

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 639 397**

51 Int. Cl.:

<b>C12N 1/00</b>	(2006.01) <b>A61K 35/74</b>	(2015.01)
<b>C03C 3/00</b>	(2006.01) <b>A61K 38/48</b>	(2006.01)
<b>C03C 4/00</b>	(2006.01) <b>A01N 63/02</b>	(2006.01)
<b>A61J 3/02</b>	(2006.01) <b>A01N 31/04</b>	(2006.01)
<b>A61K 9/19</b>	(2006.01) <b>A61K 35/742</b>	(2015.01)
<b>A61K 9/16</b>	(2006.01) <b>A23K 10/18</b>	(2006.01)
<b>A23L 2/52</b>	(2006.01) <b>A23L 33/135</b>	(2006.01)
<b>A61K 47/36</b>	(2006.01) <b>A23K 50/80</b>	(2006.01)
<b>A61K 47/38</b>	(2006.01)	
<b>A61K 31/07</b>	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.01.2011 PCT/US2011/022821**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **04.08.2011 WO11094469**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.01.2011 E 11737688 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.06.2017 EP 2529004**

54 Título: **Composición vítrea seca que comprende un material bioactivo**

30 Prioridad:

**28.01.2010 US 299315 P**

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

**26.10.2017**

73 Titular/es:

**ADVANCED BIONUTRITION CORPORATION  
(100.0%)  
7155 Columbia Gateway Drive  
Columbia, MD 21046, US**

72 Inventor/es:

**HAREL, MOTI;  
SCARBROUGH, JANUARY y  
DREWES, ROGER**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 639 397 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

Composición vítrea seca que comprende un material bioactivo

5 Antecedentes de la invención

Campo de la invención

10 La presente invención se relaciona con la estabilización y protección de materiales biológicos durante almacenamiento y condiciones de uso agresivas, y más particularmente, la invención se relaciona con la incorporación de materiales bioactivos y biológicos incluyendo bacterias vivas en una formulación protectora de una matriz vítrea amorfa.

15 Técnica relacionada

20 La liofilización ha sido el método más común de conservar sustancias biológicas sensibles tales como bacterias vivas o muertas y virus y proteínas, mientras que otros métodos tales como secado por aspersión, secado por aspersión fluidizada y desecación en general no son adecuadas. Las altas temperaturas de secado utilizadas en estos métodos dan como resultado un daño significativo del material bioactivo mismo. Además, pueden no secar suficientemente el material hasta la humedad residual específica o actividad de agua requeridos para la estabilidad del producto y así puede requerirse otra etapa adicional de secado por otros medios. Un proceso de liofilización convencional involucra típicamente la congelación de la solución que contiene el material bioactivo, y liofilizar el biomaterial congelado bajo vacío completo mientras permanece congelado. Las bajas temperaturas de este proceso de liofilización hacen disminuir la reacción de degradación del material bioactivo y minimiza la pérdida de actividad en la forma seca final. Frecuentemente el proceso de liofilización da como resultado una pérdida significativa de actividad y daño al material bioactivo debido a la formación de cristales de hielo durante el proceso de secado lento. Adicionalmente, la etapa de congelación en si misma, si no se hace correctamente, puede desnaturalizar o inactivar el material bioactivo. El daño causado por la formación de una estructura de cristales de hielo puede ser evitado, hasta cierto grado, mediante la adición de agentes crioprotectores a la solución bioactiva (Morgan et al., 2006). Tales agentes protectores son agentes químicos altamente solubles que se agregan a una formulación para proteger las membranas y proteínas celulares durante la congelación y para potenciar la estabilidad durante el almacenamiento. Estabilizadores comunes como bacterias y virus vivos incluyen azúcares superiores tales como sacarosa, glicerol o sorbitol, a altas concentraciones con el material celular o bioactivo (Morgan et al., 2006; Capela et al., 2006). Sin embargo, tales agentes protectores pueden no penetrar adecuadamente la célula para proteger los componentes activos dentro del volumen intracelular lo cual puede llevar a una inestabilidad durante el almacenamiento de las sustancias liofilizadas. Por esta razón, los biomateriales membranosos tales como virus, bacterias y células no sobreviven bien en el proceso de liofilización. Por lo tanto, sigue siendo un desafío significativo desarrollar un proceso de secado y una formulación óptimos que minimicen las pérdidas por secado a la vez que se alcanza una estabilidad de almacenamiento adecuado de material seco.

40 Algunos de los problemas asociados con la liofilización, han sido resueltos utilizando una combinación de ciertas formulaciones y secado al vacío en un estado vítreo, particularmente en cristales de azúcar (Patente de los Estados Unidos 6,190,701). Los materiales bioactivos estabilizados secos son protegidos en una matriz vítrea contra ambientes hostiles tales como altas temperaturas y humedad. En general, la estabilización por la formación de cristales es iniciada concentrando la solución de azúcar que contiene una molécula bioactiva para formar un jarabe sobresaturado. La eliminación posterior del agua progresivamente solidifica el jarabe, el cual eventualmente se convierte en un cristal de azúcar sólido con un contenido de agua residual bajo. La difusión química es despreciable en el cristal y por lo tanto las reacciones químicas virtualmente cesan. Puesto que la desnaturalización o daños en la membrana son cambios químicos, no pueden ocurrir en el cristal y el material bioactivo es estabilizado y protegido. Muchos cristales fallan en estabilizarse debido a que reaccionan con el material bioactivo durante el almacenamiento. Se presentan problemas obvios con los azúcares reductores, los cuales pueden formar buenos cristales físicos, pero luego sus grupos aldehído atacan los grupos amino sobre el material bioactivo en una reacción de Maillard típica, mientras que los azúcares no reactivos dan productos estables, que no requieren refrigeración en absoluto.

55 Puesto que los azúcares son inherentemente higroscópicos, la eliminación de agua y el secado final del jarabe sobresaturado se hace extremadamente difícil. Esta desventaja fue abordada inicialmente por (Annear 1962) quien desarrolló una formulación que contenía bacterias en una solución de azúcar y aminoácidos y un proceso de secado al vacío que involucra ebullición y formación de espuma del jarabe concentrado. Roser et al. (Patente de los Estados Unidos 6,964,771) divulga un concepto similar de secado por formación de espuma que incluye una etapa de concentración evaporando el conjunto del solvente seguida por ebullición y espumación del jarabe concentrado bajo vacío. Para mitigar la oxidación y el daño por desnaturalización que puede presentarse durante la etapa de ebullición, Bronshtein (Patentes de los Estados Unidos 5,766,520, 7,153,472) introdujeron una fórmula protectora mejorada que contenía carbohidratos y surfactantes. El secado de la solución protectora también involucra un proceso paso a paso de concentración bajo un vacío moderado antes de la aplicación de un vacío fuerte para producir una ebullición espumosa del agua restante para formar espuma estable y seca. Para obviar la etapa de

ebullición, Busson y Schroeder (Patente de los Estados Unidos No. 6,534,087) han introducido un proceso de secado en estado líquido de una formulación adecuada para materiales bioactivos sensibles y utilizando un horno de vacío bajo una presión de vacío muy moderada por encima de 30 Torr. Después de alcanzar un cierto nivel de secado sin hervir el material, se aplicó calor por encima de 20°C y el material secado fue recolectado después de solo unas pocas horas.

Este tipo de proceso de secado, en el cual la solución bioactiva es mantenida en estado líquido durante el proceso de secado completo, tiene la ventaja de un secado más rápido debido a la evaporación del líquido durante la ebullición y el área superficial incrementada presentada por las superficies espumosas. Sin embargo, la ebullición y el espumado requieren la aplicación de una cantidad significativa de calor para proveer la erupción necesaria de la solución. Tal proceso de secado no es bien adaptado para secar materiales biológicos sensibles, tales como virus, células o bacterias viables porque, el calor aplicado acelera la degradación enzimática (por ejemplo, proteólisis) y oxidación química (por ejemplo, oxidación y ataque por radicales libres), los cuales pueden destruir la actividad o viabilidad del material biológico.

El proceso de secado descrito más arriba también está limitado en su capacidad de ser escalado a un proceso industrial grande. El evitar la congelación requiere que el proceso sea llevado a cabo a un nivel de vacío bajo (> 7 TORR) que en los ciclos de procesos de liofilización o liofilización por aspersión convencionales. La desventaja más significativa de los procesos anteriores es la incapacidad para controlar y limitar la expansión de la espuma dentro del recipiente, bandeja o vial. La erupción incontrolable y frecuentemente la formación excesiva de espuma hace prácticamente imposible desarrollar un proceso a escala industrial. La naturaleza de la erupción y espumado de la etapa de ebullición da como resultado que una porción de material sea esparcida sobre las paredes del recipiente y hacia la cámara de secado. Para suavizar la erupción durante la ebullición, Bronshtein (Patentes de los Estados Unidos números 6,884,866, 6,306,345) ha propuesto cámaras especiales y un protocolo de aplicación de temperatura/presión controladas que reduce el sobrecalentamiento hasta un nivel aceptable. Otra metodología para contener la erupción y la espumación excesiva está descrita en la Publicación de Patente de los Estados Unidos No. 2008/0229609, en el cual la solución bioactiva es encerrada en un contenedor o bolsa cubierto con membranas respirables. Una vez más, estos protocolos son difíciles de implementar a nivel industrial, requieren equipo especial y son difíciles de reproducir confiablemente con diferentes formulaciones.

El proceso de espuma seca, como es conocido en la técnica, no está particularmente bien adaptado para la conservación de materiales biológicos membranosos, tales como liposomas, virus, o células y bacterias viables. Las membranas lipídicas evitan frecuentemente la penetración de los agentes protectores en volúmenes encerrados o evitan la eliminación adecuada de agua desde el volumen encerrado. Sin la penetración adecuada de los agentes protectores, los procesos enzimáticos, tales como la proteólisis, y los procesos químicos, tales como la oxidación y los ataques por radicales libres, pueden destruir la actividad o viabilidad del material biológico membranosos. Los fluidos hipoosmóticos dentro de volúmenes encerrados en la membrana pueden promover la inestabilidad del material biológico. Truong-le, Vu (Patente de los Estados Unidos No. 7,381,425) describe un proceso de liofilización adecuado para materiales bioactivos membranosos. Las composiciones de la invención incluyen un poliol y un material bioactivo membranosos. El proceso de secado comienza enfriando la formulación hasta una temperatura de aproximadamente la temperatura de transición de fase de las membranas lipídicas, reduciendo la presión sobre la formulación para formar una espuma estable, congelar la espuma, y luego sublimar el agua desde la espuma congelada para proveer una composición en espuma seca liofilizada. Pueden emplearse condiciones de secado secundarias para secar adicionalmente la espuma.

Entre otras composiciones bioactivas descritas en la técnica anterior, la GB-A-1232057 describe una composición finamente pulverizada que contiene leche en polvo desnatada la cual se granula para mejorar su capacidad de reconstitución con líquidos acuosos manteniendo la composición en la forma de un lecho fluidizado, e introducir vapor en contacto con la contracorriente del lecho para mantener gasificado el lecho. La composición puede incluir azúcares, vitaminas, minerales, proteínas, grasas, agentes voluminizantes tales como metilcelulosa, glutamato de mono sodio y colorantes. La US-A-2004/241313 enseña una composición alimenticia proteinácea que comprende proteína, eritritol, jarabe de maltitol, glicerol, inulina y maltodextrina, y un proceso para preparar la composición alimenticia proteinácea. La US-A-5262187 está relacionada con una mezcla seca baja en grasa, masa lista para usar y una composición horneada compuesta de una base de ingredientes de granos de cereales endulzados con un sistema mimético de grasa de polidextrosa, material celulósico, un sólido lácteo no graso o sustituto, emulsificante, almidón alimenticio modificado, y una mezcla de goma de xantano inicial y goma guar o de algarrobo, preferiblemente con lecitina y concentrado de proteína de suero. La composición horneada es húmeda, tierna, grumosa con buena sensación bucal, pero preferiblemente contiene un tercio menos de calorías que una composición similar con contenido completo de grasa. La USA-2007/031534 se relaciona con un alimento para mascotas que contiene aminoácidos o sales de los mismos, en vez de materiales proteínicos crudos con baja alergenicidad, seleccionados de patata, patata dulce, arroz, millo cola de zorro, millo de establo, kaoliang, maíz, guisantes, levadura de cervecería, y levadura de panadería.

Sigue existiendo una necesidad por una formulación protectora adecuada que pueda ser secada en estado vítreo sin ebullición ni excesiva espumación. Hay una necesidad particularmente para una formulación efectiva en costes y un proceso de secado escalable que también sea adecuado para aplicaciones por fuera de la industria farmacéutica,

tales como las industrias alimentaria y agrícola. Se requieren formulaciones protectoras y procesos de secado moderados para proveer un secado adecuado sin exposición a altas temperaturas. Se requiere de una composición que pueda proteger tales materiales biológicos en almacenamiento bajo condiciones de alta temperatura y humedad. La presente invención proporciona una solución a todos estos retos tal como se describe a continuación. El proceso de deshidratación de la presente invención es muy suave y no expone al agente activo a ebullición o espumación y por lo tanto es ventajoso con respecto a las técnicas de liofilización y secado en espuma convencionales que someterían la muestra a una o ambas de estas tensiones.

