

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 368 344**

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)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06755250 .5**

96 Fecha de presentación: **18.05.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1885207**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **13.02.2008**

54 Título: **COMPOSICIONES PARA APLICACIÓN PARENTERAL DE MICROORGANISMOS.**

30 Prioridad:
18.05.2005 EP 05010735

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.11.2011

73 Titular/es:
**DSM IP ASSETS B.V.
HET OVERLOON 1
6411 TE HEERLEN, NL**

72 Inventor/es:
**CHEN, Chyi-Cheng;
LEUENBERGER, Bruno H.;
SCHWEIKERT, Loni y
ZEDI, Ernst**

74 Agente: **Lehmann Novo, Isabel**

ES 2 368 344 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones para aplicación parenteral de microorganismos

5 Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a composiciones que se pueden usar para proveer de microorganismos al intestino. Se pueden encontrar varios problemas al fabricar composiciones con fines nutricionales o farmacéuticos que contienen microorganismos vivos. Algunos de esos problemas se tratan en WO 97/16198. En particular, los microorganismos que están destinados a ejercer su actividad en el intestino deben ser protegidos contra el impacto del ácido como el presente en los jugos gástricos. Además, los microorganismos incorporados en un portador o matriz protectora, que comúnmente están liofilizados, tienden a ser higroscópicos y a apelmazarse fácilmente en las condiciones de almacenamiento ambientales. Este efecto de apelmazamiento puede impedir el procesamiento de formulaciones de dosificación sólidas como los comprimidos, por ejemplo, una insuficiente fluidez, y puede además, tener un impacto negativo en la estabilidad durante el almacenamiento en términos de la viabilidad de los microorganismos debido a la rápida absorción de humedad. La fluidez de un producto en polvo también puede ser influida por el tamaño de partícula en cuanto a que partículas de tamaño demasiado pequeño pueden impedir la fluidez y por lo tanto, por ejemplo, originar un problema en la uniformidad de contenido del principio activo en los comprimidos. Por consiguiente, una baja higroscopicidad y una buena fluidez son características esenciales para el procesamiento de productos en polvo, por ejemplo para preparar comprimidos y cápsulas, especialmente productos en polvo que involucran microorganismos.

WO 97/16198 da a conocer composiciones de microorganismos probióticos como la especie *Lactobacillus* en una matriz resistente al jugo gástrico. Las composiciones se preparan mezclando los microorganismos desecados con un componente matricial resistente al jugo gástrico, compactando la mezcla y granulando en seco la mezcla obtenida. Opcionalmente, el granulado así obtenido se somete a otro paso de granulación en seco para proporcionar al granulado un recubrimiento resistente al jugo gástrico.

Se encontró que los procedimientos de formulación conocidos, como el uso del granulado preparado por el proceso de WO 97/16198 no siempre producen comprimidos con propiedades satisfactorias, por ejemplo la dureza y la resistencia a la flexión del comprimido para que los comprimidos no puedan ser dañados fácilmente durante la manipulación.

El resumen de patente de Japón 04 041434 (Asahi Breweries Ltd.) instruye sobre comprimidos que tienen una elevada estabilidad en el almacenamiento de células viables así como tolerancia al ácido gástrico, que tienen recubrimiento entérico. Estos se producen mezclando el polvo de células viables con un aditivo como almidón.

US 2004/0120931 (Procter & Gamble Company) instruye sobre comprimidos que tienen un núcleo central y al menos dos capas que lo rodean. La capa interna puede ser: a) un recubrimiento continuo insoluble a un pH de aproximadamente 3 o menos, b) un recubrimiento continuo con un peso de 3 - 25 mg/cm², o una combinación de a) y b). La capa externa es hidrófoba.

WO 97/16198 (Chr. Hansen Biosystems A/S) instruye sobre una formulación probiótica que contiene microorganismos que son estabilizados por secado, y constituyentes matriciales que son resistentes al jugo gástrico. La formulación está en forma de gránulos secos.

EP 1344458 (Société des Produits Nestlé S.A.) instruye sobre un sistema de administración de probióticos en forma de pastilla. Las pastillas contienen microorganismos y otros componentes y un recubrimiento opcional.

De conformidad con la presente invención se encontró que se pueden procesar microorganismos en forma de gránulos o polvos que tengan propiedades superiores a efectos de la compresión, particularmente que carezcan de higroscopicidad y tengan una buena fluidez, y a partir de los cuales se pueden preparar comprimidos con propiedades de manipulación satisfactorias mediante un proceso nuevo que comprende un primer paso en el que se compacta el microorganismo con una sal de un ácido graso de cadena mediana o larga para preparar un granulado compactado, y un segundo paso en el que se proporciona un recubrimiento al granulado compactado.

Por lo tanto, en un aspecto, la invención se refiere a un proceso para la fabricación de una composición sólida que contiene un microorganismo, donde en un primer paso una mezcla de un microorganismo y una sal de un ácido graso de cadena mediana o larga se compacta y granula; después de lo cual en un segundo paso se proporciona un recubrimiento a dicho granulado.

Aún en otro aspecto, la presente invención se refiere a composiciones sólidas que contienen un microorganismo compactado, que está recubierto por, o incorporado en, una sal de un ácido graso de cadena mediana o larga, donde el microorganismo tiene, opcionalmente, una primera capa de recubrimiento por debajo del recubrimiento

constituido por la sal del ácido graso de cadena mediana o larga, y donde dicha composición tiene un recubrimiento externo que sustancialmente no contiene ningún material que esté presente en la composición.

