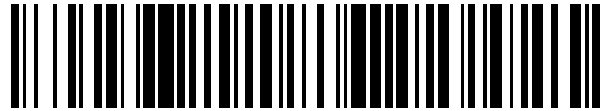


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 425 385**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.04.2010 E 10720990 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2013 EP 2424972**

54 Título: **Crioprotectores para la liofilización de las bacterias de ácido láctico**

30 Prioridad:

**30.04.2009 EP 09100265**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**15.10.2013**

73 Titular/es:

**ACTOGENIX N.V. (100.0%)  
Technologiepark 4  
9052 Zwijnaarde, BE**

72 Inventor/es:

**CORVELEYN, SAM;  
DHAESE, PATRICK;  
NEIRYNCK, SABINE y  
STEIDLER, LOTHAR**

74 Agente/Representante:

**LAZCANO GAINZA, Jesús**

**ES 2 425 385 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

Crioprotectores para la liofilización de las bacterias de ácido láctico.

La presente invención se relaciona con el uso de una nueva combinación de crioprotectores para aumentar la viabilidad de las bacterias de ácido láctico después de la liofilización, mejorando la textura de la torta liofilizada para un triturado más fácil y mejorar la estabilidad a largo plazo de las bacterias liofilizadas a diferentes condiciones de temperatura.

### CAMPO DE LA INVENCION

La invención pertenece al campo de la producción de bacterias liofilizadas, particularmente bacterias de ácido láctico. Más particularmente, la invención se relaciona con el uso de una nueva combinación de crioprotectores para aumentar la viabilidad de las bacterias después de la liofilización, mejorando la textura de la torta liofilizada para un triturado más fácil y mejorar la estabilidad a largo plazo de las bacterias liofilizadas a diferentes condiciones de temperatura. La invención se relaciona adicionalmente con el uso de tales bacterias liofilizadas en la industria alimentaria o en aplicaciones para la salud humana o animal. Más particularmente, la invención se relaciona con el aumento de la viabilidad y el almacenamiento a largo plazo de bacterias recombinantes capaces de expresar proteínas o péptidos heterólogos y administradas a seres humanos o animales con fines terapéuticos o de vacunación.

### ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las bacterias de ácido láctico (LAB) son un grupo de bacterias Gram-positivas taxonómicamente diversas, capaces de convertir hidratos de carbono fermentables principalmente a ácido láctico, lo que acidifica el medio de crecimiento en el proceso. Generalmente, las especies de LAB son más conocidas por su uso en la industria alimentaria, principalmente en la preparación de alimentos fermentados tales como los productos lácteos y ciertos tipos de carne. La importancia comercial de la industria de la fermentación láctea, que abarca la producción de por ejemplo queso, yogur y crema ácida, es bien conocida en todo el mundo.

En las últimas décadas, el interés por las LAB se ha incrementado dramáticamente. El hecho de que cepas seleccionadas de LAB pueden influir en la fisiología intestinal es ampliamente reconocido. Ha habido un creciente interés por *L. lactis* como huésped para la producción de proteínas heterólogas, y eventualmente para la producción in situ y como sistema de suministro de moléculas biológicamente activas (ver más abajo).

En la actualidad, se ha dirigido mucho esfuerzo hacia el uso de especies de LAB modificadas genéticamente (GM) como herramientas de producción y suministro para la administración de fármacos biológicos por vía tópica, a la mucosa, que incluye citoquinas, fragmentos de anticuerpos, factores de crecimiento, hormonas y neuropéptidos. (por ejemplo, [6-12]). Particularmente, se eligió la bacteria de grado alimenticio genéticamente modificada *Lactococcus lactis* (*L. lactis*) como el microorganismo preferido para el suministro terapéutico de polipéptidos biológicamente activos. Claramente, el concepto de suministro por vía oral de una proteína terapéutica con cepas de *L. lactis* modificadas genéticamente abre posibilidades emocionantes. Sin embargo un atributo necesario de cualquier producto farmacéutico es la estabilidad a largo plazo (vida en estante), típicamente al menos 24 meses bajo condiciones de almacenamiento predefinidas. Para este fin, se necesita desarrollar una plataforma de fabricación eficiente, escalable y confiable para formulaciones de Sustancia Fármaco (DS) y Producto Fármaco (DP) basadas en *L. lactis* genéticamente modificadas.

Durante la fabricación y el almacenamiento posterior, el parámetro crítico para la estabilidad del producto es la viabilidad a largo plazo de las bacterias genéticamente modificadas (expresada normalmente como unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo en función del tiempo de almacenamiento). La fabricación, el almacenamiento y el probable uso terapéutico de las cepas de LAB imponen un estrés significativo a las bacterias [4]. En entornos industriales, las LAB puede preservarse y distribuirse en forma líquida, secada por aspersión, congeladas o liofilizadas (congeladas y secadas). Aunque puede ser adecuado el uso de todas estas preparaciones como cultivos iniciales en la industria alimentaria, cada vez se pone más énfasis en los métodos de conservación a largo plazo que promuevan una viabilidad celular y una actividad metabólica elevadas, ya que estos parámetros se consideran un requisito previo para las aplicaciones (bio)farmacéuticas. Con el fin de maximizar la supervivencia, la adición a la biomasa de crioprotectores seleccionados y la posterior liofilización son etapas cruciales, especialmente considerando el hecho de que las bacterias viables y metabólicamente activas son un requisito absoluto para inducir el efecto terapéutico deseado in situ.

La liofilización es ampliamente considerada como uno de los procesos de deshidratación más adecuados para bacterias, con el objetivo de lograr una formulación final sólida y estable [4]. Es uno de los métodos más comunes para almacenar cultivos de células microbianas, aún cuando las tasas de supervivencia después de la liofilización y durante el almacenamiento pueden variar entre cepas [5]. La supervivencia después de la liofilización refleja la capacidad de las células para resistir los efectos de congelación y secado rápidos, tales como la oxidación de lípidos de membrana y el daño celular en varios sitios diana [5]. Es bien conocido que la liofilización de bacterias sin protección mata la mayoría de ellas, y aquellas que sobreviven, mueren rápidamente tras el almacenamiento. Por lo tanto se han realizado varios intentos para aumentar el número de bacterias sobrevivientes tras la liofilización y el almacenamiento, con un éxito limitado (ver más abajo).

La liofilización es con mucho, si no exclusivamente, el método más frecuentemente utilizado para lograr una vida en estante a largo plazo [16]. La elección de una mezcla adecuada de medio de secado/crioprotector es crítica para aumentar la tasa de supervivencia de las LAB durante la liofilización y posterior almacenamiento [4]. Se han informado  
5 varios estudios que intentan aumentar la tasa de supervivencia de las LAB durante la liofilización y/o posterior almacenamiento (para una revisión, ver [4]). Sin embargo, ninguna de estas publicaciones demuestran una suficiente estabilidad a largo plazo (es decir > 80% de supervivencia después de un año) de las bacterias liofilizadas, como se requiere para las aplicaciones farmacéuticas, particularmente a temperatura ambiente (25 °C) o a 2 - 8 °C

Para la mayoría de los cultivos de LAB de interés comercial para la industria láctea, la leche desnatada en polvo se selecciona como medio de secado porque estabiliza los constituyentes de las membranas celulares, facilita la rehidratación y forma un revestimiento protector sobre las células [4]. Suplementar la leche desnatada con agentes crioprotectores adicionales puede aumentar su efecto protector intrínseco. Font de Valdez y otros describen el efecto protector del adonitol al 10% en leche desnatada, sobre 12 cepas de LAB sometidas a liofilización [17]. Aunque se informan elevadas tasas de supervivencia durante la liofilización (que varían de 42-100%, dependiendo de la cepa), no se proporcionaron datos sobre la estabilidad a largo plazo. Castro y otros evaluaron los efectos beneficiosos de la leche desnatada (11%) o la trehalosa (5%) sobre la supervivencia de *Lactobacillus bulgaricus* después de la liofilización, mostrando tasas de retención del 25% (conteo de células viables) en comparación con ~ 1% en agua sola [18]. Nuevamente, no se informaron datos sobre la estabilidad durante el almacenamiento posterior.

Carvalho y otros (2003) demostraron el efecto estabilizador tanto del sorbitol como del glutamato (mono)sódico (MSG), cada uno añadido por separado a las LAB suspendidas en leche desnatada, sobre la supervivencia durante la liofilización y posterior almacenamiento de 3-6 meses [19]. Sin embargo, a pesar del hecho de que la estabilidad se incrementó en comparación con la leche desnatada sola, las tasas de supervivencia informadas en presencia de sorbitol o MSG eran todavía muy bajas (<0.1%). Además, la supervivencia a largo plazo de las células liofilizadas, almacenadas en recipientes cerrados a 20 °C al aire y mantenidas en la oscuridad hasta 8 meses, mostró una disminución significativa de uno o más registros en el tiempo.

Carcoba y Rodríguez estudiaron los efectos de diversos compuestos, añadidos de manera individual a la leche desnatada reconstituida (RSM), sobre la supervivencia celular y la actividad metabólica de *L. lactis* después de la liofilización [16]. Encontraron que los azúcares trehalosa y sacarosa, los polioles sorbitol y adonitol, así como también los aminoácidos β-alanina y ácido glutámico, eran capaces de aumentar la viabilidad celular por encima del 44.3% registrada en RSM sola. Sin embargo, las tasas de supervivencia reales con los medios suplementados no se incluyeron, y no se revelaron los datos de almacenamiento a largo plazo.

Como ejemplo final, un estudio realizado por Huang y otros desarrolló y optimizó un medio de protección para *Lactobacillus delbrueckii*, lo que resultó en un 86% de viabilidad celular después de la liofilización [20]. La composición de este medio fue: sacarosa 66.40 g/l, glicerol 101.20 g/l, sorbitol 113.00 g/l, y leche desnatada 130.00 g/l. Nuevamente, no se informaron resultados de la estabilidad a largo plazo.

Huyghebaert y otros se propusieron desarrollar una formulación de polvo liofilizado que contuviera bacterias de *L. lactis* GM viables con una vida media aceptable [21]. Para investigar la influencia de la matriz de la liofilización, se usaron dos medios diferentes; caldo de cultivo M17 suplementado con 0.5% de glucosa (con el fin de obtener GM17), o 10% (p/v) de leche desnatada suplementada con 0.5% de glucosa y 0.5% de un hidrolizado de caseína (con el fin de obtener leche GC). Después de la liofilización, se evaluó la influencia de los parámetros de liofilización, la matriz de liofilización y diferentes condiciones de almacenamiento sobre la viabilidad a corto y largo plazo.

