(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110769839 A
(43)申请公布日 2020.02.07

(21)申请号 201880007393.5

(22)申请日 2018.01.17

(30)优先权数据
17152068.7 2017.01.18 EP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2019.07.17

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2018/051112 2018.01.17

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2018/134256 EN 2018.07.26

(83)生物保藏信息
CCTCC M 2016652 2016.11.17
DSM 32130 2015.09.02
CBS 142430 2017.03.08
CBS 142431 2017.03.08

(71)申请人 西姆莱斯有限公司
地址 德国霍尔茨明登
申请人 普罗比公司

(72)发明人 马库斯·鲁道夫·格茨
克斯廷·霍姆格伦
尼克拉斯·拉松
贝恩德·菲尔比驰 威廉·韦德

(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227
代理人 郑斌 蔡胜有

(51)Int.Cl.
A61K 35/747(2006.01)
A61P 1/02(2006.01)

权利要求书2页 说明书16页 附图3页

(54)发明名称

用于与口腔内疾病相关的物种聚集的益生菌

(57)摘要

本发明涉及用于治疗和/或预防口腔内炎症,优选用于治疗和/或预防龈炎和/或牙周炎的某些微生物或其混合物。特别地,本发明涉及用作益生菌剂的微生物或其混合物,以用于与和龈炎和/或牙周炎相关的微生物形成共聚集体。此外,本发明提供了包含一种或更多种益生菌微生物作为活性剂的经口药物组合物、口腔护理产品或者用于营养或休闲的产品,及其产生方法。

CN 110769839 A

1.微生物或者包含两种或更多种微生物或由两种或更多种微生物组成的混合物,其用于治疗和/或预防龈炎和/或牙周炎,

其中所述微生物选自德氏乳杆菌乳酸亚种(Lactobacillus delbrueckii subsp.lactis)LL-G41(CCTCC M 2016652)、发酵乳杆菌(Lactobacillus fermentum)35D(DSM 32130)、格氏乳杆菌(Lactobacillus gasseri)NS8(NCIMB 11718)、唾液乳杆菌(Lactobacillus salivarius)NS13(NCIMB 8816)、唾液链球菌(Streptococcus salivarius)NS18(CBS 142430)和唾液链球菌NS19(CBS 142431)。

2.根据权利要求1使用的微生物或混合物,其中所述微生物或混合物用作益生菌剂以用于与和龈炎和/或牙周炎相关的口腔细菌物种,特别是与选自以下的疾病相关物种形成共聚集体:牙龈卟啉单胞菌(Porphyromonas gingivalis)、牙髓卟啉单胞菌(Porphyromonas endodontalis)、福赛斯坦纳氏菌(Tannerella forsythia)、龈沟产线菌(Filifactor alocis)和隐藏真杆菌(Eubacterium saphenum)。

3.根据权利要求1或2使用的微生物或混合物,其中所述微生物是减毒微生物或死微生物,优选经热灭活微生物,优选通过在70℃至100℃的温度下孵育2至8分钟而热灭活的微生物。

4.根据前述权利要求中任一项使用的微生物或混合物,其中所述/一种微生物(另外地)对疾病相关物种的生长,特别是对选自以下的一种或更多种疾病相关微生物的生长具有抑制活性:牙龈卟啉单胞菌、牙髓卟啉单胞菌、福赛斯坦纳氏菌、龈沟产线菌、隐藏真杆菌、微小小单胞菌(Parvimonas micra)、砂毛绒厌氧杆菌(Lachnoanaerobaculum saburreum),其中所述微生物是唾液乳杆菌NS13(NCIMB 8816)。

5.根据前述权利要求中任一项使用的微生物或混合物,其中所述微生物另外地能够治疗和/或预防口腔内炎症,优选用于降低或抑制选自以下的一种或更多种炎性因子的释放:白细胞介素1(IL-1)、白细胞介素6(IL-6)、白细胞介素8(IL-8)、肿瘤坏死因子(TNF)、前列腺素E2(PGE2)、异前列烷、基质金属肽酶9(MMP9)和NF-κB,其中所述微生物选自德氏乳杆菌乳酸亚种LL-G41(CCTCC M 2016652)、发酵乳杆菌35D(DSM 32130)和唾液乳杆菌NS13(NCIMB 8816)。

6.如前述权利要求中任一项所限定的一种或更多种微生物的碎片,其用于治疗和/或预防龈炎和/或牙周炎,优选用作益生菌剂以用于与和龈炎和/或牙周炎相关的口腔细菌物种,特别是与选自以下的疾病相关物种形成共聚集体:牙龈卟啉单胞菌、牙髓卟啉单胞菌、福赛斯坦纳氏菌、龈沟产线菌和隐藏真杆菌。

7.经口药物组合物、口腔护理产品或者用于营养或休闲的产品,其包含选自以下的一种或更多种微生物或其碎片:德氏乳杆菌乳酸亚种LL-G41(CCTCC M 2016652)、发酵乳杆菌35D(DSM 32130)、格氏乳杆菌NS8(NCIMB 11718)、唾液乳杆菌NS13(NCIMB 8816)、唾液链球菌NS18(CBS 142430)和唾液链球菌NS19(CBS 142431),其中所述微生物或其碎片的总量足以用于治疗和/或预防龈炎和/或牙周炎,优选通过与和龈炎和/或牙周炎相关的口腔细菌物种,特别是与选自以下的疾病相关物种形成共聚集体:牙龈卟啉单胞菌、牙髓卟啉单胞菌、福赛斯坦纳氏菌、龈沟产线菌和隐藏真杆菌,进一步优选地,其中所述微生物或其碎片的总量为0.01%至100%,更优选0.1%至50%,最优选1%至10%,在每种情况下均相对于所述组合物的总重量,和/或其中所述微生物或其碎片的总量为1×10^{3}至1×10^{11}个菌落形

成单位(CFU),更优选1×10^{5}至1×10^{10}CFU。

8.根据权利要求7所述的组合物或产品,其用于治疗和/或预防龈炎和/或牙周炎,优选用作益生菌剂以用于与和龈炎和/或牙周炎相关的口腔细菌物种,特别是与选自以下的疾病相关物种形成共聚集体:牙龈卟啉单胞菌、牙髓卟啉单胞菌、福赛斯坦纳氏菌、龈沟产线菌和隐藏真杆菌。

9.根据权利要求7所述的组合物或产品或者根据权利要求8使用的组合物或产品,其还包含选自载体、赋形剂或其他活性成分的一种或更多种组分。

10.根据权利要求7至9中任一项所述的组合物或产品或者使用的组合物或产品,其中所述组合物是经涂覆的或经包封的。

11.根据权利要求7至10中任一项所述的组合物或产品或者使用的组合物或产品,其中所述组合物或产品是溶液剂、混悬剂、乳剂、片剂、颗粒剂、散剂或胶囊剂的形式。

12.根据权利要求7至11中任一项所述的组合物或产品或者使用的组合物或产品,其中所述组合物或产品选自牙膏、牙用凝胶、牙粉、牙齿清洁液、牙齿清洁泡沫、漱口剂、口喷剂、牙线、口香糖和锭剂。

13.产生根据权利要求7至12中任一项所述的经口药物组合物、口腔护理产品或者用于营养或休闲的产品的方法,其包括以下步骤:

-将选自以下的一种或更多种微生物或其碎片与一种或更多种其他组分,优选与选自载体、赋形剂或其他活性成分的一种或更多种组分组合:德氏乳杆菌乳酸亚种LL-G41(CCTCC M 2016652)、发酵乳杆菌35D(DSM 32130)、格氏乳杆菌NS8(NCIMB 11718)、唾液乳杆菌NS13(NCIMB 8816)、唾液链球菌NS18(CBS 142430)和唾液链球菌NS19(CBS 142431)。

用于与口腔内疾病相关的物种聚集的益生菌

[0001] 本发明涉及用于治疗和/或预防口腔内炎症,优选用于治疗和/或预防龈炎和/或牙周炎的某些微生物或其混合物。

[0002] 特别地,本发明涉及用作益生菌剂的微生物或其混合物,以用于与和龈炎和/或牙周炎相关的微生物,特别是与选自以下的口腔细菌物种形成共聚集体:牙龈卟啉单胞菌(Porphyromonas gingivalis)、牙髓卟啉单胞菌(Porphyromonas endodontalis)、福赛斯坦纳氏菌(Tannerella forsythia)、龈沟产线菌(Fili向ctor alocis)和隐藏真杆菌(Eubacterium saphenum)。

