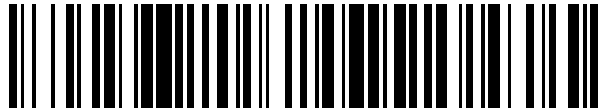


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 564 190**

51 Int. Cl.:

A23L 1/00 (2006.01)
A23P 1/04 (2006.01)
A61K 9/16 (2006.01)
B01J 13/02 (2006.01)
B01J 13/04 (2006.01)
B01J 13/20 (2006.01)
B01J 13/22 (2006.01)
A23L 1/211 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.04.2010 E 10726000 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.12.2015 EP 2418968**

54 Título: **Método para producir microperlas**

30 Prioridad:

13.04.2009 US 168746 P

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

18.03.2016

73 Titular/es:

**AGRICULTURE AND FOOD DEVELOPMENT
AUTHORITY (TEAGASC) (100.0%)
Oak Park
Carlow, Co. Carlow, IE**

72 Inventor/es:

**BRODKORB, ANDRE y
DOHERTY, SINEAD**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 564 190 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

Método para producir microperlas

Introducción

5 La invención se refiere a un método para producir microperlas que comprenden un componente activo encapsulado en una matriz de polímero gelificada. En particular, la invención se refiere a un método para producir microperlas que comprenden componentes sensibles tales como bacterias probióticas encapsuladas en una matriz de polímero gelificada. La invención también se refiere a microperlas que comprenden un componente activo encapsulado en una matriz de polímero.

Antecedentes de la invención

10 El método de usar proteínas de suero de la leche para crear perlas de gel de proteínas de suero de la leche no es nuevo. Ainsley Reid *et al.*, 2005 (*Ainsley Reid, A., J.C. Vuilleumard, M. Britten, Y. Arcand, E. Farnworth, y C.P. Champagne*. 2005. Microentrapment of probiotic bacteria in a Ca^{2+} -induced whey protein gel and effects on their viability in a dynamic gastro-intestinal model. *Journal of Microencapsulation* 22: 603-19.) describían un método que implica la producción de perlas de gotita simple usando pipetas/jeringas seguido de una etapa de gelificación. Este método produce geles de perla muy grandes que son la mayor parte inadecuados para la preparación de alimentos.

15 Rosenberg, 1994 (*Rosenberg, M.* 1993. Whey proteins as microencapsulating agents - Microencapsulation of anhydrous milkfat - Structure evaluation *Food Structure* 12: 31. o *Rosenberg, M.a.L., S.L.* 1993. Microstructure of whey protein/anhydrous milkfat emulsions. *Food Structure* 12: 267-274) describía la emulsificación de mezcla de proteína de suero de la leche desnaturalizadas por homogeneización a alta presión o alta cizalla, seguido de gelificación interna y separación posterior de la fase de gel y aceite. Las principales desventajas de este método es que el uso de alta presión/alta cizalla necesario para la formación de las micro-perlas puede causar un daño significativo al componente activo que encierra la micro-perla. También, la presencia de una fase de aceite y su eliminación a través del uso de detergentes también puede ser dañina para algunos componentes activos, como bacterias probióticas.

20 WO2007/034212 (Cambridge Applied Polymers Ltd) describe un método para preparar microgotitas, que comprende un aceite rico en omega-3 encapsulado en una matriz de proteína de suero de la leche desnaturalizada gelificada que se gelifica por la adición de ácido cítrico. El proceso implica una etapa de usar ácido cítrico para gelificar una disolución a granel de aceite y proteína de suero de la leche, y después homogeneización de la disolución a granel gelificada para proporcionar microgotitas y después secar por pulverización las microgotitas. Las etapas de
30 homogeneización y secado por pulverización son tratamientos relativamente severos no adecuados para la encapsulación de agentes activos sensibles tales como bacterias probióticas.

Declaraciones de la invención

35 El Solicitante ha descubierto sorprendentemente que las microperlas derivadas de proteína de suero de la leche desnaturalizada con calor inmediatamente gelificada y curada en un baño de acidificación, forman microperlas estables, robustas e idealmente esféricas capaces de encapsular componentes sensibles y proteger los componentes del entorno con pH bajo del estómago, mientras también son capaces de la liberación controlada de los componentes en las condiciones con un pH más neutro del intestino delgado.

40 De acuerdo con esto, en un primer aspecto, la invención se refiere a un método para producir microperlas que comprenden un componente activo encapsulado en una matriz de proteína de suero de la leche gelificada, comprendiendo el método las etapas de proporcionar una suspensión de proteína de suero de la leche desnaturalizada y un componente activo, tratar la suspensión para generar microperlas, e inmediatamente curar las microperlas por acidificación por inmersión en una disolución de curado ácida.

45 En esta especificación, el término "microperlas" debe entenderse que significa gotitas discretas de proteína de suero de la leche gelificada que tienen un diámetro medio en el intervalo del micrómetro (por ejemplo, de 80 a 500 micrómetros) y que tienen adecuadamente una forma generalmente esférica.

El pH de la etapa de acidificación debe estar cerca del pI de la β -lactoglobulina en la mezcla de proteína de suero de la leche. Preferiblemente, la etapa de acidificación se lleva a cabo a un pH de 4,0 a 4,9, más preferiblemente a un pH de 4,1 a 4,8, 4,2 a 4,7, 4,3 a 4,7, preferiblemente un pH de aproximadamente 4,5 a 4,7, e idealmente a un pH de aproximadamente 4,6.

50 Idealmente, la proteína de suero de la leche es un aislado de proteína de suero de la leche. Sin embargo, también pueden emplearse otros tipos de fracciones de proteína de suero de la leche en el proceso de la invención, por ejemplo, hidrolizado de proteína de suero de la leche o concentrados de proteína de suero de la leche.

55 Típicamente, las microperlas se curan en un baño de acidificación que contiene una disolución de acetato, aunque pueden emplearse otros ácidos. Los parámetros del baño de acidificación se eligen para asegurar la gelificación instantánea de las microperlas. Es decir, que las microperlas gelifican (es decir, se endurecen) inmediatamente

después del contacto con la disolución de curado ácida. Se ha encontrado sorprendentemente que si los parámetros del baño de acidificación son tales que no ocurre la gelificación instantánea, las micro-perlas resultantes tienen formas irregulares, no homogéneas. Por el contrario, cuando ocurre la gelificación instantánea, se producen microperlas que tienen una forma esférica, homogénea. Los parámetros requeridos para conseguir una gelificación instantánea dependen de las características de la proteína de suero de la leche, incluyendo el grado de desnaturalización, y el tipo y cantidad de componente activo. Generalmente, los parámetros de la disolución de curado ácida que se varían son pH, concentración de ácido, y temperatura. En el ejemplo proporcionado más adelante, en el que se emplea una suspensión WPI al 9% que tiene aproximadamente 80% de β -lactoglobulina (que tiene un grado de desnaturalización de aproximadamente 95%), y en el que el componente activo es una bacteria probiótica, el pH de la disolución ácida es 4,2 a 4,7, la concentración de ácido de 0,3 a 0,6 M, y la temperatura de la disolución ácida es de 30°C a 40°C. Adecuadamente, el pH de la disolución ácida es 4,5 a 4,7, la concentración de ácido de 0,4 M a 0,6 M, y la temperatura de la disolución ácida es de 34°C a 48°C. Idealmente, el pH de la disolución ácida es aproximadamente 4,6, la concentración de ácido es aproximadamente 0,5 M, y la temperatura de la disolución ácida es de 35°C a 37°C.

Típicamente, la disolución de curado ácida comprende un tensioactivo para prevenir o inhibir la aglomeración de las microperlas formadas. Adecuadamente, el tensioactivo es un tensioactivo polisorbato, idealmente Tween 20.

Adecuadamente, las microperlas formadas se someten a un periodo de curado prolongado en el baño de acidificación, durante un periodo de al menos 15 minutos (después de la gelificación), y preferiblemente durante un periodo de al menos 20 minutos. En una realización preferida de la invención, las microperlas formadas se curan durante un periodo de tiempo de 20 a 180, 20 a 120, ó 20 a 60 minutos. Idealmente, la disolución de curado ácida se agita durante el proceso de curado.

Generalmente, el método implica una etapa inicial de desnaturalización de la proteína de suero de la leche. Idealmente, la proteína de suero de la leche se desnaturaliza con calor, aunque también son aplicables otros métodos de desnaturalización, por ejemplo, desnaturalización inducida por presión. En una realización preferida, la proteína de suero de la leche se desnaturaliza con calor a una temperatura de 75°C a 80°C, adecuadamente durante un periodo de entre 30 minutos y 50 minutos. Típicamente, la proteína de suero de la leche se agita durante la desnaturalización con calor.

Adecuadamente, la concentración de la proteína de suero de la leche (antes de la adición del componente sensible) es de 5 a 15%, preferiblemente de 7 a 12%, e idealmente de 9 a 11% (p/v). Típicamente, la proteína de suero de la leche desnaturalizada está en la forma de una suspensión soluble (antes de la adición del componente activo), en la que la gelificación parcial de la β -lactoglobulina ha producido aglomerados de proteína suspendidos. Típicamente, la suspensión se somete a un proceso de filtración, generalmente antes de la adición del componente activo. En una realización preferida, la suspensión se pasa a través de una pluralidad de filtros que tienen un tamaño de poro gradualmente decreciente. Idealmente, el filtro final tiene un tamaño de poro sub-micrométrico, por ejemplo 0,1 a 0,9 micrómetros.

Idealmente, la proteína de suero de la leche empleada en el proceso de la invención tiene un contenido de β -lactoglobulina de al menos 30%, 40%, 50%, 60%, 70% u 80% (p/p). Típicamente, la β -lactoglobulina tiene un grado de desnaturalización de al menos 60%. 70%. 80%, 90% ó 95%.

Varios métodos serán evidentes para el experto en la técnica para generar microperlas, por ejemplo perlado y pulverización. Un método preferido para producir las microperlas es una técnica de tobera vibratoria, en la que la suspensión se pulveriza a través de una tobera y se induce la rotura laminar del chorro pulverizado mediante la aplicación de una frecuencia sinusoidal con amplitud definida en la tobera de pulverización. Los ejemplos de máquinas de tobera vibratoria son el ENCAPSULATOR (Inotech, Suiza) y una máquina producida por Nisco Engineering AG, o versión con aumento de escala equivalente tales como las producidas por Brace GmbH o Capsulæ y semejantes.

Típicamente, la tobera de pulverización tiene una apertura de entre 100 y 600 micrómetros, preferiblemente entre 100 y 200 micrómetros, adecuadamente 140 y 160 micrómetros, e idealmente aproximadamente 150 micrómetros.

Adecuadamente, la frecuencia de operación de la tobera vibratoria es de 900 a 3.000 Hz. Generalmente, el potencial electrostático entre la tobera y el baño de acidificación es 0,85 a 1,3 V. Adecuadamente, la amplitud es de 4,7 kV a 7 kV. Típicamente, la distancia de caída (desde la tobera hasta el baño de acidificación) es menos de 50 cm, preferiblemente menos de 40 cm, adecuadamente entre 20 y 40 cm, preferiblemente entre 25 y 35 cm, e idealmente aproximadamente 30 cm. La velocidad de flujo de la suspensión (que pasa a través de la tobera) es típicamente de 3,0 a 10 ml/min; una velocidad de flujo ideal depende del tamaño de la tobera utilizada en el proceso.

En una realización, el proceso implica una etapa de detección del tamaño de las microperlas iniciales generadas, comparando el tamaño detectado de las microperlas con un tamaño deseado predeterminado, y en el que el tamaño detectado se diferencia significativamente del tamaño deseado predeterminado, las microperlas se desvían del baño de acidificación hasta que el tamaño detectado se correlaciona con el tamaño deseado predeterminado.

En una realización de la invención, el componente activo es una suspensión de células, típicamente células bacterianas, idealmente una suspensión de células bacterianas probióticas. Adecuadamente, la concentración de células en la suspensión es de 1×10^7 a 5×10^{11} cfu/ml, preferiblemente de 1×10^8 a 5×10^{10} cfu/ml, idealmente de 1×10^9 a 7×10^{10} cfu/ml.

- 5 En un aspecto, los métodos de la invención no implican exponer las microperlas a alta presión o alta cizalla (es decir, homogeneización). Esto evita el daño a cualesquiera componentes que son sensibles a la presión o cizalla tales como, por ejemplo, células procariotas o eucariotas.

La invención también se refiere a una preparación de microperlas en la que cada microperla (es decir, todas o la mayor parte de las microperlas) comprende un componente activo dispersado en una matriz de proteína de suero de la leche desnaturalizada gelificada, y en el que al menos el 90% de las microperlas en la preparación tienen un diámetro en un intervalo de 80 a 500 μ , y en el que al menos el 90% de las microperlas en la preparación son capaces de sobrevivir intactas en jugo gástrico porcino fresco de pH 2,0 *ex-vivo* durante al menos tres horas a 37°C con agitación a 150 rpm (empleando los métodos como se describe más adelante).

15 Idealmente, sustancialmente todas las microperlas en la preparación son capaces de sobrevivir intactas en jugo gástrico porcino fresco de pH 2,0 *ex-vivo* durante al menos tres horas a 37°C con agitación a 150 rpm (empleando los métodos como se describe más adelante).