5 El recubrimiento puede ser continuo o discontinuo dependiendo de la cantidad de material de recubrimiento y de las condiciones de recubrimiento. Sin querer quedar sujetos a la teoría se supone que algunas partículas se pueden recubrir parcial o completamente y después aglomerar para formar partículas más grandes. Después las partículas aglomeradas se recubren. Por lo tanto, el proceso de recubrimiento implicaría inherentemente un proceso de granulación. De hecho, dicho proceso de granulación sería deseable porque logra partículas más grandes y mejora el flujo del polvo.

10 El proceso de la presente invención se puede llevar a cabo con cualquier microorganismo o mezcla de éstos. El término microorganismo según se usa en este documento indica cualquier forma sólida de microorganismo, inclusive preparaciones liofilizadas, que comprenda típicamente agentes auxiliares como carbohidratos y/o proteínas, y preparaciones en las que el microorganismo esté recubierto por, o incorporado en, un material matricial, por ejemplo, proteínas, maltodextrinas, trehalosa y/o ácido ascórbico. En el contexto de la invención, "un microorganismo" significa al menos un microorganismo. Preferentemente, los microorganismos son aquellos que se pueden suministrar al intestino como complemento nutricional o agente farmacéutico o aditivo alimentario. Más preferentemente, el microorganismo es un probiótico o sus mezclas. Un probiótico se define en este documento como una cepa microbiana viva que afecta de manera beneficiosa a la célula huésped humana mejorando su equilibrio microbiano. Los probióticos preferidos son cepas aisladas de *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, *Enterococcus*, y sus mezclas. Las especies probióticas que más se prefieren son *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus helveticus*, y sus mezclas. De acuerdo con una realización preferida, el microorganismo comprende como principio activo al menos uno de los probióticos siguientes: *Lactobacillus acidophilus* cepa LAFTI® L10 depositada en el CBS con el número de referencia CBS 116411, *Lactobacillus casei* cepa LAFTI® L26 depositada en el CBS con el número referencia CBS 116412 y LAFTI® B94, que es un *Bifidobacterium animalis*. De acuerdo con una realización preferida, el probiótico consiste en un cultivo biológicamente puro o un cultivo sustancialmente biológicamente puro de al menos dicha(s) cepa(s) depositada(s). De acuerdo con una realización más preferida, el probiótico consiste en un cultivo biológicamente puro o un cultivo sustancialmente biológicamente puro de al menos dicha(s) cepa(s) depositada(s) en combinación con cualquier otro probiótico valioso. De acuerdo con una realización aún más preferida, el probiótico se selecciona del grupo que consiste en *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium animalis*, *Lactobacillus acidophilus*, preferentemente *Lactobacillus acidophilus* LAFTI® L10 CBS 116411, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei*, preferentemente *Lactobacillus casei* LAFTI® L26 CBS 116412, *Lactobacillus paracasei* y *Lactobacillus helveticus*. Aún más preferentemente, el microorganismo es *Lactobacillus acidophilus* CBS 116411 y/o *Lactobacillus casei* CBS 116412 y/o un *Bifidobacterium animalis*.

40 En el primer paso del proceso de la presente invención, el microorganismo se mezcla, o se mezcla y se compacta, con una sal atóxica de un ácido graso de cadena mediana o larga (por ejemplo C₁₀₋₃₀) como un estearato o palmitato. Particularmente, la sal atóxica es estearato de calcio o magnesio. Son ejemplos de otras sales atóxicas que se pueden usar las sales de sodio, potasio o zinc de ácidos grasos de cadena larga como ácido esteárico y ácido palmítico. La cantidad de sal del ácido graso de cadena mediana o larga en la mezcla con el microorganismo, es adecuadamente entre aproximadamente 5 y aproximadamente 90% en peso, preferentemente entre aproximadamente 5 y aproximadamente 80% en peso, más preferentemente entre aproximadamente 5 y aproximadamente 50% en peso, y muy preferentemente entre aproximadamente 5 y aproximadamente 30% en peso, basado en el peso seco del microorganismo. La relación entre el aceite comestible, si estuviera presente, y la sal del ácido graso de cadena mediana o larga es adecuadamente de aproximadamente 1:10 o menor, por ejemplo, de aproximadamente 1:20 partes en peso.

50 Los términos compactar o compactación según se usan en este documento indican cualquier método para preparar una mezcla homogénea, cohesiva, de los componentes. La compactación se lleva a cabo adecuadamente amasando el microorganismo junto con la sal del ácido graso de cadena mediana o larga, opcionalmente, un aceite comestible, preferentemente un triglicérido de cadena mediana (por ej., C₈₋₁₄), un tocoferol como α -tocoferol, aceite de soja, aceite de palma, aceite de girasol, o cualquier otro aceite comestible conocido, o sus mezclas, para proporcionar una pasta homogénea. Para la granulación, la pasta se fracciona en partículas de tamaño adecuado, por ejemplo entre aproximadamente 10 μm y aproximadamente 800 μm que luego se someten a recubrimiento. Alternativamente, se puede formar una mezcla en polvo íntima del microorganismo y la sal del ácido graso de cadena mediana o larga, por ejemplo, mediante agitación. La mezcla en polvo en la que las partículas del microorganismo se supone que están dispersas con la sal del ácido graso de cadena mediana o larga, por ejemplo, estearato de magnesio, se somete a recubrimiento.

60 En el segundo paso del proceso de la invención, las partículas de granulado o el polvo se recubren. El recubrimiento se puede llevar a cabo mediante cualquier tecnología de recubrimiento siendo el método preferido la pulverización de una solución del material de recubrimiento en el lecho fluidizado del polvo o los gránulos que se van a recubrir.

