

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 643 148**

51 Int. Cl.:

C12N 1/04 (2006.01)

C12N 11/02 (2006.01)

C07K 17/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.05.2010 PCT/US2010/036098**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.12.2010 WO10138522**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.05.2010 E 10781100 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.07.2017 EP 2435554**

54 Título: **Composición en polvo seco estable que comprende microorganismos biológicamente activos y/o materiales bioactivos y métodos de producción**

30 Prioridad:

06.07.2009 US 223295 P
26.05.2009 US 181248 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.11.2017

73 Titular/es:

ADVANCED BIONUTRITION CORPORATION
(100.0%)
7155 Columbia Gateway Drive
Columbia, MD 21046-2545, US

72 Inventor/es:

HAREL, MOTI;
DREWES, ROGER;
CARPENTER, BRIAN y
ARTIMOVICH, ELENA

74 Agente/Representante:

ILLESCAS TABOADA, Manuel

ES 2 643 148 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 en polvo seco estable que comprende microorganismos biológicamente activos y/o materiales bioactivos y métodos de producción

5

Antecedentes de la invención**Campo de la invención**

10 La presente invención está en el campo de la protección de microorganismos y/o materiales bioactivos en condiciones de alta temperatura y humedad. En particular, la invención se refiere a introducir microorganismos vivos y/o materiales bioactivos en una matriz de formulación seca protectora.

Técnica anterior relacionada

15

Los microorganismos bioactivos, tales como bacterias y virus vivos o muertos, o materiales bioactivos, tales como proteínas, vitaminas, minerales, hormonas y células generalmente son inestables cuando se almacenan bajo condiciones de alta temperatura y humedad. Por ejemplo, muchas bacterias probióticas comercialmente disponibles tales como *Lactobacillus rhamnosus* pueden perder más de un log de viabilidad en menos de dos semanas cuando se almacenan en atmósfera ambiente a temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C). Un proceso común para secar y proteger estos microorganismos bioactivos después de la recolección a partir de un recipiente de cultivo (por ejemplo, fermentador) es añadir gota a gota una solución concentrada de las células vivas en nitrógeno líquido, a continuación, almacenar las perlas congeladas en refrigeración a -80 °C para posterior liofilización o envío a otros lugares. La liofilización ha sido un método dominante para secar material bioactivo sensible. Otros métodos, tales como el secado por atomización, secado de fluido supercrítico y desecación generalmente no son adecuados para bioactivos sensibles tales como bacterias y virus vivos o atenuados debido a las altas temperaturas de secado usadas en estos métodos que dan como resultado daños significativos al propio microorganismo. Además, no pueden secar suficientemente el material a los requerimientos de humedad residual específicos para la estabilidad del producto y, por tanto, una etapa de secado adicional por otros medios puede ser necesaria.

20

En la liofilización, el microorganismo o materiales bioactivos comúnmente se mezcla en una solución o suspensión de agentes protectores, se congela y, a continuación, se deshidrata por sublimación bajo vacío completo. Las temperaturas bajas del proceso de liofilización reducen las reacciones de degradación del bioactivo y minimizan la pérdida de actividad en la forma seca final. Sin embargo, el requerimiento de temperaturas bajo cero consume energía intensivamente, y la baja proporción entre el área superficial y el volumen del material congelado hace que se necesite el uso de un tiempo de secado largo (hasta varios días por ciclo en lote). El secado lento del proceso de liofilización también facilita la formación de cristales de hielo que pueden dañar o desnaturalizar un bioactivo sensible. Por esta razón, microorganismos o materiales bioactivos tales como virus, bacterias y células que poseen una pared celular o membrana lipídica, plantean retos significativos al proceso de liofilización.

25

Una opción para reducir la formación de una estructura cristalina de hielo es añadir agentes crioprotectores a la solución bioactiva. Tales agentes protectores son sustancias químicas altamente solubles que se añaden a una formulación para proteger membranas celulares y proteínas intracelulares durante la congelación y para mejorar la estabilidad durante el almacenamiento. Estabilizadores comunes para bacterias y virus vivos incluyen azúcares tales como sacarosa, glicerol o sorbitol, a altas concentraciones con el material celular o bioactivo (Morgan y col., 2006; Capela y col., 2006). Sin embargo, tales agentes protectores puede que no penetren adecuadamente dentro de la célula para proteger componentes activos dentro del volumen intracelular. Por lo tanto, queda un reto significativo de desarrollar un proceso de secado óptimo y formulación que minimice las pérdidas del secado mientras se consigue una estabilidad de almacenamiento del material secado adecuada.

30

Algunos de los problemas asociados con la liofilización se han resuelto usando una combinación de ciertas formulaciones y secando al vacío en estado líquido. Annear (Annear 1962) desarrolló una formulación que contenía bacterias en una solución de azúcares y aminoácidos y un proceso de secado al vacío que implica la ebullición y la formación de espuma. Roser y col. (documento de patente americana 6.964.771) describió un concepto similar de secado mediante la formación de espuma que incluye una etapa de concentración de líquido seguida de ebullición y formación de espuma de la solución concentrada (jarabe) bajo vacío. Para mitigar los daños por oxidación y desnaturalización que se pueden dar durante la etapa de ebullición, Bronshtein (documentos de patente americana N°: 5.766.520, 7.153.472) introdujo una fórmula protectora mejorada que contenía carbohidratos y tensioactivos. El secado de la solución protectora también implicó un proceso por etapas de concentración bajo un vacío moderado antes de la aplicación de un vacío fuerte para causar ebullición espumosa del agua restante para formar espuma estable seca. En un intento de eliminar la etapa de ebullición, Busson y Schroeder (documento de patente americana N° 6.534.087) han propuesto un proceso de secado en una formulación en estado líquido para bioactivos insensibles usando un horno de vacío sin ebullición, aplicando presión de vacío muy suave por encima de 30 Torr. Después de alcanzar un cierto nivel de secado sin ebullición del material, se aplicó calor por encima de 20 °C y el material secado se recogió después de solamente unas pocas horas.

35

- Este tipo de proceso de secado, en el cual la solución bioactiva se mantiene en un estado líquido durante el proceso de secado entero, tiene la ventaja de secar más rápido debido a la convección del líquido durante la ebullición y el incremento del área superficial representado por las superficies de espuma. Sin embargo, la ebullición y la formación de espuma requieren entrada de una cantidad significativa de calor para proporcionar la erupción necesaria de la solución. Tal proceso de secado no está bien adaptado al secado de productos biológicos sensibles, tales como virus viables, células o bacterias debido a que el calor aplicado acelera los procesos enzimáticos (por ejemplo, proteólisis), y los procesos químicos (por ejemplo, oxidación y ataques de radicales libres), los cuales pueden destruir la actividad o la viabilidad del material biológico.
- El proceso de secado anteriormente descrito también está limitado en su capacidad de ser escalado a un gran proceso industrial. Evitar la congelación requiere que el proceso se conduzca a nivel de vacío menor (>7 Torr) que en ciclos de proceso de liofilización convencional o de liofilización por atomización. La desventaja más significativa de los anteriores procesos es la incapacidad de controlar y limitar la expansión de la espuma dentro del recipiente, bandeja o vial. La erupción incontrolable y la formación de espuma con frecuencia excesiva hace prácticamente imposible desarrollar un proceso a escala industrial. La naturaleza de la erupción y la formación de espuma de la etapa de ebullición da como resultado el que una porción de material aparezca salpicado sobre las paredes del recipiente y dentro de la cámara de secado. Para suavizar la erupción durante la ebullición, Bronshtein (documentos de patente americana N°: 6.884.866, 6.306.345) ha propuesto cámaras especiales y un protocolo de aplicación de temperatura/presión controlada que reduce el sobrecalentamiento a un nivel aceptable. Otro planteamiento para contener la erupción y la excesiva formación de espuma se describe en la solicitud de patente americana N°: 2008/0229609, en la cual la solución bioactiva está encerrada en un contenedor o una bolsa recubierta con membranas transpirables. Una vez más, estos protocolos son difíciles de implementar a nivel industrial y son difíciles de replicar de manera fiable con diferentes formulaciones.
- Estudios sobre la estabilidad de las composiciones probióticas se han descrito en los documentos WO 2005/060937 A1, US 2003/165472 A1, Capela y col., *Food Research International*, 2006, 39:203-211, Schwab y col., *Cryobiology*, 2007, 55:108-114, WO 2007/079147 A2, WO 2008/076975 A1, y US 2008/102132 A2. El documento WO 2005/060937 A1 describe una composición probiótica en la forma de un comprimido que comprende organismos probióticamente activos, secados y viables y un agente estabilizante que comprende tanto un antioxidante, un agente de relleno como un gelatinizador. El documento US 2003/165472 A1 describe una formulación que comprende una fuente de microorganismos probióticos suspendidos en una matriz capaz de conservar la viabilidad sustancial de los microorganismos, en la que la matriz preferiblemente comprende alginato. Las formulaciones descritas en el documento US 2003/165472 A1 también pueden comprender conservantes tales como lactosa o trehalosa. Capela y col. (*Food Research International*, 2006, 39:203-211) describe un estudio en el efecto de los crioprotectores, prebióticos y microencapsulación (tal como por microencapsulación con alginato) en la supervivencia de microorganismos probióticos en yogurt y por liofilizado después del procesamiento y almacenamiento. Schwab y col. (*Cryobiology*, 2007, 55:108-114) describe un estudio sobre la influencia de oligosacáridos en la viabilidad y en las propiedades de membrana de *Lactobacillus reuteri* TMW1.106 durante la liofilización. El documento WO 2007/079147 A2 describe un vehículo de administración para bacterias probióticas que comprende una matriz seca de polisacáridos, sacáridos y polioles en una forma de cristal. El documento WO 2008/076975 A1 describe una composición probiótica estable que comprende trehalosa, proteína de clara de huevo o de soja y alginatos. El documento US 2008/102132 A2 describe microcápsulas que pueden contener una bacteria probiótica, donde la pared de microcápsulas se produce mediante una mezcla de al menos dos hidrocoloides.
- Perry (*Molecular Biotechnology*, 1998, 9:59-64) y Benedict y col. (*Applied Microbiology*, 1958, 6:401-407) se refieren a la conservación de microorganismos por liofilización y crioconservación.
- El documento US 2008/241244 A1 describe métodos y composiciones para proporcionar almacenamiento prolongado de materiales bioactivos, tales como, por ejemplo, péptidos, proteínas, ácidos nucleicos, anticuerpos, vacunas, bacterias, virus, liposomas, plaquetas y/o suspensiones celulares, en una matriz vítrea de una espuma seca.
- Estudios de estabilidad de composiciones que comprenden otros microorganismos y materiales se han descrito en Hinch y col., *European Biophysics Journal*, 2007, 37:503-208 (liposoma de fosfatidilcolina de huevo), documento US 6.258.362 B1 (virus), documentos WO 2007/035455 A2 (vacunas), US 2004/038825 A1 (microbios biopesticidas, virus, nemátodos, toxinas, inhibidores de la alimentación de insectos, feromonas y reguladores del crecimiento de insecto).
- Sigue existiendo la necesidad de una formulación protectora adecuada que se pueda secar en un estado líquido y un método escalable industrialmente para secar microorganismos bioactivos tales como virus, bacterias y células, vivos o muertos, particularmente a temperaturas por encima de la congelación. Particularmente, existe la necesidad de un proceso de secado escalable de coste razonable que también sea adecuado para aplicaciones fuera de la industria farmacéutica tal como las industrias alimenticias y agrícolas. Se requieren formulaciones protectoras y procesos de secado suave para proporcionar un secado adecuado sin exposición a altas temperaturas. Se necesita una composición que pueda proteger tales productos biológicos en almacenamiento bajo condiciones de alta temperatura y humedad. La presente invención, como se describe más adelante, proporciona una solución a todos

estos retos.

Resumen de la invención

5 La presente invención incluye composiciones y métodos tal como se definen en las reivindicaciones 1 y 8.

10 En una realización, la formulación comprende cantidades suficientes de agentes estabilizadores de la formulación, en donde se encuentran embebidos los microorganismos. Ejemplos de agentes estabilizadores de la formulación adecuados incluyen, pero no se limitan a, celulosa acetato ftalato (CAP), carboximetilcelulosa, pectina, alginato de sodio, sales de ácido algínico, hidroxil propil metil celulosa (HPMC), metilcelulosa, carragenano, goma guar, goma de acacia, goma de xantano, goma de algarrobo, chitosán y derivados de chitosán, colágeno, ácido poliglicólico, almidones y almidones modificados, ciclodextrinas y oligosacáridos (inulina, maltodextrinas, dextranos, etc.); y combinaciones de los mismos.

15 En una realización particular, el agente estabilizador de la formulación preferido es alginato de sodio. Preferiblemente, la formulación comprende, en porcentaje en peso de la materia seca total, 0,1 a 10 %, preferiblemente 1 a 6 %, más preferiblemente 2 a 4 % de agente estabilizador de la formulación. En una realización adicional, el estabilizador de la formulación comprende una mezcla de alginato de sodio y oligosacáridos en una relación de peso de 1:1-10, más preferiblemente 1:1-5 de alginato de sodio/oligosacáridos. En otra realización más de la presente invención, el estabilizador de formulación se reticula con iones de metales divalentes para formar un hidrogel firme.

25 En otra realización, la formulación comprende cantidades significativas de agentes protectores, en donde se encuentran embebidos los microorganismos. Ejemplos de agentes protectores adecuados incluyen, pero no se limitan a, proteínas tales como albúmina de suero humana o bovina, ovoalbumina, gelatina, inmunoglobulina, proteína de soja aislada, proteína de trigo, leche desnatada en polvo, caseinato, proteína de suero de leche y cualquier hidrolizado de proteína; carbohidratos incluyendo monosacáridos (por ejemplo, galactosa, D-manosa, sorbosa, etc.), disacáridos (por ejemplo, lactosa, trehalosa, sacarosa, etc.), un aminoácido tal como lisina, glutamato monosódico, 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 de azúcar trihídricos o superiores, (por ejemplo, glicerina, eritritol, glicerol, arabitol, xilitol, sorbitol y manitol); propilenglicol; polietilenglicol; plurónicos; tensioactivos; y combinaciones de los mismos.

