



УКРАЇНА

(19) UA (11) 96480 (13) C2

(51) МПК (2011.01)  
A01N 1/02 (2006.01)  
A61K 31/192 (2006.01)  
A61K 31/216 (2006.01)  
A61K 31/7028 (2006.01)  
A61K 35/00  
A61P 37/02 (2006.01)  
A61P 1/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ГОТУВАННЯ ПРИДАТНОЇ ДЛЯ ЗБЕРІГАННЯ СУСПЕНЗІЇ ЖИТТЄЗДАТНИХ ЯЄЦЬ ГЛИСТІВ

1

(21) а200910740  
(22) 31.03.2008  
(24) 10.11.2011  
(86) РСТ/ЕР2008/002542, 31.03.2008  
(31) 07006838.2  
(32) 02.04.2007  
(33) ЕР  
(46) 10.11.2011, Бюл.№ 21, 2011 р.  
(72) ВІЛЬГЕЛЬМ РУДОЛЬФ, DE, РОПСТОФФ  
АЛЛАН КНУД, DK, КАПЕЛЬ ХРІСТІАН МОЛІН ОУ-  
ТЦЕН, DK  
(73) ДР. ФАЛЬК ФАРМА ГМБХ, DE  
(56) WO A 2007076868, 12.07.2007.  
EP A2 1530972, 18.05.2005.  
DE A1 10163115, 03.07.2003  
(57) 1. Спосіб готування фармацевтичного препа-  
рату для внутрішнього застосування, що містить  
придатну для зберігання суспензію життєздатних  
яєць паразитичних, не патогенних для людини  
гельмінтів *Trichuris suis*, після прийому якої розви-  
вається достатня для стимуляції регуляторних  
людських Т-клітин кількість гельмінтів, який **відріз-  
няється** тим, що на одній стадії суспензію яєць  
гельмінтів піддають обробці кислотою при значен-  
ні рН не більше 2, а на іншій стадії значення рН  
підвищують до рівня не менше 4 і додають фарма-  
кологічно прийнятний консервант.  
2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що об-  
робка кислотою полягає у додаванні сірчаної кис-  
лоти.  
3. Спосіб за п. 1 або 2, який **відрізняється** тим,  
що використовують консервант, вибраний із групи,  
що включає сорбінову кислоту, бензойну кислоту,  
солі цих кислот, ефіри парабензойної кислоти,  
пропіленгліколь і комбінації цих консервантів.  
4. Спосіб за п. 3, який **відрізняється** тим, що ви-  
користовують один або кілька консервантів, виб-  
раних із групи, що включає сорбінову кислоту у  
концентрації від 0,01 до 0,2 мас. %, бензойну кис-  
лоту у концентрації від 0,1 до 0,3 мас. %, ефіри

2

парагідроксибензойної кислоти у концентрації від  
0,02 до 0,3 мас. %, пропіленгліколь у концентрації  
від 5 до 20 мас. % і комбінації цих консервантів з  
концентрацією у зазначених межах.  
5. Спосіб за одним із попередніх пунктів, який **від-  
різняється** тим, що до складу суспензії при необ-  
хідності включають додаткові фармацевтично  
прийнятні добавки.  
6. Фармацевтичний препарат для внутрішнього  
застосування, що містить придатну для зберігання  
суспензію життєздатних яєць паразитичних, не  
патогенних для людини гельмінтів *Trichuris suis*,  
після прийому якої розвивається достатня для  
стимуляції регуляторних Т-клітин кількість гельмін-  
тів і вміст мікроорганізмів у якій становить менше  
1000 колонієутворюючих одиниць на мл її об'єму,  
який **відрізняється** тим, що він отриманий спосо-  
бом за одним із пп. 1-5.  
7. Фармацевтичний препарат за п. 6, який **відріз-  
няється** тим, що вміст мікроорганізмів у суспензії  
становить менше 100 колонієутворюючих одиниць  
на мл її об'єму.  
8. Фармацевтичний препарат за п. 7, який **відріз-  
няється** тим, що вміст мікроорганізмів у суспензії  
становить менше 10 колонієутворюючих одиниць  
на мл її об'єму.  
9. Фармацевтичний препарат за одним із пп. 6-8,  
який **відрізняється** тим, що мікроорганізми виб-  
рані із групи, що включає бактерії, віруси, гриби,  
дріжджі й найпростіші.  
10. Застосування придатної для зберігання су-  
спензії яєць паразитичних гельмінтів *Trichuris suis*,  
приготовленої способом за одним із пп. 1-5, для  
готування фармацевтичного препарату, призначе-  
ного для лікування запальних захворювань трав-  
ного тракту, насамперед хронічних запальних за-  
хворювань травного тракту.  
11. Застосування за п. 10, яке **відрізняється** тим,  
що запальне захворювання травного тракту являє  
собой хворобу Крона.