[0003] 此外,本发明提供了包含一种或更多种益生菌微生物作为活性剂的经口药物组合物、口腔护理产品或者用于营养或休闲的产品,及其产生方法。

[0004] 牙龈的炎性病症主要由牙斑块的形成诱发。定植细菌借助于食物残渣以及唾液组分的存在而在牙齿表面上形成生物膜。如果在早期阶段没有充分清除的话,则牙齿表面上的斑膜导致牙石的沉积,其非常难以去除。龈缘处存在数目升高的细菌导致龈发炎,称之为龈炎。在易感个体中,龈炎可发展为牙周炎,其可以导致失牙(tooth loss)。特别地,存在于革兰氏阴性细菌中的脂多糖(lipopolysaccharide,LPS)可以通过LPS刺激的巨噬细胞而引起非特异性免疫应答,其在受影响组织中释放前列腺素E2(prostaglandin E2,PEG2)以及促炎介质(例如白细胞介素和TNF-α)。促炎介质诱导从驻留的成纤维细胞释放更多PGE2和基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase,MMP),其破坏周围组织的胞外基质。这允许细菌更深地渗透到组织中并且促进炎性过程,而不依赖于上皮和牙根的外层,从而促使形成牙周袋。支撑牙齿的牙槽骨在进展的细菌前面收缩,导致牙齿变得不稳定,并且如果不进行治疗的话,则会失牙。

[0005] 为了避免进行性牙龈破坏,需要在早期阶段抑制或理想地预防口腔中的炎性应答。

[0006] 许多不同的方法已经解决了这个问题,从用于机械去除斑块的改进方法到使用具有强抗菌性能的口腔护理产品。

[0007] 然而,并非口腔中存在的所有细菌都与疾病相关,并且许多甚至促进口腔健康。因此,期望建立朝向口腔微生物群的健康组成的平衡,而不是非特异性地根除驻留细菌。

[0008] 正常的口腔微生物群非常复杂,并且包括700多种细菌物种以及古细菌、真菌、原生动物和病毒。

[0009] 已显示,例如乳杆菌(lactobacillus)和双歧杆菌(bifidobacteria)的下肠道共生体当作为益生菌施用时对肠道健康具有有益作用,包括一些抗炎特性。

[0010] 对细菌在口腔中的益生菌作用已经进行了一些研究,但是已经发现其随所使用的物种剧烈变化,并且由于该作用可能依赖于在很大程度上不相关的效应而难以建立用于有效应用的合适参数。

[0011] 在益生菌作用中,文献中已经讨论了针对疾病相关物种的一般性抗菌作用、对牙齿表面的细菌黏附的降低或预防,以及抗炎作用。

[0012] WO 2010/077795 A2涉及改善口腔健康的组合物,其包含治疗有效量的选自链球

菌(streptococci)和乳杆菌的特定菌株的有益细菌。在此背景下解决了通过使口腔菌群的平衡朝向有益细菌来预防龈炎和斑块的问题。

[0013] 根据DE 20 2009 011 370 U1,公开了包含益生菌的牙齿和口腔护理产品能够预防牙周炎和龈炎,其描述了多种益生菌,包括乳杆菌、双歧杆菌、肠球菌(enterococci)、芽孢乳杆菌(sporolactobacilli)和链球菌。然而,未提及具体菌株,并且未进一步评价所谓的益生菌作用的机制。

[0014] WO 2010/008879 A2提供了包含与水接触后可活化的无活性益生菌的糖食组合物。作为益生菌,公开了不同的乳杆菌和双歧杆菌菌株。WO2010/008879 A2中提及的益生菌作用包括减轻牙龈炎症,例如通过抑制致病性细菌来减轻牙龈炎症。

[0015] EP 1 852 122 A1涉及包含脱水的可再活化微生物的牙齿和牙龈健康组合物。据解释,所述微生物可以通过由于竞争重建受影响组织的平衡来对抗毒性致病性细菌菌群。WO 2005018342也涉及竞争效应,其中益生菌能够通过竞争营养物或附着位点来抑制病原体的定植或生长。

[0016] 然而,已经确定,除单纯竞争性置换之外,益生菌还可能能够与病原体形成易于从口腔冲洗出的共聚集体(co-aggregate),从而降低病原体载量。

[0017] 在WO 00/09080中公开了使用外源性乳酸菌来预防或治疗龋齿、牙斑块和牙周感染。提及通过与驻留微生物群特异性结合(共聚集)而进行定植,但根据WO 00/09080的益生菌使用依赖于以下作用:不是驻留微生物群的一部分的某些乳酸菌能够直接附着到牙齿的表膜上,并由此置换病原体或阻止其附着。

[0018] WO 2012/022773 A1中提到了益生菌替换病原体或形成聚集体从而干扰病原体生物膜形成的能力。然而,WO 2012/022773 A1主要涉及包含有效量的植物乳杆菌(Lactobacillus plantarum)CECT 7481和短乳杆菌(Lactobacillus brevis)CECT 7480的用于口腔健康的益生菌组合物,其被证明具有针对某些病原体的抗菌特性,而共聚集体的形成未被评价。

[0019] WO 2012028759(EP 2 612 904 A2)提供了用于治疗口腔内感染性疾病的链球菌属的抗微生物细菌菌株,其基于变形链球菌(S.mutans)与益生菌菌株的共聚集体的形成。

[0020] WO 2012/100991公开了使用黏合剂生物(binder organism)(乳酸菌)与口腔内链球菌结合,然后将其冲洗出,由此防止病原体定植和龋齿形成。根据WO 2012/100991的有效黏合剂生物是副干酪乳杆菌(Lactobacillus paracasei)和鼠李糖乳杆菌(Lactobacillus rhamnosus)的某些菌株。

[0021] 尽管在现有技术中已经报道了益生菌与链球菌形成聚集体的作用,但是从未就已知的益生菌菌株与其他口腔细菌聚集的能力单独评价已知的益生菌菌株。特别地,在这种背景下,牙周炎相关的细菌(例如,牙龈卟啉单胞菌、牙髓卟啉单胞菌、福赛斯坦纳氏菌、龈沟产线菌和隐藏真杆菌)被认为是高度相关的。在得到本发明的广泛研究中,已经发现某些菌株与上述病原体强烈聚集,并且因此已被鉴定为用于治疗和/或预防龈炎和/或牙周炎的高效活性剂。值得注意的是,公认益生菌的许多密切相关的菌株与疾病相关的物种没有或几乎没有任何聚集。因此,本发明现在允许通过选择总体上最有效的菌株和/或将其组合来优化(商业上)可获得的益生菌的使用。

[0022] 本发明的一个目的是提供可用于高度有效地治疗和/或预防口腔内炎症,特别是

治疗和/或预防龈炎和/或牙周炎的微生物或其混合物。

[0023] 本发明的另一个目的是提供可用作益生菌剂的微生物或其混合物，用于与和龈炎和/或牙周炎相关的口腔细菌物种，特别是与选自以下的物种形成共聚集体：牙龈卟啉单胞菌、牙髓卟啉单胞菌、福赛斯坦纳氏菌、龈沟产线菌和隐藏真杆菌。

[0024] 还提供了用于递送根据本发明的微生物的口腔护理组合物或产品以及用于产生这样的组合物或产品的方法。

[0025] 本发明的目的通过以下来满足：微生物或者包含两种或更多种微生物或由两种或更多种微生物组成的混合物，其用于治疗和/或预防龈炎和/或牙周炎，其中所述微生物选自德氏乳杆菌乳酸亚种(Lactobacillus delbrueckii subsp.lactis)LL-G41(CCTCC M 2016652)、发酵乳杆菌(Lactobacillus fermentum)35D(DSM 32130)、格氏乳杆菌(Lactobacillus gasseri)NS8(NCIMB 11718)、唾液乳杆菌(Lactobacillus salivarius)NS13(NCIMB 8816)、唾液链球菌(Streptococcus salivarius)NS18(CBS 142430)和唾液链球菌NS19(CBS 142431)。

[0026] 通过广泛筛选，已经发现根据本发明的细菌菌株形成如上所述的聚集体，而出人意料地，许多密切相关的菌株未显示出与病原体的任何聚集。现有技术尚未就与所提及的病原体形成聚集体评价不同细菌菌株的效力。在本发明的上下文中，对于受试的益生菌菌株已经单独确定了聚集指数，以允许直接选择对于口腔护理应用最有效的菌株。