35 En una realización preferida, el agente protector comprende una mezcla de un disacárido, una proteína y un hidrolizado de proteína. En una realización particular, el agente protector preferido es una mezcla de trehalosa, aislado de proteína de soja o proteína de suero de leche y sus hidrolizados. Preferiblemente, la formulación comprende, en porcentaje en peso de materia seca total, 10 a 90 % de trehalosa, 0,1 a 30 % de aislado de proteína de soja o proteínas de suero de leche al y 0,1 a 30 % de hidrolizado de proteína de soja o de suero de leche. Preferiblemente 20 a 80 % de trehalosa, 0,1 a 20 % de aislado de proteína de soja o proteínas de suero de leche y 1 a 20 % de hidrolizado de proteína de soja o de suero de leche, más preferiblemente 40 a 80 % de trehalosa, 0,1 a 20 % de aislado de proteína de soja o proteínas de suero de leche y 1 a 20 % de hidrolizado de proteína de soja o de suero de leche.

45 El método de la invención típicamente incluye mezclar con vacío, solución concentrada o polvo seco de microorganismo bioactivo o un material bioactivo, los agentes estabilizadores, y los agentes protectores en una formulación homogénea, enfriar la formulación a una temperatura por encima de su temperatura de congelación, y secar bajo vacío a una temperatura de estante por encima de 20 °C. Según la invención, el proceso de secado implica un secado bajo vacío primario a una temperatura de estante de 20 °C o por encima, seguido de un secado secundario acelerante de la formulación bajo vacío máximo y temperatura elevada durante un tiempo suficiente para reducir la actividad del agua de la formulación secada a 0,3 Aw o menos.

50 En una realización del método de mezcla el microorganismo o material bioactivo está en una forma estabilizada seca y además se mezcla en seco con los agentes estabilizadores secos y agentes protectores. Esta mezcla seca, a continuación, se añade a agua y se mezcla bajo vacío y agitación apropiados para dar lugar a una suspensión homogénea de densidad deseada.

En otra realización del método de mezcla, el microorganismo o material bioactivo está en forma de solución concentrada o pasta. La solución se mezcla con todos los otros ingredientes de formulación antes de añadir al agua.

60 En otra realización más del método de mezcla, el microorganismo o material bioactivo está en forma de polvo seco. El polvo seco se mezcla con todos los otros ingredientes de la formulación antes de añadir al agua.

65 En otra realización del método de mezcla, el microorganismo o material bioactivo seco se mezcla con solo una parte de los ingredientes de la formulación, y esta mezcla se añade a la suspensión preformada, preparada a partir de la adición de los otros ingredientes de la formulación al agua.

En realizaciones preferidas de los métodos de secado, el microorganismo bioactivo se mezcla bajo vacío en una solución que incluye un agente estabilizador de formulación y un agente protector. El microorganismo bioactivo comprende bacterias probióticas. Ejemplos específicos de microorganismos probióticos adecuados estarían representados por las siguientes especies e incluyen todos los biotipos de cultivo dentro de aquellas especies:

5 *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. diacetyllactis*, *E. faecium*, *E. intermedius*, *E. lactis*, *E.*
10 *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 fteudenreichii, *Prop. shermanii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Staphylococcus carnosus*, *Staph.*
15 *xylosum*, *Streptococcus infantarius*, *Strep. salivarius* ss. *thermophilus*, *Strep. Thermophilus* y *Strep. lactis*.

En métodos preferidos, la formulación se mezcla bajo vacío a temperatura ambiente (por ejemplo, desde 20 °C a 30 °C). Después de mezclar hasta homogeneidad, la formulación se enfría a continuación a una temperatura por encima de la temperatura de congelación de la formulación. Típicamente, la formulación se enfría a entre -10 °C a +10 °C, más preferiblemente la formulación se enfría a entre -5 °C y +5 °C. En una realización preferida, la formulación enfriada se transfiere, a continuación, a una cámara de secado en la que se aplica calefacción (20 °C o más) mientras se controla una presión de vacío inicial a un nivel para mantener la temperatura de preenfriamiento original. Típicamente, la presión de vacío deseable está por debajo de 7 Torr pero no menos de 3 Torr. Bajo estas condiciones preferidas se consigue una expansión controlada de la formulación y un secado primario posterior más rápido de la formulación. Para acelerar el secado secundario, se aplica una presión de vacío máxima y la temperatura de aplicación de calor se puede elevar a desde 30 °C a 60 °C. Para maximizar la estabilidad del producto final la formulación preferiblemente se seca durante un tiempo suficiente para reducir la actividad del agua de la formulación a $A_w=0,3$ o menos. En una realización preferida de la invención, el secado secundario comprende eliminación de agua a una presión de menos de 1 Torr, y en una realización especialmente preferida a menos de 0,2 Torr.

La formulación húmeda puede estar en forma de suspensión viscosa o de partículas de hidrogel que oscilan desde 0,05 a 10 mm. La formulación secada se puede usar directamente como una escama, o molida en polvo con un tamaño de partícula promedio desde aproximadamente 10 μm a aproximadamente 1.000 μm . La formulación se puede administrar directamente a un animal, incluyendo humano, como polvo concentrado, como líquido reconstituido, (por ejemplo, bebida), o se puede incorporar o bien en forma de escama o polvo en un alimento o producto alimenticio existente.

Breve descripción de los dibujos

40 La Figura 1 muestra la tendencia de la estabilidad de la bacteria probiótica, *L. rhamnosus*, que se sometió a almacenamiento a 40 °C y humedad relativa al 33 %.

La Figura 2 muestra las temperaturas del proceso y la pérdida de viabilidad acumulativa durante un proceso de formulación que termina con una A_w de 0,28 en la etapa de secado secundario.

45 La Figura 3 muestra el efecto de diferentes estabilizadores de formulación sobre la estabilidad de almacenamiento.

La Figura 4 muestra el efecto de la viscosidad de alginato sobre la expansión de la formulación bajo vacío.

50 La Figura 5 muestra el efecto de diferentes combinaciones de agentes estabilizadores sobre la viabilidad de bacterias.

La Figura 6 muestra el efecto de la densidad de la formulación sobre la tasa de expansión bajo vacío.

55 La Figura 7 muestra el efecto de la temperatura de preenfriamiento de la formulación sobre la expansión bajo vacío.

60 La Figura 8 muestra el efecto de la presión de vacío sobre la temperatura de la formulación durante la etapa de secado primario.

La Figura 9 muestra el efecto de la presión de vacío sobre la tasa de secado de la formulación.

65 La Figura 10 muestra la estabilidad de la bacteria probiótica, *L. acidophilus*, secada con la formulación y el método de la invención bajo almacenamiento a 37 °C y humedad relativa al 33 %.

La Figura 11 muestra un diagrama de flujo del método de producción de una formulación seca estable a partir de una formulación de hidrogel según la invención.

Descripción detallada de la invención

5

Definiciones

Se entiende que la terminología usada en el presente documento es con el fin de solamente describir realizaciones particulares, y no pretende ser limitante. Tal como se usa en esta memoria y en las reivindicaciones adjuntas, las formas del singular “un/una” y “el/la” incluyen los referentes plurales a menos que el contenido dicte claramente lo contrario. Por tanto, por ejemplo, la referencia a “una proteína” incluye una única proteína o una combinación de dos o más proteínas; la referencia a “enzima”, “vitamina”, “bacteria”, etc., incluye una única o la mezcla de varias, y similares.

10

15 En la descripción y reivindicaciones de la presente invención, la siguiente terminología se usará de acuerdo con las definiciones expuestas a continuación.

Temperaturas o condiciones “ambiente” son aquellas dadas en cualquier momento en un ambiente dado. Típicamente la temperatura ambiente es de 22 a 25 °C, la presión atmosférica ambiente, y la humedad ambiente se miden fácilmente y variarán dependiendo del momento del año, clima y condiciones climáticas, altitud, etc.

20

“Desgasificación” se refiere a la liberación de un gas a partir de una solución en un líquido cuando la presión parcial del gas es mayor que la presión aplicada. Esto no es ebullición, y con frecuencia se puede dar a presiones por encima de la presión que herviría una solución. Por ejemplo, refrescos carbonatados embotellados contenían una alta presión parcial de CO₂. Al retirar el tapón de la botella se reduce la presión parcial y la bebida burbujea vigorosamente (se desgasifica, pero no hierve).

25

“Ebullición” se refiere a la rápida transición de fase 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 añade calor a un líquido que ya está en su punto de ebullición.

30

“Actividad del agua” o “Aw” en el contexto de composiciones de formulaciones secas, se refiere a la disponibilidad del agua y representa el estado de energía del agua en un sistema. Se define como la presión de vapor del agua sobre una muestra dividida entre la del agua pura a la misma temperatura. El agua destilada pura tiene una actividad de agua de exactamente uno o Aw=1,0.

35

“Humedad relativa” o “HR” en el contexto de la estabilidad de almacenamiento se refiere a la cantidad de vapor de agua en el aire a una temperatura dada. La humedad relativa normalmente es menor de la requerida para saturar el aire y se expresa en porcentaje de humedad de saturación.

40

“Secado primario”, con respecto a los procesos descritos en el presente documento, se refiere al secado que tiene lugar a partir del momento de aplicación de vacío inicial hasta el momento en el que comienza el secado secundario. Típicamente, la mayoría del secado primario tiene lugar por evaporación extensa, mientras que la temperatura del producto permanece significativamente por debajo de las temperaturas de la fuente de calor.

45

“Secado secundario”, con respecto a los procesos descritos en el presente documento, se refiere a una etapa de secado que tiene lugar a temperaturas por encima de las temperaturas de congelación de la formulación y cerca de la temperatura de la fuente de calor. En un proceso de secado de formulación típico, una etapa de secado secundario reduce la actividad del agua de la formulación a una Aw de 0,3 o menos.

50

“Microorganismo bioactivo”, o “microorganismo o formulación biológicamente activa” se refiere a preparaciones de microorganismos vivos o muertos, que están en tal forma que permiten que la actividad biológica del microorganismo sea inequívocamente eficaz. “Microorganismo vivo como polvo seco” se refiere a una biomasa bacteriana en la que al menos el 10 % p/p es bacteria viva. “Microorganismo muerto como polvo seco” se refiere a una biomasa bacteriana en la que al menos el 99,999 % es bacteria muerta.

55

“Material bioactivo”, “composición bioactiva”, “material biológicamente activo” 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 eficaz. Tales materiales bioactivos incluyen, pero no se limitan a, péptidos, proteínas, hormonas, vitaminas, minerales, fármacos, microbicidas, fungicidas, herbicidas, insecticidas, espermicidas, ácidos nucleicos, anticuerpos y vacunas.

60

“Agente estabilizador o estabilizante” se refiere a compuestos o materiales que se añaden a la formulación para incrementar la viscosidad de la formulación húmeda o para formar un hidrogel. Ejemplos de agentes estabilizadores adecuados incluyen, pero no se limitan a, polisacáridos tales como celulosa acetato ftalato (CAP),

65

carboximetilcelulosa, pectina, alginato de sodio, sales de ácido algínico, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), metilcelulosa, carragenano, goma guar, goma de acacia, goma de xantano, goma de algarrobo, chitosán y derivados de chitosán, colágeno, ácido poliglicólico, almidones y almidones modificados, ciclodextrinas y oligosacáridos (inulina, maltodextrinas, rafinosa, dextranos, etc.) y combinaciones de los mismos.

5 “Agente de protección” o “agente protector” o “protector” generalmente se refiere a compuestos o materiales que se añaden para asegurar o incrementar la estabilidad del material bioactivo durante el proceso de secado y después, o para la estabilidad de almacenamiento a largo plazo del producto en polvo seco. Protectores adecuados son generalmente fácilmente solubles en una solución y no espesan o polimerizan tras el contacto con el agua. A
10 continuación se describen protectores adecuados e incluyen, pero no se limitan a, proteínas tales como albúmina de suero humana o bovina, proteína de suero de leche, proteína de soja, caseinato, gelatina, inmunoglobulinas, carbohidratos incluyendo monosacáridos (galactosa, D-manosa, sorbosa, etc.), disacáridos (lactosa, trehalosa, sacarosa, etc.), un aminoácido tal como glutamato monosódico, lisina, glicina, alanina, arginina o histidina, así como aminoácidos hidrófobos (triptófano, tirosina, leucina, fenilalanina, etc.); una metilamina tal como betaina; una sal
15 excipiente tal como sulfato de magnesio; un poliol tal como alcoholes de azúcar trihídricos o superiores, (por ejemplo, glicerina, eritritol, glicerol, arabitol, xilitol, sorbitol y manitol); propilenglicol; polietilenglicol; plurónicos; tensioactivos, y combinaciones de los mismos.

20 Una formulación o composición “estable” es una en la que el microorganismo bioactivo o material en el mismo conserva esencialmente su capacidad, y/o actividad biológica durante el almacenamiento. La estabilidad se puede medir a una temperatura y condiciones de humedad seleccionadas durante un periodo de tiempo seleccionado. El análisis de la tendencia se puede usar para estimar el periodo de tiempo de conservación en almacenamiento esperado antes de que un material haya estado realmente en almacenamiento durante ese periodo de tiempo. Para bacterias vivas, por ejemplo, la estabilidad se define como el tiempo que tarda en perder 1 log de UFC/g de
25 formulación seca bajo condiciones predefinidas de temperatura, humedad y periodo de tiempo.

30 “Viabilidad” con respecto a bacterias, se refiere a la capacidad de formar una colonia (UFC o unidad formadora de colonia) sobre un medio nutriente apropiado para el crecimiento de las bacterias. Viabilidad, con respecto a virus, se refiere a la capacidad de infectar y reproducirse en una célula hospedadora adecuada, dando como resultado la formación de una placa sobre un césped de células hospedadoras.

