

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680026473.2

[51] Int. Cl.

*A23L 1/30 (2006.01)*  
*A61K 35/74 (2006.01)*  
*A23L 1/00 (2006.01)*  
*A23P 1/04 (2006.01)*  
*C12N 11/04 (2006.01)*

[43] 公开日 2008年9月3日

[11] 公开号 CN 101257804A

[22] 申请日 2006.5.18

[21] 申请号 200680026473.2

[30] 优先权

[32] 2005.5.18 [33] EP [31] 05010735.8

[86] 国际申请 PCT/EP2006/062416 2006.5.18

[87] 国际公布 WO2006/122965 英 2006.11.23

[85] 进入国家阶段日期 2008.1.18

[71] 申请人 帝斯曼知识产权资产管理有限公司  
地址 荷兰海尔伦

[72] 发明人 齐-程·陈 布鲁诺·H·勒安伯格  
罗尼·施维克特 厄恩斯特·泽迪

[74] 专利代理机构 北京东方亿思知识产权代理有  
限责任公司  
代理人 肖善强

权利要求书 3 页 说明书 17 页 PCT/RO/134 表 2 页

[54] 发明名称

用于微生物的肠应用的组合物

[57] 摘要

本发明描述了用于制备包含微生物的固体组合物的方法，所述方法包括：用中链或长链脂肪酸的盐与微生物掺合和/或压紧以制备粉末状混合物或压紧的颗粒的第一步，和对所述粉末状混合物或压紧的颗粒提供涂层的第二步。微生物优选地是益生菌。本发明还涉及通过所述方法获得的固体组合物及其在食品中的用途。

1.用于制备包含微生物的固体组合物的方法，所述方法包括：用中链或长链脂肪酸盐与所述微生物掺合和/或压紧，以制备粉末状混合物或压紧的颗粒的第一步，和对所述粉末状混合物或压紧的颗粒提供涂层的第二步。

2.如权利要求1所述的方法，其中在第一步中，微生物和中链或长链脂肪酸盐被压紧并形成颗粒；在第二步中，对所述颗粒提供涂层。

3.如权利要求1或2中所述的方法，其中所述中链或长链脂肪酸盐为硬脂酸镁。

4.如权利要求1或2中所述的方法，其中所述中链或长链脂肪酸盐为硬脂酸钙。

5.如权利要求1到4中任一项所述的方法，其中所属压紧步骤在存在食用油时进行。

6.权利要求5所述的方法，其中所述食用油选自中链甘油三酯和生育酚及其混合物。

7.如权利要求1所述的方法，其中在第一步中将微生物与中链或长链脂肪酸盐掺合，产生粉末状混合物，而在第二步中，对所述粉末状混合物颗粒提供涂层。

8.如权利要求1到7中任一项所述的方法，其中所述涂层由藻酸盐提供。

9.如权利要求8所述的方法，其中通过将水性藻酸盐溶液喷在所述压缩颗粒或粉末状混合物上来应用所述涂层。

10.如权利要求1到9中任一项所述的方法，其中所述微生物是益生菌或其混合物。

11.如权利要求1到10中任一项所述的方法，其中所述微生物为冻干制剂。

12.权利要求1到11中任一项所述的方法，其中所述掺合或压紧步骤中使用的微生物具有基质材料涂层或被包埋入基质材料中。

13. 如权利要求 12 所述的方法，其中所述基质材料选自蛋白质、麦芽糖糊精、海藻糖和/或抗坏血酸。

14. 如权利要求 1 到 13 中任一项所述的方法，其中所述微生物为 *Bifidobacterium*、*Lactobacillus*、*Propionibacterium* 或 *Enterococcus*。

15. 如权利要求 1 到 13 中任一项所述的方法，其中微生物选自由 *Bifidobacterium infantis*、*Bifidobacterium longum*、*Bifidobacterium animalis*、*Bifidobacterium lactis*、*Lactobacillus acidophilus*，优选地 *Lactobacillus acidophilus* CBS 116411、*Lactobacillus rhamnosus*、*Lactobacillus casei*，优选地 *Lactobacillus casei* CBS 116412、*Lactobacillus paracasei* 和 *Lactobacillus helveticus* 组成的组。

16. 如权利要求 15 中所述的方法，其中所述微生物选自由 *Lactobacillus acidophilus* 菌株 CBS 116411、*Bifidobacterium animalis* 和 *Lactobacillus casei* CBS 116412 组成的组。

17. 如权利要求 1 到 16 中任一项所述的方法，用于促进固体微生物组合物的流动性和/或降低吸湿性。

18. 固体组合物，其包含微生物或其混合物、中链或长链脂肪酸盐和涂层材料，可通过如权利要求 1 到 17 中任一项所述的方法获得。

19. 含有微生物的固体组合物，所述微生物被中链或长链脂肪酸涂布或被包埋在其中，其中所述微生物在中链或长链脂肪酸盐涂层下任选地具有第一涂层；所述组合物具有外部涂层，所述外部涂层基本上不含组合物中存在的材料。