[0027] 菌株德氏乳杆菌乳酸亚种LL-G41已根据布达佩斯条约(Budapest Treaty)于2016年11月17日由润盈生物工程有限公司(BioGrowing Co.,Ltd.)(中国上海市青浦区崧泽大道10666号，201700)(No.10666Songze Rd.,Qingpu Shanghai 201700,China)以保藏号CCTCC M 2016652保藏于中国典型培养物保藏中心(China Center for Type Culture Collection,CCTCC)(武汉大学，中国武汉430072)。菌株发酵乳杆菌35D已根据布达佩斯条约于2015年9月2日由Probi AB(Sölvegatan41,22370Lund,Sweden)以保藏号DSM 32130保藏于莱布尼茨研究所德国微生物和细胞培养物保藏中心(Leibniz Institut Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen,DSMZ)(Inhoffenstr.7B,38124Braunschweig,Germany)。菌株格氏乳杆菌NS8(NCIMB 11718;保藏日期为1982年1月27日，由DSMZ保藏)和唾液乳杆菌NS13(NCIMB 8816;保藏日期为1956年10月1日，由伯明翰大学(University of Birmingham)保藏)可在国家工业、食品和海生细菌保藏中心(National Collection of Industrial,Food and Marine Bacteria,NCIMB)(Ferguson Building,Craibstone Estate,Bucksburn,Aberdeen AB21 9YA,United Kingdom)分别以保藏号NCIMB 11718和NCIMB 8816公开获得。菌株唾液链球菌NS18和唾液链球菌NS19已根据布达佩斯条约于2017年3月8日由NIZO Food Research BV(Kemhemseweg 2,6718 ZB Ede,The Netherlands)以保藏号CBS 142430和CBS 142431保藏于Westerdijk真菌生物多样性研究所的CBS保藏中心(CBS collection at the Westerdijk Fungal Biodiversity Institute)(Uppsalalaan 8,3584AD Utrecht,The Netherlands)。

[0028] 已经测试了许多不同的菌株对病原体的结合能力，并根据其聚集指数将其分类，如在下面实施例部分所解释的。

[0029] 根据本发明的微生物可优选用作益生菌剂以用于与和龈炎和/或牙周炎相关的口腔细菌物种，特别是与选自以下的疾病相关物种形成共聚集体：牙龈卟啉单胞菌、牙髓卟啉

单胞菌、福赛斯坦纳氏菌、龈沟产线菌和隐藏真杆菌。

[0030] 已知所述的疾病相关物种参与牙周炎和相关疾病的发展，因此对于聚集其是高度期望的目标疾病相关的物种。

[0031] 致病性细菌对口腔黏膜的定植和斑块形成可以使口腔中的微生物平衡倾向于有害微生物的积聚，这也称为生态失调(dysbiosis)。因此，根据本发明用于预防和/或治疗口腔内炎症的微生物包括在预防和/或治疗斑块和斑块相关疾病中的用途，并且通过促进疾病相关物种从口腔移出而方便地帮助使口腔菌群的平衡朝向健康状态。

[0032] 在本发明的一个优选实施方案中，上述微生物是减毒微生物或死微生物，优选经热灭活微生物，优选通过在70℃至100℃的温度下孵育2至8分钟而热灭活的微生物。

[0033] 有利地，还可以使用死微生物或例如经热灭活的微生物，因为促进聚集仅需要细胞的某些膜结构。

[0034] 在本发明的另一个方面，根据本发明的微生物另外地对疾病相关物种的生长，特别是对选自以下的一种或更多种疾病相关物种的生长具有抑制活性：牙龈卟啉单胞菌、牙髓卟啉单胞菌、福赛斯坦纳氏菌、龈沟产线菌、隐藏真杆菌、微小小单胞菌(Parvimonas micra)、砂毛绒厌氧杆菌(Lachnoanaerobaculum saburreum)，当所述微生物是唾液乳杆菌NS13(NCIMB 8816)时。

[0035] 有利地，根据本发明的益生菌菌株除了抗炎活性之外，可还对某些疾病相关物种表现出生长抑制作用，如下面实施例中所证明的。

[0036] 在一个方面，本发明涉及上述微生物，其中所述微生物另外地能够治疗和/或预防口腔内炎症，优选用于降低或抑制选自以下的一种或更多种炎性因子的释放：白细胞介素1(IL-1)、白细胞介素6(IL-6)、白细胞介素8(IL-8)、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor，TNF)、前列腺素E2(PGE2)、异前列烷、基质金属肽酶9(MMP9)和NF-κB，其中所述微生物选自德氏乳杆菌乳酸亚种LL-G41(CCTCC M 2016652)、发酵乳杆菌35D(DSM32130)和唾液乳杆菌NS13(NCIMB 8816)。

[0037] 为了涵盖与和疾病相关物种形成聚集体无关的根据本发明的微生物的另一些益生菌作用，已经单独阐明了哪些益生菌菌株能够有效地抑制许多不同促炎因子的释放。因此，通过选择就多个益生菌作用而言总体上最有效的菌株，可以优化可商购的益生菌菌株用于治疗和/或预防口腔内炎性病症的用途。

[0038] 根据本发明的另一方面，如上述任一方面所限定的一种或更多种微生物的碎片可以用于治疗和/或预防口腔内炎症，优选用于治疗和/或预防龈炎和/或牙周炎，优选用作益生菌剂以用于与和龈炎和/或牙周炎相关的口腔细菌物种，特别是与选自以下的疾病相关物种形成共聚集体：牙龈卟啉单胞菌、牙髓卟啉单胞菌、福赛斯坦纳氏菌、龈沟产线菌和隐藏真杆菌。

[0039] 没有必要使用根据本发明的益生菌微生物的全细胞，因为仅包含碎片(例如降解细胞的碎片)特别是微生物膜的级分的混合物足以提供本发明的效果。因此，在本发明的上下文中，“一种或更多种微生物的碎片”优选是指能够提供本文中所述的聚集效果的细胞的任何部分或细胞部分的任何组合。

[0040] 在另一个方面，本发明还涉及经口药物组合物、口腔护理产品或者用于营养或休闲的产品，其包含选自以下的一种或更多种微生物或其碎片：德氏乳杆菌乳酸亚种LL-G41

(CCTCC M2016652)、发酵乳杆菌35D(DSM32130)、格氏乳杆菌NS8(NCIMB 11718)、唾液乳杆菌NS13(NCIMB8816)、唾液链球菌NS18(CBS 142430)和唾液链球菌NS19(CBS 142431),其中所述微生物或其碎片的总量足以用于治疗和/或预防龈炎和/或牙周炎,其优选通过与和龈炎和/或牙周炎相关的口腔细菌物种,特别是与选自以下的疾病相关物种形成共聚集体来实现:牙龈卟啉单胞菌、牙髓卟啉单胞菌、福赛斯坦纳氏菌、龈沟产线菌和隐藏真杆菌,进一步优选地,其中所述微生物或其碎片的总量为0.01%至100%,更优选0.1%至50%,最优选1%至10%,在每种情况下均相对于所述组合物的总重量,和/或其中所述微生物或其碎片的总量为1×10^{3}至1×10^{11}个菌落形成单位(colony forming unit,CFU),更优选1×10^{5}至1×10^{10}CFU。

[0041] 技术人员知道,用于根据本发明的组合物或产品的益生菌生物体代表其活性可以随批次而变化并且还取决于生产或加工方法的生物材料。因此,可以在给定范围内相应地调整合适的量。

[0042] 用于休闲的产品是为了享受而消费的产品,例如:糖食(例如巧克力、巧克力棒产品、其他小吃店产品(other bar product)、水果胶糖(fruit gum)、硬熟糖(hard-boiled sweet)、太妃糖(toffee)、口香糖(chewing gum)、冰淇淋)、含酒精或不含酒精的饮料(例如咖啡、茶、酒、含酒饮料、啤酒、含啤酒的饮料、利口酒、烈酒(spirit)、白兰地、含水果的柠檬水(fruit-containing lemonade)、等渗饮料、清凉饮料(refreshing beverage)、花蜜(nectar)、水果汁和蔬菜汁、水果汁或蔬菜汁制剂)。

[0043] 此外,本发明涉及如上所述的组合物或产品,其用于治疗和/或预防口腔内炎症,优选用于治疗和/或预防龈炎和/或牙周炎,优选用作益生菌剂以用于与和龈炎和/或牙周炎相关的口腔细菌物种,特别是与选自以下的疾病相关物种形成共聚集体:牙龈卟啉单胞菌、牙髓卟啉单胞菌、福赛斯坦纳氏菌、龈沟产线菌和隐藏真杆菌。

