

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 470 340**

51 Int. Cl.:

**A23L 1/09** (2006.01)  
**A23L 1/0532** (2006.01)  
**A23L 1/30** (2006.01)  
**A23L 1/00** (2006.01)  
**A61K 35/74** (2006.01)  
**A61K 47/36** (2006.01)  
**A23P 1/04** (2006.01)  
**A61K 9/19** (2006.01)  
**A61K 9/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.12.2006 E 06848247 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.03.2014 EP 1973406**

54 Título: **Vehículo de administración para bacterias probióticas que comprende una matriz seca de polisacáridos, sacáridos y polioles en forma vítrea**

30 Prioridad:

**28.12.2005 US 754502 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**23.06.2014**

73 Titular/es:

**ADVANCED BIONUTRITION CORPORATION  
(100.0%)  
SUITE A 7155 COLUMBIA GATEWAY DRIVE  
COLUMBIA, MD 21046-2545, US**

72 Inventor/es:

**HAREL, MORDECHI y  
KOHAVI-BECK, KEREN**

74 Agente/Representante:

**TORNER LASALLE, Elisabet**

**ES 2 470 340 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

Vehículo de administración para bacterias probióticas que comprende una matriz seca de polisacáridos, sacáridos y polioles en forma vítrea.

## Antecedentes de la divulgación

- 5 La divulgación versa en general sobre el campo de un vehículo de administración de bacterias probióticas que comprende una matriz seca de polisacáridos, sacáridos y polioles en forma vítrea. También se proporcionan procedimientos de fabricación y uso del mismo.

10 Se definen los probióticos como microbios vivos que afectan beneficiosamente al anfitrión modulando la inmunidad mucosa y sistémica, así como mejorando la función intestinal y el equilibrio microbiano en el tracto intestinal. Se han atribuido diversos efectos nutricionales y terapéuticos a los probióticos, incluyendo: modulación de la respuesta inmunitaria, disminución de las concentraciones de colesterol en el plasma, mejora de los síntomas de intolerancia a la lactosa, aumento de la resistencia a enfermedades intestinales infecciosas, disminución de la duración de la diarrea, reducción de la presión sanguínea y contribución a prevenir el cáncer de colon (Isolauri E y otros 2001, Kailasapathy K and J. 2000, Marteau PR y otros 2001, Perdigon G y otros 2001). Para ejercer sus efectos

15 beneficiosos en el anfitrión, los probióticos deben permanecer viables y llegar al intestino en grandes números (Favaro-Trindade y Grosso 2002). Sin embargo, mantener la estabilidad a largo plazo de los probióticos requiere condiciones especiales de conservación, dado que la viabilidad se deteriora rápidamente en un corto periodo de tiempo a temperatura y condiciones de humedad ambiente (Shah 2000). Además del deficiente periodo de validez, ocurre una significativa pérdida de viabilidad tras la exposición de los probióticos a las condiciones gástricas de pH

20 bajo y enzimas digestivas. Los procedimientos existentes de conservación no logran proporcionar una viabilidad satisfactoria en la conservación ni protección gástrica, especialmente si las células se almacenan a temperatura y humedad ambiente o más altas.

25 A menudo se usa la liofilización para la conservación y el almacenamiento de bacterias debido a la exposición a temperaturas bajas durante el secado. Sin embargo, tiene las características poco deseables de reducir significativamente la viabilidad, así como requerir mucho tiempo y energía. La liofilización implica poner las células en una solución, congelar la solución y exponer el sólido congelado al vacío en condiciones en las que permanece sólido y el agua y cualquier otro componente volátil son eliminados por sublimación. La temperatura estándar de liofilización de -30°C a -70°C está por debajo del punto de congelación del agua, pero está muy por encima de la

30 temperatura de transición vítrea (T<sub>g</sub>) de la solución de liofilización, lo que da como resultado el efecto no deseado de la cristalización del agua formando hielo. La congelación de cultivos bacterianos da como resultado un daño físico sustancial a la pared celular bacteriana y la consiguiente pérdida de viabilidad. Por lo tanto, evitar la formación de hielo durante la frigoconservación de proteínas, virus, células, tejidos y órganos es un problema importante de la criobiología.

35 Puede disminuirse el punto de congelación del agua añadiendo solutos que reduzcan la presión de vapor del agua. La depresión del punto de congelación es la base física sobre la que actúan esencialmente todos los anticongelantes usados actualmente (por ejemplo, glicoles, azúcares y sales). La desventaja de los depresores del punto de congelación, denominados crioprotectores, es que se requieren grandes cantidades de solutos (10% o más) para reducir el punto de congelación tan solo algunos grados Celsius. A concentraciones suficientemente elevadas (normalmente, el 50% o más), los anticongelantes convencionales pueden impedir la formación de hielo,

40 permitiendo que las soluciones acuosas se enfríen hasta temperaturas muy por debajo de 0°C sin congelarse. Sin embargo, generalmente los crioprotectores son tóxicos en las concentraciones elevadas requeridas para lograr la formación vítrea o vitrificación.

45 Otros procedimientos usados para crear preparaciones secas y estables de probióticos, tales como la desecación a temperatura ambiente y el secado por pulverización, también tienen inconvenientes. La desecación a temperatura ambiente o reducida es lenta, requiere precauciones adicionales para evitar una contaminación y a menudo produce una viabilidad insatisfactoria. El secado por pulverización implica derivas cortas hasta temperaturas de tratamiento relativamente elevadas y da como resultado pérdidas de viabilidad y tiempos limitados de conservación, incluso cuando se usan excipientes de estabilización (Lievens LC, van 't Riet K. 1994. Convective drying of bacteria. II. Factors influencing survival. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 51:71-89).

50 Simmonds y otros (2005) han descrito una formulación viable y estable para dirigir los probióticos al intestino. El procedimiento requiere la granulación de bacterias liofilizadas con estabilizadores de celulosa microcristalina, tales como la leche desnatada, sales o azúcares de cadena corta, y un desintegrante tal como almidón o ácido alginico. Acto seguido, las bacterias semisecas granuladas son desecadas a 40-70°C para reducir el nivel de humedad residual a menos del 2 por ciento. Esto es seguido por su recubrimiento con un agente entérico y un plastificante.

55 Este procedimiento de etapas múltiples da como resultado un gran tamaño de partícula (de más de 425 micrómetros) y sigue dando como resultado una pérdida de viabilidad de hasta 1,5 magnitudes logarítmicas. Una ventaja adicional de este procedimiento es el elevado contenido de los agentes de revestimiento entérico (más del 25% del peso de la microesfera), que son sintéticos en su mayoría y no son reconocidos como materiales de calidad alimentaria. Una desventaja inherente de un procedimiento de revestimiento es que la proporción relativa entre el

revestimiento y el agente activo se eleva en una función cúbica de la partícula, cuando el tamaño de partícula disminuye, haciendo el procedimiento menos utilizable para la producción de partículas de tamaños inferiores a 300 micrómetros.

5 Se ha descrito un procedimiento alternativo de conservación bacteriana que usa una técnica de formación de espuma a la vez que elimina la formación de cristales de hielo (Bronshtein y otros 2004, Roser y otros 2004). Este procedimiento requiere concentraciones elevadas de azúcares (una combinación de mono, di y oligosacáridos metilados) en el medio de secado y un liofilizador que está dotado de un sistema de vacío controlado y de exposición a la temperatura, y la adición de elementos formadores de espuma y estabilizantes. A pesar de algunas ventajas de este procedimiento en el logro de la estabilidad de un mayor periodo de validez, las bacterias conservadas en espuma no están protegidas del tránsito por el estómago. Además, este procedimiento es difícil y costoso de ampliar de escala, porque la espuma requiere, por definición, grandes volúmenes de espacio a presión atmosférica reducida (es decir, en el vacío) para la producción de una masa muy pequeña. Además, este material es muy sensible a la humedad y el producto absorbe agua fácilmente, disminuyendo la viabilidad de las bacterias.

15 Franks y otros (2003) propusieron una composición que contenía un azúcar (trehalosa) parcialmente en la fase vítrea amorfa y parcialmente en fase de hidrato cristalino. La fase de hidrato cristalino sirve de agente para deshidratar la fase amorfa, mejorando con ello la temperatura de transición vítrea del estado vítreo amorfo. Se demostró que esta composición estabilizaba moléculas individuales, como proteínas o nucleótidos. La temperatura de transición vítrea de una mezcla depende, entre otros factores, de su composición química (azúcares, proteínas, sales) y del contenido de humedad, actuando el agua como plastificante, deprimiendo la temperatura de transición vítrea. Si, en cualquier momento, se supera la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ), ya sea por exposición al calor o como consecuencia de una migración de humedad al interior del producto, el estado vítreo amorfo puede llegar a ser susceptible de una separación irreversible de fases por cristalización. Entonces, si ocurre la cristalización, cualquier fase amorfa residual estará compuesta de los demás componentes y la humedad, dando como resultado una depresión adicional de la temperatura de transición vítrea.

