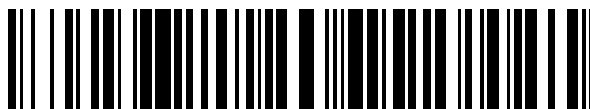


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 642 620**

51 Int. Cl.:

C12N 1/04 (2006.01)

A23L 33/135 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.08.2009** **PCT/EP2009/061085**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.03.2010** **WO10023248**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.08.2009** **E 09782291 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.08.2017** **EP 2318511**

54 Título: **Composición bacteriana**

30 Prioridad:

28.08.2008 DK 200801181

02.12.2008 EP 08170439

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

17.11.2017

73 Titular/es:

CHR. HANSEN A/S (100.0%)

Bøge Allé 10-12

2970 Hørsholm, DK

72 Inventor/es:

**ABRAHAMSEN, SUSANNE;
STUER-LAURIDSEN, BIRGITTE;
WINNING, METTE;
JOERGENSEN, LASSE VIGEL;
JEPPESEN, IBEN y
WAGNER, PETER**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 642 620 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 bacteriana.

5 Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere al uso del bicarbonato sódico como un estabilizador de color en una composición bacteriana, donde la composición bacteriana comprende células bacterianas pertenecientes a la cepa *Bifidobacterium animalis* DSM15954.

10 Antecedentes de la invención

[0002] Diferentes documentos de patentes revelan formulaciones bacterianas que se formulan con un excipiente específico o portadores de los que se reivindica que aumenta la capacidad de almacenamiento de las formulaciones bacterianas. Otros documentos de patente se refieren a la reducción de la actividad hídrica (a_w) de la formulación bacteriana, por ejemplo, añadiendo SiO₂, que retendrá algo de agua. También se ha usado desecante en diferentes formas para eliminar el agua.

[0003] El documento US4956295 describe *Lactobacilli* seco mezclado con un gel de sílice absorbente. Se afirma que las mezclas se pueden almacenar sin refrigeración.

[0004] El documento US7122370B y el documento US7229818B describen formulaciones que comprenden bacterias probióticas con sales de alginato monovalentes, donde la formulación tiene una actividad hídrica entre 0,01 y 0,07, y donde tras la exposición a un entorno ácido se forma un gel de ácido algínico que protege a las bacterias probióticas de los efectos antibióticos del entorno ácido. La sal de alginato se seca hasta alcanzar un contenido de humedad por debajo del 5% antes de mezclarse con las bacterias.

[0005] El documento EP1482811B describe un proceso para obtener un producto alimenticio que incluye los procesos de

- a. mezclar una preparación de microorganismos viables y otros componentes,
- b. secar la mezcla hasta una actividad hídrica por debajo de 0,3,
- c. compactar la mezcla
- d. recubirla y
- e. mezclar con un producto alimenticio.

[0006] El documento US2005/0100559 describe una composición bacteriana seca con una actividad hídrica inferior a 0,5.

[0007] El documento US6953592B describe una matriz a base de carbohidratos sin formación de espuma hidrosoluble o hidrodispersable que contiene gas ocluido en poros cerrados en una cantidad la cual es suficiente para promover la disolución o dispersión de la matriz en contacto con el agua.

[0008] El documento US2005/0266069 reivindica una formulación probiótica viable y estable con direccionamiento intestinal que comprende: una pluralidad de microesferas probióticas cada una de las cuales comprende: un núcleo que contiene una o varias bacterias probióticas, un excipiente celulósico, un desintegrante y uno o varios aditivos; y un revestimiento entérico capaz de ser resistente a los fluidos gástricos, con un nivel de humedad residual inferior al 5% y una actividad hídrica (a_w) entre 0,1 y 0,5.

[0009] El documento WO 2005/063200 describe un comprimido probiótico que comprende un microorganismo probiótico (por ejemplo, *Lactobacillus* GG) y otros ingredientes nutricionalmente activos en dos zonas; una primera zona que comprende dicho microorganismo probiótico y una segunda zona que comprende al menos uno de los otros ingredientes activos mencionados. La actividad hídrica en la primera zona no debería ser mayor de 0,2. Se afirma que se obtiene una buena viabilidad de los microorganismos a pesar del contenido de humedad general relativamente alto.