[0044] 根据本发明的组合物还可以包含选自以下的一种或更多种组分:载体、赋形剂或其他活性成分,例如来自以下的组的活性剂:非类固醇消炎剂、抗生素、类固醇、抗TNF-α抗体或其他通过生物技术产生的活性剂和/或物质以及镇痛剂、右泛醇、泼尼松龙、聚维酮碘化物、氯己定-双-D-葡糖酸盐、海克替啶、苄达明HCl、利多卡因、苯佐卡因、聚乙二醇月桂基醚、与氯化十六烷基吡啶(cetidyl pyridinium chloride)组合的苯佐卡因或与来自小牛血液的无蛋白质血液透析物组合的聚乙二醇月桂基醚;以及例如填充剂(例如纤维素、碳酸钙)、增塑剂或流动性改进剂(例如滑石、硬脂酸镁)、包衣(例如聚乙烯乙酸酯邻苯二甲酸酯、羟丙基甲基纤维素邻苯二甲酸酯)、崩解剂(例如淀粉、交联聚乙烯吡咯烷酮)、软化剂(例如柠檬酸三乙酯、邻苯二甲酸二丁酯)、用于造粒的物质(乳糖、明胶)、阻滞剂(retardation)(例如分散体中的聚(甲基)丙烯酸甲基/乙基2-三甲基氨甲酯共聚物、乙酸乙烯酯/巴豆酸共聚物)、压制剂(例如微晶纤维素、乳糖)、溶剂、助悬剂或分散剂(例如水、乙醇)、乳化剂(例如鲸蜡醇、卵磷脂)、用于改进流变特性的物质(二氧化硅、藻酸钠)、用于微生物稳定化的物质(例如苯扎氯铵、山梨酸钾)、防腐剂和抗氧化剂(例如DL-α-生育酚、抗坏血酸)、用于调节pH的物质(乳酸、柠檬酸)、发泡剂或惰性气体(例如氟化氯化烃、二氧化碳)、染料(铁氧化物、钛氧化物)、用于软膏剂的基本成分(例如石蜡、蜂蜡)和文献中描述的其他成分(例如Schmidt,Christin.Wirk-und Hilfsstoffe für Rezeptur,Defektur und Groβherstellung.1999;Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart oder

Bauer，Frömming Führer.Lehrbuch der Pharmazeutischen Technologie.8.Auflage，2006.Wissenschafiliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart)。

[0045] 根据本发明的组合物或产品也可以是经涂覆的或经包封的。

[0046] 根据本发明的组合物的包封可具有允许受控释放(例如在与水接触后受控释放)或在长时间内连续释放的优点。此外，可以保护组合物免于降解，从而改善产品的保质期。用于包封活性成分的方法是本领域公知的，并且许多包封材料以及如何根据具体要求将其应用于组合物的方法是可利用的。

[0047] 此外，根据本发明的组合物或产品可以是溶液剂、混悬剂、乳剂、片剂、颗粒剂、散剂或胶囊剂的形式。

[0048] 根据本发明的组合物或产品可以选自牙膏、牙用凝胶、牙粉、牙齿清洁液、牙齿清洁泡沫、漱口剂、口喷剂、牙线、口香糖和锭剂。

[0049] 这样的组合物或产品可以包含研磨体系(研磨剂和/或抛光组分)，例如硅酸盐、碳酸钙、磷酸钙、氧化铝和/或羟基磷灰石；表面活性剂，例如如月桂基硫酸钠、月桂基肌氨酸钠和/或椰油酰胺基丙基甜菜碱；湿润剂，例如甘油和/或山梨醇；增稠剂，例如羧甲基纤维素、聚乙二醇、角叉胶和/或Laponite®；甜味剂，例如糖精；芳香剂(aroma)和用于不愉快味道印象的味道矫正剂；味道调节物质(例如肌醇磷酸；核苷酸，例如鸟苷一磷酸、腺苷一磷酸或其他物质，例如谷氨酸钠或2-苯氧基丙酸)；冷却剂，例如薄荷醇衍生物(例如L-薄荷基乳酸酯(L-mentyl lactate)、L-薄荷基烷基碳酸酯、薄荷酮缩酮)、icilin和icilin衍生物；稳定剂和活性剂，例如氟化钠、单氟磷酸钠、二氟化锡、季铵氟化物、柠檬酸锌、硫酸锌、焦磷酸锡、二氯化锡、不同焦磷酸盐的混合物、三氯生、氯化十六烷基吡啶、乳酸铝、柠檬酸钾、硝酸钾、氯化钾、氯化锶、过氧化氢、芳香物质、碳酸氢钠和/或气味校正剂。

[0050] 口香糖或牙齿护理口香糖可以包含含有弹性体的口香糖基质，所述弹性体例如聚乙酸乙烯酯(PVA)、聚乙烯、(低分子或中分子)聚异丁烷(PIB)、聚丁二烯、异丁烯/异戊二烯共聚物、聚乙烯乙醚(PVE)、聚乙烯丁醚、乙烯酯与乙烯醚的共聚物、苯乙烯/丁二烯共聚物(SBR)或乙烯基弹性体，例如基于乙酸乙烯酯/月桂酸乙烯酯、乙酸乙烯酯/硬脂酸乙烯酯或乙烯/乙烯基乙酸酯的乙烯基弹性体，以及所述弹性体的混合物，如例如EP 0 242 325、US 4,518,615、US 5,093,136、US 5,266,336、US 5,601,858或US 6,986,709示例性所述的。另外，口香糖基质可以含有其他成分，例如(矿物质)填充剂，例如碳酸钙、二氧化钛、二氧化硅、滑石、氧化铝、磷酸二钙、磷酸三钙、氢氧化镁及其混合物；增塑剂(例如羊毛脂、硬脂酸、硬脂酸钠、乙酸乙酯、二醋精(二乙酸甘油酯)、三醋精(三乙酸甘油酯)和柠檬酸三乙酯)；乳化剂(例如磷脂，例如卵磷脂以及脂肪酸的甘油单酯和甘油二酯，例如单硬脂酸甘油酯)；抗氧化剂；蜡(例如石蜡、小烛蜡、巴西棕榈蜡、微晶蜡和聚乙烯蜡)；脂肪或脂肪油(例如硬化(氢化)植物脂肪或动物脂肪)和甘油单酯、甘油二酯或甘油三酯。

[0051] 最后，本发明还涉及产生如上所述的经口药物组合物、口腔护理产品或者用于营养或休闲的产品的方法，其包括以下步骤：

[0052] -将选自以下的一种或更多种微生物或其碎片与一种或更多种其他组分，优选与选自载体、赋形剂或其他活性成分的一种或更多种组分组合：德氏乳杆菌乳酸亚种LL-G41(CCTCC M 2016652)、发酵乳杆菌35D(DSM32130)、格氏乳杆菌NS8(NCIMB 11718)、唾液乳杆

菌NS13(NCIMB8816)、唾液链球菌NS18(CBS 142430)和唾液链球菌NS19(CBS 142431)。

[0053] 在本发明的上下文中,本文中还描述了治疗对象或对应地患者,特别是用于治疗和/或预防口腔内炎症(如本文中所述)的方法,其包括向对象/患者、优选地向有此需要的对象/患者施用本文中所述的微生物或混合物、优选以足以治疗或预防炎症、优选治疗或预防龈炎和/或牙周炎的量施用本文中所述的微生物或混合物。

[0054] 增加以下实施例以举例说明本发明而不是为了限制范围。

[0055] 附图简述

[0056] 图1示出了在共聚集测定中指定的益生菌针对疾病相关细菌的类型菌株的聚集能力。结果示出了致病性细菌和益生菌共同孵育之后表示为聚集指数百分比的总的光密度的降低。聚集指数[%]=(($OD_{总}$-$OD_{上清液}$/$OD_{总}$))×100;$OD_{总}$=$OD_{目标菌株}$+$OD_{益生菌菌株}$。对于x轴上示出的疾病相关细菌的每一菌株,聚集指数由从左到右的德氏乳杆菌乳酸亚种LL-G41(CCTCC M2016652)、发酵乳杆菌35D(DSM 32130)、格氏乳杆菌NS8(NCIMB11718)、唾液乳杆菌NS13(NCIMB 8816)、唾液链球菌NS18(CBS 142430)和唾液链球菌NS19(CBS 142431)的柱表示。

[0057] 图2示出了在共聚集测定中指定的益生菌针对疾病相关龈沟产线菌的野生型(wt)菌株和类型菌株龈沟产线菌(ATCC 35896^{T})的聚集能力。结果示出了致病性细菌和益生菌共同孵育之后表示为聚集指数百分比的总的光密度的降低。聚集指数[%]=(($OD_{总}$-$OD_{上清液}$/$OD_{总}$))×100;$OD_{总}$=$OD_{目标菌株}$+$OD_{益生菌菌株}$。对于在x轴上示出的疾病相关龈沟产线菌的野生型(wt)菌株和类型菌株龈沟产线菌(ATCC 35896^{T})的每种,针对德氏乳杆菌乳酸亚种LL-G41(CCTCC M 2016652)(左柱)和发酵乳杆菌35D(DSM32130)(右柱)表示聚集指数。

