

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : A61K 9/46, 35/74, 35/72, 39/00, A23L 1/03, 2/52, A61P 1/00, 31/00, 37/00 // (A61K 35/74, 31:451) (A61K 35/72, 31:451)	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/07571 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 17. Februar 2000 (17.02.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/AT99/00192 (22) Internationales Anmeldedatum: 29. Juli 1999 (29.07.99) (30) Prioritätsdaten: A 1360/98 6. August 1998 (06.08.98) AT (71)(72) Anmelder und Erfinder: VIERNSTEIN, Helmut [AT/AT]; Gymnasiumstrasse 26/18, A-1180 Wien (AT). (74) Anwälte: SONN, Helmut usw.; Riemergasse 14, A-1010 Wien (AT).		(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>
(54) Title: FORMULATIONS HAVING PROBIOTICALLY ACTIVE MICROORGANISMS (54) Bezeichnung: FORMULIERUNGEN MIT PROBIOTISCH WIRKSAMEN MIKROORGANISMEN (57) Abstract The invention relates to a formulation containing stabilized microorganisms and buffering substances. The inventive formulation facilitates the passage of the microorganisms through the stomach after their dispersion and their adsorption in the digestive tract while preserving their vitality. (57) Zusammenfassung Beschrieben wird eine Formulierung, die stabilisierte Mikroorganismen und Puffersubstanzen enthält, welche den Mikroorganismen nach dem Dispergieren und der Aufnahme in den Verdauungstrakt, die Passage durch den Magen bei Erhalt der Lebensfähigkeit ermöglicht.		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Formulierungen mit probiotisch wirksamen Mikroorganismen

Die Erfindung betrifft Formulierungen mit probiotisch wirksamen Mikroorganismen.

Als probiotisch wirksame Mikroorganismen (häufiges Synonym "Probiotika") werden nach einer modernen Definition (Havenaar et al., "Probiotics: A General View" in: "The Lactic Acid Bacteria, Volume 1", B.J.B. Wood ed. (1992), Elsevier Applied Science, 155/156) Einzel- oder Mischkulturen lebender Mikroorganismen bezeichnet, die an Mensch und Tier angewendet werden und den Wirt durch die Unterstützung der Eigenschaften der natürlich vorhandenen intestinalen Mikroflora vorteilhaft beeinflussen. Das bedeutet, daß nur Produkte die Darmphysiologie positiv beeinflussen können, die lebende oder lebensfähige Mikroorganismen enthalten, z.B. als gefriergetrocknete Zellen, den Gesundheitsstatus von Mensch und Tier verbessern und die ihre Wirkung im Mund oder dem gastrointestinalen Trakt entfalten können.

Besonders aus der Gruppe der Milchsäurebakterien (MSB) sind nach intensiven Forschungen spezielle Keime, die humanspezifisch und lebensmitteltechnologisch wertvolle Eigenschaften aufweisen, in das wissenschaftliche Interesse gerückt.

In pharmazeutischen Präparationen und Nahrungs-Ergänzungen sind nach derzeitigem Wissensstand und geltender Taxonomie Milchsäurebakterien der Gattungen Lactobacillus, Streptococcus, Lactococcus, Leuconostoc, Enterococcus, Bifidobacterium, Carnobacterium und Sporolactobacillus (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, IX; Aufl.) zunehmend zu finden. Von den Gattungen Lactobacillus, Bifidobacterium und Enterococcus gelten viele Subspecien als notwendige natürliche Darmbewohner von Mensch und Tier. Sie kommen - in Abhängigkeit vom Ernährungsstatus, Alter, Gesundheitszustand und Darmabschnitt - in sich dynamisch ändernden Mengen vor.

Milchsäurebakterien werden analog zu anderen Mikroorganismen nach ihren Fähigkeiten beurteilt. Diese sind:

1. biochemische (z.B. die Verwertung von Kohlehydratverwertung)
2. physiologische (z.B. die Stimulation der Darmperistaltik)
3. antimikrobielle (z.B. die Hemmung anderer Mikroorganismen)
4. kompetitive (z.B. die Hemmung bzw. den Abbau von Enterotoxinen).

(Volker Rusch, "Mikrobiologische Therapie", Therapeutikum 6 (1992), Seiten 292-298; K. Zimmermann, "Magen-Darm-Passage Mikrobiologische Präparate und ihr Zugang zum Immunsystem bei oraler Verabreichung", top-medizin 8 (1994), Seiten 29-31; Petra Kolb-Jaeckel, "Die Mikrobiologische Therapie und ihre Möglichkeiten bei entzündlichen Darmerkrankungen", Erfahrungsheilkunde 43(9) (1994), Seiten 502-504.