(19) UA (11) 96480 (13) C2

Даний винахід відноситься до способу готування суспензій, що містять життєздатні, здатні до розвитку яйця паразитичних хробаків (гельмінтів) і придатних для терапевтичного застосування.

Вплив паразитарних інфекцій на активацію імунної системи їхніх тваринних організмів-хазяїв є відомим фактом (Review, D.M. McKay, Parasitology 132, 2006, сс. 1-12). Активация імунної системи впливає також на зустрічальність і плин її захворювань. Результати епідеміологічних досліджень свідчать про те, що в регіонах з високою частотою глистяних інвазій (гельмінтозів) автоімунні захворювання зустрічаються рідше, ніж у регіонах, у яких завдяки кращим санітарно-гігієнічним умовам частота зустрічальності подібних інфекцій нижче. При вивченні цитокінового профілю людей, які страждають хворобою Крона, що представляє собою хронічне запальне захворювання травного тракту, було встановлено, що зараження гельмінтами може викликати стимуляцію Th2-імуноцитів. Зараження гельмінтами дозволяє попереджати хворобу Крона, що є автоімунним захворюванням з домінуванням Th1-кліток, відповідно впливати на це захворювання (Summers й ін., Am. J. Gastroenterol. 98, 2003, сс. 2034-2041). Зараження гельмінтами дозволяє також впливати на інші викликувані Th1-імуноцитами захворювання, так само як і на викликуваний бактеріями *Helicobacter gastritis* й автоімунний енцефаломієліт.

Ще в 1973 р. у літературі (Beer, Parasitology 67, 1973, сс. 253-262) з'явилися повідомлення про те, що придатної для імунізації людини могла б служити нематода *Trichuris suis*, що, не будучи патогенною для людини, не приводить до виникнення нематодозу. Нематода *Trichuris suis* є близьким родичем хробака *Trichuris humanis* і здатна, не розмножуючись, виживати у шлунково-кишковому тракті людини. При такій самообмеженій інфекції ніякі терапевтичні заходи не потрібні. Тим самим зараження нематодом *Trichuris suis* дозволяє імунізувати організм людини.

В R.J.S. Beer (Parasitology 65, 1972, сс. 343-350) описаний спосіб збору й очищення яєць глистів. Відповідно до цього способу яйця глистів на стадії розвитку ембріонів культивують при 32°C в 0,2%-ому розчині дихромату калію й щодня аерують. Аналогічний спосіб очищення яєць глистів описаний в DE 10163115. Відповідно до цієї публікації яйця глистів очищають зід можливо присутніх мікроорганізмів і вірусів шляхом хімічних реакцій, при яких відбувається утворення гідроксильних або кисневих радикалів. У зазначеній публікації описана, зокрема, так називана реакція Фентона. У ході такої реакції з  $H_2O_2$  при дії  $FeCl_2$  in statu nascendi ("у момент виділення") утвориться кисень, що володіє дезінфікуючою дією, що і використовується для очищення яєць глистів.

У Boes й ін. в Veterinary Parasitology, 1998, сс. 181-190, описані розвиток ембріонів в отримані з жіночих особин яйцях глиста *Ascaris suum* при

їхній витримці у сірчаній кислоті й інфективність таких яєць.