20. 如权利要求 18 或 19 所述的组合物，其中所述微生物为冻干制剂。

21. 如权利要求 18 或 20 所述的组合物，其中所述微生物在中链或长链脂肪酸盐涂层下具有第一涂层。

22. 如权利要求 21 所述的组合物，其中通过用蛋白质、麦芽糖糊精、海藻糖和抗坏血酸处理所述微生物的细胞悬浮液来提供所述第一涂层。

23. 如权利要求 18 到 22 中任一项所述的组合物，其为颗粒或粉末的形式。

24. 如权利要求 18 到 23 中任一项所述的组合物，其为片剂的形式。
25. 如权利要求 18 到 24 中任一项所述的组合物，其中所述中链或长链脂肪酸盐是硬脂酸镁或硬脂酸钙，所述外部涂层是藻酸钠。
26. 如权利要求 18 到 25 中任一项所述的组合物，其中所述微生物为益生菌或其混合物。
27. 如权利要求 24 所述的组合物，其中所述微生物是 *Bifidobacterium*、*Lactobacillus*、*Propionibacterium* 或 *Enterococcus*。
28. 如权利要求 27 所述的组合物，其中所述微生物选自由 *Bifidobacterium infantis*、*Bifidobacterium longum*、*Bifidobacterium animalis*、*Bifidobacterium lactis*、*Lactobacillus acidophilus*，优选地 *Lactobacillus acidophilus* CBS 116411、*Lactobacillus rhamnosus*、*Lactobacillus casei*，优选地 *Lactobacillus casei* CBS 116412、*Lactobacillus paracasei* 和 *Lactobacillus helveticus* 组成的组。
29. 如权利要求 28 所述的组合物，其中所述微生物选自由 *Lactobacillus acidophilus* CBS 116411、*Lactobacillus casei* CBS 116412 和 *Bifidobacterium animalis* 组成的组。
30. 如权利要求 18 到 29 中任一项所述的组合物，其中所述水活性范围在 0.04 和 0.3 之间。
31. 包含下述组合物的食品，所述组合物是通过权利要求 1 到 16 中任一项的方法获得的或是权利要求 18 到 30 中任一项所要求的。
32. 如权利要求 31 所述的食品，其为酸乳、酸乳酪、乳酪、乳粉、coveratures（定义为油、糖和乳蛋白（乳清）的混合物）、婴儿配方、发酵的肉产物或饮料，例如乳饮品、运动饮品、果汁、果汁饮品等。
33. 药物、营养药、营养健康成分或健康成分，其包含可通过权利要求 1 到 17 中任一项的方法获得的或如权利要求 18 到 30 中任一项所要求的组合物。

## 用于微生物的肠应用的组合物

### 发明详述

本发明涉及可用于向肠道供应微生物的组合物。制造用于营养或药物目的的、包含活的微生物的组合物时遇到若干问题。一些这类问题阐述于 WO 97/16198。特别地，旨在在肠道中发挥其活性的微生物必须被保护，免受胃液中存在的酸的影响。另外，包埋在载体或保护性基质中的微生物（其通常被冻干）易于吸湿，并且在环境储存条件下易于结块。该结块效应可例如通过流动性不足从而妨碍成为固体剂型（例如片剂）的加工，并且由于快速吸湿可能进一步对储存稳定性（在微生物存活方面）具有不良影响。粉末状产物的流动性也可被颗粒尺寸影响，因为太小的颗粒尺寸可能妨碍流动性，并从而例如导致片剂中活性的装量差异(content uniformity)问题。因此，低吸湿性和好的流动性是加工粉末状产物（特别是涉及微生物的粉末状产物）以例如制备片剂和胶囊的必需特征。

WO 97/16198 公开了胃液抗性基质中的益生菌微生物（例如 *Lactobacillus* 种）的组合物。该组合物通过将干燥的微生物与胃液抗性基质成分混合、压紧混合物并将获得的混合物干燥成颗粒而制备。任选地，对这样获得的颗粒进行进一步的干燥成颗粒步骤，以在颗粒上提供胃液抗性的涂层。

已经发现，已知的配制步骤（例如使用通过 WO 97/16198 的方法制备的颗粒）并不总是能生产出下述片剂，所述片剂显示令人满意的特性，例如片剂硬度和片剂抗弯强度，从而所述片剂在处理时不会轻易被破坏。

根据本发明发现，微生物可以被加工为下述颗粒或粉末，所述颗粒或粉末具有用于成片剂目的的优良特性，特别是吸湿性的缺乏和良好的流动性，可通过新方法从所述颗粒或粉末制备具有令人满意的操作特性的片剂，所述新方法包括：将微生物与中链或长链脂肪酸盐掺合和/或压紧以形成粉末状混合物或压紧的颗粒的第一步，和对所述粉末状混合物或压紧的

颗粒提供涂层的第二步。

因此，在一个方面，本发明涉及用于制造包含微生物的固体组合物的方法，其中在第一步中将微生物和中链或长链脂肪酸盐的混合物压紧并成颗粒；在第二步中，在所述颗粒上提供涂层。

在另一方面，本发明涉及用于制造包含微生物的固体组合物的方法，在所述方法中在第一步将微生物与中链或长链脂肪酸盐掺合，以制造粉末状混合物，而在第二步中对所述粉末状混合物颗粒提供涂层；本发明还涉及通过所述方法可获得的组合物。

在又一方面，本发明涉及含有微生物的固体组合物，所述微生物被中链或长链脂肪酸盐涂布或被包埋于其中，其中所述微生物在中链或长链脂肪酸盐涂层下任选地具有第一涂层；所述组合物具有外部涂层，所述外部涂层基本上不含存在于组合物中的材料。