Die Mikroflora des Darmes kann durch die Applikation bestimmter MSB über medizinale Indikationen oder den Weg der Nahrungs-Ergänzung zielgerichtet unterstützt werden. Im Vordergrund stehen heute sowohl diätetische als auch prophylaktische und therapeutische Indikationen, wie u.a. bei Reisediarrhoe, Behandlung von Ostipationen, Restitution einer gestörten Darmflora nach Antibiotikaeinnahme, regulierende Funktion bei Stress-Situationen, Erniedrigung des Cholesterinspiegels, Krebstherapie, Zahnfleischentzündungen, Ergänzung von Diätformen, etc..

Die Funktionalität lebensfähiger bzw. lebender MSB ist nur dann gesichert, wenn die bevorzugt verabreichten Keime in hoher Dichte in den Darm gelangen. Natürliche physiologische Barrieren können Mikroorganismen bei ungeschützten Aufnahmeformen abtöten. Insbesondere bei der direkten peroralen Verabreichungsform lebensfähiger Mikroorganismen ist zu beachten, daß je nach Gattung bzw. Stamm der größte Teil der Bakterien bereits im Magen, der mit seinem sauren Milieu eine natürliche Barriere für fast alle Gattungen von Bakterien darstellt, zerstört wird.

Hinzu kommt, daß lebende Mikroorganismen schwer zu stabilisieren sind. In Präparationen werden sie üblicherweise getrocknet als lebensfähige, lyophilisierte Mikroorganismen angewendet. Die Darstellung obliegt den Kulturenherstellern. Die kontinuierliche Produktion der Mikroorganismen in den geforderten Qualitäten, sowie deren Weiterverarbeitung zu physiologisch wirksamen Formu-

lierungen und die anschließende Lagerperiode entscheiden über die biologische Aktivität des Materials (Brennan et al., J.Food Prot. 46 (1983), 887-892).

Eine Verabreichung solcher probiotisch wirksamer Präparationen in flüssiger Form, beispielsweise in Getränken, wurde bislang noch nicht in Erwägung gezogen, da solche Kulturen im Magenbereich derart inaktiviert werden, daß sie im Darm keine positiven Wirkungen mehr hervorrufen können. Weiters können gebrauchsfertige Probiotika nicht über ausreichend lange Zeiträume in flüssiger Form gelagert werden. Das Vorsehen von Mikroorganismen in Gemengen mit (trockenen) Brausepulvern (Weinsäure oder Zitronensäure; Entwicklung von CO₂ aus Natriumhydrogencarbonat) wurde bis jetzt auch nicht in Betracht gezogen, da es beim Auflösungsvorgang von Brausepulvern zu aziden Reaktionen kommen kann, bei welchen die Mikroorganismen - analog zur Magenpassage - irreversibel geschädigt werden.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht darin, Formulierungen, enthaltend probiotisch wirksame Mikroorganismen, zur Verfügung zu stellen, welche bei vorschriftsmäßiger Verabreichung in suspendierter Form garantieren, daß physiologisch relevante Keimgehalte in den menschlichen bzw. tierischen Darm gelangen und die daher darmphysiologisch hochwirksam sein können. Verbunden ist die Aufgabe des Erhalts der Lebensfähigkeit der Probiotika, insbesondere der MSB, im Produkt selbst.

Die Formulierungen selbst sind als medizinische Formulierungen für therapeutische Indikationen oder aber als zusätzlich oder vorbeugend verabreichbare Nahrungs-Ergänzung für Mensch und Tier großtechnologisch und reproduzierbar herstellbar.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch eine Formulierung umfassend Puffersubstanzen und durch Lyophilisation stabilisierte Mikroorganismen und gegebenenfalls technologisch notwendige Hilfsstoffe, wobei die durch Lyophilisation stabilisierten Mikroorganismen trocken in die matrixbildenden Puffersubstanzen eingearbeitet sind und diese Formulierungen trocken, z.B. entweder in Pulverform oder als Tabletten, ausgeformt sein können. Ihre Wirkung entfalten die erfindungsgemäßen Präparate,

welche vorwiegend in Pulverform oder als Tablette vorliegen, nach entsprechender Auflösung und Einnahme durch den Patienten bzw. Konsumenten. Überraschenderweise kann mit Hilfe der Puffersubstanzen die Phase des Zerfalls der Formulierung z.B. in Wasser durchgeführt werden, ohne daß es zu einem wesentlichen Verlust der Keimzahl kommt, selbst wenn beim Auflösen azide Reaktionen auftreten. Offenbar reicht der (räumlich) enge Kontakt zwischen Mikroorganismen und Puffersubstanzen aus, um selbst die aziden Prozesse beim Auflösungsvorgang zu überstehen, wenn die erfindungsgemäße Formulierung als Brausepulver formuliert ist und Substanzen, wie organische Säuren (z.B. Weinsäure, Zitronensäure), Säuerungsmittel, verschiedene (säurehaltige) Aromen, etc., enthalten. Weiters sind die Puffersubstanzen auch in der Lage, bei der Magenpassage ebenfalls diese protektive Wirkung auszuüben.