Típicamente, la matriz de proteína de suero de la leche comprende al menos 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, u 80% de β -lactoglobulina (p/p). Adecuadamente, la β -lactoglobulina tiene un grado de desnaturalización de al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ó 95%. En una realización preferida de la invención, la proteína de suero de la leche comprende al menos 70% de β -lactoglobulina que tiene un grado de desnaturalización de al menos 90%.

20 Idealmente, la proteína de suero de la leche es aislado de proteína de suero de la leche (WPI) o concentrado de proteína de suero de la leche (WPC).

Preferiblemente, una mayoría de las microperlas en la preparación son esféricas.

Adecuadamente, el componente activo se dispersa homogéneamente en la matriz de polímero.

- 25 En una realización preferida, al menos el 90% de las microperlas en la preparación tienen un diámetro de 200 micrómetros a 300 micrómetros.

En una realización preferida de la invención, el agente activo es una célula, preferiblemente una preparación de células probióticas. Así, la preparación de microperlas de la invención puede usarse para transportar de forma segura células probióticas a través del estómago y dominio de sales biliares (en el que las células están protegidas por las microperlas frente a las condiciones gástricas severas) para la administración de las células en el tracto intestinal distal.

La invención también se refiere a un producto alimenticio o bebida que comprende una preparación de microperlas de la invención. Se consideran varios tipos de productos alimenticios incluyendo productos lácteos (por ejemplo, yogurt, leche, queso, etc) y productos de frutas ácidos.

35 La invención también se refiere a un vehículo capaz de administrar un agente activo a un intestino inferior de un sujeto mientras protege el agente activo durante el paso a través del estómago del sujeto, comprendiendo el vehículo una preparación de microperlas según la invención. Así, como se ha explicado anteriormente, las microperlas tienen una carga positiva neta y son sustancialmente resistentes a las condiciones de pH bajo del estómago y, como tales, protegen a los agentes activos encapsulados atrapados en la microperla. Sin embargo, al transitar las microperlas a través de la tripa al intestino, el pH del entorno se incrementa por encima del pl de la proteína de suero de la leche, lo que causa que los geles de microperlas se debiliten, permitiendo que las enzimas proteolíticas endógenas desintegren el gel y liberen los agentes activos atrapados.

40 La invención también se refiere a un método para administrar un agente activo a un intestino inferior de un sujeto y proteger el agente activo durante el paso a través del estómago del sujeto, y en el que el agente activo es susceptible de degradación en las condiciones ácidas del estómago, comprendiendo el método una etapa de administración oral de una preparación de microperlas según la invención al sujeto.

La invención también proporciona un método para producir microperlas recubiertas que comprende las etapas de producir microperlas según un método de la invención, y resuspender las microperlas en una disolución de polisacárido aniónico que tiene un pH de 4,6 o menos durante un periodo de al menos 10, 30, 60, 90, 120, 180 minutos. En esta especificación, el término "polisacárido aniónico" debe entenderse que significa un polisacárido que tiene una carga negativa neta cuando se disuelve o solubiliza en una disolución que tiene un pH de 4,6 o menos. Los ejemplos de polisacáridos aniónicos adecuados incluyen pectinas, alginatos, carragenanos, y gomas arábicas (por ejemplo, Pectina de Manzana, Pectina de cítrico, Alginato de Sodio, Carragenano kappa, carragenano iota, y goma arábica).

Adecuadamente, cuando las microperlas se recubren con alginato, se curan después de la etapa de recubrimiento, por ejemplo, se curan en una disolución de cloruro de calcio (0,1-0,5 M, típicamente aproximadamente 0,2 M).

5 La invención también se refiere a una preparación de microperlas recubiertas en la que cada microperla recubierta (es decir, todas o la mayor parte de las microperlas recubiertas) comprende una microperla recubierta con una capa de polisacárido aniónico, y en el que la microperla comprende un componente activo dispersado en una matriz de proteína de suero de la leche desnaturalizada gelificada.

Típicamente, al menos 50%, 60%, 70%, 80% ó 90% de las microperlas en la preparación tienen un diámetro de 80 a 500 μ .

10 Adecuadamente, al menos 90% e idealmente 100% de las microperlas recubiertas en la preparación son capaces de (a) sobrevivir intactas en jugo gástrico porcino fresco de pH 1,8 *ex-vivo* durante al menos tres horas a 37°C con agitación a 150 rpm, y, opcionalmente (b) romperse en jugo de yeyuno porcino fresco de pH 6,59 *ex-vivo* en una hora a 37°C con agitación a 150 rpm.

15 Adecuadamente, al menos 90% e idealmente 100% de las microperlas recubiertas en la preparación son capaces de (a) sobrevivir intactas en jugo gástrico porcino fresco de pH 1,8 *ex-vivo* durante al menos tres horas a 37°C con agitación a 150 rpm, y (b) romperse en jugo intestinal porcino fresco de pH 6,59 *ex-vivo* en 40 minutos a 37°C con agitación a 150 rpm.

20 Generalmente, al menos 90% ó 100% de las microperlas recubiertas en la preparación son capaces de sobrevivir intactas en jugo gástrico porcino fresco de pH 2,4 *ex-vivo* durante al menos dos horas a 37°C con agitación a 150 rpm, y en el que al menos 50%, 60%, 70%, 80% ó 90% de las microperlas se rompen en jugo de yeyuno porcino fresco de pH 6,59 *ex-vivo* en 40 minutos a 37°C con agitación a 150 rpm.

Típicamente, el polisacárido aniónico se selecciona del grupo que consiste en: pectina; alginato; carragenano; y goma arábica. Preferiblemente, el polisacárido aniónico se selecciona del grupo que consiste en Pectina de Manzana, Pectina de Cítrico, Alginato de Sodio, Carragenano kappa, carragenano iota, y goma arábica.

25 Típicamente, la matriz de proteína de suero de la leche comprende al menos 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, u 80% de β -lactoglobulina (p/p). Adecuadamente, la β -lactoglobulina tiene un grado de desnaturalización de al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ó 95%. En una realización preferida de la invención, la proteína de suero de la leche comprende al menos 70% de β -lactoglobulina que tiene un grado de desnaturalización de al menos 90%.

Idealmente, la proteína de suero de la leche es aislado de proteína de suero de la leche (WPI).

Preferiblemente, una mayoría de las microperlas recubiertas en la preparación son esféricas.

30 Adecuadamente, el componente activo se dispersa homogéneamente en la matriz de polímero.

En una realización preferida, al menos el 90% de las microperlas recubiertas en la preparación tienen un diámetro de 200 micrómetros a 300 micrómetros.

En una realización preferida de la invención, el agente activo es una célula, preferiblemente una preparación de células probióticas.

35 La invención también se refiere a un producto lácteo que comprende una preparación de microperlas recubiertas según la invención.

La invención también se refiere a un vehículo capaz de administrar un agente activo a un intestino inferior de un sujeto mientras protege el agente activo durante el paso a través del estómago del sujeto, comprendiendo el vehículo una preparación de microperlas recubiertas según la invención.

40 La invención también se refiere a un método de administración (es decir, liberación) de un agente activo a una región intestinal distal de un sujeto y proteger el agente activo durante el paso a través de una región estomacal e intestinal proximal del sujeto, y en el que el agente activo es susceptible de degradación en las condiciones ácidas del estómago, comprendiendo el método una etapa de administración oral al sujeto de una preparación de microperlas recubiertas según la invención. Típicamente, el agente activo es una célula, idealmente una preparación de bacterias probióticas.

45 Como se ha indicado anteriormente, el término proteína de suero de la leche debe entenderse generalmente como que significa una fracción de proteína de suero de la leche que tiene al menos 30% de β -lactoglobulina, por ejemplo, varios tipos de concentrados de proteína de suero de la leche. Idealmente, la proteína de suero de la leche es un aislado de proteína de suero de la leche (WPI) que tiene adecuadamente al menos 70% u 80% de beta-lactoglobulina. El componente activo puede ser, por ejemplo, un componente que es sensible a las condiciones de procesamiento, condiciones *in-vivo*, o condiciones de almacenamiento, por ejemplo, bacterias probióticas que son sensibles a daño por las condiciones ácidas en el tránsito gástrico, o por las fuerzas de alta cizalla o alta presión ejercidas durante el procesamiento. Así, el componente activo puede ser sensible a pH, enzimas (es decir, enzimas

proteasas), alta presión, alta cizalla, y abuso de temperatura durante el almacenamiento. En una realización particularmente preferida de la invención, el componente activo es una célula, típicamente una célula bacteriana, e idealmente una célula probiótica. Dichas células son sensibles a condiciones de pH bajo, tales como las que se encuentran en el estómago, y como tales necesitan ser protegidas de los entornos de pH gástrico y sales biliares.

5 Las bacterias probióticas, y de hecho otros tipos de células, también son sensibles a alta cizalla o alta presión, tales como las que se emplean en métodos convencionales para generar perlas de polímeros con tamaño micrométrico. Otros tipos de componentes activos que pueden encapsularse en las microperlas de la invención incluyen enzimas, bacterias de arranque, extractos celulares, proteínas y polipéptidos, azúcares y derivados de azúcares, ácidos nucleicos y construcciones de ácidos nucleicos, agentes farmacéuticamente activos, agentes de tinción para la

10 formación de imágenes y ligandos, anticuerpos y fragmentos de anticuerpos, pitoquímicos y semejantes.

La invención también se refiere a un producto alimenticio, especialmente un producto lácteo, que comprende microperlas (recubiertas o de otra forma), o a una preparación de microperlas (recubiertas o de otra forma), según la invención.

Descripción breve de las Figuras

15 **Figura 1:** Encapsulador Inotech® y el proceso de flujo durante el procedimiento de extrusión.

Figura 2: Viabilidad de la población de células probióticas (*Lb. rhamnosus* GG) durante el procedimiento de encapsulación. 1= Suspensión de células frescas (19 horas) en fase estacionaria, 2= Suspensión de células homogeneizada, 3= mezcla proteína-probiótico, 4= micro-perlas de proteína de suero de la leche, 5= Micro-perla de proteína de suero de la leche + homogeneización. *Lb. rhamnosus* GG rindió un rendimiento de extracción y eficiencia de encapsulación de $106,1 \pm 2\%$ y $94,5 \pm 1,1\%$, respectivamente.

20

Figura 3: El escape de proteína expresado como pérdida de proteína (mg)/250 mL de tampón acetato durante la formación de micro-perlas como una función del pH del acetato. La concentración de proteína se determinó según el ensayo de Bradford.

Figura 4: Resistencia de las micro-perlas como una función del tiempo de curado (0-180 minutos) en tampón acetato. La distancia de compresión (♦) permanece constante a lo largo del ensayo, indicando la presencia de una muestra de micro-perla en monocapa.

25

Figura 5: Grado de hidrólisis de las micro-perlas de proteína de suero de la leche como una función del medio digestivo a 37°C. Se incubaron HCl pH 1,8 (♦), jugo intestinal pH 7,6 (▲) y disolución salina tamponada con fosfato (PBS) pH 7,6 (●) durante 180 minutos a 200 rpm. El grado de hidrólisis se determinó según el ensayo OPA.

Figura 6: Imágenes de microscopio óptico de micro-perlas de proteína de suero de la leche lejos del punto isoelectrico (pI) de las proteínas de suero de la leche (A), cerca del pI (B). La Figura 6c y 6d ilustran la homogeneidad de las perlas y la distribución de las células probióticas, respectivamente.

30

Figura 7: La distribución de tamaño de las micro-perlas de proteína de suero de la leche como una función del tiempo de curado a un pH de acetato cercano al pI de WPI según se mide por difracción láser y microscopía óptica. D (v, 0,9) representa el 90% si las micro-perlas tienen un diámetro menor de 282 μm y D (v, 0,5) representa 50% si las micro-perlas tienen un diámetro menor de 212 μm ; sin embargo, la microscopía óptica midió un diámetro medio de $202,21 \mu\text{m} \pm 0,04 \mu\text{m}$.

35

Figura 8: Distribución del tamaño de partículas de las micro-perlas de proteína de suero de la leche a un pH de acetato cercano al pI de WPI (tamaño medio, $216,36 \pm 1,48 \mu\text{m}$; tamaño en el pico $201,68 \pm 0,43 \mu\text{m}$) usando difracción láser.

40

Figura 9: Efecto de la microencapsulación en la supervivencia de *Lb. rhamnosus* GG en contenidos gástricos porcinos pH 2,0 *ex vivo* a 37°C. ▲= Micro-perlas pH 2,0; ♦= control de proteína positivo pH 2; ■= Células libres pH 2,0.

Figura 10: Liberación de *Lb. rhamnosus* GG micro-encapsulado de micro-perlas de proteína de suero de la leche en contenidos gastro-intestinales porcinos *ex vivo* a 37°C. ♦= Micro-perlas en jugo gástrico pH 2; ▲= Micro-perlas en jugo gástrico pH 2,4; ■= Micro-perlas en jugo del intestino delgado (yeyuno) pH 6,6.

45

Figura 11: Visualización de la viabilidad celular en a) jugo de intestino delgado después de la liberación de *Lb. rhamnosus* GG de micro-perlas de proteína de suero de la leche después de incubación gástrica (pH 2,0; 37°C) y b) control de células libres después de 15 min y c) incubación gástrica de 3 h (pH 2,0; 37°C). Estos gráficos de puntos de citometría de flujo ilustran células vivas, dañadas y muertas en el cuadrante A3, A2 y A1, respectivamente.