#### Resumen de la invención

La presente invención incluye composiciones y métodos de secado para conservar materiales biológicos sensibles, tales como péptidos, proteínas, enzimas, hormonas, vitaminas, carotenoides, minerales, fármacos, antibióticos, microbicidas, fungicidas, herbicidas, insecticidas, espermicidas, ácidos nucleicos, anticuerpos, vacunas, bacterias (probióticas u otras), virus y/o suspensiones celulares en almacenamiento. Los métodos de secado proveen un proceso para secar una formulación que comprende los materiales bioactivos, un agente formador de matriz, y un agente formador de cristales. La formulación se prepara dispersando todos los componentes sólidos y los materiales bioactivos en una solución. La solución es congelada instantáneamente por medios conocidos en la técnica tales como nitrógeno líquido o hielo seco para formar una composición amorfa en pequeñas perlas, hebras o gotitas. Las partículas congeladas pueden ser almacenadas en un congelador profundo (entre -30°C y -80°C) hasta el secado, o son colocadas inmediatamente sobre bandejas en un estado amorfo congelado para secado en líquido en un liofilizador convencional. El método de secado es iniciado mediante una purga corta y una etapa de estabilización de la estructura de las partículas congeladas bajo una presión de vacío de menos de < 2000 mTORR seguida por una etapa de secado primaria bajo más de mayor de 2000 mTORR de presión de vacío y a una temperatura deseada. Durante la etapa secundaria y final de secado de material amorfo vítreo, se aplican una presión de vacío completa y temperatura elevada, para alcanzar un nivel deseable de actividad de agua de material seco.

En una realización, la formulación comprende cantidades suficientes de agentes formadores de matriz, en la cual se integra el material bioactivo. Ejemplos de un agente de matriz adecuado incluyen, pero no se limitan, acetato ftalato de celulosa (CAP), carboximetilcelulosa, pectina, alginato de sodio, sales de ácido algínico, hidroxilpropilmetilcelulosa (HPMC), metilcelulosa, carragenano, Goma guar, goma de acacia, goma xantano, goma de algarrobo, quitosano y derivados de quitosano, colágeno, ácido poliglicólico, almidones y almidones modificados, ciclodextrinas y oligosacáridos (inulina, maltodextrinas, dextranos, etc.); y combinaciones de los mismos. En una realización particular, el agente formador de matriz preferido es alginato de sodio. Preferiblemente, la formulación comprende, en porcentaje en peso de la materia seca total, 0.1-20% y más preferiblemente 1-12%.

En una realización adicional, el agente formador de matriz comprende una mezcla de alginato de sodio y oligosacáridos en una relación en peso de 1:1-10, más preferiblemente 1:1-5 de alginato de sodio/oligosacáridos.

En aún otra realización de la presente invención, el agente formador de matriz es entrecruzado con iones metálicos divalentes para formar un hidrogel firme. La formulación de hidrogel entrecruzada es formada atomizando o extruyendo la suspensión en un baño que contiene solución de iones metálicos divalentes o agregando iones metálicos divalentes directamente a la suspensión y permitiendo que la formulación se endurezca para formar un hidrogel. La formulación de un hidrogel es congelada entonces de forma instantánea y secada de acuerdo con los métodos de secado de la invención.

En aún otra realización, la formulación comprende cantidades significativas de agentes formadores de cristales, en los cuales están embebidos los microorganismos. Ejemplos de un agente adecuado incluyen pero no se limitan a proteínas tales como albúmina de huevo, clara de huevo, gelatina, inmunoglobulina, proteína de soja aislada, proteína de trigo, proteína de guisante, proteína de algodón, leche en polvo desnatada, caseinato, proteína de suero y cualquier proteína hidrolizada; carbohidratos incluyendo monosacáridos (por ejemplo, galactosa, D-manosa, sorbosa, etc.), disacáridos (por ejemplo, lactosa, trehalosa, sacarosa, etc.), un aminoácido tal como lisina, glutamato, glicina, alanina, arginina o histidina. Así como aminoácidos hidrófobos (triptófano, tirosina, leucina, fenilalanina, etc.); una metilamina tal como betaina; una sal excipiente tal como sulfato de magnesio; un poliol tal como alcoholes trihídricos de azúcar superiores, (por ejemplo, glicerina, eritritol, glicerol, arabitol, xilitol, sorbitol y manitol); propilenglicol; polietilenglicol; plurónicos; surfactantes; y combinaciones de los mismos.

En una realización preferida, el agente formador de cristal comprende una mezcla de un disacárido y una proteína hidrolizada. En una realización particular, el agente formador de cristales preferidos es una mezcla de trehalosa y proteína hidrolizada. Preferiblemente, la formulación comprende, en porcentaje en peso de la materia seca total, 10-90% de trehalosa y 0.1-30% de proteína hidrolizada, más preferiblemente 20-80% de trehalosa y 0.1-20% de proteína hidrolizada, y lo más preferiblemente 40-80% de trehalosa y 0.1-20% de proteína hidrolizada.

El método de la invención incluye típicamente mezclar en una solución los materiales bioactivos (por ejemplo, péptidos, proteínas, enzimas, hormonas, vitaminas, carotenoides, minerales, fármacos, antibióticos, microbicidas, fungicidas, herbicidas, insecticidas, espermicidas, ácidos nucleicos, anticuerpos, vacunas, bacterias, virus y/o suspensiones celulares), al menos un agente formador de matriz y al menos dos agentes formadores de cristales en

una suspensión homogénea, con congelación instantánea de la suspensión por atomización, goteo o extrusión en un baño de nitrógeno líquido. La recolección de las perlas, microperlas, hebras o gotitas del baño de nitrógeno líquido y secado en un estado líquido en un liofilizador, o almacenamiento alternativo en un congelador profundo (entre -30°C y -80°C) hasta el secado.

5 En una variación de la presente invención, la cantidad del agente formador de matriz en la formulación se ajusta para alcanzar una viscosidad y densidad de formulación deseada que permite un secado primario eficiente a la vez que evita la ebullición y la espumación excesiva que ocurren típicamente durante la etapa de secado en líquido primaria. Una densidad deseada de la formulación líquida puede alcanzarse por medios conocidos en el arte, por ejemplo, bañar o inyectar gas tal como aire, nitrógeno, dióxido de carbono, argón, etc. Preferiblemente, se inyecta nitrógeno en la formación de suspensión viscosa bajo mezcla para formar una suspensión porosa o cremosa estable antes de la etapa de congelación instantánea.

15 De acuerdo con la invención, el proceso de secado involucra tres etapas principales; 1. Etapa de purga corta y estabilización de la estructura de las partículas congeladas bajo una presión de vacío de menos de 2000 mTORR, 2. Etapa de secado líquido primaria bajo presión de vacío de más de 2000 mTORR y a una temperatura deseada, 3. Etapa de secado secundaria y final del material vítreo bajo presión de vacío completa y temperatura elevada durante un tiempo suficiente para reducir la actividad de agua de la formulación secada a 0.3 Aw o menos.

20 En realizaciones preferidas de los métodos de secado, el material bioactivo es mezclado en una solución que incluye un agente formador de matriz y un agente formador de cristales. En una realización particular, el material bioactivo comprende bacterias vivas (por ejemplo, bacterias probióticas). Ejemplos de microorganismos adecuados incluyen, pero no se limitan a, levaduras tales como *Saccharomyces*, *Debaromyces*, *Candida*, *Pichia* y *Torulopsis*, mohos tales como *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Penicillium* y *Torulopsis*, y bacterias tales como los géneros *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Fusobacterium*, *Melissococcus*, *Propionibacterium*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Kocuriaw*, *Staphylococcus*, *Peptostreptococcus*, *Bacillus*, *Pediococcus*, *Micrococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Aerococcus*, *Oenococcus* y *Lactobacillus*. Ejemplos específicos de microorganismos probióticos adecuados estarían representados por las siguientes especies e incluyen todos los biotipos de cultivo dentro de esas especies: *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *Bacillus coagulans*, *B. lentus*, *B. licheniformis*, *B. mesentericus*, *B. pumilus*, *B. subtilis*, *B. natto*, *Bacteroides amylophilus*, *Bac. capillosus*, *Bac. ruminicola*, *Bac. suis*, *Bifidobacterium adolescentis*, *B. animalis*, *B. breve*, *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. lactis*, *B. longum*, *B. pseudolongum*, *B. thermophilum*, *Candida pintolepesii*, *Clostridium butyricum*, *Enterococcus cremoris*, *E. diacetylactis*, *E. faecium*, *E. intermedius*, *E. lactis*, *E. mundtii*, *E. thermophilus*, *Escherichia coli*, *Kluyveromyces fragilis*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. alimentarius*, *L. amylovorus*, *L. crispatus*, *L. brevis*, *L. case 4*, *L. curvatus*, *L. cellobiosus*, *L. delbrueckii ss. bulgaricus*, *L. farciminis*, *L. fermentum*, *L. gasserii*, *L. helveticus*, *L. lactis*, *L. plantarum*, *L. johnsonii*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *L. sakei*, *L. salivarius*, *Leuconostoc mesenteroides*, *P. cerevisiae (damnosus)*, *Pediococcus acidilactici*, *P. pentosaceus*, *Propionibacterium freudenreichii*, *Prop. shermanii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Staphylococcus carnosus*, *Staph. xylosum*, *Streptococcus infantarius*, *Strep. salivarius ss. thermophilus*, *Strep. Thermophilus* y *Strep. lactis*.

40 En métodos preferidos, la formulación es mezclada a temperatura ambiente o ligeramente calentada para ayudar en solubilización de los materiales en la solución viscosa (por ejemplo, de 20°C a 40°C). Después de mezclar hasta homogeneidad, la suspensión viscosa es luego congelada instantáneamente atomizando, sumergiendo o extruyendo en nitrógeno líquido. Las partículas congeladas son recolectadas desde el baño en nitrógeno líquido y son secadas inmediatamente o almacenadas alternativamente en congelación profunda para secado posterior. Típicamente, la suspensión que contiene el material bioactivo es congelado instantáneamente hasta entre -30°C a -180°C, más preferiblemente la formulación es congelada instantáneamente en nitrógeno líquido.

50 En una realización preferida, las partículas congeladas instantáneamente son secadas inmediatamente o de una u otra manera almacenadas en un congelador profundo, preferiblemente a -80°C, hasta el secado. Las partículas congeladas son cargadas entonces sobre bandejas y transferidas inmediatamente a una cámara de secado al vacío donde son secadas de acuerdo con la presente invención. Preferiblemente, el secado es iniciado por sometimiento a las partículas congeladas bajo presión de vacío entre 0 y 2000 mTORR. Las partículas congeladas son desgasificadas y su estructura y volumen se dejan desarrollar y estabilizar durante un período corto de tiempo. Típicamente, el período de tiempo deseable para someter la partícula congelada a presión de vacío alta es no mayor de 30 minutos, más preferiblemente el período de tiempo está entre 1 y 20 minutos. Después de la corta desgasificación inicial y estabilización de la estructura de las partículas congeladas, el vacío es ajustado a entre 2000 y 10,000 mTORR y se aplica calor para descongelar las partículas a una temperatura por encima de su punto de congelación. Típicamente, el vacío se ajusta a entre 2000 y 4000 mTORR y la temperatura de partícula se incrementa a entre -5°C y + 5°C. Bajo estas condiciones de secado primarias, las partículas primarias son descongeladas rápidamente y suavemente mantienen su forma original a la vez que comienza una deshidratación acelerada. El secado secundario subsecuente es establecido después de eliminar aproximadamente 60-90% del agua libre, se aplica una presión de vacío máxima y una temperatura de suministro de calor a la formulación se eleva desde 30°C hasta 60°C. Para maximizar la estabilidad del producto final, la formulación es secada preferiblemente durante un tiempo suficiente para reducir la actividad de agua de la formulación a Aw = 0.3 o menos.

65 En una realización preferida de la invención, el secado secundario comprende la eliminación del agua enlazada a una presión de menos de 1000 mTORR.

5 La formulación secada puede ser utilizada directamente como una escama, o triturada en un polvo y tamizada hasta un tamaño de partícula promedio que va desde aproximadamente 10 µm hasta aproximadamente 1000 µm. La formulación puede ser suministrada directamente a un animal, incluyendo al hombre, como un polvo concentrado, un líquido reconstituido (por ejemplo, una bebida), o puede ser incorporado bien sea en forma de escamas o polvo a un producto alimenticio o de pienso existente.

Breve descripción de las figuras

10 Figura 1. Observaciones visuales y microscópicas de diferentes composiciones secadas que contienen diversas matrices y agentes formadores de cristales como perlas sólidas congeladas de acuerdo con el método de la presente invención.

15 Figura 2. El efecto de la forma de cultivo de *L. rhamnosus* como perlas frescas, congeladas o cultivos en polvo seco sobre sus recuentos de CFU iniciales en una composición seca.

20 Figura 3. El efecto de la temperatura de congelación de una composición que contiene *L. rhamnosus* como perlas sólidas congeladas en nitrógeno líquido o en congelación profunda a -80°C y como una suspensión viscosa no congelada a +4°C sobre los recuentos de CFU bacterianos iniciales en la composición seca. Los resultados muestran solamente el efecto de la temperatura de congelación de la suspensión sin etapa adicional de purga antes del secado.

25 Figura 4. El efecto de la temperatura de congelación de una composición que contiene *Bifidobacterium animalis* Bb12 como perlas sólidas congeladas en nitrógeno líquido y como una suspensión viscosa no congelada a + 4°C sobre los recuentos bacterianos de CFU iniciales en la composición seca. Los resultados muestran solamente el efecto de la temperatura de congelación de la suspensión sin etapa adicional de purga antes del secado.