Die erfindungsgemäße Formulierung garantiert nach der Dispergierung in Wasser oder anderen zweckmäßigen Flüssigkeiten den durch Lyophilisation stabilisierten Mikroorganismen einen Schutz vor der natürlichen Säure-Barriere des Magens, wobei die Mikroorganismen nach deren Rekonstitution durch die Wirkung der Puffersubstanzen der Formulierung geschützt werden. Mit den erfindungsgemäßen Formulierungen gelangen daher die Mikroorganismen nach Verabreichung und nachfolgender Magenpassage in lebensfähiger Form in den Darm, wo sie ihre Wirksamkeit entfalten können.

Die Formulierungen gemäß der vorliegenden Erfindung eignen sich hervorragend zur Herstellung von Präparaten für verschiedenste medizinische Indikationen und als zusätzlich oder vorbeugend verabreichbare Nahrungs-Ergänzung für Mensch und Tier.

Die durch Lyophilisierung stabilisierten Mikroorganismen enthalten vorzugsweise Hilfsstoffe zur Lyophilisation, sowie Nährbodenreste. Diese Lyophilisat-Kompositionen bedingen die hygroskopischen Eigenschaften des Lyophilisats. Bevorzugte Lyophilisate weisen nach dem Gefriertrocknungsprozeß a_w -Werte im Bereich von 0,2 oder darunter, insbesondere von 0,1 bis 0,2, auf. Dadurch sind sie zwar lange haltbar, jedoch auch in der Lage, aus der Umgebungsluft Wasser rasch in großer Menge aufzunehmen, was selbstverständlich bei der Lagerung unbedingt vermieden werden

muß. Diese Problematik kann insoferne technologisch gelöst werden, indem unmittelbar nach der Einbringung von lyophilisierten Mikroorganismen in die Brausematrix die Weiterverarbeitung - Tablettierung, Abfüllung, Abpackung - erfolgt, sodaß der Kontakt zur Umgebungsluft minimiert wird. Die Verpackung muß einen a_w -Wert von 0,1 bis 0,2 langfristig erhalten, damit für aktive Lebensvorgänge in Zellen kein freies Wasser zur Verfügung steht. Geeignet sind hierfür besonders Verpackungen in Verbundfolien, Beuteln (Sachets) bzw. für Tabletten in Aluminium-Hülsen mit Trocknungsmittel. Die Lagertemperatur sollte so gewählt werden, daß 20°C nicht überschritten werden.

Demgemäß weist die erfindungsgemäße Formulierung vorteilhafterweise einen a_w -Wert von 0,1 bis 0,2, insbesondere von 0,1 bis 0,15, auf. Daher werden erfindungsgemäß auch bevorzugterweise Puffermatrices verwendet, die aus vollständig wasserfreien mineralischen Bestandteilen zusammengesetzt sind. Diese sind prinzipiell zwar leicht herzustellen, wurden aber bislang bei der Herstellung von probiotisch wirksamen Formulierungen nicht verwendet.

Bevorzugte Puffersysteme im Rahmen der vorliegenden Erfindung sind Phosphatpuffer, Citratpuffer, Carbonatpuffer, Malatpuffer sowie Tartratpuffer mit Alkalien und Erdalkalien (pH 4 - 7,5).

Als durch Lyophilisation stabilisierte bzw. haltbar gemachte Mikroorganismen werden im besonderen Stämme aus den Familien Lactobacillus, Enterococcus, Bifidobacterium und Enterobacteriaceae, vorzugsweise aus den Gattungen Enterobacter und Escherichia in den erfindungsgemäßen Formulierungen verwendet, wobei die Arten Lactobacillus delbrückii subsp. bulgaricus, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus casei GG, Lactobacillus casei subsp. casei, Lactobacillus helveticus, Lactobacillus lactis, Lactobacillus salivarius, Lactobacillus plantarum, Streptococcus salivarius subsp. thermophilus, Enterococcus faecium, Bifidobacterium bifidum, Bifidobacterium infantis, Bifidobacterium longum (sowie weitere Bifidobacterium-Arten) und physiologisch bedeutsame Subspecies von Escherichia coli sowie Mischungen von zwei oder mehreren Arten dieser Mikroorganismen besonders bevorzugt sind.