[0010] El documento WO08048731A reivindica un método para prolongar la fecha de caducidad de una formulación nutricional en polvo que contiene LGG mediante la reducción de la actividad hídrica de la formulación que contiene LGG hasta menos de aproximadamente 0,16 y el mantenimiento de la temperatura de la formulación a o por debajo de 25°C.

[0011] El documento US7037708B describe una composición que comprende al menos una forma portadora de *Lactobacillus plantarum*, que a) tiene un tamaño de partícula de al menos aproximadamente 0,1 mm y b) comprende aproximadamente de 10E10 a 10E12 cfu/g de al menos una especie de microorganismo; c) tiene una actividad hídrica (a_w) inferior a 0,15 y d) está comprimida. Se describe que el cultivo puede comprender un aditivo efervescente.

[0012] El documento WO2008/035332 proporciona métodos para preparar composiciones de microorganismos probióticos tales como *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, que comprenden el proceso de microencapsulación de microorganismos vivos para producir una formulación seca y opcionalmente recubrir las microcápsulas, manteniendo en una medida significativa la viabilidad de los microorganismos.

[0013] El documento US4806368 describe en el ejemplo 6 una formulación de un comprimido que comprende 15 especies bacterianas diferentes incluyendo *Bifidobacterium bifidus*. No hay recuentos bacterianos relacionados con *Bifidobacterium bifidus*.

[0014] El documento WO00/07571 describe en el ejemplo 2.3 y en la tabla 8 que *Bifidobacterium* es una composición que comprende carbonato y ácido cítrico ("Mischung 1.3") que sobrevive a la incubación en 0,1 N HCl durante 120 minutos.

[0015] Sin embargo, ninguno de estos documentos se refiere al uso de bicarbonato sódico como un estabilizador de color en una composición bacteriana, donde la composición bacteriana comprende células bacterianas pertenecientes a la cepa *Bifidobacterium animalis* DSM15954.

[0016] Existe una necesidad de células bacterianas mejoradas que contengan composiciones con una estabilidad de color mejorada. En particular, existe la necesidad de proporcionar composiciones estables de color que comprendan la cepa *Bifidobacterium* DSM1 5954.

Resumen de la invención

[0017] Los presentes inventores han descubierto sorprendentemente que un comprimido que contiene células pertenecientes a una cepa de *Bifidobacterium* y una sal de ácido carbónico, bicarbonato sódico, tiene una estabilidad superior, especialmente si se almacena en un entorno protegido contra la exposición a la humedad del medio ambiente, por ejemplo, en una bolsa o contenedor de aluminio sellado, o en un recipiente de vidrio cerrado. La estabilidad superior es más pronunciada cuando los comprimidos protegidos se exponen a alta temperatura durante un periodo de tiempo más largo.

[0018] Además, los inventores han descubierto que la adición de una sal de ácido carbónico a una composición que contiene células pertenecientes a una cepa de *Bifidobacterium* evita o reduce sorprendentemente la decoloración (coloración roja) que ocurre normalmente durante el almacenamiento.

[0019] Basándose en estos sorprendentes hallazgos, la decoloración de una composición que comprende células vivas pertenecientes a una cepa de *Bifidobacterium* se puede reducir o evitar añadiendo una sal de ácido carbónico a la composición, es decir, la estabilidad de color de una composición que contiene células bacterianas pertenecientes al género *Bifidobacterium* puede mejorarse mediante la mezcla de las células bacterianas con una sal de ácido carbónico.

[0020] Por consiguiente, la presente invención se refiere al uso de carbonato de sodio como un estabilizador de color en una composición bacteriana, donde la composición bacteriana comprende células bacterianas pertenecientes a la cepa *Bifidobacterium animalis* DSM15954.

Descripción detallada

[0021] La estabilidad de color mejorada de una composición que contiene células bacterianas pertenecientes al género *Bifidobacterium* puede obtenerse mediante la mezcla de las células bacterianas con una sal de ácido carbónico.

[0022] La presente invención se refiere al uso de carbonato de sodio como un estabilizador de color en una composición bacteriana, donde la composición bacteriana comprende células bacterianas pertenecientes a la cepa *Bifidobacterium animalis* DSM15954.