35 Las composiciones y los métodos de la presente invención resuelven el problema de proporcionar un proceso de secado escalable a nivel industrial y eficiente en coste para producir una formulación seca que contiene microorganismos o materiales bioactivos, con una vida significativamente prolongada en estado seco. La invención proporciona una formulación que comprende un microorganismo o material bioactivo con un agente estabilizador y un agente protector en una solución, enfriando dicha formulación a una temperatura por encima de su temperatura de congelación, y estabilizando la formulación mediante la eliminación de la humedad bajo un régimen de presión reducida mientras se aplica calor a la composición.

40 La mayoría de la pérdida de viabilidad del microorganismo durante los procesos de secado se puede atribuir a una combinación de tensiones de congelación-descongelación y formación de cristal de hielo, a altas tensiones osmóticas y oxidativas, a fuerzas transversales y a la liberación de energía durante cavitaciones de burbuja asociadas con la “ebullición” de la solución bajo presión de secado baja y alta temperatura. La presente invención proporciona una formulación y un proceso de secado escalable a nivel industrial que minimiza las pérdidas durante
45 el secado y, posteriormente, protege al microorganismo bioactivo bajo condiciones de almacenamiento adversas.

Composiciones de la invención

50 La presente invención incluye las composiciones de formulación tal como se definen en las reivindicaciones 1 a 7. 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 se secaron sin preenfriamiento. Por ejemplo, formulaciones de la técnica anterior se sometieron inicialmente a la “formación de espuma” para facilitar el secado eficaz. La etapa de formación de espuma generalmente dió como resultado una extensa ebullición y erupción de la solución que es una consecuencia inevitable del secado al vacío en estado líquido y como resultado, se puede conseguir solamente una
55 capacidad de carga del material muy baja en un vial o recipiente (véase, por ejemplo, el documento de patente americana N° 6.534.087, en el cual el espesor del producto en espuma final es menor de 2 mm). Las composiciones y los métodos de secado de la presente invención permiten solamente una expansión limitada y controlada de la formulación posibilitando de ese modo una carga de material por área de secado mucho mayor y, como resultado, se puede escalar fácilmente hasta la producción de grandes cantidades de material.

60 Se ha mostrado que microorganismos unicelulares se benefician particularmente de las formulaciones y métodos de secado de la presente invención. El microorganismo bioactivo de la invención es bacteria probiótica. La formulación se prepara según las composiciones y los métodos de la invención incluyendo la obtención de bacterias probióticas vivas en solución, pasta, perlas congeladas o en forma de polvo seco, concentrados. Mezclar las bacterias
65 probióticas bajo vacío con los agentes estabilizadores y los agentes protectores, enfriar la formulación viscosa a una temperatura por encima de su temperatura de congelación, aplicar suficiente presión de vacío para mantener esa

temperatura de preenfriamiento y suministrar una fuente de calor de 20 °C o más, para facilitar la eliminación de agua. El mantenimiento de la temperatura preenfriada de la formulación puede ser mediante la conducción de calor fuera de la formulación, y/o mediante pérdida de calor latente debido a la evaporación de agua. Para acelerar más el proceso de secado se aplica una etapa de secado secundario, a vacío mayor hasta 0,1 Torr y a temperatura elevada hasta 70 °C, para proporcionar una composición final con actividad del agua con una Aw de 0,3 o menos. Tal composición puede permanecer estable en condiciones de almacenamiento de 40 °C y HR al 33 % durante 60 días o más (véase la Figura 1). Los procesos especificados de la invención han mostrado que dan como resultado la capacidad inesperada de las células de conservar su viabilidad más allá de la de los procesos de secado establecidos. La pérdida de viabilidad inicial durante todo el proceso de secado de acuerdo con la presente invención fue solamente de 0,3 logs (véase figura 2).

Formulaciones para la preparación de composiciones en polvo seco estables

Los componentes para mezclar con el microorganismo o material preferido para la preparación de composiciones en polvo seco según la invención, incluyen los agentes estabilizadores y los agentes protectores. Tales componentes, cuando se mezclan con los microorganismos o material bioactivos preferidos, se pueden procesar según los métodos de la invención para proporcionar grandes cantidades de composiciones secas estables para almacenamiento y administración de dichos microorganismos. Los estabilizadores de formulación pueden incluir una mezcla de un polisacárido y un oligosacárido. El polisacárido preferido, particularmente para estabilizar microorganismos vivos, fue alginato. Debido a que sorprendentemente se encontró que el alginato es superior a otros polisacáridos tales como pectina y goma de acacia en la reducción de las pérdidas de secado de productos biológicos sensibles tales como probióticos (Figura 3). También se prefiere debido a sus características de formación de hidrogel con metales no tóxicos a temperaturas suaves. También se encontró que el alginato estabiliza eficazmente la formulación bajo vacío, proporcionando viscosidad apropiada a la formulación y permitiendo un desarrollo controlado de la formulación a una viscosidad particular (Figura 4).

Se encontró que combinar un oligosacárido con el alginato contribuye aún más a la estabilidad total de la formulación. La Figura 5 muestra el efecto sobre la estabilidad en almacenamiento de diferentes combinaciones de alginato y oligosacáridos. Una combinación de alginato e inulina se usa en la presente invención debido a su efecto sobre las bacterias probióticas en almacenamiento prolongado. En una realización de la invención, al menos uno de los agentes estabilizadores de la formulación es preferiblemente una goma que puede formar un hidrogel firme mediante el reticulado con iones de metal.

Los agentes protectores de la invención pueden incluir diversas proteínas, péptidos, azúcares, alcoholes de azúcar y aminoácidos. El agente protector es preferiblemente uno que no cristaliza y/o desestabiliza el material biológicamente activo en la formulación a temperaturas de congelación (por ejemplo, -20 °C). Los dos o más agentes protectores diferentes inhiben la formación de cristales y estabilizan la formulación de material bioactivo en condiciones de almacenamiento durante largos periodos de tiempo.

Las formulaciones húmedas pueden incluir una cantidad sustancial de sólidos totales (componentes menos el disolvente, tal como agua). Una mayor parte de los sólidos totales puede consistir en el material bioactivo, el agente estabilizador y el agente protector. Por ejemplo, el material bioactivo puede estar presente en la formulación en una concentración que oscila desde aproximadamente 2 a 50 por ciento en peso, el agente estabilizador desde aproximadamente 1 a 20 por ciento en peso, y el agente protector desde aproximadamente 20 a 80 por ciento en peso. En otro ejemplo, el agente estabilizador puede estar presente en la formulación en una concentración que oscila desde aproximadamente 0,5 a 10 por ciento en peso, y el agente protector desde aproximadamente 10 a 40 por ciento en peso. Preferiblemente, la formulación húmeda debe tener un contenido de sólidos de entre aproximadamente 5 % y 80 %; más preferiblemente de entre aproximadamente 30 % a 60 %. La viscosidad de formulaciones de la invención es típicamente mayor de 1.000 centipoises (cP); más preferiblemente, mayor de 10.000 cP y menor de 450.000; y lo más preferiblemente mayor de 30.000 cP y menor de 100.000 cP.

La viscosidad de las formulaciones de la invención puede ser tan alta como 450.000 cP, siempre que los agentes protectores se disuelvan completamente en la solución. Se pueden conseguir suspensiones altamente viscosas y homogéneas que contienen una cantidad sustancial de sólidos totales a temperatura elevada, dependiendo de la termo- y osmosensibilidad del material bioactivo. Por ejemplo, formulaciones de células vivas que contienen 30 a 60 % de sólidos totales se pueden mezclar a temperatura elevada de aproximadamente 35 a 40 °C y la mezcla se lleva a cabo hasta que todos los agentes protectores se disuelven completamente.

Métodos de preparación de formulaciones secas estables

Métodos para preparar formulaciones secas estables para la conservación de microorganismos bioactivos incluyen, obtener un cultivo vivo de un microorganismo específico en una solución, pasta, perlas congeladas o en forma de polvo seco (estabilizado o no), concentrados. La preparación de una formulación mezclando, bajo vacío, el microorganismo o material bioactivo con los agentes estabilizadores y los agentes protectores en una solución, enfriando la formulación a una temperatura de no más de 10 °C por encima de su temperatura de congelación, y secando la formulación mediante evaporación de la humedad bajo presión reducida mientras se suministra calor a la

formulación.

En una realización, por ejemplo, una formulación que comprende un microorganismo o material bioactivo, los agentes estabilizadores y los agentes protectores se mezclan hasta homogeneidad, bajo vacío suave de aproximadamente 10 a 50 Torr, en una solución. La Figura 6 muestra el efecto de diferentes densidades de la formulación sobre su expansión bajo vacío. La introducción de aire durante la mezcla de los componentes de la formulación en una solución da como resultado excesiva y descontrolable formación de espuma incluso a presión de vacío relativamente alta. La etapa de mezcla bajo vacío según la invención resuelve este problema eliminando la introducción de aire o gas en la solución de la formulación, eliminando de ese modo la excesiva y descontrolada formación de espuma de la solución.

A continuación, la solución se enfría hasta una temperatura por encima de su punto de congelación (normalmente entre -5 °C y +5 °C). La Figura 7 muestra el efecto de preenfriamiento de la solución de la formulación sobre su expansión bajo presión de vacío. Sorprendentemente e inesperadamente se encontró que la ebullición se puede eliminar eficazmente incluso bajo una presión de vacío relativamente mayor y la expansión de la formulación se controla mejor cuando la temperatura de la solución se reduce a no más de 10 °C por encima de su temperatura de congelación. Como se ve en la Figura 7, se puede aplicar una presión de vacío de 3 Torr sin excesiva formación de espuma siempre que se enfríe la formulación a +5 °C y preferiblemente a -3 °C.

Una vez enfriada, la formulación se seca a continuación bajo vacío suficiente (por ejemplo, aproximadamente 3 Torr) para mantener esa temperatura de preenfriamiento durante la etapa de secado primario. La Figura 8 muestra el efecto de la presión de vacío aplicada sobre la temperatura de la solución de la formulación. A presión de vacío relativamente alta por encima de 8 Torr, la temperatura de formulación se incrementó a más de 6 °C y continua incrementándose rápidamente hacia la temperatura de estante o cámara. Al mismo tiempo, la solución continuará formando espuma y expandiéndose más. Esta realización se distingue de la técnica anterior anteriormente discutida (véase, por ejemplo, el documento de patente americana N° 6.534.087, en el que la presión de vacío aplicada está entre 3 a 7 Torr e incluso mayor), en la cual se aplica una presión de vacío más fuerte (<3 Torr) mientras se controla la expansión de la formulación. Este proceso da como resultado una tasa de secado significativamente más rápida (véase la Figura 9) y posibilita una alta capacidad de carga de la formulación. En esta realización, se elimina la excesiva formación de espuma y ebullición incluso bajo presiones de vacío mucho más bajas debido a que los métodos de la invención proporcionan a) una composición específica con una expansión controlada bajo vacío, b) un método que elimina la introducción de aire en la formulación durante la mezcla y c) un preenfriamiento sustancial de la formulación.

Los métodos típicos en la técnica anterior implican extensa formación de espuma y/o salpicado y ebullición violenta que pueden ser dañinos a productos biológicos sensibles y causar dificultades para el escalado industrial. Además, una desgasificación completa y eficaz de suspensiones viscosas es difícil y puede requerir un periodo de tiempo prolongado. Estos obstáculos se resolvieron en la presente invención llevando a cabo primero el proceso de mezcla completo bajo vacío suave para eliminar la introducción de gases incluidos en la formulación en primer lugar. Cualquier pequeña cantidad de gases solubles que puede quedar en la formulación, se elimina suavemente a continuación, permitiendo que la formulación se expanda moderadamente bajo vacío bajo. La etapa de preenfriamiento adicional de la formulación a una temperatura por encima de su temperatura de congelación proporciona un control añadido de la tasa de expansión y permite de ese modo una capacidad de carga por área de secado mucho mayor de la que se obtenía de acuerdo con la técnica anterior. Después de que se complete la fase de secado primario, la formulación seca estabilizada se mantiene a temperaturas de secado secundario elevadas (hasta 70 °C) y presiones de vacío de menos de 0,2 Torr para completar el secado de la formulación en un tiempo muy corto.

Otra realización de la invención proporciona métodos para preparar composiciones de la formulación en forma de hidrogel para la conservación de microorganismos o materiales bioactivos. Por ejemplo, una formulación que contiene una bacteria probiótica en una forma en polvo seco, un agente estabilizador y un agente protector, se mezclan en una solución, se reticula para formar un hidrogel añadiendo iones metálicos o cationes divalentes y, a continuación, se secan bajo vacío suave y baja temperatura como se describió anteriormente. La temperatura de preenfriamiento de la formulación se puede mantener mediante la conducción de calor fuera de la formulación, y/o por pérdida de calor latente debido a la evaporación de agua.

En una realización particular de la invención, por ejemplo, la formulación incluye un cultivo concentrado, fresco o congelado, o seco de bacterias probióticas vivas en una solución de 1 a 2,5 % de alginato de sodio (preferiblemente 1,5 % de alginato de sodio), de 1 % a aproximadamente 5 % de inulina (preferiblemente 2,5 % de inulina), de 20 % a 60 % de trehalosa (preferiblemente 40 % de trehalosa) y de 3 % a 15 % de hidrolizado de caseína (preferiblemente 8 % de hidrolizado de caseína al). La formulación se mezcla bajo vacío a una temperatura ligeramente por encima de la temperatura ambiente (generalmente entre 25 °C a 37 °C) hasta que todos los componentes se disuelven completamente.

En una realización adicional de la invención, todos los ingredientes se disuelven en la solución a temperatura elevada, a continuación, se enfría la suspensión a una temperatura entre 0 °C a -5 °C y un polvo seco de

microorganismo vivo se mezcla hasta que todos los componentes se disuelven completamente. Para facilitar la mezcla del polvo seco de organismo vivo y para prevenir el aglutinamiento, una cantidad pequeña de trehalosa se puede añadir al polvo seco (generalmente es suficiente una mezcla que contiene porciones iguales de polvo seco y trehalosa).