Weiters eignen sich Hefestämme, insbesondere *Saccharomyces boulardii* für den Human-Bereich, oder andere probiotisch wirksame Hefen, z.B. *Kluyveromyces marxianus* für Tiere, zur Herstellung der erfindungsgemäßen Formulierungen.

Bei den erwähnten Arten ist ihre physiologisch bedeutsame Wirkung ("probiotische" Eigenschaften) schon hinlänglich beschrieben worden. Ihre Bedeutung macht sie zu bevorzugten Mikroorganismen im Rahmen der vorliegenden Erfindung.

Als Mikroorganismen eignen sich auch solche, deren Wirkung zu einer oralen aktiven Immunisierung verwendet werden kann.

Die erfindungsgemäßen Formulierungen umfassen günstigerweise weitere Formulierungshilfsstoffe oder technisch notwendige Hilfsstoffkombinationen. Notwendig sein können je nach Mikroorganismenart Antioxidantien und Aminosäuren. Die genannten Stoffklassen sind typischerweise Bestandteil in allen natürlichen Systemen organischen Ursprungs, und werden daher auch großtechnisch gewonnen und als Zusatzstoffe verwendet. Sie sind in den für die erfindungsgemäße Formulierung angewendeten Konzentrationen unter den in Medikationen und Nahrungs-Ergänzungen zugelassenen Grenzwerten vorhanden und vollkommen unbedenklich.

Bevorzugt genutzte Hilfsstoffe sind L-Ascorbinsäure und L-Cystein.

Der entscheidende technologische Schritt für die erfindungsgemäßen Formulierungen liegt in der Verwendung von Puffersubstanzen, die nach der Lösung in einem geeigneten Lösungsmittel, wie z.B. Wasser, Fruchtsäften, Mineralwässern, etc., den bis dahin ebenfalls trocken vorliegenden Mikroorganismen optimale Bedingungen zur Zellwandrekonstitution bieten und diesen in weiterer Folge eine Passage durch den oberen Verdauungskanal, insbesondere den Magen, ermöglichen, wobei insbesondere die im Magen vorhandene Salzsäure kurzfristig abgepuffert wird. Ein unbeschädeter und rascher Durchtritt der mit der Lösung aufgenommenen Mikroorganismen in den Dünndarm wird damit gewährleistet.

Bevorzugterweise wird die erfindungsgemäße Formulierung zu einer etwa isotonen Lösung (zwischen 150 und 350 mosmol, insbesondere 300 mosmol) aufgelöst.

Vorzugsweise sollte beim Dispergieren der Arzneiform eine Zusammensetzung entstehen, die der jeweils gültigen WHO-Rezeptur für die Rehydratation während oder nach Diarrhøe entspricht.

Nach einer bevorzugten Ausführungsform wird die erfindungsgemäße Formulierung als Brause zur Verfügung gestellt, wobei die Puffersubstanzen Teil der trockenen Brausegrundlagen sind. Beim Zerfall der erfindungsgemäßen Formulierung bildet sich CO_2 , das den in der Lösung vorhandenen Sauerstoff verdrängt, und somit zu günstigeren Überlebensbedingungen für anaerobe und mikroaerophile Keime führt. Bevorzugterweise werden die Brausegrundlagen als Brausegranulat zur Verfügung getellt (vgl. z.B. Europäisches Arzneibuch, 3. Auflage (1997), 1847/1848 und Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis, 5. Auflage, Seite 723).

Die Puffergranulate werden nach den technologisch üblichen Granulierungsmethoden hergestellt, so z.B. durch thermische Granulierung in heizbaren Mischern, durch Granulierung mit reaktiven oder nicht reaktiven Flüssigkeiten in geeigneten handelsüblichen Geräten, wobei auch im Vakuum granuliert werden kann (z.B. evakuierbare Mischer mit Zerhacker mit anschließender Trocknung und Siebung, dem TOPO®-Verfahren oder der Wirbelschicht-Granulierung). Versetzt mit den vorgesehenen Mikroorganismen können diese Granulate anschließend tablettiert oder in Sachets abgefüllt werden.

