или лосьон.

В одном предпочтительном варианте осуществления изобретение относится к композиции для наружного применения на коже человека или животных.

В варианте осуществления настоящего изобретения композиция представляет собой лосьон, сыворотку, масло или эмульсию, включающие инкапсулированные в жире микроорганизмы.

Композиция согласно настоящему изобретению может с преимуществом дополнительно содержать другие пробиотики, пребиотики, противомикробные средства, антибиотики или другие активные антибактериальные вещества, и/или может предпочтительно также содержать одно или больше из следующих веществ, выбранных из антиоксидантов, витаминов, коферментов, жирных кислот, аминокислот и кофакторов.

В варианте осуществления настоящего изобретения композиция представляет собой фармацевтический, ветеринарный, косметический продукт для наружного применения или для ухода за кожей.

Композиция предпочтительно может включать один или более загустителей, где загуститель может быть выбран из эфира целлюлозы, полисахаридов, выбранных из группы, включающей ксантановую камедь, желатина, высокодисперсного диоксида кремния, крахмала, каррагинанов, альгинатов, трагаканта, агара, гуммиарабика, пектина или поливиниловых сложных эфиров.

Кроме того, композиция также может включать основы, ферменты, электролиты, регуляторы pH, загустители, антиоксиданты, пребиотики, оптические отбеливатели, ингибиторы посерения, регуляторы пенообразования и/или красители.

Композиция может включать один или больше пребиотических источников для пробиотического штамма, для восстановления метаболизма на поверхности кожи.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения композиция, включающая по меньшей мере один живой пробиотический штамм для применения при лечении кожного заболевания.

Другой предпочтительный аспект настоящего изобретения относится к композиции, включающей микрокапсулу согласно настоящему изобретению, или к композиции для наружного применения согласно настоящему изобретению, для применения в качестве лекарственного средства.

Еще более предпочтительный аспект настоящего изобретения относится к композиции, включающей микрокапсулу согласно настоящему изобретению, или к композиции для наружного применения согласно настоящему изобретению, для лечения, облегчения и/или профилактики кожного заболевания.

В рамках настоящего изобретения термины "кожное заболевание" и "заболевание кожи" могут использоваться попеременно и иметь разнообразные симптомы и тяжесть. Заболевание кожи и кожное заболевание могут быть временными или постоянными и могут быть безболезненными или болезненными. Некоторые имеют ситуативные причины, тогда как другие могут быть наследственными. Некоторые кожные заболевания

являются легкими, и другие могут представлять угрозу для жизни.

При использовании в настоящем документе, и, как известно в уровне техники, "лечение" является подходом для получения полезных или нужных результатов, включая клинические результаты. С такими целями полезные или нужные клинические результаты включают, без ограничения, облегчение или ослабление одного или более симптомов, уменьшение степени болезни, стабилизацию (т.е. отсутствие ухудшения) состояния болезни, профилактику болезни, задержку или замедление развития болезни, и/или ослабление или облегчение патологического состояния. Уменьшение может быть уменьшением тяжести осложнений или симптомов на 10 процентов, 20 процентов, 30 процентов, 40 процентов, 50 процентов, 60 процентов, 70 процентов, 80 процентов, 90 процентов, 95 процентов, 98 процентов или 99 процентов.

Кроме того, изобретение относится к композициям, содержащим инкапсулированную в жире композицию, включающую микроорганизмы, в частности, для применения при лечении заболеваний кожи или кожных заболеваний, в продуктах для наружного применения.

В варианте осуществления настоящего изобретения кожное заболевание может быть выбрано из группы кожных заболеваний, включающих псориаз, аллергический дерматит, сухость кожи, чувствительность кожи, склонность к появлению прыщей, гиперпигментированную кожу, возрастные изменения кожи, аллергию, экзему, сыпь, раздраженную УФ-излучением кожу, поврежденную светом кожу, раздраженную детергентами кожу (включая раздражение, вызванное ферментами, используемыми в моющих средствах, и лаурилсульфатом натрия), красные угри и истонченную кожу (например, кожу у пожилых людей и детей).

В другом варианте осуществления композиция согласно настоящему изобретению может применяться для косметического ухода за кожей.

В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения, композиция, включающая инкапсулированную в жире композицию, включающую по меньшей мере один пробиотический микроорганизм согласно настоящему изобретению, может применяться на коже пациентов с воспалительными кожными заболеваниями.

В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения композиция, включающая инкапсулированную в жире композицию, включающую по меньшей мере один пробиотический микроорганизм, может применяться на коже пациентов с воспалительными кожными заболеваниями, где жировое покрытие представляет собой жир с противовоспалительным действием в отношении кожи.

В варианте осуществления настоящего изобретения композиция, включающая инкапсулированную в жире композицию, включающую по меньшей мере один пробиотический микроорганизм, может применяться на коже пациентов с воспалительными кожными заболеваниями, где жировое покрытие представляет собой масло дерева ши (ореха дерева ши).

В другом варианте осуществления настоящего изобретения заболевание кожи

может быть связано с аллергическим дерматитом, экземой, импетиго, акне, ожогами, опрелостью, ранами.

Композиция настоящего изобретения может применяться для облегчения, лечебного или профилактического, например, в качестве пробиотического лечения кожи или слизистых оболочек.

В варианте осуществления настоящего изобретения композиция может быть композицией для наружного применения.

Показатель рН композиции настоящего изобретения может составлять от приблизительно 3 до приблизительно 8. Более предпочтителен рН в пределах 4-7 и еще более предпочтителен рН в пределах 4,5-6,5.

Натуральные масла включают натуральные антиоксиданты, в варианте осуществления настоящего изобретения в композицию могут быть включены дополнительные антиоксиданты. Антиоксидантами предпочтительно может быть витамин Е (0,25-2,5% по весу) и/или экстракт розмарина (0,1-0,75% по весу).

"Снижение" жизнеспособности может быть "статистически значимым" по сравнению с жизнеспособностью, определенной во время изготовления композиции. Снижение жизнеспособности может быть измерено как логарифмическое снижение и может включать логарифмическое снижение 5 или меньше; такое как 4,5 или меньше; например, 4 или меньше; такое как 3,5 или меньше; например, 3 или меньше; такое как 2,5 или меньше; например, 2 или меньше; такое как 1,5 или меньше; например, 1 или меньше; такое как 0,5 или меньше; например, 0,1 или меньше.

"Жизнеспособность" микроорганизмов измеряют в колониеобразующих единицах, КОЕ/мл.

"Снижение" жизнеспособности микроорганизмов может быть определено как различие в КОЕ/мл по сравнению с КОЕ/мл во время изготовления композиции.

Микроорганизмы согласно настоящему изобретению могут быть в выделенной или очищенной форме. В настоящем контексте термин "выделенный" означает, что микроорганизм может быть получен из своей среды культивирования, включая, например, свою естественную среду. Термин "очищенный" не ограничен абсолютной чистотой.

Микроорганизмы предпочтительно могут присутствовать в жизнеспособной, высушенной распылением и/или лиофилизированной форме.

Предпочтительно пробиотический штамм может применяться в виде живого выделенного микроорганизма в высушенной форме. Подходящие способы криопротекции были описаны ранее.

В рамках настоящего изобретения термины "живой" и "жизнеспособный" могут использоваться как взаимозаменяемые.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения микроорганизм может применяться в качестве жизнеспособного выделенного лиофилизированного микроорганизма.

Микроорганизм может присутствовать в композиции в количестве по весу от

0,001% (вес/вес) до 20% (вес/вес), предпочтительно от 0,005% (вес/вес) до 10% (вес/вес), наиболее предпочтительно от 0,01% (вес/вес) до 5% (вес/вес).