30 Figura 5. El efecto de la duración de la purga bajo vacío de perlas sólidas congeladas sobre los recuentos de CFU iniciales de *L. rhamnosus* en una composición seca.

Figura 6. Perfil de secado en un liofilizador de la composición de acuerdo con el método de la invención.

Figura 7. Pérdida por proceso y secado de *L. rhamnosus* en composiciones y métodos de secado de la invención.

35 Figura 8. Tendencias de estabilidad de bacterias probióticas secas, composición de *L. rhamnosus* en almacenamiento a 40°C y 33% de humedad relativa.

Descripción detallada de la invención

40 Definiciones

Debe entenderse que la terminología usada aquí tiene el propósito de describir realizaciones particulares únicamente.

45 Tal como se utiliza en esta especificación y en las reivindicaciones anexas, las formas singulares "uno", "una", y "el/la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto dicte claramente otra cosa. Así, por ejemplo, la referencia a "una proteína" incluye una proteína singular o combinación de dos o más proteínas; una referencia a "enzimas", "vitaminas", "bacterias", etc., incluye el singular o mezclas de varias, y similares.

50 "Material bioactivo", "composición bioactiva" o "formulación bioactiva" se refiere a preparaciones, las cuales están en tal forma que permiten que la actividad biológica de los ingredientes bioactivos sea inequívocamente efectiva.

55 "Agente formador de matriz" se refiere a compuestos o materiales que se agregan a la formulación para incrementar la viscosidad y/o la densidad de la formulación húmeda o para formar un hidrogel. Ejemplos de un agente formador de matriz adecuado incluyen, pero no se limitan a derivados de celulosa solubles en agua tales como metilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxietilcelulosa e hipromelosa; alginatos, galactomanano, goma de gelano, tragacanto, incluyendo cualquier derivado de éstos, acetato ftalato de celulosa (CAP), carboximetilcelulosa, pectina, alginato de sodio, sales de ácido alginico, hidroxilpropilmetilcelulosa (HPMC), metilcelulosa, carragenano, goma guar, goma de acacia, goma xantano, goma de algarrobo, quitosano y derivados de quitosano, colágeno, ácido poliglicólico, almidones y almidones modificados, ciclodextrinas y oligosacáridos (inulina, maltodextrinas, dextranos, etc.) y combinaciones de los mismos.

65 "Agente formador de cristales" o "agente formador de cristales de azúcar" se refiere en general a compuestos o materiales que son fácilmente solubles en una solución y que no se espesan o polimerizan por contacto con agua. Estos agentes son agregados para asegurar o incrementar la estabilidad del material bioactivo durante el proceso de

secado y posteriormente, o para la estabilidad en almacenamiento a largo plazo del producto pulverizado seco. Los agentes formadores de cristales útiles pueden ser monoméricos, oligoméricos y poliméricos.

5 De acuerdo con una de las realizaciones preferidas, los agentes formadores de cristales son un sacárido. Un sacárido, o carbohidrato, se define como un compuesto predominantemente compuesto de carbono, hidrógeno y oxígeno. Sacáridos útiles incluyen azúcares reductores y no reductores y alcohol azúcares, oligosacáridos, polisacáridos solubles en agua y derivados de los mismos. Los sacáridos preferidos de acuerdo con la invención incluyen glucosa, fructosa, lactosa, sacarosa, trehalosa, maltosa, celobiosa, galactosa, maltotriosa, rafinosa, dextrina, dextrano, inulina, manitol, sorbitol, xilitol. Sacáridos particularmente preferidos son glucosa y trehalosa.

10 Otros agentes formadores de cristales útiles pueden ser seleccionados de otras clases químicas, tales como aminoácidos solubles en agua, péptidos o proteínas y proteína hidrolizada. Por ejemplo, lisina, glicina, alanina, arginina o histidina, así como aminoácidos hidrófobos (triptófano, tirosina, leucina, fenilalanina, etc.); una metilamina tal como betaína. Proteínas útiles incluyen gelatina, albúmina de huevo, clara de huevo, proteína de suero, caseinato, inmunoglobulinas, proteína de soja, proteína de guisante, proteína de algodón u otras proteínas alimenticias, lácteas o vegetales.

15 "Proteínas hidrolizadas" se refiere en general a proteínas bien sea de una fuente animal, láctea o vegetal que han sido escindidas por hidrólisis o digestión enzimática en fragmentos peptídicos más cortos y/o aminoácidos. Proteínas hidrolizadas útiles son las sometidas a un proceso de hidrólisis extensiva que reduce el peso molecular del 99% de las proteínas nativas a menos de 50,000 Dalton, preferible a menos de 10,000 Dalton.

20 Temperaturas o condiciones "ambiente" son aquellas que se dan en cualquier momento en un ambiente dado. Típicamente, la temperatura ambiente es 22-25°C, la presión atmosférica ambiente y la humedad ambiente son medidas fácilmente y variarán dependiendo de la época del año, tiempo y condiciones climáticas, altitud, etc.

25 "Purga" o "desgasificación" en el contexto de la presente invención se refiere a la liberación de un gas desde una formulación sólida o líquida en donde la presión parcial del gas es mayor que la presión aplicada. Esto no es la ebullición de una solución en forma líquida, y puede presentarse frecuentemente a presiones por encima de una presión en la que haría ebullición una solución.

30 "Ebullición" se refiere a la transición de fase rápida de líquido a gas que tiene lugar cuando la temperatura de un líquido está por encima de su temperatura de ebullición. La temperatura de ebullición es la temperatura a la cual la presión de vapor de un líquido es igual a la presión aplicada. La ebullición puede ser particularmente vigorosa cuando se agrega calor a un líquido que ya está en su punto de ebullición.

35 "Actividad de agua" o "Aw" en el contexto de las composiciones de formulación secas, se refiere a la disponibilidad de agua y representa el estado de energía del agua en un sistema. Se define como la presión de vapor de agua por encima de una muestra dividida por la del agua pura a la misma temperatura. El agua destilada pura tiene una actividad de agua de exactamente uno o  $A_w = 1.0$ .

40 "Humedad Relativa" o "RH" en el contexto de la estabilidad al almacenamiento se refiere a la cantidad de vapor de agua en el aire a una temperatura dada. La humedad relativa es usualmente menor que la requerida para saturar el aire y se expresa en porcentaje de saturación de humedad.

45 "Seco" y variaciones del mismo se refieren a un estado físico que es liofilizado, deshidratado o anhidro, esto es, sustancialmente carente de líquido. El secado incluye, por ejemplo, secado por aspersion, secado en lecho fluidizado, liofilización y secado al vacío.

50 "Liofilizar" o "liofilización" se refiere a la preparación de una composición en forma seca por congelación y deshidratación rápida en el estado congelado (denominado algunas veces sublimación). Este proceso puede tener lugar bajo vacío a una presión suficiente para mantener el producto congelado, preferiblemente inferior a aproximadamente <2000 mTORR.

55 "Secado primario" o "secado en líquido", con respecto a los procesos descritos aquí, se refiere al secado por deshidratación que tiene lugar desde el momento de la descongelación de las partículas congeladas hasta el punto en donde comienza el secado secundario. Típicamente, el volumen de secado primario tiene lugar por evaporación extensiva, mientras que la temperatura del producto permanece significativamente inferior a las temperaturas de la fuente de calor. Este proceso puede tener lugar bajo vacío a una presión suficiente para mantener el producto congelado, preferiblemente por encima de aproximadamente 2000 mTORR.

60 "Secado secundario" con respecto a los procesos descritos aquí, se refiere a una etapa de secado que tiene lugar a temperaturas por encima de las temperaturas de congelación de la formulación y cerca a la temperatura de la fuente de calor. Este proceso puede tener lugar bajo vacío a una presión suficiente para reducir la actividad de agua de una formulación, preferiblemente menos de aproximadamente <1000 mTORR. En un proceso de secado de formulación típico, una segunda etapa de secado reduce la actividad de agua de la formulación hasta un  $A_w$  de 0.3 o menos.

5 "Formación de espuma" se refiere a un procedimiento para secar agentes biológicos sensibles haciendo ebullición bajo vacío bajo condiciones en las que los agentes biológicos retienen la actividad o viabilidad durante períodos extendidos de tiempo a temperaturas ambiente y superiores. El procedimiento específico para la formación de una estructura porosa mecánicamente estable procede en dos etapas: (1) Secado en Espuma Primario y ebullición bajo vacío (2) Secado/Vitrificación en estabilidad, y están divulgados en la Patente de Estados Unidos Número 5, 766, 520 de Bronshtein.

10 Una formulación o composición "estable" es aquella en la cual el material biológicamente activo en la misma retiene esencialmente su estabilidad física, estabilidad química y/o estabilidad biológica por almacenamiento. La estabilidad puede medirse a condiciones de temperatura y humedad seleccionadas durante un período de tiempo seleccionado. Puede utilizarse el análisis de tendencia para estimar una vida útil esperada antes de que el material sea puesto en almacenamiento realmente durante ese período de tiempo. Para bacterias vivas, por ejemplo, la estabilidad se define como el tiempo que tarda en perderse 1 log de CFU/g de formulación seca bajo condiciones predefinidas de temperatura, humedad y período de tiempo.

20 "Viabilidad" con respecto a bacterias se refiere a la capacidad para formar una colonia (CFU o Unidad Formadora de Colonias) sobre un medio nutritivo apropiado para el crecimiento de las bacterias. La viabilidad, con respecto a virus, se refiere a la capacidad de infectar y reproducirse en una célula huésped adecuada, dando como resultado la formación de una placa sobre un tapiz de células huésped.

25 Las composiciones y métodos de la presente invención resuelven el problema de proveer procesos de secado efectivos en costes e industrialmente escalables para formulaciones que contienen materiales bioactivos sensibles, tales como péptidos, proteínas, enzimas, hormonas, vitaminas, carotenoides, minerales, fármacos, antibióticos, microbicidas, fungicidas, herbicidas, insecticidas, espermicidas, ácidos nucleicos, anticuerpos, vacunas, bacterias, suspensiones de virus y/o células, con un tiempo de vida significativamente extendido en estado seco.

30 La invención provee una composición que comprende un material bioactivo y una matriz y agentes formadores de cristales en una mezcla en solución y un método de secado que comprende congelación instantánea de dicha composición en nitrógeno líquido para formar una estructura sólida amorfa en la forma de gotitas, hebras, perlas o microperlas y purgar las partículas congeladas bajo alto vacío seguido por la estabilización del material bioactivo en una formación de cristal de azúcar liofilizando o evaporando la humedad bajo un régimen de presión reducida a la vez que se suministra calor a la composición.

35 La mayor parte de la pérdida de viabilidad de los microorganismos durante los procesos de secado puede atribuirse a una combinación de formación de cristales de hielo, altas tensiones osmóticas y oxidativas, fuerzas de cizallamiento y liberación de energía durante las cavitaciones de burbujas asociadas con la "ebullición" y espumación de la solución bajo baja presión y alta temperatura de secado. La presente invención evita tales efectos negativos y provee composiciones y métodos de secado con una mínima pérdida lo que da como resultado un material bioactivo protegido en una matriz de cristales de azúcar bajo condiciones agresivas de almacenamiento y manipulación después del mismo.

#### Composiciones de la invención

45 La presente invención incluye composiciones de un material bioactivo, un agente formador de matriz y agentes formadores de cristales en una solución viscosa. Se encontró que las formulaciones de la invención son inherentemente diferentes en su estructura física y función de las formulaciones no viscosas o concentradas que fueron secadas con o sin congelación instantánea y purga. Por ejemplo, las formulaciones de la técnica anterior fueron inicialmente "espumadas" llevando a ebullición para facilitar el secado efectivo. La etapa de espumado dio como resultado en general una ebullición y erupción extensiva de la solución lo que tiene una consecuencia inevitable del secado en un estado líquido y como resultado, sólo puede alcanzarse una capacidad de carga muy baja de un material en un vial o un recipiente (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 6,534,087, en la que el espesor del producto espumado final es menor de 2 mm).

55 Las composiciones y métodos de secado de la presente invención evitan la ebullición y la espumación extensiva de la formulación permitiendo por lo tanto una carga mucho mayor de material por área de secado y, como resultado, puede ser escalado fácilmente a la producción de cantidades grandes de material sin el uso de recipientes, bandejas o equipos específicamente diseñados.

60 Las bacterias probióticas han demostrado beneficiarse particularmente de las formulaciones y métodos de secado de la presente invención. La formulación se prepara de acuerdo con las composiciones y métodos de la invención incluyendo la mezcla de cultivos frescos, congelados o secos de bacterias probióticas con al menos un agente formador de matriz y al menos dos agentes formadores de cristales, congelación instantánea de la formulación viscosa en nitrógeno líquido para formar una estructura amorfa de gotitas, hebras o perlas sólidas congeladas. Para el secado primario, se aplica suficiente presión de vapor para purgar y estabilizar la estructura de las partículas congeladas y luego las partículas congeladas son liofilizadas o evaporadas bajo presión de vacío reducida y

temperatura incrementada por encima de la temperatura de congelación de la formulación. El mantenimiento de la temperatura de la formulación por encima del punto de congelación puede lograrse por conducción de calor desde la formulación, y/o por pérdida de calor latente debido a la evaporación del agua. Para completar el proceso de secado y reducir adicionalmente la actividad de agua de la formulación, puede aplicarse una etapa de secado secundaria, a una presión de vapor superior de 1000 mTORR e inferior y a una temperatura elevada de hasta 70°C, para proveer una composición final con actividad de agua con un Aw de 0.3 o inferior. Tal composición puede permanecer estable en condiciones de almacenamiento de 40°C y 33% de HR durante 30 días o más, como se muestra en la Figura 8.