25 Un vidrio es un estado sólido amorfo que se obtiene por desecación controlada de una solución. La ventaja de la fase vítrea en la consecución de estabilidad a largo plazo resulta del hecho de que la difusión en materiales vítreos (vítreos) ocurre con velocidades sumamente bajas (por ejemplo, micrómetros/año). Normalmente, los materiales vítreos aparecen como sólidos homogéneos, transparentes y quebradizos que pueden ser triturados o molidos hasta formar polvo. Los beneficios óptimos de la vitrificación para la conservación a largo plazo se observan en condiciones en las que  $T_g$  es mayor que la temperatura de almacenamiento. La  $T_g$  depende directamente de la actividad y la temperatura del agua, y puede ser modificada seleccionando una combinación apropiada de solutos (es decir, polisacáridos, azúcares, sales y proteínas).

35 La formación vítrea ocurre de forma natural en algunas especies vegetales y de artrópodos que son muy tolerantes a la desecación. Varios musgos y helechos, denominados plantas de la resurrección, pueden experimentar una desecación grave y sobrevivir durante muchos años en un estado metabólico latente y luego revivir con el regreso del agua al entorno. En la mayoría de los casos, la característica de adaptación es para aumentar las concentraciones internas de ciertos sacáridos, como la trehalosa, hasta un nivel que forme estados vítreos. El documento US-B-6468782 enseña procedimientos de secado y estabilización de células procariontas y las composiciones obtenidas por los mismos. En primer lugar, las células son cultivadas e incubadas en condiciones suficientes para inducir la trehalosa intracelular, suspendidas en una solución estabilizante y secadas para formar un vidrio sólido. El producto resultante es estable en su conservación a temperatura ambiente, mostrando poca pérdida de viabilidad en su conservación. El documento WO-A-2005/084646 da a conocer una formulación en polvo que es una mezcla liofilizada de un material activo sensible (0,1-50% en peso) y un excipiente (50-99,99% en peso), estando al menos un 0,1% en peso de la mezcla en un estado amorfo; la formulación tiene una higroscopicidad sustancialmente reducida.

45 Antes de la presente divulgación, nadie ha podido proporcionar una solución común y rentable para los problemas separados que afronta la industria de los probióticos, concretamente mantener la estabilidad (es decir, la viabilidad) en un periodo de validez prolongado de células bacterianas a temperatura ambiente y actividad hídrica elevada (o gran humedad), y proporcionar protección gástrica para minimizar las pérdidas de la viabilidad probiótica durante el tránsito por el estómago. La presente invención supera estos problemas.

#### Breve resumen de la divulgación

55 La presente divulgación abarca composiciones y procedimientos de producción de micropartículas que comprenden una matriz sólida en forma vítrea adecuada para su administración oral. Las composiciones incluyen una combinación de un polisacárido, un sacárido, un poliol y una bacteria probiótica. Estas composiciones están diseñadas para proporcionar estabilidad en un periodo de validez más prolongado a temperatura ambiente en entornos de gran actividad hídrica, y protección gástrica del probiótico. Además, el procedimiento de producción de esta matriz implica procesos que dan como resultado una mínima pérdida de la viabilidad del probiótico.

En consecuencia, un aspecto de la presente invención comprende una composición seca en forma vítrea sólida adecuada para su administración oral, comprendiendo la composición una mezcla que incluye al menos un

polisacárido, un sacárido, un poliol y bacterias probióticas, en la que el sacárido es trehalosa y la proporción entre el sacárido y el poliol es 3:1 a 1:3.

En un aspecto preferente, las bacterias de la mezcla de conservación de hidratos de carbono son bacterias probióticas seleccionadas, sin limitación, del grupo consistente en *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Propionobacterium*, *Bacillus* y *Streptococcus* vivos.

En otro aspecto de la invención, el polisacárido de la mezcla de conservación proporciona protección gástrica y un mecanismo de control de la liberación que libera gradualmente los microbios en su lugar de acción en el intestino delgado y el intestino grueso del animal o del ser humano. Ejemplos de polisacáridos con protección gástrica y un mecanismo de control de la liberación son los polisacáridos formadores de hidrocoloides seleccionados del grupo que incluye, sin limitación, almidón (incluyendo el almidón no digestible), pectina, inulina, goma xantana, alginato, ácido alginico, quitosano, carragenano, carboximetil celulosa, metil celulosa, goma guar, goma arábica, goma garrofin y combinaciones de los mismos. También preferentemente, la concentración de los polisacáridos en la mezcla de conservación es inferior al 10% p/v y, más preferentemente, inferior al 5% p/v de la mezcla de conservación.

En otro aspecto de la invención, la combinación de sacáridos/polioles en la mezcla de conservación está formulada para que no cristalice durante el secado y la conservación a largo plazo a temperatura ambiente. Un sistema adecuado de formulación vítrea incluye, sin limitación, trehalosa/glicerol, trehalosa/manitol, trehalosa/maltitol, trehalosa/isomaltitol, trehalosa/adonitol, trehalosa/lactitol y trehalosa/sorbitol. La trehalosa es un disacárido no reductor que se da en la naturaleza que se asocia con la prevención del daño por desecación en ciertas plantas, microbios y animales que pueden secarse sin daño y revivir cuando se rehidratan. También se ha demostrado que la trehalosa es útil en la prevención de la desnaturalización de proteínas, virus y productos alimentarios durante la desecación (Chen y otros 2001, Crowe and Crowe 1992, Liao y otros 2002). Comparada con la de la sacarosa, la temperatura de transición vítrea de la trehalosa es significativamente mayor (110°C en comparación con solo 65°C) (Crowe y otros 1998). Sin embargo, la trehalosa no siempre es suficiente para estabilizar bacterias, especialmente a temperatura y humedad elevadas. Además, las membranas son más permeables a los alcoholes de azúcar externos que a la trehalosa externa (Krallish I y otros 1997, Linders L J y otros 1997, Qiu L y otros 2000). Precisamente el efecto sinérgico de la trehalosa y los alcoholes de azúcar proporciona mayor protección y mejora la viabilidad celular durante un periodo de conservación prolongado. Preferentemente, la concentración tanto del sacárido como del poliol en la mezcla es inferior al 60% p/v y, más preferentemente, inferior al 40% p/v de la mezcla de conservación. Preferentemente, la proporción entre el sacárido y el poliol es de aproximadamente 3:1 trehalosa/poliol, aunque una proporción de 1:3 trehalosa/poliol es también similarmente efectiva en la conservación de ciertas especies probióticas.

La presente divulgación también proporciona procedimientos de secado de la mezcla en forma vítrea con una mínima pérdida de viabilidad. Se descubrió que eran posibles la vitrificación y el secado eficiente de la mezcla de conservación al vacío sin la necesidad de formación de espuma descrita por Bronshtein (2004). La gelificación o reticulación de los polisacáridos en la mezcla de conservación y cortarla en trozos pequeños eliminaron la necesidad de espumar la mezcla para secarla al vacío. También redujeron la formación de un producto gomoso que se daba a menudo en el procedimiento de espumado. Preferentemente, se permite que la mezcla de conservación, incluyendo el probiótico, gelifique a baja temperatura y luego es cortada y secada al vacío en condiciones adecuadas para la formación vítrea. Más preferentemente, el polisacárido de la mezcla se selecciona del grupo de polisacáridos reticulables, tales como el alginato, la pectina o el quitosano. A continuación, la mezcla es extrudida al interior de un baño de Ca<sup>++</sup> y las cuerdas o partículas son recogidas, enjuagadas con agua y luego empapadas en una mezcla adecuada de trehalosa/poliol, seguido por un secado al vacío en condiciones adecuadas para la formación vítrea.

La presente divulgación también proporciona procedimientos de secado al vacío de la matriz de conservación sin espumado ni formación de hielo. El procedimiento de secado por formación vítrea comprende mantener la matriz a 40°C, aplicar un vacío inicial de aproximadamente 333,31 Pa durante un periodo de tiempo seguido por secado a menos de 13,33 Pa durante otro periodo de tiempo. Preferentemente, se mantiene la temperatura inicial del producto a o aproximadamente a 10-20°C durante el periodo a presión parcialmente reducida (333,31 Pa) y luego se aumenta hasta 40-50°C cuando la presión atmosférica disminuye hasta menos de 13,33 Pa. También puede resultar beneficiosa una etapa final de secado a 20°C con un vacío máximo (ca. 1,33 Pa) durante un periodo de tiempo adicional para la total eliminación del agua. A continuación, la matriz seca puede ser triturada o molida y, si es necesario, tamizada hasta obtener un polvo particulado deseado.