涂层可以是连续的或不连续的，这取决于涂层材料的量和涂布条件。不希望受任何理论束缚的情况下，假设一些颗粒可以被部分或完全涂布，然后附聚形成更大的颗粒。附聚的颗粒随后被涂布。因此，涂布过程将固有地涉及成颗粒过程。事实上，这类成颗粒过程是需要的，因为其使得颗粒更大并促进粉末流动。

本发明的方法可以用任何微生物或其混合物来实现。本文使用的术语微生物表示微生物的任何固体形式（包括冻干制剂，其典型地包含辅助剂，例如碳水化合物和/或蛋白质）和其中微生物被基质材料（例如蛋白质、麦芽糖糊精、海藻糖和/或抗坏血酸）涂布或包埋于其中的制剂。在本发明上下文中，“微生物”是指至少一种微生物。优选地，所述微生物是作为营养补剂或药剂或食品添加物提供给肠道的微生物。更优选地，微生物是益生菌或其混合物。益生菌在本文中被定义为活的微生物菌株，其通过促进微生物平衡有利地影响人宿主细胞。优选的益生菌是 *Bifidobacterium*、*Lactobacillus*、*Propionibacterium*、*Enterococcus* 及其混合物的分离菌株。更优选的益生菌物种是 *Bifidobacterium infantis*、*Bifidobacterium longum*、*Bifidobacterium animalis*、*Bifidobacterium lactis*、*Lactobacillus acidophilus*、*Lactobacillus rhamnosus*、*Lactobacillus casei*、

*Lactobacillus paracasei*、*Lactobacillus helveticus* 及其混合物。根据一种优选的实施方案，所述微生物包含至少一种以下益生菌作为活性成分：在 CBS 以编号 CBS 116411 保藏的 *Lactobacillus acidophilus* 菌株 LAFTI® L10、在 CBS 以编录号 CBS 116412 保藏的 *Lactobacillus casei* 菌株 LAFTI® L26，和 LAFTI® B94，其是 *Bifidobacterium animalis*。根据一种优选的实施方案，益生菌至少由所述保藏菌株的生物学纯净培养物或基本上生物学纯净的培养物组成。根据一种更优选的实施方案，益生菌至少由所述保藏菌株的生物学纯净培养物或基本上生物学纯净的培养物与任何其它有价值的益生菌组合组成。根据一种进一步更优选的实施方案，益生菌选自自由 *Bifidobacterium infantis*、*Bifidobacterium longum*、*Bifidobacterium lactis*、*Bifidobacterium animalis*、*Lactobacillus acidophilus*，优选地 *Lactobacillus acidophilus* LAFTI® L10 CBS 116411、*Lactobacillus rhamnosus*、*Lactobacillus casei*，优选地 *Lactobacillus casei* LAFTI® L26 CBS 116412、*Lactobacillus paracasei* 和 *Lactobacillus helveticus* 组成的组。进一步更优选地，微生物为 *Lactobacillus acidophilus* CBS 116411 和/或 *Lactobacillus casei* CBS 116412 和/或 *Bifidobacterium animalis*。

在本发明方法的第一步中，将微生物与中链或长链（例如 C<sub>10-30</sub>）脂肪酸的无毒盐（例如硬脂酸盐或棕榈酸盐）混合，或混合并压紧。具体地，无毒盐为硬脂酸钙或硬脂酸镁。其它可以使用的无毒盐的例子为长链脂肪酸（如硬脂酸和棕榈酸）的钠、钾或锌盐。在与微生物的混合物中中链或长链脂肪酸盐的量以微生物干重为基础，适当地为约 5 重量%到约 90 重量%，优选地为约 5 wt.-%到约 80 wt.-%，更优选地为约 5 wt.-%到约 5 wt.-%，最优选地为约 5 wt.-%到约 30 wt.-%。存在食用油时，其与中链或长链脂肪酸盐的比例适当地为约 1: 10 或更低，例如以重量计约 1: 20 份。

本文使用的术语“压紧”的各种词性形式是指制备均相的、粘合的成分混合物的任何方法。压紧适当地通过将微生物与中链或长链脂肪酸盐和任选地食用油（优选中链（例如 C<sub>8-14</sub>）三酰甘油，生育酚如  $\alpha$ -生育酚，大豆油，棕榈油，葵花子油）或任何其它已知食用油或其混合物捏合在一起

形成均相糊剂来实现。对颗粒而言，糊剂被制成适当尺寸（例如约 10  $\mu\text{m}$  到约 800  $\mu\text{m}$ ）的颗粒，然后对所述颗粒进行涂布。或者，可形成微生物和中链或长链脂肪酸盐的亲密粉末状混合物，例如通过例如摇动来实现。对所述粉末状混合物（其中微生物颗粒被假设为用中链或长链脂肪酸盐盖满）进行涂布。