[0058] 图3示出了在共聚集测定中指定的益生菌针对疾病相关牙龈卟啉单胞菌的野生型(wt)菌株和类型菌株牙龈卟啉单胞菌(ATCC 33277^{T})的聚集能力。结果示出了致病性细菌和益生菌共同孵育之后表示为聚集指数百分比的总的光密度的降低。聚集指数[%]=(($OD_{总}$-$OD_{上清液}$/$OD_{总}$))×100;$OD_{总}$=$OD_{目标菌株}$+$OD_{益生菌菌株}$。聚集指数由从左到右的益生菌发酵乳杆菌35D(DSM 32130)、格氏乳杆菌NS8(NCIMB 11718)、唾液乳杆菌NS13(NCIMB 8816)、唾液链球菌NS18(CBS 142430)和唾液链球菌NS19(CBS 142431)的每一种的分组的柱表示,并且在每组内牙龈卟啉单胞菌菌株的柱从左到右表示ATCC 33277T、1807(wt)、2836(wt)、7681(wt)、2103(wt)和9066(wt)。

[0059] 图4示出了在共聚集测定中指定的活益生菌或减毒益生菌针对疾病相关牙龈卟啉单胞菌的野生型(wt)菌株和类型菌株牙龈卟啉单胞菌(ATCC 33277^{T})的聚集能力。结果示出了致病性细菌和益生菌共同孵育之后表示为聚集指数百分比的总光密度的降低。聚集指数[%]=(($OD_{总}$-$OD_{上清液}$/$OD_{总}$))×100;$OD_{总}$=$OD_{目标}$菌株+$OD_{益生菌菌株}$。对于在y轴上示出的牙龈卟啉单胞菌的每一菌株(从左到右为ATCC 33277T、1807(wt)、2836(wt)、7681(wt)、2103(wt)和9066(wt)),交替显示活发酵乳杆菌35D(DSM 32130)(左柱)和减毒发酵乳杆菌35D(DSM 32130)(右柱)以及活唾液乳杆菌NS13(NCIMB 8816)(左柱)和减毒唾液乳杆菌NS13(NCIMB 8816)(右柱)的聚集指数。

[0060] 实施例1:建立益生菌菌株的培养和操作

[0061] 为了鉴定待筛选益生菌的最佳生长条件和收获点并确定其菌落形成单位(CFU),首先确定生长期的对数期和末期。

[0062] 细菌生长

[0063] 将冷冻的(-80℃)益生菌贮存液在4℃下过夜解冻,并在第二天早晨将6ml无菌9%NaCl溶液添加至1.2ml细菌。将样品离心(5分钟,5000rpm),弃去上清液,将沉淀用8ml的9%NaCl洗涤,并再次以5000rpm离心5分钟。然后,将沉淀重悬于1.2ml的9%NaCl中,并将1ml样品添加至50ml的37℃温热培养基(MRS Bouillon,Carl Roth KG,Karlsruhe)并在37℃下孵育。孵育在50ml无菌聚丙烯管(Greiner)中进行,并在不同时间点收获探测物以评价生长曲线。

[0064] OD确定

[0065] 为了确定OD,取出500μl细菌混悬液并在1.5ml-PS-小杯(Brand)中在1ml MRS Bouillon中稀释。使用1.5ml MRS Bouillon作为空白,在600nm下进行OD确定(ThermoScientific,Helios Epsilon)。

[0066] CFU确定

[0067] 为了确定CFU,将细菌稀释(1:10,000,000、1:50,000,000和1:100,000,000),平板接种在MRS-琼脂平板(MRS Agar,X924,Carl Roth)上并在37℃下孵育2天。然后,计数生长的菌落并计算CFU。

[0068] 细菌从开始起接近对数期直到7到8小时,此时细菌开始达到平台期。接种的细菌量不会改变曲线的形状。选择5小时作为收获对数期细菌的在最陡生长期的点并且选择7小时以在对数期的末期收获细菌。

[0069] 实施例2:益生菌菌株与口腔疾病相关细菌的共聚集

[0070] 基于专有的OASSYS®共聚集进行筛选。目标菌株和益生菌菌株在特定的生长条件下培养、收获、洗涤和共同孵育。监测菌株的行为:

[0071] a)宏观上,絮凝物的外观分级为0至3级(对于没有絮凝物/浑浊上清液为“0”,对于相当大的沉淀/澄清上清液为“3”)

[0072] b)估计聚集指数(%聚集),其表示在共同孵育之后已经聚集的应用的细菌细胞的百分比。如果聚集已发生,当轻轻离心时聚集体将沉至孔底,导致上清液的光密度降低(在600nm处光度测量),而不是在菌株之间没有相互作用的情况下,上清液的光密度将保持不变。该方法允许准确量化聚集事件。

[0073] 根据公式计算聚集指数:

[0074] $$\text{聚集指数}(\%) = \frac{OD_{(总)} - OD_{(上清液)}}{OD_{(总)}} \times 100$$

[0075] $OD_{总} = OD_{目标菌株} + OD_{益生菌菌株}$

[0076] 然后将受试的菌株根据其聚集指数分为5类(表1)。低聚集指数表示细胞之间低等级的稳定相互作用和聚集,而高聚集指数表示高聚集能力并且在共同孵育之后少有或没有浮游细胞(planktonic cell)留下。在本发明的上下文中,优选地,根据本发明使用的微生物显示针对疾病相关微生物(如本文中所述)的至少60%、优选至少80%的聚集指数。

[0077] 表1

[0078]

聚集指数[%]	0-20%	20-40%	40-60%	60-80%	80-100%
聚集类别	1	2	3	4	5

[0079] c)(任选的)光学显微术;通过光学显微术分析所选择的已观察到可见絮凝物的菌

株并对其拍照。

[0080] 目标菌株的培养和表征

[0081] 建立并调整用于培养和操作目标细菌隐藏真杆菌、福赛斯坦纳氏菌、龈沟产线菌、牙髓卟啉单胞菌和牙龈卟啉单胞菌的微生物学方法。

[0082] 将目标菌株作为在肉汤中的细菌混悬液递送、从琼脂平板冲洗并在冷冻管中收集。为了建立对于作为混悬液培养物的目标菌株的培养最适合的生长培养基，准备并测试了在一些情况下补充有精氨酸、半胱氨酸、维生素K和氯化血红素的多种培养基，例如BHI(脑心浸出液，Brain Heart Infusion)、TYP(胰胨-酵母提取物-蛋白胨，Tryptone-Yeast Extract-Peptone)、FAB(苛养厌氧菌肉汤，Fastidious Anaerobe Broth)。建立了对于牙龈卟啉单胞菌、牙髓卟啉单胞菌和龈沟产线菌的最佳生长条件。然而，未能发现对于福赛斯坦纳氏菌和隐藏真杆菌的培养合适的液体培养基，因此所述菌株适应于在固体培养基(补充有马血和N-乙酰胞壁酸的苛性厌氧菌琼脂)上生长。对于随后的测定，从平板中收获细胞材料。这种替代的培养方法导致细胞材料的收率较低，并且允许仅有限数量的筛选实验的实施。因此，福赛斯坦纳氏菌的筛选被减少为针对已经在筛选针对其他疾病相关物种(龈沟产线菌、牙龈卟啉单胞菌和牙髓卟啉单胞菌)中显示出阳性共聚集能力的益生菌菌株。

[0083] 由于非常缓慢且不良的生长，因此从筛选中完全排除了隐藏真杆菌。

[0084] 筛选

[0085] 在24孔板中进行共聚集测定。培养目标菌株和益生菌菌株，将其洗涤数次并共同孵育。另外，测试了所分析的益生菌菌株和目标菌株二者的自聚集能力。为了此目的，将目标菌株和益生菌菌株单独孵育并记录与在共同孵育的情况下相同的参数-宏观观察和上清液中光密度的测量。为了创造特定菌株共聚集能力的更好的概述并促进命中选择，将益生菌菌株根据其聚集指数分类(参见表1)。通过显微分析证实了具有高聚集指数的数种样品中聚集体的存在。

[0086] 在筛选的60多种菌株中，菌株德氏乳杆菌乳酸亚种LL-G41(CCTCC M 2016652)、发酵乳杆菌35D(DSM 32130)、格氏乳杆菌NS8(NCIMB11718)、唾液乳杆菌NS13(NCIMB 8816)、唾液链球菌NS18(CBS 142430)和唾液链球菌NS19(CBS 142431)显示了与至少一种目标菌株的超过60％的聚集指数。

[0087] 图1至图4示出了益生菌菌株对于受试的疾病相关菌株的聚集能力。表2和3示出了益生菌菌株的宏观共聚集和聚集类别的分级。

[0088] 表2示出了在宏观评价的共聚集测定中指定的益生菌针对疾病相关龈沟产线菌的野生型(wt)菌株和类型菌株龈沟产线菌(ATCC 35896^{T})的聚集能力。对于没有絮凝物，絮凝物分级为“0”，并且对于相当大的沉淀或澄清的上清液，絮凝物分级为“3”。此外，该表示出了聚集类别内聚集指数的分级以更容易地解释测定结果。