Preparación de las Composiciones

Los materiales que se van a mezclar en una solución con los agentes bioactivos preferidos para la preparación de composiciones en polvo seco o de la invención, incluyen al menos un agente formador de matriz y al menos dos agentes formadores de cristales. Tales materiales, cuando se mezclan con el material bioactivo preferido, forman perlas, microperlas, hebras o gotitas en nitrógeno líquido y pueden ser liofilizados o deshidratados eficientemente en un estado vítreo amorfo de acuerdo con métodos de la invención y para proveer grandes cantidades de composición seca estable para almacenamiento y administración de dicho material bioactivo (véanse las Figuras 1A y B para observaciones visuales y microscópicas, y actividad del agua (Aw) de diferentes formulaciones después del secado). El agente formador de matriz provee estabilidad estructural a la formulación, perfil de secado mejorado y/o beneficios físicos y químicos protectores para los materiales bioactivos. El agente formador de matriz también provee viscosidad por espesamiento para la formulación y mejor control sobre las propiedades de formulación bajo presión al vacío y resistencia estructural incrementada a las composiciones de la formulación seca de la invención (véase Figura 1B, imágenes 4, 4b, 4c para la estructura vítrea y sequedad de la formulación particular). El agente formador de matriz incluye una mezcla de polisacáridos y oligosacáridos. Los polisacáridos preferidos, particularmente para organismos vivos, son gomas solubles en agua, debido a su característica distintiva para formar gel viscoso a temperaturas moderadas. También se encontró que las gomas a cierta concentración estabilizan efectivamente la formulación y facilitan la formación de una estructura vítrea amorfa y potencian el perfil de secado bajo vacío (véase Figura 1A – imágenes 3a, 3b, 3c, 4 y Figura 1B - 4c y Figura 6).

De manera notable y al observar las imágenes de la Figura 1A en combinación con los resultados presentados a continuación en la Tabla 1, es evidente que las muestras 3b, 3c, 4, 5 y 6 fueron todas secadas suficientemente para proveer alguna porosidad en las estructuras vítreas amorfas.

Tabla 1

	Inspección visual de las diversas composiciones secas							
	1	2	3a	3b	3c	4	5	6
Sequedad	Sin Secar	Sin Secar	Sin Secar	Seco	Seco	Seco	Seco	Seco
Porosidad	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Presente	Presente	Presente	Ninguno	Parcial
Aw	0.847	0.923	0.916	0.216	0.183	0.376	0.171	0.112
Estructura de Cristal	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Parcial	Parcial	Presente	Parcial	Parcial

Los agentes formadores de cristales de la invención pueden incluir diversos azúcares, azúcares no reductores, alcoholes de azúcar, aminoácidos, proteínas, proteínas hidrolizadas y péptidos. El compuesto formador de cristal es preferiblemente uno que no cristalice y/o desestabilice el material biológicamente activo en la formulación a temperaturas de congelación (por ejemplo, inferior a -20°C). Por ejemplo, el material bioactivo puede ser integrado físicamente en estructuras cristalinas de azúcar amorfo tales como sacarosa o trehalosa para promover la retención de la estructura molecular a través de el proceso de secado e impartir rigidez estructural a la matriz amorfa en el estado seco. El agente formador de cristales reemplaza la pérdida de agua de hidratación durante el secado, para evitar daño a las membranas celulares y desnaturalización de enzimas (véase la revisión de Crowe et al., 1998). Otras funciones del agente formador de cristal pueden incluir proteger el material bioactivo de la exposición a luz, oxígeno, agentes oxidantes y humedad nocivos. La mayoría de los agentes formadores de cristales pueden ser disueltos fácilmente en una solución en cantidades que varían desde aproximadamente 0.1 por ciento en peso hasta aproximadamente 80 por ciento en peso. Es beneficioso incluir dos o más diferentes agentes formadores de cristal para inhibir la formación de cristales y potenciar la estabilidad del material bioactivo secado en condiciones de almacenamiento durante períodos extendidos de tiempo (véase el efecto de la proteína de azúcares y proteínas en la Figura 1A - imágenes 4, 5 y 6).

Las formulaciones presecadas incluyen una cantidad sustancial de sólidos totales (constituyentes menos el solvente, tal como agua). Una porción principal de los sólidos totales consiste de el material bioactivo, los agentes formadores de matriz y los agentes formadores de cristales. Por ejemplo, el material bioactivo está presente en la formulación en

una concentración que varía de aproximadamente 5-60 por ciento en peso, el agente formador de matriz de 1-20 por ciento en peso, y el agente formador de vidrio de aproximadamente 5-80 por ciento en peso. En otro ejemplo, el agente formador de matriz puede estar presente en la formulación en una concentración que varía desde aproximadamente 0.5 -10 por ciento en peso, y el agente formador de cristal desde 10- 50 por ciento en peso.

5 Preferiblemente, la formulación húmeda debería tener un contenido de sólidos entre 5% y 80%; más preferiblemente entre 30% y 60%. La viscosidad de las formulaciones de la invención es típicamente mayor que 1000 centipoises (cP). Más preferiblemente, la viscosidad mayor de 5,000 cP; y lo más preferiblemente mayor de 10,000 cP. La densidad de las formulaciones de la invención está preferiblemente entre 0.9 y 1.2 g/ml.

#### 10 Métodos para preparar formulaciones secas estables

Los métodos para preparar formulaciones secas estables que contienen materiales bioactivos incluyen: (1) preparación de una formulación mezclando el material bioactivo con una matriz y agentes de formación de cristales en una solución, (2) congelación instantánea de la formulación para formar partículas congeladas sólidas, (3) 15 someter la partícula congelada a presión a alto vacío durante un tiempo corto para purgar las partículas y estabilizar su estructura, (4) eliminación del agua por liofilización y/o evaporación de la humedad bajo presión reducida a la vez que se suministra calor a la formulación a una temperatura por encima de la temperatura de congelación de la formulación, preferiblemente mayor de -10°C, (5) reducción adicional de la actividad de agua de la formulación a menos de 0.3 Aw bajo vacío completo y temperatura elevada.

20 En una realización, por ejemplo, las formulaciones de la invención incluyen un material bioactivo formulado en una solución o suspensión que contiene una matriz y agentes formadores de cristales. El agente formador de matriz y/o una alta concentración de agentes formadores de cristales son disueltos y sanitizados en solución acuosa caliente con agitación antes de enfriar y mezclar con el material bioactivo. El material bioactivo, tal como virus o bacterias 25 cultivados, se concentra y separa del medio de cultivo por centrifugación o filtración antes de la resuspensión en la formulación.

En una realización de la presente invención, la totalidad del agua en la formulación es provista en el líquido del organismo vivo concentrado y la suspensión de organismo vivo se mantiene a una temperatura ligeramente por encima de la temperatura ambiente. Los componentes secos son mezclados entre sí y luego agregados lentamente a la suspensión tibia (25°C a 40°C) del organismo vivo. La suspensión de la formulación es agitada suavemente en un mezclador planetario hasta que todos los componentes sean dispersados completamente y se obtenga una 30 suspensión uniforme.

35 La solución viscosa es entonces congelada instantáneamente por atomización, goteo o extrusión en un baño de nitrógeno líquido para formar pequeñas gotitas, perlas o hebras sólidas. Las partículas de sólido congelado pueden ser almacenadas en un congelador profundo entre -30°C y -80°C hasta secado o colocadas inmediatamente sobre bandejas y liofilizadas o secadas de acuerdo con los métodos de la invención. Las partículas congeladas sólidas son purgadas en un tiempo corto típicamente entre 1 y 20 minutos, bajo vacío suficiente (por ejemplo, por debajo de <math>2000\text{ mTORR}</math>). Las partículas permanecen en una forma congelada sólida a una temperatura por debajo de -20°C 40 durante la etapa de purga. Después de la etapa de purga inicial la presión de vacío es incrementada hasta entre 2000 y 10,000 mTORR y puede proveerse calor permitiendo que la temperatura de la formulación se incremente rápidamente a entre -5°C y +5°C y las partículas comienzan a descongelarse. Una vez que la temperatura de la formulación alcanza la temperatura deseada, se ajusta el calor para mantener esa temperatura y avanza la primera 45 etapa de secado. En esta etapa, la formulación ya está descongelada y tiene lugar la evaporación acelerada de agua sin ebullición o espumado.

Los métodos típicos en la técnica anterior involucran espumado y/o esparcimiento extenso y ebullición violenta lo que puede ser nocivo para los materiales biológicos sensibles y producir dificultades para escalamiento industrial a una capacidad de carga elevada (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 6,534,087, en donde la presión de vacío aplicada da como resultado una ebullición violenta y espumación), mientras que las composiciones y métodos presentes evitan cualquier ebullición o espumación excesiva de la formulación a la vez que se alcanza una rata de secado significativamente más rápida y permite una alta capacidad de carga de la formulación. Adicionalmente, una desgasificación completa y eficiente de las suspensiones líquidas viscosas es difícil y puede 50 requerir un periodo de tiempo extendido. Estos obstáculos fueron todos resueltos en la presente invención utilizando una composición adecuada que permite un secado de líquido primario efectivo que forma una formación vítrea amorfa sin ninguna ebullición y espumación excesiva. Sorprendentemente y de forma importante esto fue logrado principalmente por congelación instantánea de una composición adecuada y a través de la introducción de una etapa de purga corta antes del inicio de la etapa de secado de líquido primaria. La carga de partículas congeladas 60 sólidas sobre una bandeja en oposición a un jarabe en suspensión o viscoso permiten una capacidad de carga mucho más alta por área de secado sobre las bandejas que la obtenida de acuerdo con la técnica anterior. Después de que se termina la etapa de secado en líquido primaria, la formulación vítrea amorfa estabilizada es mantenida a temperaturas de secado secundarias elevadas (entre 20°C y 70°C) y presiones de vacío de menos de 1000 mTORR para reducir adicionalmente la actividad de agua de la formulación en un tiempo muy corto.

65

Otra realización de la invención provee métodos para preparar composiciones en formulación de hidrogel para conservación de materiales bioactivos. Por ejemplo, una formulación que contiene un material bioactivo y una matriz y agentes formadores de cristales se mezclan en una solución y se entrecruzan para formar partículas de hidrogel firmes atomizando o extruyendo en un baño que contiene iones metálicos divalentes o agregando iones metálicos divalentes directamente en la suspensión y deshaciendo las láminas de hidrogel endurecidas en pequeñas hebras o piezas. Las partículas en hidrogel son secadas entonces de acuerdo con los métodos de secado de la invención como se describió más arriba.

En una realización particular de la invención, por ejemplo, la formulación incluye bacterias probióticas vivas en una solución de 1-4% de alginato de sodio y 10-40% de trehalosa. Se agregan proteínas y particularmente proteínas hidrolizadas, tales como caseína, suero, guisante, soja o semilla de algodón a la formulación a 5-10% para potenciar el proceso de secado y la formación de una estructura estable vítrea amorfa de la formulación (véase Figura 1A, imágenes 4, 5 y 6). El cultivo probiótico puede ser fresco, congelado o ya secado en la forma de polvo seco (véase la Figura 2 para los recuentos de CFU de diferentes formas de cultivo de las bacterias probióticas en la formulación seca). La solución es mezclada a una temperatura ligeramente superior a la temperatura ambiente (típicamente entre 25°C -37°C) hasta que todos los componentes sean completamente disueltos. La suspensión de la formulación es atomizada, extrudida o pasada por nitrógeno líquido para formar pequeñas gotitas o perlas que luego son retiradas del nitrógeno líquido, empacadas en bolsas y pueden ser almacenadas en un congelador profundo a -80°C hasta el secado.

Un método de secado típico de bacterias probióticas vivas incluye: esparcir las perlas congeladas sólidas sobre bandejas en una capa uniforme a una capacidad de carga entre 100-1000 g/pie cuadrado y las bandejas son colocadas inmediatamente en un liofilizador. Se aplica presión de vacío entonces a aproximadamente 1000 mTORR y dependiendo del tamaño del liofilizador y del tipo de fuente de calor, la temperatura del estante se ajusta a +20°C o a una temperatura suficiente para mantener las partículas a aproximadamente a -20°C. Las perlas congeladas sólidas se dejan purgar durante aproximadamente 5-30 minutos y el vacío se ajusta a entre 2000 y 10,000 mTORR y la transferencia de calor se incrementa para elevar la temperatura de la formulación a entre -5°C y +5°C. Estas condiciones de temperatura y presión de vacío se mantienen durante la etapa primaria de secado en líquido la cual puede durar desde unas pocas horas y hasta 24 horas dependiendo de la carga de la bandeja, preferiblemente desde aproximadamente 3 hasta 10 horas. En algún punto durante el proceso de secado primario, la rata de evaporación del solvente se hace más lenta y la temperatura de la formulación comienza a incrementarse debido al suministro superfluo de calor en la cámara de secado. Este punto indica el final de la etapa de secado primaria. A medida que el solvente es extraído de la formulación, los agentes formadores de cristales en la solución se concentran y se hacen más espesos hasta que se detiene el flujo como líquido y forma una estructura amorfa y/o vítrea estable.