Вариант осуществления настоящего изобретения включает введение от приблизительно  $1 \times 10^3$  до  $1 \times 10^{14}$  КОЕ жизнеспособных бактерий на грамм композиции, более предпочтительно от приблизительно  $1 \times 10^4$  до  $1 \times 10^{10}$ , и наиболее предпочтительно от приблизительно  $1 \times 10^5$  до  $1 \times 10^9$  КОЕ жизнеспособных бактерий на грамм композиции.

В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения дозировка живых пробиотических микроорганизмов в композиции может быть выше чем приблизительно  $1 \times 10^4$  КОЕ жизнеспособных бактерий на грамм композиции, предпочтительно выше чем приблизительно  $1 \times 10^5$ , и более предпочтительно может составлять приблизительно  $1 \times 10^6$  КОЕ жизнеспособных бактерий на грамм композиции и более предпочтительно от приблизительно  $1 \times 10^7$  КОЕ жизнеспособных бактерий на грамм композиции.

Было неожиданно обнаружено, что микроорганизмы согласно настоящему изобретению могут быть способны к активации на коже и восстановлению метаболической активности несмотря на присутствие других видов микроорганизмов в микробиоме кожи.

Специалистам в данной области техники будет очевидно, что в данном случае, как и при всех указаниях диапазонов, приведенных в настоящем изобретении, охарактеризованных такими терминами, как "примерно" или "приблизительно", нет необходимости указывать точный числовой диапазон с использованием таких выражений, как "примерно" или "примерн." или "приблизительно", но вместо этого даже незначительные отклонения в сторону повышения или понижения относительно указанного числа все еще находятся в рамках объема настоящего изобретения. В данном контексте незначительное отклонение относится к отклонению в 5% или меньше; такому как отклонение в 4% или меньше; например, отклонение в 3% или меньше; такое как отклонение в 2% или меньше; например, отклонение в 1% или меньше; такое как отклонение в 0,5% или меньше; например, отклонение в 0,1% или меньше.

"Млекопитающее" включает, без ограничения, человека, приматов, сельскохозяйственных животных, спортивных животных, грызунов и домашних животных. Неограничивающие примеры не относящихся к человеку подопытных животных включают грызунов, таких как мыши, крысы, хомяки и морские свинки; кроликов; собак; кошек; овец; свиней; поросят; свиноматок; домашнюю птицу; индеек; бройлеров; норок; коз; рогатый скот; лошадей; и не относящихся к человеку приматов, таких как обезьяны и человекообразные обезьяны.

Предпочтительная композиция может быть предназначена для наружного применения на коже человека.

"Эффективное количество" зависит от контекста, в котором оно применяется. В рамках введения композиции согласно настоящему изобретению эффективное количество может быть добавлением некоторого количества жизнеспособных микроорганизмов, определенных в КОЕ/грамм, оказывающих пробиотическое действие на кожу.

В варианте осуществления настоящего изобретения микрокапсула и/или композиция, включающая инкапсулированную композицию, включающую микроорганизм, может включать пребиотическое соединение. "Пребиотические соединения" или "пребиотики" являются компонентами, которые повышают рост определенных микроорганизмов. "Синбиотики" представляют собой композиции, включающие по меньшей мере один пробиотик и по меньшей мере одно пребиотическое соединение. Такие композиции, как известно, способствуют росту полезных микроорганизмов (например, пробиотик). Таким образом, сильные синбиотики основаны на комбинации определенных штаммов пробиотических микроорганизмов с тщательно подобранными пребиотиками. Они могут приносить значимую пользу для здоровья млекопитающего.

Пребиотики относятся к химическим продуктам, которые вызывают рост и/или активность симбиотических микроорганизмов кожи (например, бактерий и грибов), что способствует здоровью их хозяина. Пребиотики стимулируют рост и/или активность полезных бактерий, которые населяют кожу. Пребиотики могут, таким образом, служить в качестве источника питательных веществ для пробиотиков. Пребиотики известны в уровне техники.

В варианте осуществления настоящего изобретения пребиотики могут быть выбраны из углеводов, глюкозидов, альфа-глюкозидов, бета-глюкозидов, маннанолигосахаридов, инулина, олигофруктозы, олигосахаридов грудного молока (ОГМ), галактоолигосахаридов (ГОС), лактулозы, лактосахарозы, галактотриозы, фруктоолигосахарида (ФОС), целлобиозы, целлодекстринов, циклодекстринов, мальтита, лактита, гликозилсахарозы, бетаина, витамина Е или его варианта (где варианты выбраны из альфа, бета, гамма, дельта-токоферолов, токотриенолов и токомоненолов). Необязательно могут быть предпочтительными маннанолигосахариды и/или инулин.

ОГМ могут включать лакто-N-тетраозу, лакто-N-фукопентаозу, лакто-N-триозу, 3'-сиалиллактозу, лакто-N-неофукопентаозу, сиаловую кислоту, L-фукозу, 2-фукозиллактозу, 6'-сиалиллактозу, лакто-N-неотетраозу и 3-фукозиллактозу.

В варианте осуществления настоящего изобретения в композиции для наружного применения согласно изобретению используется по меньшей мере одно из следующих пребиотических соединений: лактоза, бета-глюкозиды, маннанолигосахариды, инулин, олигофруктоза, галактоолигосахариды (ГОС), лактулоза, лактосахароза, галактотриоза, фруктоолигосахарид (ФОС), целлобиоза, целлодекстрины, циклодекстрины, мальтит, лактит, гликозилсахароза, бетаин, витамин Е или его вариант (где варианты отобраны из альфа, бета, гамма, дельта-токоферолов, токотриенолов и токомоненолов), лакто-N-тетраоза, лакто-N-фукопентаоза, лакто-N-триоза, 3'-сиалиллактоза, лакто-N-неофукопентаоза, сиаловая кислота, 2-фукозиллактоза, 6'-сиалиллактоза, лакто-N-неотетраоза и 3-фукозиллактоза. Необязательно могут быть предпочтительными лактоза и/или маннанолигосахариды, и/или инулин.

Фукоза, в особенности L-фукоза, может быть предпочтительной, так как считается,

что это соединение усиливает естественную защиту кожи, стимулирует иммунную защиту эпидермиса и/или предотвращает и/или лечит кожное аутоиммунное заболевание. В одном предпочтительном варианте осуществления изобретения композиция включает L-фукозу и/или D-фукозу.

В варианте осуществления настоящего изобретения композиция дополнительно включает L-фукозу и/или D-фукозу в концентрации в композиции от 10 мМ до 500 мМ.

Композиция согласно настоящему изобретению, включающая инкапсулированный микроорганизм согласно изобретению, может дополнительно включать по меньшей мере один другой пробиотический микроорганизм, выбранный из группы, состоящей из бактерий, археев, бактериофагов, вируса, дрожжей или плесневых грибов.