В Summers й ін. (GUT 54, 2005, сс. 87-90) описаний спосіб очищення яєць нематоди *T. suis*, які спочатку для розвитку ембріонів витримують протягом 5-6 тижнів у буферному розчині, що містить антибіотики (пеніцилін/стрептоміцин/амфотерицин В), а потім також культивують в 0,2%-ому розчині дихромату у фосфатному буфері при рН 6-7.

Застосування подібних агентів, що знищують бактерії й віруси, має цілий ряд різних істотних недоліків, які розглянуті нижче.

При використанні розчину дихромату, так само як і при використанні розчину Фентона й той, і інший розчин необхідно видаляти після закінчення короткого періоду часу, щоб уникнути ушкодження яєць глистів. Крім цього, результати проведених експериментів свідчать про те, що в наступний за очищенням період розвитку ембріонів (протягом 3 місяців при 22-25°C) незважаючи на таке попереднє очищення відбувається інтенсивне інфікування яєць. Наступне зберігання яєць із ембріонами, що розвиваються, при 2-8°C також не дозволяє уникнути інфікування яєць. Обумовлено це, імовірно, тим, що після видалення подібних агентів, що знищують мікроорганізми й віруси, у суспензії яєць нематоди *T. suis* знову починається розмноження мікроорганізмів.

Крім цього з розчину необхідно повністю видаляти дихромат. Однак дотримання цієї умови зв'язано зі значними труднощами.

Описане в Summers додавання антибіотиків щоб уникнути сильного інфікування яєць на стадії розвитку у них ембріонів хоча й дозволяє запобігти інтенсивному розмноженню мікроорганізмів на цій стадії, однак не гарантує повного їхнього знищення. Після видалення антибіотиків на наступних стадіях очищення яєць і при їхньому зберіганні аж до моменту застосування знову відбувається інтенсивне розмноження мікроорганізмів.

В основу даного винаходу було покладене завдання розробити спосіб готування суспензії яєць глистів з ембріонами, що розвиваються, яке після її очищення від забруднюючих вірусів і мікроорганізмів, насамперед бактерій, можна було б зберігати без небезпеки проростання грибових спор і розмноження дріжджів. У приготуваній подібним способом суспензії яйця глистів повинні зберігати свою здатність до розвитку з них дорослих особин. Крім цього приготувані таким способом суспензії яєць глистів повинні бути придатні для терапевтичного застосування.

При створенні даного винаходу знезацька було встановлено, що для вирішення зазначеного вище завдання найбільш придатний комбінований спосіб очищення й консервування, оскільки він на відміну від відомих способів не вимагає застосування токсичних речовин (наприклад, дихромату калію ( $K_2Cr_2O_7$ )) і дезінфікуючих засобів.

На стадії очищення виділені яйця гельмінтів, переважно яйця гельмінта *T. suis*, протягом 1-72

год інкубують у розчині кислоти, переважно у розчині  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , зі значенням pH не більше 2 (див. приклад 1). Оптимальна тривалість інкубації становить від 2 до 8 год, переважно 3 год. Інкубацію проводять при температурі у межах від 4 до 37°C, переважно від 25 до 35°C.

При готуванні прийнятого всередину фармацевтичного препарату, що містить придатну для зберігання суспензію життєздатних яєць паразитичних, не патогенних для людини гельмінтів, після прийому якої розвивається достатня для стимуляції регуляторних людських Т-кліток кількість гельмінтів, спочатку на першій стадії суспензію яєць гельмінтів піддають обробці кислотою при значенні pH не більше 2. На наступній стадії значення pH підвищують до рівня не менше 4 і додають фармакологічно прийнятний консервант. У принципі можлива й зворотна послідовність проведення зазначених стадій, а саме: спочатку можна додавати консервант, а потім проводити обробку кислотою. Однак переважно все-таки спочатку проводити обробку кислотою й потім додавати консервант.