Breve resumen de varias vistas de los dibujos

La Figura 1 es un diagrama de flujo que muestra un procedimiento de desecación contracorriente de un hidrogel de matriz húmeda usando un sacárido pulverizado (trehalosa) como mezcla estabilizante.

La Figura 2 es un gráfico que representa el efecto de la concentración de trehalosa en el medio de secado sobre la viabilidad de las bacterias. La máxima viabilidad de *L. rhamnosus* se logró con una concentración de trehalosa de

0,5 M. Se secó *L. rhamnosus* al aire durante 3 días en una campana de flujo laminar en presencia de una concentración creciente de trehalosa.

La Figura 3 es un gráfico de barras que representa el efecto de los sacáridos y los polioles (con una concentración total del 24% p/v en el medio de secado) sobre la viabilidad de *L. paracasei* tras el secado.

5

La Figura 4 es un gráfico de barras que representa el efecto de diferentes proporciones de sacáridos/polioles (trehalosa/manitol o trehalosa/isomaltitol) en una mezcla de polisacáridos (2% almidón, 1% alginato de sodio y 0,5% pectina) sobre la viabilidad de *L. acidophilus* tras el secado al vacío (la concentración total de los sacáridos y los polioles es del 30% p/v).

10

La Figura 5 es un gráfico de barras que representa el efecto de la mezcla de polisacáridos (2% almidón, 1% alginato de sodio y 0,5% pectina) con 3:1 trehalosa/isomaltitol (la concentración total de los sacáridos/polioles es del 40% p/v) sobre la viabilidad de *L. acidophilus* seco a 45°C al 0% o el 33% de humedad relativa.

15

La Figura 6 es un gráfico de barras que representa el efecto de jugos gástricos simulados correspondientes a después de comer (12% de leche desnatada, 2% de glucosa, 1% de extracto de levadura y 0,05% de cisteína; pH 2) o en ayunas (0,32% de pepsina, 0,2% de cloruro sódico; pH 1,2) sobre *L. paracasei* seco en forma libre o en forma vítrea de la mezcla de polisacáridos/sacáridos/polioles.

20

La Figura 7 es un gráfico de barras que representa el efecto de jugos gástricos simulados correspondientes a en ayunas (0,32% de pepsina, 0,2% de cloruro sódico; pH 1,2) sobre *L. acidophilus* seco en forma libre o en forma vítrea de la mezcla de polisacáridos/sacáridos/polioles.

25

La Figura 8 es un par de gráficos que representan el efecto de una mezcla de hidratos de carbono/polisacáridos/albúmina de huevo (trehalosa/alginato/pectina/albúmina de huevo 30:1,5:0,5:10) sobre la viabilidad de *Lactobacillus GG* seco a 40°C al 15% o el 33% de humedad relativa.

#### Descripción detallada

30

La divulgación versa acerca de una composición que está en una matriz vítrea sólida que comprende un polisacárido, sacáridos, polioles y bacterias probióticas y procedimientos para la producción eficiente de esta composición a gran escala.

#### Definiciones

Según se usan en el presente documento, cada uno de los términos siguientes tiene el significado asociado con él en esta sección.

35

"Polisacáridos" se refiere a compuestos que consisten en un gran número de monosacáridos ligados con enlaces glucósidos. Según se usa en el presente documento, el término polisacáridos se refiere únicamente a aquellos que contienen más de diez residuos monosacáridos.

"Sacáridos" incluye monosacáridos, disacáridos y oligosacáridos.

40

"Polioles" se refiere en general a compuestos químicos que contienen múltiples grupos hidroxilo. Según se usa en el presente documento, el término poliol significa alcohol de azúcar, que es una forma hidrogenada de hidrato de carbono cuyo grupo carbonilo (azúcar reductor de aldehído o cetona) ha sido reducido a un grupo hidroxilo primario o secundario. Algunos alcoholes de azúcar comunes son: manitol, sorbitol, xilitol, isomaltitol, maltitol, lactitol.

45

"Vitrificación" (es decir, formación de vidrio) significa formación de un material amorfo vítreo o no cristalino. Según se usa en el presente documento, el término vidrio o estado vítreo significa una fase líquida de tan alta viscosidad y bajo contenido en agua que todas las reacciones químicas son ralentizadas hasta casi su paralización, y las células bacterianas se vuelven latentes.

"Cristalización" se refiere a la formación de cristales sólidos a partir de una solución homogénea. Es esencialmente una separación entre sólidos y líquidos.

"Crioprotector" se refiere a un compuesto o una sustancia química que se usa para impedir la formación de cristales de hielo durante el sobreenfriamiento de una mezcla que contiene agua.

50

#### Descripción detallada

Un polisacárido capaz de formar una matriz de gel resistente es fundamental para esta invención. Preferentemente, esta matriz retiene bacterias y la mezcla de conservación aun después de ser cortada en trozos pequeños o conformada en hilos delgados, cuerdas o partículas. Además, la matriz de polisacáridos posee preferentemente un mecanismo de liberación controlada que protege las bacterias en el estómago, y que es capaz de liberar las bacterias en su lugar de acción en el intestino.

55

Varios polisacáridos presentan estos requisitos y son adecuados para el uso descrito en el presente documento. El almidón con alto contenido de amilosa es un polisacárido capaz de formar un gel firme tras hidratar los gránulos de almidón en agua en ebullición, dispersar los gránulos con la ayuda de un mezclador de alta velocidad y enfriar luego la solución hasta aproximadamente 0-10°C. La firmeza y la resistencia del gel dependen de la concentración de almidón en la solución, con una concentración trabajable máxima de hasta el 10% p/v. La matriz cortada de gel de almidón también es capaz de retener las bacterias vivas en la mezcla de conservación y, dado que es en su mayor parte no digestible por los jugos intestinales o gástricos, las bacterias son protegidas de la destrucción gástrica mientras se encuentran dentro de la matriz de almidón. Se proporciona el mecanismo de liberación controlada por el hecho de que el almidón con un alto contenido de amilosa es digestible por la microflora intestinal, momento en el cual las bacterias vivas administradas son liberadas en su forma intacta.

La pectina es otro polisacárido adecuado que se comporta de forma muy similar al almidón con alto contenido de amilosa. La pectina tiene una ventaja adicional, dado que la resistencia de la matriz de gel de pectina puede aumentar adicionalmente con la adición de cationes divalentes, como  $\text{Ca}^{++}$ , que forman puentes entre los grupos carboxilo de los polímeros de azúcar.

En una realización preferente de la presente invención se usan alginato o una combinación de alginato y almidón no digestible. El alginato puede formar una matriz de gel firme por reticulación con cationes divalentes. La solución de conservación que contiene alginato puede ser endurecida hasta crear una matriz de gel firme al reticularse internamente los polisacáridos de alginato con  $\text{Ca}^{++}$  y luego cortar el gel en trozos pequeños mientras las bacterias y la mezcla de conservación están completamente retenidas dentro de la matriz de gel. Otro procedimiento de reticulado de la solución que contiene alginato y mezcla de conservación es extrudiendo hilos o cuerdas delgadas de la solución en un baño de  $\text{Ca}^{++}$ . Las cuerdas endurecen instantáneamente tras la interacción con el  $\text{Ca}^{++}$ . Las cuerdas delgadas son recogidas, enjuagadas con agua potable y luego empapadas nuevamente en la solución de conservación, pero sin la presencia de polisacáridos. Otro procedimiento adecuado es inyectar los hilos delgados en el baño de  $\text{Ca}^{++}$ , que también contiene una mezcla de conservación con igual concentración y proporción que las de la solución extrudida. Un procedimiento alternativo de preparación de la matriz es atomizar la mezcla al interior de un baño que contiene cationes de  $\text{Ca}^{++}$ . En tal procedimiento se producen pequeñas micropartículas de 50 a 500 micrómetros. Tales partículas son recogidas, enjuagadas y empapadas en el medio de conservación, o el propio baño puede contener la mezcla de conservación según se ha descrito más arriba para la producción de los hilos o las cuerdas delgadas.