[0089] 表2

宏观共聚集	0-1	2	3

	ATCC 35896^T	1550 (wt)	2282 (wt)	7684 (wt)	9351 (wt)	9077 (wt)
发酵乳杆菌 *(DSM 32130)*	3	2	3	2	2	0
德氏乳杆菌 *(CCTCC M 2016652*	3	3	3	1	3	0

[0090]

聚集类别	1	2	3	4	5
聚集指数	<20%	20-40%	41-60%	61-80%	>80%

	ATCC 35896^T	1550 (wt)	2282 (wt)	7684 (wt)	9351 (wt)	9077 (wt)
发酵乳杆菌 *(DSM 32130)*	4	4	3	2	2	1
德氏乳杆菌 *(CCTCC M 2016652*	3	4	2	1	1	1

[0091] 表3示出了在宏观评价的共聚集测定中指定的益生菌针对疾病相关牙龈卟啉单胞菌的野生型(wt)菌株和类型菌株牙龈卟啉单胞菌(ATCC33277^T)的聚集能力。对于没有絮凝物,絮凝物分级为“0”,并且对于相当大的沉淀或澄清的上清液,絮凝物分级为“3”。此外,该表示出了聚集类别内聚集指数的分级以更容易地解释测定结果。

[0092] 表3

宏观共聚集	0-1	2	3

	ATCC 33277^T	*1807 (wt)*	*2836 (wt)*	*7681 (wt)*	*2108 (wt)*	*9066 (wt)*
发酵乳杆菌 *(DSM 32130)*	3	3	3	0	0	1
格氏乳杆菌*(NCIMB 11718)*	3	2	3	1	0	1
唾液乳杆菌 *(NCIMB 8816)*	3	3	3	3	3	3

[0093]

聚集类别	1	2	3	4	5
聚集指数	<20%	20-40%	41-60%	61-80%	>80%

	ATCC 33277^T	*1807 (wt)*	*2836 (wt)*	*7681 (wt)*	*2108 (wt)*	*9066 (wt)*
发酵乳杆菌 *(DSM 32130)*	5	4	4	2	1	2
格氏乳杆菌*(NCIMB 11718)*	5	4	4	3	1	2
唾液乳杆菌 *(NCIMB 8816)*	5	5	5	5	4	5

[0094] 实施例3:益生菌菌株对疾病相关细菌的抑制活性

[0095] 确定了所选择的益生菌菌株、尤其是唾液乳杆菌NS 13对牙周炎相关的口腔细菌物种(指示菌株)的抑制活性。指示菌株是:

[0096] ●牙龈卟啉单胞菌ATCC 33277

[0097] ●牙髓卟啉单胞菌ATCC 35406

[0098] ●福赛斯坦纳氏菌ATCC 43037

[0099] ●龈沟产线菌ATCC 35896

[0100] ●隐藏真杆菌ATCC 49989

[0101] ●微小小单胞菌ATCC 33270

[0102] ●砂毛绒厌氧杆菌ATCC 33271

[0103] 以一式三份进行延迟拮抗方法。将测试菌株在血琼脂上以条纹生长24或48小时，然后通过暴露于氯仿将其杀伤。将指示菌株交叉划线并孵育多至72小时。

[0104] 如表4中所示，唾液乳杆菌NS 13具有针对多种指示菌株的活性：

[0105] 表4

[0106]

	唾液乳杆菌NS 13
牙龈卟啉单胞菌ATCC 33277	-
牙髓卟啉单胞菌ATCC 35406	-
福赛斯坦纳氏菌ATCC 43037	-
龈沟产线菌ATCC 35896	+
隐藏真杆菌ATCC 49989	+
微小小单胞菌ATCC 33270	+
砂毛绒厌氧杆菌ATCC 33271	-

[0107] 实施例4：益生菌锭剂或片剂(comprimate)

[0108]

编号	块(block)	成分	异麦芽酮糖醇片剂		
			安慰剂	只有益生菌	+矫味剂
1	A	硬脂酸镁	1.800%	1.800%	1.800%
2		安赛蜜	0.050%	0.050%	0.050%
3		三氯蔗糖	0.025%	0.025%	0.025%
4		益生菌材料		1.000%	1.000%
5		矫味剂（例如 134229 Optamint 胡椒薄荷 s/d）			0.500%
6	B	异麦芽酮糖醇	98.125%	97.125%	96.625%
		总计	**100.00%**	**100.00%**	**100.00%**

[0109] 产生方法：

[0110] ●将组分1和6在真空室干燥器中在50℃和最大10mbar的压力下干燥16小时。

[0111] ●所有组分都精确称重

[0112] 将组分1、2、3、4和5合并并充分混合(块A)。益生菌材料以活性为每克约10^5至10^{12}个菌落形成单位(CFU)的冻干形式施加。

[0113] ●随后将块A添加至组分6并充分混合5分钟。

[0114] ●将粉末混合物在压片机EKO(Korsch AG,Berlin)中在15至20kN的调节压力下压制成片剂。

[0115] 目标参数：

[0116] ○片剂直径：20mm

[0117] ○片剂重量：2.0g。

[0118] ●在RT下储存在密封的铝袋中。每5个锭剂使用1g干燥剂进行除湿(通过在105℃下在真空室干燥器中储存3小时来活化)。

[0119] 实施例5:粉状洁牙剂

[0120]

编号	块	成分	牙粉		
			安慰剂	只有益生菌	+矫味剂
1	A	碳酸镁	3.00%	3.00%	3.00%
2		碳酸氢钠	2.00%	2.00%	2.00%
3		氟化钠	0.25%	0.25%	0.25%
4		糖精钠	0.60%	0.60%	0.60%
5	B	益生菌材料		4.00%	4.00%
6		矫味剂(例如134229 Optamint 胡椒薄荷s/d)			2.00%
7	C	碳酸钙	94.15%	90.15%	88.15%
		总计	**100.00%**	**100.00%**	**100.00%**

[0121] 产生方法:

[0122] ●将组分7在真空室干燥器中在50℃和最大10mbar的压力下干燥16小时。

[0123] ●所有组分都精确称重。

[0124] ●将组分1、2、3和4合并并充分混合在一起(块A)。

[0125] ●如果需要的话,将组分5和6合并并充分混合(块B)。益生菌材料以活性为每克约10^5至10^{12}个菌落形成单位(CFU)的冻干形式施加。

[0126] ●随后将块A和B合并并充分混合在一起。

[0127] ●将混合物添加至组分7并充分混合5分钟。

[0128] ●将粉末混合物制成0.5g的部分,每部分与1g干燥剂/部分(通过在105℃下在真空室干燥器中储存3小时来活化)一起在RT下储存在密封的铝袋中。

[0129] 实施例6:粉状洁牙剂

[0130]

编号	块	成分	牙膏片剂
1	A	碳酸镁	3.00%
2		碳酸氢钠	2.00%
3		氟化钠	0.25%
4		糖精钠	0.60%
5		月桂基硫酸钠	0.50%
6		硬脂酸镁	1.00%
7	B	矫味剂（例如 134229 Optamint 胡椒薄荷 s/d）	2.00%
8		益生菌材料	6.67%
9	C	碳酸钙	17.00%
10		微晶纤维素	66.98%
		总计	**100.00%**

[0131] 产生方法：

[0132] ●将组分6、9和10在真空室干燥器中在50℃和最大10mbar的压力下干燥16小时。

[0133] ●所有组分都精确称重。

[0134] ●将组分1、2、3、4、5和6合并并充分混合在一起(块A)。

[0135] ●将组分7和8合并并充分混合在一起(块B)。益生菌材料以活性为每克约10^5至10^{12}个菌落形成单位(CFU)的冻干形式施加。

[0136] ●随后将块A和B合并并充分混合在一起。

[0137] ●将组分9和10合并并充分混合在一起(块C)。

[0138] ●将这两种混合物(块A/B和块C)合并并充分混合5分钟。

[0139] ●将粉末混合物在压片机EKO(Korsch AG,Berlin)中在15至20kN的调节压力下压制成片剂。

[0140] 目标参数

[0141] ○片剂直径:9mm

[0142] ○片剂重量:0.3g

[0143] ●在RT下储存在密封的铝袋中。每3个片剂使用1g干燥剂进行除湿(通过在105℃下在真空室干燥器中储存3小时来活化)。

[0144] 实施例7:口香糖

[0145]

编号	成分	具有植物油、在矫味剂中益生菌的口香糖		具有植物油、在油中益生菌的口香糖	
1	胶基（例如 Geminis T）	30.00%	块 A	30.00%	块 A
2	异麦芽酮糖醇（在此为：异麦芽酮糖醇 ST-PF）	65.00%	块 B	65.00%	块 B
3	包封的三氯蔗糖(在蜡中 10%)	1.00%		1.00%	
4	脱油大豆卵磷脂（在此为：Emulpur IP）	0.30%		0.30%	
5	植物油-甘油三酯	1.60%	块 C	1.60%	块 C
6	益生菌材料	0.80%	块 D	0.80%	
7	矫味剂(例如 203191 Optamint 胡椒薄荷)	1.30%		1.30%	块 D