El material de recubrimiento es adecuadamente uno que se pueda disolver o suspender en agua como una solución o suspensión viscosa. Los carbohidratos y las proteínas son adecuados para este fin. Los ejemplos de carbohidratos para usar como material de recubrimiento en el proceso de la presente invención son polisacáridos como alginato, pectina, almidón, almidón modificado, maltodextrina, carragenina, goma arábica, goma guar, xantano, celulosa y derivados de celulosa, como hidroxipropilmetilcelulosa, ftalato y acetato-succinato de hidroxipropilmetilcelulosa, oligosacárido, disacárido y monosacárido. Son ejemplos de proteínas para usar como material de recubrimiento en el proceso de la presente invención la gelatina, las proteínas vegetales y las proteínas del suero de leche. El material de recubrimiento preferido es alginato de sodio que se puede usar como una solución acuosa de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 8% en peso. También se pueden usar otros agentes de recubrimiento conocidos en el oficio, especialmente los que se sabe que proporcionan recubrimientos resistentes al jugo gástrico, por ejemplo, derivados de celulosa como hidroxipropilmetilcelulosa, ftalato y acetato-succinato de hidroxipropilmetilcelulosa.

La cantidad de recubrimiento es preferentemente 15% en peso o menos, basado en el peso total de la composición, más preferentemente entre aproximadamente 0.1% en peso y aproximadamente 10% en peso, aún más preferentemente entre aproximadamente 0.1% en peso y aproximadamente 5% en peso, y muy preferentemente entre aproximadamente 1% en peso y aproximadamente 3% en peso.

El microorganismo utilizado en el primer paso del proceso de la presente invención es adecuadamente una preparación liofilizada y puede tener un recubrimiento, especialmente un recubrimiento resistente al jugo gástrico. Preferentemente, el microorganismo utilizado en el paso de mezcla o compactación tiene un recubrimiento de, o está incorporado en, un material matricial. Alternativamente son posibles otras formas de secar el microorganismo como secado por aspersión o secado en lecho fluidizado. Dicha preparación liofilizada de un microorganismo, que tiene un recubrimiento resistente al jugo gástrico se puede obtener por tratamiento de una suspensión de células del microorganismo con compuestos al menos seleccionados del grupo que consiste en proteínas (suero de leche, leche, otras), azúcares (maltosa, trehalosa, lactosa, sacarosa), almidón, celulosa, y opcionalmente otros estabilizantes o agentes que protegen de la congelación como el ácido ascórbico. Más preferentemente, la suspensión de células se trata con proteínas, maltodextrinas, trehalosa, y opcionalmente, otros agentes estabilizantes o protectores de la congelación como ácido ascórbico, para formar una pasta viscosa que se somete a liofilización. El material así obtenido se muele hasta un tamaño entre aproximadamente 10 μm y aproximadamente 800 μm . En particular, la preparación liofilizada se puede obtener según se describe en las patentes coreanas KR 429494B o KR 429495 B. Por lo tanto, en una realización particularmente preferida, la presente invención se refiere a composiciones sólidas que contienen un microorganismo que está recubierto por, o incorporado en, una sal de un ácido graso de cadena mediana o larga, donde el microorganismo tiene una primera capa de recubrimiento por debajo del recubrimiento constituido por la sal del ácido graso de cadena mediana o larga, y donde dicha composición tiene un recubrimiento externo que sustancialmente no contiene ningún material que esté presente en la composición.

De acuerdo con una realización preferida, la concentración de agua residual presente en la composición después del recubrimiento está por debajo de 10%. Más preferentemente, la concentración de agua residual está por debajo de 5%, aún más preferentemente por debajo de 4%. La concentración de agua residual se mide preferentemente mediante pérdida por secado. Preferentemente, este método se realiza en 4 g de producto, a 70 °C durante 60 minutos. De acuerdo con otra realización preferida, la actividad de agua de la composición después del recubrimiento varía entre 0.04 y 0.3. Más preferentemente, la actividad de agua varía entre 0.04 y 0.2, aún más preferentemente entre 0.04 y 0.15 y muy preferentemente entre 0.04 y 0.1. La actividad de agua se establece preferentemente a una temperatura dada, midiendo la humedad relativa de equilibrio (h_{re}) en el espacio de cabeza de una cámara cerrada en la que se coloca el polvo. La temperatura preferida es 25 °C. La actividad de agua se expresa como la h_{re} dividida entre 100.

En consecuencia, para obtener dichas composiciones con esas concentraciones de agua residual o actividad de agua tan bajas, el paso final de recubrimiento de las partículas del granulado o el polvo es simultáneamente un paso de secado realizado en un lecho fluidizado. Alternativamente, el paso de secado se realiza como un paso adicional después del recubrimiento de las partículas del granulado o el polvo.

Sorprendentemente, encontramos que las composiciones con concentraciones de agua residual o actividad de agua relativamente bajas, tienen una supervivencia mucho mayor de los microorganismos durante el almacenamiento.

Las composiciones de la presente invención pueden ser útiles como un nutracéutico, es decir un producto farmacéutico que tiene valor nutricional o un alimento que tiene su valor nutricional potenciado por un producto farmacéutico (en este caso: el microorganismo) o como un ingrediente nutricional, o como un ingrediente natural o como un complemento para un alimento o una bebida o como un medicamento independiente. En consecuencia, en otra realización, la invención se refiere a un alimento o una bebida que contiene la composición de conformidad con la presente invención. Dicho alimento o dicha bebida puede contener cualquier excipiente y/o diluyente fisiológicamente aceptable. Los productos alimenticios preferidos son leche cultivada, yogurt, queso, leche en polvo, coberturas (definidas como mezclas de aceite, azúcares y proteína láctea (suero de leche)), leches maternizadas,

productos cárnicos fermentados o una bebida como bebidas lácteas, bebidas para deportistas, jugos de frutas o bebidas a base de frutas.