Se monitoriza constantemente el nivel de  $\text{Ca}^{++}$  en el baño y solo se añade de una vez una cantidad suficiente de cationes necesaria para reticular el alginato. Esto elimina la necesidad de enjuagar el exceso de  $\text{Ca}^{++}$  de las cuerdas o partículas, reteniendo con ello todo el azúcar en la matriz, que, si no, se perdería por lavado. En un modo preferente de la presente invención, monitorizar los cationes de  $\text{Ca}^{++}$  en un intervalo del 0,25-0,5% p/v en el baño reticulante es suficiente para endurecer la solución de alginato extrudido sin ningún daño a las bacterias probióticas. La protección gástrica y el desencadenante de la liberación controlada también se cumplen mediante el uso del polisacárido de alginato. Una matriz polimérica que contiene alginato permanece firme en el entorno ácido del estómago, protegiendo con ello a las bacterias, pero se desintegra rápidamente en el entorno de mayor pH y rico en fosfatos del intestino. Esto da como resultado la liberación de las bacterias probióticas en su lugar de acción en el intestino.

El propósito de la mezcla de conservación es proporcionar protección contra derivas de temperatura y humedad del producto final sin la indebida pérdida de viabilidad de las bacterias probióticas. Una mezcla ideal contiene una combinación de sacáridos y alcoholes de azúcar que forman una fase vítrea amorfa con una temperatura de transición vítrea (Tg) muy por encima de la temperatura ambiente y actividad hídrica del producto. La trehalosa por sí sola no siempre es suficiente para estabilizar las bacterias, especialmente con una temperatura y una humedad elevadas. Se descubrió que una mezcla más adecuada era una combinación de trehalosa y alcohol de azúcar adicional, que proporciona un efecto sinérgico de mayor protección y viabilidad celular mejorada en periodos de conservación prolongados. Además de alcoholes de azúcar y otros polialcoholes de cadena larga, otros conservadores incluyen sacarosa, lactosacarosa, rafinosa, maltodextrina, sefarosa y dextrano. Estos compuestos pueden mejorar sinérgicamente la conservación de ciertas especies de bacterias.

La concentración y la proporción de diferentes hidratos de carbono en la mezcla de conservación dependen de varios factores, y, muy en particular, de la especie de las bacterias, de su cepa y de las condiciones de secado. La presente invención da a conocer varias concentraciones óptimas y proporciones de azúcares adecuadas para su inclusión en la mezcla de conservación para varias bacterias probióticas. Preferentemente, la concentración de hidratos de carbono debería ser inferior a aproximadamente el 50%, ya que concentraciones mayores pueden interferir en el secado efectivo.

La mezcla de conservación puede incluir opcionalmente otros aditivos que contribuyen a la estabilidad general de las bacterias probióticas. Aditivos adecuados incluyen proteínas, aminoácidos, diluyentes, quelantes, tampones, conservantes, estabilizadores, antioxidantes y lubricantes. Ejemplos específicos de tales aditivos incluirían, sin limitación: aminoácidos: lisina, glicina, leucina L, isoleucina, arginina, cisteína; proteínas: proteínas del plasma humano, albúmina de huevo, gelatina; tampones: diversos tampones de fosfato de sodio, tampones cítricos/de

citrato; conservantes: derivados de los ácidos hidroxibenzoicos; antioxidantes: vitamina E, ácido ascórbico; lubricantes: silicona/silicatos miscibles en agua; quelantes: ácido cítrico, EDTA, EGTA.

En un modo preferente de la presente divulgación, el gel cortado o los hilos o las cuerdas delgadas son secados de tal modo que se forme un vidrio. Pueden emplearse varios procedimientos de secado, incluyendo, sin limitación, secado al aire a temperatura ambiente, secado por pulverización, secado en lecho fluidizado, secado al vacío y liofilizado. Según se usa en el presente documento, el vidrio que contiene las células bacterianas secadas contiene, preferentemente, un contenido de humedad residual inferior a aproximadamente el 5% y, más preferentemente, inferior a aproximadamente el 2%.

Preferentemente, el secado se lleva a cabo al vacío en un liofilizador con una temperatura del producto por encima de la temperatura de congelación del agua en tales condiciones. En general, el secado por vacío se lleva a cabo en dos etapas. La primera etapa implica una presión moderadamente reducida (ca. 333,31 Pa) a temperaturas templadas (20°C), mientras que la segunda etapa implica presiones menores (es decir, un vacío mayor: 13,33 Pa) a temperatura más alta (hasta aproximadamente 50°C). Puede lograrse este procedimiento usando un sistema de control programable para la presión de vacío y la temperatura del producto. Las condiciones de vacío y de temperaturas para la primera etapa de secado son ajustadas empíricamente según el tamaño del secador, la capacidad de transferencia del calor y la carga de producto, pero la meta es mantener el producto por encima de su temperatura de congelación maximizando la tasa de evaporación del agua. En una realización, la temperatura se mantiene inicialmente a aproximadamente 20°C durante aproximadamente 16 horas, seguido por un aumento gradual de la temperatura hasta aproximadamente 50°C durante las 48 horas siguientes. Estas condiciones de secado permiten la formación de un estado vítreo en el que las bacterias están bloqueadas en un estado latente dentro de la matriz de polisacáridos.

En una realización preferente, las bacterias probióticas son secadas como sigue: la presión inicial de vacío se regula a aproximadamente 333,31 Pa, con una temperatura inicial de almacenamiento de 40°C durante 12 horas, seguido por una reducción incremental de la presión atmosférica (es decir, aumento del vacío) hasta menos de 13,33 Pa a una tasa de 16,67 Pa/hora. Una vez que el vacío alcanza 13,33 Pa, se mantiene la muestra a 40°C durante 12 horas adicionales. Siguiendo este protocolo, el procedimiento de secado se completa en menos de 48 horas sin comprometer sustancialmente la viabilidad. Según la presente invención, la gran área superficial del gel o las cuerdas cortados o picados aumenta muchísimo la tasa de evaporación sin la necesidad de hervir ni espumar el producto, eliminando así condiciones incoherentes de secado y salpicaduras de la solución espumante del producto en la cámara de vacío. Además, la composición y el procedimiento de secado dados a conocer dan como resultado una mayor capacidad de carga de producto en comparación con el procedimiento de secado por espuma, que permite únicamente que se espume y se seque eficientemente una capa delgada de la solución.

Un procedimiento alternativo de secado para las cuerdas o las partículas de la matriz recién preparadas incluye una desecación controlada de la matriz mediante adición del hidrogel hasta un cierto volumen (preferentemente 1:10 en peso) de sacárido seco en polvo, tal como trehalosa o mezcla seca pulverizada de conservación. Durante este procedimiento, el hidrogel es desecado rápidamente a temperatura ambiente, concentrándose el material de conservación en la propia matriz. Preferentemente, el procedimiento se realiza contracorriente, añadiéndose por un extremo de la corriente de tratamiento la matriz de hidrogel completamente hidratado que contiene las bacterias y, desde la dirección opuesta, flujos de sacáridos de conservación secos en polvo (Figura 1). El material humedecido de los sacáridos en polvo se seca a temperatura elevada y vuelve a usarse mientras que el hidrogel parcialmente desecado va entonces a la segunda etapa de secado por vacío descrita más arriba. Este procedimiento reduce significativamente el tiempo de secado y los costes de tratamiento.

El material vítreo resultante acotado por la matriz, que contiene las bacterias probióticas secadas y estabilizadas tiene una Tg suficientemente elevada para conservar las bacterias a temperatura ambiente (hasta 30°C) con una humedad relativa del 33%. Generalmente, cuanto más alta sea la Tg, mayores serán la temperatura y la humedad permisibles de conservación. La Tg de la mezcla de conservación vítrea seca de la presente invención es determinada usando técnicas estándar de la técnica, tales como la calorimetría diferencial de barrido.

Los procedimientos y las composiciones de la invención facilitan el desarrollo de varios productos, incluyendo, sin limitación: vacunas de bacterias vivas en forma estable seca, nutracéuticos (probióticos) bacterianos vivos en forma estable seca, fermentos bacterianos vivos en forma estable seca, bacterias vivas en forma estable seca para usos agrícolas, en acuicultura o biorremediación, y cultivos de bacterias vivas en forma estable seca para la industria biotecnológica.

Los ejemplos siguientes ilustran diversos aspectos de la presente invención relativos a la producción de un vehículo de administración que comprende una matriz seca y estable de polisacáridos, sacáridos, polioles y bacterias probióticas en forma vítrea. Las composiciones y los procedimientos de secado está adaptados para estabilizar y conservar varias bacterias probióticas en almacenamiento y un entorno gástrico.