在本发明方法的第二步中，对颗粒状颗粒或粉末进行涂布。涂布可以通过任何涂布技术完成，一种优选方法为将涂层材料的溶液喷雾进入待涂布的粉末或颗粒的流动床上。

涂层材料适当地是能够溶解或悬浮于水中形成粘稠溶液或悬浮液的材料。碳水化合物和蛋白质适用于该目的。在本发明方法中用作涂层材料的碳水化合物的例子为多糖（例如藻酸盐、果胶、淀粉、修饰的淀粉、麦芽糖糊精、角叉藻聚糖、阿拉伯胶、瓜尔胶、黄原胶）、纤维素和纤维素衍生物（例如羟丙基甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素邻苯二甲酸酯和乙酸盐-琥珀酸盐、寡糖、二糖和单糖）。在本发明方法中用作涂层材料的蛋白质的例子是明胶、植物蛋白和乳清蛋白。优选的涂层材料为海藻酸钠，其可以作为约 0.1 到约 8 wt.-%的水性溶液使用。也可使用本领域已知的其它涂层剂，特别是已知提供抗胃液的涂层，例如纤维素衍生物，如羟丙基甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素邻苯二甲酸酯和醋酸酯-琥珀酸酯。

涂层的量优选占组合物总重的 15 wt.-%或更少，更优选约 0.1 wt.-%到约 10 wt.-%，仍然更优选约 0.1 wt.-%到约 5 wt.-%，最优选约 1 wt.-%到约 3 wt.-%。

本发明方法第一步中使用的微生物适当地为冻干制剂，其可以具有涂层，特别是抗胃液涂层。优选地，掺合或压紧步骤中使用的微生物具有涂层或被包埋在基质材料中。或者，干燥微生物的其它方法是可能的，如喷雾干燥、流动床干燥。可通过用化合物处理所述微生物的细胞悬浮液获得具有抗胃液涂层的这类冻干的微生物制剂，所述化合物至少选自由蛋白质（乳清、乳、其它）、糖（麦芽糖、海藻糖、乳糖、蔗糖）、淀粉、纤维素和任选地其它稳定剂或冷冻保护剂（如抗坏血酸）组成的组。更优选地，用蛋白质、麦芽糖糊精、海藻糖和任选地其它稳定剂或冷冻保护剂

(如抗坏血酸)处理细胞悬浮液,形成粘稠的糊剂,将其冷冻干燥。将如此获得的材料研磨为约 10  $\mu\text{m}$  到约 800  $\mu\text{m}$  的尺寸。特别地,可如 Korean 专利 KR 429494B 或 KR 429495 B (其内容通过参考并入本文)中所述获得冻干制剂。因此,在一种特别优选的实施方案中,本发明涉及含有微生物的固体组合物,所述微生物被涂布有中链或长链脂肪酸盐或被包埋在其中,其中所述微生物在中链或长链脂肪酸盐的涂层下具有第一涂层;所述组合物具有外部涂层,所述外部涂层具有基本上不存在于组合物中的材料。

根据一种优选的实施方案,涂布后存在于组合物中的残余水浓度为低于 10%。更优选地,残余的水浓度低于 5%,进一步更优选地低于 4%。优选地通过干燥失水来测量残余水浓度。优选地,该方法在 4 g 产物上在 70°C 下进行 60 分钟。根据另一优选的实施方案,涂布后组合物的水活性范围在 0.04 和 0.3 之间。更优选地,水活性在 0.04 和 0.2 范围之间,进一步更优选地在 0.04 和 0.15 之间,最优选地在 0.04 和 0.1 之间。水活性优选地在给定温度下,通过测量放置粉末的密闭容器的顶部空间中的平衡相对湿度(erh)来确定。优选的温度为 25°C。水活性表达为 erh 除以 100。

为了获得具有如此低的残余水浓度或水活性的组合物,涂布颗粒状颗粒或粉末的最终步骤是在流动床中同时进行的干燥步骤。或者,将干燥步骤作为涂布颗粒状颗粒或粉末后的一个额外步骤来进行。令人惊奇的是,我们发现具有相对低残余水浓度或水活性的组合物在储存中显示好得多的微生物存活。

本发明的组合物可用作营养药物(即具有营养价值的药物产物,或通过药物增强其营养价值的食物(in casu: 微生物)或用作营养成分,或用作健康成分,或用作食物或饮料的补剂,或用作独立作用(stand-alone)的药物。因此,在另一实施方案中,本发明涉及包含根据本发明的组合物的食物或饮料。这类食物或饮料可含有任何生理学的或可接受的赋形剂和/或稀释剂。优选的食物产物为酸乳、酸乳酪、乳酪、乳粉、coveratures(定义为油、糖和乳蛋白(乳清)的混合物)、婴儿配方、经发酵的肉制品,或饮料如乳饮品、运动饮品、果汁、果汁饮品。

根据另一实施方案，本发明的组合物是片剂、胶囊、粉末或颗粒、经口液体施用的液体制剂、栓剂、干制剂的形式。更优选地，组合物是能够在胃中存留并完整达到肠的肠溶片、胶囊、粉末或颗粒的形式。所有这些形式能够通过已知方法使用食品级的（各种药物可接受的）载体、赋形剂、溶剂或佐剂来制备。就制备药物而言，可使用如 Remington: The science and practice of pharmacy, 1995, Mack Publishing, Remington 通过引用将 Remington 一文并入本文。

因此，根据一种优选的实施方案，采用本发明的方法能制造包含微生物的固体组合物，其中与已知的包含微生物的固体组合物相比，该组合物具有经改进的流动性和/或降低的吸湿性。

