



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)  
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0035612

(51)<sup>7</sup> A61Q 11/00; A61P 1/02; A61K 35/747; (13) B  
A61K 8/99

(21) 1-2018-03586

(22) 18/01/2017

(86) PCT/EP2017/051003 18/01/2017

(87) WO/2017/125446 A1 27/07/2017

(30) 1600975.5 19/01/2016 GB

(45) 25/05/2023 422

(43) 25/03/2019 372A

(73) PROBI AB (SE)

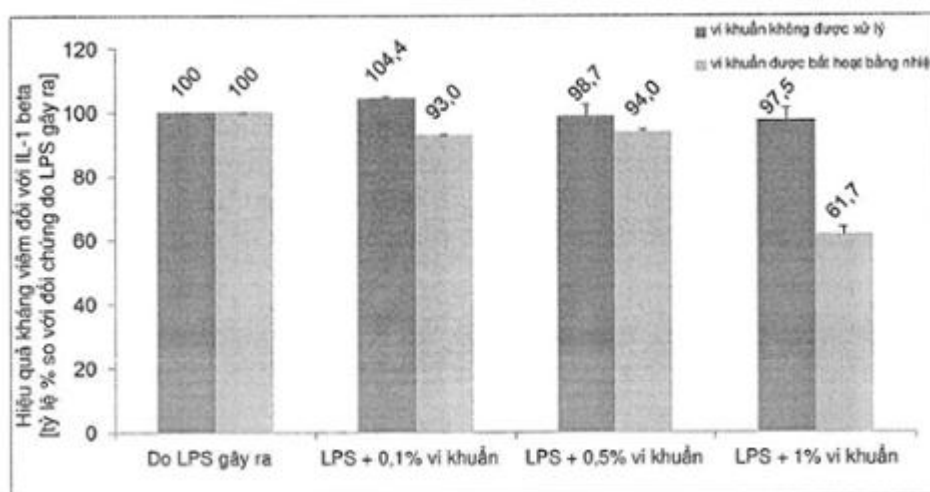
Ideongatan 1A, 223 70 Lund, Sweden

(72) FISCHER, Jörg Thilo (DE); GÖTZ, Marcus Rudolf (DE); MOLIN, Göran (SE);  
AHRNE, Siv (SE).

(74) Công ty TNHH Luật ALIAT (ALIAT LEGAL)

(54) CHẾ PHẨM ĐƯỢC PHÂN LẬP CHỨA CHỦNG VI KHUẨN *LACTOBACILLUS PLANTARUM* GOS 42 (DSM 32131) VÀ CHẾ PHẨM CHỨA CHỦNG VI KHUẨN NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm được phân lập chứa chủng vi khuẩn *Lactobacillus Plantarum* GOS 42 (DSM 32131) được sử dụng trong y học dùng để điều trị và/hoặc phòng ngừa bệnh viêm, hoặc để làm giảm và/hoặc ức chế sự giải phóng một hoặc nhiều yếu tố viêm được chọn từ nhóm bao gồm intolơkin 1 (interleukin 1: IL-1), intolơkin 6 (interleukin 6: IL-6), intolơkin 8 (interleukin 8: IL-8), yếu tố hoại tử khối u (tumor necrosis factor: TNF), prostaglandin E2 (prostaglandin E2: PGE2), isoprostan, metalopeptidaza cơ chất 9 (matrix metallopeptidase 9: MMP9) và NF-κB.



### **Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập**

Sáng chế đề cập đến chủng vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* Gos 42 (DSM 32131), và chế phẩm chứa vi khuẩn này dùng làm vi khuẩn có lợi. Chủng vi khuẩn này có ứng dụng cụ thể trong y học, đặc biệt là để điều trị và/hoặc phòng ngừa bệnh viêm. Chủng vi khuẩn nêu trên và chế phẩm chứa vi khuẩn này có tính hữu dụng cụ thể trong việc điều trị và/hoặc phòng ngừa bệnh viêm trong khoang miệng, tốt hơn là để điều trị và/hoặc phòng ngừa bệnh viêm lợi và/hoặc viêm nha chu.

Cụ thể, chủng vi khuẩn nêu trên và chế phẩm chứa vi khuẩn này có thể được sử dụng làm chất kháng viêm để làm giảm hoặc ức chế sự giải phóng một hoặc nhiều yếu tố viêm được chọn từ nhóm bao gồm intolokin 1 (interleukin 1: IL-1), intolokin 6 (interleukin 6: IL-6), intolokin 8 (interleukin 8: IL-8), yếu tố hoại tử khối u (tumor necrosis factor: TNF), prostaglandin E2 (prostaglandin E2: PGE2), isoprostan, metalopeptidaza cơ chất 9 (matrix metallopeptidase 9: MMP9) và NF-κB.

Tốt hơn, nếu chủng vi khuẩn theo sáng chế là vi khuẩn có lợi, tức là vi sinh vật mang lại lợi ích khi được phát triển trong vi môi trường cụ thể, ví dụ, bằng cách ức chế hoặc ngăn ngừa sự phát triển của các sinh vật khác trong chính vi môi trường này. Ví dụ về các vi sinh vật là vi khuẩn có lợi bao gồm *Lactobacilli*, vi khuẩn này có thể khu trú ở đường dạ dày ruột, ít nhất là tạm thời, để thay thế hoặc tiêu diệt các sinh vật gây bệnh, cũng như mang lại các lợi ích khác cho vật chủ.

### **Tình trạng kỹ thuật của sáng chế**

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “vi khuẩn có lợi” để chỉ các vi sinh vật tạo ra ít nhất một phần hệ thực vật chuyển tiếp hoặc nội sinh và nhờ đó có hiệu quả phòng và/hoặc điều trị bệnh có lợi trên sinh vật chủ. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này thường đã biết là các vi khuẩn có lợi an toàn về mặt lâm sàng

(nghĩa là không gây bệnh). Ví dụ nhưng không làm giới hạn cơ chế cụ thể bất kỳ, hiệu quả phòng và/hoặc điều trị bệnh của vi khuẩn sản sinh ra axit của sáng chế một phần là do tác dụng ức chế cạnh tranh sự phát triển của các tác nhân gây bệnh do: (i) khả năng khu trú rất tốt của chúng; (ii) hiện tượng ký sinh của các vi sinh vật không mong muốn; (iii) sự sản sinh ra axit (ví dụ, axit lactic, axit axetic, và các hợp chất có tính axit khác) và/hoặc các sản phẩm ngoại bào khác có hoạt tính kháng vi sinh vật; và (iv) tổ hợp khác nhau của các yếu tố này. Cần lưu ý rằng các sản phẩm nêu trên và hoạt tính của vi khuẩn sản sinh ra axit theo sáng chế có tác dụng hiệp đồng để tạo ra hiệu quả của vi khuẩn có lợi được bộc lộ ở đây.

Thuật ngữ chế phẩm tinh chế hoặc phân lập được chứa chủng vi khuẩn có nghĩa là chế phẩm này không chứa các loài hoặc chủng vi khuẩn khác với lượng đủ để cản trở sự sao chép của chế phẩm ở nhiệt độ cụ thể. Chế phẩm tinh chế hoặc phân lập được chứa chủng vi khuẩn được điều chế bằng cách sử dụng các phương pháp tiêu chuẩn, ví dụ, mạ với việc chọn mức độ pha loãng và nhiệt độ giới hạn.

Bệnh viêm lợi chủ yếu do sự tạo thành cao răng gây ra. Sự khu trú vi khuẩn tạo thành màng sinh học trên bề mặt của răng do sự có mặt của thức ăn còn sót lại cũng như các thành phần của nước bọt. Nếu không được làm sạch thích đáng ở giai đoạn sớm, lớp màng bám trên bề mặt răng gây ra sự lắng đọng của vôi răng rất khó loại bỏ. Sự có mặt của số lượng vi khuẩn ở bờ lợi tăng lên dẫn đến hiện tượng viêm lợi, được gọi là bệnh viêm lợi. Ở các đối tượng miễn cảm, bệnh viêm lợi có thể tiến triển thành bệnh viêm nha chu, bệnh này có thể gây rụng răng. Cụ thể, lipopolysaccharit (lipopolysaccharide: LPS) có mặt trong vi khuẩn Gram âm có thể gây ra sự đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu bởi các đại thực bào được kích thích bởi LPS, quá trình này giải phóng prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) và các chất trung gian tiền viêm như interleukin và TNF- $\alpha$  trong mô bị bệnh. Các chất trung gian tiền viêm gây ra sự giải phóng các chất PGE<sub>2</sub> khác và metalloproteinaza cơ chất (matrix metalloproteinase: MMP) từ nguyên bào sợi khu trú, thành phần này phá hủy khuôn gian bào của mô xung quanh. Điều này cho phép vi khuẩn xâm nhập sâu hơn vào mô và kích thích quá trình viêm không phụ thuộc vào lớp ngoài của biểu mô và chân răng gây ra sự hình thành túi nha chu.

Khi vi khuẩn tiếp tục xâm nhập vào xương ổ răng có tác dụng đỡ răng, răng trở nên không ổn định và bị rụng, nếu không được điều trị.