## Ejemplos

Ahora se describe la materia de esta divulgación con referencia a los siguientes ejemplos. Estos ejemplos son facilitados únicamente con fines ilustrativos, y la materia no está limitada a estos ejemplos, sino que, más bien, abarca todas las variaciones que son evidentes como resultado de la enseñanza proporcionada en el presente documento.

### 5 Ejemplo 1

Se mezcló almidón con alto contenido de amilosa (100 g de Novation®, National Starch and Chemical, Bridgewater, Nueva Jersey) con 150 ml de agua a temperatura ambiente. A continuación, la mezcla de almidón fue añadida lentamente a 850 ml de agua en ebullición con un mezclado vigoroso usando una batidora doméstica estándar. Una vez que se observó una completa dispersión de los gránulos de almidón (usando un microscopio binocular), se dejó enfriar la solución de almidón y, a continuación, se disolvieron en la mezcla 300 g de trehalosa y 100 g de isomaltitol (ambos de Cargill Minneapolis, Minnesota). Se añadió alginato de sodio (15 g) a la suspensión espesa y se dejó enfriar toda la mezcla hasta la temperatura ambiente. A continuación, se mezcló bien *Lactobacillus paracasei* (200 g de pasta congelada, directamente de la recolección de fermentación) en la suspensión espesa y la suspensión espesa fue extrudida al interior de un baño de 1000 ml (mantenido a 0-5°C) que contenía 5 g de CaCl<sub>2</sub>, 300 g de trehalosa y 100 g de isomaltitol usando una jeringa equipada con una aguja 18 G. El baño de CaCl<sub>2</sub> fue agitado ligeramente mientras se inyectó la suspensión espesa. Se dejó que las cuerdas de la matriz se reticulasen durante 30 minutos y luego fueron recogidas y escurridas sobre una toalla de papel. La Tabla 1 proporciona la composición de la matriz de gel.

Tabla 1. Composición de la matriz de gel (g peso seco/100 g)

amilosa elevada (70% de amilosa)	10 g
trehalosa	30 g
isomaltitol	10 g
alginato de sodio	1,5 g
<i>L. paracasei</i>	20 g
agua	100 g

Los hilos delgados fueron cargados en una bandeja (13 × 25,4 cm) y colocados en un liofilizador (Virtis Advantage, Virtis, Gardiner, Nueva York). Se fijó el condensador a -70°C y se fijó la temperatura de almacenamiento a 40°C. Cuando el producto se hubo calentado hasta la temperatura de almacenamiento (medida por un par de sensores de temperatura metidos en el material húmedo), se inició y se controló el vacío a aproximadamente 333,31 Pa con un controlador externo de vacío (Thyr-Cont, Electronic, GmbH). A medida que disminuyó la presión atmosférica, la temperatura del producto cayó y se estabilizó a aproximadamente -2°C. Después de 12 horas, la temperatura del producto había aumentado hasta aproximadamente 10°C. En este punto, la presión atmosférica cayó en aproximadamente 66,66 Pa cada 4 horas hasta que se estableció la presión de vacío total de 1,33 Pa. En este periodo de tiempo de vacío creciente, se mantuvo cuidadosamente la temperatura del producto a o por encima de -5°C. Doce horas después de establecer el vacío total, el producto secado fue sacado del liofilizador y triturado hasta obtener un polvo fino usando un molinillo de café estándar.

### Ejemplo 2

Se añadieron 100 g de trehalosa y 300 g de isomaltitol (ambos de Cargill Minneapolis, Minnesota) a 1000 ml de agua y se dejó que se disolvieran. Se mezcló alginato de sodio (15 g) en la suspensión espesa y se dejó enfriar hasta la temperatura ambiente. A continuación, se añadió *Lactobacillus paracasei* (200 g de pasta congelada, como en el Ejemplo 1) a la suspensión espesa, seguido por 5 g de fosfato cálcico dibásico y 5 g de gluconolactona. Se dejó que la suspensión espesa reticulase a temperatura ambiente durante las 4 horas siguientes. El gel firme fue cortado formando hilos delgados y largos pasando por un rallador de queso y escurriendo sobre una toalla de papel. La Tabla 2 proporciona la composición de la matriz de gel.

Tabla 2. Composición de la matriz de gel (g peso seco/100 g)

trehalosa	10 g
isomaltitol	30 g
alginato de sodio	1,5 g
<i>L. paracasei</i>	20 g
agua	100 g

Los hilos delgados fueron cargados en una bandeja (13 × 25,4 cm) y colocados en un liofilizador para su secado según se ha esbozado en el Ejemplo 1.

### Ejemplo 3

Se añadieron 300 g de trehalosa (Cargill Minneapolis, Minnesota) y 100 g de manitol (Sigma) a 1000 ml de agua y se dejó que se disolvieran. Se mezclaron alginato de sodio (15 g) y pectina (5 g) en la suspensión espesa y se dejó a la suspensión espesa enfriar hasta la temperatura ambiente. Se mezcló bien en la suspensión espesa

5 *Lactobacillus acidophilus* (200 g de pasta congelada, directamente de la recolección de fermentación). Acto seguido, la suspensión espesa fue extrudida por medio de una jeringa equipada con una aguja 18 G al interior de un baño de 1000 ml (0-5°C) que contenía 5 g de CaCl<sub>2</sub>, 300 g de trehalosa y 100 g de manitol. El baño de CaCl<sub>2</sub> fue agitado ligeramente mientras se extruyó la suspensión espesa. Se dejó que las cuerdas formadas se reticulasen durante 30 minutos y luego fueron recogidas y escurridas sobre una toalla de papel. La Tabla 3 proporciona la composición de la matriz de gel.

Tabla 3. Composición de la matriz de gel (g peso seco/100 g)

trehalosa	30 g
manitol	10 g
alginato de sodio	1,5 g
pectina	0,5 g
<i>L. acidophilus</i>	20 g
agua	100 g

Los hilos delgados fueron cargados en una bandeja (33 × 25,4 cm) y colocados en un liofilizador para su secado según se ha esbozado en el Ejemplo 1.

#### Ejemplo 4

10 Optimización de la concentración de trehalosa en el medio de conservación

Se añadió *L. rhamnosus* seco en polvo (LCS - 742, Morinaga Milk Industry Co., LTD., Kanagawa, Japón) a diversas concentraciones de trehalosa en un medio de cultivo bacteriano y (L.MRS) y se dejó que se desecara en una campana de flujo laminar a temperatura ambiente durante 3 días. Al final del periodo de secado de tres días se midió la viabilidad de las bacterias en función de la concentración de trehalosa. Se reconstituyeron el polvo bacteriano seco o muestras desecadas en tampón estéril de 50 mM PBS, pH 7,4. Tras la homogeneización, las soluciones de los cultivos reconstituidos fueron diluidas (en incrementos de magnitudes de 10) en tampón de PBS y puestas en placas por triplicado sobre agar L.MRS. Tras la incubación a 35°C durante 48-72 horas, se determinó el número de unidades formadoras de colonias (UFC) y se descubrió que la viabilidad de *L. rhamnosus* era máxima con una concentración inicial de trehalosa de 0,5 M (Figura 2).

20 Ejemplo 5

Efecto de diferentes alcoholes de azúcar sobre la conservación de *L. paracasei*

Se preparó y se secó *L. paracasei* según se ha descrito en el Ejemplo 2, salvo que la concentración total de azúcar era del 24% y la concentración de almidón era del 2% en el medio de conservación. Se sometió a ensayo a varios alcoholes de azúcar para averiguar su efecto sobre la viabilidad de las bacterias después del secado. La Figura 3 muestra que la trehalosa y el sorbitol proporcionaron la mejor protección para las bacterias usando este procedimiento de secado y conservación.

#### Ejemplo 6

Efecto de diferentes alcoholes de azúcar sobre la conservación de *L. acidophilus*

30 Se secó *L. acidophilus* según se describe en el Ejemplo 3, salvo que se usaron proporciones diferentes de trehalosa/manitol o trehalosa/isomaltitol y la mezcla final contenía una combinación de 3 polisacáridos (2% almidón, 1% alginato de sodio y 0,5% pectina). En la Figura 4 se muestra la viabilidad de *L. acidophilus* tras el secado por vacío. En todos los casos, las bacterias conservadas tenían una viabilidad mucho mayor en comparación con bacterias secadas sin las mezclas de sacáridos/polioles, y las diferentes proporciones entre sacáridos y polioles usadas en las mezclas de conservación produjeron prestaciones de protección similares para *L. acidophilus*.