Cuando se liofilizó en caldo de cultivo GM17 convencional, la viabilidad absoluta fue menor que el 10%, mientras que la liofilización en la matriz leche GC resultó en una viabilidad significativamente más elevada (60.0 ± 18.0%). Sin embargo, a pesar de varios intentos de estandarizar el procedimiento de liofilización, no pudo evitarse una variabilidad significativa lote a lote.

Los estudios de estabilidad a corto plazo mostraron que la viabilidad ya había disminuido ± 20% después de la liofilización y el almacenamiento durante 1 semana (matriz de leche GC). En los estudios de estabilidad a largo plazo, la viabilidad relativa disminuyó grandemente después de 1 mes de almacenamiento, seguido de una disminución logarítmica durante los meses posteriores de almacenamiento (matriz de leche GC, diversas condiciones de almacenamiento), lo que indica que no se pudo lograr la estabilidad a largo plazo.

Teniendo en cuenta el estado anterior de la técnica en su totalidad, es obvio que la leche desnatada es un componente recurrente de los medios de liofilización para las LAB, y así parece ser esencial para la viabilidad bacteriana. Sin embargo, no se recomienda el uso de derivados de la leche en nuevas composiciones farmacéuticas, especialmente en vista del riesgo de encefalopatía espongiforme transmisible (TSE) asociado con su uso.

Junto con una viabilidad elevada después de la producción, las LAB liofilizadas deben tener además una vida media a largo plazo aceptable para las aplicaciones farmacéuticas. Las composiciones bacterianas secas estabilizadas se describen por ejemplo en US 2005/0100559, US 3897307 y W02004/065584. En US 2005/0100559 las composiciones bacterianas secas se caracterizan porque ellas comprenden una fracción grande de estabilizantes. Ver por ejemplo

- [055] en US 2005/0100559, en donde los estabilizantes representan al menos 40% (p/v). En WO2004/065584 la sacarosa o sacarosa y maltodextrina se muestran para mejorar la estabilidad de un cultivo celular bacteriano, pero sólo a -20°C. En esta referencia no hay ninguna indicación sobre cómo mejorar la vida media a largo plazo (a temperatura ambiente) para una composición que comprende bacterias liofilizadas. En US3897307, todos los experimentos comienzan a partir de un cultivo de diferentes especies de *Lactobacillus* en la leche sin grasa que es posteriormente liofilizada, opcionalmente en presencia de potenciadores de estabilización seleccionados a partir de ácido L-ascórbico, que incluye sales comestibles del mismo, y el ácido glutámico o ácido aspártico, que incluye las sales de los mismos. Como tal, los componentes de la leche son un constituyente importante de las composiciones bacterianas secas estabilizadas.
- En otras palabras ninguna de las técnicas anteriores se refiere a la sustitución de los componentes de la leche con una supervivencia y estabilidad suficientes en condiciones de almacenamiento en estantes a largo plazo. De hecho, la mayoría de estos estudios carecen de datos precisos sobre la viabilidad inicial, la estabilidad y la densidad bacteriana. Finalmente, ninguno de ellos informa sobre la liofilización de las bacterias GM y/o el mantenimiento de sus propiedades.

### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- Figura 1:** Conteo de células viables (expresado en unidades formadoras de colonias [UFC]/g) de la cepa de *L. lactis* sAGX0037 usando diferentes mezclas de crioprotectores: datos inmediatamente después de la liofilización y después de la exposición a 25°C/35% de HR durante 24 horas. En la Tabla 1 se describe la composición detallada de las mezclas de crioprotectores.
- Figura 2:** Conteo de células viables (expresado en unidades formadoras de colonias [UFC]/g) de la cepa de *L. lactis* sAGX0037 usando diferentes mezclas de crioprotectores: datos inmediatamente después de la liofilización y después de la exposición a 25°C/35% de HR durante 24 horas. En la Tabla 3 se describe la composición detallada de las mezclas de crioprotectores.
- Figura 3:** Conteo de células viables (expresado en unidades formadoras de colonias [UFC]/g) de la cepa de *L. lactis* sAGX0037 usando una mezcla de crioprotectores Z4 (20% de glutamato sódico, 10% de sorbitol y 10% de dextrano 500), liofilizada a una temperatura de estante final de 25°C y 35°C: datos inmediatamente después de la liofilización y después de la exposición a 25°C/35% de HR durante 4 y 24 horas. En la Tabla 4 se describe la composición detallada de las bacterias y la composición de la mezcla de crioprotectores.
- Figura 4:** Efecto estabilizante de una combinación de glutamato sódico, dextrina (a partir de almidón de maíz) y sorbitol sobre la cepa de *L. lactis* sAGX0037 durante la liofilización y el almacenamiento a largo plazo en 3 condiciones diferentes de almacenamiento: -20°C, 5°C y 25°C/60% de HR en bolsas PET/ALU. En la Tabla 5 se describe la composición detallada de las bacterias y la composición de la mezcla de crioprotectores.

### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención comprende el descubrimiento y el desarrollo de una composición de crioprotectores efectiva, que no contiene leche desnatada o cualquier otro compuesto derivado de animales, para lograr una estabilidad a largo plazo de las bacterias de ácido láctico liofilizadas (LAB), a diferentes temperaturas, de manera que la retención de la viabilidad de las LAB liofilizadas después de 6 meses de almacenamiento, preferentemente después de 9 meses de almacenamiento, con mayor preferencia después de 12 meses de almacenamiento es mayor que 50%, preferentemente mayor que 60%, con mayor preferencia mayor que 70%, aún con mayor preferencia mayor que 80%. La principal ventaja de la formulación de la composición de crioprotectores es proporcionar protección a las bacterias altamente sensibles durante la liofilización, durante la exposición a corto plazo a condiciones operacionales normales de fabricación, y durante el almacenamiento a largo plazo después del envasado.

La presente invención proporciona una combinación de agentes estabilizantes (crioprotectores), lo que resulta en una alta supervivencia de las LAB tras su liofilización, molienda y tamizado de las tortas liofilizadas y su almacenamiento posterior. Con el fin de maximizar la supervivencia, se añade una combinación de diferentes compuestos estabilizadores (crioprotectores) a la biomasa bacteriana antes de la liofilización. Esta combinación de compuestos estabilizantes, que comprende un hidrolizado de almidón y una sal de ácido glutámico y/o un poliol, resulta en un incremento de la supervivencia y la estabilidad de las LAB liofilizadas. Particularmente, la invención se relaciona con el uso de una nueva combinación de crioprotectores para aumentar la viabilidad de las bacterias después de la liofilización, mejorar la textura de la torta liofilizada para una molienda fácil y mejorar la estabilidad a largo plazo de las bacterias liofilizadas a diferentes condiciones de temperatura.

Como se explica en detalle en los ejemplos de aquí en adelante, después de la liofilización en presencia de la mezcla de crioprotectores seleccionada se obtuvieron elevados rendimientos de células viables ( $>6 \times 10^{11}$  unidades formadoras de colonias [UFC]/g). Sorprendentemente, la viabilidad de estas células liofilizadas no se afectó por la exposición a condiciones ambientales (imitando los procesos posteriores a la formulación farmacéutica y la producción [por ejemplo, el llenado de cápsulas]) durante 24 horas (25°C/35% de HR), y la conservación a largo plazo de la viabilidad celular se observó en diferentes condiciones de almacenamiento.

- Las combinaciones de crioprotectores que contienen ya sea glutamato sódico o sorbitol y dextrano, combinados con crioprotectores bien conocidos tales como la trehalosa y la sacarosa, resultó en rendimientos de células viables inmediatamente después de la liofilización comparables con la formulación preferida de crioprotectores (código D).
- 5 Estudios de exposición a corto plazo demostraron claramente que las formulaciones de crioprotectores que comprenden dicha combinación de un hidrolizado de almidón y una sal de ácido glutámico y/o un poliol, protegen a las bacterias liofilizadas de *L. lactis* tras el almacenamiento sin protección durante 24 horas a 25°C y 35% de HR. En la invención, la sal del ácido glutámico es preferentemente un glutamato sódico. El poliol de la invención es preferentemente sorbitol o manitol, mientras que el hidrolizado de almidón de la invención es preferentemente un dextrano.
- 10 Los resultados del análisis de supervivencia de la cepa de *Lactococcus lactis* (*L. lactis*) sAGX0037, determinada por conteo de células viables en las muestras liofilizadas así como también en muestras expuestas al aire, indicaron que una combinación preferida (código D) de un hidrolizado de almidón (por ejemplo dextrano 500), glutamato de sodio y un poliol (por ejemplo manitol) (como se presenta en los Ejemplos 1, 2 y 3), protegió las bacterias de *L. lactis* tras el almacenamiento sin protección por 24 horas a 25°C y 35% de HR.
- 15 En comparación con una formulación de sacarosa, que se conoce como un "estándar de oro" para la estabilización de LAB liofilizadas, la combinación de 3 crioprotectores es claramente superior tras el almacenamiento, y es la única combinación de estabilizadores que resulta en conteos de células viables de  $> 6 \times 10^{E+11}$  UFC/g tras la exposición a corto plazo a 25°C/35% de HR. Cuando se añadió glutamato sódico solo a las bacterias, tras la exposición a corto plazo, no se observó supervivencia de las bacterias.
- 20 La combinación de crioprotectores de un hidrolizado de almidón (por ejemplo, dextrina a partir de almidón de maíz), glutamato sódico y un poliol (por ejemplo, sorbitol), conduce a un polvo de LAB liofilizado estable, que asegura la estabilidad y la supervivencia a largo plazo de las bacterias viables (no se observó una disminución significativa en el conteo de células viables en las tortas liofilizadas molidas y tamizadas almacenadas a -20 °C y 5 °C, y  $> 90\%$  del conteo inicial de células viables se conservó durante 1 año de almacenamiento, lo que resultó en concentraciones muy elevadas de UFC de hasta  $> 5 \times 10^{E+11}$  UFC /g). A 25 °C, 60% de HR, sólo se observó una ligera disminución en el
- 25 conteo de células viables, aún dando lugar a altas concentraciones de UFC, hasta  $> 3 \times 10^{E+11}$  CFU/g después de 1 año de almacenamiento a 25°C/60% de HR.

Es por lo tanto un objetivo de la presente invención proporcionar una composición bacteriana liofilizada que comprende la combinación de un hidrolizado de almidón, una sal de ácido glutámico y un poliol. Como resulta evidente a partir de

30 los ejemplos de aquí en adelante, la cantidad de hidrolizado de almidón usada en dicha composición es de aproximadamente 2,0% a aproximadamente 10% (p/v); particularmente de aproximadamente 2,5% a aproximadamente 5% (p/v). La cantidad de la sal del ácido glutámico usada en dicha composición es de aproximadamente 2,0% a aproximadamente 10% (p/v); en particular de aproximadamente 5,0% a aproximadamente 7,5% (p/v). La cantidad de poliol usada en dicha composición es de aproximadamente 5,0% a aproximadamente 30% (p/v); en particular de

35 aproximadamente 10% a aproximadamente 20% (p/v); más en particular de aproximadamente 7,5% a aproximadamente 15% (p/v).