Để tránh sự phá hủy lợi răng tiến triển, cần ngăn chặn các đáp ứng viêm trong khoang miệng ở giai đoạn đầu hoặc tốt hơn là phòng ngừa chúng.

Có nhiều phương pháp khác nhau để giải quyết vấn đề này, từ phương pháp cải tiến để loại bỏ mảng bám về mặt cơ học đến phương pháp sử dụng các sản phẩm chăm sóc răng có đặc tính kháng khuẩn mạnh.

Tuy nhiên, không phải tất cả các vi khuẩn có mặt trong khoang miệng đều liên quan đến bệnh và nhiều vi khuẩn thậm chí còn có tác dụng thúc đẩy sức khỏe của răng miệng. Do đó, tốt hơn nếu thiết lập sự cân bằng đối với thành phần có lợi cho sức khỏe của khu hệ vi sinh vật trong miệng thay vì trừ tận gốc các vi khuẩn khu trú không đặc hiệu.

Khu hệ vi sinh vật trong miệng bình thường rất phức tạp và bao gồm hơn 700 loài vi khuẩn cũng như vi khuẩn cổ, nấm, động vật nguyên sinh và virus. Các vật hội sinh dưới lợi như *lactobacilli* và *bifidobacteria* đã được chứng minh là có tác dụng có lợi đối với sức khỏe của ruột, bao gồm cả một số đặc tính kháng viêm, khi được sử dụng làm vi khuẩn có lợi.

Tác dụng có lợi của vi khuẩn trong khoang miệng đã được nghiên cứu nhưng kết quả thu được thay đổi rõ rệt với các loài được sử dụng và khó thiết lập các thông số thích hợp cho ứng dụng hữu hiệu do tác dụng này chỉ dựa trên hiệu quả không liên quan đáng kể.

Trong số các tác dụng của vi khuẩn có lợi: tác dụng kháng khuẩn phổ biến đối với các loài liên quan đến bệnh, tác dụng làm giảm hoặc ngăn ngừa sự bám dính của vi khuẩn với bề mặt răng cũng như tác dụng kháng viêm đã được bàn luận trong các tài liệu chuyên ngành.

Tuy nhiên, vẫn chưa biết rõ về tác dụng của các chủng vi khuẩn có lợi cụ thể đối với cơ chế viêm, cụ thể là đối với tác dụng ức chế các chất trung gian gây viêm khác nhau. Đáng chú ý là đã phát hiện được trong các nghiên cứu trên phạm vi rộng để tìm ra sáng chế rằng một số chủng trong số các vi khuẩn có lợi đã được thừa nhận nói

chung cũng có thể làm gia tăng mức độ giải phóng của yếu tố tiền viêm với liều dùng nhất định. Do đó, vẫn có nhu cầu chưa được đáp ứng về các chủng mới có hiệu quả mong muốn đối với các chất trung gian tiền viêm và kháng viêm của bệnh viêm.

### **Bản chất kỹ thuật của sáng chế**

Mục đích của sáng chế là tìm ra chủng vi khuẩn mới và chế phẩm chứa vi khuẩn này có thể được sử dụng trong y học, đặc biệt là để điều trị và/hoặc phòng ngừa bệnh viêm, như trong khoang miệng, cụ thể là để điều trị và/hoặc phòng ngừa bệnh viêm lợi và/hoặc viêm nha chu.

Mục đích khác của sáng chế là tìm ra chủng vi khuẩn mới và chế phẩm chứa vi khuẩn này có khả năng làm giảm hoặc ức chế sự giải phóng một hoặc nhiều yếu tố viêm như intolokin 1 (IL-1), intolokin 6 (IL-6), intolokin 8 (IL-8), yếu tố hoại tử khối u (TNF), prostaglandin E2 (PGE2), isoprostan, metalopeptidaza cơ chất 9 (MMP9) và NF-κB.

Mục đích của sáng chế đạt được bằng cách đề xuất chủng vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* GOS 42, đã được lưu giữ bởi Công ty Probi AB, Sölvegatan 41, 22370 Lund, Thụy Điển tại Viện Leibniz DSMZ-Đức, Bảo tàng vi sinh vật và nuôi cấy tế bào (Collection of Microorganisms and Cell Cultures), Inhoffenstr. 7 B, D-38124 Braunschweig, theo quy định của Hiệp ước Budapest ngày 2 tháng 9 năm 2015 và đã nhận được số hiệu lưu giữ là DSM 32131 và chế phẩm chứa vi khuẩn này.

Chủng vi khuẩn theo sáng chế được phân lập từ nước bọt của những người tình nguyện khỏe mạnh và được chọn trong số hơn 50 chủng vi khuẩn có lợi ứng viên bao gồm các chủng *Bacillus subtilis*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus LAFTI*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus cellobiosus*, *Lactobacillus salivarius*, *Streptococcus thermophilus* và *Lactococcus lactis*.

### Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện hiệu quả kháng viêm của vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* GOS 42 (DSM 32131) trong bạch cầu đơn nhân to sơ cấp của người đối với intolokin 1 beta (Fig.1A), intolokin 6 (Fig.1B), intolokin 8 (Fig.1C), prostaglandin E2 (Fig.1D), yếu tố hoại tử khối u alpha (Fig.1E) và isoprostan (Fig.1F). Cột bên trái thể hiện các tế bào không được xử lý, cột bên phải thể hiện các tế bào đã bị giảm độc tính.

Fig.2 thể hiện hiệu quả kháng viêm của vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* GOS 42 (DSM 32131) ở dạng đã bị giảm độc tính đối với intolokin trong nguyên bào sợi lợi của người. Cột bên trái thể hiện kết quả đối với intolokin 6, cột bên phải thể hiện kết quả đối với intolokin 8.

### Mô tả chi tiết sáng chế

Bằng cách sàng lọc trên phạm vi rộng, chủng vi khuẩn theo sáng chế đã được xác định là có hoạt tính điều biến khác biệt, chủ yếu theo cách ức chế mức độ giải phóng một số yếu tố tiền viêm trong khi đồng thời không làm tăng hoặc chỉ làm tăng không đáng kể mức độ giải phóng các yếu tố tiền viêm khác. Sáng chế cho phép việc sử dụng chủng vi khuẩn có lợi được tối ưu hóa để phòng và/hoặc điều trị các bệnh viêm, đặc biệt là các bệnh xuất hiện trong khoang miệng, mà trước đây không thể thực hiện.

Như đã giải thích trên đây, sự khu trú của các vi khuẩn liên quan đến bệnh trong niêm mạc miệng và sự tạo thành mảng bám có thể gây ra sự mất cân bằng vi sinh vật trong khoang miệng theo hướng tích tụ các vi sinh vật có hại, quá trình này còn được gọi là sự mất cân bằng sinh học. Do đó, vi sinh vật dùng để phòng và/hoặc điều trị bệnh viêm trong khoang miệng theo sáng chế bao gồm việc sử dụng để phòng và/hoặc điều trị các bệnh liên quan đến một hoặc nhiều mảng bám và có lợi nếu giúp tránh được sự mất cân bằng sinh học bằng cách làm cân bằng hệ thực vật ở miệng theo hướng có trạng thái khỏe mạnh.

Theo phương án được ưu tiên của sáng chế, vi sinh vật đã mô tả trên đây đã bị giảm độc tính hoặc đã chết, tốt hơn là được làm bất hoạt bằng nhiệt, lý tưởng là bằng cách ủ trong thời gian từ 2 đến 8 phút ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 70 đến 100°C.

Trong các nghiên cứu được mô tả dưới đây, đã chứng minh được rằng vi sinh vật theo sáng chế có thể tạo ra tác dụng ức chế sự giải phóng yếu tố tiền viêm ngay cả khi ở trạng thái bất hoạt. Do đó, có thể sử dụng chủng mới khi chủng này đã chết hoặc được làm bất hoạt bằng nhiệt. Đáng chú ý là các chủng được bất hoạt bằng nhiệt có thể có hoạt tính kháng viêm tương đương hoặc thậm chí tăng lên một chút đối với một số yếu tố.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến vi sinh vật đã nêu trên đây dùng làm chất kháng viêm, đặc biệt là để làm giảm hoặc ức chế sự giải phóng một hoặc nhiều yếu tố viêm được chọn từ nhóm bao gồm intolokin 1 (IL-1), intolokin 6 (IL-6), intolokin 8 (IL-8), yếu tố hoại tử khối u (TNF), prostaglandin E2 (PGE2), isoprostan, metallopeptidaza cơ chất 9 (MMP9) và NF- $\kappa$ B.

Theo khía cạnh khác của sáng chế, các mảnh của chủng vi sinh vật mới như được xác định theo khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh đã mô tả trên đây có thể được sử dụng để điều trị và/hoặc phòng ngừa bệnh viêm, đặc biệt là trong khoang miệng, và tốt hơn là để điều trị và/hoặc phòng ngừa bệnh viêm lợi và/hoặc viêm nha chu.