[0023] Las células bacterianas se pueden mezclar con un portador antes y/o después y/o al mismo tiempo que la mezcla con la sal. Actualmente se prefiere que todos los constituyentes se mezclen al mismo tiempo.

[0024] Al comprimir el polvo, el producto será una composición bacteriana en forma de polvo o una forma sólida tal como un comprimido o una pastilla.

[0025] La sal de ácido carbónico se puede seleccionar del grupo consistente en carbonato de sodio, bicarbonato sódico, sesquicarbonato sódico, carbonato potásico, bicarbonato de potasio, sesquicarbonato de potasio, carbonato de magnesio, carbonato de glicina de sodio, carbonato de L-lisina, carbonato de arginina, carbonato cálcico amorfo, carbonato amónico, bicarbonato de amonio y combinaciones de los mismos. La presente invención se refiere al uso de la sal bicarbonato sódico.

[0026] El proceso puede incluir además un proceso de secado, tal como liofilización, secado al vacío, secado mediante un desecante, o calentamiento. Un proceso de secado puede realizarse:

- 5 i) antes del proceso de mezclado (es decir, se secan unas o más de las células bacterianas o portadoras); y/o
- ii) después del proceso de mezclado (es decir, se seca la mezcla); y/o
- iii) después del proceso de compresión opcional (es decir, se seca el comprimido o la pastilla).

10 [0027] Las células bacterianas pueden ser células bacterianas de un género seleccionado del grupo *Bifidobacterium*, por ejemplo, unas especies seleccionadas del grupo que consiste en *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium brevis*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium infantis*, tales como células bacterianas pertenecientes a una cepa seleccionada del grupo constituido por la cepa *Bifidobacterium animalis* DSM15954, la cepa *Bifidobacterium longum* subsp.*infantis* DSM15953, la cepa *Bifidobacterium longum* subsp.*longum* DSM15955, y mutantes o variantes de cualquiera de estas.

20 [0028] El portador puede comprender además uno de los componentes seleccionado del grupo que consiste en: un ácido inorgánico o una sal del mismo, un ácido orgánico o una sal del mismo, un carbohidrato, lactosa, un alcohol de azúcar, fibras solubles y almidón.

25 [0029] Los procesos pueden incluir otros pasos, tales como un proceso de recubrimiento (donde, por ejemplo, un comprimido/pastilla es recubierto de una forma conocida por el experto en la materia), y/o un proceso de envasado, por ejemplo, que comprende la colocación del polvo o del polvo comprimido (comprimido/pastilla) en un recipiente que se puede sellar, por ejemplo, hecho de aluminio y/o un polímero.

30 [0030] El proceso para mejorar la estabilidad del color de una composición que contiene células bacterianas pertenecientes al género *Bifidobacterium* comprende la mezcla de las células bacterianas con sal de ácido carbónico.

35 [0031] Las células bacterianas pueden pertenecer a cualquiera de las especies o cepas anteriormente mencionadas. La composición puede comprender al menos 10E5 CFU/mg, tal como al menos 10E7 CFU/mg o al menos 10E9 CFU/mg, las CFU siendo unidades formadoras de las células bacterianas.

[0032] La invención se refiere al uso de sal de ácido carbónico, bicarbonato sódico, como un estabilizador de color en una composición bacteriana que comprende células bacterianas pertenecientes a la cepa *Bifidobacterium animalis* DSM15954.

40 Definiciones

[0033] En el presente contexto, el término "comprimido" se refiere a un polvo comprimido. El término incluye todas las formas físicas y todos los tamaños, tales como una píldora, una pastilla, un comprimido, etc.

45 [0034] Con el término "composición bacteriana" debe entenderse una composición que comprende células bacterianas o un cultivo celular. Las células son preferiblemente activas o inactivas, y además se prefiere que la composición contenga al menos 10E5 unidades formadoras de células por gramo.

50 [0035] En el presente contexto, el término "mutante" debe entenderse como una cepa derivada de una cepa de la invención mediante, por ejemplo, ingeniería genética, radiación y/o tratamiento químico. Se prefiere que el mutante sea un mutante funcionalmente equivalente, por ejemplo, un mutante que tiene sustancialmente las mismas propiedades o mejoradas que la cepa madre, por ejemplo, como un probiótico. Tal mutante forma parte de la presente invención. Especialmente, el término "mutante" se refiere a una cepa obtenida sometiendo una cepa de la invención a cualquier tratamiento de mutagénesis utilizado de forma convencional que incluye un tratamiento con un mutágeno químico tal como etano metano sulfonato (EMS) o N-metil-N'-nitro-N-nitroguanidina (NTG), luz UV o un mutante formado espontáneamente.