Обробка кислотою у кращому варіанті полягає у додаванні сірчаної кислоти. При обробці кислотою її додають у кількості, достатній для зниження значення pH до рівня у межах від приблизно 0,5 до 2. У ще одному варіанті значення pH знижують до рівня у межах від приблизно 0 до менше 1. До числа придатних для застосування у цих потребах кислот відносяться соляна кислота, азотна кислота й сірчана кислота, переважно, однак, використати сірчану кислоту. Обробка кислотою повинна тривати лише протягом порівняно короткого періоду часу, щоб уникнути занадто сильного ушкодження яєць глистів. Щодо цього існує також взаємозв'язок між тривалістю обробки кислотою і її концентрацією. Значення pH переважно знижувати до менше 2, найбільше переважно навіть до рівня у межах від 0,6 до 0,8. Тривалість обробки кислотою становить від декількох хвилин до декількох годин, переважно від 120 до 360 хв. Протягом такого ще припустимого короткого періоду часу триває процес розвитку ембріонів у яйцях глистів (триває у цілому 3 місяці при 22-25°C).

Після обробки кислотою значення pH додаванням прийнятої основи, наприклад, NaOH, знову підвищують до більше 4. Потім додають один або кілька консервантів, у якості яких у принципі можна використати всі придатні для консервування харчових продуктів або лікарських препаратів речовини. Переважно ж використовувати консерванти, які добре переносяться саме тими людьми, які страждають хворобою Крона.

Консервант переважно вибирати із групи, що включає сорбінову кислоту, бензойну кислоту, солі цих кислот, ефіри парабензойної кислоти, ефіри парагідроксибензойної кислоти, пропіленгліколь і комбінації таких консервантів.

Найбільше переважно використовувати один або кілька консервантів, вибраних із групи, що включає сорбінову кислоту у концентрації від 0,01 до 0,2%, насамперед від 0,1 до 0,2%, бензойну кислоту у концентрації від 0,1 до 0,3 мас. %, ефіри парагідроксибензойної кислоти у концентрації від 0,02 до 0,3 мас. %, пропіленгліколь у концентрації

від 5 до 20 мас. % і комбінації таких консервантів з концентрацією у зазначених межах.

Для швидкої інактивації мікроорганізмів і вірусів замість сильних кислот можна також використовувати більш слабкі кислоти розчини з додаванням зазначених вище консервантів, переважно сорбінової кислоти і її солей. Перевага застосування таких розчинів перед застосуванням сильних кислот складається у можливості очищення яєць, їхньої витримки для розвитку у них ембріонів (протягом 3 місяців при 22-25°C) і введення в організм пацієнта в одному єдиному середовищі завдяки її менш кислому значенню pH. Настільки тривале знаходження яєць у подібному середовищі не приводить до зниження їхньої життєздатності (див. приклад 5). Такий бережливий спосіб передбачає застосування середовищ, які містять консерванти, зі значенням pH не менше 1, переважно не більше 2, і не приводить до зниження мікробіологічної чистоти суспензії яєць глистів.

Отримані у результаті суспензії яєць глистів, які містять консервант, з ембріонами, що розвиваються, придатні для прийому пацієнтом у вигляді рідини (розчину) для пиття. До складу таких суспензій яєць глистів при необхідності можна включати додаткові фармацевтично прийнятні добавки, такі як барвники, смакові речовини або загусники.

Відповідно до цього об'єкта винаходу є також прийняті усередину фармацевтичних препарати, що містять придатну для зберігання суспензію життєздатних яєць паразитичних, не патогенних для людини гельмінтів, насамперед гельмінтів *T. suis*, після прийому якої розвивається достатня для стимуляції регуляторних Т-кліток кількість гельмінтів і зміст мікроорганізмів у якій становить менше 1000 колоноутворюючих одиниць (КУО) на мл її об'єму. У кращому варіанті зміст мікроорганізмів у прийнятому усередину фармацевтичному препараті становить менше 100 колоноутворюючих одиниць на мл об'єму суспензії. У найбільш кращому варіанті зміст мікроорганізмів у прийнятому усередину фармацевтичному препараті становить менше 10 колоноутворюючих одиниць на мл об'єму суспензії. Кількість колоноутворюючих одиниць визначають звичайними мікробіологічними методами.

Під мікроорганізмами у даному контексті маються на увазі бактерії, віруси, гриби, дріжджі й найпростіші, при цьому повинна бути виключена присутність тих мікроорганізмів, які могли б завдати шкоди здоров'ю.