35 Ejemplo 7

Estabilidad de *L. acidophilus* a 45°C al 0% o el 33% de humedad relativa

40 Se secó *L. acidophilus* según se describe en el Ejemplo 6. Las bacterias secadas fueron puestas en una incubadora con control de la temperatura y la humedad regulada a 45°C y al 0% de humedad relativa, o a 45°C y al 33% de humedad relativa durante 4 horas. La viabilidad de las bacterias fue medida antes y después de la exposición a la temperatura y la humedad. La Figura 5 muestra que la mezcla de polisacáridos (2% almidón, 1% alginato de sodio y 0,5% pectina) proporcionó protección adicional a la de trehalosa/isomaltitol por sí solos o la de bacterias libres.

#### Ejemplo 8

Estabilidad de la composición de la presente invención en jugos gástricos simulados

Se prepararon y se secaron *L. acidophilus* y *L. paracasei* según se ha descrito en el Ejemplo 2. A continuación, las bacterias de la matriz vítrea seca en polvo fueron expuestas durante 2 horas a jugo gástrico simulado (después de comer: 12% de leche desnatada, 2% de glucosa, 1% de extracto de levadura y 0,05% de cisteína; pH 2; o en ayunas: 0,32% de pepsina, 0,2% de cloruro sódico; pH 1,2). Se registraron las viabilidades bacterianas antes y después de la exposición a los jugos gástricos simulados. Las Figuras 6 y 7 demuestran una protección significativa de las bacterias en la composición de secado de la presente invención en las diferentes condiciones gástricas.

#### Ejemplo 9

Se añadieron 300 g de trehalosa (Cargill Minneapolis, Minnesota) y 100 g de albúmina de huevo (Sigma) a 1000 ml de agua y se dejó que se disolvieran. Se mezclaron alginato de sodio (15 g) y pectina (5 g) en la suspensión espesa y se dejó a la suspensión espesa enfriar hasta la temperatura ambiente. A continuación, se añadió a la suspensión espesa *Lactobacillus GG* (200 g de pasta congelada, directamente de la recolección de fermentación), seguido por 5 g de fosfato cálcico dibásico y 5 g de gluconolactona. Se dejó que la suspensión espesa reticulase a temperatura ambiente durante las 4 horas siguientes. El gel firme fue cortado formando hilos delgados y largos pasando por un rallador de queso y escurriendo sobre una toalla de papel. La Tabla 4 proporciona la composición de la matriz de gel.

Tabla 4. Composición de la matriz de gel (g peso seco/100 g)

trehalosa	30 g
albúmina de huevo	10 g
alginato de sodio	1,5 g
pectina	0,5 g
<i>Lactobacillus GG</i>	20 g
agua	100 g

Los hilos delgados fueron cargados en una bandeja (13 × 25,4 cm) y colocados en un liofilizador para su secado según se ha esbozado en el Ejemplo 1.

#### Ejemplo 10

Estabilidad de la composición de la presente invención a 40°C y al 15% o el 33% de humedad relativa

Se secó *Lactobacillus GG* según se ha descrito en el Ejemplo 9. Las bacterias secadas fueron puestas en una incubadora con control de la temperatura y la humedad regulada a 40°C y al 15% de humedad relativa, o a 40°C y al 33% de humedad relativa durante 4 semanas. La viabilidad de las bacterias fue medida cada 7 días. La Figura 8 muestra que la mezcla de hidratos de carbono/polisacáridos/albúmina de huevo (30% trehalosa, 10% albúmina de huevo, 1,5% alginato de sodio y 0,5% pectina) proporcionó protección adicional a la de trehalosa/isomaltitol por sí solos o la de bacterias libres.

#### Referencias

En el presente documento se cita la siguiente bibliografía:

- Bronshtein, V., C. Isaac, And G. Djordjevic. 2004. Preservation Of Bacterial Cells At Ambient Temperatures, EP1402003.
- Chen, T., J. P. Acker, A. Eroglu, S. Cheley, H. Bayley, A. Fowler, and M. Toner. 2001. Beneficial effect of intracellular trehalose on the membrane integrity of dried mammalian cells. *Cryobiology* 43: 168-81.
- Crowe, J. H., J. F. Carpenter, and L. M. Crowe. 1998. The role of vitrification in anhydrobiosis. *Annu Rev Physiol* 60: 73-103.
- Crowe, L. M., and J. H. Crowe. 1992. Anhydrobiosis: a strategy for survival. *Adv Space Res* 12: 239-47.
- Favaro-Trindade, C. S., and C. R. Grosso. 2002. Microencapsulation of *L. acidophilus* (La-05) and *B. lactis* (Bb-12) and evaluation of their survival at the pH values of the stomach and in bile. *J Microencapsul* 19: 485-94.
- Franks, F., B. J. Aldous, and A. Auffret. 2003. Stable compositions, US6503411.
- Isolauri E, Sutas Y, Kankaanpaa P, Arvilommi H, and S. S. 2001. Probiotics: effects on immunity. *Review. Am J Clin Nutr.* 73: 4448-4508.
- Kailasapathy K, and C. J. 2000. Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium spp.* *Review. Immunol Cell Biol.* 78: 80-88.

- Krallish I, Jeppsson H, Rapoport A, and H.-H. B. 1997. Effect of xylitol and trehalose on dry resistance of yeasts. *Appl Microbiol Biotechnol.* 47: 447-51.
- 5 Liao, Y. H., M. B. Brown, A. Quader, and G. P. Martin. 2002. Protective mechanism of stabilizing excipients against dehydration in the freeze-drying of proteins. *Pharm Res* 19: 1854-61.
- Linders LJ, Wolkers WF, Hoekstra FA, and v. t. R. K. 1997. Effect of added carbohydrates on membrane phase behavior and survival of dried *Lactobacillus plantarum*. *ECryobiology.* 35: 31-40.
- 10 Marteau PR, de Vrese M, Cellier CJ, and S. J. 2001. Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. Review. *Am J Clin Nutr.* 73: 430S- 436S.
- Perdigon G, Fuller R, and R. R. 2001. Lactic acid bacteria and their effect on the immune system. Review. *Curr Issues Intest Microbiol.* 2: 27-42.
- 15 Qiu L, Lacey MJ, and Bedding RA. 2000. Permeability of the infective juveniles of *Steinernema carpocapsae* to glycerol during osmotic dehydration and its effect on biochemical adaptation and energy metabolism. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 125: 411-9.
- 20 Roser, B. J., J. Kampinga, C. Colaco, and J. Blair. 2004. Solid dose delivery vehicle and methods of making same, US6811792.
- Shah, N. P. 2000. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. *J Dairy Sci* 83: 894-907.
- 25 Simmons, D. L., P. Moslemy, G. D. Paquette, D. Guerin, and M.-H. Joly. 2005. Stable probiotic microsphere compositions and their methods of preparation, PA20050266069.
- 30 Aunque se ha divulgado esta materia con referencia a realizaciones específicas, es evidente que los expertos en la técnica pueden idear otras realizaciones y variaciones sin apartarse de la materia descrita en el presente documento. Las reivindicaciones adjuntas incluyen todas las realizaciones y las variaciones equivalentes de ese tipo.

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición seca en forma vítrea sólida adecuada para su administración oral, comprendiendo la composición una mezcla que incluye al menos un polisacárido, un sacárido, un poliol y bacterias probióticas, en la que el sacárido es trehalosa y la proporción entre el sacárido y el poliol es 3:1 a 1:3.
- 5 2. La composición según la reivindicación 1 en la que el poliol se selecciona del grupo constituido por glicerol, manitol, maltitol, isomaltitol, adonitol, lactitol y sorbitol.
3. La composición según las reivindicaciones 1 o 2 en la que el polisacárido se selecciona de almidón, de almidón no digestible, de pectina, inulina, goma xantana, alginato, ácido algínico, quitosano, carragenano, carboximetil celulosa, metil celulosa, goma guar, goma arábiga, goma garrofin y combinaciones de los mismos.
- 10 4. La composición según la reivindicación 1 en la que las bacterias probióticas se seleccionan del grupo constituido por *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Propionobacterium*, *Bacillus* y *Streptococcus* vivos.
5. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en la que la composición es secada al vacío por evaporación y sin espumado ni formación de hielo, y en la que la composición proporciona protección gástrica de la bacteria probiótica.