Có thể không nhất thiết phải sử dụng toàn bộ các tế bào của chủng mới theo sáng chế do hỗn hợp chỉ gồm các mảnh (ví dụ, mảnh vụn của các tế bào bị phân hủy) của các vi sinh vật là đủ để tạo ra hiệu quả của sáng chế.

Theo khía cạnh khác, sáng chế còn đề cập đến được phẩm chứa chủng vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* GOS 42 hoặc các mảnh của nó và chất mang, tá dược và/hoặc chất pha loãng được dụng. Tốt hơn, nếu tổng lượng vi sinh vật hoặc các mảnh của nó đủ để điều trị và/hoặc phòng ngừa bệnh viêm, đặc biệt là trong khoang miệng, tốt hơn là để điều trị và/hoặc phòng ngừa bệnh viêm lợi và/hoặc viêm nha chu. Tốt hơn, nếu tổng lượng vi sinh vật hoặc các mảnh của nó nằm trong khoảng từ 0,01 đến 100%, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,1 đến 50%, tốt nhất là nằm trong khoảng từ 1 đến 10%, trong mỗi trường hợp đều được tính so với tổng trọng lượng của chế phẩm, và/hoặc trong đó tổng lượng của (các) vi sinh vật hoặc các mảnh của nó nằm trong khoảng từ  $1 \times 10^3$  đến  $1 \times 10^{11}$  đơn vị tạo khuẩn lạc (colony forming unit: CFU),

tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ  $1 \times 10^5$  đến  $1 \times 10^{10}$  CFU, và lý tưởng là nằm trong khoảng từ  $1 \times 10^8$  đến  $1 \times 10^9$  CFU.

Theo phương án được ưu tiên, vi sinh vật (vi khuẩn) theo sáng chế có mặt trong chế phẩm với nồng độ nằm trong khoảng từ  $1 \times 10^3$  đến  $1 \times 10^{14}$  đơn vị tạo khuẩn lạc (CFU), tốt hơn là nằm trong khoảng từ  $1 \times 10^5$  đến  $1 \times 10^{12}$  CFU/gam, trong khi theo các phương án khác, nồng độ nằm trong khoảng từ  $1 \times 10^9$  đến  $1 \times 10^{13}$  CFU/gam, nằm trong khoảng từ  $1 \times 10^5$  đến  $1 \times 10^7$  CFU/gam, hoặc nằm trong khoảng từ  $1 \times 10^8$  đến  $1 \times 10^9$  CFU/gam. Tuy nhiên, cần hiểu rằng tổng lượng CFU chứ không phải nồng độ là yếu tố quan trọng nhất.

Theo một phương án, vi khuẩn theo sáng chế có mặt trong chất mang được dụng hoặc sản phẩm thực phẩm thích hợp để sử dụng qua đường miệng cho động vật có vú, tốt hơn là dưới dạng thực phẩm bổ sung dạng bột, sản phẩm dạng viên, hoặc sản phẩm dạng lỏng. Tốt hơn, nếu động vật có vú là người.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng sinh vật là vi khuẩn có lợi được sử dụng trong chế phẩm hoặc sản phẩm theo sáng chế là chất sinh học mà hoạt tính của nó có thể thay đổi theo mẻ và cũng phụ thuộc vào phương pháp sản xuất hoặc xử lý. Do đó lượng thích hợp có thể được điều chỉnh tương ứng trong khoảng cho trước.

Ngoài ra, sáng chế đề cập đến chế phẩm hoặc sản phẩm như đã mô tả trên đây để sử dụng trong y học, tốt hơn là để điều trị và/hoặc phòng ngừa bệnh viêm, đặc biệt là trong khoang miệng, và tốt nhất là để sử dụng trong việc điều trị và/hoặc phòng ngừa bệnh viêm lợi và/hoặc viêm nha chu.

Chế phẩm theo sáng chế có thể còn chứa một hoặc nhiều thành phần được chọn từ nhóm bao gồm chất mang, tá dược hoặc các hoạt chất khác, ví dụ như các chất có hoạt tính từ nhóm bao gồm các chất chống viêm không steroid, chất kháng sinh, steroid, các kháng thể kháng TNF-alpha hoặc các tác nhân và/hoặc chất có hoạt tính được tạo ra bằng công nghệ sinh học khác cũng như các chất giảm đau, dexpanthenol, prednisolon, polyvidon iodua, clorhexidin-bis-D-gluconat, hexetidin, benzydamin HCl, lidocain, benzocain, ete macrogol lauryl, benzocain kết hợp với xetidyl pyridini clorua hoặc ete macrogol lauryl kết hợp với sản phẩm thẩm tách máu không chứa

protein từ máu bê cũng như, ví dụ, các chất độn (ví dụ, xenluloza, canxi cacbonat), chất dẻo hóa hoặc chất cải thiện độ chảy (ví dụ, bột talc, magie stearat), các lớp phủ (ví dụ, polyvinyl axetat phtalat, hydroxyl propyl metyl xenluloza phtalat), các chất gây rã (ví dụ, tinh bột, polyvinyl pyrrolidon liên kết ngang), chất làm mềm (ví dụ, trietyl xitrat, dibutyl phthalat), các chất dùng để tạo hạt (lactoza, gelatin), chất làm chậm (ví dụ, sản phẩm copolyme hóa este metyl/etyl/2-trimetyl aminometyl của axit poly(met)acrylic trong hệ phân tán, sản phẩm copolyme hóa vinyl axetat/axit crotonic), chất dùng để ép (ví dụ, xenluloza vi tinh thể, lactoza), các dung môi, chất tạo huyền phù hoặc chất phân tán (ví dụ, nước, etanol), chất nhũ hóa (ví dụ, rượu xetylic, lexitin), các chất làm thay đổi tính lưu biến (silic oxit, natri alginat), các chất để làm ổn định vi sinh vật (ví dụ, benzalkoni clorua, kali sorbat), các chất bảo quản và chất chống oxy hóa (ví dụ, DL-alpha-tocopherol, axit ascorbic), các chất làm thay đổi độ pH (axit lactic, axit xitric), các chất thổi hoặc khí trợ (ví dụ, các hydrocacbon flo hóa và clo hóa, cacbon dioxit), các thuốc nhuộm (sắt oxit, titan oxit), các thành phần nền dùng cho pomat (ví dụ, parafin, sáp ong) và các chất khác như được mô tả trong tài liệu chuyên ngành (ví dụ, trong tài liệu: Schmidt, Christin. Wirk- und Hilfsstoffe für Rezeptur, Defektur und Großherstellung. 1999; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart oder Bauer, Frömming Führer. Lehrbuch der Pharmazeutischen Technologie. 8. Auflage, 2006. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart).

Chế phẩm hoặc sản phẩm theo sáng chế cũng có thể được phủ hoặc bao nang.

Việc bao nang chế phẩm theo sáng chế có thể có lợi thế là cho phép giải phóng có kiểm soát, ví dụ, khi tiếp xúc với nước, hoặc giải phóng liên tục trong khoảng thời gian kéo dài. Ngoài ra, chế phẩm này có thể được bảo vệ khỏi sự thoái biến để cải thiện thời hạn sử dụng của sản phẩm. Các phương pháp bao nang hoạt chất là đã được biết rõ trong lĩnh vực này và nhiều chất bao nang cũng như phương pháp sử dụng chúng cho chế phẩm theo các yêu cầu cụ thể là đã biết.

Hơn nữa, chế phẩm hoặc sản phẩm theo sáng chế có thể ở dạng dung dịch, huyền phù, nhũ tương, viên nén, hạt, bột hoặc viên nang.

Chế phẩm hoặc sản phẩm này theo sáng chế có thể được chọn từ nhóm bao gồm kem đánh răng, gel dùng để đánh răng, bột dùng để đánh răng, chất lỏng dùng để làm sạch răng, bột dùng để làm sạch răng, nước súc miệng, nước xịt thơm miệng, chỉ nha khoa, kẹo cao su và viên ngậm hình thoi.

Các chế phẩm hoặc sản phẩm này có thể chứa hệ mài mòn (các thành phần mài mòn và/hoặc mài nhẵn) như các hợp chất silicat, canxi cacbonat, canxi phosphat, nhôm oxit và/hoặc hydroxyl apatit, các chất hoạt động bề mặt, ví dụ như natri lauryl sulfat, natri lauryl sarcosinat và/hoặc cocamidopropyl betain, các chất làm ẩm như glyxerol và/hoặc sorbitol, các chất làm đặc, ví dụ, cacboxy metyl xenluloza, polyetylen glycol, caragenan và/hoặc Laponite®, các chất làm ngọt như sacarin, các chất điều chỉnh mùi thơm và vị để che cảm giác về vị khó chịu, chất cải biến vị (ví dụ, inositol phosphat, các nucleotit, ví dụ, guanosin monophosphat, adenosin monophosphat hoặc các chất khác, ví dụ, natri glutamat hoặc axit 2-phenoxy propionic), các chất làm mát như các dẫn xuất menthol (ví dụ, L-menthyl lactat, L-menthyl alkyl cacbonat, menthon ketal), icilin và các dẫn xuất icilin, các chất ổn định và các chất có hoạt tính như natri florua, natri monoflo phosphat, thiếc diflorua, amoni florua bậc bốn, kẽm xitrat, kẽm sulfat, thiếc pyrophotphat, thiếc diclorua, hỗn hợp của các hợp chất pyrophotphat khác nhau, triclosan, xetyl pyridini clorua, nhôm lactat, kali xitrat, kali nitrat, kali clorua, stronti clorua, hydro peroxit, các chất thơm, natri bicarbonat và/hoặc chất điều chỉnh mùi.