Los 'polioles' como se usa en la presente, generalmente se refiere a una mezcla de varios alcoholes de azúcares, tal como sorbitol, maltitol, y manitol, entre otros. Este se hidroliza a partir de almidón de maíz, almidón de papa, o almidón

40 de trigo, que se descompone en pequeñas unidades tales como glucosa, dextrina, malto-dextrina, y polidextrina, por las enzimas amilasa. En una etapa de hidrogenación posterior, dichas unidades más pequeñas se convierten en los alcoholes de azúcar, tales como sorbitol, maltitol, manitol, y sacáridos hidrogenados de cadena más larga (tal como maltitriitol). En una modalidad particular de la presente invención el poliol es manitol, sorbitol o una combinación de sorbitol y manitol. En dicha modalidad cada uno de dichos polioles, es decir sorbitol o manitol, está cada uno presente en una cantidad de aproximadamente 5,0% a aproximadamente 15% (p/v); en particular de aproximadamente 7,0% a

45 aproximadamente 15% (p/v). En aún una modalidad adicional cada uno de dichos componentes polioles están presentes en la misma cantidad, es decir a aproximadamente 7%, 8%, 9%, 10%, 11 %, 12%, 13%, 14% o 15% (p/v).

Las 'sales de ácido glutámico' como se usa en la presente, se refiere generalmente al ácido glutámico y sus sales solubles en agua comestibles. Dichas sales "comestibles" son aquellas aprobadas para uso en alimentos para seres humanos y son de grado alimenticio, tales como las sales de sodio y/o potasio del ácido glutámico. En una modalidad

50 particular de la presente invención, la sal del ácido glutámico es glutamato monosódico, también conocido como glutamato sódico y MSG. En aún una modalidad adicional dicho glutamato sódico está presente de aproximadamente 2,0% a aproximadamente 10% (p/v); en particular de aproximadamente 5,0% a aproximadamente 7,5% (p/v).

Los 'hidrolizados de almidón' como se usa en la presente se refiere generalmente a los productos de hidrolización de polisacáridos ramificados que consiste en un gran número de unidades de glucosa, tal como almidón, o dextrano. En el

55 almidón, las unidades de construcción consisten en el amilosa lineal y helicoidal, y la amilopectina ramificada. En el dextrano, la cadena recta consiste de enlaces  $\alpha$ -1,6 glicosídicos entre moléculas de glucosa, mientras que las ramificaciones comienzan a partir de enlaces  $\alpha$ -1,4 (y, en algunos casos, enlaces  $\alpha$ -1,2 y  $\alpha$ -1,3 también). En una modalidad particular los hidrolizados de almidón como se usa en la presente constan de uno cualquiera de dextrano, 1, dextrano, 5, dextrano 10, dextrano 20, dextrano, 40, dextrano 60, dextrano 70, dextrano 110, o dextrano 500, en donde el número se refiere al peso molecular normativo expresado en kDa; en una modalidad más particular el hidrolizado de

60

almidón es dextrano 500. En aún una modalidad adicional dicho dextrano está presente de aproximadamente 2,0% a aproximadamente 10% (p/v); en particular de aproximadamente 2,5% a aproximadamente 5% (p/v).

5 Como se usa en la descripción de la invención y ejemplos, las formas del singular "un", "una", y "el/la" incluyen los referentes en singular y plural a menos que el contexto lo especifique claramente de cualquier otra forma. A modo de ejemplo, "una célula" se refiere a una o más de una célula.

Los términos "que comprende", "comprende" y "compuesto de" como se usa en la presente son sinónimos con "que incluyen", "incluye" o "que contiene", "contiene", y son inclusivos o abiertos y no excluyen miembros, elementos o etapas del método no mencionados, adicionales.

10 La enumeración de intervalos numéricos por puntos finales incluye todos los números y fracciones abarcadas dentro de ese intervalo, así como también los puntos finales enumerados.

15 El término "aproximadamente" como se usa en la presente cuando se refiere a un valor medible tal como un parámetro, una cantidad, una duración temporal, y similares, abarca las variaciones de +/-20% o menos, preferentemente +/-10% o menos, con mayor preferencia +/-5% o menos, aún con mayor preferencia +/-1% o menos, y aún con mayor preferencia +/-0.1% o menos del valor especificado, en tanto tales variaciones son adecuadas para llevar a cabo de la invención descrita.

Todos los documentos citados en la presente descripción se incorporan en su totalidad como referencia en la presente. En particular, las enseñanzas de todos los documentos a los que se hace referencia en la presente se incorporan como referencia.

20 A menos que se defina de cualquier otra forma, todos los términos usados para describir la invención, incluyendo términos técnicos y científicos, tienen el significado comúnmente comprendido por el experto en la técnica a la que pertenece la invención. A modo de una guía adicional, las definiciones siguientes se incluyen para apreciar mejor la enseñanza de la presente invención.

25 El término "ácido nucleico recombinante" se refiere generalmente a un ácido nucleico que se compone de segmentos unidos entre sí mediante tecnología de ADN recombinante. Cuando un ácido nucleico recombinante se replica en un organismo huésped, la progenie de ácidos nucleicos se incluye además dentro del término "ácido nucleico recombinante".

30 Los trabajos de referencia estándares que exponen los principios generales de la ingeniería genética incluyen Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2da ed., vol. 1-3, ed. Sambrook y otros, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; Current Protocols in Molecular Biology, ed. Ausubel y otros, Greene Publishing and Wiley-Interscience, Nueva York, 1992 (con actualizaciones periódicas) ("Ausubel y otros 1992"); Innis y otros, PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press: San Diego, 1990. Los principios generales de la microbiología se exponen, por ejemplo, en Davis, B. D. y otros, Microbiology, 3ra edición, Harper & Row, publishers, Filadelfia, Pa. (1980).

35 El término "heterólogo", cuando se refiere a la relación entre un ORF dado y un promotor, significa que normalmente dicho promotor no está asociado con este, es decir, normalmente no controla la transcripción de dicho ORF en la naturaleza. En otras palabras, la asociación se crea por técnicas de ADN recombinante en los ácidos nucleicos recombinantes de la invención.

40 El término 'bacteria de ácido láctico' se refiere generalmente a una bacteria seleccionada del grupo que consiste de una especie de *Lactococcus*, una especie de *Lactobacillus*, una especie de *Streptococcus*, una especie de *Pediococcus*, una especie de *Bifidobacterium* y una especie de *Leuconostoc* y abarca cualquier taxón (por ejemplo, especies, subespecies, cepa) clasificado como perteneciente a las mismas en la técnica

45 El término "*Lactococcus*" se refiere generalmente al género *Lactococcus* y abarca cualquier taxón (por ejemplo, especies, subespecies, cepa) clasificado como perteneciente a las mismas en la técnica. A modo de ejemplo, *Lactococcus* incluye las especies *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus piscium*, *Lactococcus plantarum* y *Lactococcus raffinolactis*, y cualquier subespecie y cepas de estas.

En modalidades preferidas de la invención el *Lactococcus* es *Lactococcus lactis*. *Lactococcus lactis* incluye, sin limitarse a, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* ssp. *hordniae*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lactococcus lactis* ssp. *bv. diacetylactis*.

50 En modalidades preferidas adicionales de la invención el *Lactococcus lactis* es *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* o *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, con mayor preferencia *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, y abarca cualquiera de las cepas de estas, tal como, por ejemplo, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* SK11 o *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* MG1363.

En consecuencia, en una modalidad, la bacteria liofilizada contiene uno o más marcos de lectura abiertos de los ácidos

nucleicos recombinantes que codifican un producto de expresión, preferentemente un polipéptido, capaz de provocar una respuesta terapéutica en un sujeto, preferentemente en un sujeto humano o animal.

En una modalidad particularmente útil, ilustrativa y no limitante dicho o dichos marcos de lectura abiertos de los ácidos nucleicos recombinantes de la invención pueden codificar un antígeno y/o un polipéptido terapéuticamente activo no vacunogénico.

Como se usa en la presente, el término "antígeno" se refiere generalmente a una sustancia extraña a un cuerpo (esp. al cuerpo de un sujeto humano o animal al cual se le administre el antígeno) que evoca una respuesta inmune, que incluye respuesta inmune humoral y/o inmune celular, y es capaz de unirse con un producto de la respuesta inmune, por ejemplo, un anticuerpo o una célula T. Consecuentemente, en un ejemplo preferido, un antígeno requiere que el sujeto al que se le administra posea un sistema inmunológico funcional para provocar una respuesta fisiológica de dicho sujeto.

De acuerdo con la invención un antígeno puede derivarse de cualquier polipéptido para el que se produzca una respuesta inmunológica terapéuticamente útil en un sujeto humano o animal, por ejemplo, de un patógeno, por ejemplo, de un patógeno viral, procariótico (por ejemplo, bacteriano) o eucariótico, de una proteína no fisiológica (por ejemplo, una proteína derivada de tejido canceroso), de un alérgico (por ejemplo, para provocar tolerancia inmunológica), etc.

El término "polipéptido terapéuticamente activo no vacunogénico" se refiere generalmente a un polipéptido que, al administrarlo a un sujeto humano o animal, no provoca una respuesta inmunológica contra sí mismo y es capaz de lograr un efecto terapéutico. Consecuentemente, se esperaría que el efecto terapéutico de un polipéptido de este tipo esté directamente relacionado con su propia función biológica natural de manera que puede lograr efectos particulares en un cuerpo de un sujeto; en lugar de producir un efecto terapéutico al actuar como un antígeno inmunogénico y/o inmunoprotector en el sujeto. Consecuentemente, el polipéptido terapéuticamente activo no vacunogénico debe ser biológicamente activo en la forma en que se expresa o, al menos, debe convertirse en la forma biológicamente activa una vez liberado de la célula huésped que lo expresa. Preferentemente, dicha forma biológicamente activa de dicho polipéptido puede mostrar una conformación secundaria y preferentemente también terciaria que sea la misma o cercanamente análoga a su configuración nativa.

Preferentemente, el polipéptido terapéuticamente activo no vacunogénico es además no tóxico y no patogénico.

En una modalidad preferida, el polipéptido terapéuticamente activo no vacunogénico puede derivarse de un ser humano o animal, y puede corresponder preferentemente al mismo taxón que el sujeto humano o animal al que se va a administrar.