5 De acuerdo con otra realización, la composición de la invención está en forma de un comprimido, una cápsula, un polvo o un granulado, una preparación líquida para administrar por vía oral, supositorios o preparaciones secas. Más preferentemente, la composición está en forma de un comprimido, una cápsula, un polvo o un granulado entéricos, que sobrevivirán al estómago y llegarán intactos al intestino. Todas esas formas se pueden preparar por medios conocidos, usando portadores, excipientes, solventes o adyuvantes de calidad alimentaria, respectivamente farmacéuticamente aceptables. Para la preparación del medicamento, se pueden usar los ingredientes y los métodos de preparación estándar ya descritos en Remington: The science and practice of pharmacy, 1995, Mack Publishing, Co Easton, PA 18042, Estados Unidos).

15 En consecuencia, de acuerdo con una realización preferida, el proceso de la invención conduce a la fabricación de una composición sólida que contiene un microorganismo compactado, donde esta composición tiene una fluidez mejorada y/o una higroscopicidad reducida, en comparación con las composiciones sólidas conocidas que contienen un microorganismo.

20 La invención se ilustra más detalladamente mediante los ejemplos que se proporcionan a continuación. En toda la descripción y las reivindicaciones, el término "Lafti® L10" se refiere a una preparación de células liofilizadas de *Lactobacillus acidophilus* según se definió antes en la descripción. El triglicérido de cadena mediana (TCM) consistió en una mezcla de triglicéridos de los cuales no menos del 95% son ácido octanoico y decanoico (véase Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2ª ed., Am. Pharm. Association, Wash., Estados Unidos, 1994)

Ejemplos

25 Ejemplo 1

(Compactación/recubrimiento en lecho fluidizado)

30 Paso 1:
Se mezclaron estearato de magnesio (46.74 g), alfa-tocoferol (6.46 g) y triglicérido de cadena mediana (TCM, 3.8 g) en un vaso de bohemia y después se amasaron con un equipo para fabricar pasta (Modelo Atlas 150, fabricado en Italia por, Campodarsego, Italia) hasta obtener una mezcla homogénea. Después la mezcla se mezcló con Lafti® L10 (CBS 116411) (323 g) y se amasó con el equipo para fabricar pasta hasta que se volvió homogénea y laminada. El material laminado se paso a presión a través de un tamiz de 800 micrómetros para formar partículas granuladas.

35 Paso 2:
Se preparó una solución de alginato al 6% disolviendo 7.372 g de alginato de sodio (13% de contenido humedad; FMC Biopolymer, Filadelfia, Estados Unidos) en agua desionizada (99.5 g). La preparación Lafti® L10 recubierta con estearato de magnesio (según se obtuvo en el paso 1, 350 g) se colocó en una granuladora de lecho fluidizado (MP-1 Multi-Processor, Aeromatic-Fielder, Bubendorf, Suiza) y se pulverizó desde la parte inferior con la solución de alginato al 6% (106.9 g) a una velocidad de aproximadamente 1.6 g por minuto. Al final, el producto se secó hasta un contenido de humedad por debajo de 4% para dar un producto final con la distribución del tamaño de partículas siguiente que se presenta en la tabla 1.

45 Tabla 1: distribución del tamaño de partículas

Tamaño de partícula, micrómetros	> 850	> 800	> 600	> 425	> 355	> 250	> 150	< 150
%	13.1	2.5	15.9	15.3	7.4	15.2	21.9	8.7

El producto final tuvo la composición siguiente que se presenta en la tabla 2.

50 Tabla 2: composición del producto final

	%
Lafti® L10	83.47
Estearato de Mg	12.08
Tocoferol	1.67
TCM	0.98
Alginato de Na	1.8

Fluidez: La fluidez se determinó registrando el tiempo necesario para que 100 g de la muestra pasaran a través de un embudo con un cuello de 11 cm de diámetro. La fluidez fue de 16 segundos por 100 g, mientras que la preparación Lafti® inalterada no tenía fluidez de polvo.

- 5 La tasa de supervivencia en el proceso de *Lactobacillus acidophilus* se muestra a continuación en la tabla 3. El número de ufc se estimó contando las colonias de *Lactobacillus* formadas en el medio de cultivo Mann Ragosa Sharp (MRS) agar (Oxoid, Reino Unido), luego de la incubación de las placas de agar inoculadas, a 37 °C durante al menos 48 horas en condiciones anaeróbicas.

10 Tabla 3: tasa de supervivencia del probiótico en la composición

	ufc/g
Lafti® L10 (preparación inalterada)	220 x 10 ⁹
Lafti® recubierta con alginato/estearato de magnesio (esperada)	184 x 10 ⁹
Lafti® recubierta con alginato/estearato de magnesio (determinada)	190 x 10 ⁹
Tasa de supervivencia	100 %
ufc: unidades formadoras de colonia	

Ejemplo 2

(Compresión)

- 15 Se tamizaron 2.80 g de Poliplasdon XL10, (Crosopovidona) y 181.96 g de Avicel pH 302 (celulosa microcristalina) a través de un tamiz de 1 mm. Se agregaron 95.24 g de la preparación de Lafti® L10 obtenida según el ejemplo 1 y se mezclaron durante 10 minutos con una mezcladora de tambor.