В варианте осуществления настоящего изобретения композиция включает инкапсулированный микроорганизм согласно настоящему изобретению и по меньшей мере еще один другой штамм, где по меньшей мере еще один другой микроорганизм может быть выбран из следующего:

бифидобактерия может быть любой бифидобактерией, обладающей пробиотическим действием, как правило, используются штаммы, принадлежащие видам *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium bifidum* и *Bifidobacterium adolescentis*. Один или больше живых штаммов *Bifidobacterium lactis* выбраны, без ограничения, из следующих: *B. lactis* BI-04, *B. lactis* Bi-07, *B. lactis* 420, *B. lactis* DN 173 010, *B. lactis* HN019, *B. lactis* Bb-12, *B. lactis* DR10, *B. lactis* DSM10140, *B. lactis* LKM512, *B. lactis* DSM 20451, *Bifidobacterium bifidum* BB-225, *Bifidobacterium adolescentis* BB-102, *Bifidobacterium breve* BB-308, *Bifidobacterium longum* BB-536 от Zaidanhojin Nihon Bifizusukin Senta (Japan Bifidus Bacteria Center), *Bifidobacterium* NCIMB 41675, описанная в EP2823822. *Bifidobacterium bifidum* BB-225, *Bifidobacterium adolescentis* BB-102, *Bifidobacterium breve* BB-308, *Bifidobacterium lactis* HN019 (Howaru), доступная от DuPont Nutrition Biosciences ApS, *Bifidobacterium lactis* DN 173 010, доступная от Groupe Danone, *Bifidobacterium lactis* Bb-12, доступная от Christian Hansen A/S, *Bifidobacterium lactis* 420, доступная от DuPont Nutrition Biosciences ApS, *Bifidobacterium breve* Bb-03, доступная от DuPont Nutrition Biosciences ApS, *Bifidobacterium bifidum* Bb-02, *Bifidobacterium bifidum* Bb-06, *Bifidobacterium longum* KC-1 и *Bifidobacterium longum* 913 (DuPont Nutrition Biosciences ApS), *Bifidobacterium breve* M-16V (Morinaga), и/или лактобацилла, обладающая пробиотическим действием, и может быть любым из следующих штаммов: *Lactobacillus rhamnosus* LGG (Chr. Hansen), *Lactobacillus acidophilus* NCFM (DuPont Nutrition Biosciences ApS), *Lactobacillus bulgaricus* 1260 (DuPont Nutrition Biosciences ApS), *Lactobacillus paracasei* Lpc-37 (DuPont Nutrition Biosciences ApS), *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (Howaru), доступная от DuPont Nutrition Biosciences ApS, *Streptococcus thermophilus* 715 и *Streptococcus thermophilus* ST21, доступная от DuPont Nutrition Biosciences ApS, *Lactobacillus paracasei* подв. *paracasei* CRL431 (ATCC 55544), *Lactobacillus paracasei* штамма F-19 от Medipharm, Inc., *L. paracasei* LAFTI L26 (DSM

Food Specialties, the Netherlands) и *L. paracasei* CRL 431 (Chr. Hansen), *Lactobacillus acidophilus* PTA-4797, *L. salivarius* Ls-33 и *L. curvatus* 853 (DuPont Nutrition Biosciences ApS). *Lactobacillus casei* подв. *rhamnosus* LC705 описана в патенте Финляндии 92498, Valio Oy. *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) (ATCC 53103) описана в патенте США 5,032,399, и *Lactobacillus rhamnosus* LC705 (DSM 7061), пропионовокислая бактерия, например, *Propionibacterium freudenreichii* подв. *shermanii* PJS (DSM 7067), описанная более подробно в патенте Финляндии 92498, Valio Oy, *Nitrosomonas eutropha* D23 (ABiome), *Staphylococcus hominis* штаммов A9, C2, AMT2, AMT3, AMT4-C2, AMT4-G1 и/или AMT4-D12 (все от Matrisys Bioscience), *Staphylococcus epidermidis* штаммов M034, M038, A11, AMT1, AMT5-C5 и/или AMT5-G6 (все от Matrisys Bioscience), *L. plantarum* YUN-V2.0 (Yun NV, BCCM LMG P-29456), *L. pentosus* YUN-V1.0 (BCCN LMG P-29455), *L. rhamnosus* YUN-S1.0 (BCCM LMG P-2961) и их любые смеси.

Предпочтительно, композиция, включающая инкапсулированный микроорганизм, дополнительно включает по меньшей мере один штамм, выбранный из группы, состоящей из: *Weissella viridescens* LB10G (DSM 32906), *Lactobacillus plantarum* LB113R (DSM 32907), *Lactobacillus plantarum* LB244R (DSM 32996), *Lactobacillus paracasei* LB116R (DSM 32908), *Lactobacillus paracasei* LB28R (DSM 32994), *Lactobacillus brevis* LB152G (DSM 32995), *Lactobacillus plantarum* LB316R (DSM 33091), *Leuconostoc mesenteroides* LB349R (DSM 33093), *Lactobacillus plantarum* LB356R (DSM 33094), *Lactobacillus plantarum* LB312R (DSM 33098) и *Leuconostoc mesenteroides* LB276R (DSM 32997) или мутантных штаммов.

В варианте осуществления настоящего изобретения композиция может включать по меньшей мере один штамм, выбранный из группы молочнокислых бактерий, способных повышать целостность плотных контактов, например, *Lactobacillus acidophilus* NCFM (DuPont), *Lactobacillus salivarius* Ls-33 (DuPont), (DuPont) *Bifidobacterium lactis* 420, *L. acidophilus* La-14 (DuPont) или *L. rhamnosus* LGG (Chr. Hansen).

Для получения продукта, который действует как на поверхность кожи, так и через дерму/эпидермис, может быть предложена концепция эмульсии, при этом может потребоваться, чтобы концепция эмульсии была включена. Эмульсия представляет собой смесь двух или больше жидкостей, которые обычно не смешиваются (например, масло и вода). Эмульсии являются частью более широкого класса двухфазных систем веществ, называемых коллоидами. Хотя термины коллоид и эмульсия иногда используются как взаимозаменяемые, эмульсия используется, когда дисперсная и сплошная фаза являются жидкими. В эмульсии одна жидкость (дисперсная фаза) диспергирована в другой жидкости (сплошная фаза).

В предпочтительном варианте осуществления изобретения инкапсулированный в жире микроорганизм суспендирован в жидком масле и дополнительно включен в эмульсию, включающую водную фазу и масляную фазу, где масляная фаза включает микроорганизмы, инкапсулированные в твердом жире.

"Жидкое" масло согласно изобретению является маслом, жидким при температуре

хранения, таким образом, жидкое масло имеет температуру плавления ниже 25°C, такую как ниже 20°C, например, ниже 15°C.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения жидкое масло является растительным и выбрано из миндального масла, конопляного масла, масла КБД, масла каннабиса, вечерней примулы, масла бурачника, масла сладкого миндаля, масла шиповника, масла жожоба золотого, масла ромашки, масла календулы, облепихового масла, цветочного масла Jaf и кунжутного масла.

Растительное масло может включать по меньшей мере одно из следующего: асаи, ягоды асаи, сладкий миндаль, алоэ вера, андироба, абрикосовая косточка, арника, аргана, авокадо, бабассу, боабаб, семена ежевики, черный тмин, семена черной смородины, черника, бурачник, бразильский орех, семена брокколи, бурити, календула, семена камелии, масло каннабиса, включающее КБД и ТГК, канола, копайский бальзам, каштан капский (янгу), морковь (*Daucus carota*), клещевина, виноград шардоне, хальмугра, вишневая косточка, семена чиа, звездчатка, кокос, фракционированный кокос, семена хлопка, окопник, кукуруза, семена крамбе, семена клюквы, семена огурца, семена эхиума, яйцо, примула вечерняя, эму, семена льна, виноградные косточки, лесной орех, семена конопли, семена конского ореха, жожоба, семена каранджа, семена киви, лумбанг, орех макадамия, марула, алтей, монгонго, пенник луговой, семена расторопши, моринга масличная, коровяк обыкновенный, семена горчицы, ним, олива, пальма, семена папайи, семена пассифлоры, персиковая косточка, арахис, перилла, гранат, пентаклетра крупнолопастная *Pentaclethra macroloba*, семена тыквы, семена малины, рисовые отруби, шиповник, Масло зверобоя, сафлор, мякоть облепихи, масло ши, жареный кунжут, семена кунжута, соя, подсолнечник, калофиллум волокнистолистный или таману (*Calophyllum inophyllum*), чертополох, томат, ализариновое масло, кротон Лехлера, грецкий орех, семена арбуза, зародыши пшеницы, катран абиссинский, рапс, пчелиный воск, ланолин, льняное семя, масло мортиреллы, онгокея, вазелиновое масло, пекан, пеки, мак, пракакси, рапс, соя, таловое масло, тунг, вероника лекарственная, зародыши пшеницы, семена Янгу, и их любые комбинации.