Los ejemplos no limitantes de polipéptidos terapéuticamente activos no vacunogénicos adecuados incluyen los que son capaces de funcionar localmente o sistémicamente, por ejemplo, es un polipéptido capaz de ejercer actividades endocrinas que afectan el metabolismo local o de todo el cuerpo y/o el(los) polipéptido(s) biológicamente activo(s) es/son aquel(aquellos) capaz(capaces) de regular las actividades de las células pertenecientes al sistema inmunohepatopoyético y/o uno o más polipéptidos biológicamente activos es/son aquel(aquellos) capaz (capaces) de afectar la viabilidad, el crecimiento y la diferenciación de una variedad de células normales o neoplásicas en el cuerpo o de afectar la regulación inmunológica o la inducción de respuestas inflamatorias de fase aguda a lesiones e infecciones y/o uno o más polipéptidos biológicamente activos es/son aquel(aquellos) capaces de aumentar o inducir resistencia a la infección de las células y los tejidos mediante quimiocinas que actúan sobre sus receptores en la célula diana, o la proliferación de células epiteliales o la promoción de la cicatrización de heridas y/o uno o más polipéptidos biológicamente activos modula(n) la expresión o la producción de sustancias por las células en el cuerpo.

[Los ejemplos específicos de esos polipéptidos incluyen, sin limitarse a, insulina, hormona del crecimiento, prolactina, calcitonina, hormona luteinizante, hormona paratiroidea, somatostatina, hormona estimulante de las tiroides, polipéptido intestinal vasoactivo, citocinas tales como IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, cualquiera de IL-14 a IL-32, GM-CSF, M-CSF, SCF, IFN, EPO, G-CSF, LIF, OSM, CNTF, GH, PRL, la familia TNF de citocinas, por ejemplo, TNFa, TNFb, CD40, CD27 o FAS ligandos, la familia IL-1 de citocinas, la familia del factor de crecimiento de fibroblastos, los factores de crecimiento derivados de plaquetas, factores de crecimiento transformantes y factores de crecimiento de nervios, la familia del factor de crecimiento epidérmico de citocinas, la insulina relacionada con citocinas, etc. Alternativamente, el polipéptido terapéuticamente activo puede ser un receptor o antagonista para los polipéptidos terapéuticamente activos como se definen anteriormente. Los ejemplos específicos adicionales de tales polipéptidos adecuados se enumeran, por ejemplo, en WO 96/11277, página 14, líneas 1-30, incorporada en la presente como referencia; en WO 97/14806, página 12, línea 1 a la página 13, línea 27, incorporada en la presente como referencia; o US 5,559,007, col. 8, línea 31 a la col. 9, línea 9, incorporada en la presente como referencia.

En consecuencia, en una modalidad el ácido nucleico recombinante codifica un antígeno y/o un polipéptido terapéuticamente activo no vacunogénico, en donde dicho antígeno es capaz de provocar una respuesta inmunológica, preferentemente una respuesta inmunológica protectora, en un sujeto humano o animal, y/o dicho polipéptido terapéuticamente activo no vacunogénico es capaz de producir un efecto terapéutico en un sujeto humano o animal.

WO 97/14806 específicamente describe además la co-expresión de antígenos con moléculas estimuladoras de la respuesta inmune, tales como, por ejemplo, interleucinas, por ejemplo, IL-2 o IL-6, por bacterias. En consecuencia, se contemplan además las bacterias liofilizadas de la invención para dicha co-expresión.

5 En una modalidad preferida adicional, el marco de lectura abierto de acuerdo con la invención comprende adicionalmente una secuencia que codifica una señal de secreción correlacionada con un polipéptido codificado por el ORF. Esto permite de manera favorable la secreción del polipéptido expresado a partir de la célula huésped y de ese modo puede facilitar, por ejemplo, el aislamiento o el suministro.

10 Típicamente, una secuencia señal de secreción representa un segmento de aproximadamente 16 a aproximadamente 35 aminoácidos, que contiene usualmente aminoácidos hidrofóbicos que se embeben en la bicapa lipídica de la membrana, y de ese modo permite la secreción de una proteína acompañante o secuencia peptídica de la célula huésped, y que usualmente se escinde de esa proteína o péptido. Preferentemente, la secuencia señal de secreción puede estar activa de esa manera en una célula huésped destinada para usarse con el ácido nucleico que comprende dicha secuencia señal, por ejemplo, una célula bacteriana huésped, preferentemente una bacteria de ácido láctico, con mayor preferencia *Lactococcus*, aún con mayor preferencia *Lactococcus lactis*.

15 Las secuencias señal de secreción activas en células huésped adecuadas se conocen en la técnica; las secuencias señal de *Lactococcus* ilustrativas incluyen aquellas de usp45 (ver, US 5,559,007) y otras, ver, por ejemplo, Perez-Martinez y otros 1992 (Mol Gen Genet 234: 401-11); Sibakov y otros 1991 (Appl Environ Microbiol 57(2): 341-8). Preferentemente, la secuencia señal se localiza entre la secuencia del promotor y el ORF, es decir la secuencia señal se localiza hacia el 3' de la secuencia del promotor y precede al ORF del polipéptido de interés. En una modalidad preferida, la secuencia señal codifica la secuencia del aminoácido

MKKKIISAIL MSTVILSAAA PLSGVYA (usp45).

En un aspecto adicional, la bacteria liofilizada de la invención comprende un vector que contiene un ácido nucleico recombinante.

25 Como se utiliza en la presente, "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico, típicamente de ADN, a la que se pueden insertar y clonar, es decir, propagar, fragmentos de ácidos nucleicos. Consecuentemente, un vector contendrá típicamente uno o más sitios de restricción únicos, y puede ser capaz de replicación autónoma en un organismo huésped o vehículo definido de tal manera que la secuencia clonada es reproducible. Los vectores pueden incluir, sin limitarse a, plásmidos, fagémidos, bacteriófagos, vectores derivados de bacteriófago, PAC, BAC, ácidos nucleicos lineales, por ejemplo, ADN lineal, etc., según sea adecuado (ver, por ejemplo, Sambrook y otros, 1989; Ausubel 1992).

30 El ácido nucleico recombinante o el vector de la invención pueden estar presentes en la célula huésped de manera extra-cromosómica, preferentemente con replicación autónoma usando un propio origen de replicación, o puede estar integrado en el ADN genómico bacteriano, por ejemplo, en el cromosoma bacteriano, por ejemplo, en el cromosoma de *Lactococcus*. En este último caso, una o varias copias de dicho ácido nucleico pueden integrarse, preferentemente una sola copia; la integración puede tener lugar en un sitio al azar del cromosoma o, como se describió anteriormente, en un sitio predeterminado del mismo, preferentemente en un sitio predeterminado, tal como, en un ejemplo preferido no limitante, en el locus *thyA* de *Lactococcus*, por ejemplo, de *Lactococcus lactis*.

35 En un aspecto relacionado, la invención proporciona un método para la fabricación de bacterias liofilizadas que comprenden uno o más marcos de lectura abiertos dentro de un ácido nucleico recombinante dentro de las bacterias liofilizadas para seres humanos o animales que necesiten de ellas, que comprende administrar a dicho ser humano o animal una cantidad terapéuticamente eficaz de tales bacterias transformadas con dicho ácido nucleico.

40 El animal puede ser preferentemente un mamífero, tal como, por ejemplo, animales domésticos, animales de granja, animales del zoo, animales deportivos, mascotas y animales experimentales tales como perros, gatos, conejillos de indias, conejos, ratas, ratones, caballos, ganado, vacas, primates como los simios, monos, orangutanes y chimpancés; cánidos como los perros y los lobos; felinos como los gatos, leones y tigres; équidos, tales como caballos, burros y cebras; animales productores de alimentos, tales como vacas, cerdos y ovejas; ungulados como ciervos y jirafas; roedores tales como ratones, ratas, hámsteres y conejillos de indias, y así sucesivamente.

45 Como se usa en la presente, los términos "tratar" o "tratamiento" se refieren al tratamiento terapéutico y profiláctico o medidas preventivas, en donde el objetivo es prevenir o ralentizar (disminuir) un cambio o trastorno fisiológico indeseado. Un "humano o animal con necesidad de tratamiento" incluye uno que pudiera beneficiarse con el tratamiento de una afección dada.

50 El término "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de una sustancia o composición terapéutica eficaz para tratar una enfermedad o trastorno en un sujeto, por ejemplo, humano o animal, es decir, para obtener un efecto local o sistémico y un desempeño deseado. A modo de ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de bacterias puede comprender al menos 1 bacterias, o al menos 10 bacterias, o al menos 10<sup>2</sup> bacterias, o al menos 10<sup>3</sup> bacterias, o al menos 10<sup>4</sup> bacterias, o al menos 10<sup>5</sup> bacterias, o al menos 10<sup>8</sup> bacterias, o al menos 10<sup>7</sup> bacterias, o al



menos  $10^8$  bacterias, o al menos  $10^9$ , o al menos  $10^{10}$ , o al menos  $10^{11}$ , o al menos  $10^{12}$ , o al menos  $10^{13}$ , o al menos  $10^{14}$ , o al menos  $10^{15}$ , o más células huésped, por ejemplo, bacterias, por ejemplo, en una dosis única o repetida.

Las células liofilizadas de la presente invención pueden administrarse solas o en combinación con uno o más compuestos activos. Estos últimos pueden administrarse antes, después o simultáneamente con la administración de dichas células liofilizadas.

Existe una serie de descripciones de la técnica anterior sobre el suministro de antígenos y/o polipéptidos terapéuticamente activos, y debe apreciarse que tales descripciones pueden modificarse de manera más favorable con los promotores fuertes de la presente invención. A modo de ejemplo y no de limitación, el suministro bacteriano de péptidos trébol puede usarse para tratar enfermedades del canal alimentario (ver, por ejemplo, WO 01/02570), el suministro de interleucinas particularmente IL-10 para el tratamiento de la colitis (por ejemplo, ver WO 00/23471), el suministro de antígenos como vacunas (por ejemplo, WO 97/14806), el suministro de GLP-2 y análogos relacionados puede usarse para tratar la enfermedad del intestino corto, la enfermedad de Crohn, la osteoporosis y como terapia adyuvante durante la quimioterapia de cáncer, etc. Se prevén aplicaciones terapéuticas adicionales usando las células liofilizadas de la invención.