Запропонований у винаході спосіб дозволяє одержувати придатну для зберігання суспензію яєць паразитичних, не патогенних для людини гельмінтів у формі, придатній для фармацевтичного застосування. Запропонована у винаході обробка, з одного боку, дозволяє завдяки практично повному знищенню забруднюючих мікроорганізмів, насамперед бактерій, а також грибів, вірусів і за певних умов найпростіших, одержувати придатний для фармацевтичного застосування препарат. З іншого боку, подібна обробка є настільки бережливою, що яйця глистів після прийому препарату, що їх містить, зберігають свою здатність дозрівати

у травному тракті пацієнта й забезпечувати тим самим необхідну стимуляцію імунної системи.

Запропоновані у винаході препарати придатні головним чином для лікування різних запальних захворювань травного тракту, насамперед хронічних запальних захворювань травного тракту. Запропоновані у винаході препарати найбільше переважно застосовувати для лікування запальних захворювань травного тракту, названих хворобою Крона.

Приклад 1: Зниження вмісту мікроорганізмів у суспензії яєць гельмінта *T. suis*

Відповідно до рекомендацій Німецької фармакопеї (DAB, Deutsches Arzneibuch, розділ 2.6.12, останнє відновлення з 24-м додатковим випуском у 2006 р.) визначали кількість мікроорганізмів у суспензії яєць гельмінта *Trichuris suis* (TSO-суспензії) у фосфатному буфері (pH 7) у концентрації 2400 яєць/мл. За результатами аналізу кількість мікроорганізмів у суспензії склала 190000 КУО/мл. Цю суспензію потім повторно забуферували

вали розведеним розчином  $H_2SO_4$  до pH 2. Після 3-годинної витримки при 30°C кількість мікроорганізмів знизилася до менше 20 КУО/мл.

Після цього перевіряли якість приготовленої описаним вище способом суспензії. Для цього відповідно до рекомендацій Німецької фармакопеї (DAB) використовували певні тест-штами бактерій, дріжджів і грибів. Результати цієї перевірки представлені у прикладах 2а, 2б й 2в.

Приклад 2: Визначення кількості мікроорганізмів

а) Живильну суспензію, склад якої відповідав представленому у DAB 2.6.13, інокулювали зазначеними нижче у таблиці 1 споротвірними й не споротвірними тест-бактеріями. Потім суспензію повторно забуферували розведеним розчином  $H_2SO_4$  до pH 2 і витримували протягом 6 год при 30°C. Після цього визначали кількість мікроорганізмів, одержавши представлені у таблиці 1 результати.

Таблиця 1

Мікроорганізм	$T_0$	$H_2SO_4$ , pH 2, через 6 год
<i>Clostridium sporog.</i>	8000000	<10
<i>Bacillus subtilis</i>	1400000	20*
<i>Escherichia coli</i>	130000	<10
<i>Staphylococcus aureus</i>	800000	<10
<i>Salmonella typhimurim</i>	250000	<10

\* Примітка: більш тривала обробка кислотою протягом приблизно 6-10 год дозволила знизити кількість колоноутворюючих одиниць до менше 10.

б) Живильну суспензію, склад якої відповідав представленому у DAB 2.6.13, інокулювали зазначеними нижче у таблиці 2 тест-дріжджами. Потім суспензію

повторно забуферували розведеним розчином  $H_2SO_4$  до pH 2, відповідно до pH 1 і витри-

мували протягом 3 год, відповідно 48 год при 25°C. Після цього визначали кількість мікроорганізмів, одержавши представлені у таблиці 2 результати.

Таблиця 2

Мікроорганізм	$T_0$	$T_{3\text{год}}$	$T_{48\text{год}}$	$T_{3\text{год}}$	$T_{48\text{год}}$
		$H_2SO_4$ , pH 2		$H_2SO_4$ , pH 1	
<i>Saccharomyces cer.</i>	470000	380000	220000	39000	40*
<i>Candida albicans</i>	690000	380000	32000	26000	<10

\* Примітка: більш тривала обробка кислотою тривалістю до 72 год дозволила знизити кількість КУО до 5.