Kẹo cao su hoặc kẹo cao su chăm sóc răng có thể bao gồm nền kẹo cao su chứa thể đàn hồi, ví dụ, polyvinyl axetat (polyvinyl acetate: PVA), polyetylen, polyiso butan (polyiso butane: PIB) (phân tử thấp hoặc trung bình), polybutadien, copolyme isobuten/isopren, ete polyvinyl etyl (polyvinyl ethyl ether: PVE), ete polyvinyl butyl, các copolyme của este vinyl và ete vinyl, copolyme styren/butadien (SBR) hoặc thể đàn hồi vinyl, ví dụ, trên cơ sở vinyl axetat/vinyl laurat, vinyl axetat/vinyl stearat hoặc etylen/vinyl axetat và hỗn hợp của các thể đàn hồi nêu trên, ví dụ như được mô tả trong các patent EP 0 242 325, US 4,518,615, US 5,093,136, US 5,266,336, US 5,601,858 hoặc US 6,986,709. Ngoài ra, nền của kẹo cao su có thể chứa các thành phần khác, ví dụ, các chất độn (vô cơ), ví dụ, canxi cacbonat, titan dioxit, silic dioxit,

bột talc, nhôm oxit, dicanxi phosphat, tricanxi phosphat, magie hydroxit và các hỗn hợp của chúng, các chất dẻo hóa (ví dụ, lanolin, axit stearic, natri stearat, etyl axetat, diaxetin (glyxerol diaxetat), triaxetin (glyxerol triaxetat) và trietyl xitrat), các chất nhũ hóa (ví dụ, các hợp chất phosphatit như lexitin và các hợp chất mono và diglyxerit của axit béo, ví dụ, glyxerol monostearat), các chất chống oxy hóa, các sáp (ví dụ, sáp parafin, sáp candelila, sáp carnauba, sáp vi tinh thể và sáp polyetylen), các chất béo và dầu béo (ví dụ, các mỡ thực vật hoặc mỡ động vật hóa rắn (hydro hóa)) và các hợp chất mono, di hoặc triglyxerit.

### Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ sau đây được đưa ra để minh họa sáng chế mà không dự định giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ 1: tiến hành nuôi cấy và xử lý các chủng vi khuẩn có lợi

Chủng vi khuẩn theo sáng chế được chọn trong số hơn 50 chủng vi khuẩn có lợi ứng viên của *Bacillus subtilis*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus LAFTI*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus cellobiosus*, *Lactobacillus salivarius*, *Streptococcus thermophilus* và *Lactococcus lactis*.

Để xác định các điều kiện sinh trưởng sinh trưởng và thời điểm thu hoạch tối ưu và xác định số lượng đơn vị tạo khuẩn lạc (CFU) đối với vi khuẩn có lợi cần được sàng lọc, trước tiên giai đoạn pha logarit và kết thúc pha sinh trưởng được xác định.

### Sự phát triển của vi khuẩn

Nguyên liệu gốc là vi khuẩn có lợi đã đông lạnh (ở nhiệt độ -80°C) được rã đông qua đêm ở nhiệt độ 4°C và 6ml dung dịch NaCl 9% vô khuẩn được cho vào 1,2ml vi khuẩn vào sáng hôm sau. Các mẫu được ly tâm (5 phút, 5000 vòng/phút), dịch nổi bề mặt được loại bỏ, các viên vón được rửa bằng 8ml NaCl 9% và được ly

tâm lại trong 5 phút ở tốc độ 5000 vòng/phút. Sau đó, viên vón được tái tạo huyền phù trong 1,2ml NaCl 9% và cho 1ml mẫu vào 50ml môi trường ươm ở nhiệt độ 37°C (MRS Bouillon, Carl Roth KG, Karlsruhe) và ủ ở nhiệt độ 37°C. Quá trình ủ được thực hiện trong ống polypropylen vô khuẩn có dung tích 50ml (Greiner) và các đầu dò được thu hoạch ở các thời điểm khác nhau để đánh giá đường cong sinh trưởng.

#### *Xác định mật độ quang OD*

Để xác định OD, 500µl huyền phù vi khuẩn được lấy ra và pha loãng trong 1ml môi trường MRS Bouillon trong chậu PS-1,5ml (Brand). Việc xác định OD được thực hiện ở bước sóng 600nm (ThermoScientific, Helios Epsilon), 1,5ml môi trường MRS Bouillon được sử dụng làm đối chứng trắng.

#### *Xác định CFU*

Để xác định CFU, các vi khuẩn được pha loãng (theo tỷ lệ 1:10.000.000, 1:50.000.000 và 1:100.000.000), được dàn mỏng trên các đĩa thạch-MRS (MRS Agar, X924, Carl Roth) và được ủ trong 2 ngày ở nhiệt độ 37°C. Sau đó, các khuẩn lạc đã phát triển được đếm và tính CFU.

Các vi khuẩn đạt đến pha logarit ngay từ khi bắt đầu cho đến thời điểm từ 7 đến 8 giờ khi chúng bắt đầu đạt đến pha ổn định. Lượng vi khuẩn cần được cấy vào không làm thay đổi hình dạng của đường cong. 5 giờ được chọn làm thời điểm mà khi đó pha sinh trưởng dốc nhất để thu hoạch vi khuẩn trong pha logarit và 7 giờ là thời điểm để thu hoạch chúng khi kết thúc pha logarit.

Ví dụ 2: tiến hành kích thích bạch cầu đơn nhân to của người bằng vi khuẩn có lợi

Việc kích thích môi trường nuôi cấy tế bào bạch cầu đơn nhân to bằng chủng vi khuẩn có lợi mới được thực hiện bằng cách sử dụng các chủng thu được dưới dạng bột. Trước tiên, một vài dạng sử dụng như sử dụng vi khuẩn đã sinh trưởng (được chọn từ pha logarit), dịch nổi bề mặt của môi trường nuôi cấy vi khuẩn đã phát triển, sử dụng trực tiếp bột đã hòa tan và dịch nổi bề mặt dạng bột được thử nghiệm. Theo các kết quả thu được, khi kết thúc pha logarit, vi khuẩn được thử nghiệm với hai mẻ chủng vi khuẩn đông lạnh. Thay vì sử dụng các dịch nổi bề mặt, tiến hành làm bất

hoạt hai chủng vi khuẩn này bằng nhiệt và so sánh vi khuẩn được làm bất hoạt với vi khuẩn được hoạt hóa.

*Xác định nồng độ xytokin; MMP-9 và PGE2 trong bạch cầu đơn nhân to sơ cấp của người*

Bạch cầu đơn nhân to sơ cấp của người được phân lập từ lớp đệm của máu được lấy từ người cho khỏe mạnh. Các tế bào được cấy vào đĩa có 24 lỗ để tiến hành thử nghiệm ELISA. Các tế bào được ủ với LPS trong 24 giờ. Các vi khuẩn có lợi (5 liều) được cho thêm trong 30 phút trước khi xử lý bằng LPS. Sau 24 giờ, dịch nổi bề mặt được lấy ra, ly tâm và đánh giá về nồng độ IL-1beta, TNFalpha, IL-6, IL-8, MMP-9, isoprostan-8 and PGE<sub>2</sub> trong EIA (PGE<sub>2</sub>, sản phẩm của AssayDesign, isoprostan, sản phẩm của Cayman) hoặc ELISA (tất cả các xytokin, sản phẩm của Immunotools, MMP-9, GE Healthcare) bằng cách sử dụng quy trình của nhà sản xuất. Mỗi liều dùng được đánh giá 2 đến 3 lần trong hai lớp đệm được lấy từ hai người cho khác nhau.

Trước tiên, các loại khác nhau của chế phẩm dạng bột đông khô chứa vi khuẩn có lợi dùng để kích thích bạch cầu đơn nhân to của người được thử nghiệm.

Các vi khuẩn có lợi được thu hoạch và sau đó được ly tâm. Các tế bào được hòa tan trong môi trường mới và được phủ lên bạch cầu đơn nhân to của người.

Sau đó, các bạch cầu đơn nhân to được ủ với các vi khuẩn có lợi trong 30 phút, tiếp đó, LPS được cho thêm vào và sau 24 giờ, dịch nổi bề mặt được lấy ra và sử dụng để xác định các thông số viêm.

Ví dụ 3: thử nghiệm với các chủng vi khuẩn được bất hoạt bằng nhiệt

*Tiến hành bất hoạt bằng nhiệt*

Việc làm bất hoạt bằng nhiệt được thực hiện theo hai mẻ. Khi kết thúc pha sinh trưởng logarit của vi khuẩn, phần phân ước của huyền phù vi khuẩn được lấy ra, cho vào ống mới có dung tích 50ml và được ủ trong 5 phút ở nhiệt độ 80°C trong bể nước. Vi khuẩn được làm bất hoạt trong 5 phút ở nhiệt độ 80°C và do đó sự phát triển của chúng bị ngừng lại.