60 [0036] En el presente contexto, el término "variante" debe entenderse como una cepa que es funcionalmente equivalente a una cepa de la invención, por ejemplo, que tiene sustancialmente las mismas propiedades o mejoradas, por ejemplo como un probiótico. Tales variantes, que se pueden identificar utilizando técnicas de selección apropiadas, forman parte de la presente invención.

65 [0037] El uso de los términos "un/a" y "el/los" y referentes similares en el contexto de descripción de la invención (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) se debe interpretar de modo que abarquen tanto el singular como el plural, a menos que se indique lo contrario aquí o el contexto lo contradiga claramente. Los términos, "que comprende", "que tiene", "que incluye" y "que contiene" se deben interpretar como términos

sin límites fijos (es decir, con el significado de "que incluye, pero no se limita a") a menos que se indique lo contrario.

La mención de rangos de valores en el presente documento está meramente destinada a servir como un método abreviado para referirse individualmente a cada valor separado que se encuentra dentro del intervalo, a menos que se indique lo contrario, y cada valor separado se incorpora a la especificación como si estuviera mencionado individualmente en el presente documento. Todos los métodos descritos en el presente documento se pueden realizar en cualquier orden adecuado a menos que se indique lo contrario aquí o el contexto lo contradiga claramente. El uso de todos y cualquiera de los ejemplos, o un lenguaje de ejemplificación (por ejemplo, "tal como") proporcionado en el presente documento sólo tiene por objeto ilustrar mejor la invención y no plantea una limitación en el ámbito de la invención a menos que se reivindique lo contrario. Ninguna expresión de la especificación debe ser interpretada como que indica cualquier elemento no reivindicado como parte esencial de la práctica de la invención.

Leyendas

[0038]

Fig 1: supervivencia de BB-12® en polvo H1069 y H1071 cuando se almacena a 37°C durante 3 meses.
Fig 2: imagen que muestra las mezclas de polvos H1184 A (A), H1184 B (B), H1184 C (C) y H1184 D (D) después de dos semanas a temperatura ambiente.

Ejemplos

Ejemplo 1:

[0039] Se preparan dos mezclas, una mezcla en polvo H1069 que contiene BB-12® HA (5,1 %(p/p) triturado y excipientes (manitol; 10%(p/p), lactosa; 84,4%(p/p) estearato de magnesio; 0,5%(p/p) sin bicarbonato sódico, y mezcla de polvo H1071 que contiene BB-12® HA (5,1 %(p/p) triturado y excipientes (manitol; 10%(p/p), lactosa; 54,4%(p/p) estearato de magnesio; 0,5 %(p/p) con bicarbonato sódico; 30%(p/p). La concentración de bicarbonato sódico se obtiene sustituyendo la parte de lactosa de los excipientes con bicarbonato sódico dejando todos los demás componentes en concentraciones iguales en el polvo.

[0040] Los polvos se envasaron en bolsas de aluminio (20-30 g) y se almacenaron a 37°C durante 3 meses. Se tomaron bolsas para análisis de las unidades formadoras de colonias (cfu/g) y la actividad hídrica (aw) justo después del envasado (0 meses), 1 mes y 3 meses de almacenamiento.

[0041] Resultados: la actividad hídrica de los polvos H1069 y H1071 era equivalente, aw (H1069) = 0,19 y aw (H1071) = 0,19 justo después del envasado. Después del almacenamiento durante 1 a 3 meses, la actividad hídrica de los polvos aumentó a aw = 0.27-0.31. Los resultados de las unidades formadoras de colonias se mostraron equivalentes a cfu/g a 0 y 1 mes pero mostraron una diferencia dramática en la supervivencia de BB-12® después de 3 meses (figura 1).

[0042] Conclusión: La sustitución del excipiente de dextrosa con bicarbonato sódico resultó en una supervivencia mejorada de BB-12® durante el almacenamiento. Este resultado muestra que el bicarbonato sódico mejora la supervivencia de los polvos de *Bifidobacterium animalis* durante el almacenamiento.