Твердый жир для покрытия жизнеспособного микроорганизма отличается тем, что он является твердым при температуре хранения и плавится при температуре кожи.

Предпочтительно твердый жир является натуральным растительным жиром или маслом. Эти жиры могут быть триглицеридами, при этом температура плавления зависит от определенной комбинации жирных кислот в триглицеридах. Поэтому жиры могут быть химически модифицированными или смешанными, чтобы получить смешанную жировую композицию со свойством согласно изобретению.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения смешанный жир или химически модифицированный жир, который может использоваться для покрытия жизнеспособного микроорганизма, отличается тем, что такой жир имеет температуру плавления от 25°C до 37°C.

Согласно другому варианту осуществления предложен жировой препарат,

включающий: твердое жирное масло или полутвердое жирное масло; где твердое жирное масло или полутвердое жирное масло может включать добавку, выбранную из группы, состоящей из: частей растений, деревьев, корней, семян, косточек, орехов, масел, жирных кислот, активного ингредиента, растительных масел, авокадо, пчелиного воска, побочных продуктов животноводства, сариаги, какао, черного какао, кокоса, кофе, бассии, гарцинии, манго, мурумuru, ядра кокоса, фисташки, ши, Shealoe, сои, астрокариума, укуубу, нильского ши, сал (*Shorea robusta*), талового масла (говяжий жир) и их любой комбинации, с получением температуры плавления жировой композиции от 25°C до 37°C.

В варианте осуществления настоящего изобретения твердый жир может быть триглицеридом, где жирнокислотный состав триглицерида включает олеиновую кислоту (C18:1) и стеариновую кислоту (C18:0).

Жирные кислоты триглицерида могут включать по меньшей мере 30% олеиновой кислоты (C18:1) и по меньшей мере 30% стеариновой кислоты (C18:0).

В варианте осуществления настоящего изобретения твердый жир может быть выбран из жира масла какао, жира масла ореха бассии, жира масла манго, жира масла панья и/или жира масла дерева ши или их любых комбинаций.

В варианте осуществления изобретения композиция включает по меньшей мере 10% жира.

В другом варианте осуществления изобретения композиция включает по меньшей мере 20% жира.

В еще одном варианте осуществления изобретения композиция включает по меньшей мере 50% жира.

В еще одном варианте осуществления изобретения твердый жир включает по меньшей мере 50% жира масла дерева ши.

В другом варианте осуществления изобретения твердый жир включает по меньшей мере 75% жира масла дерева ши.

В еще одном варианте осуществления изобретения твердый жир включает по меньшей мере 90% жира масла дерева ши.

Композиция согласно настоящему изобретению может быть эмульсией, включающей гидрофильную фазу и гидрофобную фазу, где гидрофобная фаза составляет по меньшей мере 50% композиции, и где гидрофобная фаза включает инкапсулированные в жире жизнеспособные микроорганизмы.

В варианте осуществления настоящего изобретения композиция может быть эмульсией, включающей гидрофильную фазу и гидрофобную фазу, где гидрофобная фаза включает масло и жир, и где соотношение воды:масла:жира составляет 20-60:30-50:5-20.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения композиция может быть эмульсией, состоящей из гидрофильной фазы и гидрофобной фазы, где гидрофобная фаза включает масло и жир, и где соотношение воды:масла:жира составляет 5-20:5-30:50-90.

Пробиотические микроорганизмы согласно настоящему изобретению могут быть

способны к пролиферации и колонизации на и/или в коже млекопитающего.

Настоящее изобретение успешно решает недостатки известных в настоящее время композиций для наружного применения. Известные композиции для наружного применения либо не способны сохранять жизнеспособность микроорганизмов, либо микроорганизмы не способны активироваться на поверхности кожи.

Настоящее изобретение обеспечивает несколько преимуществ. В частности, жизнеспособность микроорганизмов сохраняется в композиции даже в условиях хранения при комнатной температуре. Микроорганизмы активируются при температуре кожи с высвобождением микроорганизмов из оболочек на коже.

Согласно другому варианту осуществления предложен микроорганизм, инкапсулированный в жире с температурой плавления приблизительно 25-37°C. Инкапсулированный микроорганизм может быть дополнительно включен в композицию. При нанесении на кожу жир плавится и высвобождает жизнеспособный микроорганизм, который затем активируется под воздействием влаги в коже, а также влаги и любых пребиотиков в композиции для наружного применения.

В другом аспекте настоящего изобретения предложены способы получения композиции для наружного применения, включающей микроорганизм, инкапсулированный в жире.

Способы могут включать этап получения расплавленной жировой композиции, имеющей температуру плавления выше 25°C, путем гомогенного смешивания расплавленного жира с высушенными жизнеспособными микроорганизмами. Жировая композиция может быть нагрета до температуры плавления или немного выше с получением расплавленной жировой смеси с высушенным микроорганизмом. В предпочтительном варианте микроорганизм представляет собой лиофилизированную культуру. Кроме того, предпочтительно микроорганизм охлаждают ниже 10°C перед смешиванием с расплавленным жиром.

Важно то, что жировая композиция имеет низкое содержание свободной влаги (т.е.  $A_w$  меньше 0,4), чтобы свести к минимуму контакт высушенного жизнеспособного микроорганизма с влагой и избежать активации микроорганизма. Высушенный микроорганизм смешивают с расплавленным жиром, необязательно вместе с любыми смешиваемыми дополнительными растворимыми компонентами, с получением гомогенно инокулированного расплавленного жира с содержанием  $10^3$ - $10^{12}$  колониеобразующих единиц на грамм.

Жировая композиция твердеет при охлаждении, предпочтительно жировую композицию охлаждают быстро, чтобы избежать кристаллизации жира. Жировая композиция может применяться непосредственно в качестве композиции для наружного применения. Жировая композиция, включающая жизнеспособные микроорганизмы, может быть подвергнута дополнительной обработке.

Способ может дополнительно включать следующий этап. Расплавленную жировую композицию, включающую жизнеспособные микроорганизмы, охлаждают и

непосредственно перед затвердеванием гомогенно перемешивают в масле. Масло при этом будет содержать инкапсулированные в жире жизнеспособные микроорганизмы. Масляная композиция, включающая инкапсулированные в жире микроорганизмы, может применяться непосредственно в качестве композиции для наружного применения.

Масляная композиция, включающая инкапсулированные в жире микроорганизмы, может быть подвергнута дополнительной обработке.

Способ может дополнительно включать следующий этап. Масляную композицию, включающую инкапсулированные в жире микроорганизмы, могут смешивать с гидрофильной композицией, обеспечивая эмульгирование, необязательно вместе с любыми дополнительными растворимыми компонентами. Инкапсулированные в жире микроорганизмы останутся в масляной фазе. Масляная фаза может быть либо сплошной фазой, либо несплошной фазой эмульсии. Эмульсия будет являться композицией для наружного применения согласно изобретению, включающей инкапсулированный в жире жизнеспособный микроорганизм, которая отличается жировым покрытием, имеющим температуру плавления в пределах 32-37°C.

Один аспект согласно настоящему изобретению относится к способу получения микрокапсулы согласно настоящему изобретению, где способ включает следующие этапы:

- (i) получение композиции, включающей жизнеспособный микроорганизм;
- (ii) добавление жира в композицию, включающую жизнеспособный микроорганизм, с получением микроорганизма, смешанного с жиром;
- (iii) смешивание микроорганизма, смешанного с жиром, с получением микрокапсулы согласно настоящему изобретению.

Предпочтительно композиция, включающая жизнеспособный микроорганизм, предоставленный в этапе (i), может быть подвергнута этапу сушки перед смешиванием с жиром (этап (ii)). Этап сушки может быть выполнен путем лиофилизации; сушкой атмосферным воздухом; вакуумной сушки или распылительной сушки. Предпочтительно этап сушки может быть выполнен путем лиофилизации.