Fig. 1

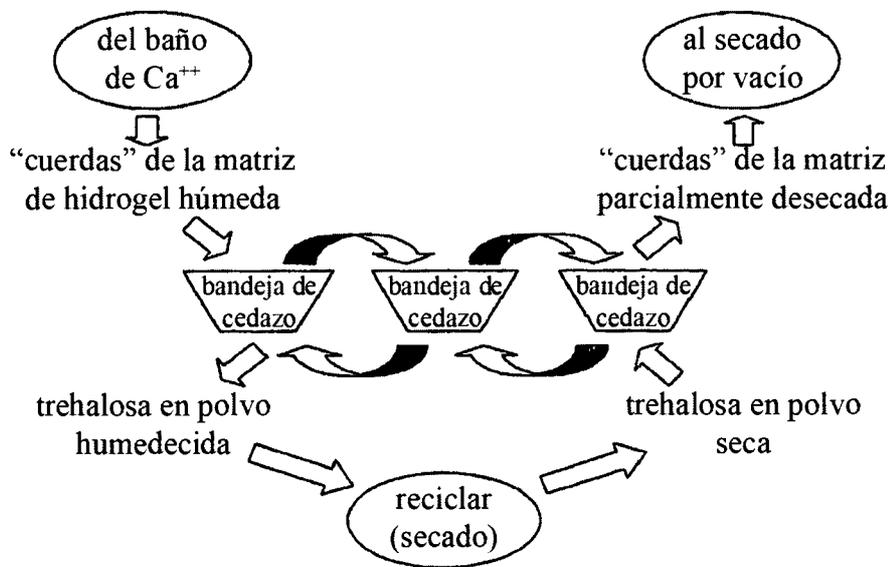


Fig. 2

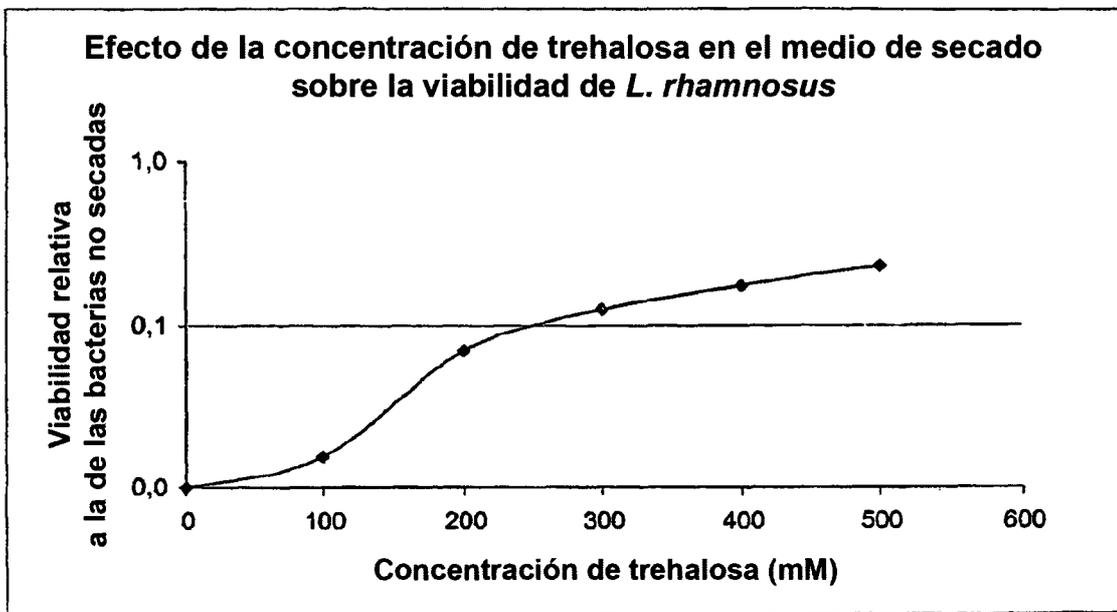


Fig. 3

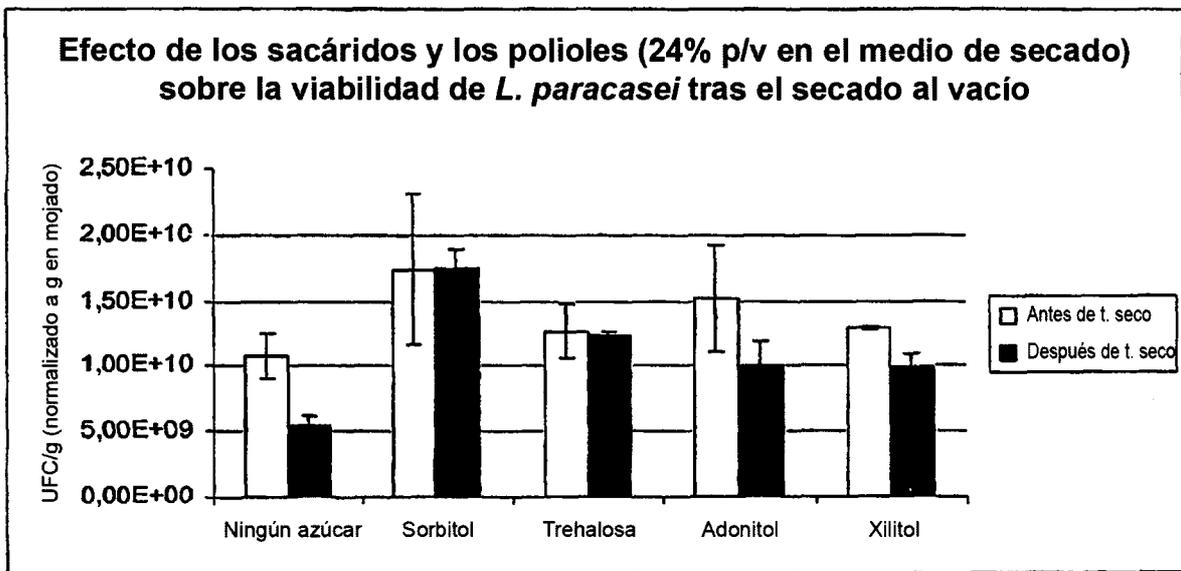


Fig. 4

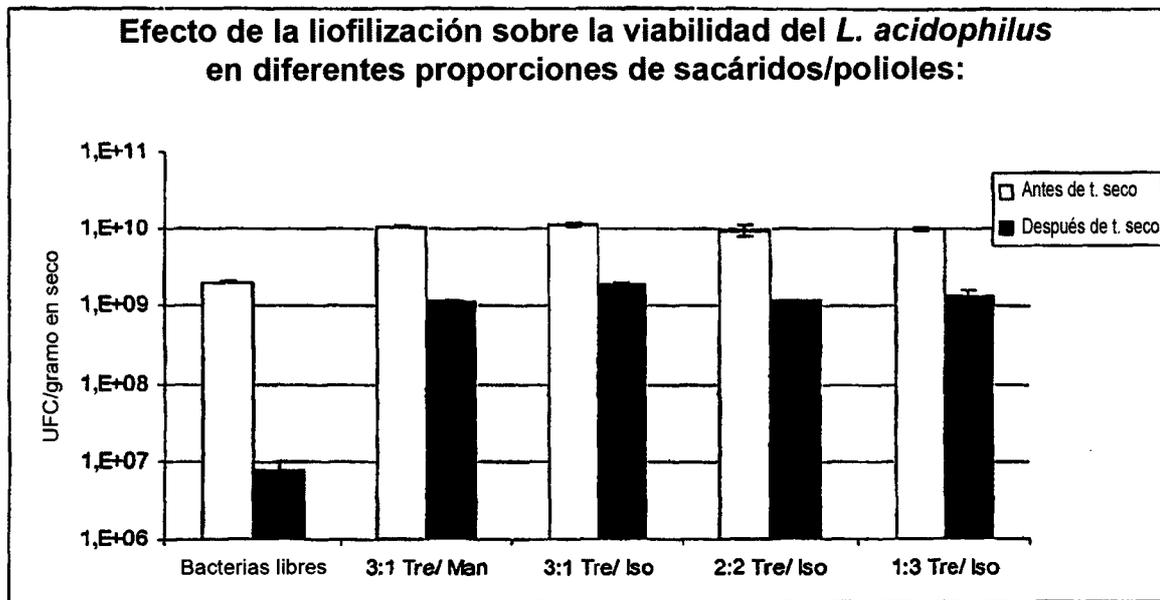


Fig. 5