Vorzugsweise enthält die erfindungsgemäße Formulierung ein oder mehrere pharmazeutische Wirkstoffe, insbesondere einen antidiarrhöetisch wirksamen Bestandteil, wodurch ein überadditiver, antidiarrhöetischer Effekt durch die Kombination dieser Substanzen bei gleichzeitiger Wiederherstellung einer gesunden Darmflora entsteht. Pharmazeutische Wirkstoffe für die erfindungsgemäße Formulierung können z.B. Loperamid, Domperidon und Ofloxacin sein, die selbst keine keimschädigende Wirkung auf Milchsäurebakterien ausüben.

Die erfindungsgemäße wirksame Formulierung umfaßt vorzugsweise in der Regel

- 0,1 - 30 Gew.% durch Lyophilisation stabilisierte Mikroorganismen, insbesondere 0,1 bis 5 Gew.%, und
- 10 - 99,9 Gew.%, insbesondere 70 bis 99 Gew.% Puffersubstanzen (Brausegrundlagen) sowie bei Bedarf
- 0 - 80 Gew.%, insbesondere 0 bis 2 Gew.%, Hilfsstoffe.

Die Puffersubstanzen, aber auch Hilfsstoffe und Lyophilisate, liegen vorzugsweise in granulierter Form oder in Pulverform vor.

Eine besonders bevorzugte Formulierung beinhaltet durch Lyophilisation stabilisierte Mikroorganismen der Gattung *Lactobacillus casei* GG.

Gemäß einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung der erfindungsgemäßen darmphysiologisch wirksamen Formulierungen zur Herstellung von Präparationen für medizinische Indikationen, insbesondere für Magen-/Darm-Erkrankungen, bzw. als Nahrungs-Ergänzung und Tiernahrungs-Ergänzung.

Besonders geeignet sind die erfindungsgemäßen Formulierungen bei allen Fällen, in denen die natürliche Darmflora beeinträchtigt bzw. zerstört worden ist, beispielsweise bei der effektiven Begleit- und Nachbehandlung während bzw. nach einer Antibiotikagabe.

Weiters können erfindungsgemäße Formulierungen auch Glucose und/oder Oligosaccharide und/oder andere für das Keimwachstum im Darmlumen günstige Saccharide sowie Polysaccharide und artverwandte Stoffe (Inuline, Ballaststoffe) umfassen.

Die Erfindung wird anhand der folgenden Beispiele, auf die sie selbstverständlich nicht beschränkt sein soll, näher erläutert.

B e i s p i e l 1: Stabile Formulierungen von Brausegranulaten (-tabletten) mit Milchsäurebakterien als wirksames Prinzip

Mischung 1.1.:

Lactobacillus casei GG (LGG, Valio, Finnland) ca. 10^8 CfU (Colony forming Units)/Dosis

Natriumhydrogencarbonat	984 mg
Kaliumhydrogencarbonat	900 mg
Zitronensäure	1416 mg
Dinatriumhydrogenphosphat	180 mg
Natriumcarbonat	600 mg
Aroma	120 mg

Mischung 1.2:

Enterococcus faecium (Ef) (Stamm M74, Medipharma, Schweden) ca. 10^8 CfU/Dosis

Natriumhydrogencarbonat	984 mg
Kaliumhydrogencarbonat	900 mg
Zitronensäure	1416 mg
Dinatriumhydrogenphosphat	180 mg
Natriumcarbonat	600 mg
Aroma	120 mg

Mischung 1.3:

Bifidobacterium lactis (Stamm Bb 12, Hansen's Biosystems/ Dänemark) ca. 10^{10} CfU/Dosis

Glucose	2953 mg
Natriumcarbonat	1107 mg
Zitronensäure	1036 mg
Kaliumcarbonat	203 mg
Dinatriumhydrogenphosphat	584 mg
Aroma	94 mg

B e i s p i e l 2 : Inkubation der erfindungsgemäßen Formulierungen in artifiziellem Magensaft (aMS)

Im Rahmen der vorliegenden Beispiele werden jeweils die Puffer-substanzen mit Bakterienlyophilisaten im Gewichtsverhältnis 249 : 1 gemischt. Ein Teil Lyophilisat genügt, um eine Keimdichte von etwa 10^8 - 10^9 CfU/g Formulierungs-Masse zu erzielen. Mit modernen Lyophilisaten werden Keimdichten in Bereichen über 10^{12} CfU/g erzielt, die selbstverständlich bei erfindungsgemäßen Handelsprodukten bevorzugt sind.

Die Inkubation wird bei Körpertemperatur von 37°C durchgeführt, um möglichst physiologische Bedingungen zu simulieren.