Этап сушки может быть продолжен, пока композиция, включающая жизнеспособный микроорганизм, не будет содержать ниже 5% (вес/вес) воды; например, ниже 4% (вес/вес); например, ниже 3% (вес/вес); например, ниже 2% (вес/вес); например, ниже 1% (вес/вес); например, ниже 0,5% (вес/вес); например, ниже 0,1% (вес/вес); например, ниже 0,05% (вес/вес); например, ниже 0,01% (вес/вес).

Чтобы предохранить жизнеспособные микроорганизмы от разрушения, в композицию, включающую жизнеспособный микроорганизм, может быть добавлено защитное средство, перед тем как композицию, включающую жизнеспособный микроорганизм, можно будет подвергнуть этапу сушки.

Жир, добавленный в этапе (ii), может быть расплавлен перед добавлением в композицию, включающую жизнеспособный микроорганизм. Предпочтительно жир может быть расплавлен путем нагрева жира до температуры в диапазоне 35-75°C, такой

как 37-65°C, например, 40-55°C.

В варианте осуществления настоящего изобретения смешивание микроорганизма, смешанного с жиром (этап (iii)), можно проводить с получением инкапсулированной композиции, включающей жизнеспособный микроорганизм. Смешивание смешанного с жиром микроорганизма (этап (iii)) может быть выполнено путем перемешивания и/или гомогенизации.

После смешивания смешанного с жиром микроорганизма (этап (iii)), жиру могут позволять затвердеть после смешивания жировой смеси, предпочтительно путем охлаждения до температуры ниже 37°C, такой как температура ниже 35°C, например, температура ниже 30°C, такая как температура ниже 25°C, например, температура ниже 20°C, такая как температура ниже 15°C, например, температура ниже 10°C, такая как температура ниже 5°C, например, температура ниже 2°C.

В варианте осуществления настоящего изобретения масло может быть добавлено к микрокапсуле, полученной в этапе (iii), с получением гидрофобной фазы, включающей микрокапсулу. Масло может быть смесью масел.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения гидрофильная фаза может быть смешана с гидрофобной фазой с образованием эмульсии.

Ниже приведен пример процедуры получения композиции, включающей инкапсулированный в жире микроорганизм, для наружного применения.

Процедура 1:

Этап 1: Расплавить жир для покрытия

Этап 2: Охладить до температуры перед затвердеванием жира и добавить пробиотический микроорганизм

Этап 3: Гомогенизировать

Этап 4: Охладить до затвердевания

Процедура 2:

Этап 1: Расплавить жир для покрытия

Этап 2: Охладить до температуры перед затвердеванием жира и добавить пробиотический микроорганизм и гомогенизировать

Этап 3: Добавить жидкое масло и гомогенизировать

Этап 4: Охладить до затвердевания

Процедура 3:

Этап 1: Расплавить жир для покрытия

Этап 2: Охладить до температуры перед затвердеванием жира и добавить пробиотический микроорганизм и гомогенизировать

Этап 3: Добавить жидкое масло и гомогенизировать

Этап 4: Смешать с гидрофильной фазой с образованием эмульсии

Этап 5: Охладить до затвердевания

Процедура 4:

Этап 1: Расплавить жир для покрытия

Этап 2: Охладить до температуры приблизительно 37°C и добавить лиофилизированный пробиотический микроорганизм и гомогенизировать

Этап 3: Добавить жидкое масло и гомогенизировать

Этап 4: Смешать с гидрофильной фазой с образованием эмульсии

Этап 5: Охладить до затвердевания

Этап 6: Хранить в воздухонепроницаемом контейнере

Следует отметить, что варианты осуществления и признаки, описанные в рамках одного из аспектов настоящего изобретения, также относятся к другим аспектам изобретения.

Все патентные и непатентные источники, цитируемые в настоящей заявке, включены посредством отсылок во всей своей полноте.

Далее изобретение будет описано более подробно в следующих неограничивающих примерах.

### Примеры

Пример 1

Процедура 2:

Этап 1: Расплавить жир

Этап 2: Охладить до температуры приблизительно 37°C и добавить лиофилизированный пробиотический микроорганизм и гомогенизировать

Этап 3: Добавить жидкое масло и гомогенизировать

Этап 4: Смешать с гидрофильной фазой с образованием эмульсии

Этап 5: Охладить до затвердевания

Жиры, используемые в этапе 1, представлены в таблице 1.

Таблица 1: Жиры и состав основных жирных кислот триглицерида.

Жирная кислота	Масло дерева ши	Масло бассии	Масло какао	Манго	Панья
Арахидоновая кислота (C20:0)	1-2%		0,1-1,0%		0,1%
Линолевая кислота (C18:2)	4-8%	0-1,2%	2,6-3,5%	7,33%	0,5-0,7%
Олеиновая кислота (C18:1)	43-56%	32-38%	32,7-34,6%	46,22%	48,7-57,6%
Пальмитиновая кислота (C16:0)	4-8%	15-19%	24,1-25,8%	6,43%	2,6-3,9%
Стеариновая кислота (C18:0)	31-45%	42-48%	33,3-37,4%	37,73%	38,4-47,1%

Микроорганизмами, используемыми в примере, являются: *Lactobacillus rhamnosus* LBB (Chr. Hansen), *Weissella viridescens* LB10G (DSM 32906), *Lactobacillus plantarum* LB113R (DSM 32907), *Lactobacillus plantarum* LB244R (DSM 32996), *Lactobacillus paracasei* LB116R (DSM 32908), *Lactobacillus paracasei* LB28R (DSM 32994), *Lactobacillus brevis* LB152G (DSM 32995) и *Leuconostoc mesenteroides* LB276R (DSM 32997). Микроорганизмы представляют собой лиофилизированные жизнеспособные штаммы, кроме одного эксперимента с использованием жизнеспособных свежесыведенных

культивированных штаммов *Leuconostoc mesenteroides* LB276R (DSM 32997) и *Lactobacillus rhamnosus* LBB (Chr. Hansen), выращенных в средах MRS, собранных с помощью центрифугирования и протестированных на жизнеспособность в других жирах.

В этапе 3 использовали следующие масла:

Образец 1: Миндальное масло

Образец 2: Масло бурачника

Образец 3: Масло сладкого миндаля

Образец 4: Масло шиповника

Образец 5: Золотое масло жожоба

Образец 6: Масло ромашки

Образец 7: Масло календулы

Образец 8: Облепиховое масло

Образец 9: Масло энотеры Jafflower

Образец 10: Кунжутное масло

Используются следующие добавки:

Триаконтанил

Пчелиный воск

Поли-сорбат 40, 60 или 80

Лецитин

Глицерин

токоферол

Инулин

Лактоза

L-фукоза

Альфа-глюкан олигосахарид

Добавки могут добавлять в этапе 1, 3 или 4.

Жизнеспособность штаммов определяли в различных жирах и маслах. Было установлено, что все протестированные штаммы были стабильными в 5 жирах, особенно в масле дерева ши, ни один из лиофилизированных штаммов не потерял своей жизнеспособности при анализе после 3 дней при 25°C.

Некоторые масла, например, облепиховое масло и масло шиповника обладали противомикробной активностью и сохраняли жизнеспособность штаммов в этих маслах, поэтому важно заключать жизнеспособный штамм в жир перед смешиванием в масле.

Пример 2

Следующие композиции изготавливали согласно процедуре 4 выше.