Tiến hành thử nghiệm với các mẻ của chủng vi khuẩn được làm bất hoạt bằng nhiệt, đã phát hiện được rằng hiệu quả gia tăng đối với IL-1 và TNF không bị ảnh

hưởng bởi việc xử lý nhiệt. Hơn nữa, việc hoạt hóa bằng nhiệt không làm ảnh hưởng hoặc chỉ ảnh hưởng rất nhỏ đến mức độ ức chế PGE2 bởi cả hai chủng này.

Ví dụ 4: Sàng lọc các vi khuẩn có lợi đối với bạch cầu đơn nhân to của người và hiệu quả đối với mức độ hoạt hóa NF-kappaB

Các chủng vi khuẩn có lợi khác nhau được sàng lọc về dạng được hoạt hóa và dạng đã bị giảm độc tính (dạng được làm bất hoạt bằng nhiệt) của chúng đối với bạch cầu đơn nhân to sơ cấp của người do LPS gây ra (xác định nồng độ IL-1beta, IL-6, IL-8, TNFalpha, PGE2, 8-isoprostan, và MMP-9).

Hiệu quả kháng viêm điển hình của chủng mới theo các Ví dụ từ 1 đến 4 được thể hiện trên Fig.1.

Các thử nghiệm để đánh giá hiệu quả đối với mức độ hoạt hóa NF-kappaB do TNF gây ra trong các nguyên bào sợi NIH-3T3 được thực hiện với dòng tế bào nguyên bào sợi chứa gen Luciferaza đã chuyển nhiễm ổn định được định hướng bởi gen khởi đầu phụ thuộc NF-kappaB. Các tế bào được kích thích bằng TNF với sự có mặt hoặc không có mặt của các vi khuẩn có lợi. Sau 6 giờ kích thích, các tế bào được làm tan và hoạt tính của luciferaza được xác định bằng thiết bị đo độ phát sáng.

Ví dụ 5: sàng lọc các vi khuẩn có lợi đã chọn đối với nguyên bào sợi ở lợi của người

Các chủng vi khuẩn theo sáng chế đã chọn được phủ lên nguyên bào sợi ở lợi của người. Các môi trường nuôi cấy nguyên bào sợi được duy trì như được mô tả trong quy trình của nhà sản xuất. Trước khi kích thích, các tế bào được cấy vào đĩa có 24 lỗ dùng để thử nghiệm ELISA. Các tế bào được ủ khi không có (nhóm đối chứng không được kích thích) hoặc có IL-1beta trong 24 giờ. Các chủng vi khuẩn có lợi (5 liều dùng, tùy theo kết quả của thử nghiệm sàng lọc) được cho thêm trong 30 phút trước khi xử lý bằng IL-1. Sau 24 giờ, dịch nổi bề mặt được lấy ra, ly tâm và đánh giá về nồng độ IL-6, IL-8, isoprostan, và PGE2 trong EIA (PGE2, sản phẩm của AssayDesign, isoprostan, sản phẩm của Cayman) hoặc ELISA (IL-6, IL-8, sản phẩm của Immunotools), bằng cách sử dụng quy trình của nhà sản xuất. Mỗi liều được đánh giá ít nhất 2 đến 3 lần. Các chủng cho thấy có hiệu quả ức chế IL-6 nhất định.

Hiệu quả kháng viêm của chủng theo Ví dụ 5 được thể hiện trên Fig.2.

Ví dụ 6: sản phẩm dạng viên nén và viên ngậm hình thoi chứa vi khuẩn có lợi

| Số thứ tự | Khối | Các thành phần                                            | Viên nén isomalt |                          |                     |
|-----------|------|-----------------------------------------------------------|------------------|--------------------------|---------------------|
|           |      |                                                           | Plaxebo          | Chỉ chứa vi khuẩn có lợi | + Chất tạo hương vị |
| 1         | A    | Magie stearat                                             | 1,800%           | 1,800%                   | 1,800%              |
| 2         |      | Acesulfam                                                 | 0,050%           | 0,050%                   | 0,050%              |
| 3         |      | Sucraloza                                                 | 0,025%           | 0,025%                   | 0,025%              |
| 4         |      | Vi khuẩn có lợi                                           |                  | 1,000%                   | 1,000%              |
| 5         |      | Chất tạo hương vị (ví dụ, 134229 Optamint Peppermint s/d) |                  |                          | 0,500%              |
| 6         | B    | Isomalt                                                   | 98,125%          | 97,125%                  | 96,625%             |
|           |      | Tổng                                                      | 100,00%          | 100,00%                  | 100,00%             |

Phương pháp sản xuất:

các thành phần 1 và 6 được làm khô trong thiết bị sấy có khoang chân không ở nhiệt độ 50°C và áp suất tối đa bằng 10 mba trong 16 giờ

tất cả các thành phần được cân trọng lượng chính xác

các thành phần 1, 2, 3, 4 và 5 được kết hợp và trộn kỹ (khối A). Vi khuẩn có lợi được phủ ở dạng đông khô nhanh có hoạt tính nằm trong khoảng từ  $10^5$  đến  $10^{12}$  đơn vị tạo khuẩn lạc (CFU)/gam.

sau đó, khối A được cho vào thành phần 6 và được trộn kỹ trong 5 phút

hỗn hợp bột này được ép thành viên nén trong máy ép viên nén EK0 (Korsch AG, Berlin) ở áp lực được điều chỉnh nằm trong khoảng từ 15 đến 20kN

các thông số đích:

đường kính viên nén: 20mm

trọng lượng viên nén: 2,0g

bảo quản ở nhiệt độ trong phòng trong túi nhôm được hàn kín. Sử dụng 1g chất hút ẩm cho mỗi 5 viên ngậm hình thoi để làm khô (được hoạt hóa bằng cách bảo quản trong 3 giờ ở nhiệt độ 105°C trong thiết bị sấy có khoang chân không).

Ví dụ 7: Bột dùng để đánh răng

| Số thứ tự | Khối | Các thành phần                                            | Bột dùng để đánh răng |                             |                     |
|-----------|------|-----------------------------------------------------------|-----------------------|-----------------------------|---------------------|
|           |      |                                                           | Plaxebo               | Chỉ sử dụng vi khuẩn có lợi | + Chất tạo hương vị |
| 1         | A    | Magie cacbonat                                            | 3,00%                 | 3,00%                       | 3,00%               |
| 2         |      | Natri bicacbonat                                          | 2,00%                 | 2,00%                       | 2,00%               |
| 3         |      | Natri florua                                              | 0,25%                 | 0,25%                       | 0,25%               |
| 4         |      | Natri sacarin                                             | 0,60%                 | 0,60%                       | 0,60%               |
| 5         | B    | Vi khuẩn có lợi                                           |                       | 4,00%                       | 4,00%               |
| 6         |      | Chất tạo hương vị (ví dụ, 134229 Optamint Peppermint s/d) |                       |                             | 2,00%               |
| 7         | C    | Canxi cacbonat                                            | 94,15%                | 90,15%                      | 88,15%              |
|           |      | Tổng                                                      | 100,00%               | 100,00%                     | 100,00%             |

Phương pháp sản xuất:

thành phần 7 được làm khô trong thiết bị sấy có khoang chân không ở nhiệt độ 50°C và áp suất tối đa bằng 10 mba trong 16 giờ

tất cả các thành phần được cân trọng lượng chính xác

các thành phần 1, 2, 3 và 4 được kết hợp và trộn kỹ với nhau (khối A)

các thành phần 5 và 6, nếu cần, được kết hợp và trộn kỹ (khối B). Vi khuẩn có lợi được phủ ở dạng đông khô nhanh có hoạt tính nằm trong khoảng từ  $10^5$  đến  $10^{12}$  đơn vị tạo khuẩn lạc (CFU)/gam.

sau đó, các khối A và B được kết hợp và trộn kỹ với nhau

hỗn hợp này được cho vào thành phần 7 và được trộn kỹ trong 5 phút

hỗn hợp bột được tạo thành các phần, mỗi phần có trọng lượng 0,5g và được bảo quản ở nhiệt độ trong phòng cùng với 1g chất hút ẩm (được hoạt hóa bằng cách bảo quản trong 3 giờ ở nhiệt độ 105°C trong thiết bị sấy có khoang chân không) trong các gói nhôm được hàn kín.