Se sigue entonces una etapa de secado secundaria a vacío completo y temperatura de la formulación entre 30°C y 50°C. El propósito de la etapa de secado secundaria es eliminar la humedad atrapada o unida y proveer una composición que sea estable en almacenamiento durante un periodo de tiempo extendido a temperaturas ambientes. La etapa de secado secundaria puede durar varias horas y su punto final se alcanza cuando la formulación está completamente seca y su actividad de agua es inferior a 0.3 Aw.

Los métodos de secado de la invención dan como resultado un material biológicamente activo que está incorporado dentro de una matriz vítrea amorfa, evitando por lo tanto el desplegamiento de proteínas y haciendo significativamente más lentas las interacciones moleculares o la reactividad cruzada, debido a una movilidad sustancialmente reducida del compuesto y otras moléculas dentro de la composición vítrea amorfa. En tanto el sólido amorfo está a una temperatura por debajo de su temperatura de transición vítrea y la humedad residual permanezca relativamente baja (esto es, por debajo de Aw de 0.3), el material bioactivo permanece relativamente estable (véase Figura 8). Debería anotarse que alcanzar un estado vítreo no es un prerrequisito para una estabilidad a largo plazo puesto que algunos de los ingredientes bioactivos pueden comportarse mejor en un estado más cristalino.

#### Preparación de polvo seco

La formulación seca puede ser utilizada en bloque, cortada en formas y tamaños deseados, o triturada y molida en un polvo de flujo libre que provea un procesamiento corriente abajo como aglomeración en húmedo o seco, granulación, formación de tabletas, compactación, formación de pella o mezclada en productos alimenticios o piensos o cualquier otra clase de proceso de suministros. Los procesos para triturar, moler, romper o pulverizar son bien conocidos en el arte. Por ejemplo, un molino de martillos, un molino de aire, un molino de impacto, un molino de chorro, un molino de pasador, un molino Wiley o un dispositivo de molienda similar pueden ser utilizados. El tamaño de partícula preferido de las partículas molidas es menor de aproximadamente 1000 µm y preferiblemente menor de 500 µm.

Las composiciones y métodos descritos aquí conservan la actividad biológica del material biológico activo incorporado. Por ejemplo, las composiciones son probadas en cuanto a su estabilidad sometiénolas a temperatura elevada (por ejemplo, 40°C) y alta humedad (por ejemplo 33% de RH) y midiendo la actividad biológica de las formulaciones. Como un ejemplo para bacterias probióticas vivas, los resultados de estos estudios demuestran que

las bacterias formuladas en estas formulaciones son estables durante al menos 20 días (véase Figura 8). La estabilidad está definida como el tiempo para una pérdida de potencia de 1 log CFU/g. Tales formulaciones son estables incluso cuando se utilizan altas concentraciones del material biológicamente activo. Así, estas formulaciones son ventajosas en cuanto pueden ser enviadas y almacenadas a temperaturas en o por encima de la temperatura ambiente durante largos períodos de tiempo.

Ejemplos

Ejemplo 1

Preparación de una sustancia probiótica seca y estable

Formulación Básica

75 g de trehalosa (Cargill Minneapolis, MN) y 22 g de caseína extensamente hidrolizada (Marcor, Carlstadt, NJ) fueron mezclados uniformemente con 3 g de alginato de sodio (ISP Corp., Wayne, NJ) en forma seca. Un concentrado fresco de *Lactobacillus acidophilus* (100 ml que contenía al menos 10% de sólidos, directo de la recolección de la fermentación) fue agregado en un mezclador y se mantuvo a 35°C. La mezcla seca de la goma, el azúcar y la proteína hidrolizada fue agregada lentamente al cultivo probiótico y la mezcla se llevó a cabo a 35°C durante 10 minutos. La suspensión viscosa fue transferida entonces a un recipiente que tenía un fondo perforado y se dejó gotear sobre un baño que contenía nitrógeno. Las perlas fueron retiradas entonces del nitrógeno líquido e inmediatamente transferidas al secado.

Secado de las perlas congeladas de la formulación básica

Las perlas congeladas fueron esparcidas homogéneamente sobre una bandeja a una capacidad de carga de 100 g/pie cuadrado e inmediatamente colocadas sobre un estante en un liofilizador (Modelo 25 SRC, Virtis, Gardiner, NY). Se aplicó entonces presión de vacío a 1000 mTORR y las perlas congeladas sólidas fueron dejadas en purga durante 10 minutos. El vacío se ajustó entonces a 2700 mTORR y la temperatura de los estantes se elevó a +30°C. Esta temperatura y presión de vacío fueron mantenidas durante 3 horas. Se siguió entonces una etapa de secado secundaria a vacío completo (150-200 mTORR) y la temperatura del estante se elevó a 30°C durante 2 horas adicionales. La formulación fue secada completamente y su actividad de agua fue medida mediante un instrumento Hygropalm Aw1 (Rotonic Instrument Corp., Huntington, NY) a Aw = 0.23.

Ejemplo 2

Composición seca estable que contiene bacterias probióticas de *Lactobacillus rhamnosus* LGG.

Se descongeló *Lactobacillus rhamnosus* LGG (500 g de concentrado congelado de una fuente comercial) a 37°C en un mezclador planetario de doble camisa (DPM, 1qt, Ross Engineering, Inc., Savannah, GA). Se mezclaron homogéneamente dos agentes formadores de cristales: Trehalosa (387 g, Cargill Minneapolis, MN) y caseína extensamente hidrolizada (83 g, Marcor, Carlstadt, NJ) en forma seca con dos agentes formadores de matriz; alginato de sodio (15 g, ISP Corp., Wayne, NJ) e inulina instantánea (25 g, Cargill Minneapolis, MN). La mezcla seca fue agregada lentamente a las bacterias probióticas descongeladas y la mezcla se llevó a cabo a 40 RPM y 37°C durante 10 minutos. La viscosidad de la suspensión fue ajustada a 12,000 Cp mediante la adición de 50-200 ml de agua. La suspensión fue transferida entonces a un recipiente que tenía un fondo perforado y se dejó gotear sobre un recipiente que contenía nitrógeno líquido. Las perlas fueron retiradas entonces del nitrógeno líquido, colocadas en una bolsa laminada de aluminio sellada y almacenados en un congelador profundo a -80°C durante varias semanas.

Para el secado, las perlas congeladas fueron esparcidas homogéneamente sobre bandejas en una capacidad de carga que variaba desde 100 hasta 500 g/pie cuadrado y las bandejas fueron colocadas en estanterías en un liofilizador (Modelo 25 SRC, Virtis, Gardiner, NY). La presión de vacío fue aplicada a 1000 mTorr y la temperatura de los estantes ajustada a +20°C. Las perlas congeladas sólidas se dejaron en purga durante un período de tiempo que variaba de 1 a 30 minutos. La etapa de purga fue seguida por una etapa de secado primaria después de ajustar la presión de vacío a 2700 mTORR y la temperatura del estante elevada a +30°C. Esta temperatura y la presión de vacío fueron mantenidas durante 12 horas. Se siguió entonces una etapa de secado secundaria a vacío completo (150-200 mTORR) y la temperatura del estante se mantuvo a 30°C durante 4 horas adicionales. La formulación fue secada completamente y su actividad de agua se midió a 0.23 Aw. La Figura 6 muestra el perfil de secado de la formulación probiótica.

Las pérdidas de viabilidad después de la congelación de la suspensión a diferentes temperaturas (+ 4°C, -80°C y -180°C) y después del proceso de secado incluyendo la preparación de las perlas congeladas, y el secado en un liofilizador, se presentan en la Figura 3, 4 y 7. Las pérdidas de viabilidad para el proceso completo fueron en general inferiores a <1 log dependiendo del tipo de cultivo bacteriano (cultivos congelados o secos) y de la temperatura de la suspensión viscosa. Los resultados muestran que la congelación instantánea de las bacterias probióticas en nitrógeno líquido (-180°C) fue un proceso menos nocivo que el congelamiento a -80°C.

Las Figuras 5 y 8 muestran el efecto de diversos períodos de tiempo de purga que variaba de 0 min (sin purga) a 30 min sobre recuentos iniciales de las bacterias probióticas en la composición seca y una estabilidad de almacenamiento bajo condiciones de almacenamiento aceleradas de 40°C y 33% de RH. Los resultados sugieren que un tiempo de purga más largo mejora en general el recuento inicial de bacterias en la formulación seca pero no tiene efectos sobre la estabilidad del almacenamiento de la formulación probiótica.

#### Ejemplo 3

Trehalosa (752 g, Cargill Minneapolis, MN), proteína de guisante extensamente hidrolizada (167 g, Marcor, Carlstadt, NJ), alginato de sodio (30 g, ISP Corp., Wayne, NJ) e inulina instantánea (50 g, Cargill Minneapolis, MN) fueron mezclados homogéneamente en forma seca. La mezcla seca fue agregada lentamente a 1000 ml de agua desionizada caliente a 80°C en un mezclador planetario de doble camisa (DPM, 1qt, Ross Engineering, Inc., Savannah, GA) y la mezcla se llevó a cabo a 40 RPM durante 10 minutos. La temperatura de mezcla fue reducida a 37°C y se agregaron lentamente 100 g de polvo seco de *Lactobacillus rhamnosus* LGG obtenido de una fuente comercial y la mezcla continuó durante 20 minutos. La suspensión fue extrudida entonces a través de una aguja con orificio de 2 mm hacia un baño que contenía nitrógeno líquido. Las hebras/perlas fueron retiradas entonces del nitrógeno líquido y colocadas en bolsas de aluminio laminadas selladas y almacenadas en un congelador profundo a -80°C durante varias semanas. Para el secado, las hebras/perlas congeladas fueron esparcidas homogéneamente sobre bandejas a una capacidad de carga que variaba de 100 a 500 g/pie cuadrado y las bandejas fueron colocadas en estantes en un liofilizador (Modelo 25 SRC, Virtis, Gardiner, NY) y secadas como se describe en el Ejemplo 2. Todas las formulaciones fueron retenidas contenidas dentro de la bandeja y no se observó esparcimiento ni espumación en todos los niveles de carga. La formulación fue secada completamente incluso a la capacidad de carga más alta y la actividad de agua medida a 0.26 Aw y menos para todas las muestras.

#### Ejemplo 4

Preparación de una formulación de hidrogel que contiene bacterias probióticas *Bifidobacterium lactis* (Bb12):

Se prepara una suspensión probiótica concentrada de *Bifidobacterium lactis* (Bb12) de acuerdo con el Ejemplo 1. A la formulación básica, se agregan 0.5 g de fosfato de calcio dibásico, seguido por 0.5 g de gluconolactona. La suspensión fue dejada endurecer a temperatura ambiente durante las 2 horas siguientes para formar un hidrogel sólido. El gel firme fue seccionado en hebras delgadas y largas, utilizando un cortador/rallador comercialmente disponible. Las hebras delgadas fueron congeladas instantáneamente en nitrógeno líquido y cargadas sobre una bandeja a una capacidad de carga de 700 g/pie cuadrado y colocadas en un liofilizador para secado como se describe en el Ejemplo 2. La actividad de agua (Aw) de la formulación fue de 0.05 (Medida mediante un HygroPalm Aw1, R tonic Huntington, NY). La formulación seca fue triturada adicionalmente hasta un polvo fino utilizando un equipo de molienda de martillo y tamizada a través de mallas de 50-250 micrones.

#### Ejemplo 5

Composición libre de alérgenos que contiene bacterias probióticas *Lactobacillus acidophilus*.

Trehalosa (752 g, Cargill Minneapolis, MN), proteína de guisante extensamente hidrolizada (167 g, Marcor, Carlstadt, NJ), alginato de sodio (30 g, ISP Corp., Wayne, NJ) e inulina instantánea (50 g, Cargill Minneapolis, MN) fueron mezclados homogéneamente en forma seca. La mezcla seca fue esterilizada agregando la lentamente a 1000 ml de agua desionizada caliente a 80°C en un mezclador planetario de doble camisa (DPM, 1qt, Ross Engineering, Inc., Savannah, GA) y la mezcla se llevó a cabo a 40 RPM durante 10 minutos hasta que se formó una suspensión suave y clara. La temperatura de la mezcla se redujo a 37°C y se agregaron lentamente 1000 g de perlas congeladas que contenían *Lactobacillus acidophilus* obtenidas de una fuente comercial y la mezcla continuó durante 10 minutos. La suspensión fue extrudida entonces a través de una aguja con orificio de 2 mm en un baño que contenía nitrógeno líquido. Las hebras/perlas fueron entonces retiradas del nitrógeno líquido, colocadas en bolsas de aluminio laminado selladas y almacenadas en un congelador profundo a -80°C durante varias semanas. Para el secado, las hebras/perlas congeladas fueron esparcidas homogéneamente sobre bandejas a una capacidad de carga de 1000 g/pie cuadrado y las bandejas fueron colocadas en estantes en un liofilizador (Modelo 25 SRC, Virtis, Gardiner, NY) y secadas como se describe en el Ejemplo 2. El recuento inicial de CFU de las bacterias probióticas en la composición seca fue de 10.53 logs/g, y la pérdida de viabilidad después de 42 días de almacenamiento bajo condiciones de almacenamiento acelerado de 40°C y 33% de RH fue de 0.69 log CFU/g.