Композиция 1:

Жир масла дерева ши: 10 г

Лиюфилизированные микроорганизмы: 1 г (соответствует приблизительно  $10^9$  КОЕ/мл готовой композиции)

Миндальное масло: 50 г

Пчелиный воск: 6 г

Глицерин: 3,48 г

Полисорбат 80: 1,16 г

Вода: 45,36 г

Композиция 2:

Жир масла дерева ши: 30 г

Лиофилизированные микроорганизмы: 1 г (соответствует приблизительно  $10^9$  КОЕ/мл готовой композиции)

Миндальное масло: 50 г

Пчелиный воск: 6 г

Глицерин: 3,48 г

Полисорбат 80: 1,16 г

Вода: 25,36 г

Композиция 3:

Жир масла дерева ши: 80 г

Лиофилизированные микроорганизмы: 1 г (соответствуют приблизительно  $10^9$  КОЕ/мл готовой композиции)

Кунжутное масло: 10 г

Пчелиный воск: 6 г

Глицерин: 3,48 г

Полисорбат 80: 1,16 г

Подкисленная вода (рН 5): 10 г

Токоферол: 0,1 г

Композиция 4:

Жир масла дерева ши: 40 г

Лиофилизированные микроорганизмы: 1 г (соответствует приблизительно  $10^9$  КОЕ/мл готовой композиции)

Миндальное масло: 10 г

Масло жожоба: 30 г

Пчелиный воск: 6 г

Глицерин: 3,48 г

Полисорбат 80: 1,16 г

Вода: 20 г

Инулин: 5 г

Композиция 5:

Жир масла панья: 50 г

Лиофилизированные микроорганизмы: 1 г (соответствует приблизительно  $10^9$  КОЕ/мл готовой композиции)

Масло жожоба: 15 г

Триаконтанил: 6 г

Глицерин: 3,48 г

Лецитин: 1 г

Вода: 35 г

Лактоза: 5 г

Альфа-глюкан олигосахарид: 1 г

Композиция 6:

Жир масла дерева ши: 50 г

Жир масла какао: 20 г

Лиофилизированные микроорганизмы: 1 г (соответствует приблизительно  $10^9$  КОЕ/мл готовой композиции)

Масло сладкого миндаля: 15 г

Лецитин: 1 г

Вода: 20 г

Лактоза: 5 г

L-фукоза

Композиция 7:

Жир масла дерева ши: 30 г

Жизнеспособные собранные микроорганизмы: соответствующие приблизительно  $10^9$  КОЕ/мл готовой композиции

Миндальное масло: 50 г

Пчелиный воск: 6 г

Глицерин: 3,48 г

Полисорбат 80: 1,16 г

Вода: 25,36 г

Инулин: 5 г

Композиции хранили в воздухонепроницаемых флаконах при 20°C и 25°C. КОЕ/мл определяли после 1, 2, 5, 7, 14, 30, 60 и 90 дней.

Все композиции были стабильными с логарифмическим снижением меньше 0,5 в течение всего периода исследования, при этом штаммы сохраняли жизнеспособность. За исключением композиции 7, включающей жизнеспособные собранные штаммы, которые не были лиофилизированы перед нанесением жира. В случае Композиции 7 жизнеспособность после 1 недели снизилась до приблизительно  $10^7$  КОЕ/мл, а после 60 дней жизнеспособность составила  $10^4$ - $10^6$  КОЕ/мл. После 90 дней в композиции 7 не наблюдали никакой жизнеспособности, тогда как все остальные композиции, содержащие лиофилизированные инкапсулированные микроорганизмы, все еще сохраняли жизнеспособность.

### Пример 3

Содержание воды в лиофильно высушенном/лиофилизированном микроорганизме определяли с помощью титрования по Карлу Фишеру с использованием реагентов Karl Fischer Aquastar производства Merck, наборов Water standard oven (Merck 1.88054), и

согласно стандартному анализу для определения содержания воды, предоставленному в наборе, в интервале от <0,1% до >5% (вес/вес). Эффект содержания воды в лиофилизированной композиции оценивали при инкапсулировании в жире лиофилизированного жизнеспособного микроорганизма с использованием таких полигидроксисоединений, как трегалозы (Sigma-Aldrich T9449) и сахарозы (Sigma-Aldrich 84097), в качестве криопротекторов. *Lactobacillus plantarum* LB244R выращивали в течение ночи в 1 л MRS при 37°C и собирали с помощью центрифугирования с получением водной концентрированной клеточной массы. Криопротекторы использовали в количестве приблизительно 50% водной концентрированной клеточной массы *Lactobacillus plantarum* LB244R (LAB), среда для консервации содержала 200 г каждого криопротектора, и 3,5 г NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O, 7,1 г Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> и 400 мл деионизированной воды добавляли к ресуспендированной клеточной массе (приблизительно 3% (вес/об) клеточной массы).

Исходную суспензию выдерживали в ледяной бане в течение приблизительно 30 минут перед применением. Каждую из двух флаконов для лиофильной сушки заполняли 250 мл исходной суспензии. Исходные суспензии быстро замораживали при вращении флаконов в сухом льду и подсоединяли к лиофилизатору (Lyph-Locke 6L, Labconco), работающему при 950 Па и 55°C, на 15 мин, 45 мин, 2 часа, 6 часов и 24 часа (повторяли в двух экземплярах). Лيوфилизированные образцы сразу анализировали на содержание воды, и инкапсулирование в жире производили согласно процедуре 1, описанной выше.

Жировая композиция, используемая для инкапсулирования, была следующей:

Жир масла дерева ши (Natura-Тес мягкое рафинированное масло ши органик): 10 г

Лиюфилизированная LAB: 1 г

Миндальное масло (Natura-Тес масло сладкого миндаля, рафинированное): 5 г

Масло жожоба (Natura-Тес масло жожоба, рафинированное): 5 г

Пчелиный воск (KahlWax пчелиный воск органик 8139): 1 г

Глицерин (Merck 1295607): 1 г

Инкапсулированную в жире лиофилизированную LAB хранили при 25°C и тестировали на жизнеспособность в следующие дни: 0, день 7, день 21.

Содержание воды перед инкапсулированием в жире определяли с помощью титрования по КФ	КОЕ/г инкапсулированных в жире лиофилизированных LAB (хранили при 25°C)		
	T=0	T=7 дней	T=21 день
12,7%	$2 \times 10^9$	0	0
8,2%	$8 \times 10^9$	<10	0
4,9%	$1 \times 10^{10}$	$2 \times 10^5$	$10^3$
3,1%	$6 \times 10^9$	$6 \times 10^9$	$5 \times 10^7$
0,09%	$6 \times 10^9$	$3 \times 10^9$	$2 \times 10^9$
11,6%	$4 \times 10^9$	0	0
7,9%	$2 \times 10^{10}$	70	0
5,1%	$7 \times 10^9$	$2 \times 10^8$	100
2,7%	$3 \times 10^9$	$9 \times 10^8$	$2 \times 10^9$
0,1%	$8 \times 10^8$	$8 \times 10^9$	$2 \times 10^9$

Чем ниже было содержание воды в лиофилизированных LAB перед инкапсулированием в жире, тем более высокая стабильность хранения была получена.

При низком содержании воды была достигнута кристаллизация лиофилизированных LAB, и кристаллы были инкапсулированы в жировой композиции.

На Фигуре 1 показаны инкапсулированные в жире лиофилизированные LAB.

Пример 4:

Различные криопротекторы тестировали с 2 разными содержаниями воды в лиофилизированном материале.

Сухое обезжиренное молоко для микробиологии (Merck 70166)

Пептон (растительный) (Merck 18332)

Декстран (Sigma-Aldrich S6022)

Декстроза (Sigma-Aldrich G8270)

Глутамат (Sigma-Aldrich G3291)

Трегалоза (Sigma-Aldrich T9449)

Сахароза (Sigma-Aldrich 84097)

Полиэтиленгликоль (ПЭГ) (Sigma-Aldrich 81260)

*Lactobacillus plantarum* LB244R (LAB) выращивали в 200 мл MRS в течение ночи при 37°C, собирали с помощью центрифугирования и ресуспендировали в 50 мл фосфатно-солевого буфера PBS, смешивали 1:1 с каждым криопротектором и лиофилизировали, как описано в Примере 3, с получением двух разных значений содержания воды, приблизительно 1% и 5% (вес/вес), определенных с помощью анализа титрования по КФ. Криопротекторы сравнивали со стабильностью контроля, включающего криопротекторы.