- 20 La mezcla para comprimidos se comprimió en una compresora (Compres II) en un único punzón, en forma de comprimidos oblongos (22 mm x 9 mm) que pesaban aproximadamente 1400 mg con una fuerza de compresión de 20 kN. Las características de los comprimidos obtenidos fueron las siguientes:

Resistencia al aplastamiento:	277 N (determinada con Kraemer UTS 4.1)
Tiempo de desintegración:	7 min 10 s. (según la USP 27, agua desmineralizada)
Recuento agregado/comprimido	90.8 * 10 ⁹
Recuento encontrado/comprimido	89.6 * 10 ⁹ (retención = 99%)

- 25 La expresión "recuento agregado" se refiere al recuento de microorganismos (unidades formadoras de colonias) que se agregaron con la preparación Lafti® L10 del ejemplo 1; la expresión "recuento encontrado" indica las unidades formadoras de colonias encontradas en la formulación del comprimido.

Ejemplo 3 (Comparativo)

- 30 (Mezclado/recubrimiento en lecho fluidizado)

Paso 1:

- 35 Se colocaron Lafti® L10 (272 g) y estearato de magnesio (48 g) en un frasco de 1 litro y se agitaron durante 20 minutos a 45 rpm (Turbula T2C, Willy A. Bachofen, Basilea, Suiza).

Paso 2:

- 40 Se preparó una solución de alginato al 6% disolviendo 6.321 g de alginato de sodio (13% de contenido de humedad; FMC Biopolymer, Filadelfia, Estados Unidos) en agua desionizada (85.3 g). El producto obtenido en el paso 1, (300 g) se colocó en una granuladora de lecho fluidizado (MP-1 Multi-Processor, Aeromatic-Fielder, Bubendorf, Suiza) y se pulverizó desde la parte inferior con la solución de alginato al 6% (91.65 g) a una velocidad de aproximadamente 0.86 -1.6 g por minuto. Al final, la preparación Lafti® L10 recubierta con alginato y estearato de magnesio se secó hasta un contenido de humedad por debajo de 4% para dar un producto final con la distribución del tamaño de partículas siguiente que se presenta en la tabla 4.

- 45 Tabla 4: distribución del tamaño de partículas

Tamaño de partícula, micrómetros	> 850	> 800	> 600	> 425	> 355	> 250	> 150	< 150
----------------------------------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

ES 2 368 344 T3

Tamaño de partícula, micrómetros	> 850	> 800	> 600	> 425	> 355	> 250	> 150	< 150
%	0.2	0.1	0.9	11.5	11.6	23.5	28.5	23.7

El producto final tuvo la composición siguiente que se presenta en la tabla 5.

Tabla 5: composición del producto final obtenido

	%
Lafti® L10	83.47
Estearato de Mg	14.73
Alginato de Na	1.8

5 Fluidez: La fluidez se determinó según se describe en el ejemplo 1 y fue de 10 segundos por 100 g mientras que la preparación Lafti® inalterada no tenía fluidez de polvo.

10 La tasa de supervivencia en el proceso de *Lactobacillus acidophilus* se muestra a continuación en la tabla 6.

Tabla 6: tasa de supervivencia del probiótico en la composición

	ufc/g
Lafti® L10	140 x 10 ⁹
Lafti® recubierta con alginato/estearato de magnesio (esperada)	117 x 10 ⁹
Lafti® recubierta con alginato/estearato de magnesio (determinada)	94 x 10 ⁹
Tasa de supervivencia	80 %

Ejemplo 4 (Comparativo)

15 (Compresión)

Se tamizaron 0.98 g de Poliplasdon XL10, (Crosprovidona), 55.09 g de Avicel PH 302 (celulosa microcristalina) y 41.93 g de la preparación Lafti® L10 obtenida de acuerdo con el ejemplo 3 a través de un tamiz de 1 mm y se mezclaron durante 10 minutos con una mezcladora de tambor.

20 La mezcla para comprimidos se comprimió en una compresora (Compres II) en un único punzón, en forma de comprimidos oblongos (22 mm x 9 mm) que pesaban aproximadamente 1400 mg con una fuerza de compresión de 20 kN.

25 Las características de los comprimidos obtenidos fueron las siguientes:

Resistencia al aplastamiento:	254.4 N (determinada con Kraemer UTS 4.1)
Tiempo de desintegración:	52 min 02 s. (según la USP 27, agua desmineralizada)

Ejemplo 5 (Comparativo)

30 Paso 1:

Se colocaron Lafti® L10 (272 g) y estearato de magnesio (48 g) en un frasco de 1 litro y se agitaron durante 20 minutos a 45 rpm (Turbula T2C, Willy A. Bachofen, Basilea, Suiza).

Paso 2:

35 Se preparó una solución de pectina al 3% disolviendo 16.45 g de pectina (pectina GENU® USP/100, 8.83% de contenido de humedad, CP Kelco, Lille Skensved, Dinamarca) en agua desionizada (483.55 g). El producto obtenido en el paso 1, (360 g) se colocó en una granuladora de lecho fluidizado (MP-1 Multi-Processor, Aeromatic-Fielder, Bubendorf, Suiza) y se pulverizó desde la parte superior con la solución de pectina al 3% (216 g) a una velocidad de aproximadamente 1.5 g por minuto. Al final, la preparación Lafti® L10 recubierta con pectina y estearato de magnesio se secó hasta un contenido de humedad por debajo de 4%. La fracción mayor (301 g) del producto quedó en el recipiente de la granuladora, pero una fracción menor de material blancuzco (59 g) quedó retenida en el filtro. Basado en el color (estearato de magnesio: blanco, Lafti: amarillada), el material en el filtro fue predominantemente estearato de magnesio.

La distribución del tamaño de partículas de las fracciones combinadas se presenta en la tabla 7.