#### Ejemplo 6

Una fórmula infantil que contiene la formulación seca de la presente invención:

Una formulación seca estable que contenía *Lactobacillus* GG (Valio Corp., Finlandia) fue preparada de acuerdo con el Ejemplo 2 seguido por tamizaje en dos grupos de tamaño de partícula (por encima de 50 µm y por debajo de 150 µm). Se preparó una fórmula infantil mezclando 99.9 g de Nutramigen (Mead Johnson, Evansville, IL) con 0.1 g de

las partículas de formulación seca en el rango de tamaño entre 50 µm y 150 µm). El producto final contiene aproximadamente 10<sup>8</sup> cfu de *Lactobacillus* GG por 100 g de fórmula infantil.

#### Ejemplo 7

5

Un suplemento probiótico que contiene la formulación seca estable de la presente invención:

Una composición seca estable que contiene *Lactobacillus acidophilus* es formulada en formas de dosificación oral, tales como tabletas, capsuletas o cápsulas. Se preparan tabletas con sabor naranja que contenían 99.9 g de un agente de compresión (dextrosa) y 0.1 g de las partículas de formulación seca en el rango de tamaño entre 50 µm y 150 µm por compresión directa sobre una máquina rotatoria utilizando una herramienta cóncava estándar redonda de 1/2". El producto final contiene aproximadamente 10<sup>8</sup> cfu/dosis unitaria. La dureza de las tabletas está en el rango de 8-10 kp y los tiempos de desintegración son de aproximadamente 20 segundos. Las tabletas comprimidas son empacadas en botellas HDPE de 180 cc de 100 tabletas cada una y expuestas a temperatura/humedad controlada de 40°C/33% RH. El producto es sometido a pruebas de estabilidad microbiológica mensualmente durante un periodo de 12 meses o hasta que se observa una reducción en el recuento de ensayo por debajo de 1 x 10<sup>6</sup>/dosis unitaria.

10

15

20

#### Ejemplo 8

Una bebida funcional que contiene la formulación seca estable de la presente invención:

Se prepara una mezcla seca que contiene (% en peso) 71% de sacarosa, 14% de maltodextrina, 10% de inulina, 2% de dextrosa, 1% de ácido cítrico anhidro, 0.3% de goma acacia, 0.3% de sabores, 0.3% de fosfato de tricalcio y 0.1% de partículas de formulación probiótica seca (*L. acidophilus*) en el rango de tamaño entre 50 µm y 250 µm. El producto final contiene aproximadamente 10<sup>9</sup> cfu/dosis unitaria (30 g de mezcla seca). El producto es empacado en pequeñas bolsas de lámina de aluminio (30 g de dosis unitaria/bolsa) para beber por agitación entre 340 ml de agua. La estabilidad de las bacterias probióticas en la mezcla seca para bebida es sometida a una prueba de estabilidad microbiológica mensual durante un período de 12 meses o hasta que se observa una reducción en el recuento de ensayo por debajo de 1 x 10<sup>7</sup>/dosis unitaria.

25

30

#### Ejemplo 9

Preparación de alimento probiótico para mascotas:

35

Un alimento para mascotas en pellas comercialmente disponible es secado en un horno de conversión hasta una actividad de agua de 0.1, y luego se recubre con la formulación seca probiótica estable preparada como se describe en el ejemplo 3. Las pellas secas son asperjadas con aproximadamente 5% de una barrera a la humedad basada en grasa (una mezcla de 40% de grasa de pollo, 40% de manteca de cacao y 20% de cera de abeja), se mezcla en un tambor de rotación con la formulación en polvo seco (usualmente 0.1-0.5% del alimento para mascotas total que provee una dosificación de 10<sup>8</sup> CFU/g) y finalmente se asperjó con un recubrimiento adicional de la barrera para humedad basada en grasa. La cantidad total de recubrimiento es aproximadamente 15% (del alimento para mascotas). El tiempo de recubrimiento es de aproximadamente 30 minutos.

40

45

#### Ejemplo 10

Preparación de alimento para peces con varios microorganismos probióticos:

Se prepara un pienso en pellas para peces de acuerdo con la presente invención con una mezcla de varios probióticos. Se prepara una formulación probiótica seca estable que contiene una mezcla de *L. rhamnosus*, *L. acidophilus* y *Bifidobacterium lactis* como se describe en el Ejemplo 1. Un pienso iniciador disponible comercialmente para salmón (Zeigler Bros., Gardners, PA) es secado primero en un horno de convección hasta una de agua de 0.1, y luego se recubre con la formulación probiótica en un tambor rotatorio. Las pellas (1000 g) son asperjadas primero con aproximadamente 5% en peso de barrera para la humedad basada en grasa (una mezcla de 40% de aceite de pescado, 40% de manteca de cacao y 20% de cera de abejas) y luego se mezcla con 1 g de la formulación probiótica seca estable (para alcanzar una dosificación de 10<sup>7</sup> cfu/g de pienso) y finalmente se asperja con un recubrimiento adicional de la barrera para la humedad basada en grasa. La cantidad total de recubrimiento es aproximadamente 10% (del pienso para peces).

50

55

60

#### Ejemplo 11

Polvo seco estable que contiene una enzima:

Se prepara una fórmula en hidrogel que contiene 40 por ciento en peso de Savinasa (Novozymes, Dinamarca) mezclando 600 g de la formulación descrita en el Ejemplo 4 y 400 g de savinasa en 1000 g de solución acuosa. La formulación en hidrogel triturada es congelada instantáneamente en nitrógeno líquido y secada en un horno al vacío

65

a una temperatura de secado de la formulación de 50°C. Para determinar la carga y la estabilidad en almacenamiento de la fórmula seca: una muestra seca es pesada con exactitud (<100 mg) en un tubo de microcentrifuga. Se agregan 200 µl de dimetilsulfóxido (DMSO). La formulación es disuelta en el regulador de DMSO por vórtex. A esta muestra, se agregan 0.8 ml de una solución que contiene naoh 0.05 n, sds al 0.5% y ácido cítrico 0.075 m (sal trisódica). Los tubos son sometidos a sonicación durante 10 minutos a 45°C, seguida por una de breve centrifugación a 5,000 rpm durante 10 minutos. Se toman alícuotas de la solución clara de dms0/naoh/sds/citrato en pozos de una microplaca y se analizan en cuanto al contenido de proteína utilizando el método de ensayo de bradford. La estabilidad en almacenamiento de la formulación estable de enzimas es significativamente superior que una enzima seca sin la formulación de la presente invención.

#### Ejemplo 12

Polvo seco estable que contiene vitamina a:

Una formulación que contenía 30 por ciento en peso de vitamina a se prepara mezclando 320 g de inulina instantánea, 320 g de maltodextrina de-1 (tate & lyle, londres, reino unido), 50 g de carboximetilcelulosa de sodio (ashland aqualon functional ingredients, wilmington, de), 10 g de ascorbato de sodio y 300 g de vitamina a cristalina (basf corp., florham park, nj) en 1000 g de agua. La formulación húmeda es secada por aspersion en un secador por aspersion mobile-minor (gea process engineering inc., columbia md), a temperaturas de entrada y salida de 180°C y 80°C, respectivamente, o congelada instantáneamente en nitrógeno líquido, luego esparcidas sobre bandejas con una capacidad de carga de 1,000 g/pie cuadrado y se secó como se describió en el ejemplo 2. La composición de vitamina a es estable (> 80%) a 40°C y 75% de rh durante 3 meses.

#### Ejemplo 13

Preparación de carotenos en una formulación protegida que tiene biodisponibilidad potenciada:

Una formulación que protege y potencia la biodisponibilidad de carotenos que de otra manera estarían sujetos a oxidación por otros ingredientes es un pienso durante el almacenamiento o después de alimentar un organismo se prepara de acuerdo con la formulación y el método de la presente invención. Una formulación que contiene 6 g de quitosano soluble en agua (Isk biopartners, inc. Salt lake city, utah) se disuelve en 200 g de agua. A esta solución se agregan 90 g de astaxantina natural (naturosetm, cyanotech corp., kailua-kona, hi) y la suspensión se atomiza o extrude en un baño que contiene 5% de tripolifosfato de sodio. Las micropartículas o hebras en hidrogel se dejan endurecer a temperatura ambiente durante 4 horas. Las partículas son retiradas del baño de entrecruzamiento, lavadas con agua y mezcladas con una mezcla seca de 90 g de sacarosa y 10 g de caseína extensamente hidrolizada. Las partículas cargadas de azúcar/proteína son congeladas instantáneamente y se colocan inmediatamente sobre bandejas a 500 g/ pie cuadrado y liofilizadas en un liofilizador hasta que la actividad de agua se reduzca a menos de 0.3. La formulación seca es molida posteriormente hasta la distribución de tamaño deseada y empacada.

#### Ejemplo 14

Preparación de un cebo para especies invasivas

Un cebo en pellas para especies invasivas específicamente buscadas se prepara de acuerdo con la presente invención. Se preparan 200 g de una formulación que contiene un pesticida como se describe en el ejemplo 1 y se agregan a 200 g de agua. A esta solución se agregan 90 g de rotenona y 0.5 g de fosfato de calcio dibásico, seguido de 0.5 g de gluconolactona. La suspensión se deja endurecer a temperatura ambiente durante 2 horas. El gel firme es seccionado en trozos delgados y largos a través de un cortador/rallador. Las hebras delgadas son cargadas sobre una bandeja y colocadas sobre un liofilizador. La temperatura del estante se fija a -30°C y la formulación se deja liofilizar antes de que se aplique vacío completo y la temperatura del estante se eleve a +60°C para secado durante la noche. La formulación seca es triturada hasta la distribución de tamaño apropiado para la especificación de tamaño del cebo para la especie específica objetivo.

#### Ejemplo 15

Preparación de un pesticida protegido en una formulación insoluble en agua:

Con la formulación y el método de la presente invención se prepara una formulación granular protegida de un pesticida que de otra manera estaría sometida a descomposición por otros ingredientes en una formulación durante el almacenamiento o después de la aplicación en el ambiente. Una formulación que contiene 6 g de pectina y 102 g de sacarosa se agrega a 200 g de agua. A esta solución se agregan 90 g de una formulación seca de un pesticida sensible y una mezcla que contiene 1.5 g de fosfato de calcio dibásico y 0.5 g de cloruro de calcio, seguido por 0.85 g de gluconolactona. La suspensión se deja endurecer a temperatura ambiente durante 4 horas, y luego se secciona en hebras delgadas, largas a través de un cortador/rallador. Las hebras delgadas son cargadas sobre bandejas y

secadas en un liofilizador hasta alcanzar una actividad de agua de 0.1. La formulación seca es molida posteriormente hasta la distribución de tamaño deseada, y empacada.

Ejemplo 16

5

Preparación de una formulación probiótica para plantas protegida:

10 Un agente de control biológico tal como *rhizobacteria* es preparado en una composición seca de acuerdo con el ejemplo 4. La efectividad de la composición de *rhizobacteria* seca es evaluada sobre lechugas cultivadas bajo condiciones gnotobióticas. Se inoculan dosis de 100 mg de la composición seca de *rhizobacteria* por planta en macetas con arena y se plantan con brotes de lechuga pregerminados (24 horas). Se aplica una dosis de nutrientes de 5 ml de solución de hoagland esterilizada a las plantas en la maceta. Las macetas son dispuestas al azar en una cámara de crecimiento mantenida a 28°C con fotoperiodo de 12 horas. Durante intervalos de cada 7 días después de la inoculación, las plantas y la arena adherida son retiradas cuidadosamente de las macetas. Las raíces son lavadas en regulador de fosfato estéril (ph 7.0) y se registra la medición de la longitud de la raíz.

15

Referencia

20

Las siguientes referencias y todas las referencias citadas aquí se incorporan aquí como referencia para todos los propósitos.

Referencias de patentes de los Estados Unidos:

25

6,190,701 Composition and method for stable injectable liquids, March 1999, Roser et al.

30

6,964,771 Method for stably incorporating substances within dry, foamed glass matrices, September 1997, Roser et al.

35

5,766,520 Preservation by formulation formation, June 1998, Bronshtein

40

6,534,087 Process for preparing a pharmaceutical composition, June 2001, Busson and Schroeder.

45

6,884,866 Bulk drying and the effects of inducing bubble nucleation, April 2005, Bronshtein.

50

7,153,472 Preservation and formulation of bioactive materials for storage and delivery in hydrophobic carriers, December, 2006, Bronshtein

55

20080229609 Preservation by Vaporization, June 2005, Bronshtein

60

6,306,345 Industrial scale barrier technology for preservation of sensitive biological materials at ambient temperatures, October 2001, Bronshtein et al.

65

7381425 Preservation of bioactive materials by freeze dried foam, September 2006, Truong-le, Vu.

70

Otras referencias:

75

Morgan, C.A., Herman, N., White, P.A., Vesey, G. 2006. Preservation of micro-organisms by drying; a review. J. Microbiol. Methods. 66(2):183-93.

80

Capela, P., Hay, T. K. C., & Shah, N. P. 2006. Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yoghurt. Food Research International, 39(3) 203-211.

85

Annear, 1962. The Preservation of Leptospire by Drying From the Liquid State, J. Gen. Microbiol., 27:341-343.