Ví dụ 8: Bột dùng để đánh răng

| Số thứ tự | Khối | Các thành phần                                            | Viên nén dùng để đánh răng |
|-----------|------|-----------------------------------------------------------|----------------------------|
| 1         | A    | Magie cacbonat                                            | 3,00%                      |
| 2         |      | Natri bicacbonat                                          | 2,00%                      |
| 3         |      | Natri florua                                              | 0,25%                      |
| 4         |      | Natri sacarin                                             | 0,60%                      |
| 5         |      | Natri laurylsulphat                                       | 0,50%                      |
| 6         |      | Magie stearat                                             | 1,00%                      |
| 7         | B    | Chất tạo hương vị (ví dụ, 134229 Optamint Peppermint s/d) | 2,00%                      |
| 8         |      | Vì khuẩn có lợi                                           | 6,67%                      |
| 9         | C    | Canxi cacbonat                                            | 17,00%                     |
| 10        |      | Xenluloza vi tinh thể                                     | 66,98%                     |
|           |      | Tổng                                                      | 100,00%                    |

Phương pháp sản xuất:

Các thành phần 6, 9 và 10 được làm khô trong thiết bị sấy có khoang chân không ở nhiệt độ 50°C và áp suất tối đa 10 mba trong 16 giờ.

Tất cả các thành phần được cân trọng lượng chính xác

Các thành phần 1, 2, 3, 4, 5 và 6 được kết hợp và trộn kỹ với nhau (khối A)

Các thành phần 7 và 8 được kết hợp và trộn kỹ với nhau (khối B). Vi khuẩn có lợi được phủ ở dạng đông khô nhanh có hoạt tính nằm trong khoảng từ  $10^5$  đến  $10^{12}$  đơn vị tạo khuẩn lạc (CFU)/gam.

Sau đó, các khối A và B được kết hợp và trộn kỹ với nhau

Các thành phần 9 và 10 được kết hợp và trộn kỹ với nhau (khối C)

Hai hỗn hợp (khối A/B và khối C) được kết hợp và được trộn kỹ trong 5 phút

Hỗn hợp bột được ép thành viên nén trong máy ép viên EK0 (Korsch AG, Berlin) với áp lực được điều chỉnh nằm trong khoảng từ 15 đến 20kN

các thông số đích

đường kính viên nén: 9mm

trọng lượng viên nén: 0,3g

Bảo quản ở nhiệt độ trong phòng trong các túi nhôm được hàn kín. Sử dụng 1g chất hút ẩm cho mỗi 3 viên nén để làm khô (được hoạt hóa bằng cách bảo quản trong 3 giờ ở nhiệt độ  $105^{\circ}\text{C}$  trong thiết bị sấy có khoang chân không)

Ví dụ 9: Kẹo cao su

| Số thứ tự | Các thành phần                            | Kẹo cao su với dầu thực vật, vi khuẩn có lợi trong chất tạo hương vị |        | Kẹo cao su với dầu thực vật, vi khuẩn có lợi trong dầu |        |
|-----------|-------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|--------|--------------------------------------------------------|--------|
| 1         | Nền gồm (ví dụ, Geminis T)                | 30,00%                                                               | Khối A | 30,00%                                                 | Khối A |
| 2         | Isomalt (ở đây là: Isomalt ST-PF)         | 65,00%                                                               | Khối B | 65,00%                                                 | Khối B |
| 3         | Sucraloza được phủ (10% trong sáp)        | 1,00%                                                                |        | 1,00%                                                  |        |
| 4         | Lexitin đã khử dầu (ở đây là: Emulpur IP) | 0,30%                                                                |        | 0,30%                                                  |        |
| 5         | Dầu thực vật – Triglycerit                | 1,60%                                                                | Khối C | 1,60%                                                  | Khối C |

|   |                                                       |       |        |       |        |
|---|-------------------------------------------------------|-------|--------|-------|--------|
| 6 | Vi khuẩn có lợi                                       | 0,80% | Khối D | 0,80% |        |
| 7 | Chất tạo hương vị (ví dụ, 203191 Optamint Peppermint) | 1,30% |        | 1,30% | Khối D |

Phương pháp sản xuất:

Thành phần 2 được làm khô trong thiết bị sấy có khoang chân không ở nhiệt độ 50°C và áp suất tối đa bằng 10 mba trong 16 giờ

Tất cả các thành phần được cân trọng lượng chính xác

Thành phần 1 được xử lý nhiệt đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ 45 đến 59°C trong máy ngào trộn kẹo cao su dùng trong phòng thí nghiệm kèm theo ngào trộn trong khi gia nhiệt cho đến khi thu được khối chất đồng nhất. Việc gia nhiệt vẫn tiếp tục trong toàn bộ quá trình trộn

Sau đó, các thành phần 2, 3 và 4 được thêm vào và được ngào trộn cho đến khi hỗn hợp đồng nhất và không quan sát thấy bột nữa

Theo tỷ lệ, thành phần 6 được trộn vào thành phần 5 (khối C) hoặc thành phần 7 (khối D). Vi khuẩn có lợi được phủ ở dạng đông khô nhanh có hoạt tính nằm trong khoảng từ  $10^5$  đến  $10^{12}$  đơn vị tạo khuẩn lạc (CFU) trong mỗi gam. Các thành phần được trộn lẫn cho đến khi thu được huyền phù đồng nhất.

Trước tiên, khối C được cho vào khối chất kẹo cao su và được ngào trộn tiếp cho đến khi thu được khối chất đồng nhất.

Cuối cùng, khối D được xử lý tương ứng. Sau khi cho thêm, hỗn hợp này cần được ngào trộn cho đến khi thu được khối chất kẹo cao su đồng nhất.

Lấy khối chất ra khỏi máy trộn và tạo hình thành dạng thanh nhỏ bằng con lăn dập nổi bằng cách sử dụng bộ dập nổi “dạng tấm”

Bảo quản ở nhiệt độ trong phòng trong túi nhôm được hàn kín. Sử dụng 1g chất hút ẩm cho mỗi 7 thanh kẹo cao su để làm khô (được hoạt hóa bằng cách bảo quản trong 3 giờ ở nhiệt độ 105°C trong thiết bị sấy có khoang chân không)

Ví dụ 10: Vi khuẩn có lợi ở dạng hạt nhỏ

| Các thành phần  | Vi khuẩn có lợi ở dạng hạt nhỏ có tỷ lệ nạp thấp, không có chất thơm, có thuốc nhuộm, có gồm gelatin (% trọng lượng) | Vi khuẩn có lợi ở dạng hạt nhỏ có tỷ lệ nạp thấp, có chất thơm, có thuốc nhuộm, có gồm gelatin (% trọng lượng) | Vi khuẩn có lợi ở dạng hạt nhỏ có tỷ lệ nạp cao, không có chất thơm, không có thuốc nhuộm, không có gồm gelatin, hàm lượng nước cao (% trọng lượng) | Vi khuẩn có lợi ở dạng hạt nhỏ có tỷ lệ nạp cao, không có chất thơm, không có thuốc nhuộm, không có gồm gelatin, hàm lượng nước thấp (% trọng lượng) |
|-----------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Alginat         | 1,75                                                                                                                 | 1,65                                                                                                           | 1,44                                                                                                                                                | 1,57                                                                                                                                                 |
| Gummi Arabicum  | 1,25                                                                                                                 | 1,18                                                                                                           | 0,60                                                                                                                                                | 0,65                                                                                                                                                 |
| Sợi lúa mì      | 1,125                                                                                                                | 1,06                                                                                                           | 0,52                                                                                                                                                | 0,57                                                                                                                                                 |
| Thuốc nhuộm     | 0,0125                                                                                                               | 0,018                                                                                                          | -                                                                                                                                                   | -                                                                                                                                                    |
| Chất thơm       | -                                                                                                                    | 1,41                                                                                                           | -                                                                                                                                                   | -                                                                                                                                                    |
| Glyxerol        | 0,1875                                                                                                               | -                                                                                                              | -                                                                                                                                                   | -                                                                                                                                                    |
| Vi khuẩn có lợi | 1,125                                                                                                                | 1,35                                                                                                           | 7,20                                                                                                                                                | 7,83                                                                                                                                                 |
| Gôm gelatin     | 0,0625                                                                                                               | 0,059                                                                                                          | -                                                                                                                                                   | -                                                                                                                                                    |
| Nước            | Lượng thêm vào cho đủ 100%                                                                                           | Lượng thêm vào cho đủ 100%                                                                                     | Lượng thêm vào cho đủ 100%                                                                                                                          | Lượng thêm vào cho đủ 100%                                                                                                                           |
| Tỷ lệ nạp       | khoảng 20%                                                                                                           | khoảng 20%                                                                                                     | khoảng 74%                                                                                                                                          | khoảng 74%                                                                                                                                           |

Phương pháp sản xuất:

Tạo ra bề canxi clorua để làm kết tủa alginat dạng hạt nhỏ:

Điều chế dung dịch canxi clorua 2% từ nước cất và canxi clorua. Cần lưu ý rằng  $\text{CaCl}_2$  phải được hòa tan hoàn toàn.