通过下文给出的实施例进一步阐述本发明。在说明书和权利要求全文中，术语“Lafti® L10”是指先前在说明书中定义的 *Lactobacillus acidophilus* 的冻干细胞制剂。由甘油三酯混合物组成的中链甘油三酯(MCT)中不少于 95% 为辛酸和硅酸（见 Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2nd ed., Am. Pharm. Association, Wash., USA, 1994）。

### 实施例 1

#### （压紧/流动床涂层）

##### 步骤 1:

将硬脂酸镁(46.74 g)、 $\alpha$ -生育酚(6.46 g)和中链甘油三酯(MCT, 3.8 g)在烧杯中混合，然后用制糊机(pasta maker)(Model Atlas 150, Fabrique En Italie Par, Campodarsego, Itali)揉捏直到混合物均相为止。然后将混合物与 Lafti® L10 (CBS 116411) (323 g)混合，并用制糊机揉捏直到其均相并成片状。将片状材料通过 800-微米筛形成成颗粒的颗粒。

##### 步骤 2:

通过将 7.372 g 藻酸钠（13 %水含量；FMC Biopolymer, Philadelphia, USA）溶解于去离子水(99.5 g)中，来制备 6%的藻酸盐溶液。将涂布了硬脂酸镁的 Lafti ®L 10（如在步骤 1 中所获得的，350 g）置于流动床颗粒机 (MP-1 Multi-Processor, Aeromatic-Fielder, Bubendorf, Switzerland)上，并从

底部以每分钟约 1.6 g 的速率喷射 6% 的藻酸盐溶液(106.9 g)。最后, 将产物干燥至低于 4% 的水分含量, 得到具有以下表 1 所示颗粒尺寸分布的最终产物。

表 1: 颗粒尺寸分布

颗粒尺寸 微米	> 850	> 800	> 600	> 425	> 355	> 250	> 150	< 150
%	13.1	2.5	15.9	15.3	7.4	15.2	21.9	8.7

最终产物具有如表 2 中所示的如下组成。

表 2: 最终产物的组成

	%
Lafti® L10	83.47
硬脂酸镁	12.08
生育酚	1.67
MCT	0.98
藻酸钠	1.8

流动性: 通过记录 100 g 样品经过带有直径 11 cm 颈的漏斗所需要的时间来测定流动性。流动性为每 100 g 16 秒, 而未改变的 Lafti® 制剂不具有粉末流动性。

*Lactobacillus acidophilus* 方法的存活率在下文显示于表 3 中。将琼脂平板在缺氧条件下于 37°C 孵育至少 48 小时后, 通过计算在 Mann Ragosa Sharp (MRS) (Oxoid, UK) 琼脂上形成的 *Lactobacillus* 菌落来评估 CfU 数。

表 3: 组合物中益生菌的存活率

	cfu/g
Lafti® L10 (未改变制剂)	220 x 10 <sup>9</sup>
预期的藻酸盐/硬脂酸镁涂布的 Lafti® (预期的)	184 x 10 <sup>9</sup>

藻酸盐/硬脂酸镁涂布的 Lafti® L10 (测定的)	190 x 10 <sup>9</sup>
存活率	100 %

Cfu: 菌落形成单位

### 实施例 2

#### (片剂化)

将 2.80 g Polyplasdone XL10, (Crospovidone)和 181.96 g Avicel pH 302 (微晶纤维素)筛过 1 mm 的筛子。加入 95.24 g 根据实施例 1 获得的 Lafti® L10 制剂, 并用转鼓混合机混合 10 分钟。

将片剂混合物在单冲头压片机(Compres II)上压实为重约 1400 mg 的长方形 (oblong) 片剂(22 mm x 9 mm), 压实力为 20 kN。获得的片剂特性如下:

压碎力: 277 N (通过 Kraemer UTS 4.1 测定)

崩解时限: 7 分钟 10 秒 (根据 USP 27, 软化水)

添加计数(Added counts)/片剂 90.8 \* 10<sup>9</sup>

发现计数(Found counts) /片剂 89.6 \* 10<sup>9</sup> (保留=99%)

术语“添加计数”是指与实施例 1 的 Lafti® L10 制剂一起被添加的微生物计数 (菌落形成单位) 数量; 术语“发现计数”表示在片剂配方中发现的菌落形成单位。

### 实施例 3

#### (掺合/流动床涂层)

步骤 1:

将 Lafti®L 10 (272 g)和硬脂酸镁(48 g)置于 1 升瓶中, 并以 45 RPM 摇动 20 分钟(Turbula T2C, Willy A. Bachofen, Basel, Switzerland)。

步骤 2:

通过将 6.321 g 藻酸钠 (13%水分含量; FMC Biopolymer, Philadelphia, USA) 溶于去离子水(85.3 g)中, 来制备 6%藻酸盐溶液。将步骤 1 中获得

的产物(300 g)置于流体床颗粒机(MP-1 Multi-Processor, Aeromatic-Fielder, Bubendorf, Switzerland)中, 并从底部以每分钟 0.86 -1.6 g 的速率喷射 6% 的藻酸盐溶液(91.65 g)。最后将藻酸盐和硬脂酸镁包被的 Lafti® L10 干燥至低于 4% 的水分含量, 得到具有表 4 中所示的以下颗粒尺寸分布。