Die Inkubation in aMS wird durch Mischung der erfindungsgemäßen Präparate mit 150 ml Wasser und 100 ml aMS (= 100 ml 0,1 normale HCl) gestartet und unter Bewegung im Schüttelwasserbad (SWB) durchgeführt.

Eine Probe, die nur in Wasser inkubiert wird, nicht jedoch in aMS, dient als Referenzprobe (REF).

Beispiel 2.1:

Die Lactobacillus casei GG enthaltende Zubereitung (Formulierungsmasse = 4,20 g) gemäß Mischung 1.1, wird hinsichtlich ihrer stabilisierenden Wirkung gegenüber den Mikroorganismen während Inkubation in aMS untersucht. Der Verlauf der Keimzahlreduktion ist in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1

Überlebensraten von Lactobacillus casei GG-Bakterien nach Inkubation in artifiziellen Magensaft

Inkubationszeit in min	LGG CfU/ml	LGG REF CfU/ml	LGG Lyo in aMS
0	$1,15 \times 10^7$	$3,00 \times 10^7$	$3,00 \times 10^7$
30	$2,52 \times 10^6$		0
60	$2,27 \times 10^6$		0
90	$2,66 \times 10^6$		0
120	$3,05 \times 10^6$	$2,95 \times 10^7$	0

In Spalte 2 der Tabelle 1 ist der Keimzahlverlauf dargestellt, wie er sich aus dem erfindungsgemäßen Einsatz der Puffersubstanz und LGG bei Inkubation in aMS ergibt. In Spalte 3 sind die Daten der REF enthalten. Spalte 4 zeigt, wie sich aMS auf ungeschützte Milchsäurebakterien in Form eines Lyophilisates (Lyo) auswirkt.

Beispiel 2.2:

Die Enterococcus faecium enthaltende Zubereitung gemäß Mischung 1.2 (Formulierungsmasse 4,20 g) wird hinsichtlich ihrer stabili-

sierenden Wirkung gegenüber den Mikroorganismen während Inkubation in aMS untersucht. Der Verlauf der Keimzahlreduktion ist in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2

Überlebensraten von Enterococcus faecium-Bakterien nach Inkubation in artifizielltem Magensaft

Inkubationszeit in min	Ef CfU/ml	Ef REF CfU/ml	Ef Lyo in aMS
0	$4,70 \times 10^7$	$6,05 \times 10^7$	$1,80 \times 10^8$
30	$4,50 \times 10^7$	$6,00 \times 10^7$	0
60	$5,10 \times 10^7$	$3,00 \times 10^7$	0
90	$7,30 \times 10^7$	$1,00 \times 10^7$	0
120	$5,53 \times 10^7$	$6,00 \times 10^6$	0

Wie in Mischung 2.1 bei LGG verhält sich Ef in vergleichbarer Weise. In Spalte 1 wird anhand der Keimzahl deutlich, daß nach Inkubation in aMS über 2 Stunden praktisch kein Keimverlust eintrat. Ohne Puffersubstanzen (Spalte 4) können Ef-Keime in aMS nicht überleben.

Beispiel 2.3:

Die Bifidobacterium ssp. enthaltende Zubereitung (Formulierungsmasse 5,98 g) gemäß Mischung 1.3 wird hinsichtlich ihrer stabilisierenden Wirkung gegenüber den Mikroorganismen während Inkubation in aMS untersucht. Der Verlauf der Keimzahlreduktion ist in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3

Überlebensraten von Bifidobacterium ssp. Nach Inkubation in artifizielltem Magensaft

Inkubationszeit in min	Bb CfU/ml	Bb REF CfU/ml	Bb Lyo in aMS
0	$4,70 \times 10^7$	$5,75 \times 10^7$	$5,75 \times 10^7$
30	$4,28 \times 10^7$		0
60	$1,61 \times 10^7$		0
90	$1,42 \times 10^7$		0
120	$1,00 \times 10^7$	$1,06 \times 10^7$	0

Auch für *Bifidobacterium* ssp. ist bei einer Inkubation in aMS kein wesentlicher Keimverlust über 2 Stunden festzustellen.

Beispiel 2.4:

(Vergleich mit herkömmlichen Brauseformulierungen)

Zusammensetzung der Brausemischung (gemäß Bauer et al. „Pharmazeutische Technologie“, 5. Auflage, Seite 316):

1560 mg	Zitronensäure
940 mg	NaHCO ₃
10 mg	LGG

Anwendungsmenge: 2510 mg

Für die Untersuchung in aMS wurden 2,510 g bakterienhaltige Brausemischung in 150 ml Wasser suspendiert und weitere 100 ml artifizieller Magensaft zugesetzt; danach erfolgte die Inkubation im SWB (37°C).