5 La suspensión de la formulación se extiende sobre las bandejas a capacidad de carga de aproximadamente 200 g/pies cuadrados y las bandejas se colocan sobre estantes en un liofilizador. La temperatura del estante se ajusta a 0 a -5 °C (preferiblemente -2 °C) y se deja enfriar la suspensión a esa temperatura. A continuación, se aplica la presión de vacío a 1 a 5 Torr (preferiblemente 3 Torr) y la temperatura del estante se incrementa a 20 °C a 45 °C (preferiblemente 30 °C) para transmitir el calor conductivo. La temperatura de la formulación permaneció a aproximadamente la temperatura de 0 a -5 °C durante la etapa de evaporación primaria para prevenir la congelación de la muestra. La etapa de secado secundario a vacío máximo de 0,1 Torr y temperatura de estante de 40 °C comienza cuando la temperatura del producto alcanza aproximadamente +10 °C. El proceso de secado completo prosigue durante 4 horas al cabo de las cuales el producto se recoge y la actividad del agua es de Aw -0,3 o menos.

15 En otra realización de la invención, las bandejas cargadas se preenfrian a -2 °C en una habitación fría, inmediatamente a continuación, se cargan en horno de secado a vacío para transmisión de calor radiante. Las etapas de secado primario y secundario se aplican a continuación tal como se describió anteriormente para la transmisión del calor conductivo.

20 **Preparación de la formulación**

Las formulaciones pueden incluir microorganismos vivos frescos, congelados o secos, formulados en una solución o suspensión que contiene un agente estabilizador de la formulación y un agente protector. El estabilizador de la formulación y/o una alta concentración de agente protector se pueden disolver en una solución acuosa calentada con agitación antes de ser enfriada y mezclada con los microorganismos bioactivos. Los microorganismos, tales como virus o bacterias, cultivados, se pueden concentrar y separar de los medios de cultivos por centrifugación o filtración, a continuación, se mezclan directamente dentro de la formulación de la presente invención, o se añaden con crioprotectores convencionales gota a gota en nitrógeno líquido y las pequeñas perlas congeladas se almacenan a -80 °C hasta que se mezclan en la formulación. Alternativamente, las perlas congeladas se pueden liofilizar, moler en un polvo fino, empaquetar en bolsas herméticas y almacenar refrigeradas hasta que se mezclen en la formulación de la invención. En una realización de la presente invención, la totalidad del agua en la formulación se proporciona 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 del agente estabilizador de la formulación y el agente protector se mezclan juntos y, a continuación, se añaden lentamente a la suspensión caliente del organismo vivo. La suspensión de la formulación se agita suavemente bajo vacío suave en un mezclador planetario hasta que todos los componentes se dispersan completamente y se obtiene suspensión uniforme.

40 En otra realización de la presente invención el microorganismo bioactivo está en forma de polvo seco y se premezcla en seco con ingredientes de la formulación antes de que se añada la mezcla seca resultante a agua a una temperatura ligeramente por encima de la temperatura ambiente.

45 El microorganismo o material bioactivo puede proporcionar cualquier bioactividad, tal como la actividad enzimática, la inducción de las respuestas inmunes, multiplicación celular, infección, inhibición del crecimiento celular, estimulación del crecimiento celular, efectos terapéuticos, efectos farmacológicos, efectos antimicrobianos y/o similares.

50 Los estabilizadores de formulación proporcionan estabilidad estructural a la formulación y/o beneficios protectores físicos y químicos a los microorganismos bioactivos. Los estabilizadores pueden proporcionar viscosidad espesante a la formulación y mejor control sobre sus propiedades de expansión bajo presión de vacío y fuerza estructural incrementada a las composiciones de formulación secada de la invención.

55 Los agentes protectores pueden incluir una diversidad de proteínas, hidrolizados de proteína, azúcares, alcoholes de azúcar y aminoácidos. Por ejemplo, azúcares tales como sacarosa o trehalosa pueden rodear físicamente el material bioactivo para promover la retención de la estructura molecular durante el proceso de secado e impartir rigidez estructural a la matriz amorfa en el estado seco. El agente protector puede reemplazar el agua de hidratación perdido durante el secado, para prevenir daños a las membranas celulares y la desnaturalización de las enzimas. Otras funciones de los agentes protectores pueden incluir proteger el material bioactivo de la exposición a la luz perjudicial, oxígeno, agentes oxidativos y humedad. La mayoría de los agentes protectores se pueden disolver fácilmente en una solución en cantidades que oscilan desde aproximadamente 0,1 por ciento en peso a aproximadamente 60 por ciento en peso.

60 **Preenfriamiento de la formulación**

65 Las formulaciones de la invención se pueden preenfriar antes de la aplicación de presión de vacío del proceso de secado, para proporcionar beneficios tales como un espesamiento adicional de la suspensión de la formulación, un

mejor control sobre la expansión de las formulaciones bajo presión de vacío baja, estabilización de microorganismo o material bioactivo, y/o aumento de la penetración de los componentes de formulación a través de las membranas celulares. El enfriamiento se puede aplicar mediante cualquier técnica apropiada conocida en la técnica. Por ejemplo, el enfriamiento puede ser por contacto y conducción con superficies frías, pérdida de calor latente, y/o similares. Típicamente, las formulaciones se guardan en recipientes o se extienden sobre bandejas de metal y se ponen en contacto con una superficie o una cámara de temperatura controlada en la que se equilibran a la temperatura controlada. Típicamente, las formulaciones de la invención se pueden preenfriar a una temperatura por encima de su temperatura de congelación (por ejemplo, entre -5 °C y +5 °C).

10 Secado primario de la formulación

Procesos típicos para la conservación de microorganismos bioactivos tales como, organismos vivos o atenuados, incluyen una combinación de condiciones de congelación y vacío que pueden dar como resultado daños de membrana y desnaturalización de componentes celulares. La técnica anterior enseña el uso de presiones de vacío superiores (por ejemplo, menos de 100 Torr), la adición de agentes crioprotectores específicos, etapas de concentración para obtener soluciones espesas (jarabe), y/o temperaturas iniciales superiores para prevenir la congelación. El uso de las formulaciones y los parámetros del proceso de la presente invención superan estas limitaciones y permiten una mayor capacidad de carga por área de secado que mejora significativamente la producción industrial.

La formulación en la presente invención se seca por evaporación. La eliminación del disolvente (humedad) del ambiente gaseoso alrededor de la formulación se puede realizar por condensación o desecación. La evaporación del disolvente de la formulación puede proporcionar un secado primario acelerado de la formulación bajo presión de vacío baja. La expansión controlada de la formulación acelera el secado primario de la formulación mediante una transferencia rápida del disolvente fuera de la formulación. La expansión controlada de la formulación se consigue mediante desgasificación suave (no ebullición) de los gases disueltos restantes cuando se aplica el vacío de secado. Puesto que es deseable no hervir la formulación o formar espuma excesivamente debido a que las cavitaciones y fuerzas transversales asociadas con la formación de burbujas durante la ebullición y/o la formulación puede desbordar del contenedor o tener un impacto negativo sobre el microorganismo bioactivo.

Mientras se produce el secado primario, se estabiliza la estructura de la formulación. El calor suministrado en la cámara de secado compensa la pérdida de calor latente causado por la evaporación del disolvente y la temperatura de la formulación se mantiene dentro de 10 °C por encima de su temperatura de congelación. En algún momento durante el proceso de secado primario, la tasa de evaporación del disolvente se reduce y la temperatura de la formulación comienza a incrementar debido al suministro de calor superfluo en la cámara de secado. Este punto indica el final de la etapa de secado primario en esta invención. Mientras el disolvente se conduce fuera de la formulación, los agentes protectores en la solución se vuelven concentrados y más espesos hasta que para de fluir como un líquido. La formulación amorfa y/o vítrea conserva una estructura de formulación estable.

40 Secado secundario

El secado secundario de la formulación estructuralmente estable elimina la humedad atrapada o unida restante y proporciona una composición que es estable en almacenamiento durante un periodo de tiempo prolongado a temperaturas ambiente. El secado secundario implica la aplicación de temperaturas elevadas y un fuerte vacío durante varias horas o días. En realizaciones preferidas el periodo de tiempo necesario para completar la etapa de secado secundario es el doble del tiempo de la etapa de secado primario. La actividad del agua de la formulación al final de la etapa de secado secundario es menor que una A_w de 0,3. La temperatura de secado puede oscilar desde aproximadamente la temperatura ambiente a aproximadamente 70 °C. Un proceso de secado secundario típico para muchos microorganismos bioactivos puede incluir elevar la temperatura desde aproximadamente 30 °C a aproximadamente 40 °C, y mantenerla desde aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 24 horas (preferiblemente desde aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 4 horas), para proporcionar una composición de formulación seca estable con actividad del agua de menos de una A_w de 0,3. En una realización particular del secado secundario, la temperatura de secado se eleva lentamente desde las condiciones de secado primario con una cadencia que puede conservar más la actividad de productos biológicos vivos tales como microorganismos vivos. Un vacío fuerte se puede proporcionar en el proceso de secado secundario para acelerar la tasa de eliminación de agua a niveles de humedad residuales inferiores. El vacío durante el secado secundario puede ser de menos de 1 Torr y, preferiblemente, menos de aproximadamente 0,2 Torr.

Los métodos de secado de la invención dan como resultado un microorganismo biológicamente activo o material bioactivo que está encerrado dentro de una matriz vítrea amorfa, previniendo de ese modo el desplegamiento de las proteínas y reduciendo significativamente las interacciones moleculares o reactividad cruzada, debido a movilidad muy reducida del compuesto y de otras moléculas dentro de la composición vítrea amorfa. Siempre y cuando el sólido amorfo esté a una temperatura por debajo de su temperatura de transición a cristal y la humedad residual permanezca relativamente baja (es decir, por debajo de A_w de 0,3), el microorganismo bioactivo lábil puede permanecer relativamente estable. Se debe indicar que conseguir un estado vítreo no es un prerrequisito para la estabilidad a largo plazo aunque a algunos microorganismos o materiales bioactivos pueden tener mejores

resultados en un estado más cristalino.

Preparación de polvo seco

5 La formulación secada se puede usar en bloque, cortada en formas y tamaños deseados, o triturada y molida en un polvo de flujo libre que proporciona un procesamiento posterior fácil, tal como la aglomeración húmeda o seca, granulación, formación de comprimido, compactación, peletización o cualquier otro tipo de proceso de administración. Los procesos de triturado, molido, machacado o pulverización son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede usar un molino de martillo, un molino de impacto, un molino de chorro, un molino de púas, un molino Wiley, o dispositivo de molido similar. El tamaño de partícula preferida es menor que aproximadamente 1.000 µm y preferiblemente menor que 500 µm.

15 Las composiciones y los métodos descritos en el presente documento conservan la actividad biológica del microorganismo biológicamente activo o materiales bioactivos encerrados. Por ejemplo, se ha ensayado la estabilidad en las composiciones sometiénolas a temperatura elevada (por ejemplo, 40 °C) y alta humedad (por ejemplo, HR al 33 %) y midiendo la actividad biológica de las formulaciones. Como ejemplo para las bacterias probióticas vivas, los resultados de estos estudios demuestran que las bacterias formuladas en estas formulaciones son estables durante al menos 60 días (véase Figura 1). La estabilidad se define como el tiempo en el cual se produce la pérdida de eficacia de un log UFC/g. Tales formulaciones son estables incluso cuando se usan altas concentraciones de material biológicamente activo. Por tanto, estas formulaciones son ventajosas dado que se pueden transportar y almacenar a temperaturas de o por encima de la temperatura ambiente durante largos periodos de tiempo.

25 Ejemplos

Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar, pero no limitan la invención reivindicada.

Ejemplo 1

30 Preparación de la formulación premezclada seca:

35 Se prepararon varias premezclas de formulación según la Tabla 1. La trehalosa se obtuvo de Cargill Minneapolis, MN. El aislado de proteína de soja se obtuvo de "Fearn Natural Foods", Mequon, WI. El concentrado de proteína de suero de leche se obtuvo de Agri-Mark Inc., Middlebury, VT. El hidrolizado de caseína se obtuvo de Marcor, Carlstadt, NJ, y el alginato de sodio de ISP Corp., Wayne, NJ. Todos los ingredientes se combinaron juntos y se mezclaron uniformemente (Tabla 1).

Tabla 1. Composición de premezcla de formulaciones (porcentaje en peso)

Compuesto	Premezcla de soja	Premezcla de suero de leche	Premezcla de hidrolizado de proteína
Alginato de sodio	3,0	3,0	3,0
Inulina	5,0	5,0	5,0
Trehalosa	75,3	75,3	75,3
Aislado de proteína de soja	14	-	-
Concentrado de proteína de suero de leche	-	14	-
Hidrolizado de caseína	2,7	2,7	16,7

40 Ejemplo 2

Polvo seco estable que contiene bacterias probióticas:

45 Se descongeló *Lactobacillus acidophilus* (100 g de concentrado congelado de una recolección de fermentación de laboratorio) a 37 °C. La premezcla de hidrolizado de proteína (100 g, Tabla 1) se añadió lentamente a la suspensión descongelada de bacterias probióticas en un mezclador planetario doble cubierto (DPM, 1qt, Ross Engineering, Inc. Savannah, GA.). La mezcla se llevó a cabo bajo vacío suave (25 Torr) a 40 rpm y 37 °C durante 10 minutos. La suspensión homogénea se extendió uniformemente sobre una bandeja a una capacidad de carga de 200 g/pies cuadrados y la bandeja se colocó sobre un estante en un liofilizador (Modelo 25 SRC, Virtis, Gardiner, NY). La temperatura de almacenamiento se fijó por encima de la temperatura de congelación de la suspensión a -5 °C para enfriar, pero no congelar, la suspensión. La presión de vacío (3 Torr) se aplicó cuando la temperatura de formulación alcanzó aproximadamente -1 °C. La suspensión comienza a desgasificarse suavemente cuando el vacío alcanzó aproximadamente 7 Torr. Cuando el vacío alcanzó 3 Torr, la temperatura de almacenamiento se incrementó a 50 °C.