Los ejemplos no limitantes adicionales de los tipos de enfermedades tratables en seres humanos o animales mediante el suministro de polipéptidos terapéuticos de acuerdo con la invención incluyen, sin limitarse a, por ejemplo, enfermedades inflamatorias del intestino que incluyen la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerativa (tratables con, por ejemplo, IL-1ra o IL-10 o péptidos trébol); enfermedades autoinmunes, que incluyen, pero sin limitarse a la psoriasis, la artritis reumatoide, el lupus eritematoso (tratables con, por ejemplo, IL-1ra o IL-10); trastornos neurológicos, que incluyen, pero sin limitarse a la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y la esclerosis lateral amiotrófica (tratables con, por ejemplo, el factor neurotrófico derivado del cerebro y el factor neurotrófico ciliar); cáncer (tratable con, por ejemplo, IL-1, factores estimulantes de colonias o interferón- $\gamma$ ); osteoporosis (tratable con, por ejemplo, el factor de crecimiento transformante  $\beta$ ); diabetes (tratable con, por ejemplo, insulina); enfermedad cardiovascular (tratable con, por ejemplo, el activador tisular del plasminógeno); aterosclerosis (tratable con, por ejemplo, citocinas y antagonistas de citocinas); hemofilia (tratable con, por ejemplo, factores de coagulación); enfermedad hepática degenerativa (tratable con, por ejemplo, el factor de crecimiento de hepatocitos o interferón  $\alpha$ ); enfermedades pulmonares tales como la fibrosis quística (tratable con, por ejemplo, antitripsina alfa); obesidad; infecciones de patógenos, por ejemplo, infecciones virales o bacterianas (tratables con cualquiera de las composiciones o antígenos mencionados anteriormente); etc.

Por lo tanto, en un aspecto adicional la invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende las bacterias liofilizadas fabricadas por la invención, ya sean o no transformadas con el ácido nucleico y/o el vector descrito anteriormente.

Preferentemente, dicha formulación comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de las bacterias liofilizadas fabricadas mediante la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable, es decir, una o más sustancias vehículo farmacéuticamente aceptables y/o aditivos, por ejemplo, amortiguadores, vehículos, excipientes, estabilizadores, etc. El término "farmacéuticamente aceptable" como se usa en la presente es consistente con la técnica y significa compatible con los otros ingredientes de una composición farmacéutica y no perjudiciales para el receptor de la misma. Las bacterias liofilizadas de acuerdo con la invención pueden prepararse en forma de cápsulas, comprimidos, granulados y polvos, cada uno de los cuales puede administrarse por vía oral.

Alternativamente, las bacterias liofilizadas de acuerdo con la invención pueden prepararse en forma de suspensiones acuosas en medios adecuados, o las bacterias liofilizadas pueden suspenderse en un medio adecuado justo antes de usarse.

Para la administración por vía oral, pueden formularse formas de dosificación por vía oral gastro-resistentes, cuyas formas de dosificación pueden incluir además compuestos que proporcionan la liberación controlada de las células huésped y de ese modo proporcionan la liberación controlada de la proteína deseada codificada en las mismas. Por ejemplo, la forma de dosificación por vía oral (que incluye tabletas, píldoras, granulados, polvos) puede estar recubierta con una fina capa de excipiente (usualmente polímeros, derivados celulósicos y/o materiales lipófilos) que resiste la disolución o la ruptura en el estómago, pero no en el intestino, permitiendo de ese modo el tránsito a través del estómago a favor de la desintegración, la disolución y la absorción en el intestino.

La forma de dosificación por vía oral puede diseñarse para permitir la liberación lenta de las células huésped y de la proteína recombinante de las mismas, por ejemplo como de liberación controlada, de liberación sostenida, de liberación prolongada, tabletas o cápsulas de acción sostenida. Estas formas de dosificación usualmente contienen excipientes convencionales y bien conocidos, tales como excipientes lipófilos, poliméricos, celulósicos, insolubles, hinchables. Las formulaciones de liberación controlada además pueden usarse para cualquier otro sitio de suministro, que incluye suministro intestinal, colon, bioadhesión o sublingual (es decir, suministro por la mucosa dental) y suministro bronquial. Cuando las composiciones de la invención son para administrarse por vía rectal o vaginal, las formulaciones farmacéuticas pueden incluir supositorios y cremas. En este caso, las células huésped se suspenden en una mezcla de excipientes comunes que incluyen además lípidos. Cada una de las formulaciones mencionadas anteriormente son bien

conocidas en el arte y se describen, por ejemplo, en las siguientes referencias: Hansel y otros (1990, Pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems, 5ta edición, William and Wilkins); Chien 1992, Novel drug delivery system, 2da edición, M. Dekker); Prescott y otros (1989, Novel drug delivery, J. Wiley & Sons); Cazzaniga y otros, (1994, Oral delayed release system for colonic specific delivery, Int. J. Pharm.108:7).

5 Preferentemente, una formulación de enema puede usarse para la administración rectal. El término "enema" se usa para cubrir las preparaciones líquidas destinadas para uso rectal. El enema usualmente puede suministrarse en envases de dosis única y contiene uno o más principios activos disueltos o dispersados en agua, glicerol o macrogoles u otros disolventes adecuados.

10 Así, de acuerdo con la invención, en una modalidad preferida, las células huésped recombinantes que codifican un gen deseado pueden administrarse al animal o humano a través de la mucosa, por ejemplo, una ruta oral, nasal, rectal, vaginal o bronquial puede ser una cualquiera de las formulaciones del estado del arte aplicable a la ruta específica. La dosificación de las células huésped para la administración variará dependiendo de cualquier número de factores que incluyen el tipo de bacteria y el gen así codificado, el tipo y gravedad de la enfermedad a tratar y la ruta de administración a usar.

15 Así, las dosis precisas no se pueden definir para cada modalidad de la invención, pero serán fácilmente evidentes para los expertos en la materia una vez armados con la presente invención. La dosificación puede determinarse de cualquier manera caso a caso mediante la medición de las concentraciones a nivel del suero de la proteína recombinante después de la administración de un número predeterminado de células, usando métodos bien conocidos, tales como los conocidos como ELISA o Biacore (ver ejemplos). El análisis del perfil cinético y la vida media de la proteína recombinante suministrada proporciona información suficiente para permitir la determinación de un intervalo de dosificación eficaz para las células huésped transformadas.

En una modalidad, cuando las bacterias liofilizadas fabricadas de acuerdo con las invenciones expresan un antígeno, la invención puede proporcionar además una vacuna.

25 El término "vacuna" identifica una composición farmacéuticamente aceptable que, cuando se administra en una cantidad eficaz a un sujeto humano o animal, es capaz de inducir anticuerpos frente a un inmunógeno comprendido en la vacuna y/o provoca inmunidad protectora en el sujeto.

30 La vacuna de la invención podría comprender las células huésped transformadas con los ácidos nucleicos o vectores de la invención y además opcionalmente un excipiente. Tales vacunas además pueden comprender un adyuvante, es decir, un compuesto o composición que aumenta la respuesta inmunológica a un antígeno. Los adyuvantes incluyen, pero sin limitarse a, adyuvante completo de Freund, adyuvante incompleto de Freund, saponina, geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias tensioactivas tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite o hidrocarburos, y adyuvantes humanos farmacéuticamente aceptables potencialmente útiles tales como BCG (bacilo Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum*.

35 Las bacterias de ácido láctico liofilizadas de la invención pueden usarse en la industria alimentaria generalmente como un aditivo para alimentos o particularmente como un cultivo inicial, tales como cultivos iniciales de yogur o cultivos iniciales de queso. Típicamente, tales composiciones comprenden la bacteria en una forma concentrada incluyendo concentrados congelados, secos o liofilizados que tienen típicamente una concentración de células viables que es al menos  $10^{5.5}$  UFC por gramo de la composición, tal como al menos  $10^{6.5}$  UFC/g incluyendo al menos  $10^{7.5}$  UFC/g, por ejemplo al menos  $10^{8.5}$  UFC/g, por ejemplo al menos  $10^{10}$  UFC/g, tal como al menos  $10^{11}$  UFC/g, por ejemplo al menos  $10^{12}$  de la composición. La composición puede contener como componentes adicionales aditivos convencionales que incluyen nutrientes tales como extracto de levadura, azúcares y vitaminas.

45 La invención proporciona un método para la fabricación de bacterias de ácido láctico liofilizadas que son útiles para una variedad de componentes de productos comestibles o ingredientes tales como leche que incluyen leche sin pasteurizar (cruda), carne, masa de harina, vino y materiales vegetales, tales como verduras, frutas y cultivos forrajeros. Como se usa en la presente, el término "leche" significa cualquier tipo de leche o componente de la leche que incluyen por ejemplo, leche de vaca, leche humana, leche de búfala, leche de cabra, leche de oveja, productos lácteos hechos a partir de dicha leche, o suero de la leche. La ventaja particular de las bacterias de ácido láctico liofilizadas de la invención es el elevado grado de viabilidad y la capacidad de almacenamiento a largo plazo. El cultivo inicial se añade en cantidades que resultan en un número de células viables el cual es al menos  $10^3$  unidades formadoras de colonia (UFC) por gramo de los materiales de partida del producto comestible, tal como al menos  $10^4$  UFC/g que incluyen al menos  $10^5$  UFC/g, tal como al menos  $10^6$  UFC/g, por ejemplo al menos  $10^7$  UFC/g, tal como al menos  $10^8$  UFC/g, por ejemplo al menos  $10^9$  UFC/g, tal como al menos  $10^{10}$  UFC/g, por ejemplo al menos  $10^{11}$  UFC/g, por ejemplo al menos  $10^{12}$  UFC/g de los materiales de partida del producto comestible.

55 La invención proporciona además una bacteria de ácido láctico liofilizada que comprende una combinación de compuestos estabilizantes de la invención, la cual está en la forma de composición de un cultivo inicial para la producción de un producto alimenticio o un alimento para animales, o en la forma de un cultivo para la producción de un aroma.

La invención se ilustra adicionalmente con ejemplos que no han de considerarse limitantes.

**EJEMPLOS**

5 La presente invención se entenderá mejor por referencia a los Detalles Experimentales que siguen, pero los expertos en la materia apreciarán fácilmente que éstos son solamente ilustrativos de la invención como se describe más completamente en las reivindicaciones que siguen posteriormente. Otras modalidades se les ocurrirán a los expertos en la técnica a la luz de estos ejemplos, particularmente las modalidades que comprenden otras especies de bacterias de ácido láctico como las especies de *Lactococcus*, tal como una especie de *Lactobacillus*, una especie de *Streptococcus*, una especie de *Pediococcus*, una especie de *Bifidobacterium* una especie de *Leuconostoc* cualquier taxón (por ejemplo, especies, subespecies, cepa) clasificado perteneciente a estas en la técnica.

**EJEMPLO 1: Efecto estabilizante de una combinación de dextrano, glutamato sódico y un poliol durante la liofilización y la exposición sin protección a corto plazo (24 horas) a 25°C/35% de HR**

15 La cepa de *L. lactis* sAGX0037 se cultivó en un fermentador de 5 l, se lavó dos veces con agua purificada que contenía 800 µM de timidina, y se concentró diez veces. Las bacterias concentradas se mezclaron en una proporción en volumen 1:1 con la mezcla de crioprotectores (1 ml de muestra + 1 ml de crioprotector). La formulación resultante se alicuotó en 35 frascos en volúmenes de 2 ml. Todo el proceso, desde el biorreactor hasta el frasco, tomó aproximadamente 8 horas, mientras que la temperatura promedió los 10 °C. Las diferentes formulaciones en su concentración final, es decir, que incluyen bacterias, se muestran en la Tabla 1. Los frascos se congelaron en gránulos sólidos de CO2 hasta que estos se colocaron en el liofilizador.