Điều chế dung dịch alginat (thay vì alginat, pectin hoặc gôm gelan cũng có thể được sử dụng):

Trong bình phản ứng có máy khuấy và bình này thích hợp dùng cho kích thước của mẻ, nước được cho vào

Bật máy khuấy và trong khi khuấy ở tốc độ cao, các lượng tương ứng của alginat, gôm arabicum, sợi lúa mì và vi khuẩn có lợi, cũng như lượng gôm gelan tùy ý, nếu cần, được thêm vào

Hỗn hợp này được gia nhiệt đến  $80^\circ\text{C}$  trong khi khuấy và duy trì ở nhiệt độ này trong 5 phút – trong bước này, các thành phần tạo gel được hòa tan

Sau đó, ngừng gia nhiệt và dung dịch gel nóng được khuấy tiếp trong ít nhất 30 phút cho đến khi không còn thấy cục

Tiếp đó, dung dịch được làm nguội bằng cách làm lạnh đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ  $39^\circ\text{C}$  đến  $43^\circ\text{C}$  trong khi khuấy

Trong bình khác, chất thơm và thuốc nhuộm được cho vào, nếu cần và được trộn kỹ. Trong trường hợp không sử dụng chất thơm, thuốc nhuộm được trộn với glyxerol

Khi hệ phân tán thuốc nhuộm được trộn đồng nhất, hệ này được cho vào bình phân đoạn với dung dịch alginat. Bình trộn này được rửa vài lần bằng khoảng 10% lượng dung dịch alginat được sử dụng chứa nước và được cho vào hệ phân tán

Dung dịch alginat được khuấy tiếp trong ít nhất 5 phút.

Sau đó, mẻ này được khuấy trong ít nhất 15 phút nữa ở tốc độ thấp để loại bỏ không khí có thể có mặt.

Nhỏ giọt dung dịch alginat vào dung dịch canxi clorua để làm kết tủa dạng hạt nhỏ:

Dung dịch alginat được chuyển vào bình phản ứng ở áp suất ổn định có thể bịt kín, có hai lỗ thoát. Ở một lỗ thoát, bơm không khí đã nén vào. Lỗ thoát thứ hai dẫn đến các vòi phun của dụng cụ nhỏ giọt qua ống.

Bình phản ứng được xử lý nhiệt trên tấm gia nhiệt sao cho dung dịch alginat đạt đến nhiệt độ khoảng 45°C. Dung dịch này được khuấy nhẹ bằng máy khuấy từ.

Sau khi tác dụng áp suất vào bình phản ứng, dung dịch alginat được ép về phía vòi phun, các vòi này được tạo dao động bằng máy tạo dao động. Bằng cách điều chỉnh áp suất và tần số của máy tạo dao động, kích thước của giọt tạo thành ở đầu các vòi phun có thể được điều chỉnh.

Các giọt alginat tạo ra ở đầu vòi phun rơi vào bình thu gom ở dạng phểu trong đó dung dịch canxi clorua được tạo ra khi bắt đầu tuần hoàn.

Các hạt nhỏ alginat đã hóa rắn cùng với dung dịch canxi clorua đi qua phểu và được thu gom trong rây, dung dịch canxi clorua thu được được bơm trở lại vào phểu ở dưới dụng cụ nhỏ giọt và do đó được tái sử dụng.

Các hạt nhỏ được làm khô trong máy sấy kiểu dòng khí động học với nhiệt độ không khí cấp vào bằng 80°C cho đến khi nhiệt độ không khí xả ra đạt 45°C.

**YÊU CẦU BẢO HỘ**

1. Chế phẩm vi sinh vật được phân lập bao gồm hoặc chứa *Lactobacillus plantarum* GOS 42 (DSM 32131).
2. Chế phẩm chứa vi sinh vật *Lactobacillus plantarum* GOS 42 (DSM 32131) cùng với chất mang, tá dược và/hoặc chất pha loãng.
3. Chế phẩm được phân lập theo điểm 1 hoặc chế phẩm theo điểm 2, trong đó vi sinh vật hiện diện dưới dạng tế bào sinh dưỡng và/hoặc bào tử.
4. Chế phẩm được phân lập theo điểm 1 hoặc 3 hoặc chế phẩm theo điểm 2 hoặc 3, trong đó vi sinh vật bị suy giảm độc tính hoặc chết.
5. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 4, trong đó chế phẩm này là dược phẩm.
6. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 5, trong đó tổng lượng vi sinh vật nằm trong khoảng từ 0,01 đến 100%, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,1 đến 50%, tốt nhất là trong khoảng từ 1 đến 10%, trong mỗi trường hợp đối với tổng trọng lượng của chế phẩm và/hoặc trong đó tổng lượng vi sinh vật nằm trong khoảng từ  $1 \times 10^3$  đến  $1 \times 10^{11}$  đơn vị hình thành khuẩn lạc (CFU) , tốt hơn là trong phạm vi từ  $1 \times 10^5$  đến  $1 \times 10^{10}$  CFU.
7. Chế phẩm theo điểm 6, trong đó tổng lượng vi sinh vật nằm trong khoảng từ 0,1 đến 50% so với tổng trọng lượng của chế phẩm; và/hoặc tổng số lượng vi sinh vật nằm trong khoảng từ  $1 \times 10^5$  đến  $1 \times 10^{10}$  CFU.
8. Chế phẩm theo điểm 7, trong đó tổng lượng vi sinh vật nằm trong khoảng từ 1 đến 10% so với tổng trọng lượng của chế phẩm; và/hoặc trong đó tổng lượng vi sinh vật nằm trong khoảng từ  $1 \times 10^8$  đến  $1 \times 10^9$  CFU.
9. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 8, trong đó chế phẩm này được phủ hoặc bao nang.
10. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 9, trong đó chế phẩm này ở dạng dung dịch, huyền phù, nhũ tương, viên nén, hạt, bột hoặc viên nang.

11. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 10, trong đó chế phẩm này được chọn từ nhóm bao gồm kem đánh răng, gel dùng để đánh răng, bột dùng để đánh răng, chất lỏng dùng để làm sạch răng, bọt dùng để làm sạch răng, nước súc miệng, nước xịt thơm miệng, chỉ nha khoa, kẹo cao su và viên ngậm hình thoi.

12. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 11, trong đó chế phẩm này chứa thành phần thức ăn và/hoặc đồ uống động vật.