После лиофилизации каждый образец инкапсулировали в жировой композиции:

Жир масла дерева ши: 10 г

Лиофилизированные LAB: 1 г

Миндальное масло: 10 г

Жизнеспособность инкапсулированных в жире, лиофилизированных LAB определяли полуколичественно сразу после инкапсулирования в жире и после хранения в течение 14 дней при 25°C при подсчете на чашках, с использованием 15% полисорбата 80 (tween) в воде для разбавления инкапсулированных в жире лиофилизированных LAB.

Жизнеспособность определяли полуколичественно при использовании следующей шкалы:

Никакая жизнеспособность: -

Больше  $10^3$  КОЕ/г +

Больше  $10^6$  КОЕ/г ++

Криопротектор	Содержание воды % (вес/вес)	T=0	T=14 дней
Сухое обезжиренное молоко	5,0	++	++
	0,8	++	++
Пептон	5,3	++	+

	1,1	++	++
Декстран	4,8	++	++
	0,9	++	++
Декстроза	5,1	++	++
	1,2	++	++
Глутамат	5,5	++	+
	0,7	++	++
Трегалоза	4,9	++	++
	1,0	++	++
Сахароза	4,8	++	++
	0,8	++	++
ПЭГ	5,4	++	+
	1,2	++	++
Контроль	5,1	++	-
	0,9	++	-

Жизнеспособность лиофилизированных, инкапсулированных в жире LAB в значимой степени зависела от криопротекторов, в контроле без криопротектора лиофилизированные, инкапсулированные в жире LAB становились нежизнеспособными (мертвыми) после 14 дней. Было показано, что применение криопротекторов для лиофилизации перед инкапсулированием в жире было важным для жизнеспособности, однако все протестированные криопротекторы демонстрировали значимый эффект, и только несколько криопротекторов показали снижение жизнеспособности после 14 дней, и такое снижение наблюдали для лиофилизированных LAB с высоким содержанием воды (>5%).

#### Пример 5:

Долговременную стабильность определяли для инкапсулированных в жире, лиофилизированных молочнокислых бактерий (МКБ) согласно процедуре, описанной в Примере 3.

*Lactobacillus plantarum* LB244R лиофилизировали при использовании декстрозы и сахарозы в качестве криопротекторов 1:1. *L. plantarum* LB244R выращивали в течение ночи в 1 л MRS при 37°C и собирали с помощью центрифугирования с получением концентрированной водной клеточной массы. Криопротекторы использовали в количестве приблизительно 50% от водной концентрированной клеточной массы *Lactobacillus plantarum* LB244R (LAB), среда для консервации содержала по 200 г каждого криопротектора и 3,5 г  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 7,1 г  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  и 400 мл деионизированной воды добавляли к ресуспендированной клеточной массе (приблизительно 3% (вес/об) клеточной массы).

Исходную суспензию выдерживали в ледяной бане в течение приблизительно 30 минут перед применением. Каждую из двух флаконов для лиофильной сушки заполняли 250 мл исходной суспензии. Исходные суспензии быстро замораживали при вращении

флаконов в сухом льду и подсоединяли к лиофилизатору (Lyph-Locke 6L, Labconco), работающему при 950 Па и 55°C, и LAB лиофилизировали до содержания воды приблизительно 0,1% и 5% (повторяли в двух экземплярах). Лيوфилизированные образцы сразу анализировали на содержание воды, и инкапсулирование в жире производили согласно процедуре 1, описанной выше.

Для инкапсулирования использовали две разных жировых композиции:

Жировая композиция 1:

Жир масла дерева ши: 10 г

Лيوфилизированные LAB: 1 г

Миндальное масло: 5 г

Масло жожоба: 10 г

Жировая композиция 2:

Жир масла дерева ши: 5 г

Жир масла какао: 5 г

Масло жожоба: 10 г

Композиции хранили при 25°C, и контролировали жизнеспособность с течением времени. Жизнеспособность определяли для каждого образца один раз в месяц в течение 9 месяцев.

Долговременную стабильность контролировали с помощью анализа изображений. По 10 мкл инкапсулированных в жире, лиофилизированных LAB помещали в лунку 96-луночного микротитровального планшета, плавил при 37°C и добавляли сверху по 10 мкл питательной среды MRS, и наблюдали рост с помощью анализа изображений с течением времени в oCelloScope производства BioSense solutions, Дания. Жизнеспособность можно определять уже через 1 час с помощью анализа изображений и количественного определения растущих клеток из инкапсулированных LAB относительно общего количества. КОЕ/г определяли при использовании калибровочной кривой.

На Фигуре 2 показаны инкапсулированные в жире, лиофилизированные LAB (жировая композиция 1) через 3 месяца хранения.

Жизнеспособность лиофилизированных, инкапсулированных в жире LAB не показала значимого различия для этих двух проверенных композиций, однако значимое различие жизнеспособности наблюдали в зависимости от содержания воды в лиофилизированных LAB перед инкапсулированием в жире.

Низкое содержание воды (0,1% (вес/вес)) привело к получению инкапсулированных в жире лиофилизированных LAB, которые являлись стабильными в течение всего периода продолжительностью 9 месяцев.

Представленное выше описание предназначено для обучения специалиста в данной области, как применять описание, представленное в настоящем документе. Оно не предназначено для подробного описания всех очевидных модификаций и вариаций, которые будут ясны специалисту после прочтения описания. Однако предполагается, что все такие очевидные модификации и вариации должны быть включены в объем

следующей формулы изобретения. Формула изобретения предназначена для охвата заявленных компонентов и этапов в любой последовательности, которая эффективна для достижения предусмотренных целей, если из контекста прямо не следует иное.

### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Микрокапсула, включающая покрытие на жировой основе, окружающее композицию, с получением инкапсулированной композиции, где инкапсулированная композиция включает жизнеспособный микроорганизм и имеет содержание воды ниже 5% (вес/вес).

2. Микрокапсула по п.1, где инкапсулированная композиция включает защитное средство, где защитное средство является криопротектором или лиопротектором.

3. Микрокапсула по любому из предыдущих пп., где инкапсулированная композиция включает защитное средство, является полигидроксисоединениями, и где полигидроксисоединения выбраны из мальтозы; лактозы; сахарозы; трегалозы; сухого обезжиренного молока; декстрана; декстрозы; пептона; глутамата; полиэтиленгликоля (ПЭГ); или любой комбинации согласно настоящему документу, предпочтительно, комбинации сахарозы и трегалозы.

4. Микрокапсула по любому из предыдущих пп., где инкапсулированная композиция включает ниже 5% (вес/вес) воды; такой как ниже 4% (вес/вес); например, ниже 3% (вес/вес); такой как ниже 2% (вес/вес); например, ниже 1% (вес/вес); такой как ниже 0,5% (вес/вес); например, ниже 0,1% (вес/вес); такой как ниже 0,05% (вес/вес); например, ниже 0,01% (вес/вес).

5. Микрокапсула по любому из предыдущих пп., где покрытие на жировой основе имеет температуру плавления в диапазоне 25-37°C; такую как температура плавления в диапазоне 28-36°C; например, температура плавления в диапазоне 29-35°C; такая как температура плавления в диапазоне 31-34°C.

6. Микрокапсула по любому из предыдущих пп., где покрытие на жировой основе залито в гидрофобной фазе, где гидрофобная фаза представляет собой масло.

7. Микрокапсула по любому из предыдущих пп., где покрытие на жировой основе эмульгировано в гидрофильной фазе.

8. Микрокапсула по любому из предыдущих пп., где жизнеспособный микроорганизм высушен, предпочтительно жизнеспособный микроорганизм лиофильно высушен.