Ejemplo 2: Ensayo para observar si el bicarbonato sódico influirá en el desarrollo del color rojo en formulaciones de *Bifidobacterium* que contengan ascorbato.

[0043] Contenido de mezclas de polvo (p/p)

H1184 A: 24% de cultivo BB-12® HA triturado, 51% de manitol y 25% de inulina

H1184 B: 24% de cultivo BB-12® HA triturado, 51% de manitol y 25% de bicarbonato sódico

H1184 C: 12% de cultivo BB-12® HA triturado, 63% de manitol y 25% de inulina

H1184 D: 12% de cultivo BB-12® HA triturado, 63% de manitol y 25% de bicarbonato sódico

[0044] El cultivo BB-12® HA triturado contiene ascorbato como agente crioprotector. El ascorbato reacciona con residuos de la fermentación y desarrolla un color rojo. La reacción se acelera mediante temperaturas elevadas y humedad.

[0045] Los polvos se guardaron en bolsas de aluminio herméticas. Para el ensayo, los polvos se sacaron de las bolsas de aluminio en cantidades de 5-8 g y se colocaron en recipientes de plástico pequeños (fabricados por Rotronic para su uso en mediciones de aw). Los recipientes de plásticos se dejaron a temperatura ambiente y después de dos semanas se pudo observar la diferencia en el desarrollo del color, como se muestra en la figura 2.

Los polvos tenían una aw similar de aprox. 0.4. La figura 2 muestra que los polvos A y C cambiaron de color a rojo pálido, mientras que los polvos B y D mantuvieron su color amarillo pálido original.

[0046] Conclusión: La presencia de bicarbonato sódico en las mezclas de polvo tiene un efecto en el desarrollo del color rojo. El color rojo no se desarrolla cuando el bicarbonato sódico está presente en la mezcla de polvo.

5 **Referencias**

[0047] US2004175389, WO03075676, US2005100559, US6953592, WO03012819, WO05266069, WO05063200

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de bicarbonato sódico como un estabilizador del color en una composición bacteriana, donde la composición bacteriana comprende células bacterianas pertenecientes a la cepa *Bifidobacterium animalis* DSM15954.
2. Uso según la reivindicación 1, donde la composición bacteriana está en forma de un polvo o una forma sólida tal como un comprimido o una pastilla.
- 10 3. Uso según la reivindicación 1 o 2 donde la composición comprende al menos 10^5 CFU/mg, tal como al menos 10^7 CFU/mg o al menos 10^9 CFU/mg.

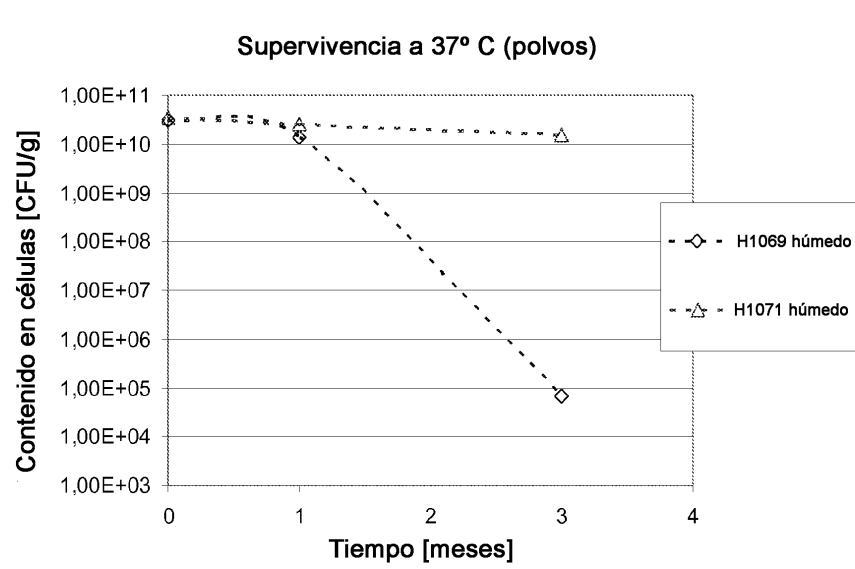


FIG 1



FIG 2