50

Figura 12: Cromatograma de exclusión por tamaño que ilustra la desintegración gradual de micro-perlas de proteína de suero de la leche durante incubación (0-180 minutos) en contenidos intestinales porcinos pH 6,6 a 37°C (150 rpm).

Figura 13: Potencial zeta de mezcla de micro-perlas de proteína de suero de la leche (recubiertas= 1) recubiertas con polisacáridos aniónicos (2= pectina de manzana, 4= pectina se cítrico, 6= alginato de sodio, 8= carragenano kappa, 10= carragenano iota) y recubiertas posteriormente (doble recubrimiento) con 1% (p/v) de WPI tratado con calor, pH 2,9 (3, 5, 7, 9 y 11). Las barras de error representan la desviación estándar de 3 ensayos independientes realizados en triplicado.

Figura 14: Imágenes de microscopio que diferencian claramente entre la matriz de micro-perlas y la capa de recubrimiento de polisacárido.

Figura 15: Diámetro de las micro-perlas como una función del recubrimiento de polisacárido mediante deposición capa por capa.

Figura 16: Supervivencia en el almacenamiento de micro-perlas recubiertas y no recubiertas durante un almacenamiento de 14 días a temperatura ambiente de almacenamiento en zumo de arándano (pH 2,6).

Figura 17: Supervivencia en el almacenamiento de micro-perlas recubiertas y no recubiertas durante un almacenamiento de 14 días durante almacenamiento refrigerado (4°C) en zumo de arándano (pH 2,6).

Figura 18: Supervivencia en el almacenamiento de micro-perlas recubiertas y no recubiertas en zumo de arándano (temperatura de refrigeración 4°C) seguido de incubación gástrica *ex vivo* pH 1,8.

Figura 19: Liberación de células de las micro-perlas durante la incubación intestinal *ex vivo*.

Figura 20: Tiempo de tránsito de micro-perlas de proteína de suero de la leche como una función de la sección GI 2- (■) y 4-h (□) después de la administración del probiótico. Los datos representan los valores medios de 3 cerdos ($n=3$ por tratamiento) con la desviación estándar de las medias indicada por barras verticales. Los asteriscos indican diferencias significativas (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$) en las unidades formadoras de colonias 2 h después de la administración de probiótico respecto a la transición de 4 h.

Figura 21: Ilustra la evolución secuencial de la supervivencia LGG^{Rif} en el estómago (■), yeyuno (□), íleo (▣) y ciego (▤) después de la administración de probiótico como una función del grupo de tratamiento.

Figura 22: Adhesión celular de LGG^{Rif} (■) y *Lactobacillus* total (□) en el tejido iliaco obtenido 1 m proximal de la unión íleo-cecal. Los datos representan la media del valor de dos animales por tratamiento.

Descripción detallada de la invención

MÉTODOS:

Productos Químicos

BiPro, un aislado de proteína de suero de la leche (WPI) comercial se obtuvo de Davisco Foods International Inc., (Le Sueur, MN, EEUU). El contenido nativo de β -lactoglobulina (β -Lg) y α -lactalbúmina (α -La) de WPI se analizaron por HPLC de fase reversa y se estimaron a 82% y 16%, respectivamente. El acetato de sodio se obtuvo de Sigma Chemicals Co. (Basingstoke, Hampshire, Reino Unido). Tween-20 y ácido acético se obtuvieron de BDH (Alchem Chemicals Ltd., Little Island, Co. Cork, Irlanda). Los productos químicos usados en la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) fueron acetonitrilo (ACN) y ácido trifluoroacético (TFA), ambos de grado HPLC. Se usó agua altamente purificada (Milli-Q PLUS, Millipore Corporation) en todos los casos para la dispersión de las muestras, medios de cultivo y disoluciones tampón.

Cultivos de probióticos y suspensiones celulares

Datos *in-vitro* y *ex-vivo*

La cepa probiótica *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103, *L. rhamnosus* GG, Valio Ltd., Finlandia), fue procurada por el University College Cork, bajo un acuerdo de transferencia de materiales restringidos. Las células recogidas se almacenaron como disoluciones madre en un caldo Man Rogosa Sharpe (MRS) (Oxoid Ltd., Hampshire, Reino Unido) (REFERENCIA: De Man, J.C., Rogosa, M. y Sharpe, M.E. 1960. A medium for cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology* **23**: 130-135. que contenía 50% (v/v) de glicerol acuoso a -20°C. Todos los ensayos se realizaron usando subcultivos de la misma preparación madre congelada, que se evaluó rutinariamente para pureza. Antes del ensayo, *L. rhamnosus* GG se transfirió de forma seriada tres veces en caldo MRS (Oxoid Ltd., Hampshire, Reino Unido) y se incubó anaeróticamente a 37°C durante 24 horas (Merck, Darmstadt, Alemania). Las bacterias destinadas a encapsulación, se propagaron a partir de inóculos de 1% (v/v) durante 19 horas a 37°C bajo condiciones anaeróbicas. La biomasa probiótica en la fase estacionaria temprana (10^9 cfu/mL) se recogió por centrifugación a 5.200 x g durante 10 minutos a 4°C (Sorvall, RC-5C Plus, Sorvall Products, Stevenage, Herts, Reino Unido), se lavó, se esterilizó por filtración y se resuspendió en disolución salina tamponada con fosfato estéril (Sigma Chemical CO, St. Louis, EEUU). Se enumeraron suspensiones celulares frescas preparadas para cada experimento por siembra por vertido en placa en agar MRS (incubación anaeróbica a 37°C

durante 48 horas) y posteriormente se usaron bien directamente en el ensayo (condición sin células) o se emplearon en el proceso de microencapsulación.

Matriz de microperlas y medio de curado

- 5 WPI se hidrató en agua estéril (11% p/v) durante 16 h a 4°C bajo una agitación suave (180 rpm) con el fin de permitir una buena hidratación de proteínas. La disolución de WPI se ajustó a pH 7 con 100 mM HCl y se filtró a través de 0,45 µm (Millex, HVLP, Millipore Corp., Bedford, MA) para eliminar trazas de material no disuelto. La dispersión de proteínas se calentó posteriormente a 78-80°C durante 30-45 minutos con agitación (para estimular la polimerización de proteínas. La suspensión de agregados de WPI reactivos se enfrió posteriormente en hielo, se almacenó a 4°C toda la noche.
- 10 El medio de curado se formuló usando un tampón acetato (0,5 M) ajustado a pH 4,6, en el que el escape de proteínas estaba en un valor mínimo (véase la Figura 3). Después del equilibrado del pH, se añadió 0,04-0,08% Tween-20 y la disolución se filtró posteriormente (0,22 µm), se esterilizó (121°C durante 15 minutos) y se atemperó a 35-37°C antes del experimento de encapsulación.

Producción de microperlas

- 15 Las micro-perlas de proteína de suero de la leche monodispersas se prepararon usando un dispositivo de encapsulación (Inotech Encapsulator® Inotech AG, Dottikon, Suiza) ilustrado en la Figura 1. La tecnología se basa en la rotura de chorro laminar inducida mediante la aplicación de una frecuencia sinusoidal con amplitud definida a una tobera (3). La suspensión proteína-probiótico se administra a la tobera mediante una línea de alimentación (1), que está conectada al reservorio de polímero. Pueden usarse toberas con diámetros en el intervalo de 50-1.000 µm.
- 20 La tobera está conectada mediante una membrana PTFE a un dispositivo vibratorio (2), que está aislado de las estructuras circundantes por soportes de goma para evitar la generación de frecuencias de resonancia en el sistema. El flujo de disolución de polímero a la tobera se consigue usando una bomba de jeringa de precisión con un volumen de extrusión máximo de 50 mL.

- 25 La producción de < 50 mL de micro-perlas fue suficiente para cumplir los requerimientos de este estudio; por lo tanto el encapsulador se utilizó como un reactor discontinuo. Todo el material de vidrio y las disoluciones usados en el procedimiento se esterilizaron (121°C durante 15 minutos) y la suspensión de proteínas se equilibró hasta temperatura ambiente, se filtró secuencialmente a través de filtros estériles de tamaño de poro 5, 1,2, 0,8 y 0,45 µm (Sartorius) y se mezclaron concienzudamente con el concentrado bacteriano para rendir una población probiótica correspondiente a la concentración en fase estacionaria (10^9 CFU/mL). La mezcla proteína-probiótico se extruyó asépticamente a través de una tobera de 150 µm y se pasó posteriormente a través de un electrodo (4) en el recipiente de encapsulación (8) que contenía 250 mL de disolución tampón de curado (7) atemperada (35°C), con agitación continua para evitar la coalescencia de las micro-perlas durante la polimerización. Se utilizó un vaso de recogida, suspendido (5) desde la placa superior, durante el cebado inicial de la tobera con la mezcla proteína-probiótico. Esto facilitó la recuperación de las gotitas de polímero iniciales con un diámetro en exceso del valor predicho (definido en condiciones controladas) y así aseguró monodispersidad del lote posterior de micro-perlas.
- 35 Las micro-perlas flexibles formadas se curaron durante 3 horas a temperatura ambiente con el fin de garantizar una polimerización completa de las proteínas. Las micro-perlas rígidas resultantes se recuperaron, se lavaron dos veces en agua estéril y posteriormente se analizaron.

- 40 La velocidad de flujo de la suspensión proteína-probiótico, frecuencia vibratoria y amplitud vibratoria se controlaron según se deseó. La frecuencia puede estimarse a partir del conocimiento de las propiedades físico-químicas de la mezcla de proteínas para el diámetro de tobera elegido; sin embargo, en al práctica, se requirieron algunos ajustes para obtener un diámetro favorable de las micro-perlas. Consecuentemente, la mezcla de polímero se administró a una velocidad de alimentación ajustada a la tobera para conseguir un i) chorro de líquido y ii) velocidad de flujo (3-10 mL/min) ajustados, visualizado mediante un dispositivo estroboscópico (6). Una frecuencia (900-3.000 Hz) y amplitud (4,7 a 7) vibratorias óptimas se definieron a partir de esto para facilitar la rotura del chorro y la producción de gotitas. Una vez estos parámetros se determinaron para una suspensión proteína probiótico dada, se registraron y se utilizaron sin ajuste para la producción discontinua adicional usando los mismos parámetros del polímero.

Producción de microperlas recubiertas con polisacárido

- 50 Los siguientes biopolímeros se usaron como materiales de recubrimiento: Pectina de Manzana, Pectina de Cítrico, Alginato de Sodio, Carragenano kappa, carragenano iota, y goma arábica. Las disoluciones de pectina se prepararon en 10 mM tampón fosfato pH 7 mientras el resto de los biopolímeros se solubilizaron en agua destilada. Después de la disolución completa, el pH se ajustó a 4,6. Todos los materiales del tratamiento se filtraron a través de filtros estériles de 0,22 µm. Cada preparación de micro-perlas (preparada como anteriormente) se curó durante un máximo de 3 h, se lavó dos veces en agua estéril y se resuspendió en 100 mL de la disolución de polisacárido respectiva (pH 4,6). Los lotes de micro-perlas se agitaron (100 rpm) toda la noche a temperatura ambiente y se curaron posteriormente durante 15 min en 0,2 M CaCl₂. Doble recubrimiento: Lotes adicionales de cada tratamiento de biopolímero se lavaron y resuspendieron en WPI tratado con calor (1% p/v; pH 2,9) y se agitaron en condiciones similares.

Detección analítica del recubrimiento de polisacárido

La movilidad electroforética (EM) de las micro-perlas de proteína de suero de la leche recubiertas se determinó usando un Zetasizer (Malvern, Worcs., Reino Unido) después de un procedimiento de homogeneización (ajuste 3; 5 min) y centrifugación (5.000 x g; 5 min; 20°C). EM se derivó de la velocidad de la suspensión de proteína-polisacárido bajo un campo eléctrico aplicado de 150 V y se convirtió en potencial zeta usando la ecuación de Helmholtz-Smoluchowski.

Datos *in-vivo*

La cepa probiótica *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103, *Lb. rhamnosus* GG, Valio Ltd., Finlandia), fue procurada por el University College Cork, bajo un acuerdo de transferencia de materiales restringidos y las células recogidas se almacenaron como disoluciones madre en caldo Man Rogosa Sharpe (MRS) (Oxoid Ltd., Hampshire, Reino Unido) que contenía 50% (v/v) de glicerol acuoso a -20°C. Todos los ensayos se realizaron usando subcultivos de la misma preparación madre congelada, que se evaluó rutinariamente para pureza. El cultivo congelado se creció en caldo MRS (Oxoid Ltd., Hampshire, Reino Unido) a 37°C en condiciones anaeróbicas, conseguidas por activación de paquetes de gas Anaerocult (Merck, Darmstadt, Alemania). Se aisló un derivado resistente a rifampicina espontáneo (LGG^{Rif}), requerido para facilitar la enumeración posterior durante el ensayo en cerdos, por siembra por extensión en placa de 10⁹ cfu de un cultivo de toda la noche en agar MRS que contenía 100 µg de rifampicina/ml (MRS^{Rif}) (Sigma Chemical Co., Dorset, Reino Unido). Después de la incubación anaeróbica a 37°C durante 48 h, se seleccionaron colonias únicas y se almacenaron en caldo MRS que contenía 40% (v/v) glicerol. Se realizó electroforesis en gel con campo pulsado para asegurar homología entre los patrones de banda de las cepas parental y variante de *Lb. rhamnosus* GG. También se elucidaron las características de crecimiento, tolerancia a calor y ácido de ambas cepas para confirmación adicional de la similitud entre cepas (datos no mostrados).