55 La temperatura de formulación permaneció a aproximadamente -1 °C a aproximadamente +5 °C durante los primeros 50 minutos de la etapa de secado primario. Una vez que la temperatura de la formulación se incrementó a

+10 °C, se inició la etapa de secado secundario. El vacío máximo de 0,1 Torr se aplicó mientras aún la temperatura de estante continuaba manteniéndose a 50 °C. La etapa de secado secundario se continuó durante 100 minutos adicionales, en dicho tiempo el proceso de secado se terminó y las fórmulas secas se sacaron del liofilizador. La actividad del agua de la formulación seca en este momento era de $A_w=0,23$ medida por un instrumento Hygropalm Aw1 (Rotonic Instrument Corp., Huntington, NY.).

Las pérdidas de viabilidad durante los procesos de formulación, preparación y secado se presentan en la Figura 9. Las pérdidas de viabilidad durante la preparación de la formulación fueron de 0,26 logs y 0,34 logs durante el proceso de secado resultando en una pérdida acumulativa total de 0,6 logs.

La Figura 10 muestra la estabilidad de almacenamiento de la formulación seca bajo condiciones de almacenamiento acelerado de 37 °C y HR al 33 %. Después de cuatro semanas a estas condiciones de almacenamiento, la pérdida de viabilidad de las bacterias probióticas estabilizadas en la formulación de la invención fue solamente de 0,8 logs.

Ejemplo 3

Preparación de una formulación de hidrogel:

La suspensión probiótica concentrada se preparó según el Ejemplo 2 pero usando la premezcla de proteína de suero de leche de la Tabla 1. A esta suspensión, se añadieron 0,5 g de fosfato de calcio dibásico, seguido de 0,5 g de gluconolactona. La suspensión se dejó endurecer a temperatura ambiente durante las siguientes 2 horas para formar un hidrogel sólido. El gel firme se recortó en hebras finas y largas, usando una rebanadora/trituradora comercialmente disponible. Las hebras finas se cargaron sobre una bandeja a una capacidad de carga de 200 g/pies cuadrados y se colocaron en un liofilizador durante el secado como se describe en el Ejemplo 2. Cuatro horas después de establecer el vacío máximo de 0,1 Torr, el producto secado se sacó del liofilizador. La actividad del agua (A_w) de la formulación era de 0,05 (Medida por HygroPalm Aw1, Rotonic Huntington, NY). La formulación seca se machacó a continuación hasta obtener un polvo fino usando un equipo de molino de martillos estándar y se cribó a través de tamices de 50 a 250 micras. La Figura 11 presenta un diagrama de flujo del método de producción de una formulación seca estable a partir de una formulación de un hidrogel según la invención.

Ejemplo 4

Preparación de alimento para mascotas probiótico:

Un alimento para mascotas granulado (*pellet*) para perros comercialmente disponible se seca en un horno de convección hasta una actividad del agua de 0,1 y, a continuación, se recubre con la formulación seca probiótica estable preparada como se describe en el Ejemplo 3. Los gránulos secos se rocían con aproximadamente 5 % de una barrera de vapor basada en grasa (una mezcla de grasa de pollo al 40 %, manteca de cacao al 40 % y acera de abeja al 20 %), se mezclan en un agitador de tambor con la formulación en polvo seco (normalmente 0,1 a 0,5 % de alimento para mascotas total que proporciona una dosis de 10^8 UFC/g) y finalmente se rocían con un recubrimiento adicional de la barrera de vapor basada en grasa. La cantidad total de recubrimiento es de aproximadamente 15 % (del alimento para mascotas). El tiempo de recubrimiento es de aproximadamente 30 min.

Ejemplo 5

Preparación de alimento para peces con varios microorganismos probióticos:

El alimento granulado (*pellet*) para peces según la presente invención se preparó con una mezcla de varios probióticos. Una formulación probiótica seca estable que contiene una mezcla de *L. rhamnosus*, *L. acidophilus* y *Bifidobacterium lactis* se preparó como se describe en el Ejemplo 2. Un alimento de inicio comercialmente disponible para salmón (Zeigler Bros., Gardners, PA) se secó primero en un horno de convección hasta una actividad del agua de 0,1 y, a continuación, se recubrió con la formulación de probióticos en un agitador de tambor. Los gránulos (100 g) primero se rociaron con aproximadamente 5 % en peso de barrera de vapor basada en grasa (una mezcla de aceite de pescado al 40 %, manteca de cacao al 40 % y acera de abeja al 20 %), a continuación, se mezcló con 1 g de la formulación probiótica seca estable (para lograr una dosis de 10^7 UFC/g alimento), y finalmente se rociaron con recubrimiento adicional de la barrera de vapor basada en grasa. La cantidad total de recubrimiento fue de aproximadamente 10 % del alimento para peces.

Ejemplo 6

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

Se prepara una formulación seca estable que contiene *Lactobacillus* GG (Valio Corp, Finlandia) según el Ejemplo 2 seguido de un cribado en dos grupos de tamaño de partículas (por encima de 50 μm y por debajo de 150 μm). Se prepara una fórmula infantil mezclando 99 g de Nutramigen (Mead Johnson; Evansville, IL) con 0,1 g de las partículas de pequeño tamaño (por debajo de 50 μm). El producto final contiene aproximadamente 10^8 UFC de

Lactobacillus GG por 100 g de fórmula infantil.

Ejemplo comparativo 7

5 Polvo seco estable que contiene una enzima:

Se prepara una fórmula de hidrogel que contiene 40 por ciento en peso de Savinasa (Novozymes, Dinamarca) mezclando, bajo vacío suave, 60 g de premezcla de formulación de hidrolizado de proteína (Tabla 1) y 40 g de savinasa en 100 g de solución de agua. La formulación húmeda se seca en un horno de vacío a una temperatura de secado de 50 °C. Para la determinación de la estabilidad de carga y almacenamiento de la fórmula secada: se pesa con exactitud una muestra seca (<100 mg) en un tubo de microcentrífuga. Se añade 200 µl de dimetil sulfóxido (DMSO). La formulación se disuelve en el tampón de DMSO mediante agitación en vórtex. A esta muestra, se añade 0,8 ml de una solución que contiene NaOH 0,05 N, SDS al 0,5 % y ácido cítrico 0,075 M (sal de trisodio). Los tubos se someten a sonicación durante 10 min a 45 °C, seguido de una breve centrifugación a 5.000 rpm durante 10 min.

10

15 Alícuotas de la solución clara DMSO/NaOH/SDS/Citrato se colocan en pocillos de una microplaca y se analizan para medir el contenido de proteína usando el método de ensayo de Bradford. La estabilidad de almacenamiento de la formulación de enzima estable es significativamente mayor que la de una enzima seca sin la formulación de la presente invención.

20 Ejemplo comparativo 8

Polvo seco estable que contiene vitamina A:

Se prepara una fórmula de hidrogel que contiene 50 por ciento en peso de vitamina A (BASF Corp., Florham Park, N.J) mezclando, bajo 25 Torr de vacío, 50 g de premezcla de formulación de proteína de soja (Tabla 1) y 50 g de vitamina A en polvo en 100 g de solución de agua. La formulación húmeda se preenfía a -5 °C, a continuación, se extiende sobre bandejas a una capacidad de carga de 200 g/pies cuadrados y se seca en un horno de vacío a una presión de vacío inicial de 3 Torr y temperatura de 70 °C, seguido de una etapa de vacío máximo de 0,2 Torr a 70 °C una vez que la temperatura de la formulación alcanzó 5 °C.

25

30

Ejemplo comparativo 9

Preparación de cebo de especies invasivas:

El cebo granulado especialmente dirigido a especies invasivas según la presente invención se prepara conteniendo un pesticida. La premezcla de proteína de suero de leche de la Tabla 1 se añade a 200 g de agua. A esta solución se añade 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 se corta en hebras finas y largas a través de una rebanadora/trituradora. Las hebras finas se cargan sobre una bandeja y se colocan en un secador de horno de vacío. El secado se para después de alcanzar una actividad del agua de 0,10. La formulación seca se machaca para obtener la distribución de tamaño apropiada en la especificación de tamaño del cebo para las especies objetivo específicas.

35

40

Ejemplo comparativo 10

45

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

Una formulación granular soluble protegida de un pesticida que de otro modo estaría sujeto a descomposición por otros ingredientes en una formulación durante el almacenamiento se prepara mediante el proceso de la presente invención. La premezcla de proteína de soja de la Tabla 1 se añade a 200 g de agua. A esta solución se añade 80 g de una formulación seca de un pesticida formulado sensible. La suspensión se traslada a un secador de horno de vacío y se seca para una actividad del agua de 0,1. La formulación seca se muele hasta el tamaño deseado y se empaqueta.

50

55 Ejemplo comparativo 11

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

Una formulación granular insoluble protegida de un pesticida que de otro modo estaría sujeto a descomposición por otros ingredientes en una formulación durante el almacenamiento se prepara con la formulación y el método de la presente invención. La premezcla de proteína de soja de la Tabla 1 se añade a 200 g de agua. A esta solución se añade 90 g de una formulación seca de un pesticida sensible y 0,5 g de fosfato de calcio dibásico, seguido de 0,55 g de gluconolactona. La suspensión se deja endurecer a temperatura ambiente durante 2 horas y, a continuación, se corta en hebras finas y largas por una rebanadora/trituradora. Las hebras finas se cargan sobre bandejas y se secan en un secador de horno de vacío para alcanzar una actividad del agua de 0,1. La formulación seca se muele a continuación hasta obtener la distribución de tamaño deseada y se empaqueta.

60

65

Ejemplo 12

Se mezclan diez (10) gramos de *Lactobacillus Rhamnosus GG* seco con 100 g de la premezcla de hidrolizado de proteína del Ejemplo 1 (tabla 1). Esta mezcla seca se añade lentamente a 100 g de agua desionizada a 35 °C en un mezclador planetario doble cubierto, y se mezcla durante 10 minutos a 40 rpm. La suspensión homogénea se extiende uniformemente sobre una bandeja a una capacidad de carga de 100 g/pies cuadrados, y la bandeja se coloca sobre un estante en un liofilizador (Modelo 25 SRC, Virtis, Gardiner, NY). La temperatura del estante se fija a 5 °C para enfriar la suspensión. Se aplica vacío para reducir la presión a 3 Torr, en dicho momento la temperatura del estante se eleva a 30 °C. Después de 2 horas la presión se reduce más a 150 miliTorr con la temperatura de estante mantenida aún a 30 °C. Se continúa el secado durante unas 3 horas adicionales y en dicho momento la temperatura del producto se ha elevado a una temperatura dentro de 2 °C de la temperatura del estante. A continuación, el producto secado se saca del liofilizador y la actividad del agua de la formulación seca en este momento se mide por un instrumento Hygropalm Aw1. Las pérdidas de viabilidad durante los procesos de formulación, preparación y secado se miden y registran. El ensayo de estabilidad de almacenamiento de la formulación seca se conduce bajo condiciones de almacenamiento acelerado de 32 °C y HR al 20 %.

A continuación, se muestran los resultados para el ensayo a 30 °C, y también para uno repetido a 40 °C

Actividad del agua después del secado	0,25	0,26
Pérdidas durante el secado	0,5 log	0,7 log
Pérdidas durante el almacenamiento	0,4 log	0,7 log

20 Ejemplo 13

Se mezclan veinte (20) gramos de *Lactobacillus rhamnosus GG* seco con 100 g de la premezcla de proteína de suero de leche del Ejemplo 1. Esta mezcla seca se añade lentamente a 100 g de agua desionizada a 35 °C en un mezclador planetario doble cubierto, y se mezclan durante 10 minutos a 40 rpm. La suspensión homogénea se extiende uniformemente sobre una bandeja a una capacidad de carga de 100 g/pies cuadrados, y la bandeja se coloca sobre un estante en un liofilizador (Modelo 25 SRC, Virtis, Gardiner, NY). La temperatura del estante se fija a 5 °C para enfriar la suspensión. Se aplica vacío para reducir la presión a 3 Torr, en dicho momento la temperatura del estante se eleva a 30 °C. Después de 2 horas la presión se reduce más hasta 150 miliTorr con la temperatura del estante mantenida aún a 30 °C. Se continúa el secado durante unas 3 horas adicionales y en dicho momento la temperatura del producto se ha elevado a una temperatura dentro de 2 °C de la temperatura del estante. A continuación, el producto secado se saca del liofilizador y la actividad del agua de la formulación seca en este momento se mide por un instrumento Hygropalm Aw1. Las pérdidas de viabilidad durante los procesos de formulación, preparación y secado se miden y registran.

35 El ensayo de estabilidad de almacenamiento de la formulación seca se conduce bajo condiciones de almacenamiento acelerado de 32 °C y HR al 20 %.

A continuación, se muestran los resultados para el ensayo a 30 °C y también para uno repetido, pero llevado a cabo a 40 °C:

40

Actividad del agua después del secado	0,23	0,26
Pérdidas durante el secado	0,6 log	0,7 log
Pérdidas durante el almacenamiento	0,8 log	0,7 log

Ejemplo 14

45

Se mezclan diez (10) gramos de *Lactobacillus acidophilus* seco con 10 g de trehalosa y se apartan brevemente mientras 65,3 g de trehalosa, 3 g de alginato de sodio, 5 g de inulina y 16,7 g de hidrolizado de suero de leche se mezclan juntos como un polvo seco y se añaden lentamente a 100 g de agua desionizada a 35 °C en un mezclador planetario doble cubierto, y se mezclan durante 5 minutos a 40 rpm. A esta suspensión se añade la premezcla seca de *Lactobacillus acidophilus* y trehalosa, y se continúa el mezclado durante unos 5 minutos adicionales a 35 °C. La suspensión homogénea se extiende uniformemente sobre una bandeja a una capacidad de carga de 100 g/pies cuadrados, y la bandeja se coloca sobre un estante en un liofilizador (Modelo 25 SRC, Virtis, Gardiner, NY). La temperatura del estante se fija a 5 °C para enfriar la suspensión. Se aplica vacío para reducir la presión a 3 Torr, en dicho momento la temperatura del estante se eleva a 30 °C. Después de 2 horas la presión se reduce más hasta 150 miliTorr con la temperatura del estante mantenida aún a 30 °C. El secado se continúa durante unas 3 horas adicionales y en dicho momento la temperatura del producto se ha elevado a una temperatura dentro de 2 °C de la temperatura del estante. El producto secado se saca del liofilizador y la actividad del agua de la formulación seca en este momento se mide por un instrumento Hygropalm Aw1. Las pérdidas de viabilidad durante los procesos de formulación, preparación y secado se miden y registran. El ensayo de estabilidad de almacenamiento de la formulación seca se conduce bajo condiciones de almacenamiento acelerado de 32 °C y HR al 20 %. Los resultados

60

para el ensayo en el que el secador se mantiene a 30 °C y comparado con aquellos en los que el secador se mantiene a 50 °C se muestran en la Tabla de a continuación.