90

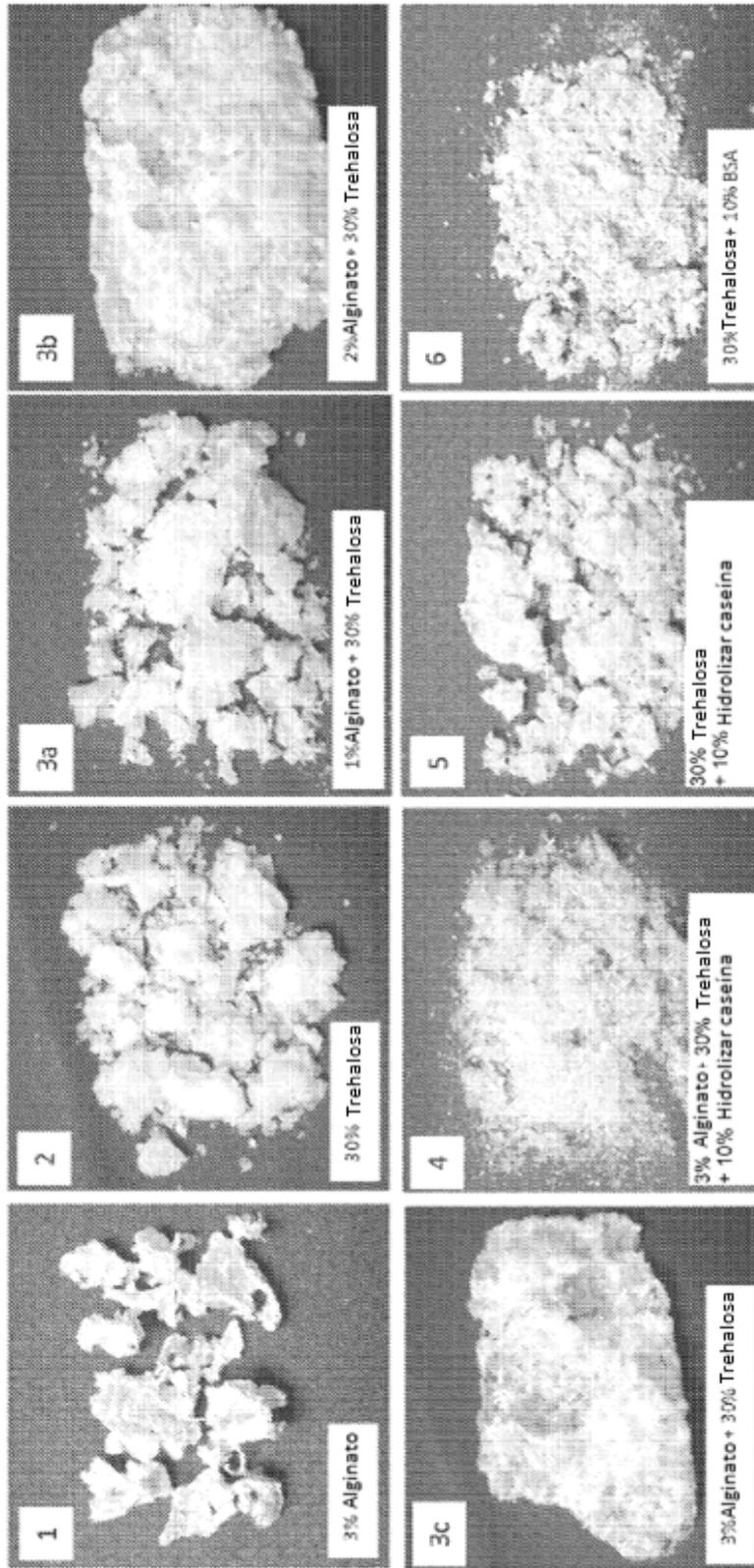
Crowe, J.F., Carpenter, J.F. and Crowe, L.M. 1998. THE ROLE OF VITRIFICATION IN ANHYDROBIOSIS. Annu. Rev. Physiol. 60:73-103.

## REIVINDICACIONES

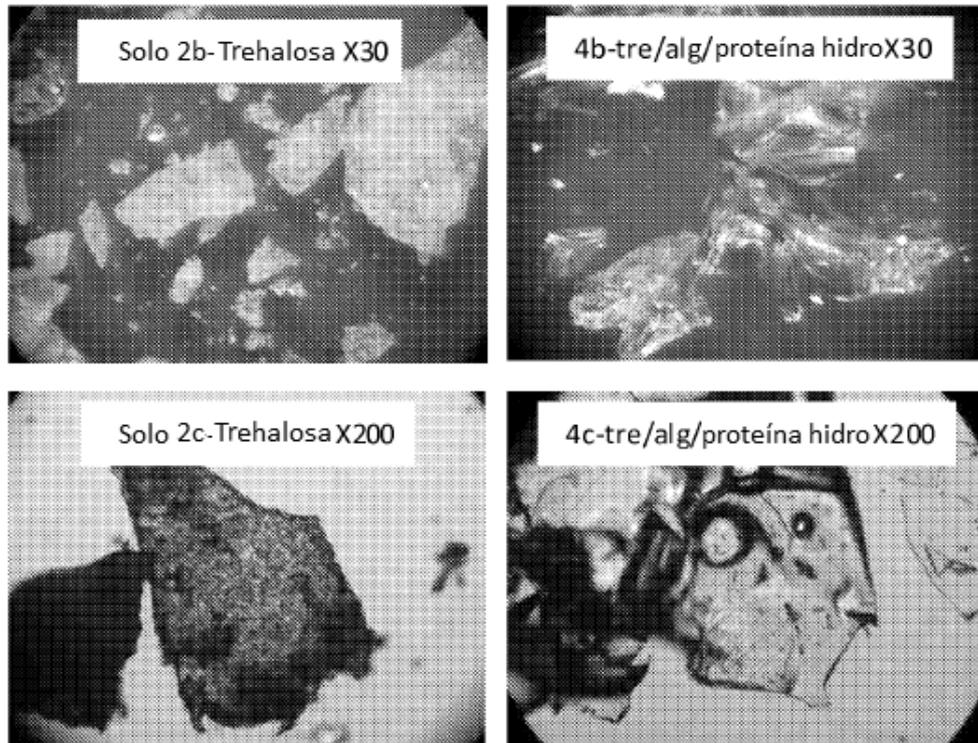
1. Un método para preparar una composición seca estable que comprende un material bioactivo, un agente formador de matriz y un agente formador de cristales, comprendiendo dicho método:
- 5 (a) combinar el material bioactivo, el agente formador de matriz y el agente formador de cristales en una solución;
- (b) congelar instantáneamente la suspensión de la etapa (a) en nitrógeno líquido para formar una composición amorfa en perlas, hebras o gotitas;
- 10 (c) secado primario de las partículas congeladas purgadas de la etapa (b) bajo vacío a una presión entre 2000 y 10000 mTORR y a una temperatura por encima del punto de congelación de las partículas; y
- 15 (d) efectuar un secado secundario de las partículas secadas primariamente de la etapa (c) bajo presión a vacío completo y a una temperatura que va de 30 a 60°C.
2. El método de la reivindicación 1 el cual incluye adicionalmente la etapa, entre las etapas (b) y (c), de purgar las partículas congeladas sólidas de la etapa (b) bajo vacío a una presión de menos de 2000 mTORR;
- 20 3. El método de la reivindicación 2, en donde la purga se lleva a cabo bajo presión de vacío de menos de 2000 mTORR por no más de 30 minutos.
4. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que la composición tiene una actividad de agua de  $A_w - 0.3$  o menos.
- 25 5. El método de la reivindicación 1 o 2, que comprende adicionalmente cortar, triturar, moler o respectivamente pulverizar la composición en un polvo de flujo libre que tiene un tamaño de partícula de menos de aproximadamente 1000  $\mu\text{m}$ .
- 30 6. El método de la reivindicación 1 o 2, que comprende adicionalmente mezclar la composición con un componente seleccionado del grupo que consiste de una fórmula infantil, bebidas funcionales y alimento para mascotas.
7. Una composición seca que comprende un material bioactivo, al menos un agente formador de matriz y al menos dos agentes formadores de cristales, en la que la formulación comprende opcionalmente sólidos totales que varían de aproximadamente 30 por ciento en peso hasta aproximadamente 70 por ciento en peso, y/o el agente formador de matriz está presente opcionalmente en la formulación en una cantidad que varía desde aproximadamente 1 por ciento en peso hasta aproximadamente 20 por ciento en peso y/o el agente formador de cristales está presente opcionalmente en la formulación en una cantidad que varía desde aproximadamente 1 por ciento en peso hasta aproximadamente 80 por ciento en peso, en la que dicha formulación es preparada de acuerdo con el método de la reivindicación 1 o 2.
- 35 40 8. La composición de la reivindicación 7, en la que la composición es una composición vítrea seca.
9. La composición de la reivindicación 7, en la que el material bioactivo comprende una célula, un microbio, un virus, un cultivo celular, una bacteria, una bacteria probiótica, una bacteria probiótica de plantas y suelo, una levadura, una proteína, una proteína recombinante, una enzima, un péptido, una hormona, una vacuna, un fármaco, un antibiótico, una vitamina, un carotenoide, un mineral, un microbicida, un fungicida, un herbicida, un insecticida o un espermicida.
- 45 10. La composición de la reivindicación 7, en la que el agente formador de matriz es un polisacárido seleccionado del grupo consistente de: acetato ftalato de celulosa (CAP), carboximetilcelulosa, pectina, alginato de sodio, sales de ácido algínico, hidroxilpropilmetilcelulosa (HPMC), metilcelulosa, carragenano, goma guar, goma acacia, goma xantano, goma de algarrobo, quitosano y derivados de quitosano, almidones y almidones modificados, ciclodextrinas, inulina, maltodextrinas, dextranos y combinaciones de los mismos.
- 50 11. La composición de la reivindicación 7, en la que el agente formador de cristales es fácilmente soluble en una solución, no se espesa ni polimeriza por contacto con agua y no forma cristales durante el secado.
- 55 12. La composición de la reivindicación 7, en la que los agentes formadores de cristales son seleccionados del grupo consistente de proteínas, tales como albúmina de suero humano y bovino, albúmina de huevo, gelatina, inmunoglobulinas, proteína de soja aislada, proteína de trigo, leche en polvo desnatada, caseinato, proteína de suero, proteína de guisantes y cualquier hidrolizado de proteínas; carbohidratos incluyendo monosacáridos (galactosa, D-manosa, sorbosa, etc.), disacáridos incluyendo lactosa, trehalosa, sacarosa, etc.; un aminoácido tal como lisina, glutamato de monosodio, glicina, alanina, arginina o histidina, así como aminoácidos hidrófobos (triptófano, tirosina, leucina, fenilalanina, etc.); una metilamina tal como betaína; un poliol tal como alcoholes trihidricos o de azúcar superiores, por ejemplo, glicerina, eritritol, glicerol, arabitol, xilitol, sorbitol, manitol e isomaltol;
- 60 65

propilenglicol; polietilenglicol; surfactantes tales como ésteres de azúcar de ácidos grasos y fosfolípidos tales como lecitina; y combinaciones de los mismos.

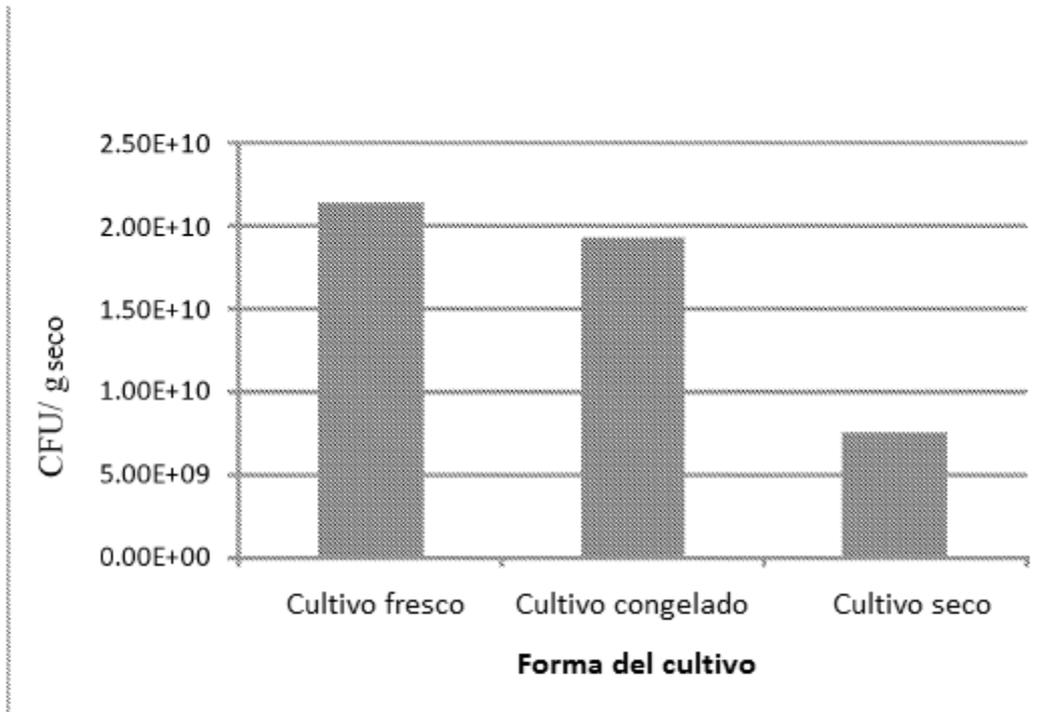
- 5 13. La composición de la reivindicación 7 para la administración a animales y plantas en forma de un líquido reconstituido o de un polvo triturado incorporado en un producto alimenticio o pienso.