Preparación de tratamiento (pare ejemplos *in-vivo*)

Antes del ensayo, LGG^{Rif} se transfirió de forma seriada tres veces en caldo MRS (Oxoid Ltd., Hampshire, Reino Unido) y se incubó anaeróticamente a 37°C durante 24 horas (Merck, Darmstadt, Alemania). Las bacterias destinadas a encapsulación, se propagaron a partir de inóculos de 1% (v/v) durante 19 horas a 37°C bajo condiciones anaeróbicas. La biomasa probiótica en la fase estacionaria temprana (10⁹ cfu/mL) se recogió por centrifugación a 5.200 x g durante 10 minutos a 4°C, se lavó, se esterilizó por filtración y se resuspendió en disolución salina tamponada con fosfato estéril (Sigma Chemical Co., Dorset, Reino Unido). Las suspensiones de células frescas se homogeneizaron y enumeraron en agar MRS como se ha descrito anteriormente y se mezclaron posteriormente con proteína de suero de la leche desnaturalizada para conseguir una concentración probiótica en fase estacionaria (10⁹ cfu/ml). Esta mezcla proteína-probiótico se extruyó asépticamente a través de una tobera de 150 µm para la producción a gran escala de micro-perlas como se ha descrito anteriormente. Los lotes de micro-perlas que contenían 1,7 x 10¹⁰ cfu se polimerizaron, recuperaron y almacenaron a 4°C antes de la dosificación a animales. Además, se prepararon micro-perlas recubiertas como se describe más adelante por deposición electrostática de pectina de manzana (Cybercolloids, Cork, Irlanda) en la superficie de micro-perlas después de 2 h de polimerización. También se preparó un control positivo usando una disolución de proteína nativa (sustrato) mezclada asépticamente con el concentrado celular con el fin de conseguir concentraciones bacterianas consistentes (10⁹ cfu/ml) entre todas las muestras de tratamiento. Las poblaciones bacterianas se determinaron por homogeneización, dilución y siembra por vertido en placa en agar MRS.

Determinación de viabilidad del probiótico durante almacenamiento en zumo de arándano y posterior incubación gástrica

La viabilidad y sensibilidad de las bacterias encapsuladas se evaluaron en varios entornos de micro-perla recubierta, almacenando todos los tratamientos a temperatura ambiente y condiciones refrigeradas durante 28 días. La enumeración de las células viables se realizó en los días 0, 1, 4, 8 y 14 de almacenamiento. Las bacterias atrapadas se liberaron de su red proteica respectiva usando un procedimiento de homogeneización (datos no mostrados) para asegurar la liberación completa de las bacterias de los sistemas proteicos respectivos. Las células de *Lb. rhamnosus* GG planctónicas (control) se trataron de forma similar, para mantener condiciones de tratamiento consistentes. Los homogenados se sembraron por extensión en placa en agar MRS y las colonias se contaron posteriormente después de una incubación de 48 h a 37°C en condiciones anaeróbicas. Las placas que contenían 30-300 colonias se enumeraron y registraron como cfu/ml de material proteico.

Detección de probiótico usando citometría de flujo

Además de los recuentos en placas, la viabilidad de las células probióticas se evaluó por citometría de flujo (FACS), usando el ensayo de viabilidad de células BD (BD Biosciences, Oxford, Reino Unido). Los homogenados del contenido en digestión se diluyeron hasta una densidad celular pre-determinada y se realizó tratamiento enzimático en asociación con tinción fluorescente. La adquisición de datos se realizó en un citómetro de flujo BD FACS Canto II (BD Biosciences, Oxford, Reino Unido), equipado con excitación láser a 488 nm y software BD FACS Diva usando un umbral de dispersión lateral (SSC).

Microscopía

El trabajo de microscopía se realizó usando un microscopio de epifluorescencia BX51 y un microscopio confocal de barrido láser Leica TCS SP5 (CSLM) (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) como describen Doherty *et al.* (2010). Brevemente, se tiñeron contenidos gastro-intestinales integrando las concentraciones de agente de tinción previamente optimizadas durante el análisis FACS y se formaron imágenes usando un objetivo de aumento x 63 con una apertura numérica de 1.4. También se realizaron microscopía fluorescente y óptica de campo brillante en secciones de contenido en digestión seleccionadas usando un microscopio óptico BX51 (Olympus, Alemania).

Estudios de tiempo de tránsito *in-vivo*

El tiempo de tránsito de las micro-perlas cargadas con probiótico y la evolución secuencial de LGG^{Rif} a lo largo del tracto gastro-intestinal (GI) se investigaron *in vivo* debido a su consideración como pre-requisitos fundamentales para la ingeniería exitosa de un ensayo en animales de escala completa. Los estudios de alimentación se realizaron con cerdos, en cumplimiento con la Directiva del Consejo de la Unión Europea 91/630/EEC (indica los estándares mínimos para la protección de cerdos) y la Directiva del Consejo de la Unión Europea 98/58/EC (se refiere a la protección de animales mantenidos para propósitos de ganaderos) y se aprobaron por, y se obtuvo una licencia de, el Irish Department of Health and Children. Brevemente, dos semanas después del destete, seis cerdos macho se separaron por peso (peso medio de $13,2 \pm 0,6$ kg), se estabularon individualmente (como se describe más adelante) y se asignaron aleatoriamente a dos grupos ($n = 3$). Habiendo ayunado desde la tarde anterior (16 h), ambos grupos se dosificaron con micro-perlas de proteína, se cargaron con 10^{10} cfu de LGG^{Rif}, administrado mediante un medio de permeado de leche altamente apetitoso (leche sin proteínas, NPM). Los animales recibieron 200 ml de NPM después de la administración del probiótico. Dos ($n = 3$) y 3 h ($n = 3$) después, los animales se sacrificaron por aturdidor de bala cautiva seguido de exsanguinación, en el mismo orden en el que fueron alimentados. Los estudios de tránsito de marcador previos en cerdos mostraron que la mayoría del alimento ingerido habría transitado al intestino delgado en 2 h; sin embargo, la recuperación secuencial de los probióticos encapsulados puede desbancar estas expectativas debido a la naturaleza del sistema de administración. Por lo tanto, los datos respecto a la evolución de LGG^{Rif} en el tracto GI se elucidaron examinando los contenidos del estómago e ileostomía de todos los animales de tratamiento y el análisis microbiológico se documenta más adelante.

Ensayo de alimentación en cerdos *in vivo*

Un total de 32 cerdos (macho) de diferentes camadas de un programa de cruce convencional (Large White x Landrace) realizado en Moorepark Pig Production Development Unit (MPDU), se destetaron a aproximadamente 26 días de edad. A los 14 días después del destete, (día -7), los cerdos se etiquetaron, se separaron por peso corporal medio inicial ($11,8 \pm 1,3$ kg) y se asignaron aleatoriamente a uno de cuatro grupos de tratamiento ($n = 8$): control, suspensión de sustrato probiótico, micro-perlas de probiótico y micro-perlas recubiertas. Los cerdos se estabularon individualmente en jaulas diseñadas para proporcionar un espacio razonable para el movimiento libre y actividad normal de los cerdos, asegurando de esta manera una motilidad GI normal (Snoeck *et al.*, 2004). Todas las jaulas, equipadas con un único alimentador y bebedero con boquilla, estaban localizadas en habitaciones con luz controlada (0700 h a 1630 h) con temperaturas mantenidas a 28-30°C a lo largo del ensayo usando un calentador de espacio controlado termostáticamente. Los 7 días siguientes se documentaron como el periodo de aclimatación (día -7 a día 0), durante los cuales los animales se alimentaron con una dieta comercial no medicada (desprovista de antimicrobianos, potenciadores del rendimiento, y edulcorantes) dos veces al día a 0730 y 1530 (350 g/ración) con acceso *ad libitum* a agua fresca. Durante este periodo, los animales se entrenaron para consumir un volumen estándar de medio vehicular - zumo de manzana pasteurizado (Squeez®, Dublín, Irlanda) - en un tiempo definido antes de su alimentación matinal. El consumo de zumo, actitud del animal y consistencia fecal se monitorizaron diariamente durante el periodo de aclimatación y se combinaron para generar un sistema de puntuación (datos no mostrados). Cualquier animal que mostró signos de mala salud se trató apropiadamente por el personal *in situ*. Los animales tuvieron acceso no restringido a agua en todo momento durante el estudio.

En el día 0; se tomaron muestras fecales 6 h después de la alimentación matinal para la determinación de parámetros de línea base. Se recogieron heces recién defecadas (5-10 g) en contenedores estériles después de estimulación rectal de dos animales por tratamiento ($n = 8$). Las muestras fecales se almacenaron anaeróticamente a 4°C y se realizaron análisis microbiológicos en 2 h como se indica más adelante. Además del zumo matinal en el día 0, se ofreció a todos los grupos de tratamiento una ración de zumo extra como un reemplazo de la alimentación de la tarde. Después de un ayuno de toda la noche (16 h), los animales recibieron tratamientos con probiótico con su zumo matinal en el día 1. El primer grupo (A) recibió LGG^{Rif} libre, que sirvió como un control y el segundo grupo (B) se trató con suspensiones de proteína nativa de LGG^{Rif}. Las micro-perlas cargadas con probiótico se administraron al tercer grupo (C), mientras el grupo restante (D) recibió micro-perlas recubiertas con polisacárido y no existió una diferencia en tamaño significativa entre los tratamientos con micro-perla respectivos. Un método de dosificación se optimizó para mitigar el estrés de los animales durante la administración del tratamiento, ya que el manejo de los animales retrasa el tiempo de tránsito GI (Snoeck, *et al.*, 2004). Durante la administración del probiótico, cada cerdo recibió aproximadamente 400 ml de zumo de manzana que contenía aproximadamente $4,2 \times 10^7$ cfu/ml de LGG^{Rif} en los tratamientos respectivos, lo que proporcionó una dosis total de $1,7 \times 10^{10}$ cfu/animal. El uso de un único medio vehicular y tamaño estándar de micro-perlas son pre-requisitos fundamentales ya que pueden resultar tiempos de tránsito gástrico fluctuantes de la variación en la viscosidad del vehículo y tamaño/densidad de las micro-perlas

(Davis et al., 2001, Mpassi et al., 2001). Los experimentos preliminares (datos no mostrados) revelaron una eficiencia de encapsulación de $96,1\% \pm 0,7\%$ para las micro-perlas cargadas con probiótico; así, las muestras control (grupo A y B) se ajustaron para procurar concentraciones aproximadamente iguales de LGG^{Rif} entre todos los grupos de tratamiento.

- 5 Dos horas después de la administración de probiótico, los animales de los grupos de tratamiento A, B y C se sacrificaron (como se ha descrito anteriormente) mientras el grupo D se aleatorizó entre dos tiempos de tránsito (2 y 3 h) para la investigación de liberación celular retardada de los sistemas recubiertos. El tracto GI entero se retiró de cada cadáver inmediatamente después del sacrificio y el contenido en digestión (5-10 g) de varias regiones del GI se recogió asépticamente. Los contenidos gástricos (pilóricos) se muestrearon, después de lo cual el contenido en digestión intestinal desde 1 m de longitud desde el yeyuno se recogió, empezando en un punto 1 m distal de la válvula pilórica. También se tomó contenido en digestión desde 1 m de longitud del íleo, empezando a 15 cm proximal de la unión íleo-cecal, que fue seguido secuencialmente por recogida de los contenidos completos del ciego. Todas las muestras se almacenaron anaeróbicamente y se transportaron en hielo al laboratorio donde se realizaron análisis microbiológicos en 8 h desde el sacrificio, como se indica más adelante. También se recogieron muestras de tejido durante la disección del cadáver de las regiones del estómago, yeyuno e íleo descritas anteriormente. Las muestras pequeñas de tejido (1-2 cm) se almacenaron inmediatamente en hielo para análisis por microscopio y adhesión de probiótico; realizándose el último en 2 h desde el sacrificio.

In-vivo - Análisis microbiológico de los contenidos del GI porcino

- 20 Las muestras fecales se homogeneizaron en Diluyente de Máxima Recuperación (MRD) como diluciones de 10 veces (p/p) usando un stomacher (Lab-Blender 400; Seward Medical, Londres, Reino Unido): sin embargo, todos los contenidos en digestión del GI se diluyeron de forma seriada usando tampón fosfato (pH 7; 0,5 M) y se homogeneizaron en un baño de hielo para facilitar la inactivación permanente de las enzimas digestivas y la liberación completa de las bacterias encapsuladas. Las diluciones apropiadas se sembraron por extensión en placa en tres medios como se describe por Gardiner et al. (2004), para la enumeración de LGG^{Rif}, lactobacilos totales y *Enterobacteriaceae*. Brevemente, se obtuvieron recuentos de probiótico para *Lb. rhamnosus* GG usando agar MRS que contenía rifampicina (Sigma Chemical Co., Dorset, Reino Unido) como un agente selectivo y 50 U/mL de nistatina (Sigma Chemical Co., Dorset, Reino Unido) para inhibir levaduras y hongos después de la incubación anaeróbica durante 2 días a 37°C (MRS^{Rif}). Las bacterias fecales en la familia de *Enterobacteriaceae* se enumeraron en agar bilis rojo violeta con glucosa (Merck, Darmstadt, Alemania) incubado a 27°C durante 24 h (VRBA), mientras los recuentos de *Lactobacillus* total se detectaron en agar selectivo para *Lactobacillus* (Rogosa et al., 1951) (Becton Dickinson, Cockeysville, Md.) después de incubación anaeróbica durante 5 días (LBS). LGG^{Rif} fue fácilmente identificable en MRS^{Rif} debido a su apariencia distinta de colonias, es decir, colonias lechosas, bien desarrolladas, redondas, sin embargo, se realizó PCR de ADN polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD-PCR) (detallada más adelante) para validar la presencia de *Lb. rhamnosus* GG en las placas MRS^{Rif}. Los contenidos del GI se analizaron para la determinación del pH (medidor de pH Mettler Toledo MP220) en las 6 h desde el sacrificio.