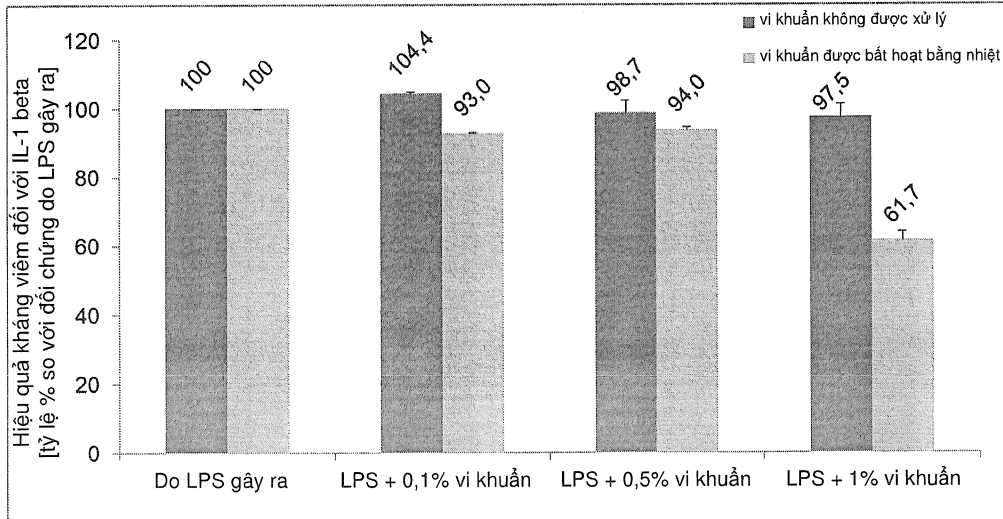


Fig. 1A

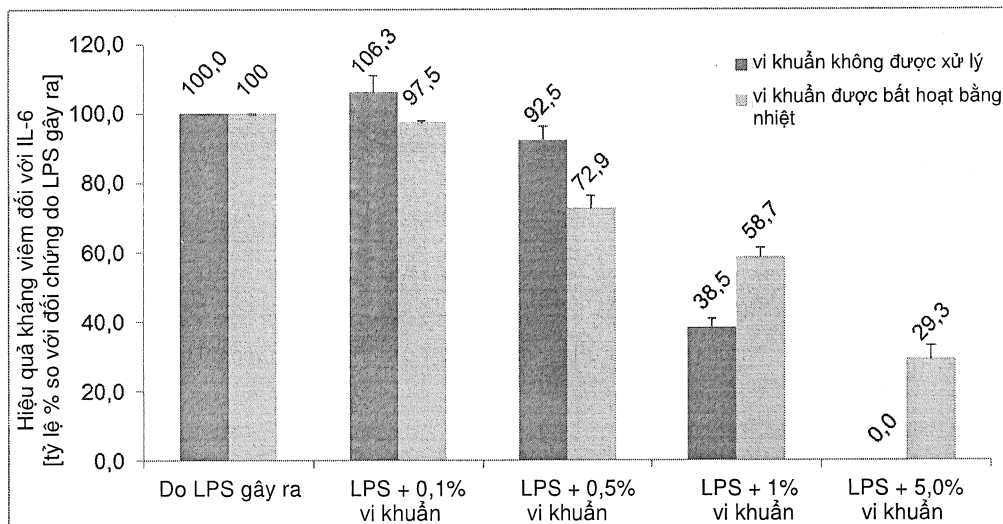


Fig.1B

2/4

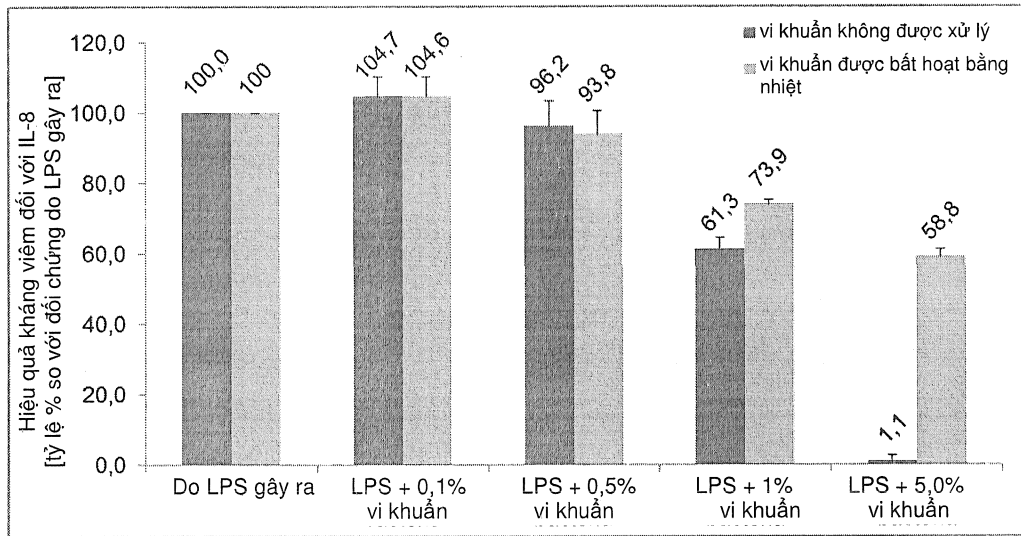


Fig.1C

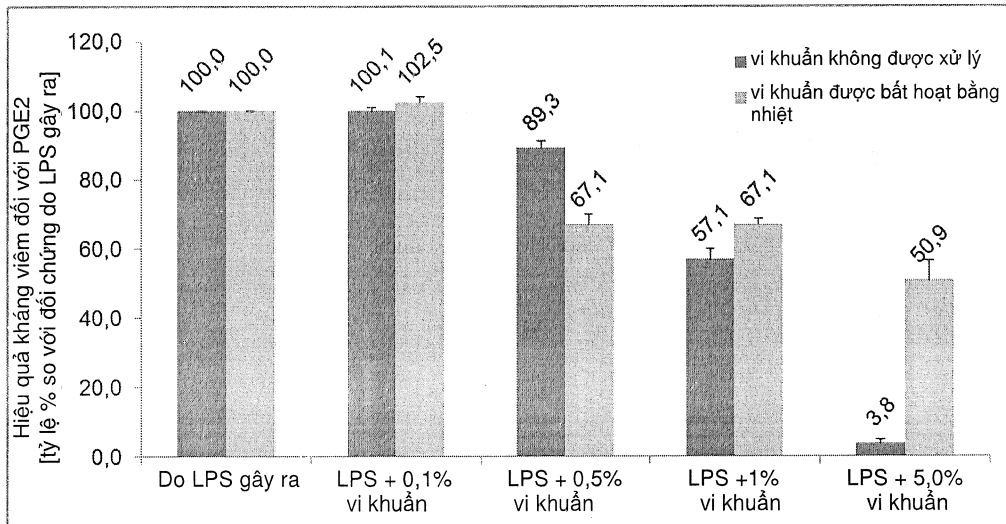


Fig.1D

3/4

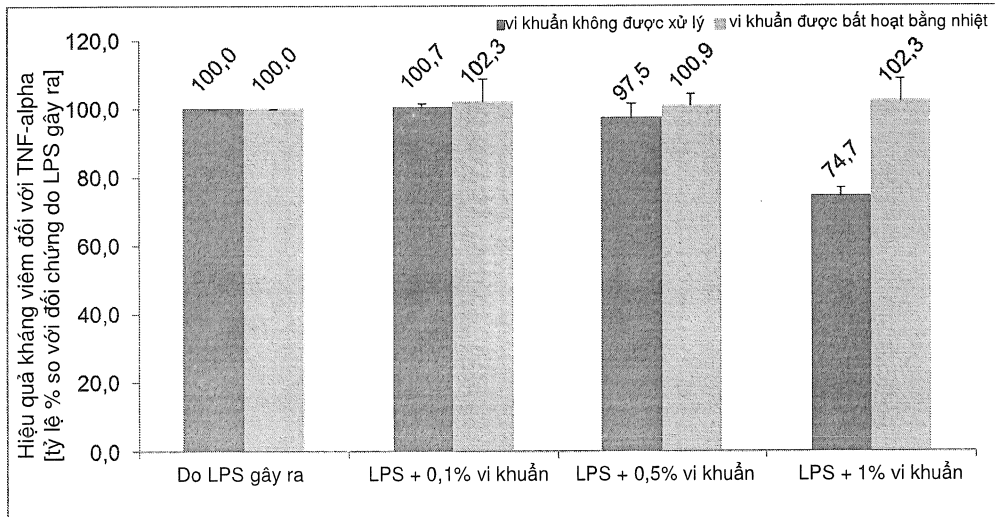


Fig. 1E

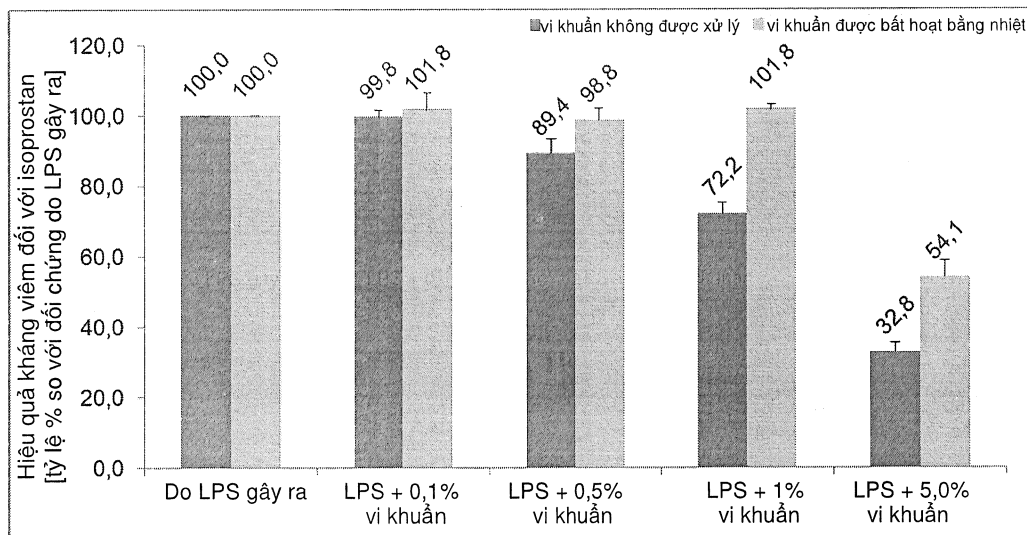


Fig.1F

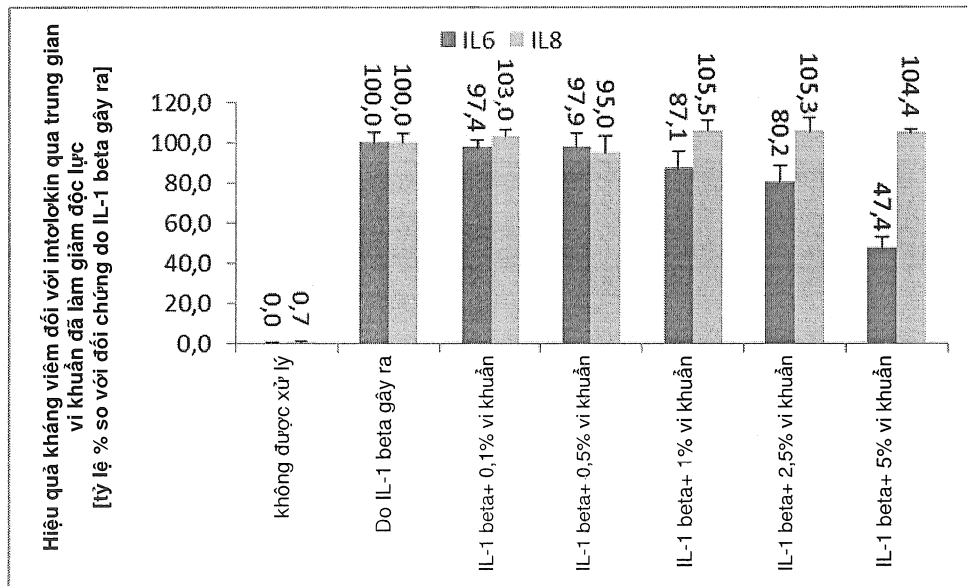


Fig.2