Actividad del agua después del secado	0,23	0,26
Pérdidas durante el secado	0,6 log	0,7 log
Pérdidas durante el almacenamiento	0,8 log	0,9 log

5 Ejemplo 15

Se mezclan diez (10) gramos de *Lactobacillus acidophilis* seco con 10 g de trehalosa y se apartan brevemente mientras 65,3 g de trehalosa, 3 g de alginato de sodio, 5 g de inulina y 16,7 g de hidrolizado de suero de leche se mezclan juntos como un polvo seco y se añaden lentamente a 100 g de agua desionizada a 50 °C en un mezclador planetario doble cubierto, y se mezclan durante 5 minutos a 40 rpm. La suspensión se enfría a 4 °C. A esta suspensión enfriada se añade la premezcla de *Lactobacillus acidophilis* y trehalosa, y el mezclado se continúa durante unos 5 minutos adicionales a 4 °C. La suspensión homogénea se extiende uniformemente sobre una bandeja a una capacidad de carga de 100 g/pies cuadrados, y la bandeja se coloca sobre un estante en un liofilizador (Modelo 25 SRC, Virtis, Gardiner, NY). La temperatura del estante se fija a 5 °C para mantener la temperatura de la suspensión fría. Se aplica vacío para reducir la presión a 3 Torr, en dicho momento la temperatura del estante se eleva a 30 °C. Después de 2 horas la presión se reduce más hasta 150 miliTorr con la temperatura del estante mantenida aún a 30 °C. El secado se continúa durante unas 3 horas adicionales y en dicho momento la temperatura del producto se ha elevado a una temperatura dentro de 2 °C de la temperatura del estante. El producto secado se saca del liofilizador. La actividad del agua de la formulación seca en este momento es de Aw=0,23 medida por un instrumento Hygropalm Aw1. Las pérdidas de viabilidad durante los procesos de formulación, preparación y secado ascienden a 0,6 logs.

Ejemplo 16

Se añaden lentamente cien (100) gramos de premezcla de soja a 100 g de agua desionizada a 35 °C en un mezclador doble cubierto, y se mezclan durante 10 minutos a 40 rpm. Diez (10) gramos de *Bifidobacterium lactis* Bb-12 seco se añaden lentamente mezclando a 20 rpm, y la suspensión se mezcla durante unos 5 minutos adicionales. La suspensión homogénea se extiende uniformemente sobre una bandeja a una capacidad de carga de 100 g/pies cuadrados, y la bandeja se coloca sobre un estante en un liofilizador (Modelo 25 SRC, Virtis, Gardiner, NY). La temperatura del estante se fija a 5 °C para enfriar la suspensión. Se aplica vacío para reducir la presión a 3 Torr, en dicho momento la temperatura del estante se eleva a 30 °C. Después de 2 horas la presión se reduce más hasta 150 miliTorr con la temperatura del estante mantenida aún a 30 °C. El secado se continúa durante unas 3 horas adicionales y en dicho momento la temperatura del producto se ha elevado a una temperatura dentro de 2 °C de la temperatura del estante. El producto secado se saca del liofilizador y la actividad del agua de la formulación seca en este momento es de Aw=0,26 medida por un instrumento Hygropalm Aw1. Las pérdidas de viabilidad durante los procesos de formulación, preparación y secado ascienden a 0,7 logs.

El ensayo de estabilidad de almacenamiento de la formulación seca bajo condiciones de almacenamiento acelerado de 32 °C y HR al 20 % muestra una pérdida de viabilidad de las bacterias probióticas estabilizadas en la formulación de la invención de solamente de 0,7 logs después de cuatro semanas.

Ejemplo 17

Los mismos parámetros que el Ejemplo N° 1, excepto que la mezcla realizada en el mezclador Ross es bajo 25 pulgadas de vacío para dar una densidad de suspensión de 1,2 g/cc. La actividad del agua de la formulación seca en este punto es de Aw=0,26 medida por el instrumento Hygropalm Aw1. Las pérdidas de viabilidad durante los procesos de formulación, preparación y secado ascienden a 0,5 logs.

El ensayo de estabilidad de almacenamiento de la formulación seca bajo condiciones de almacenamiento acelerado de 32 °C y HR al 20 % muestra una pérdida de viabilidad de las bacterias probióticas estabilizadas en la formulación de la invención de solamente 0,7 logs después de cuatro semanas.

Ejemplo 18

Se añaden cien (100) gramos de un concentrado líquido fresco de bacterias LGG (que contienen sólidos al 10 % y el resto agua) a un mezclador planetario doble cubierto y se calientan a 35 °C. A esto se añaden lentamente 100 g de premezcla de suero de leche (Tabla 1). La suspensión resultante se mezcla 10 minutos a 40 rpm. La suspensión homogénea se extiende uniformemente sobre una bandeja a una capacidad de carga de 100 g/pies cuadrados, y la bandeja se coloca sobre un estante en un liofilizador (Modelo 25 SRC, Virtis, Gardiner, NY). La temperatura del estante se fija a 5 °C para enfriar la suspensión. Se aplica vacío para reducir la presión a 3 Torr, en dicho momento la temperatura del estante se eleva a 30 °C. Después de 2 horas la presión se reduce más hasta 150 miliTorr con la temperatura del estante mantenida aún a 30 °C. El secado se continúa durante unas 3 horas adicionales y en dicho

momento la temperatura del producto se ha elevado a una temperatura dentro de 2 °C de la temperatura del estante. El producto secado se saca del liofilizador. La actividad del agua de la formulación seca en este momento es de $A_w=0,25$ medida por un instrumento Hygropalm Aw1. Las pérdidas de viabilidad durante los procesos de formulación, preparación y secado ascienden a 0,5 logs. El ensayo de estabilidad de almacenamiento de la formulación seca bajo condiciones de almacenamiento acelerado de 32 °C y HR al 20 % muestra una pérdida de viabilidad de las bacterias probióticas estabilizadas en la formulación de la invención de solamente 0,4 logs después de cuatro semanas.

Ejemplo 19

Se añadieron *Lactobacillus rhamnosus GG (LGG)* cien (100) gramos de concentrado congelado, no descongelado, y 100 g de premezcla de hidrolizado de proteína a un mezclador planetario doble cubierto (DPM, 1pt, Ross Engineering, Inc., Savannah, GA). Este proceso también se puede hacer descongelando primero el concentrado congelado. La mezcla se lleva a cabo a 40 rpm y 37 °C durante 10 minutos. Se midió la viscosidad de la suspensión homogénea (viscosímetro Brookfield, Modelo N° LVDVE115, Brookfield Engineering Laboratories, Inc.) y, a continuación, se extendió uniformemente sobre una bandeja a una capacidad de carga de 100 g/pies cuadrados. Los parámetros de viscosidad para intervalos de alta viscosidad eran: 300 g de muestra en un matraz Pyrex de 400 ml, 33 a 37 °C, Eje N° 64, velocidad 1,0 rpm, operado sin una guarda. A continuación, la bandeja se cargó en un refrigerador a -4 °C para enfriar durante 30 min. Después de enfriar, se comenzó el secado usando un liofilizador (Modelo 25 SRC, Virtis, Gardiner, NY) con una temperatura de estante fijada a 30 °C durante toda la etapa, y 2.800 mTorr de presión durante al menos 2,5 horas. Después de al menos 2,5 horas, la presión se redujo hasta 100 mTorr durante al menos otras 2,5 horas. Este experimento se repitió con dos lotes diferentes de fermentado LGG, y se incluyó el lavado de un lote con DMV al 3 % y la reconstitución con agua desionizada antes de añadir la premezcla de hidrolizado.

Muestra	UFC/g del producto final	Pérdidas durante el secado	Viscosidad de la suspensión (cP)
LGG Lote N° 1	$2,20 \times 10^{+10}$	0,61	410.000
LGG Lote N° 2	$7,00 \times 10^{+10}$	0,48	No disponible
LGG Lote N° 2 lavado	$1,38 \times 10^{+11}$	0,21	319.000

Los parámetros de viscosidad para los intervalos de viscosidad media eran: 300 g de muestra en un matraz Pyrex de 400 ml, 33 a 37 °C, Eje N° 64, velocidad de 5,0 rpm, operado sin una guarda.

Muestra	UFC/g del producto final	Pérdidas durante el secado	Viscosidad de la suspensión (cP)
LGG Lote N° 4	$1,39 \times 10^{+11}$	0,18	58.100
LGG Lote N° 4 lavado	$1,31 \times 10^{+11}$	0,23	36.200

Ejemplo 20

Se descongeló *Lactobacillus rhamnosus GG (LGG)* cien (100) gramos de concentrado congelado a 37 °C y se añadieron a un mezclador planetario doble cubierto (DPM, 1pt, Ross Engineering, Inc., Savannah, GA). A esto, se añadieron 100 g de premezcla de hidrolizado de proteína. También se puede usar concentrado congelado no descongelado. La mezcla se lleva a cabo a 40 rpm y 37 °C durante 10 minutos y, a continuación, la suspensión se extiende uniformemente sobre bandejas a una capacidad de carga de 100 g/pies cuadrados. A continuación, se cargaron las bandejas en un refrigerador a -4 °C para enfriar durante 30 min. Después de enfriar, se comienza el secado usando un liofilizador (Modelo 25 SRC, Virtis, Gardiner, NY) con una temperatura del estante fijada a 30 °C durante toda la etapa, y 2.800 mTorr de presión durante al menos 2,5 horas. Después de al menos 2,5 horas, la presión se redujo hasta 100 mTorr durante al menos otras 2,5 horas. Este mismo proceso se aplicó a 10 g de material de LGG secado (en polvo), el cual se mezcló en 100 g de hidrolizado de proteína. Esta mezcla seca, a continuación, se añadió lentamente a 90 g de agua desionizada en el mezclador planetario doble cubierto.

Muestra	Pérdidas durante el secado (logs)
LGG seco/ producto final MM	1,26
Concentrado LGG congelado/ producto final MM	1,46

Ejemplo comparativo 21

Polvo seco estable que contiene enzima:

Se mezclan cuarenta (40) gramos de enzima proteolítica (Novozymes, Dinamarca) en forma de polvo seco con 60 g de premezcla de soja (Tabla 1). Esta mezcla seca se añade lentamente a 100 g de agua desionizada a 35 °C en un mezclador planetario doble cubierto, y se mezclan durante 10 minutos a 40 rpm. La suspensión homogénea se extiende uniformemente sobre una bandeja a una capacidad de carga de 100 g/pies cuadrados, y la bandeja se

coloca sobre un estante en un liofilizador (Modelo 25 SRC, Virtis, Gardiner, NY). La temperatura del estante se fija a 5 °C para enfriar la suspensión. Se aplica vacío para reducir la presión a 3 Torr, en dicho momento la temperatura del estante se eleva a 60 °C. Después de 1 hora la presión se reduce más hasta 150 miliTorr con la temperatura del estante mantenida aún a 60 °C. El secado se continúa durante una 1 hora adicional y en dicho momento la temperatura del producto se ha elevado a una temperatura dentro de 2 °C de la temperatura del estante. El producto secado se sacó del liofilizador. Para la determinación de la estabilidad de carga y almacenamiento de la fórmula secada: la muestra seca se pesa con exactitud (<100 mg) en un tubo de microcentrífuga y se añade 200 µg de dimetil sulfoxido (DMSO). La formulación se disuelve en el tampón DMSO agitando en un vórtex. A esta muestra, se añade 0,8 ml de una solución que contiene NaOH 0,05 N, SDS al 0,5 % y ácido cítrico 0,075 M (sal trisodio). Los tubos se someten a sonicación durante 10 min a 45 °C, seguido de una breve centrifugación a 5.000 rpm durante 10 min. Alícuotas de la solución DMSO/NaOH/SDS/Citrato clara se colocan en pocillos de una microplaca y se analizan para determinar el contenido de proteína usando el método de ensayo Bradford. La estabilidad de almacenamiento de la formulación enzimática estable es significativamente mayor que la de una enzima seca sin la formulación de la presente invención.

Referencias

Los contenidos de las referencias citadas en el presente documento se incorporan por referencia al presente documento para todos los fines.

6.964.771 "Method for stably incorporating substances within dry, foamed glass matrices". Septiembre 1997. Roser y col.

5.766.520 "Preservation by formulation formation". Junio 1998. Bronshtein

6.534.087 "Process for preparing a pharmaceutical composition". Junio 2001. Busson y Schroeder.

6.884.866 "Bulk drying and the effects of inducing bubble nucleation". Abril 2005. Bronshtein.

7.153.472 "Preservation and formulation of living cells for storage and delivery in hydrophobic carriers". Diciembre, 2006. Bronshtein.

20080229609 "Preservation by Vaporization". Junio 2005. Bronshtein.

6.306.345 "Industrial scale barrier technology for preservation of sensitive biological materials at ambient temperatures" Octubre 2001. Bronshtein y col.

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.

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).