In-vivo - Ensayo de adhesión

- 40 Las muestras de tejido ilíaco se lavaron suavemente en MRD para eliminar cualquier contenido en digestión adherido débilmente y se lavaron adicionalmente por inmersión en MRD y agitación vigorosa durante 60 s. Las muestras de tejido se homogeneizaron en MRD fresco como diluciones de 10 veces usando un stomacher (Lab-Blender 400; Seward Medical, Londres, Reino Unido). El homogenado resultante se diluyó adicionalmente 10 veces en MRD y se sembraron en placas diluciones apropiadas en los tres medios detallados anteriormente para la enumeración de las bacterias adherentes.

Resultados

- 45 Los datos indicaron claramente que las microperlas según la invención son capaces de sobrevivir al paso a través del estómago y romperse para administrar el agente activo en el intestino inferior (véanse, por ejemplo, las Figs 9 a 12). Los datos ex-vivo indican adicionalmente que las microperlas recubiertas son capaces de la administración retardada en el intestino delgado, permitiendo así la administración intestinal distal (es decir, administración del agente activo en el íleo) (véase, por ejemplo, la Fig. 19). Los datos in-vivo muestran que el agente activo, en este caso bacterias probióticas, retiene su funcionalidad y viabilidad después de la administración en el intestino. En referencia particularmente a la Fig. 22, tanto las microperlas no recubiertas como recubiertas retienen su capacidad de adherirse a la mucosa ilíaca, adhesión que es mejorada por el recubrimiento de las microperlas, y adhesión que persiste durante al menos 3 horas.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para producir microperlas que comprenden un componente activo encapsulado en una matriz de proteína de suero de la leche gelificada, comprendiendo el método las etapas de proporcionar una suspensión de proteína de suero de la leche desnaturalizada y un componente activo, tratar la suspensión para generar microperlas, e inmediatamente curar las microperlas por acidificación por inmersión en una disolución de curado ácida.
2. Un método como se reivindica en la reivindicación 1, en el que el pH de la disolución de curado ácida es de 4,0 a 4,9.
- 10 3. Un método como se reivindica en cualquier reivindicación anterior, en el que la proteína de suero de la leche es un aislado de proteína de suero de la leche o concentrado de proteína de suero de la leche.
4. Un método como se reivindica en cualquier reivindicación anterior, en el que la proteína de suero de la leche tiene un grado de desnaturalización de al menos 90% (p/p).
5. Un método como se reivindica en cualquier reivindicación anterior, en el que la suspensión de proteína de suero de la leche tiene una concentración de 5-15% (p/v).
- 15 6. Un método como se reivindica en cualquier reivindicación anterior, en el que la disolución de curado ácida tiene una concentración de ácido de 0,3 M a 0,6 M.
7. Un método como se reivindica en cualquier reivindicación anterior, en el que la temperatura de la disolución de curado ácida es de 30°C a 40°C.
- 20 8. Un método como se reivindica en cualquier reivindicación anterior, en el que la disolución de curado ácida comprende un tensioactivo para prevenir o inhibir la aglomeración de las microperlas formadas.
9. Un método como se reivindica en cualquier reivindicación anterior, en el que las microperlas formadas se someten a un periodo de curado prolongado en la disolución de curado ácida, durante un periodo de al menos 15 minutos (después de la gelificación).
- 25 10. Un método como se reivindica en la reivindicación 1, en el que la proteína de suero de la leche empleada en el proceso de la invención tiene un contenido en β -lactoglobulina de al menos 30% (p/p).
11. Un método como se reivindica en cualquier reivindicación anterior, en el que las microperlas se producen por una tobera vibratoria, en la que la suspensión de la proteína de suero de la leche se pulveriza a través de una tobera y se induce la rotura laminar del chorro pulverizado mediante la aplicación de una frecuencia sinusoidal con amplitud definida a la tobera de pulverización.
- 30 12. Un método para producir microperlas recubiertas que comprende las etapas de producir microperlas que comprenden un componente activo encapsulado en una matriz de proteína de suero de la leche gelificada según un método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, y resuspender las microperlas en una disolución de polisacárido aniónico que tiene un pH de 4,6 o menos durante un periodo de al menos 10 minutos.
- 35 13. Un método como se reivindica en la reivindicación 12, en el que el polisacárido aniónico se selecciona del grupo que consiste en: pectina; alginato; carragenano; y goma arábiga.
14. Una preparación de microperlas en la que cada microperla comprende un componente activo dispersado en una matriz de proteína de suero de la leche desnaturalizada gelificada, y en el que al menos el 90% de las microperlas en la preparación tienen un diámetro de 80 a 500 μ , en el que al menos el 90% de las microperlas en la preparación son capaces de sobrevivir intactas en jugo gástrico porcino fresco de pH 2,0 *ex-vivo* durante al menos tres horas a 37°C con agitación a 150 rpm.
- 40 15. Un vehículo capaz de administrar un agente activo a un intestino inferior de un sujeto mientras protege el agente activo durante el paso a través del estómago e intestino proximal del sujeto, comprendiendo el vehículo una preparación de microperlas como se reivindica en la reivindicación 14.