[0146] 产生方法：

[0147] ●将组分2在真空室干燥器中在50℃和最大10mbar的压力下干燥16小时。

[0148] ●所有组分都精确称重。

[0149] ●将组分1在口香糖实验室捏合机中回火至45℃至59℃，加热捏合直至获得均匀的团块。在整个混合过程期间持续加热。

[0150] ●随后添加组分2、3和4并捏合直至混合物均匀并且粉末不再可见。

[0151] ●根据配方，将组分6加工到组分5中(块C)，或者加工到组分7中(块D)。益生菌材料以活性为每克约10^5至10^{12}个菌落形成单位(CFU)的冻干形式施加。混合组分直至获得均匀的混悬体。

[0152] ●首先，将块C添加至口香糖团块并再次捏合直至获得均匀的团块。

[0153] ●最后，相应地加工块D。在添加之后，必须将组合物捏合直至获得均匀的口香糖团块。

[0154] ●将团块从混合器中取出，并使用压纹装置“板”通过压纹辊形成为微型棒。

[0155] ●在RT下储存在密封的铝袋中。每7个口香糖使用1g干燥剂进行除湿(通过在105℃下在真空室干燥器中储存3小时来活化)。

[0156] 实施例8：益生菌珠粒

[0157]

组分	低载量、无芳香剂、具有染料、具有结冷胶的益生菌珠粒（wt.%）	低载量、具有芳香剂、具有染料、具有结冷胶的益生菌珠粒（wt.%）	高载量、无芳香剂、无染料、无结冷胶、高含水量的益生菌珠粒（wt.%）	高载量、无芳香剂、无染料、无结冷胶、低含水量的益生菌珠粒（wt.%）
藻酸盐	1.75	1.65	1.44	1.57
阿拉伯胶	1.25	1.18	0.60	0.65
小麦纤维	1.125	1.06	0.52	0.57
染料	0.0125	0.018	-	-
芳香剂	-	1.41	-	-
甘油	0.1875	-	-	-
益生菌	1.125	1.35	7.20	7.83
结冷胶	0.0625	0.059	-	-

[0158]

水	添加至 100	添加至 100	添加至 100	添加至 100
载量	*约 20%*	*约 20%*	*约 74%*	*约 74%*

[0159] 产生方法：

[0160] 用于沉淀藻酸盐珠粒的氯化钙浴的产生：

[0161] ●由蒸馏水和氯化钙产生2％氯化钙溶液。必须注意$CaCl_2$完全溶解。藻酸盐溶液的产生(作为藻酸盐的替代，也可以使用果胶或结冷胶)：

[0162] ●在具有搅拌器并且适合批量尺寸的反应容器中，提供水。

[0163] ●打开搅拌器，并在以高水平搅拌的同时，添加相应量的藻酸盐、阿拉伯胶、小麦纤维和益生菌，以及任选所需的结冷胶。

[0164] ●在搅拌的同时将混合物加热至80℃并在该温度下保持5分钟-在该步骤期间，凝胶形成性组分溶解。

[0165] ●然后，关闭加热并将热凝胶溶液进一步搅拌至少30分钟直至其没有结块。

[0166] ●随后，在搅拌的同时将溶液通过制冷冷却至39℃至43℃。

[0167] ●在另一个容器中，如果需要的话，提供芳香剂和染料并充分混合。在不使用芳香剂的情况下，将染料与甘油混合。

[0168] ●当染料分散体均匀混合时，将其与藻酸盐溶液一起添加至分批容器。将混合容器用所使用藻酸盐溶液的量的约10％的水洗涤数次，并添加分散体。

[0169] ●将藻酸盐分散体进一步搅拌至少5分钟。

[0170] ●随后，将该批次以低速进一步搅拌至少15分钟以除去可能存在的空气。

[0171] 将藻酸盐溶液滴入氯化钙溶液中以沉淀珠粒：

[0172] ●将藻酸盐分散体移动至具有两个出口的可紧密密封的压力稳定反应容器中。在一个出口处，施加压缩空气。第二个出口通过管引导至滴注单元的喷嘴。

[0173] ●将反应容器在加热板上回火，使得藻酸盐溶液达到约45℃的温度。用磁力搅拌器轻轻搅拌溶液。

[0174] ●在向反应容器施加压力之后，藻酸盐溶液被压向喷嘴，喷嘴设定为通过振荡器振荡。通过调节压力和振荡器的频率，可以调节在喷嘴尖端处产生的液滴的尺寸。

[0175] ●在喷嘴尖端处形成的藻酸盐溶液液滴落入其中循环有在开始时制备的氯化钙溶液的漏斗形式的收集容器中。

[0176] ●固化的藻酸盐珠粒与氯化钙溶液一起通过漏斗并收集在筛子中，收集的氯化钙溶液被泵送回在滴落单元之下的漏斗中，从而再循环。

[0177] ●将珠粒在Aromatic流动床-干燥器中在80℃的供气温度下干燥，直至排气温度达到45℃。

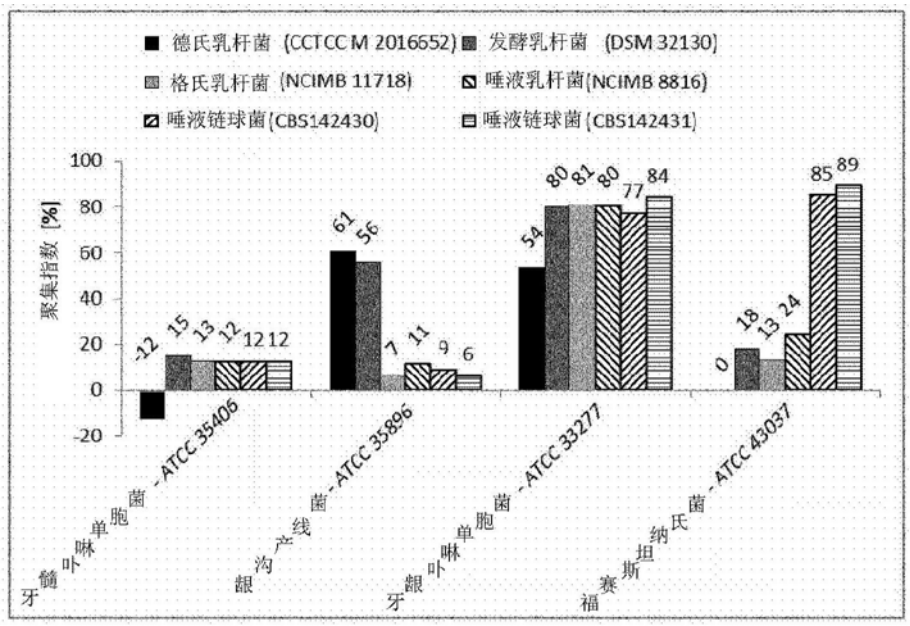

德氏乳杆菌 (CCTCC M 2016652)
发酵乳杆菌 (DSM 32130)
格氏乳杆菌 (NCIMB 11718)
唾液乳杆菌(NCIMB 8816)
唾液链球菌(CBS142430)
唾液链球菌(CBS142431)
聚集指数 [%]
100
80
60
40
20
0
-20
-12 15 13 12 12 12
61 56 7 11 9 6
54 80 81 80 77 84
0 18 13 24 85 89
牙龈卟啉单胞菌 - ATCC 35406
龈沟产线菌 - ATCC 35896
牙龈卟啉单胞菌 - ATCC 33277
福赛斯坦纳氏菌 - ATCC 43037