Tabla 7: distribución del tamaño de partículas

Tamaño de partícula, micrómetros	> 850	> 800	> 600	> 425	> 355	> 250	> 150	< 150
%	0.1	0	0.35	0.61	2.08	20.38	36.16	40.33

5 Fluidez: La fluidez se determinó registrando el tiempo necesario para que 100 g de la muestra pasaran a través de un embudo con un cuello de 11 cm de diámetro. La fluidez fue de 21 segundos por 100 g, mientras que la preparación Lafti® L10 inalterada no tenía fluidez de polvo.

10 El producto tuvo la composición siguiente que se presenta en la tabla 8.

Tabla 8: composición del producto final obtenido

	%
Lafti® L10	83.47
Estearato de Mg	14.73
Alginato de Na	1.8

15 Cuando se eliminó la fracción menor retenida en el filtro, la distribución del tamaño de partículas del producto fue la que se muestra en la tabla 9.

Tabla 9: distribución del tamaño de partículas

Tamaño de partícula, micrómetros	> 850	> 800	> 600	> 425	> 355	> 250	> 150	< 150
%	0.11	0	0.42	0.73	2.49	24.38	43.25	28.63

20 Fluidez: La fluidez se determinó registrando el tiempo necesario para que 100 g de la muestra pasaran a través de un embudo con un cuello de 11 cm de diámetro. La fluidez fue de 14 segundos por 100 g, mientras que la preparación Lafti® inalterada no tenía fluidez de polvo.

Ejemplo 6

25 (Compactación/recubrimiento en lecho fluidizado)

Paso 1:

30 Se mezclaron estearato de calcio (61.5 g), alfa-tocoferol (8.5 g) y triglicérido de cadena mediana (TCM, 5 g) en un vaso de bohemia, y después se amasaron con un equipo para fabricar pasta (Modelo Atlas 150, fabricado en Italia por, Campodarsego, Italia) hasta obtener una mezcla homogénea. Después la mezcla se mezcló con Lafti® L10 (425 g) y se amasó con el equipo para fabricar pasta hasta que se volvió homogénea y laminada. La mezcla se compactó con una compresora y los comprimidos se trituraron y se pasaron a través de una malla de 1 mm. El proceso se repitió en su totalidad 4 veces. En la última vez, la mezcla se pasó a presión a través de un tamiz de 500 micrómetros para formar partículas granuladas.

Paso 2:

40 Se preparó una solución de alginato disolviendo 33 g de alginato de sodio (13% de contenido de humedad; FMC Biopolymer, Filadelfia, Estados Unidos) en agua desionizada (538.9 g). La preparación Lafti® L10 recubierta con estearato de magnesio (según se obtuvo en el paso 1, 350 g) se colocó en una granuladora de lecho fluidizado (MP-1 Multi-Processor, Aeromatic-Fielder, Bubendorf, Suiza) y se pulverizó desde la parte inferior con la solución de alginato (142.9 g) a una velocidad de aproximadamente 2.3 g por minuto. Al final, el producto se secó hasta un contenido de humedad por debajo de 4%. La fracción de más de 850 micrómetros se eliminó, lo que representó 8.1% del material total. La distribución del tamaño de partículas del resto del material se muestra en la Tabla 10.

45 Tabla 10: distribución del tamaño de partículas.

Tamaño de partícula, micrómetros	> 850	> 800	> 600	> 425	> 355	> 250	> 150	< 150
%	0.1	1.1	26.3	32.5	13.2	16.8	7.2	2.9

El producto final tuvo la composición siguiente que se presenta en la tabla 11.

Tabla 11: composición del producto final obtenido

	%
Lafti® L10	83.3
Estearato de Mg	12.05
Tocoferol	1.67
TCM	0.98
Alginato de Na	2.0

5 Fluidez: La fluidez se determinó registrando el tiempo necesario para que 100 g de la muestra pasaran a través de un embudo con un cuello de 11 cm de diámetro. La fluidez fue de 14 segundos por 100 g, mientras que la preparación Lafti® inalterada no tenía fluidez de polvo.

Ejemplo 7 (Comparativo)

(Mezclado/recubrimiento en lecho fluidizado)

10 Paso 1:
Se colocaron Lafti® L10 (272 g) y estearato de magnesio (48 g) en un frasco de 1 litro y se agitaron durante 20 minutos a 45 rpm (Turbula T2C, Willy A. Bachofen, Basilea, Suiza).

15 Paso 2:
Se preparó una solución de alginato al 3% disolviendo 6.321 g de alginato de sodio (13% de contenido de humedad; FMC Biopolymer, Filadelfia, Estados Unidos) en agua desionizada (176.9 g). Se preparó cloruro de calcio al 5% disolviendo 5 g de cloruro de calcio en agua desionizada (95 g). El producto obtenido en el paso 1, (300 g) se colocó en una granuladora de lecho fluidizado (MP-1 Multi-Processor, Aeromatic-Fielder, Bubendorf, Suiza) y se pulverizó desde la parte superior con la solución de alginato al 3% (180 g) a una velocidad de aproximadamente 1 - 3 g por minuto, y con la solución de cloruro de calcio al 5% (27 g) a una velocidad de 0.5 - 2 g por minuto. Al final, la preparación Lafti® L10 recubierta con alginato y estearato de magnesio se secó hasta un contenido de humedad por debajo de 4% para dar un producto final con la distribución del tamaño de partículas siguiente que se presenta en la tabla 12.

25 Tabla 12: distribución del tamaño de partículas

Tamaño de partícula, micrómetros	> 850	> 800	> 600	> 425	> 355	> 250	> 150	< 150
%	0	0	0.4	11.9	15.6	30.5	29.5	11.9

El producto final tuvo la composición aproximada siguiente que se muestra en la tabla 13.