Figura 1

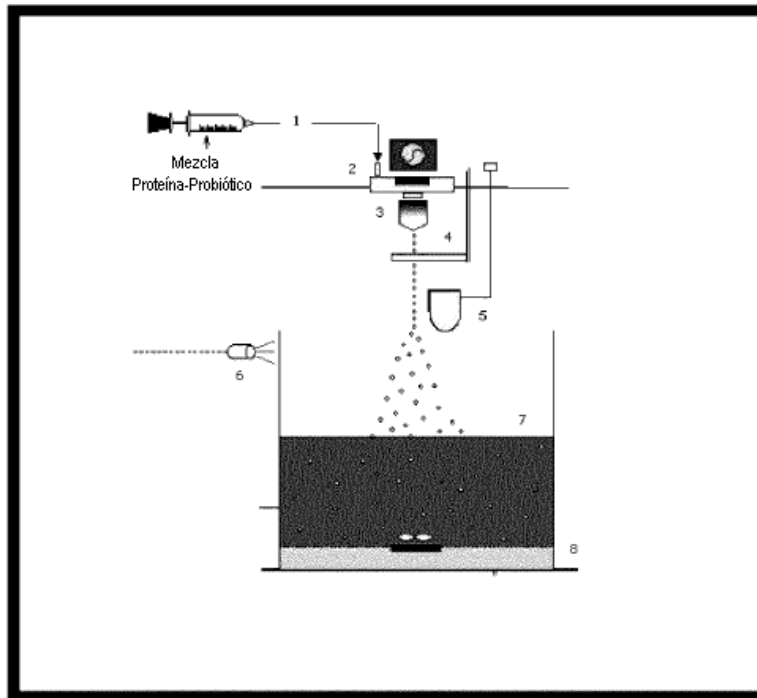


Figura 2

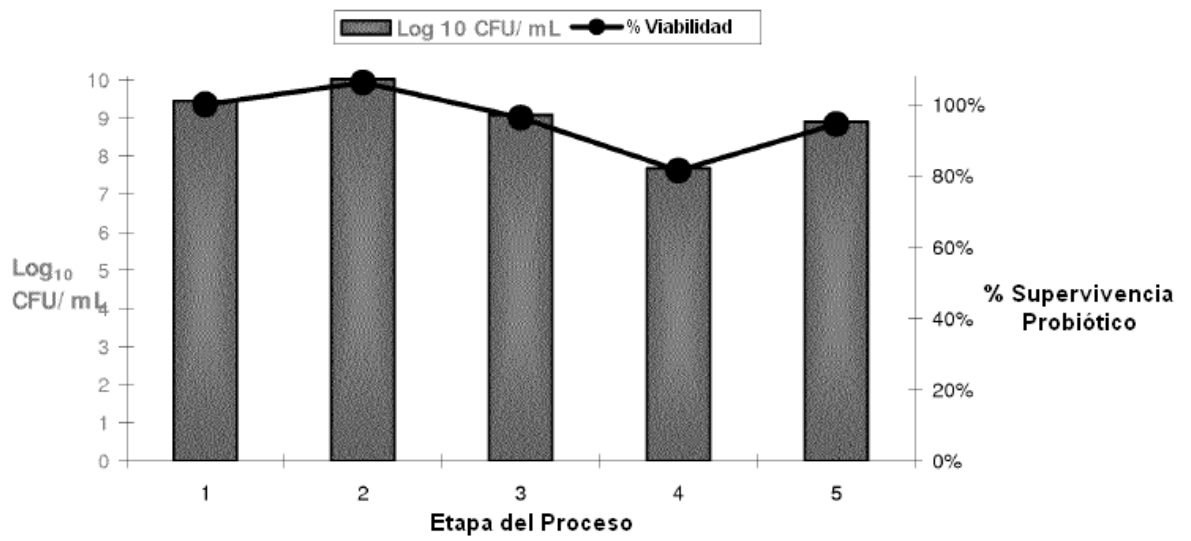


Figura 3

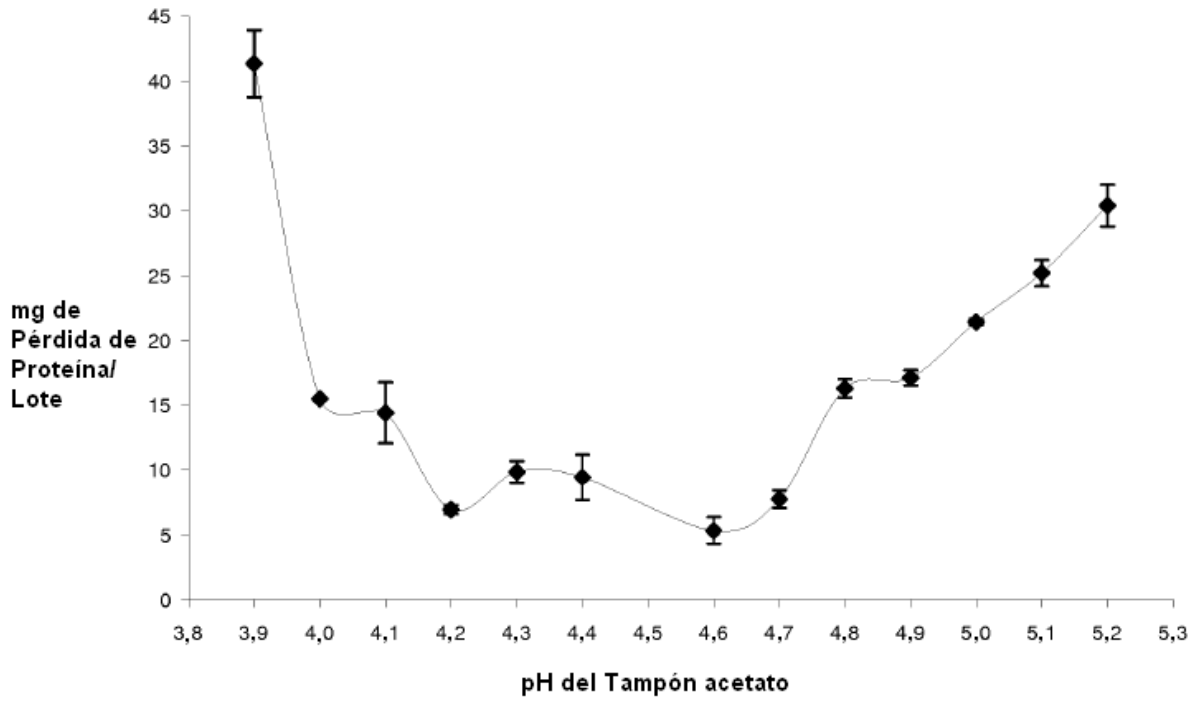


Figura 4

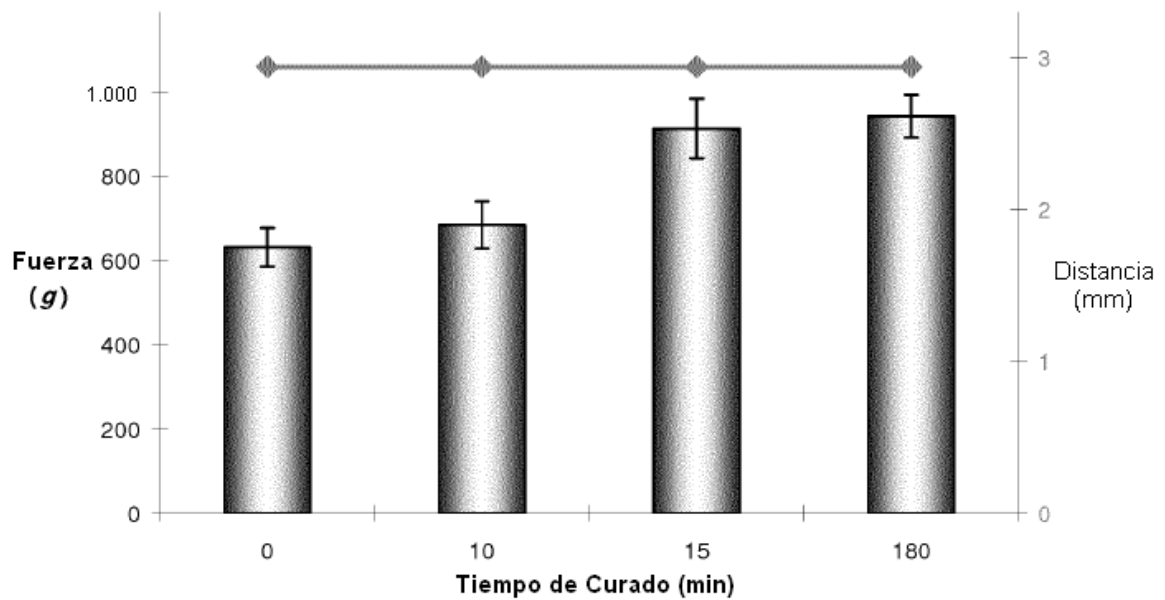


Figura 5

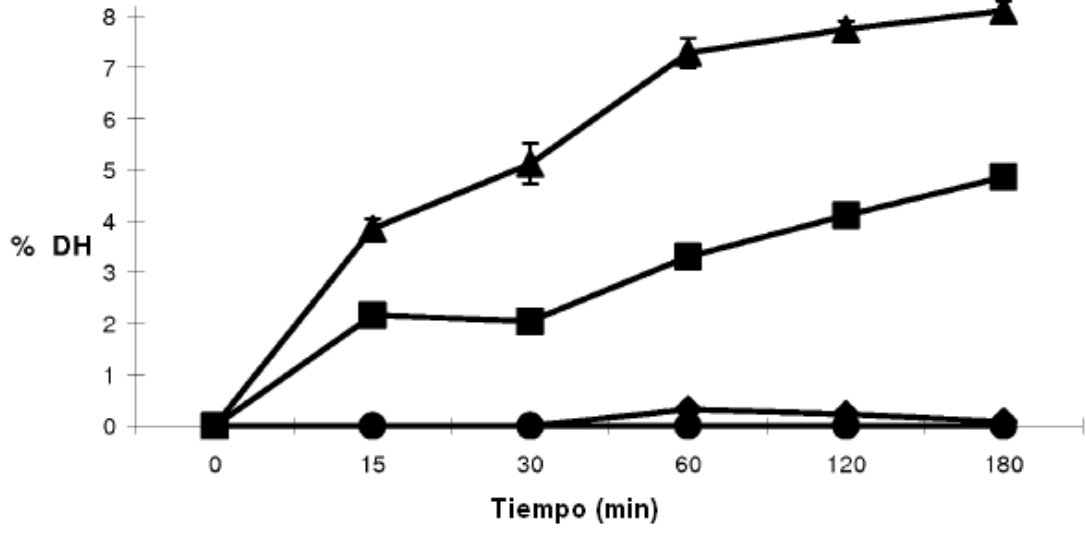


Figura 6

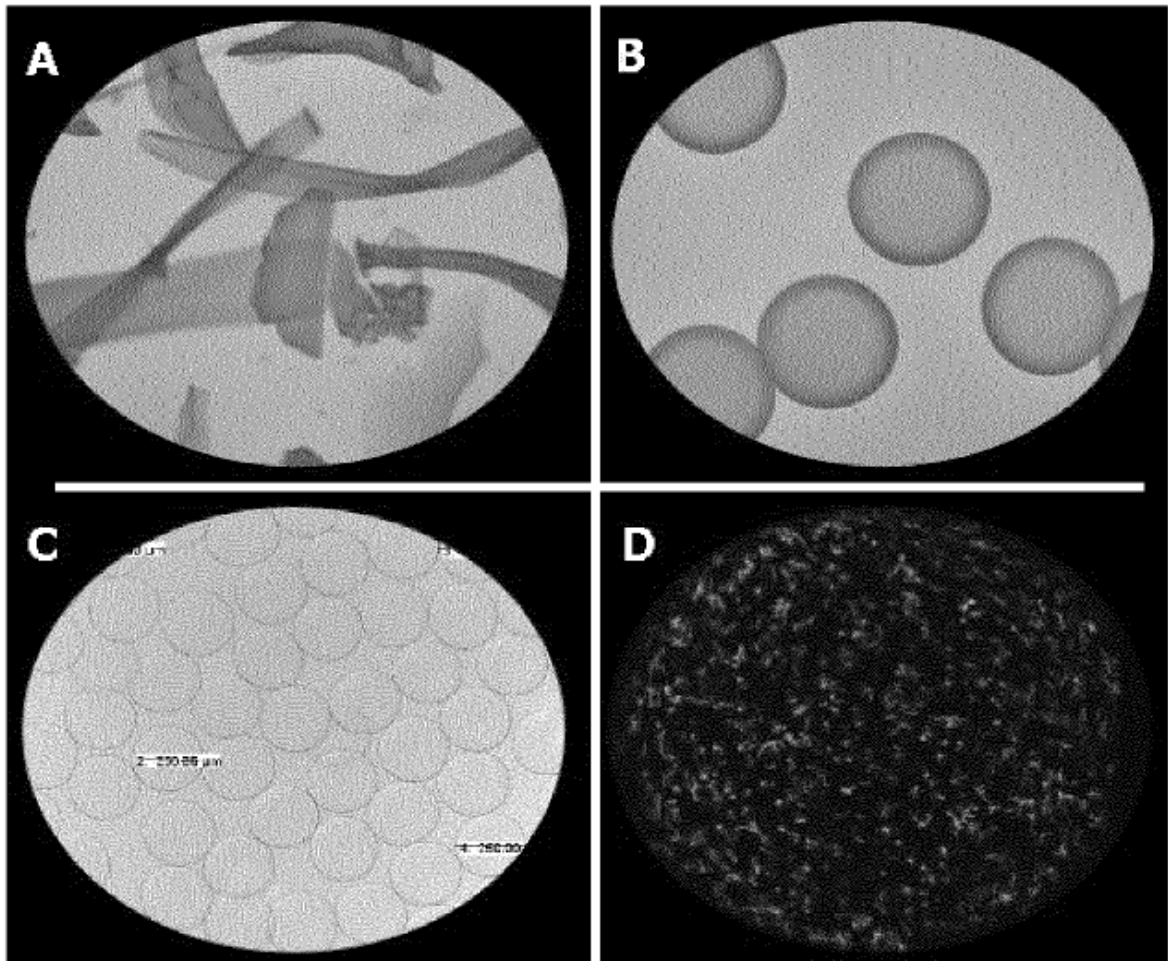


Figura 7

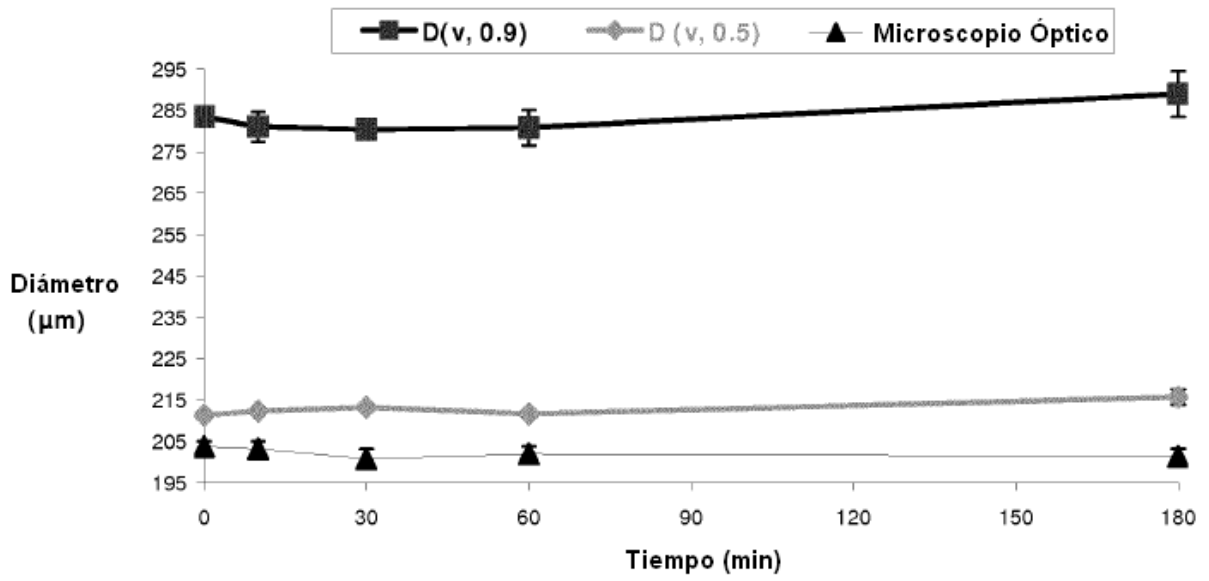


Figura 8