20 Tabla 1 Composición de las formulaciones de crioprotectores después de añadir la suspensión de células. El contenido en peso seco de las células en la suspensión celular formulada fue 33 g/l o 3.3%.

Código	Composición final (peso/volumen [p/v])	Materia sólida total de crioprotectores en la formulación líquida final antes de la liofilización (en% p/p)
A	5% HES Hidroxi Etil Almidón	12.5%
	5% trehalosa	
	2.5% Glutamato Sódico	
B	4% sorbitol	20%
	4% dextrano 500	
	4% HES	
	4% trehalosa	
	4% glicina	
C	7.5% HES	20%
	10% sacarosa	
	2.5% Glutamato Sódico	
D	7.5% manitol	20.5%
	7.5% glutamato sódico	
	3% glicina	
	2.5% dextrano 500	

Código	Composición final (peso/volumen [p/v])	Materia sólida total de crioprotectores en la formulación líquida final antes de la liofilización (en% p/p)
E	10% sacarosa	10%
F	no se añadieron excipientes	

5 Con el fin de probar la supervivencia de las tortas liofilizadas después de la exposición a las condiciones ambientales (imitando los procesos posteriores a la formulación [por ejemplo, el llenado de cápsulas]), se analizaron 3 frascos mediante el conteo de células viables inmediatamente después de la liofilización y después de 24 horas de almacenamiento a 25°C y 35% de HR.

10 Los resultados del análisis de supervivencia para la cepa de *L. lactis* sAGX0037, determinados por el conteo de células viables en las muestras liofilizadas, así como también las muestras expuestas al aire, indicaron que una combinación de un hidrolizado de almidón (dextrano 500), glutamato sódico y un poliol (por ejemplo manitol) (tal como se presenta mediante el código D), protegió a las bacterias *L. lactis* liofilizadas tras el almacenamiento sin protección durante 24 horas a 25°C y 35% de HR.

15 Aunque las combinaciones que contienen glutamato sódico o sorbitol y dextrano, combinado con crioprotectores bien conocidos tales como trehalosa y sacarosa (formulaciones codificadas A, B y C) dieron lugar a rendimientos de células viables inmediatamente después de la liofilización que eran comparables a la formulación codificada D ( $> 1 \times 10^{E+11}$  UFC/g), los estudios de exposición a corto plazo demostraron claramente que sólo la formulación D, que contiene una combinación de un hidrolizado de almidón y una sal de ácido glutámico y/o un poliol, protegió a las bacterias *L. lactis* liofilizadas tras el almacenamiento sin protección durante 24 horas a 25°C y 35% de HR.

20 En comparación con la formulación de sacarosa (codificada E), conocida como un "estándar de oro" para la estabilización de LAB liofilizadas, la combinación seleccionada (D) es superior tras el almacenamiento, y es la única combinación en este ejemplo que resulta en un conteo de células viables de  $> 1 \times 10^{E+11}$  UFC/g tras la exposición a corto plazo a 25°C/35% de HR.

Cuando no se añadieron estabilizadores a las bacterias, no se observó la supervivencia de las bacterias tras la exposición a corto plazo, como se demuestra en la Figura 1, formulación codificada F.

25 **Ejemplo 2: Efecto estabilizante de una combinación de dextrano, glutamato sódico y un poliol durante la liofilización y la exposición a corto plazo (24 horas) a 26°C/35% de HR.**

Se usó un pre-cultivo (100 ml) de la cepa de *L. lactis* sAGX0037 para la inoculación de un reactor de tanque continuamente agitado (CSTR) de 7 l, que contiene 5 l de medio M17c (composición enumerada en la Tabla 2)

Tabla 2: Composición del medio de fermentación M17c

Componente	Cantidad (por 1 litro)
Extracto de levadura	20 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.0 g
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0.51 g
Ácido cítrico monohidrato	0.49 g
glucosa	55 g
Timidina (100 mM)	8 ml/l

30 El biorreactor se ajustó para mantener la temperatura a 30 °C y el pH a 7 (por adición de NH<sub>4</sub>OH 5M). La velocidad de agitación se ajustó a 200 rpm. La fermentación se terminó cuando se completó el consumo de glucosa enfriando el fermentador a 4°C. Se tomó una muestra de "fin de la fermentación" y se usó para la determinación del peso celular

seco (DCW). Una vez que la fermentación se terminó, se concentraron 3.5 l del caldo de fermentación y se lavaron mediante ultrafiltración/diafiltración usando un filtro de 1400cm<sup>2</sup> de fibra hueca de 500 kDa.

5 Cuando la cantidad total de 3.5 l de caldo se concentró aproximadamente 10 veces, la botella de 5 l en volumen se reemplazó con una botella que contenía agua purificada y se usó para la diafiltración. Durante la diafiltración, la concentración de lactato se controló por análisis del permeado. La diafiltración se terminó una vez que la concentración de lactato alcanzó 5 - 10 g/l.

10 Directamente después de la concentración y diafiltración, las suspensiones de células bacterianas se dividieron en 13 porciones, a las que se añadieron diferentes crioprotectores (enumerados en la Tabla 3). Después de mezclar los crioprotectores con las suspensiones celulares, cada mezcla se alicuotó en más de 25 frascos (2 ml de volumen final) y se liofilizó.

Tabla 3: Composición de las formulaciones de crioprotectores después de la adición de la suspensión celular. El contenido en peso seco de las células en la suspensión celular formulada fue 70 g/l.

Código de la formulación	Composición de la solución de crioprotectores (p/v)	Materia sólida total de crioprotectores en la formulación líquida final (%)	Volumen de la suspensión celular (ml)	Volumen de la solución de crioprotectores (ml)
A1	10% HES	12.5%	26	26
	10% trehalosa			
	5% Glutamato Sódico			
A2	5% HES	10%	26	26
	10% trehalosa			
	5% Glutamato Sódico			
B1	8% sorbitol	20%	26	26
	8% dextrano 500			
	8% HES			
	8% trehalosa			
	8% glicina			
C1	15% HES	20%	26	26
	20% sacarosa			
	5% Glutamato Sódico			
C2	15% HES	12.5%	26	26
	15% sacarosa			
	5% Glutamato Sódico			
D1	15% manitol	20.5%	26	26

Código de la formulación	Composición de la solución de crioprotectores (p/v)	Materia sólida total de crioprotectores en la formulación líquida final (% p/v)	Volumen de la suspensión celular (ml)	Volumen de la solución de crioprotectores (ml)
	15% Sorbitol			
	5% Glutamato Sódico			
	6% glicina			
	5% dextrano 500			
<b>D2</b>	7% manitol	12%	26	26
	7% Sorbitol			
	5% Glutamato Sódico			
	5% dextrano 500			
<b>E1</b>	50% sacarosa	10%	41.6	10.4
<b>F2</b>	40% Glutamato Sódico	5%	40	6.29

5 Con el fin de probar la supervivencia de las tortas liofilizadas después de la exposición a las condiciones ambientales (imitando los procesos posteriores a la formulación [por ejemplo el llenado de cápsulas]), se analizaron 3 frascos mediante el conteo de células viables inmediatamente después de la liofilización y después de 24 horas de almacenamiento a 25°C y 35% de HR.

10 Los resultados del análisis de supervivencia para la cepa de *L. lactis* sAGX0037, determinados por el conteo de células viables en las muestras liofilizadas, así como también las muestras expuestas al aire, indicaron que una combinación de un hidrolizado de almidón (dextrano 500), un poliol (por ejemplo manitol y/o sorbitol) y glutamato sódico (tal como se presenta mediante el código D1), produjo un conteo elevado de células viables inmediatamente después de la liofilización (por ejemplo > 3 E+11 UFC/g) y estabilizó los liofilizados de bacterias de *L. lactis* tras el almacenamiento sin protección durante 24 horas a 25°C y 35% de HR, lo que resulta en elevados rendimientos de células viables (> 2 E+11 UFC/g).

15 Aunque las formulaciones codificadas A1, A2, B1, C1 y C2 (combinaciones que contienen ya sea glutamato sódico o sorbitol y dextrano, combinados con crioprotectores bien conocidos tales como trehalosa y sacarosa) resultaron en rendimientos de células viables inmediatamente después de la liofilización comparables a los de la formulación codificada D1, los estudios de exposición a corto plazo demostraron claramente que las formulaciones D1 y D2 (que contienen una mezcla de al menos un hidrolizado de almidón [dextrano 500], un poliol [por ejemplo manitol y/o sorbitol] y el glutamato sódico) estabilizaron las bacterias liofilizadas de *L. lactis* tras el almacenamiento sin protección durante 24 horas a 25°C y 35% de HR.

25 En comparación con la formulación de sacarosa (codificada E1), un "estándar de oro" para la estabilización de LAB liofilizadas, la combinación de 3 crioprotectores es claramente superior tras el almacenamiento, y es la única combinación de estabilizadores en este ejemplo que resultó en un conteo de células viables > 2 x 10E +11 UFC/g tras la exposición a corto plazo a 25°C/35% de HR.

Cuando se añadió glutamato sódico solo a las bacterias, no se observó la supervivencia de las bacterias tras la exposición a corto plazo, como se demuestra en la Figura 2, formulación codificada F2.

**EJEMPLO 3: Efecto estabilizante de una combinación de dextrano, glutamato sódico y sorbitol durante la liofilización y la exposición sin protección a corto plazo (4 y 24 horas) a 25°C/35% de HR.**

Se usó un pre-cultivo de la cepa de *L. lactis* sAGX0037 (100 ml) para la inoculación de un CSTR de 7 l que contenía 5 l de medio M17c (ver Tabla 2 anterior). El biorreactor se ajustó para mantener la temperatura a 30°C y el pH a 7 (por adición de NH<sub>4</sub>OH 5M). La velocidad de agitación se ajustó a 200 rpm. La fermentación se terminó cuando la concentración de glucosa había caído por debajo de 0.5 g/l, mediante el enfriamiento del fermentador a 4°C. Se tomó una muestra de "final de la fermentación" y se utilizó para la determinación del DCW. Una vez que la fermentación se terminó, se concentraron 3.5 l del caldo de fermentación y se lavaron mediante ultrafiltración/diafiltración usando un filtro de 1400cm<sup>2</sup> de fibra hueca de 500 kDa.