图1

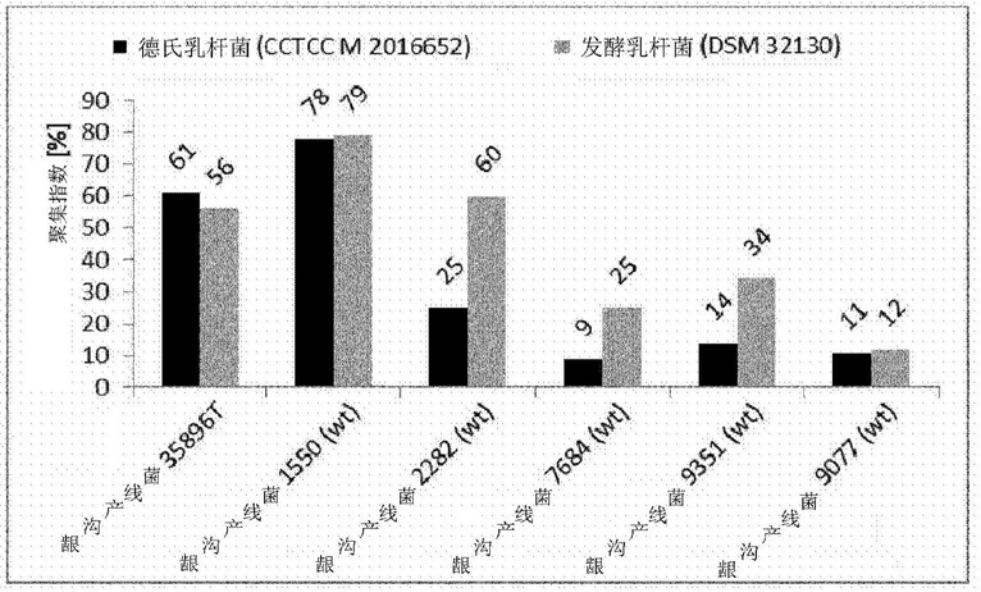

德氏乳杆菌 (CCTCC M 2016652)
发酵乳杆菌 (DSM 32130)
聚集指数 [%]
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
61 56
78 79
25 60
9 25
14 34
11 12
龈沟产线菌 35896T
龈沟产线菌 1550 (wt)
龈沟产线菌 2282 (wt)
龈沟产线菌 7684 (wt)
龈沟产线菌 9351 (wt)
龈沟产线菌 9077 (wt)

图2

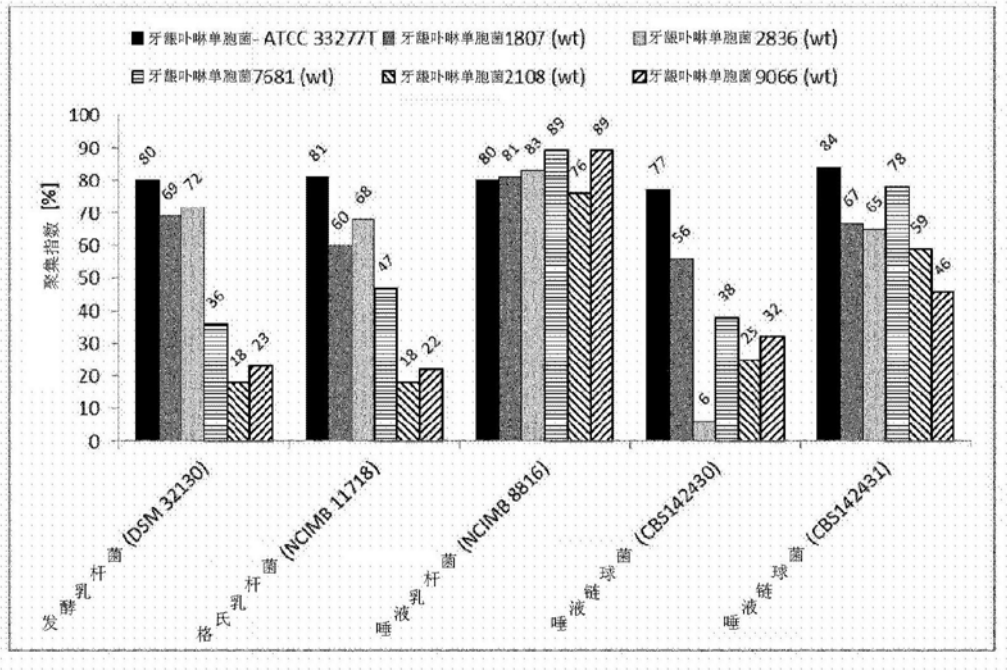

牙龈卟啉单胞菌- ATCC 33277T
牙龈卟啉单胞菌1807 (wt)
牙龈卟啉单胞菌 2836 (wt)
牙龈卟啉单胞菌7581 (wt)
牙龈卟啉单胞菌2108 (wt)
牙龈卟啉单胞菌 9066 (wt)
聚集指数 [%]
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
80 69 72 36 18 23
81 60 68 47 18 22
80 81 83 89 76 89
77 56 6 38 25 32
34 67 65 78 59 46
发酵乳杆菌 (DSM 32130)
格氏乳杆菌 (NCIMB 11718)
唾液乳杆菌 (NCIMB 8816)
唾液链球菌 (CBS142430)
唾液链球菌 (CBS142431)

图3

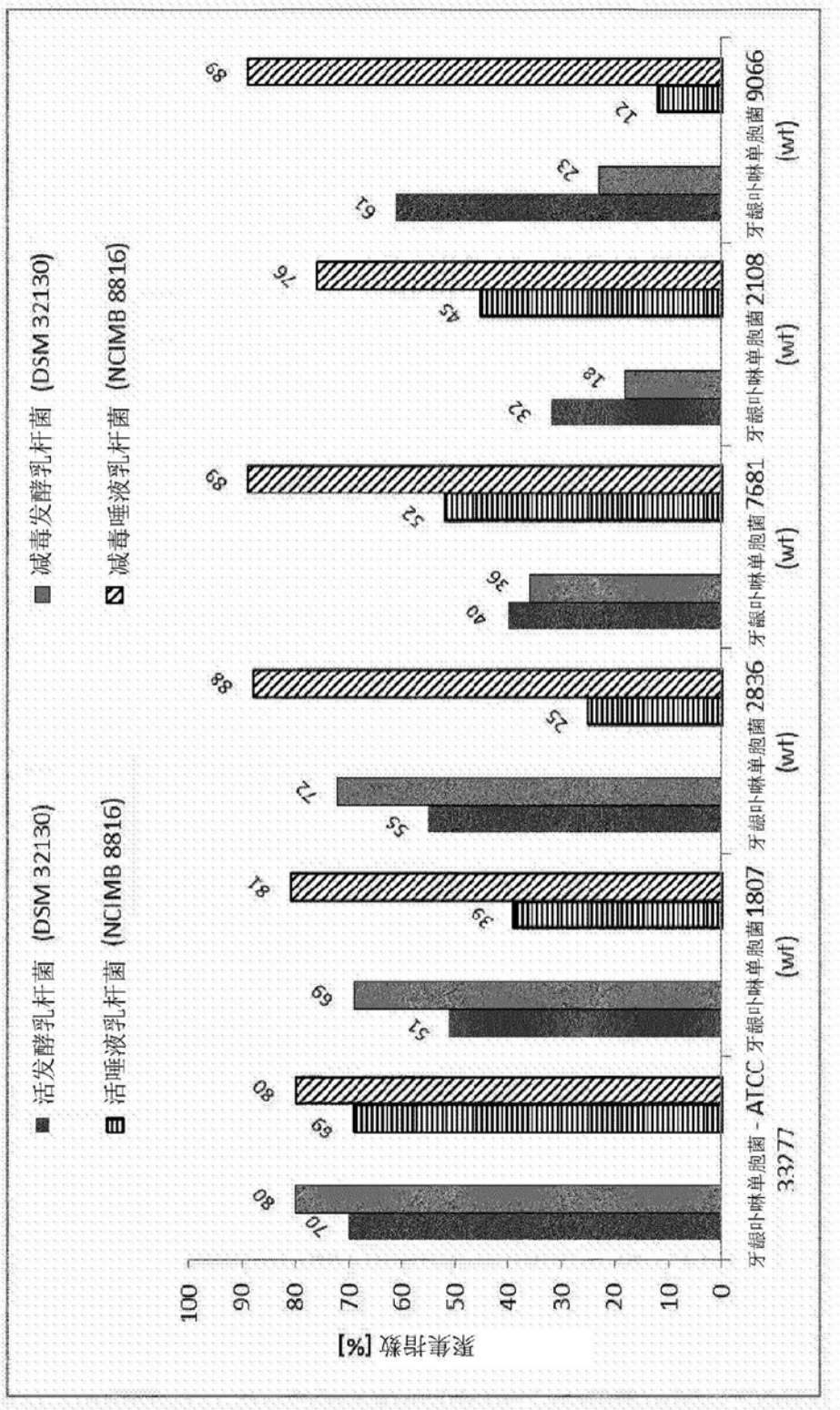

活发酵乳杆菌 (DSM 32130)
活唾液乳杆菌 (NCIMB 8816)
减毒发酵乳杆菌 (DSM 32130)
减毒唾液乳杆菌 (NCIMB 8816)
聚集指数 [%]
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
70
80
69
80
51
69
39
81
55
72
25
88
40
36
52
89
32
18
45
76
61
23
12
89
牙龈卟啉单胞菌 - ATCC 33277
牙龈卟啉单胞菌 1807 (wt)
牙龈卟啉单胞菌 2836 (wt)
牙龈卟啉单胞菌 7681 (wt)
牙龈卟啉单胞菌 2108 (wt)
牙龈卟啉单胞菌 9066 (wt)

图4