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

REIVINDICACIONES

1. Una composición seca estable que comprende (i) un microorganismo o material bioactivo, (ii) al menos dos agentes estabilizadores y (iii) al menos dos agentes protectores,
 5 donde el microorganismo o material bioactivo es un probiótico;
 donde los al menos dos agentes estabilizadores comprenden alginato de sodio e inulina;
 donde los al menos dos agentes protectores comprenden una mezcla de un disacárido, y un hidrolizado de proteína;
 y
 10 donde el microorganismo o material bioactivo está encerrado dentro de una matriz vítrea amorfa.
2. La composición de la reivindicación 1, donde los estabilizadores están presentes en una cantidad que va desde aproximadamente el 1 por ciento en peso a aproximadamente el 20 por ciento en peso.
3. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, donde los agentes protectores son fácilmente solubles en una
 15 solución y no espesan o polimerizan en contacto con agua.
4. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, donde el hidrolizado de proteína se selecciona del grupo que consiste en hidrolizados de suero humano, albumina de suero bovina, ovoalbumina, gelatina, inmunoglobulinas, proteína de soja aislada, proteína de trigo, leche desnatada en polvo, caseinato, proteína de suero de leche y
 20 proteína de guisante.
5. La composición de la reivindicación 1, donde la cantidad total de los agentes protectores está entre 20 y 70 por ciento en peso.
- 25 6. La composición de la reivindicación 1, preparada a partir de un cultivo fresco o congelado o seco de bacterias probióticas vivas en una solución de 1 % a 2,5 % de alginato de sodio, 1 % a 5 % de inulina, 20 % a 60 % de trehalosa y 3 % a 15 % de hidrolizado de caseína.
- 30 7. La composición de la reivindicación 1, donde el organismo o material bioactivo comprende bacterias probióticas y en la que la composición se somete como mucho a 1 log UFC/g de pérdida de eficacia durante 60 días a 40 °C y humedad relativa al 33 %.
8. Un método para preparar una composición seca estable de cualquier reivindicación precedente, donde dicho método comprende: (i) mezclar bajo vacío un microorganismo o material bioactivo, los al menos dos agentes
 35 estabilizadores y los al menos dos agentes protectores en un disolvente acuoso; (ii) enfriar la mezcla de la etapa (i) a una temperatura por encima de su temperatura de congelación; (iii) secado primario de la mezcla enfriada por evaporación, bajo vacío, a una temperatura por encima de su temperatura de congelación; (iv) secado secundario de la mezcla bajo vacío a una temperatura de 20 °C o más durante un tiempo suficiente para reducir la actividad del agua de la mezcla a $A_w=0,3$ o menos.
- 40 9. El método de la reivindicación 8, donde el secado de la mezcla se lleva a cabo por evaporación.
10. El método de la reivindicación 8, donde la etapa de secado secundario comienza cuando se incrementa la temperatura de la mezcla en al menos 10 °C por encima de su temperatura de secado inicial.
 45 11. El método de la reivindicación 8, donde la mezcla secada se corta, tritura, muele o respectivamente se pulveriza en un polvo de flujo libre, y el tamaño de partícula es menor que 1.000 μm .
12. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, donde los agentes protectores se disuelven en el disolvente acuoso para formar una mezcla homogénea, donde el secado primario de la mezcla enfriada se realiza bajo vacío en un intervalo desde 0,0039 bar a 0,0093 bar y donde el secado secundario de la mezcla se realiza a una presión de vacío de menos de 0,0002 bar.
 50 13. El método de la reivindicación 12, donde el microorganismo o material bioactivo se añade a la solución acuosa después de que se disuelvan los agentes protectores.
14. El método de la reivindicación 8, que comprende además la administración de la composición a un mamífero como un líquido reconstituido o como un polvo molido y como un alimento o producto alimenticio.
- 60 15. La composición de la reivindicación 1, obtenida mediante el método de la reivindicación 8.