表 4: 颗粒尺寸分布

颗粒尺寸 微米	> 850	> 800	> 600	> 425	> 355	> 250	> 150	< 150
%	0.2	0.1	0.9	11.5	11.6	23.5	28.5	23.7

终产物具有如表 5 中所示的以下组成。

表 5: 获得的终产物组成

	%
Lafti ® L 10	83.47
硬脂酸镁	14.73
藻酸钠	1.8

流动性: 流动性如实施例 1 中所述测量, 为每 100 g 10 秒, 而未改变的 Lafti ® 制剂不具有粉末流动性。

*Lactobacillus acidophilus* 方法存活率在下文显示于表 6 中。

表 6: 组合物中益生菌的存活率

	cfu/g
Lafti® L 10	140 x 10 <sup>9</sup>
预期的藻酸盐/硬脂酸镁涂布的 Lafti ® L10 (预期的)	117 x 10 <sup>9</sup>
藻酸盐/硬脂酸镁涂布的 Lafti® L10 (测定的)	94 x 10 <sup>9</sup>
存活率	80 %

#### 实施例 4

#### (片剂化)

将根据实施例 3 获得的 0.98 g Polyplasdone XL10, (Crospovidone), 55.09 g Avicel PH 302 (微晶纤维素) 和 41.93 g Lafti® L 10 制剂筛过 1 mm 筛子, 并用转鼓混合机混合 10 分钟。

将片剂混合物在单冲头压片机(Comprex II)上压实为重约 1400 mg 的长方形片剂(22 mm x 9 mm), 压实力为 20 kN。

获得的片剂特性如下:

压碎力: 254.4 N (通过 Kraemer UTS 4.1 测定)

崩解时限: 52 分钟 02 秒 (根据 USP 27, 软化水)

### 实施例 5

步骤 1:

将 Lafti® L10 (272 g)和硬脂酸镁(48 g)置于 1 升瓶中, 并以 45 RPM 摇动 20 分钟(Turbula T2C, Willy A. Bachofen, Basel, Switzerland)。

步骤 2:

通过将 16.45 g 果胶 (GENU®果胶 USP/100, 8.83%水分含量, CP Kelco, Lille Skensved, Denmark) 溶解于去离子水(483.55 g)中, 来制备 3%的果胶溶液。将步骤 1 中获得的产物(360 g)置于流动床颗粒机(MP-1 Multi-Processor, Aeromatic-Fielder, Bubendorf, Switzerland)中, 并从顶部以每分钟约 1.5 g 的速率喷射 3%的果胶(216 g)。最后, 将果胶和硬脂酸镁包被的 Lafti® L10 干燥至水分含量低于 4%。产物的主要级分(301 g)位于颗粒机容器中, 但是白色材料(59 g)的较小级分残留在过滤器上。根据颜色 (硬脂酸镁: 白色; Lafti: 褐色), 滤器中的材料主要为硬脂酸镁。

组合级分的颗粒尺寸分布表示在表 7 中。

表 7: 颗粒尺寸分布

颗粒尺寸 微米	> 850	> 800	> 600	> 425	> 355	> 250	> 150	< 150
%	0.1	0	0.35	0.61	2.08	20.38	36.16	40.33

流动性：通过记录 100 g 样品经过带有直径 11 cm 颈的漏斗所需要的时间来测定流动性。流动性为每 100 g 21 秒，而未改变的 Lafti® L10 制剂不具有粉末流动性。

产物具有如表 8 中所示的以下组成。

表 8：获得的终产物的组成

	%
Lafti ® L10	83.47
硬脂酸镁	14.73
藻酸钠	1.8

去除滤器中残余的较小级分后，产物的颗粒尺寸分布显示于表 9 中。

表 9：颗粒尺寸分布

颗粒尺寸，微米	> 850	> 800	> 600	> 425	> 355	> 250	> 150	< 150
%	0.11	0	0.42	0.73	2.49	24.38	43.25	28.63

流动性：通过记录 100 g 样品经过带有直径 11 cm 颈的漏斗所需要的时间来测定流动性。流动性为每 100 g 14 秒，而未改变的 Lafti®制剂不具有粉末流动性。

### 实施例 6

#### (压缩/流动床涂层)

##### 步骤 1:

将硬脂酸钙(61.5 g)、 $\alpha$ -生育酚(8.5 g)和中链甘油三酯(MCT, 5 g)在烧杯中混合，然后用制糊机 (Model Atlas 150, Fabrique En Italie Par, Campodarsego, Itali)揉捏直到混合物均相为止。然后将混合物与 Lafti® L10 (425 g)混合并用制糊机揉捏直到其均相并成片状。用压片机将混合物压缩，将片剂压碎并通过 500-微米筛形成颗粒状的颗粒。

**步骤 2:**

通过将 33 g 藻酸钠（13 %水含量；FMC Biopolymer, Philadelphia, USA）溶解于去离子水(538.9 g)中，来制备藻酸盐溶液。将涂布了硬脂酸镁的 Lafti®L 10（如在步骤 1 中所获得的，350 g）置于流动床颗粒机(MP-1 Multi-Processor, Aeromatic-Fieldler, Bubendorf, Switzerland)中，并从底部以每分钟约 2.3 g 的速率喷射藻酸盐溶液(142.9 g)。最后，将产物干燥至低于 4%的水分含量。去除大于 850 微米的级分，所述级分占总材料的 8.1 %。表 10 显示剩余材料的颗粒尺寸分布。