30 Tabla 13: composición del producto obtenido

	%
Lafti ® L10	83.4
Estearato de Mg	14.7
Alginato de Na/Ca	1.84

Fluidez: La fluidez se determinó según se describe en el ejemplo 1 y fue de 16 segundos por 100 g mientras que la preparación Lafti ® inalterada no tenía fluidez de polvo.

35 Ejemplo 8

(Compresión)

40 Se tamizaron 0.98 g de Poliplasdon XL10, (Crosppovidona), 55.09 g de Avicel PH 302 (celulosa microcristalina) y 41.93 g de la preparación Lafti® L10 obtenida de acuerdo con el ejemplo 6 a través de un tamiz de 1 mm y se mezclaron durante 10 minutos en una mezcladora de tambor.

45 La mezcla para comprimidos se comprimió en una compresora (Compres II) en un único punzón, en forma de comprimidos oblongos (22 mm x 9 mm) que pesaban aproximadamente 1400 mg con una fuerza de compresión de 20 kN.

Las características de los comprimidos obtenidos fueron las siguientes:

Resistencia al aplastamiento: 254.4 N (determinada con Kraemer UTS 4.1)

5 Ejemplo 9

El objetivo de los ensayos fue validar la formulación Lafti y el proceso a escala piloto, y su posible extrapolación a escala productiva.

10 Indicaciones de la premezcla

Se realizaron tres ensayos para determinar la sensibilidad de la premezcla a la cantidad de aceite según se presenta en la tabla 14.

15 Tabla 14: composición de las tres premezclas preparadas

	A	D	F
Tamaño del lote	10.1 kg	9.9 kg	10.2 kg
dl-alfa-tocoferol	13.1%	12.1%	13.7%
TCM	7.7%	7.1%	8.1%
Estearato de calcio	79.2%	80.8%	78.2%
Depósito en la pared	no	no	no
Depósito en el propulsor	no	no	no

La mezcla de aceite se pulverizó sobre el estearato de calcio, que se mezcló en una mezcladora de alto cizallamiento a 150 rpm. La mezcladora de alto cizallamiento se pudo vaciar en cada caso sin problema (no hubo depósitos). La premezcla no tuvo grumos y no fue necesario tamizar.

20 Mezcla de polvos

La mezcla de polvos (Lafti L10/premezcla) también se realizó en una mezcladora de alto cizallamiento con las indicaciones siguientes presentadas en la tabla 15.

25 Tabla 15: mezclas de polvos realizadas partiendo de las tres premezclas

Ensayo	B	C	E	G
Lote de premezcla	A	A	D	F
Kg de premezcla	1.237	1.237	1.236	1.238
Kg de Lafti L10	7	7	7	7

Después la mezcla de polvos se compactó en una compactadora Bepex. Presión utilizada: 5 – 20 kN, cantidad de pasadas: 2

30 El material comprimido se tamizó después según se presenta en la tabla 16, el tamiz rotatorio utilizado para los 2 últimos ensayos permitió tamizar 8 – 9 kg en menos de 5 minutos.

Tabla 16: Condiciones de tamizado de los cinco ensayos

Ensayo	B	C	E	G
Tamiz	Vibratorio, 500	Vibratorio, 500	Rotatorio, 500	Rotatorio, 500

35 El material compactado/tamizado se recubrió en un equipo para recubrimiento de lecho fluidizado (Aeromatic). Se usó la configuración de pulverización desde la parte inferior. Se encontró que una solución de alginato al 4% era la mejor para ser pulverizada fácilmente. La tabla 17 proporciona una visión general de las características del proceso utilizado en cada ensayo.

ES 2 368 344 T3

Tabla 17: proceso utilizado para cada ensayo

Ensayo	B	C	E	G
Lecho	Compactado B	Compactado C	Compactado E	Compactado G
cantidad	7 kg	7 kg	7 kg	7 kg
Alginato pulverizado	3070 g	3240 g	3100 g	3240 g
T° de pulverización	21 - 28 °C	20 - 26 °C	21 - 27 °C	20 - 26 °C
T° de secado	hasta 37.5 °C	hasta 38.2 °C	hasta 38.0 °C	hasta 39.5 °C
Tiempo de pulverización	155 min	169 min	151 min	159 min
Tiempo de secado	50 min	91 min	69 min	81 min
Rendimiento	80.7%	92.6%	96.3%	89.4%

Calidad del producto final

- 5 Todos los productos obtenidos tuvieron propiedades de flujo de buenas a muy buenas y fueron fáciles de usar para preparar comprimidos con buenas propiedades. La densidad del producto es alta lo que es bueno para su envasado.

Los gránulos obtenidos no son higroscópicos y se pueden dejar al aire durante varios días sin que se peguen entre sí. La distribución del tamaño de partícula es buena especialmente en el ensayo C.

- 10 La medición de la tasa de supervivencia después del proceso de granulación y después del proceso de compresión es buena y es semejante a los datos obtenidos en la tabla 3 o 6.

La tabla 18 proporciona una visión general de las características de los productos preparados en los cinco ensayos.