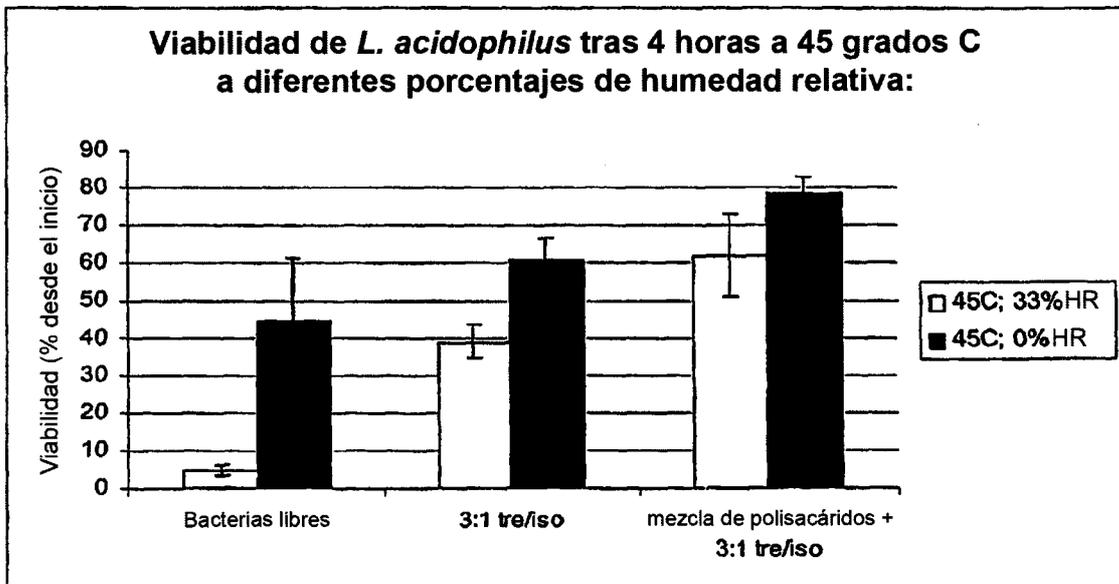


Fig. 6

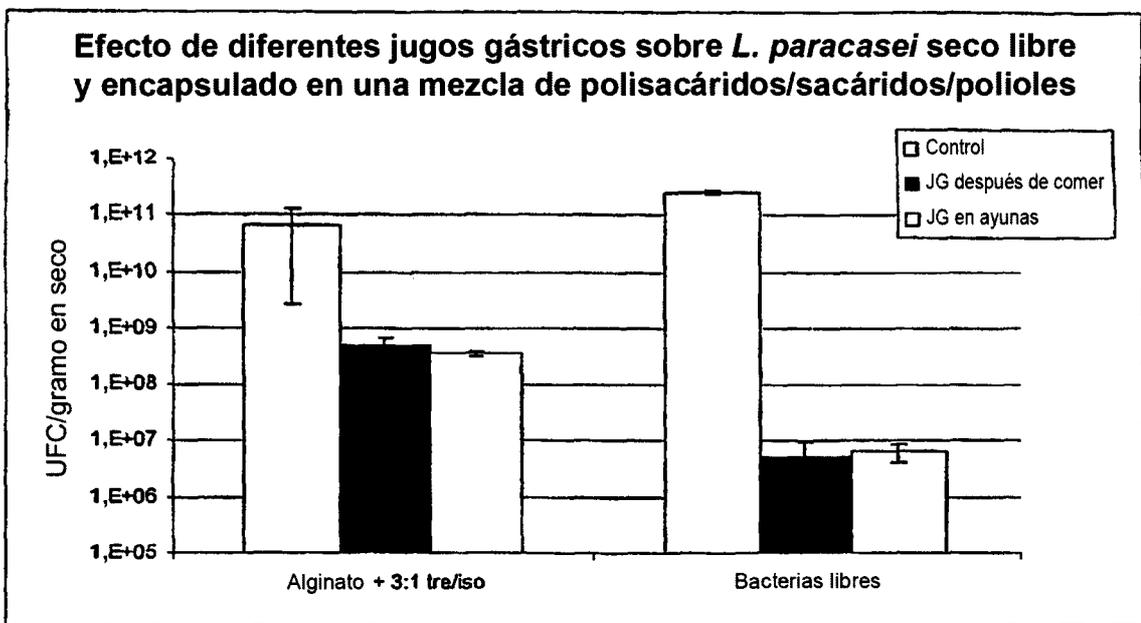


Fig. 7

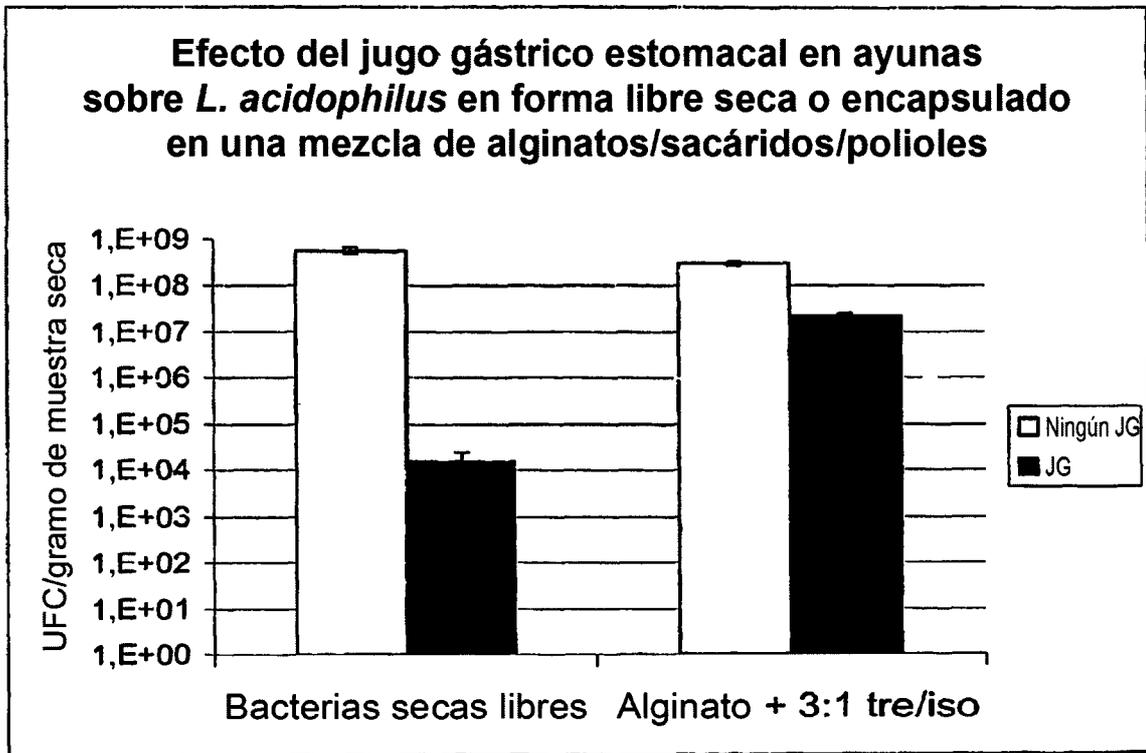


Fig. 8A

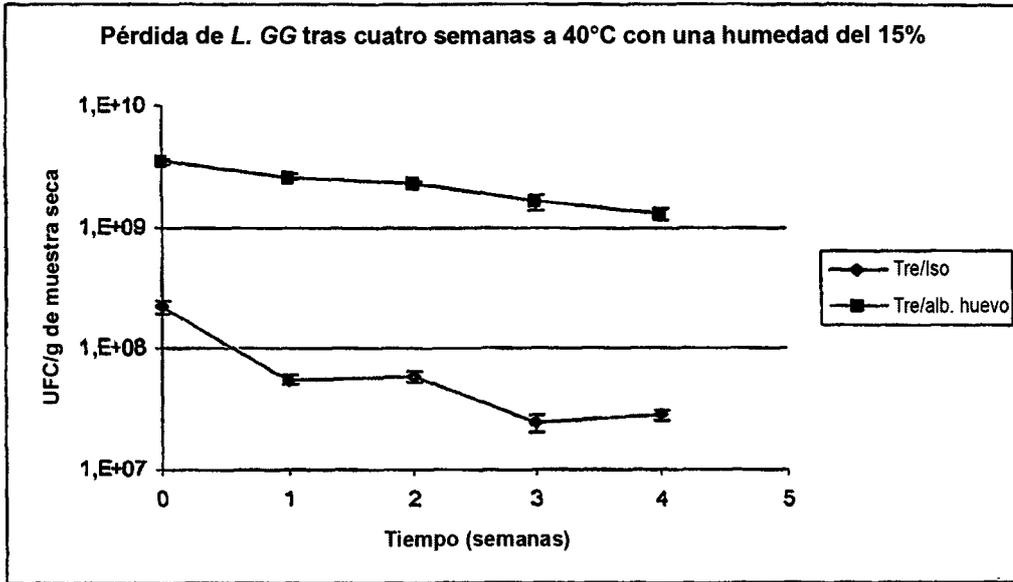


Fig. 8B