Für die Referenzuntersuchung wurden 2,510 g bakterienhaltige Brausemischung in 250 ml Wasser suspendiert und anschließend bei 37°C im SWB inkubiert.

In der nachfolgenden Tabelle 4 sind die Überlebenskeimzahlen von LGG nach Inkubation in artifizielltem Magensaft sowie parallel dazu nach Inkubation in Wasser (REF) aufgelistet.

Tabelle 4

Überlebensraten von *Lactobacillus casei* GG nach Inkubation in artifizielltem Magensaft und reinem Wasser

Inkubationsdauer in min	CFU/ml in aMS	CFU/ml in REF
0	$2,00 \times 10^7$	$1,52 \times 10^7$
30		
60	0	---
90		
120	0	$3,05 \times 10^5$

Die Inkubation von Milchsäurebakterien in Lösungen, die nur Brausemischungen enthalten, zeigt, daß diese Hilfsstoffkomponenten alleine überhaupt keinen Schutz gegenüber artifiziellem Magensaft bieten. Darüberhinaus ist auch eine nicht ausreichende Stabilisierung der Keime nach Inkubation in reinem Wasser zu verzeichnen.

B e i s p i e l 3 : Wirkung von Loperamid auf die Überlebensfähigkeit von Milchsäurebakterien

Für die Untersuchung in aMS wurden 6,0 g Brausemischung (Mischung 1.3; jedoch anstelle von Bifidobacterium lactis LGG) und 2 mg Loperamid in 150 ml Wasser dispergiert und 100 ml artifizierter Magensaft zugesetzt; danach erfolgte die Inkubation im SWB (37°C).

Für die Referenzprobe wurden 6,0 g Brausemischung und 2 mg Loperamid in 250 ml Wasser dispergiert; anschließend erfolgte die Inkubation im SWB (37°C).

Tabelle 5

Überlebensrate von Bifidobacterium lactis nach Inkubation in artifiziellem Magensaft in Anwesenheit von Loperamid

Inkubationsdauer in min	CFU/ml in aMS	CFU/ml in REF
0	$2,70 \times 10^7$	$2,70 \times 10^7$
30	$2,60 \times 10^7$	
60	$2,60 \times 10^7$	
90	$2,60 \times 10^7$	
120	$2,10 \times 10^7$	$1,80 \times 10^7$

Aus Tabelle 5 ist ersichtlich, daß der Wirkstoff Loperamid keinen negativen Einfluß auf die Überlebensfähigkeit der Milchsäurebakterien während der Inkubation in reinem Wasser hat. Auch die von der Kombination von Loperamid und artifiziellm Magensaft bedingt keinen negativen Einfluß auf die Keimzahl.

B e i s p i e l 4 : Wirkung von Domperidon auf die Überlebensfähigkeit von Milchsäurebakterien

Für die Untersuchung in aMS wurden 6,0 g Brausemischung (Mischung 1.3; jedoch anstelle von Bifidobacterium lactis LGG) und 10 mg Domperidon in 150 ml Wasser dispergiert und 100 ml artifizieller Magensaft zugesetzt; danach erfolgte die Inkubation im SWB (37°C).

Für die Referenzprobe wurden 6,0 g Brausemischung und 10 mg Domperidon in 250 ml Wasser gelöst, anschließend erfolgte die Inkubation im SWB (37°C).

Tabelle 6

Überlebensraten von LGG nach Inkubation in artifiziellm Magensaft in Anwesenheit von Domperidon

Inkubationsdauer in min	CFU/ml in aMS	CFU/ml in REF
0	$2,50 \times 10^7$	$2,60 \times 10^7$
30	$1,50 \times 10^7$	
60	$1,60 \times 10^7$	
90	$1,50 \times 10^7$	
120	$1,20 \times 10^7$	$1,80 \times 10^7$

Tabelle 6 zeigt, daß der Wirkstoff Domperidon einen sehr geringen Einfluß auf die Überlebensfähigkeit der Milchsäurebakterien während der Inkubation hat. Die Kombination von Domperidon und artifiziellm Magensaft bedingt eine geringfügig stärkere Abnahme der Keimzahl als Wasser.

B e i s p i e l 5 : Wirkung von Ofloxacin auf die Überlebensfähigkeit von Milchsäurebakterien

Für die Untersuchung in aMS wurden 6,0 g Brausemischung (Mischung 1.3; jedoch anstelle von Bifidobacterium lactis LGG) und 200 mg Ofloxacin in 150 ml Wasser dispergiert und 100 ml artifizieller Magensaft zugesetzt; danach erfolgte die Inkubation im SWB (37°C).