15

Tabla 18: características de los productos preparados en los cinco ensayos

	B	C	E	G
Actividad de agua (60 min)	0.133	0.045	0.127	0.051
Contenido de humedad (%)				
(4 g/70 °C/30 min)	3.65	3.08	3.42	3.07
(4 g/70 °C/60 min)	4.12	3.51	3.89	3.49
Tamaño de partícula (%)				
>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
Comprimidos (20 KN)	168.3	165.4	163.3	176
Densidad aparente (ml/g)	0.5	0.53	0.53	0.48
Densidad compactada	0.61	0.63	0.65	0.56
Fluidez 14 mm	1000	1000	1200	1000
Fluidez 11 mm	462	429	545	500
Fluidez 9 mm	240	240	273	250
Fluidez 7 mm	125	128	150	136

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un proceso para la fabricación de una composición sólida que contiene un microorganismo, donde dicho proceso comprende un primer paso en el que se compacta el microorganismo con una sal de un ácido graso de cadena mediana o larga para preparar un granulado compactado, y un segundo paso en el que se proporciona recubrimiento a dicho granulado compactado.
- 10 2. Un proceso como el de la reivindicación 1 donde la sal del ácido graso de cadena mediana o larga es estearato de magnesio.
3. Un proceso como el de la reivindicación 1 o 2 donde la sal del ácido graso de cadena mediana o larga es estearato de calcio.
- 15 4. Un proceso como el de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 donde el paso de compactación se lleva a cabo en presencia de un aceite comestible.
5. Un proceso como el de la reivindicación 4 donde el aceite comestible se selecciona entre los triglicéridos de cadena mediana y los tocoferoles, y sus mezclas.
- 20 6. Un proceso como el de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 donde el recubrimiento es provisto por un alginato.
7. Un proceso como el de la reivindicación 6 donde el recubrimiento se aplica por pulverización de una solución acuosa de alginato sobre dicho granulado compactado.
- 25 8. Un proceso como el de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 donde el microorganismo es un probiótico o una de sus mezclas.
- 30 9. Un proceso como el de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 donde el microorganismo es una preparación liofilizada.
10. Un proceso como el de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 donde el microorganismo utilizado en el paso de compactación está recubierto por, o incorporado en, un material matricial.
- 35 11. Un proceso como el de la reivindicación 10 donde el material matricial se selecciona entre proteínas, maltodextrinas, trehalosa y/o ácido ascórbico.
- 40 12. Un proceso como el de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 donde el microorganismo es un *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium* o *Enterococcus*.
- 45 13. Un proceso como el de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 donde el microorganismo se selecciona del grupo que consiste en *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, preferentemente *Lactobacillus acidophilus* CBS 116411, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei*, preferentemente *Lactobacillus casei* CBS 116412, *Lactobacillus paracasei* y *Lactobacillus helveticus*.
14. Un proceso como el de la reivindicación 13 donde el microorganismo se selecciona del grupo que consiste en *Lactobacillus acidophilus* cepa CBS 116411, un *Bifidobacterium animalis* y *Lactobacillus casei* CBS 116412.
- 50 15. Un proceso como el de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 para mejorar la fluidez y/o reducir la higroscopicidad de las composiciones sólidas de microorganismos.
- 55 16. Una composición sólida que contiene un microorganismo o una de sus mezclas, una sal de un ácido graso de cadena mediana o larga y un material de recubrimiento, que se puede obtener mediante el proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15.
- 60 17. Una composición sólida que contiene un microorganismo compactado que está recubierto por y compactado, o incorporado en y compactado, una sal de un ácido graso de cadena mediana o larga, donde el microorganismo tiene una primera capa de recubrimiento por debajo del recubrimiento constituido por la sal del ácido graso de cadena mediana o larga, y donde dicha composición tiene un recubrimiento externo que sustancialmente no contiene ningún material que esté presente en la composición.
18. Una composición como la de las reivindicaciones 16 o 17 donde el microorganismo es una preparación liofilizada.

19. Una composición como la de la reivindicación 17 donde la primera capa de recubrimiento fue provista por el tratamiento de una suspensión de células del microorganismo con proteínas, maltodextrinas, trehalosa y ácido ascórbico.
- 5 20. Una composición como la de la reivindicación 16 o 19 que está en forma de un granulado.
21. Una composición como la de cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19 que está en forma de un comprimido.
- 10 22. Una composición como la de cualquiera de las reivindicaciones 16 a 21 donde la sal del ácido graso de cadena mediana o larga es estearato de magnesio o estearato de calcio y el recubrimiento externo es alginato de sodio.
23. Una composición como la de cualquiera de las reivindicaciones 16 a 22 donde el microorganismo es un probiótico o una de sus mezclas.
- 15 24. Una composición como la de la reivindicación 21 donde el microorganismo es un *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium* o *Enterococcus*.
- 20 25. Una composición como la de la reivindicación 24 donde el microorganismo se selecciona del grupo que consiste en *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, preferentemente *Lactobacillus acidophilus* CBS 116411, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei*, preferentemente *Lactobacillus casei* CBS 116412, *Lactobacillus paracasei* y *Lactobacillus helveticus*.
- 25 26. Una composición como la de la reivindicación 25 donde el microorganismo se selecciona del grupo que consiste en *Lactobacillus acidophilus* CBS 116411, *Lactobacillus casei* CBS 116412 y un *Bifidobacterium animalis*.
27. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 16 a 26, donde la actividad de agua está comprendida entre 0.04 y 0.3.
- 30 28. Un alimento que contiene una composición como la obtenida mediante el proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 o la reivindicada en cualquiera de las reivindicaciones 16 a 27.
- 35 29. Un alimento de acuerdo con la reivindicación 28 que es leche cultivada, yogurt, queso, leche en polvo, coberturas definidas como mezclas de aceite, azúcares y proteína láctea como suero de leche, leches maternizadas, productos cárnicos fermentados o una bebida como bebidas lácteas, bebidas para deportistas, jugos de frutas o bebidas a base de frutas.
- 40 30. Un medicamento, un nutracéutico, un ingrediente nutricional natural o un ingrediente natural que contiene una composición como la que se puede obtener mediante el proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 o la reivindicada en cualquiera de las reivindicaciones 16 a 27.