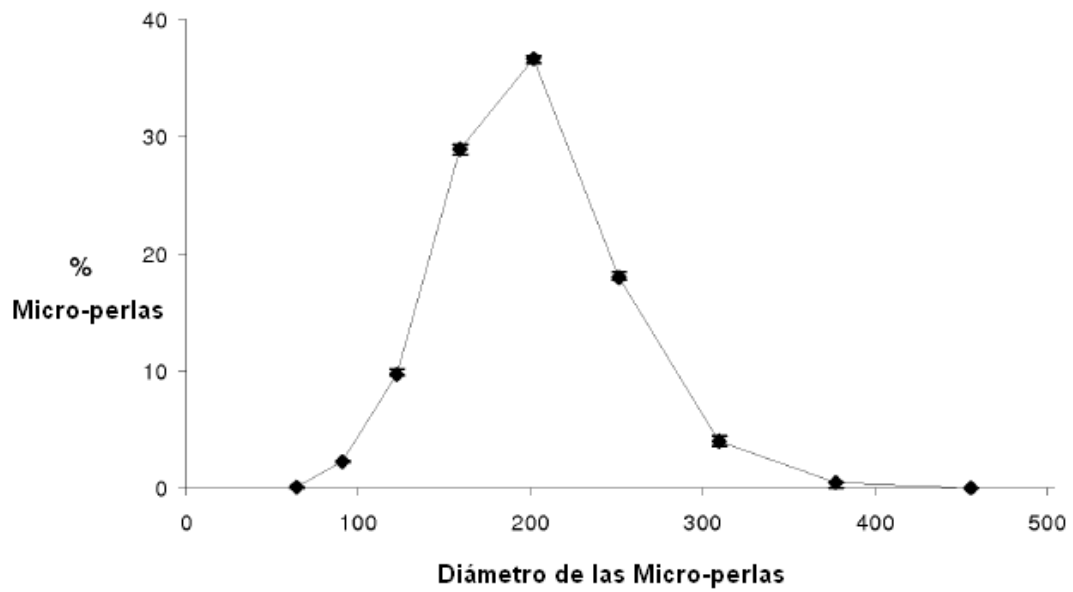


Figura 9

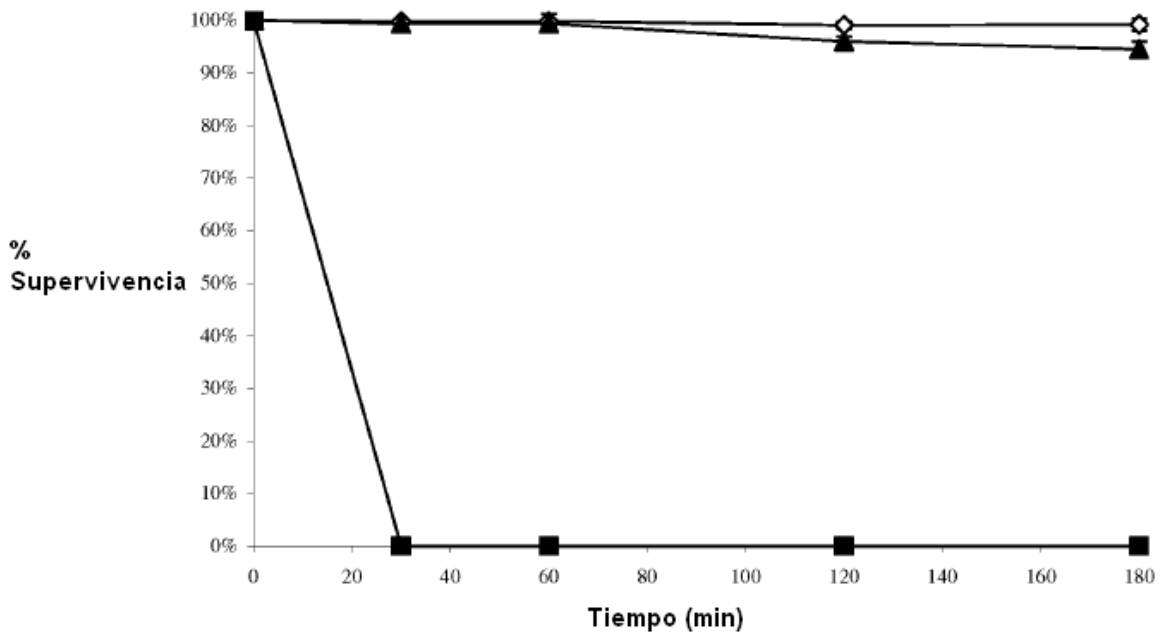


Figura 10

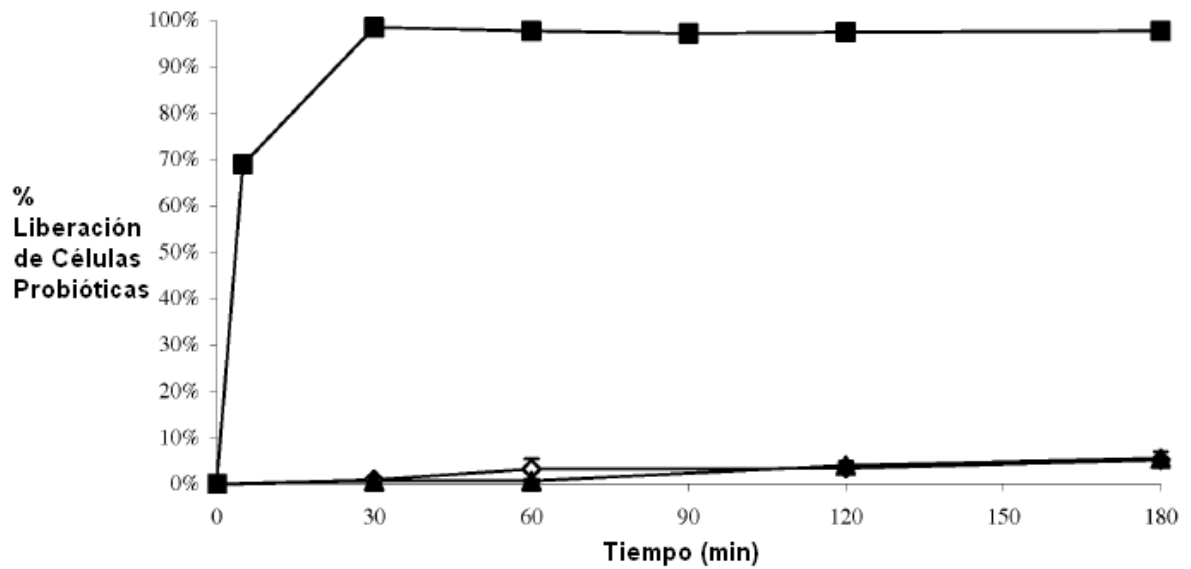


Figura 11

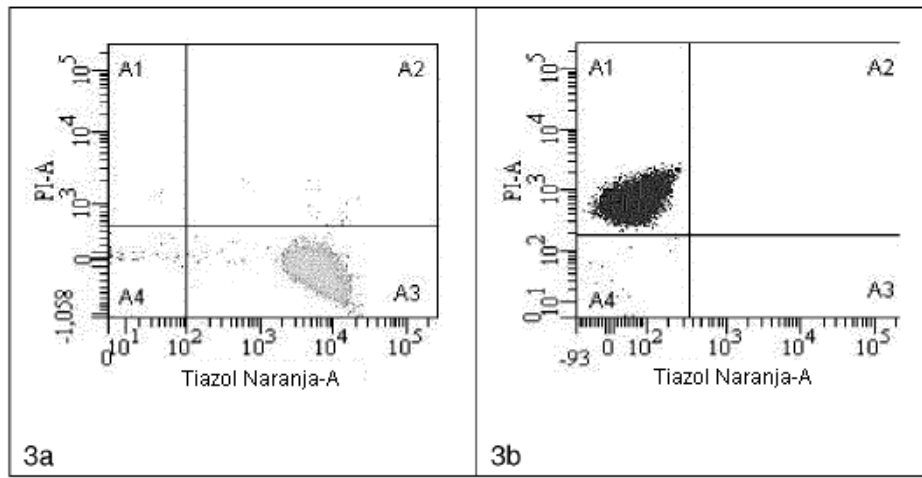


Figura 12

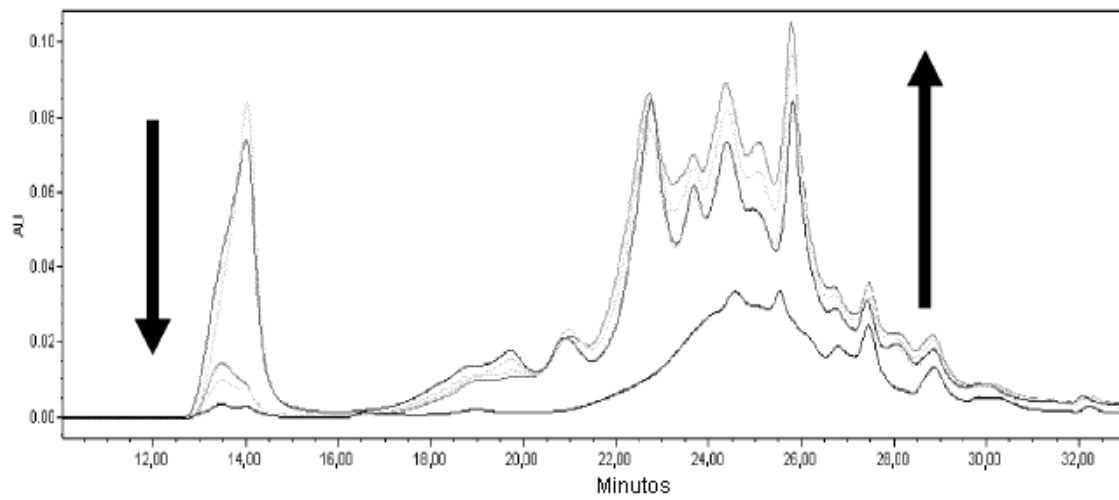


Figura 13

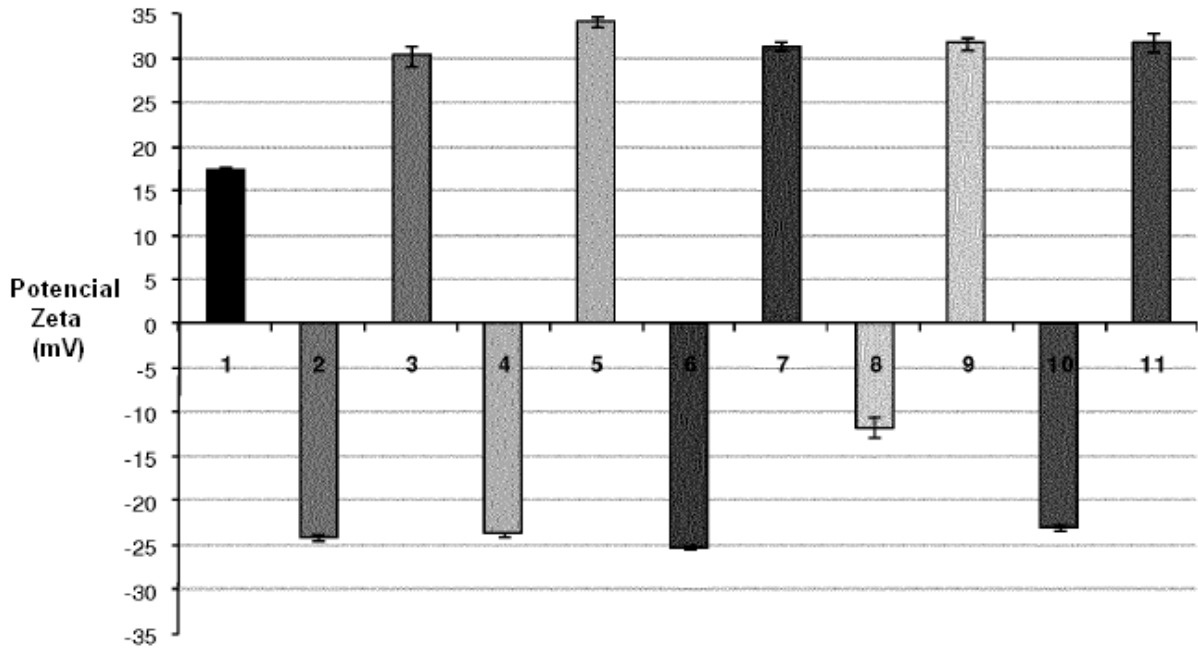


Figura 14

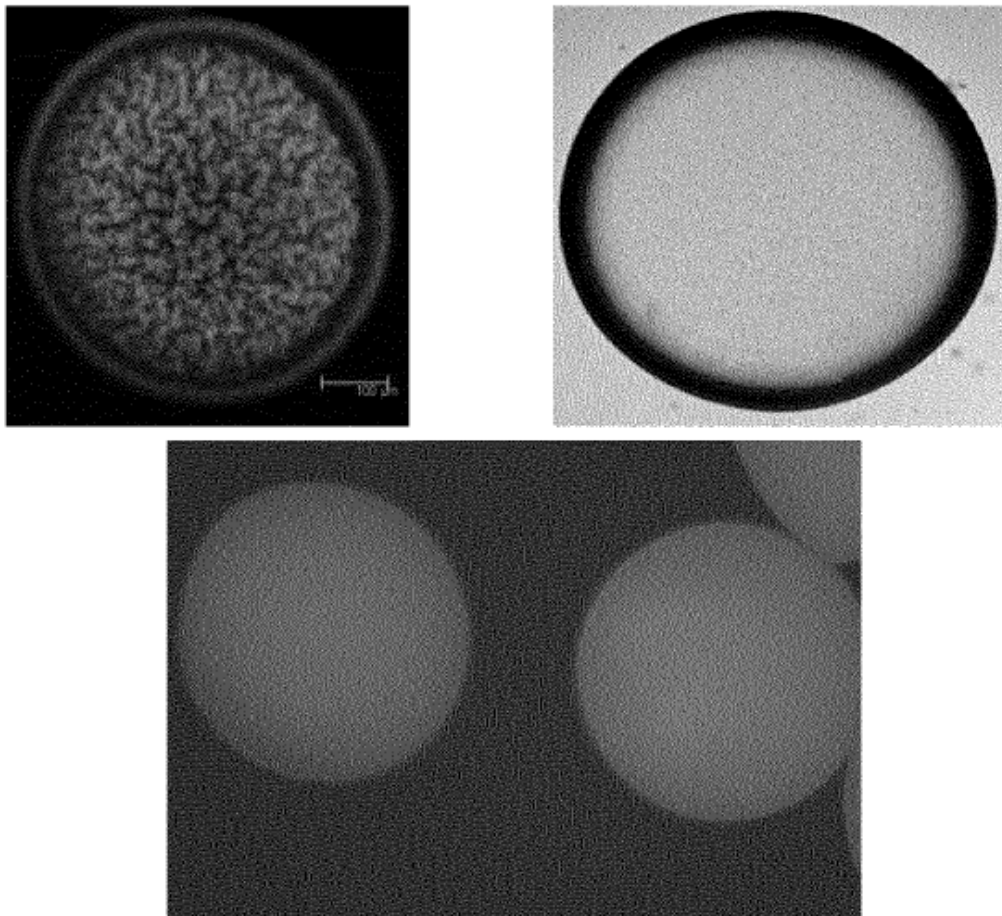


Figura 15