Cuando la cantidad total de 3.5 l de caldo de cultivo se concentró aproximadamente 10 veces, la botella de 5 l en volumen se reemplazó con una botella que contenía agua purificada y se utilizó para la diafiltración. Durante la diafiltración, la concentración de lactato se controló por análisis del permeado. La diafiltración se terminó una vez que la concentración de lactato alcanzó 5 - 10 g/l.

Las suspensiones bacterianas se mezclaron con diferentes crioprotectores, la composición de los cuales se describe en la Tabla 4. Después de mezclar los crioprotectores con las suspensiones, cada mezcla se alícuotó en diferentes recipientes de liofilización (alícuotas de 55 ml) en condiciones asépticas. Después de alícuotar, los recipientes se colocaron en una placa plana en un congelador de -70°C hasta la liofilización. Se evaluaron dos temperaturas de secado secundarias durante el proceso de liofilización: temperatura del estante 25°C y 35°C.

Tabla 4: Composición de las formulaciones de crioprotectores después de la adición de la suspensión celular (peso seco de 70 g/l)

Código del crioprotector	Solución madre de la composición concentrada 5 x (p/v)	Volumen de la suspensión celular (ml)	Volumen de la solución madre de crioprotectores (ml)	Composición de la mezcla final de crioprotectores en la formulación líquida antes de la liofilización (% p/v)
Z4 25°C / 35°C	20 % Na-glutamato	184	46	4 % Na-glutamato
	10 % dextrano 500			2 % dextrano 500
	10 % sorbitol			2 % sorbitol

Los resultados del análisis de viabilidad para la cepa de *L. lactis* sAGX0037 (Figura 3), determinados por el conteo de células viables en las muestras liofilizadas así como también en las muestras expuestas al aire, indicaron que una combinación de un hidrolizado de almidón (dextrano 500), un polioli (por ejemplo manitol y/o sorbitol) y glutamato sódico, produjo un elevado conteo de células viables inmediatamente después de la liofilización (por ejemplo > 6 E+11 UFC/g) y estabilizó a las bacterias *L. lactis* liofilizadas tras la exposición sin protección a 25°C y 35% de HR durante 4 horas y 24 horas. Se observó una elevada estabilidad de células viables después de esta prueba de exposición, lo que resultó en rendimientos de células viables de > 6 E+11 UFC/g después de 4 horas y > 5 E+11 UFC/g después de 24 horas de exposición respectivamente.

Tabla 4a: Efecto de la formulación de crioprotectores en la supervivencia de *L. lactis* después de la liofilización

Muestra	Composición final de la mezcla de crioprotectores	Conteo de células viables UFC/ml antes de la liofilización	Conteo de células UFC/ml después de la liofilización y reconstitución	Supervivencia %
Z4 25°C	4 % Na-glutamato	1.6E+11	1.1E+11	69%
	2 % dextrano 500			
	2 % sorbitol			

**EJEMPLO 4: Efecto estabilizador de una combinación de dextrina, glutamato sódico y sorbitol durante la liofilización y el almacenamiento a largo plazo en diferentes condiciones de almacenamiento.**

5 Después de un escalado a 200 l de fermentación industrial de la cepa de *L. lactis* sAGX0037, la biomasa acumulada se concentró y se lavó con agua purificada por ultrafiltración/diafiltración respectivamente. La diafiltración se detuvo una vez que la concentración de lactato cayó por debajo de 5 g/l (55 mmol/l). Durante la ultrafiltración y la diafiltración, la cubierta del recipiente se enfrió continuamente a 4°C con agua.

10 En vista de la etapa de liofilización posterior, la estabilización de las bacterias se aseguró mediante la adición de una solución de crioprotectores seleccionada a la biomasa resultante de la etapa de UF/DF. La solución final de crioprotectores consistió en un hidrolizado de almidón (dextrina de almidón de maíz), glutamato sódico y un poliol (sorbitol), tal como se describe en la Tabla 5.

Tabla 5: Composición de la formulación de crioprotectores

Componente	Peso
Dextrina (a partir de almidón de maíz)	100g = 10% p/v
Sorbitol	100g = 10% p/v
Glutamato sódico	200g = 20% p/v
Agua para inyecciones	QSP 1 l

15 El peso requerido de la solución de crioprotectores añadida fue de aproximadamente 17.0 kg de suspensión celular y 4.8 kg de solución de crioprotectores, lo que resulta en un peso aproximado de la formulación final de 21.8 kg de suspensión celular formulada. La formulación fue enviada en bandejas adecuadas de liofilización masiva y se liofilizó bajo condiciones validadas y controladas. Las bandejas se cargaron en los estantes del liofilizador y posteriormente se congelaron a -50°C. El tiempo total de la congelación fue de aproximadamente 9 horas.

20 Después de la etapa de congelación, la presión de la cámara se redujo y el secado primario se inició aumentando de la temperatura de los estantes en múltiples etapas en gradiente de -22°C, -10°C, 20°C, 25°C y una temperatura final del estante de 35°C. Al final del secado primario, se realizó una prueba de aumento de presión para determinar el final de la fase de secado primario. No se produjo aumento de presión, y el proceso de liofilización continuó por una fase de secado secundario. El tiempo total del proceso de liofilización fue de aproximadamente 93 horas.

25 Al final del ciclo de liofilización, la cámara se presurizó con gas nitrógeno seco, esterilizado por filtración (filtrado en una membrana con tamaño de poro de 0.22 µm). Las bandejas se descargaron y se envasaron en bolsas de papel de aluminio (Alu) impermeables a los vapores, a 18-26°C y 30-70% de HR respectivamente.

30 Después, las tortas liofilizadas se equilibraron durante aproximadamente una hora en un cuarto de producción de Clase 100.000 a temperatura (19-23°C) y humedad (<20% HR) controladas, y posteriormente se pulverizaron por triturado manual (en bolsas de PE) de las tortas liofilizadas, seguido por tamizado (410 µm). Después de tamizar, el polvo se homogeneizó manualmente (en bolsas de PE) y se tomaron muestras de la sustancia fármaco masiva final liofilizada resultante (DS, que contiene bacterias de *L. lactis* sAGX0037 y crioprotectores), para el análisis y las pruebas de estabilidad.

35 Las muestras se envasaron por 500 mg en bolsas PET/Alu y se almacenaron a -20 ± 5 °C, a 5 ± 3 °C y a 25 ± 2 °C, 60 ± 5% de HR. Las muestras se controlaron durante 12 meses. Como se demuestra en la Figura 4, no se observó disminución significativa en el conteo de células viables de las bacterias liofilizadas en polvo, almacenadas a -20°C y 5°C, y se conservó > 90% del conteo inicial de células viables durante 1 año de almacenamiento, lo que resultó en concentraciones muy elevadas de UFC de hasta > 5 x 10E+11 UFC/g. A 25°C, 60% de HR, sólo se observó una ligera disminución en el conteo de células viables, lo que resultó en elevadas concentraciones de UFC de hasta > 3 x 10E+11 UFC/g después de 1 año de almacenamiento a 25°C/60% de HR.

40 Estos datos demuestran claramente que la combinación de crioprotectores de un hidrolizado de almidón (por ejemplo,



dextrina de almidón de maíz), glutamato sódico y un poliol (por ejemplo, sorbitol ) conduce a un polvo de LAB liofilizado estable, asegurando la estabilidad y la supervivencia a largo plazo de las bacterias viables.

### Referencias

- 5 1. Bibiloni R, Fedorak RN, Tannock GW, Madsen KL, Gionchetti P, Campieri M, De Simone C, Sartor RB. VSL#3 probiotic-mixture induces remission in patients with active ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 2005;100(7):1539-1546
2. Rioux KP, Fedorak RN. Probiotics in the treatment of inflammatory bowel disease. *J Clin Gastroenterol* 2006;40(3):260-263
3. Shanahan F. Probiotics in inflammatory bowel disease-therapeutic rationale and role. *Adv Drug Deliv Rev* 2004;56(6):809-818
- 10 4. Carvalho AS, Silva J, Ho P, Teixeira P, Malcata FX, Gibbs P. Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria. *International Dairy Journal* 2004;14(10):835-847
- 5 5. Miyamoto-Shinohara Y, Sukenobe J, Imaizumi T, Nakahara T. Survival of freeze-dried bacteria. *J Gen Appl Microbiol* 2008;54(1):9-24
- 15 6. Braat H, Rottiers P, Hommes DW, Huyghebaert N, Remaut E, Remon JP, van Deventer SJ, Neiryneck S, Peppelenbosch MP, Steidler L. A phase I trial with transgenic bacteria expressing Interleukin-10 in Crohn's disease. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 2006;4:754-759
7. Vandenbroucke K, Hans W, Van Huysse J, Neiryneck S, Demetter P, Remaut E, Rottiers P, Steidler L. Active delivery of trefoil factors by genetically modified *Lactococcus lactis* prevents and heals acute colitis in mice. *Gastroenterology* 2004;127:502-513
- 20 8. Steidler L, Neiryneck S, Huyghebaert N, Snoeck V, Vermeire A, Goddeeris B, Cox E, Remon JP, Remaut E. Biological containment of genetically modified *Lactococcus lactis* for intestinal delivery of human interleukin 10. *Nat Biotechnol* 2003;21:785-789
9. Steidler L, Wells JM, Raeymaekers A, Vandekerckhove J, Fiers W, Remaut E. Secretion of biologically active murine interleukin-2 by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Applied and Environmental Microbiology* 1995;61:1627-1629
- 25 10. Steidler L, Robinson K, Chamberlain L, Schofield KM, Remaut E, Le Page RWF, Wells JM. Mucosal delivery of murine interleukin-2 (IL-2) and IL-6 by recombinant strains of *Lactococcus lactis* coexpressing antigen and cytokine. *Infection and Immunity* 1998;66:3183-3189
11. Steidler L, Hans W, Schotte L, Neiryneck S, Obermeier F, Falk W, Fiers W, Remaut E. Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. *Science* 2000;289:1352-1355
- 30 12. Frossard CP, Steidler L, Eigenmann PA. Oral administration of an IL-10-secreting *Lactococcus lactis* strain prevents food-induced IgE sensitization. *J Allergy Clin Immunol* 2007;119(4):952-959
13. Wells JM, Wilson PW, Le Page RW. Improved cloning vectors and transformation procedure for *Lactococcus lactis*. *J Appl Bacteriol* 1993;74(6):629-636
14. Ahmed FE. Genetically modified probiotics in foods. *Trends Biotechnol* 2003;21(11):491-497
- 35 15. Kleerebezem M, Hugenholtz J. Metabolic pathway engineering in lactic acid bacteria. *Curr Opin Biotechnol* 2003;14(2):232-237
16. Carcoba R, Rodriguez A. Influence of cryoprotectants on the viability and acidifying activity of frozen and freeze-dried cells of the novel starter strain *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CECT 5180. *European Food Research and Technology* 2000;211(6):433-437
- 40 17. de Valdez GF, de Giori GS, de Ruiz Holgado AA, Oliver G. Protective effect of adonitol on lactic acid bacteria subjected to freeze-drying. *Appl Environ Microbiol* 1983;45(1):302-304
18. H.P. Castro PMTRK. Evidence of membrane damage in *Lactobacillus bulgaricus* following freeze drying. In; 1997:87-94
- 45 19. Ana SC, Joana S, Peter H, Paula T, Malcata FX, Paul G. Protective effect of sorbitol and monosodium glutamate during storage of freeze-dried lactic acid bacteria. In; 2003:203-210
20. Huang L, Lu Z, Yuan Y, Lu F, Bie X. Optimization of a protective medium for enhancing the viability of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* based on response surface methodology. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2006;33(1):55-61