表 10: 颗粒尺寸分布

颗粒尺寸 微米	> 850	> 800	> 600	> 425	> 355	> 250	> 150	< 150
%	0.1	1.1	26.3	32.5	13.2	16.8	7.2	2.9

最终产物具有如表 11 中所述的以下组成。

表 11: 获得的最终产物的组成

	%
Lafti® L10	83.3
硬脂酸镁	12.05
生育酚	1.67
MCT	0.98
藻酸钠	2.0

**流动性:** 通过记录 100 g 样品经过带有直径 11 cm 颈的漏斗所需要的时间来测定流动性。流动性为每 100 g 14 秒，而未改变的 Lafti®制剂不具有粉末流动性。

**实施例 7**

(掺合/流动床涂层)

**步骤 1:**

将 Lafti® L10 (272 g)和硬脂酸镁(48 g)置于 1 升瓶中, 并以 45 RPM 摇动 20 分钟(Turbula T2C, Willy A. Bachofen, Basel, Switzerland)。

**步骤 2:**

通过将 6.321 g 藻酸钠 (13 %水含量; FMC Biopolymer, Philadelphia, USA) 溶解于去离子水(176.9 g)中制备 3%的藻酸盐溶液。通过将 5 g 氯化钙溶解于去离子水(95 g)中制备 5%的氯化钙。将步骤 1 中获得的产物 (300 g) 置于流动床颗粒机(MP-1 Multi-Processor, Aeromatic-Fielder, Bubendorf, Switzerland)中并从顶部以约 1-3 g 每分钟的速率喷射 3%的藻酸盐溶液(180 g)和以 0.5-2 g 每分钟的速率喷射 5%的氯化钙溶液(27 g)。最后, 将用藻酸盐和硬脂酸镁包被的 Lafti® L10 干燥至低于 4%的水分含量, 得到具有表 12 所示以下颗粒尺寸分布的最终产物。

表 12: 颗粒尺寸分布

颗粒尺寸 微米	> 850	> 800	> 600	> 425	> 355	> 250	> 150	< 150
%	0	0	0.4	11.9	15.6	30.5	29.5	11.9

最终产物具有如表 13 中所示的以下大致组成。

表 13: 获得产物的组成

	%
Lafti® L 10	83.4
硬脂酸镁	14.7
藻酸钠/藻酸钙	1.84

流动性: 如实施例 1 所述测定流动性, 且流动性为每 100 g 16 秒, 而未改变的 Lafti®制剂不具有粉末流动性。

**实施例 8**

(片剂化)

将 0.98 g Polyplasdone XL10, (Crospovidone)、55.09 g Avicel pH 302 (微晶纤维素) 和 41.93 g 根据实施例 6 获得的 Lafti® L10 制剂筛过 1 mm 的筛子, 并用转鼓混合机混合 10 分钟。

将片剂混合物在单冲头压片机(Comprex II)上压实为重约 1400 mg 的长方形片剂(22 mm x 9 mm), 压实力为 20 kN。

获得的片剂特性如下:

压碎力: 254.4 N (通过 Kraemer UTS 4.1 测定)

实施例 9

这些试验的目的在于确认 Lafti 配方和中试规模的方法及其可能的的外推至生产规模。

**预先混合配方**

为了测试预先混合物对油量的敏感性, 进行三次试验, 如表 14 中所示。

表 14: 制备的三种预先混合物的组成

	A	D	F
批量	10.1Kg	9.9Kg	10.2Kg
dl- $\alpha$ 生育酚	13.1%	12.1%	13.7%
MCT	7.7%	7.1%	8.1%
硬脂酸钙	79.2%	80.8%	78.2%
壁上沉积物	无	无	无
叶轮上沉积物	无	无	无

油混合物被喷射到硬脂酸钙上, 所述硬脂酸钙在高剪切力的搅拌器中于 150 rpm 下混合。高剪切力的搅拌器在各情况下可毫无问题地被清空 (没有沉积物)。预先混合物不含块, 不需要过筛。

**粉末混合物**

粉末混合物 (lafti L10 /预先混合物) 也用表 15 所示的以下配方在高剪切力搅拌器中获得。

表 15: 从三种预先混合物获得的粉末混合物

试验	B	C	E	G
预先混合物批次	A	A	D	F
预先混合物 kg	1.237	1.237	1.236	1.238
Lafti L10 kg	7	7	7	7

然后在 Bepex 压紧器上压缩粉末混合物。

使用的压力: 5 – 20kN, 次数: 2

然后如表 16 所示将压缩的材料过筛。最后 2 组试验使用的旋转筛使得能够在少于 5 分钟内筛过 8-9Kg。

表 16: 五个试验组的过筛条件

试验	B	C	E	G
筛	振动, 500	振动, 500	旋转, 1000	旋转, 500

在流动床涂布器(Aeromatic)中对压缩的/过筛的材料涂布。使用底部喷射构型。发现 4% 的藻酸盐溶液是容易喷射的最优值。表 17 给出各试验中使用的方法特性。