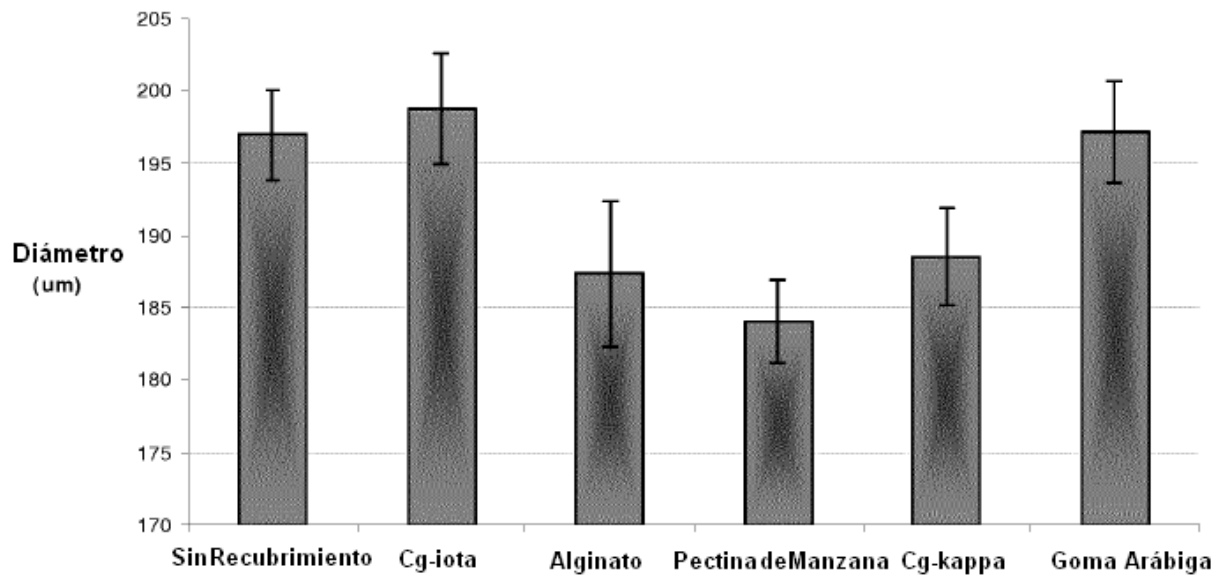


Figura 16

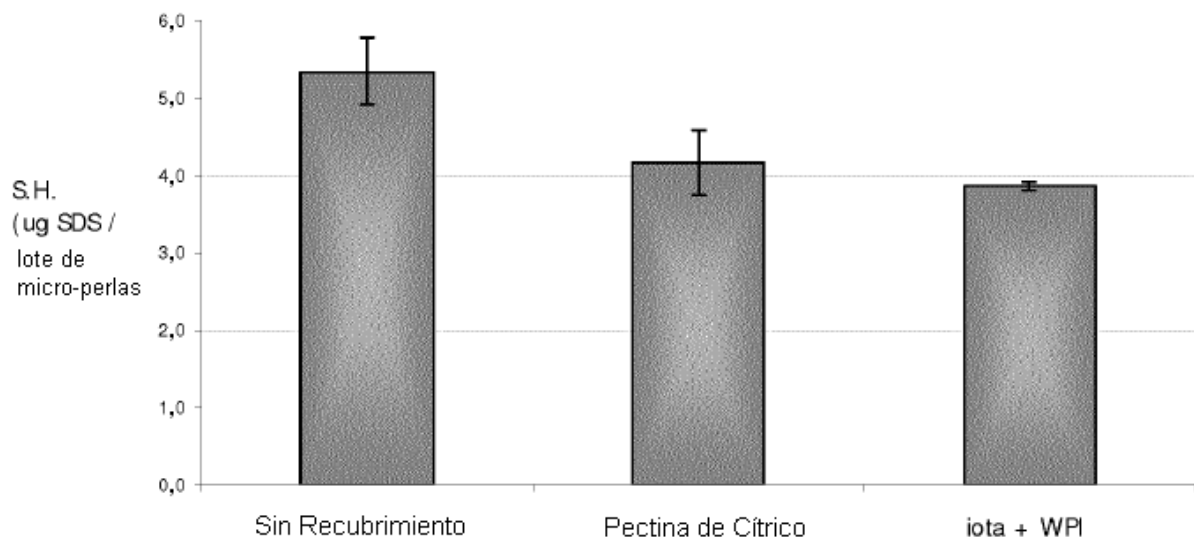


Figura 17

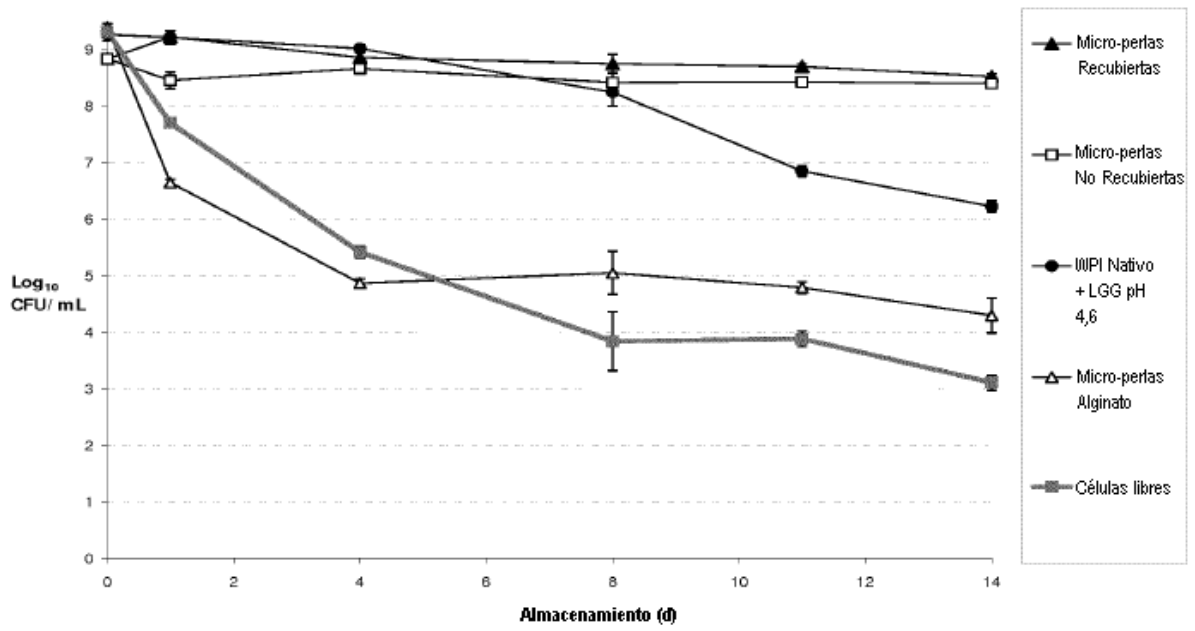


Figura 18

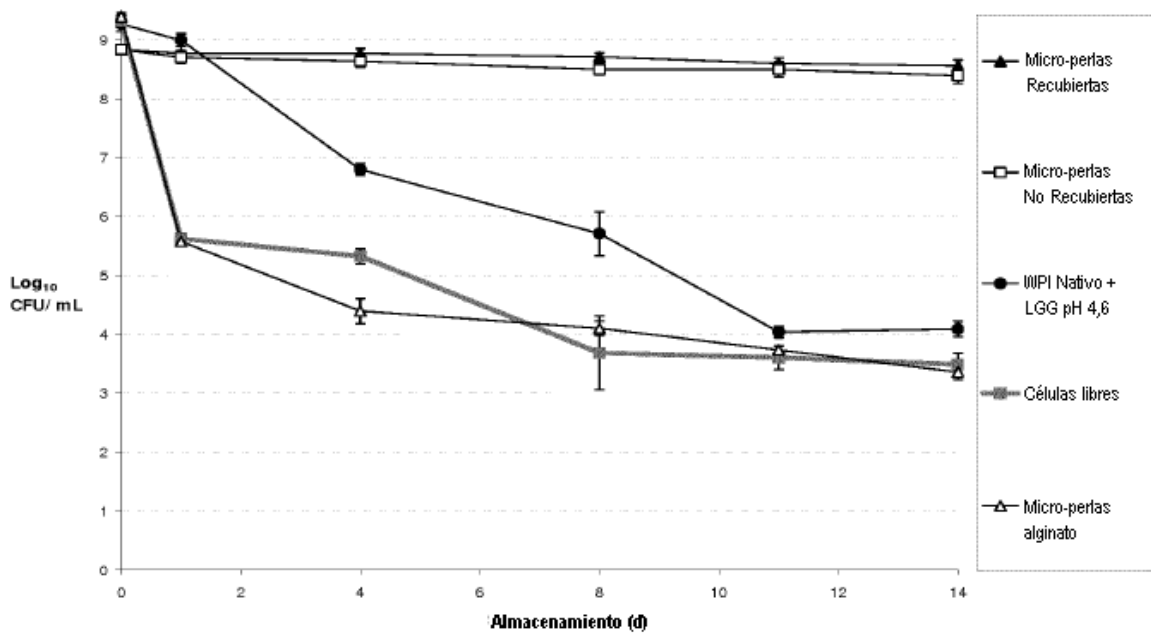


Figura 19

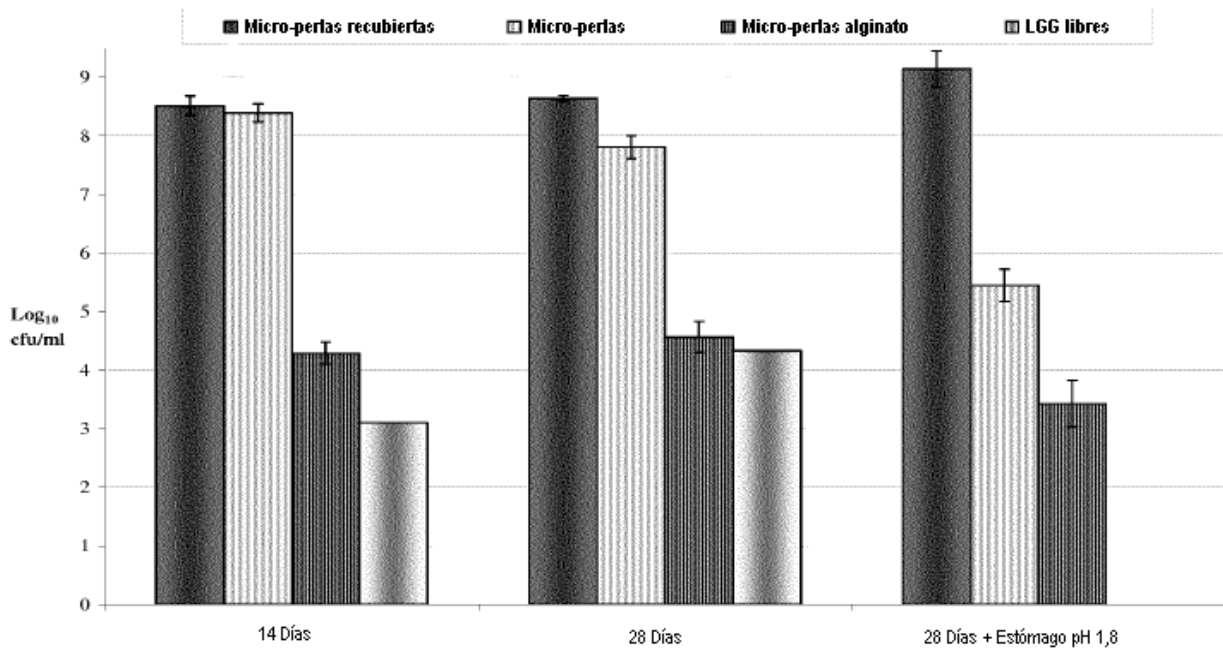


Figura 20

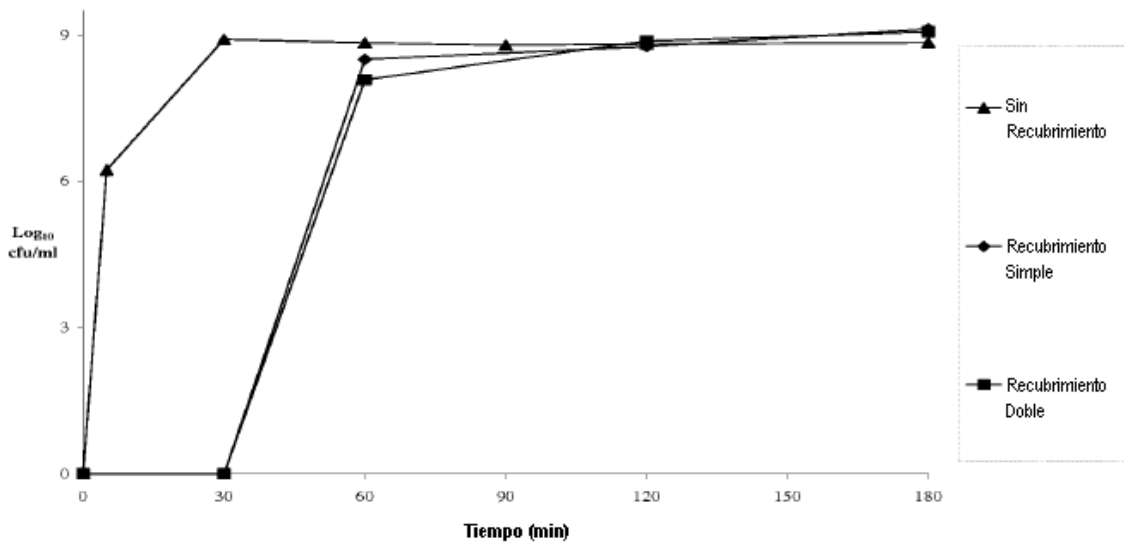


Figura 21

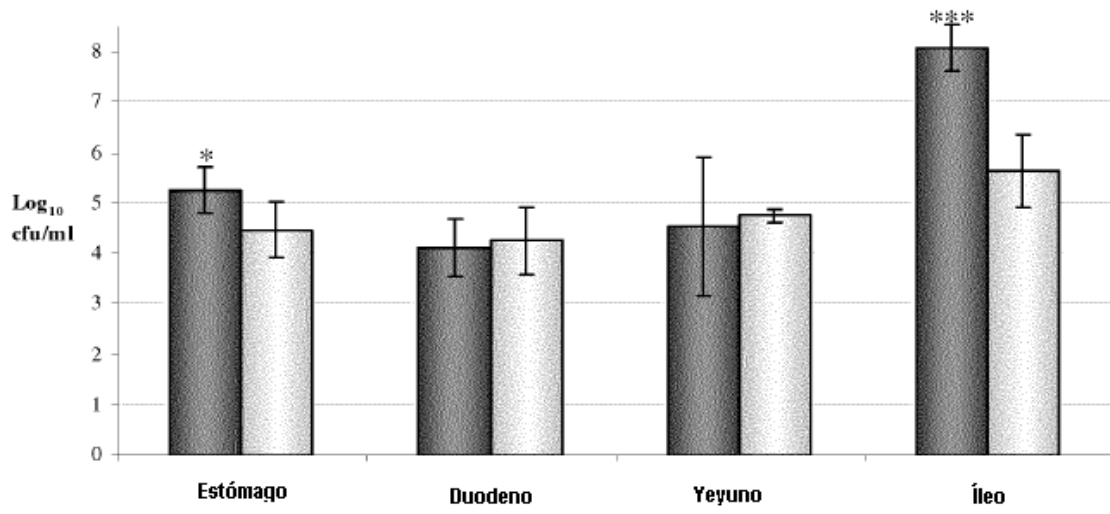


Figura 22