в) Живильну суспензію, склад якої відповідав представленому у DAB 2.6.13, інокулювали зазначеними нижче у таблиці 2 видами тест-цвілі. Потім суспензію повторно забуферували розведеним розчином  $H_2SO_4$  до pH 2, до pH 1 і до pH 0,

і витримували протягом 3 год, відповідно 48 год при 25°C. Після цього визначали кількість мікроорганізмів, одержавши представлені у таблиці 3 результати.

Таблиця 3

Мікроорганізм	$T_0$	$T_{3\text{год}}$	$T_{48\text{год}}$	$T_{3\text{год}}$	$T_{48\text{год}}$	$T_{3\text{год}}$	$T_{48\text{год}}$
		$H_2SO_4$ , pH 2		$H_2SO_4$ , pH 1		$H_2SO_4$ , pH 0	
<i>Penicillium brevicomp.</i>	490000	90000	32000	39000	14000	70	<10
<i>Aspergillus niger</i>	800000	370000	700000	500000	500000	50	<10

При недостатньому зниженні кількості КУО у випадку деяких мікроорганізмів тривалість обробки кислотою відповідно збільшували аж до 72 год.

Представлені у прикладах 1 й 2а-2в дані свідчать про те, що використання розведеного розчину  $H_2SO_4$  з рН 2 дозволяє ефективно знищувати бактерії за короткий період часу. Для ефективного ж знищення дріжджів і грибів потрібно або збільшувати тривалість інкубації, або знижувати рН до більше кислих значень.

Описані вище стадії очищення знезацька придатні й для готування суспензії яєць гельмінта *T. suis*, яка не містить віруси.

#### Приклад 3: Зниження вмісту вірусів

У цьому прикладі розглянута інактивація вірусу лейкемії мишей (MuLV-вірусу), вірусу псевдосказу (PRV-вірусу), парвовірусу свиней (PPV-вірусу) і котячого каліцивірусу (FCV-вірусу) при готуванні суспензії яєць гельмінта *Trichuris suis* (TSO-суспензії). Під використовуваними вірусами при цьому маються на увазі віруси-моделі.

Титри вірусів в інокульованих зразках визначали шляхом титрування до кінцевої точки. При титруванні цим, добре відомим методом розведені зразки поміщають на титраційні мікропланшети з легко ідентифікованими індикаторними клітками. Після такого зараження індикаторних кліток зразками, які містять віруси, змінюється морфологія кліток у результаті їхнього лізису. Подібний лізис кліток кількісно легко визначити під мікроскопом.

Тест-віруси, що мають і не мають оболонку, додавали у високій концентрації у 0,01н. розчин  $H_2SO_4$  (рН 2, 30°C), що містив також TSO-суспензію. Активність вірусів визначали потім через 10 хв, 3 год й 72 год. Через 10 хв не заразними ставали PRV- і MuLV-віруси, що мають оболонку, а через 3 год - FCV- і PPV-віруси, що не мають оболонку. У нейтралізованому 1н. розчині NaOH контрольному зразку навіть після 3-годинної інкубації віруси всіх 4-х видів усе ще залишалися вірулентними. Проведення експерименту із цим розчином у порівняльних потребах було неможливим через цитотоксичність 0,2%-ого розчину дихромату калію у 0,01н. сірчаній кислоті.

Значного ж зменшення кількості грибів і дріжджів (див. приклад 2, таблиці 2 й 3) вдалося домогтися лише шляхом тривалої інкубації й зниження значення рН до 0, переважно до менше 1. Такий власне кажучи новий спосіб очищення у дуже кислому середовищі має той недолік, що при цьому знижується виживаність яєць глистів у суспензії, яка містить такі яйця.