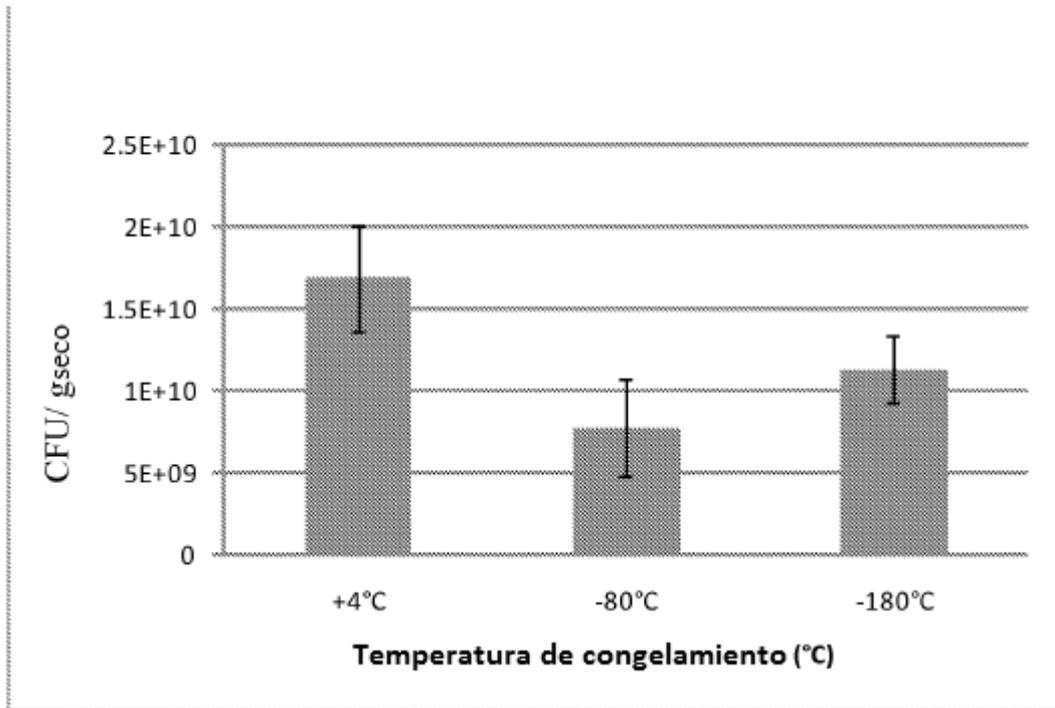
**Figura 1 A**



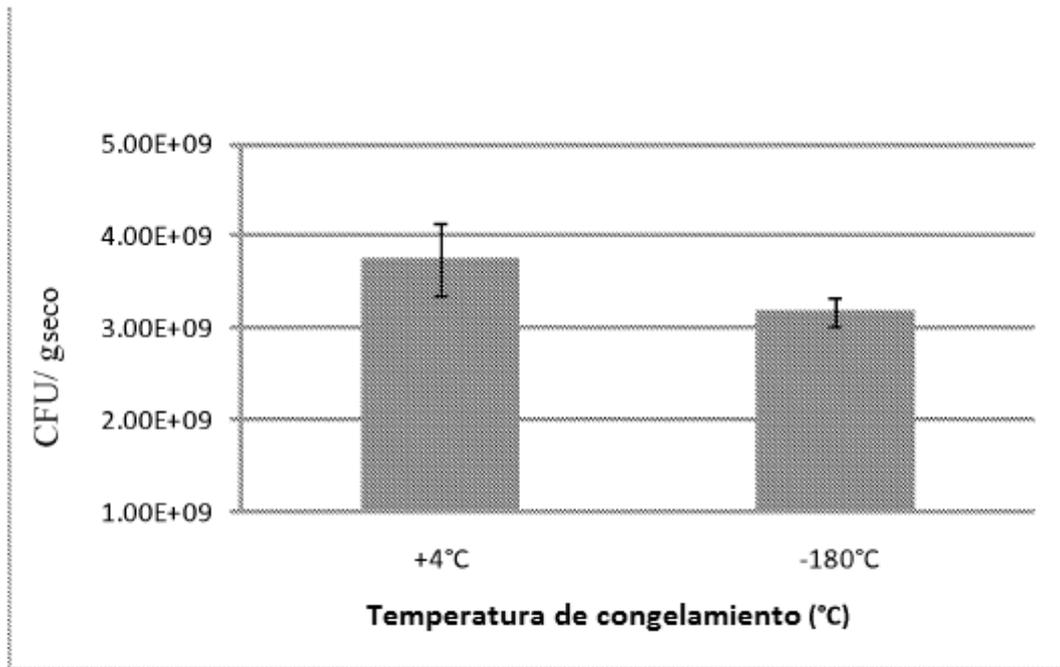
**Figura 1 B**



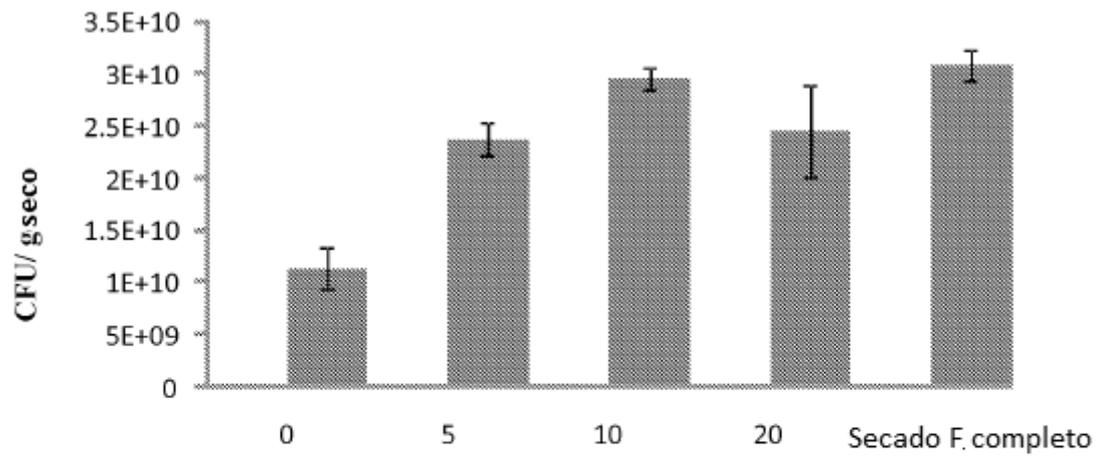
**Figura 2**



**Figura 3**



**Figura 4**



**Figura 5**

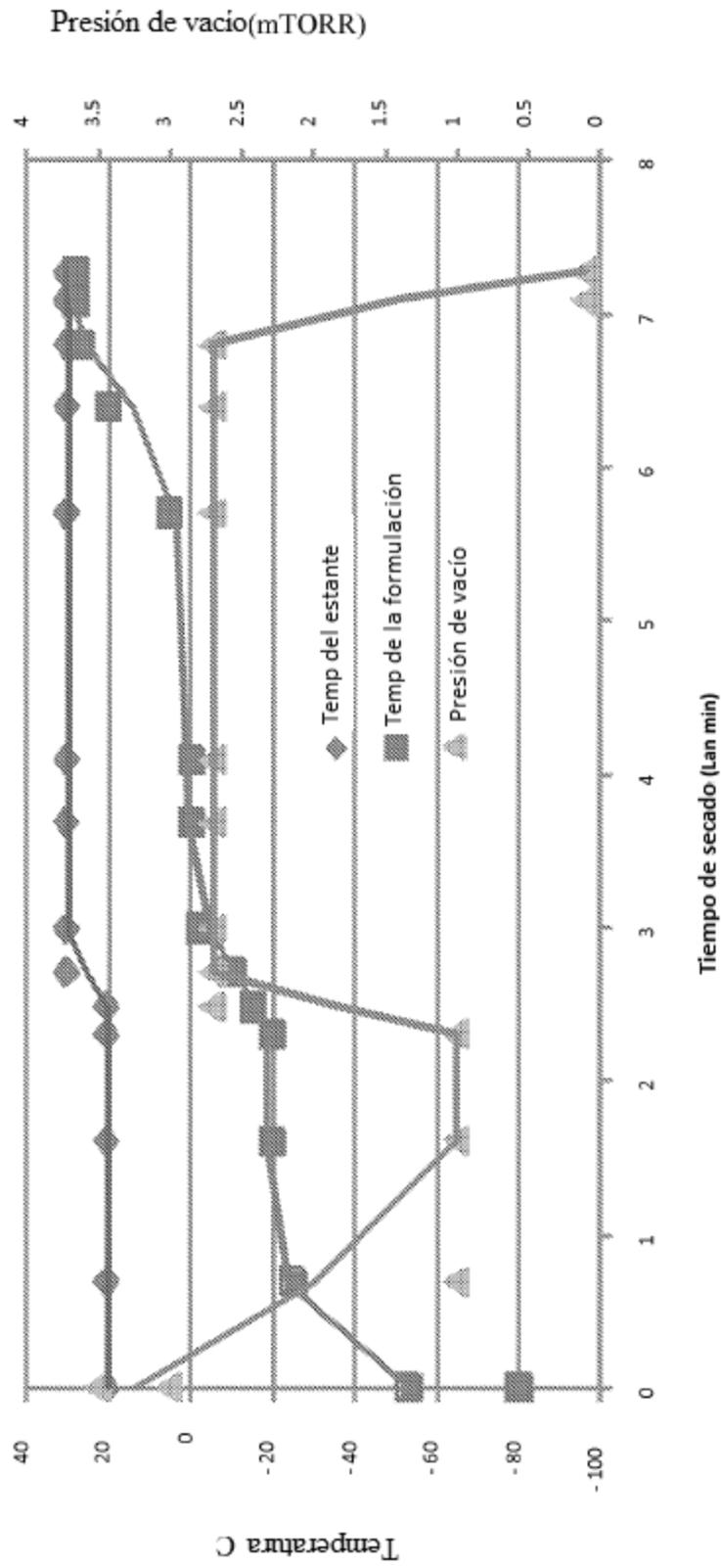


Figura 6

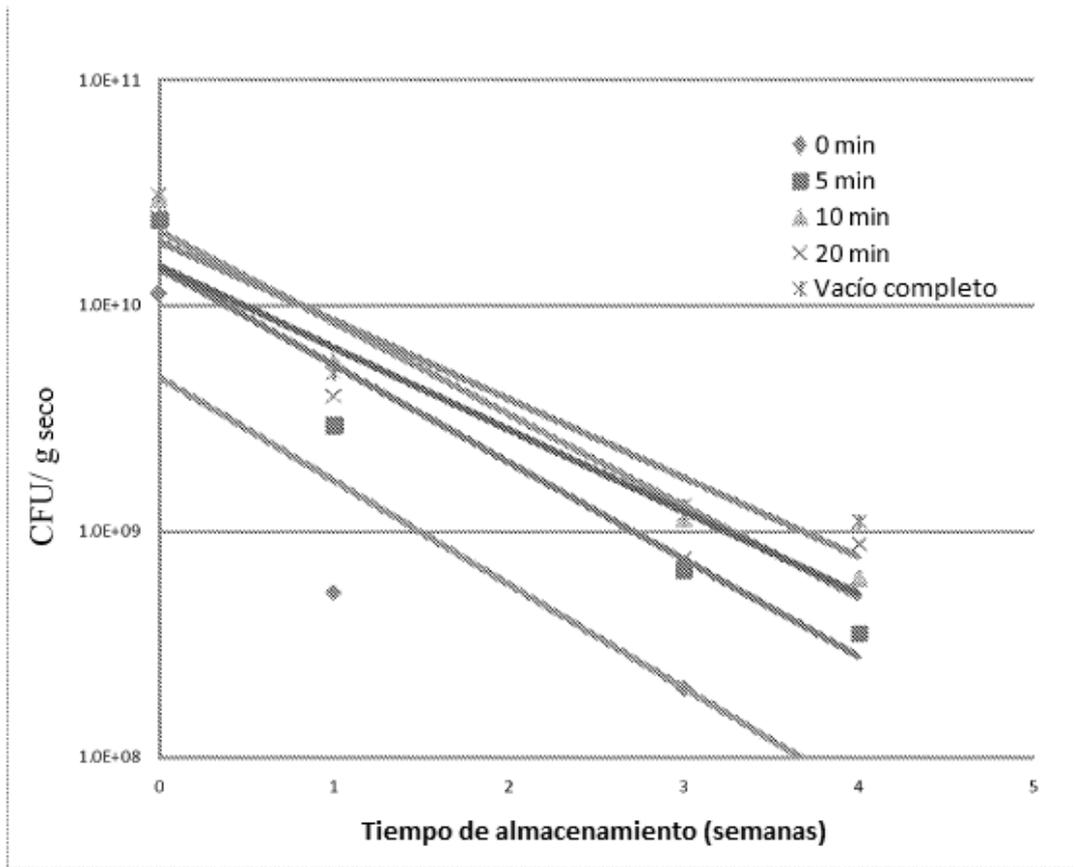
Pérdida del proceso de *L. rhamnosus* durante el secado de diferentes tipos de cultivo y a diferentes temperaturas de congelamiento

Tipo de cultivo	Log de la pérdida
Cultivo congelado	0.91
Cultivo seco	0.44
<b>Temperatura de congelamiento</b>	
+4°C	0.73
-80°C	0.96
-180°C	0.90

\*las pérdidas por temperaturas de congelamiento fueron evaluadas en cultivos de bacterias congeladas

\*\*Las pérdidas del proceso fueron obtenidas después del secado sin el paso de purga adicional.

**Figura 7**



**Figura 8**