Für die Referenzprobe wurden 6,0 g Brausemischung und 200 mg Ofloxacin in 250 ml Wasser dispergiert und anschließend im SWB (37°C) inkubiert.

Tabelle 7

Überlebensraten von LGG nach Inkubation in artifiziellm Magensaft in Anwesenheit von Ofloxacin

Inkubationsdauer in min	CFU/ml in aMS	CFU/ml in REF
0	$2,30 \times 10^7$	$2,20 \times 10^7$
30	$9,40 \times 10^6$	
60	$9,90 \times 10^6$	
90	$8,80 \times 10^6$	
120	$8,80 \times 10^6$	$7,80 \times 10^5$

Die Ergebnisse in Tabelle 7 zeigen, daß der Wirkstoff Ofloxacin die Milchsäurebakterien während der Inkubation in artifiziellm Magensaft nur geringfügig beeinflußt.

P a t e n t a n s p r ü c h e :

1. Formulierung, umfassend Puffersubstanzen und stabilisierte Mikroorganismen, wobei die Mikroorganismen trocken in matrixbildende Puffersubstanzen eingearbeitet sind.
2. Formulierung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Puffermatrix aus trockenen Brausegrundlagen zusammengesetzt ist.
3. Formulierung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die durch Lyophilisation stabilisierten Mikroorganismen ausgewählt sind aus den Familien Lactobacteriaceae, vorzugsweise aus den Gattungen Lactobacillus, Streptococcus, Enterococcus und/oder Bifidobacterium, und Enterobacteriaceae, vorzugsweise aus den Gattungen Enterbacter und/oder Escherichia.
4. Formulierung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die durch Lyophilisation stabilisierten Mikroorganismen ausgewählt sind aus den Arten Lactobacillus delbrückii subsp. bulgaricus, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus casei GG, Lactobacillus casei subsp. casei, Lactobacillus helveticus, Lactobacillus lactis, Lactobacillus salivarius, Lactobacillus plantarum, Streptococcus salivarius subsp. thermophilus, Enterococcus faecium, Bifidobacterium bifidum, Bifidobacterium infantis, Bifidobacterium longum, physiologisch bedeutsamen subsp. von Escherichia coli, den Hefen Saccharomyces boulardii und Kluyveromyces marxianus sowie Mischungen von zwei oder mehreren dieser Arten.
5. Formulierung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß sie
 - 0,1 - 30 Gew.%, insbesondere 0,1 bis 5 Gew.%, durch Lyophilisation stabilisierte Mikroorganismen und
 - 10 - 99,9 Gew.%, insbesondere 70 bis 99 Gew.%, Puffersubstanzen und
 - 0 - 80 Gew.%, insbesondere 0 bis 2 Gew.%, Hilfsstoffe

umfaßt.

6. Formulierung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß sie Puffersubstanzen und durch Lyophilisation stabilisierte Mikroorganismen der Gattung *Lactobacillus casei* GG und Hilfsstoffe, vorzugsweise L-Ascorbinsäure und/oder L-Cystein, enthält.

7. Formulierung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Konzentration an Puffersubstanzen derart bemessen ist, daß nach dem Zerfall eine isotonische Lösung entsteht.

8. Formulierung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Formulierung Glucose und/oder Oligosaccharide und/oder andere für das Keimwachstum im Darmlumen günstige Saccharide enthält.

9. Formulierung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Formulierung ein oder mehrere pharmazeutische Wirkstoffe, insbesondere einen antidiarrhöetisch wirksamen Bestandteil, vorzugsweise Loperamid, enthält.

10. Verwendung einer Formulierung nach einem der Ansprüche 1 bis 9 zur Herstellung von Präparationen zur Behandlung von Magen/Darm-Erkrankungen oder als Nahrungs-Ergänzung, wobei unerwünschte Keime in ihrem Wachstum gehemmt oder zurückgedrängt oder eliminiert werden.

11. Medizinische Präparate, welche eine Formulierung nach einem der Ansprüche 1 bis 9 umfassen, insbesondere zur peroralen aktiven Immunisierung.

12. Formulierung nach einem der Ansprüche 1 bis 10, zur gleichzeitigen und/oder Nachbehandlung mit Antiinfektiva zur Stabilisierung der Darmflora.

13. Lebensmittel bzw. Genußmittel, Getränke, insbesondere Reformprodukte, welche eine Formulierung nach einem der Ansprüche 1 bis 9 umfassen.