У якості другої відмінної риси даного винаходу знезацька було встановлено, що завдяки до-

даванню придатних для прийому усередину використовуваних для консервування хімічних речовин вдалося зберегти коефіцієнт виживаності яєць глистів, що розраховується як процентне відношення яєць із нормально розвиненими ембріонами до загальної кількості яєць. Подібний коефіцієнт виживаності яєць глистів однозначно характеризує здатність яєць зберігати свою життєздатність у суспензіях, які їх містять. Крім цього завдяки застосуванню консервантів інактивація забруднюючих мікроорганізмів спостерігалася вже при рН 4. У якості оптимальних придатних для прийому усередину консервантів зарекомендували себе бензойна кислота, сорбінова кислота, їхні солі й пропіленгліколь (див. приклади 4а-4д).

Лише додавання консервантів дозволяє використовувати набагато менше кислоти й тим самим кращі середовища, які переносять яйцями глистів. Завдяки цьому яйця глистів можна очищати, витримувати для розвитку у них ембріонів, зберігати й вводити в організм пацієнта в одному єдиному середовищі. Відповідно до цього з'являється можливість довгострокового використання одного й того ж середовища. Можливе повторне зараження TSO-суспензії новими мікроорганізмами вдається запобігти за рахунок застосування розведених кислот і додавання консервантів. Описаний вище комбінований спосіб інактивації мікроорганізмів і консервування TSO-суспензії дозволяє уникнути розмноження нових мікроорганізмів. Тим самим подібний, дуже бережливий спосіб однозначно має явні переваги перед способом, заснованим на застосуванні сильних кислот.

Приклад 4: Визначення кількості колоній різних мікроорганізмів У цьому прикладі розглянуте підвищення значень рН з 2 до 4 і додавання консервантів.

Експерименти у прикладах 4а-4д проводили в наступних умовах. Досвідчені зразки містили по 10000 TSO/мл ( $\pm 10\%$ ) у фосфатному буфері з рН 4, а також містили або 0,2% бензойної кислоти, або 0,1% сорбінової кислоти, або 15% пропіленгліколя. До досліджуваних зразків додавали наступні мікроорганізми:

- *Aspergillus niger* у вигляді окремого мікроорганізму;

- *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* й *Escherichia coli* у вигляді комбінації.

Температура інкубації становила 25°C. Досліджувані планшети аналізували через 1-7 днів. При цьому були отримані наступні результати:

4а. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>			
Консервант	T <sub>0</sub> (КУО/мл)	T <sub>1день</sub> (КУО/мл)	T <sub>7днів</sub> (КУО/мл)
Бензойна кислота, 0,2%	180000	<10	<10
Сорбінова кислота, 0,1%	180000	30	<10
Пропіленгліколь, 15%	180000	10	<10
4б. <i>Staphylococcus aureus</i>			
Консервант	T <sub>0</sub> (КУО/мл)	T <sub>1день</sub> (КУО/мл)	T <sub>7днів</sub> (КУО/мл)
Бензойна кислота, 0,2%	130000	<10	<10
Сорбінова кислота, 0,1%	130000	240	<10
Пропіленгліколь, 15%	130000	14000	<10
4в. <i>Escherichia coli</i>			
Консервант	T <sub>0</sub> (КУО/мл)	T <sub>1день</sub> (КУО/мл)	T <sub>7днів</sub> (КУО/мл)
Бензойна кислота, 0,2%	140000	<10	<10
Сорбінова кислота, 0,1%	140000	490	<10
Пропіленгліколь, 15%	140000	7100	<10
4г. <i>Candida albicans</i>			
Консервант	T <sub>0</sub> (КУО/мл)	T <sub>1день</sub> (КУО/мл)	T <sub>7днів</sub> (КУО/мл)
Бензойна кислота, 0,2%	240000	<10	<10
Сорбінова кислота, 0,1 %	240000	190	<10
Пропіленгліколь, 15%	240000	8600	30
4д. <i>Aspergillus niger</i>			
Консервант	T <sub>0</sub> (КУО/мл)	T <sub>1день</sub> (КУО/мл)	T <sub>7днів</sub> (КУО/мл)
Бензойна кислота, 0,2%	120000	90	<10
Сорбінова кислота, 0,1%	120000	20000	<10
Пропіленгліколь, 15%	120000	30000	9000

При сильному зараженні грибами переважно використовувати сорбінову кислоту, бензоїну кислоту й/або ефіри парагідроксибензойної кислоти або використовувати пропіленгліколь у комбінації із цими консервантами.