9. Композиция для наружного применения, включающая микрокапсулу по любому из пп.1-8.

10. Композиция для наружного применения по п.9, где композиция для наружного применения включает 5-75% (вес/вес) воды; такой как 10-50% (вес/вес); например, 15-40% (вес/вес); такой как 20-30% (вес/вес).

11. Композиция, включающая микрокапсулу по любому из пп.1-8, или композиция для наружного применения по любому из пп.9-10, для применения в качестве лекарственного средства.

12. Композиция, включающая микрокапсулу по любому из пп.1-8, или композиция для наружного применения по любому из пп.9-10, для лечения, облегчения и/или профилактики кожного заболевания.

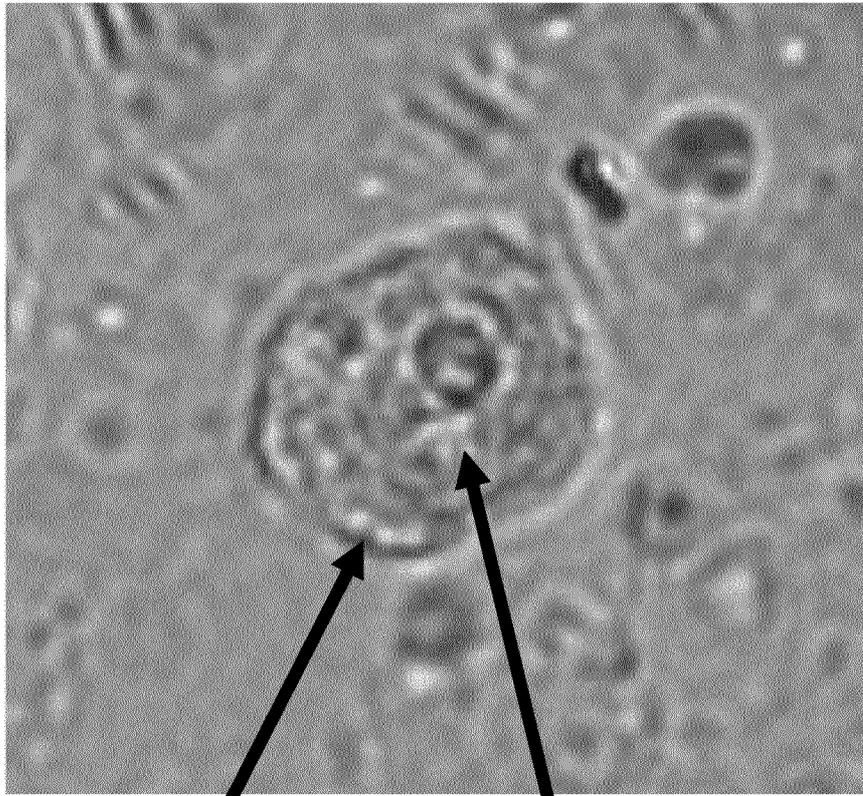
13. Композиция по любому из п.11 или п.12, где кожное заболевание выбрано из группы кожных заболеваний, включающих псориаз, аллергический дерматит, сухость кожи, чувствительность кожи, склонность к появлению прыщей, гиперпигментированную кожу, возрастные изменения кожи, аллергию, экзему, сыпь, раздраженную УФ-излучением кожу, поврежденную светом кожу, раздраженную детергентами кожу (включая раздражение, вызванное ферментами, используемыми в моющих средствах, и лаурилсульфатом натрия), красные угри и истонченную кожу (например, кожу у пожилых людей и детей).

14. Способ получения микрокапсулы по любому из пп.1-8, где способ включает следующие этапы:

- (i) получение композиции, включающей жизнеспособный микроорганизм;
- (ii) добавление жира к композиции, включающей жизнеспособный микроорганизм, с получением смешанного с жиром микроорганизма;
- (iii) смешивание смешанного с жиром микроорганизма с получением микрокапсулы по любому из пп.1-23.

15. Способ по п.14, где композицию, включающую жизнеспособный микроорганизм, полученную в этапе (i), подвергают этапу сушки перед смешиванием с жиром (этап (ii)).

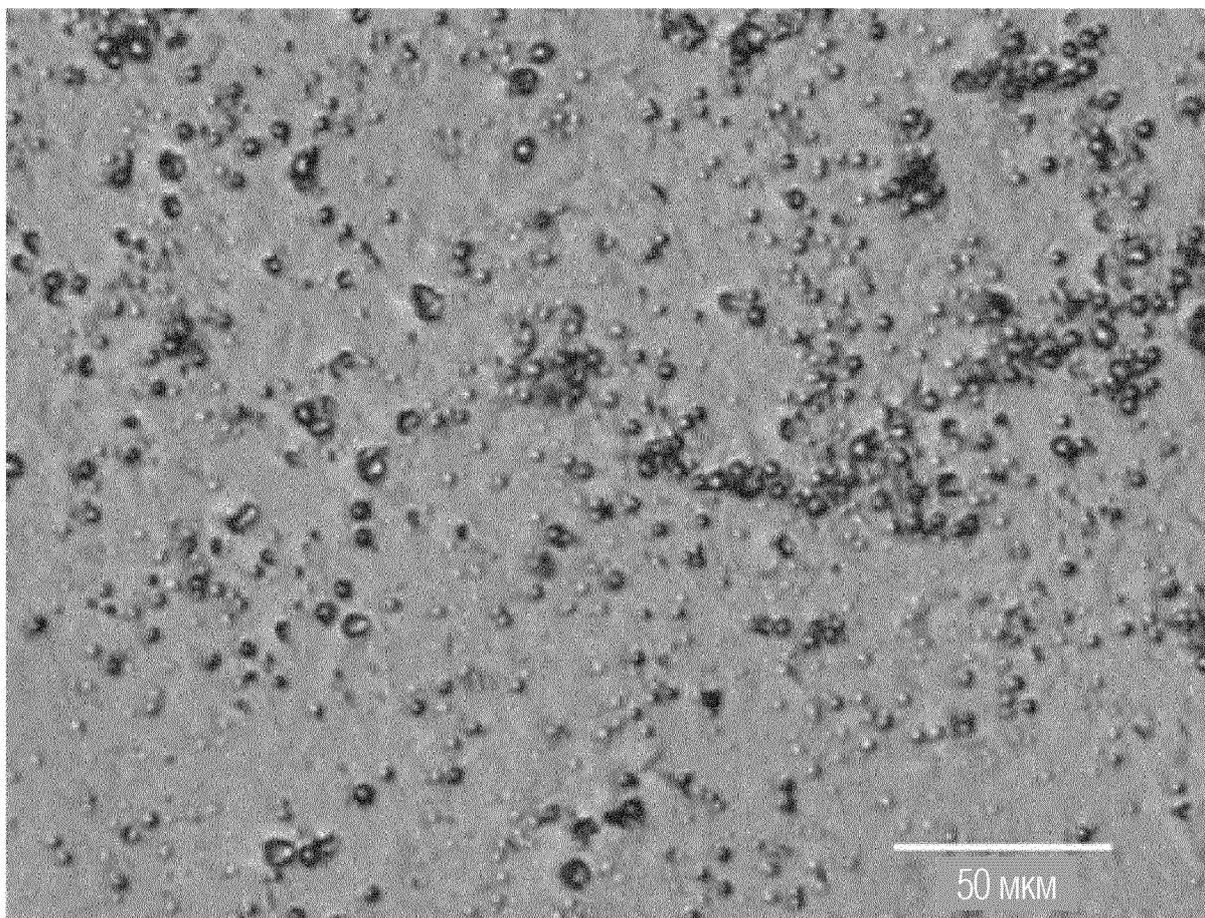
По доверенности



(2)

(1)

ФИГ. 1



ФИГ. 2