表 17: 用于各试验的方法

试验	B	C	E	G
床	经压缩的 B	经压缩的 C	经压缩的 E	经压缩的 G
量	7Kg	7Kg	7Kg	7Kg
喷射的藻酸盐	3070g	3240g	3100g	3240g
喷射 T°	21 - 28°C	20 - 26°C	21 - 27°C	20 - 26°C
干燥 T°	最高 37.5°C	最高 38.2°C	最高 38.0°C	最高 39.5°C
喷射时间	155 分钟	169 分钟	151 分钟	159 分钟

干燥时间	50 分钟	91 分钟	69 分钟	81 分钟
产率	80.7%	92.6%	96.3%	89.4%

### 最终产物质量

所有的产物具有良好到非常良好的以下特征，并易于用来制造性能良好的片剂。产物密度高，这有利于包装。

获得的颗粒不是吸湿性的，可以放在开放的空气中数天而不粘合。颗粒尺寸分布良好，特别是对试验 C 而言。

成颗粒过程和成片剂过程后的存活率测量良好，与表 3 或表 6 中获得的数据相当。

表 18 给出了对五个试验中产生的产物特性的综述。

表 18: 五个试验中制备的产物特性

	B	C	E	G
水活性 (60 分钟)	0.133	0.045	0.127	0.051
水分含量 (%)				
(4g/70 <sup>0</sup> C/30 分钟)	3.65	3.08	3.42	3.07
(4g/70 <sup>0</sup> C/60 分钟)	4.12	3.51	3.89	3.49
颗粒尺寸 (%)				
>850	5.3	3.8	23.5	2.2
800-850	1.1	0.8	4	0.6
600-800	12.6	10.2	17.9	7.2
425-600	33.8	24	20.6	22.9
355-425	11.6	18.1	11.7	18.6
250-355	16.5	25.6	11.2	30.4
150-250	9.3	7.7	2	9.1
<150	1.1	1.1	0.3	0.3
片剂(20 KN)	168.3	165.4	163.3	176
堆密度(ml/g)	0.5	0.53	0.53	0.48
振实密度	0.61	0.63	0.65	0.56

---

流动性 14mm	1000	1000	1200	1000
流动性 11mm	462	429	545	500
流动性 9mm	240	240	273	250
流动性 7mm	125	128	150	136

申请人或代理人文件参考编号 24921WO	国际申请号:
-----------------------	--------

**与被保藏的微生物相关的说明**

(PCT Rule 13bis)

A. 下文说明涉及 Word 文档说明书第 3 页 20 行 (中文译文 3 页第 5 行) 提到的微生物	
<b>B. 保藏证明</b> <span style="float: right;">还有其它保藏记载于附页上 (是)</span>	
保藏单位名称 CENTRAAL BUREAU VOOR SCHIMMEL CULTURES	
保藏单位地址 (包括邮政编码和国家) Uppsalalaan 8 P.O. Box 85167 NL-3508 AD Utrecht The Netherlands	
保藏日期 2004 年 10 月 15 日	编号 CBS116411
<b>C. 其它说明 (如不适用则留空白)</b> <span style="float: right;">该信息还有附页继续说明 ( )</span>	
我方通知贵方, 根据 Rule 13bis PCT, 在国家专利授权公告公开之前, 上述微生物, 仅可由请求人指定的专家获得样品, 如果该申请被驳回、撤回或视为撤回, 这条规定将从申请日起算二十年内有效。	
<b>D. 说明适用的指定国家和地区 (如果说明不是针对所有国家和地区的话)</b>	
<b>E. 对说明的单独补充 (如不适用则留空白)</b>	
下述说明将随后提交至国际局 (指明说明的常见性质, 例如“保藏号”)	
接收局专用 (是) 该表随国际申请收到	国际局专用 ( ) 该表于下述日期被国际局收到: 
负责官员 Deleye-Milani, Mirella	负责官员 (签名)

申请人或代理人文件参考编号 24921WO	国际申请号:
-----------------------	--------

### 与被保藏的微生物相关的说明

(PCT Rule 13bis)

A. 下文说明涉及 Word 文档说明书第 3 页 21 行 (中文译文 3 页第 6 行) 提到的微生物	
<b>B. 保藏证明</b> <span style="float: right;">还有其它保藏记载于附页上 (是)</span>	
保藏单位名称 CENTRAAL BUREAU VOOR SCHIMMEL CULTURES	
保藏单位地址 (包括邮政编码和国家) Uppsalalaan 8 P.O. Box 85167 NL-3508 AD Utrecht The Netherlands	
保藏日期 2004 年 10 月 15 日	编号 CBS 116412
<b>C. 其它说明 (如不适用则留空白)</b> <span style="float: right;">该信息还有附页继续说明 ( )</span>	
我方通知贵方, 根据 Rule 13bis PCT, 在国家专利授权公告公开之前, 上述微生物, 仅可由请求人指定的专家获得样品, 如果该申请被驳回、撤回或视为撤回, 这条规定将从申请日起算二十年内有效。	
<b>D. 说明适用的指定国家和地区 (如果说明不是针对所有国家和地区的话)</b>	
<b>E. 对说明的单独补充 (如不适用则留空白)</b>	
下述说明将随后提交至国际局 (指明说明的常见性质, 例如“保藏号”)	
接收局专用 (是) 该表随国际申请收到	国际局专用 ( ) 该表于下述日期被国际局收到: 
负责官员 Deleye-Milani, Mirella	负责官员 (签名)