Ще одна перевага, пов'язана з комбінуванням процесу інактивації мікроорганізмів розведеними кислотами із застосуванням консервантів, складається у можливості запобігти при подальшому застосуванні TSO-суспензії її можливе повторне зараження новими мікроорганізмами. Описаний вище комбінований спосіб інактивації мікроорганізмів і консервування TSO-суспензії дозволяє уникнути розмноження нових мікроорганізмів.

Підготовчі операції для подальшого готування суспензії і її застосування пацієнтом вимагають підвищення значення рН до 2-7, переважно до 4-6. Для виконання цієї третьої стадії також необхідне додавання прийнятних консервантів. Консерванти, які застосовуються, повинні бути при цьому придатні для прийому всередину. У якості придатних для застосування у цих потребах консервантів зарекомендували себе сорбінова кислота у концентрації 0,1-0,2%, бензойна кислота у концентрації 0,1-0,3%, ефіри парагідроксибензойної кислоти у концентраціях 0,02-0,3%

або пропіленгліколь у вигляді 5-20%-ого водяного розчину. Зазначені консерванти можна також використовувати у вигляді їхніх сумішей.

При створенні винаходу знеацька було встановлено, що подібний спосіб очищення не приводить до зниження життєздатності яєць глистів, що перебувають у суспензії.

Приклад 5: Життєздатність яєць глистів

Яйця глистів із ще не розвиненими ембріонами суспендували у концентрації 40000 яєць/мл у різних середовищах і витримували у них для розвитку ембріонів (при 22-25°C). По завершенні періоду інкубації тривалістю 60 й 90 днів окремі суспензії досліджували під мікроскопом і на підставі загальної кількості яєць глистів, а також кількості морфологічно інтактних яєць із ембріонами, що розвиваються, розраховували коефіцієнт виживаності. Коефіцієнт виживаності (КВ) є при цьому показником життєздатності яєць глистів. До початку процесу розвитку ембріонів їхній розвиток у яйцях глистів ще не почався, і тому коефіцієнт виживаності у цей момент дорівнює нулю. У міру ж розвитку ембріонів коефіцієнт виживаності зростає й за даних умов інкубації досягає своїх максимальних значень, починаючи з 60-го дня. Звичайно коефіцієнт виживаності становить порядку 90%.

Рідке дисперсійне середовище суспензії	КВ у 0-й день	КВ на 60-й день	КВ на 90-й день
Сірчана кислота з рН 1 з добавкою 0,01% сорбату калію	0	0,91	0,91
Сірчана кислота з рН 1 з добавкою 0,07% сорбату калію	0	0,93	0,91
Сірчана кислота з рН 0,8	0	0,94	0,90
Сірчана кислота з рН 0,5	0	0,92	0,77

У всіх середовищах частка яєць із ембріонами, що розвиваються, після закінчення 60 днів

склала більше 90%. На відміну від середовищ, які містили консервант і при знаходженні яєць у яких

коефіцієнт виживаності поза залежністю від концентрації консерванту не знижувався протягом наступних 30 днів, у сірчаній кислоті з рН 0,5 відзначалося зменшення частки яєць глистів з нормальними ембріонами, що розвиваються. Тим самим додавання придатного для прийому всередину консерванту, переважно сорбінової кислоти і її солей, дозволяє використовувати рідкі дисперсійні середовища з нешкідливими для яєць глистів значеннями рН. Відповідно до цього такий спосіб можна використовувати для готування стійкого при зберіганні препарату (бережливий спосіб).

Підготовчі операції для подальшого готування суспензії вимагають підвищення значення рН до 2-7, переважно до 4-6, а також додавання прийнятних консервантів. Консерванти, які застосовуються, повинні бути при цьому придатні для прийому всередину. У якості придатних для застосування у цих потребах консервантів зарекомендували себе сорбінова кислота у концентрації 0,01-0,2%, бензойна кислота у концентрації 0,1-0,3% або пропіленгліколь у вигляді 5-20%-ого водяного розчину. Зазначені консерванти можна також використовувати у вигляді їхніх сумішей.