21. Huyghebaert N, Vermeire A, Neiryck S, Steidler L, Remaut E, Remon JP. Development of an enteric-coated formulation containing freeze-dried, viable recombinant Lactococcus lactis for the ileal mucosal delivery of human interleukin-10. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 2005;60:349-359

**LISTA DE SECUENCIAS**

- 5 <110> ACTOGENIX NV
- <120> Crioprotectores para la liofilización de bacterias del ácido láctico
- <130> AGX-020
- <150>EP09100265.9
- <151> 2009-04-30
- 10 <160> 1
- <170> PatentIn versión 3.3
- <210>1
- <211>27
- <212>PRT
- 15 <213> Lactococcus lactis
- <400>1
- Met Lys Lys Lys Ile Ile Ser Ala Ile Leu Met Ser Thr Val Ile Leu**
- 1 5 10 15**
- Ser Ala Ala Ala Pro Leu Ser Gly Val Tyr Ala**
- 20 25**

**REIVINDICACIONES**

1. Una combinación de compuestos estabilizantes para mejorar la supervivencia y estabilidad de las bacterias de ácido láctico liofilizadas, que comprende un hidrolizado de almidón, una sal de ácido glutámico y un poliol.
2. La combinación de acuerdo con reivindicación 1 en donde;
  - 5 - la cantidad de hidrolizado de almidón está en el intervalo de aproximadamente 2,0% a aproximadamente 10% (p/v);
  - la cantidad de sal de ácido glutámico está en el intervalo de aproximadamente 2,0% a aproximadamente 10% (p/v); y
  - la cantidad de poliol está en el intervalo de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 30% (p/v).
- 10 3. La combinación de compuestos estabilizantes de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 2, en donde la sal del ácido glutámico es un glutamato sódico.
4. La combinación de compuestos estabilizantes de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde el poliol es sorbitol o manitol.
- 15 5. La combinación de compuestos estabilizantes de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el hidrolizado de almidón es un dextrano.
6. Un método para la liofilización de una bacteria de ácido láctico, en donde una combinación de los compuestos estabilizantes se usa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
7. Una bacteria de ácido láctico liofilizada, que comprende además una combinación de los compuestos estabilizantes de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
- 20 8. Una bacteria de ácido láctico liofilizada de acuerdo con la reivindicación 7 en donde dicha bacteria de ácido láctico comprende además uno o más ácidos nucleicos recombinantes que son heterólogos para la bacteria.
9. Una bacteria de ácido láctico liofilizada de acuerdo con la reivindicación 7 u 8 para usar como un medicamento o como un ingrediente alimenticio.
- 25 10. Una bacteria de ácido láctico liofilizada de acuerdo con la reivindicación 7 u 8 para usar aplicaciones alimenticias o procesamiento de alimentos.
11. Una bacteria de ácido láctico liofilizada de acuerdo con la reivindicación 10 que está en forma de una composición de cultivo inicial para la producción de un producto alimenticio o un alimento animal, o en forma de un cultivo para la producción de un aroma.
- 30 12. Una combinación de compuestos estabilizantes de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde las bacterias de ácido láctico se seleccionan del grupo que consiste de una especie de *Lactococcus*, una especie de *Lactobacillus*, una especie de *Streptococcus*, una especie de *Pediococcus*, una especie de *Bifidobacterium* y una especie de *Leuconostoc*.
- 35 13. Un método para liofilizar bacterias de ácido láctico de acuerdo con la reivindicación 6, en donde las bacterias de ácido láctico se seleccionan del grupo que consiste de una especie de *Lactococcus*, una especie de *Lactobacillus*, una especie de *Streptococcus*, una especie de *Pediococcus*, una especie de *Bifidobacterium* y una especie de *Leuconostoc*.
14. Una bacteria liofilizada de acuerdo con las reivindicaciones 7 a 10, en donde las bacterias de ácido láctico se seleccionan del grupo que consiste de una especie de *Lactococcus*, una especie de *Lactobacillus*, una especie de *Streptococcus*, una especie de *Pediococcus*, una especie de *Bifidobacterium* y una especie de *Leuconostoc*.

40

Figura 1

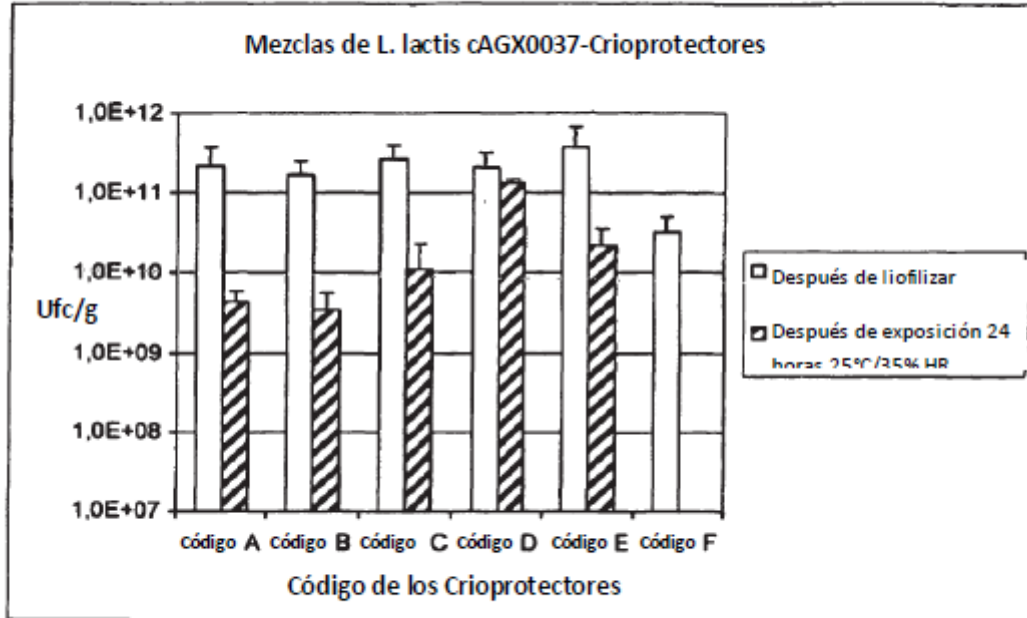


Figura 2

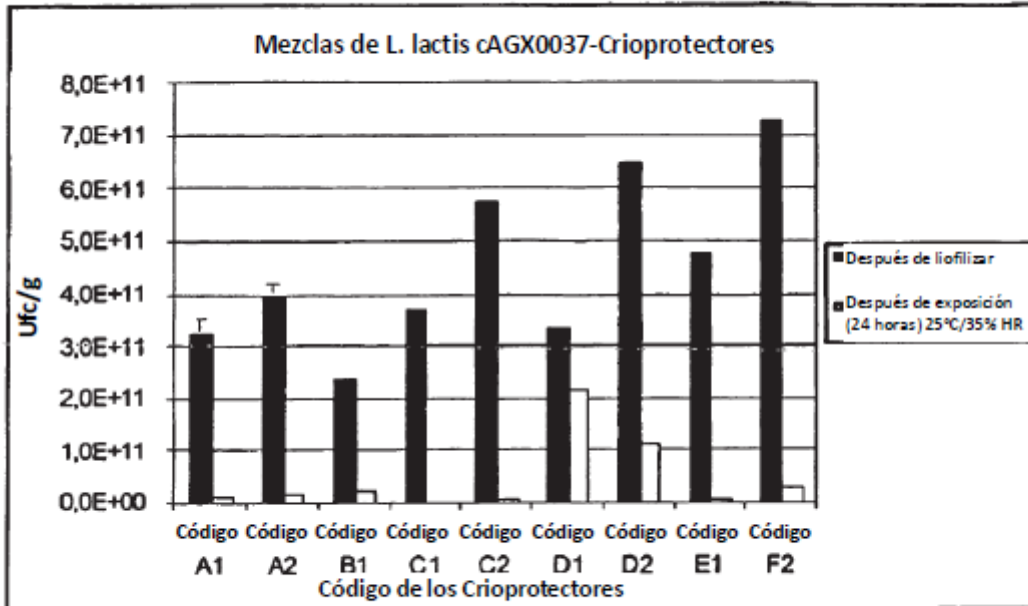


Figura 3

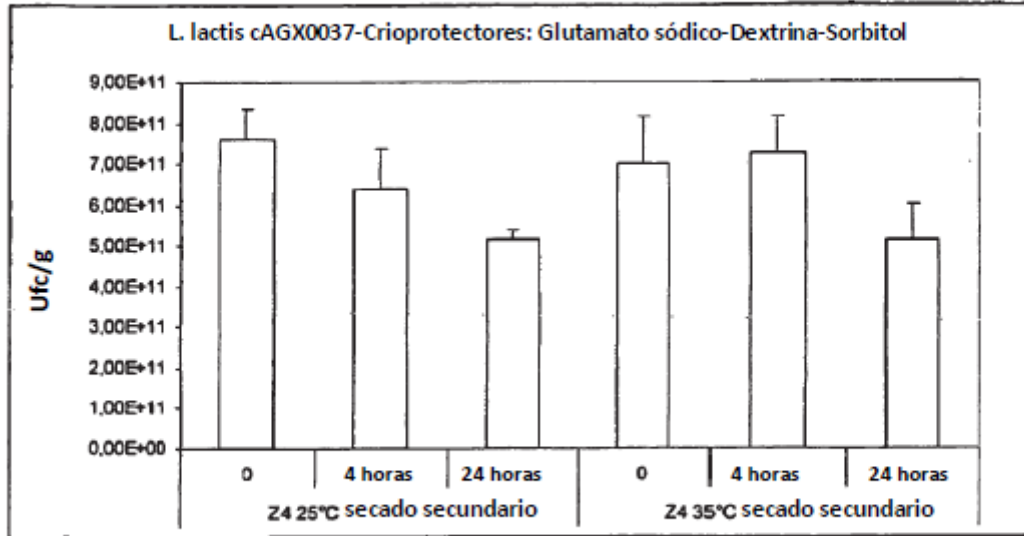


Figura 4