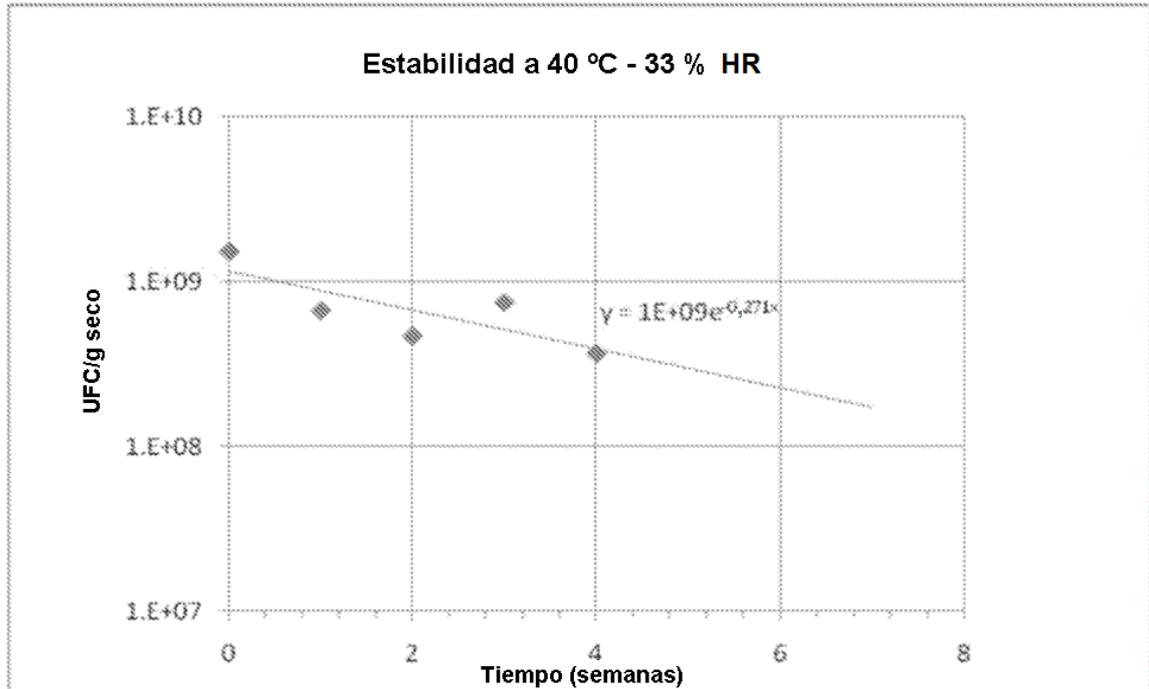


Figura 1

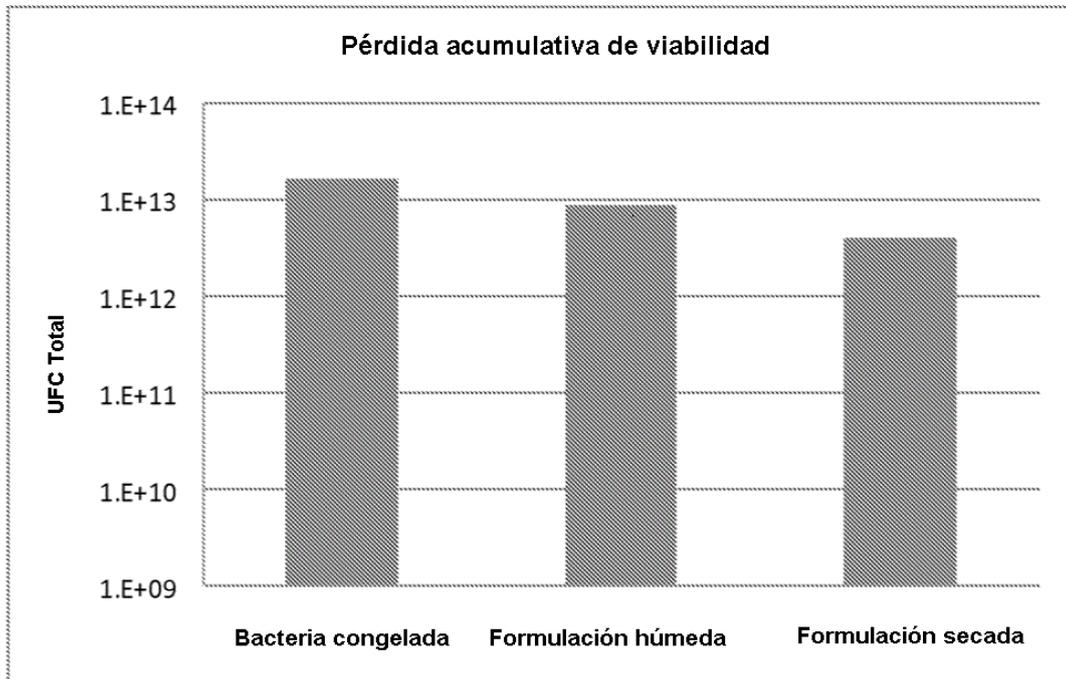


Figura 2

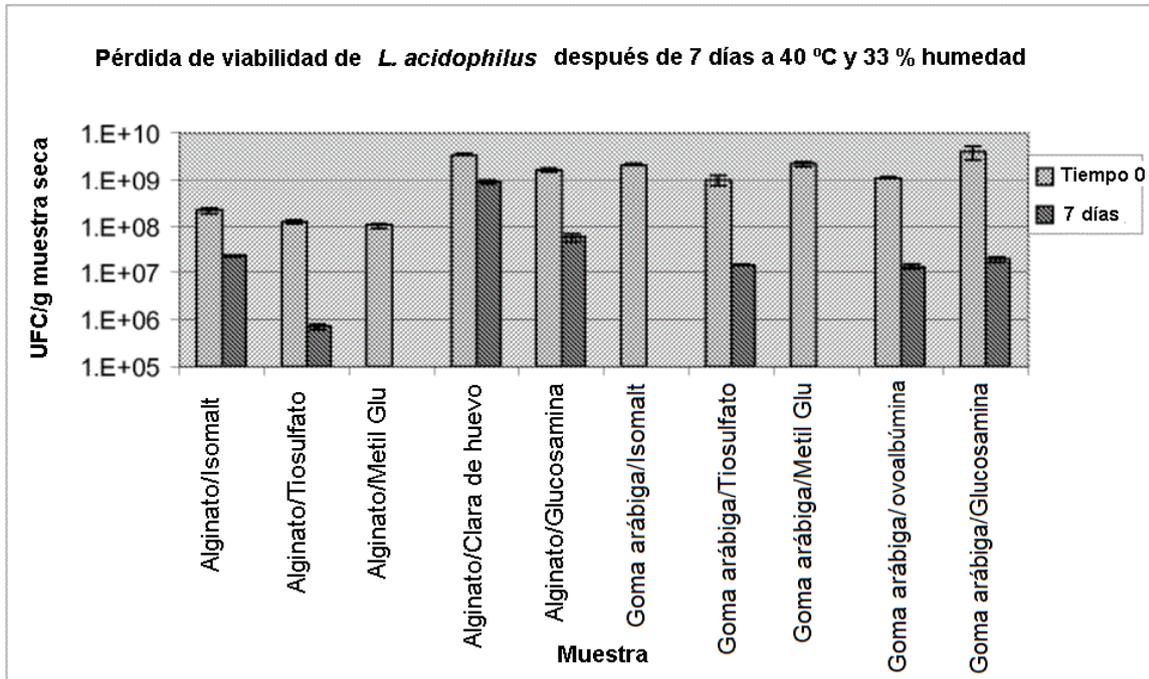


Figura 3

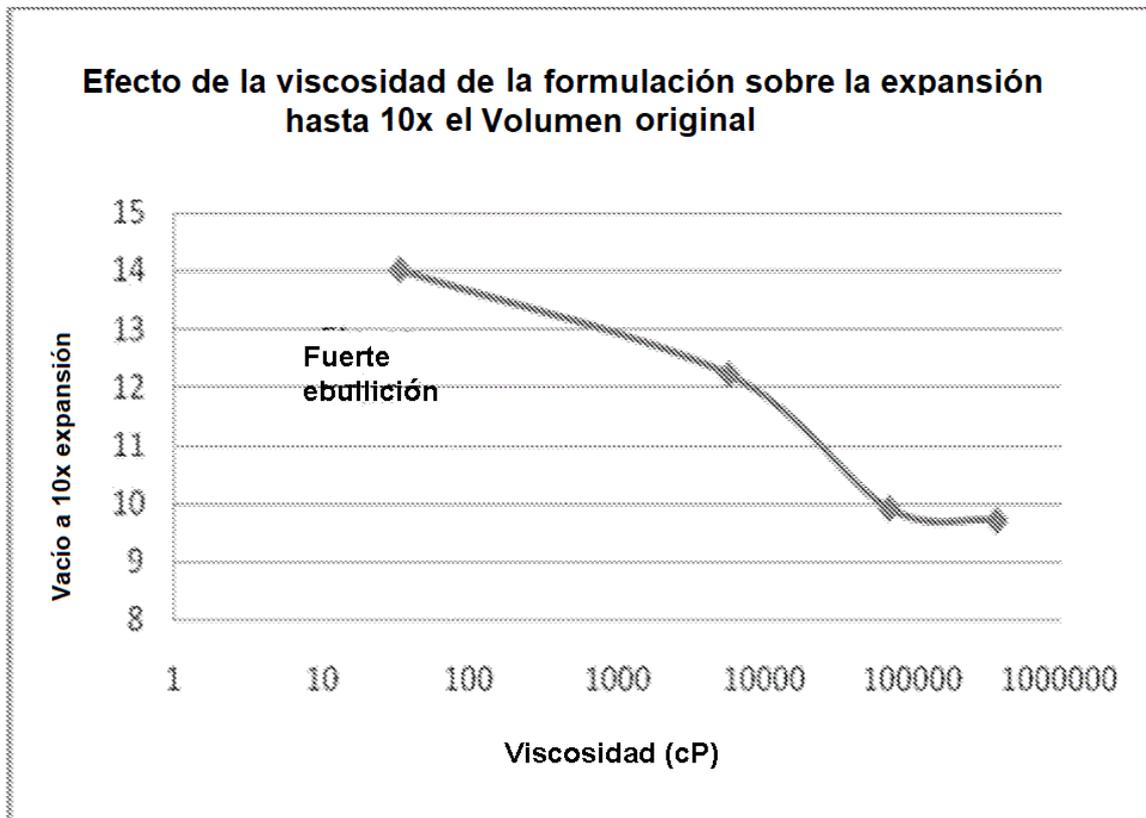


Figura 4

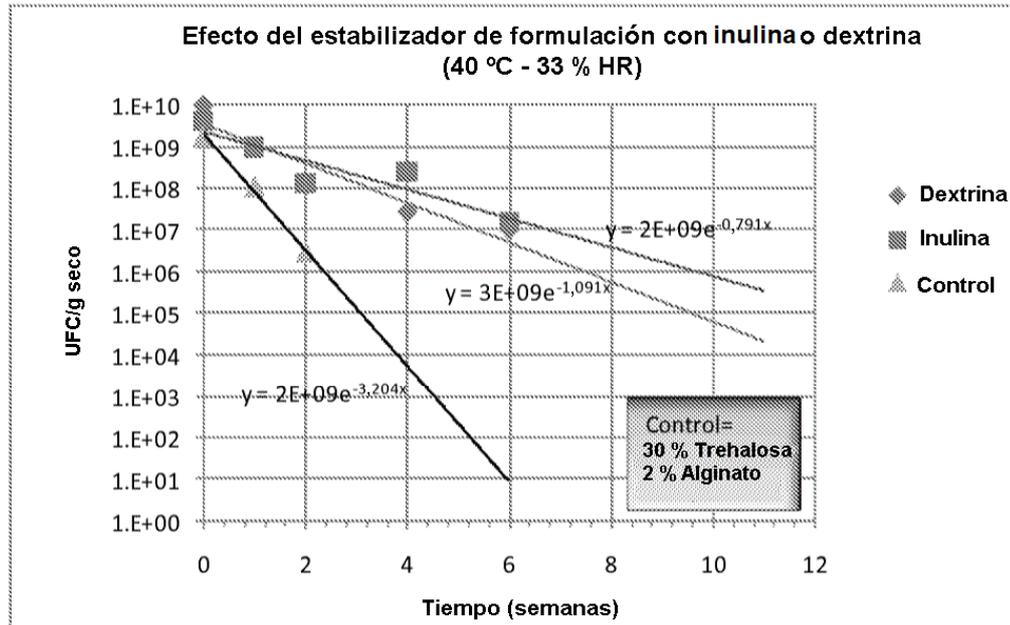


Figura 5

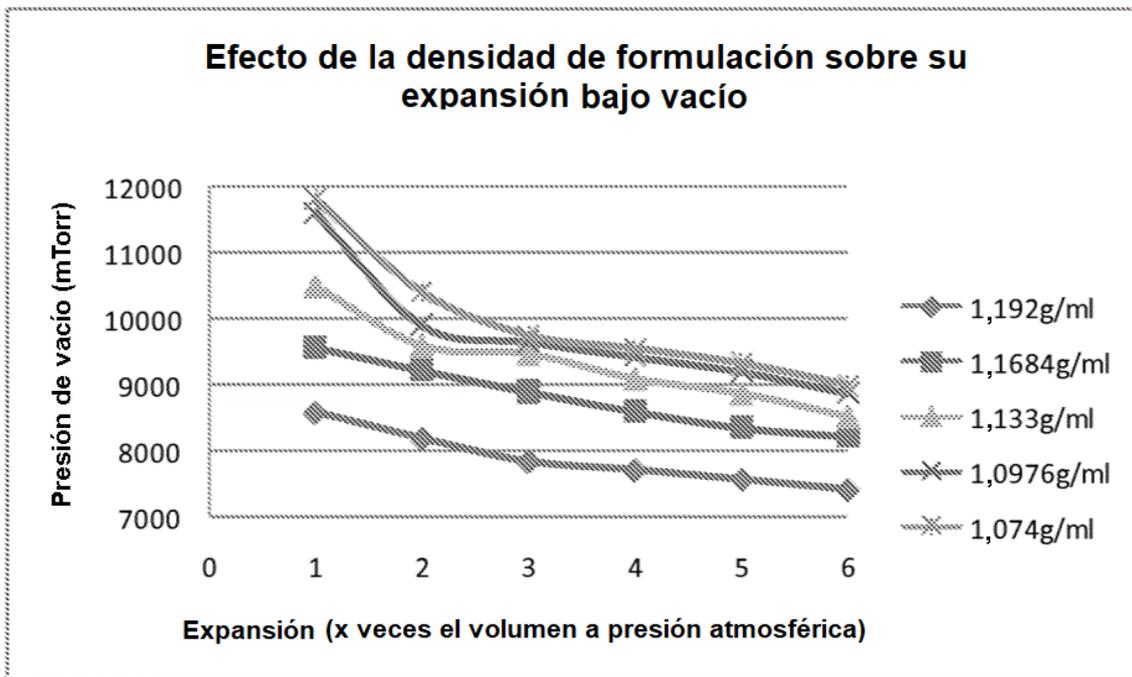


Figura 6

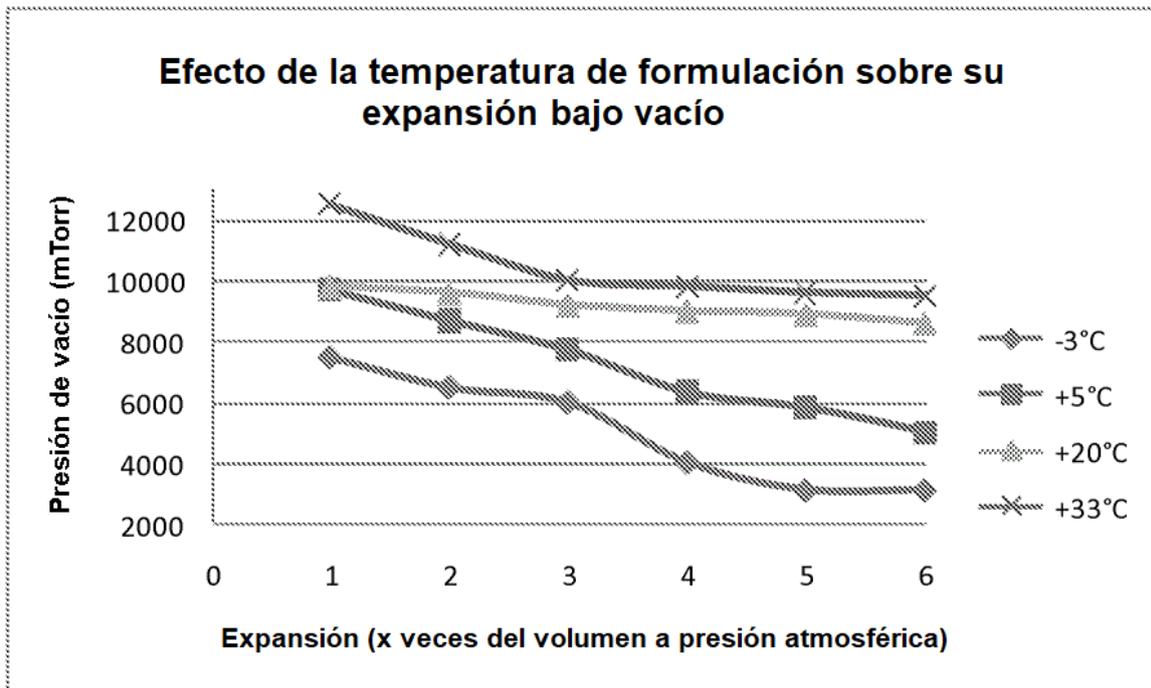


Figura 7

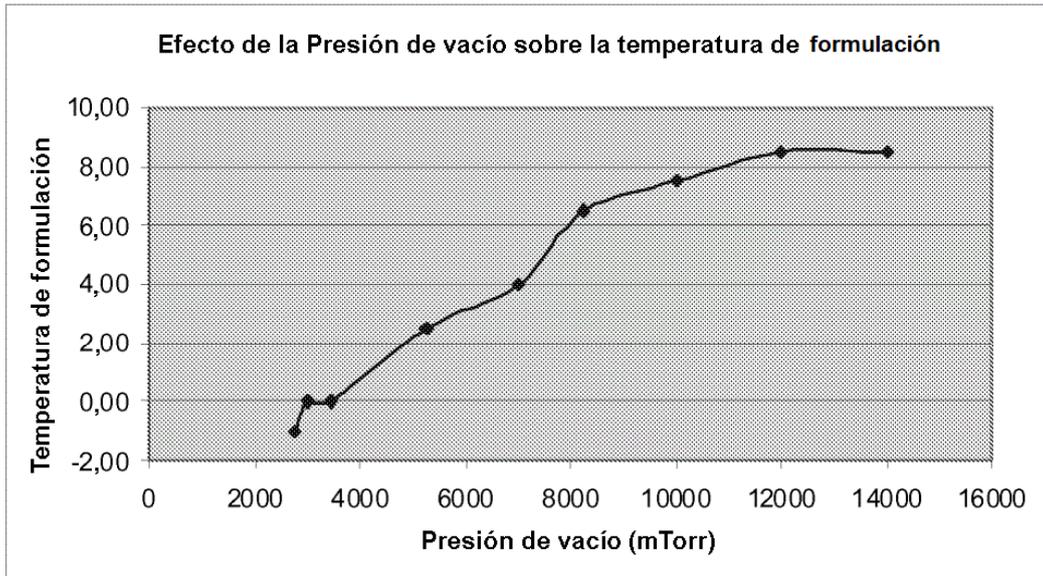


Figura 8

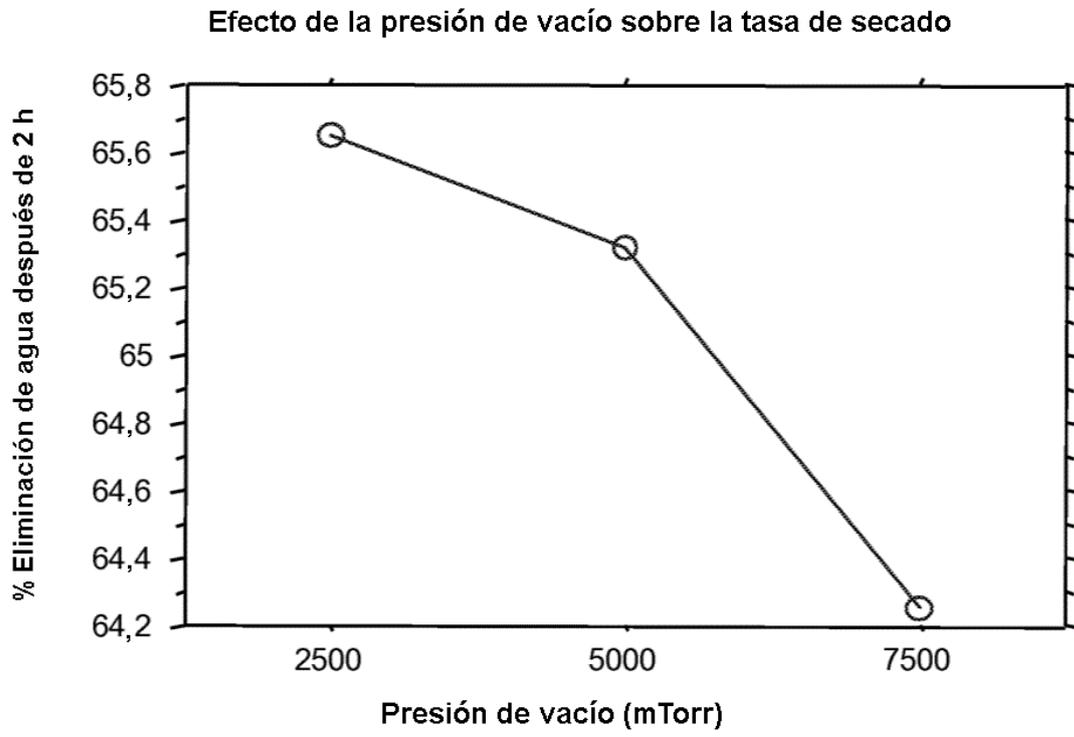


Figura 9

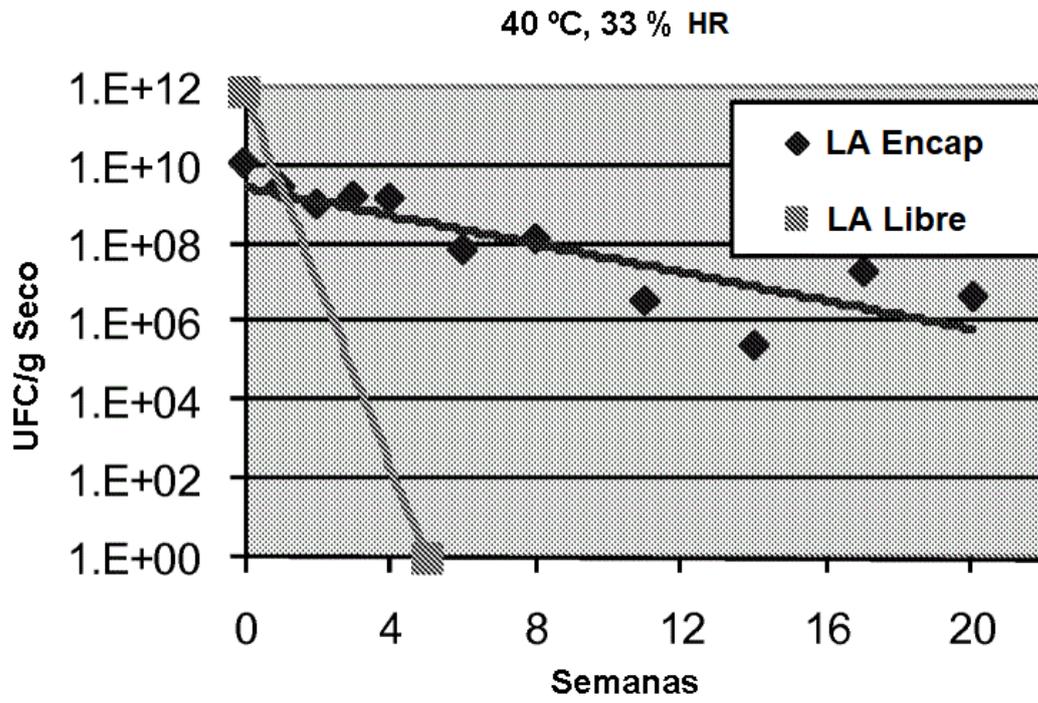


Figura 10

Flujo de proceso para preparar y secar la formulación hidrogel de la invención

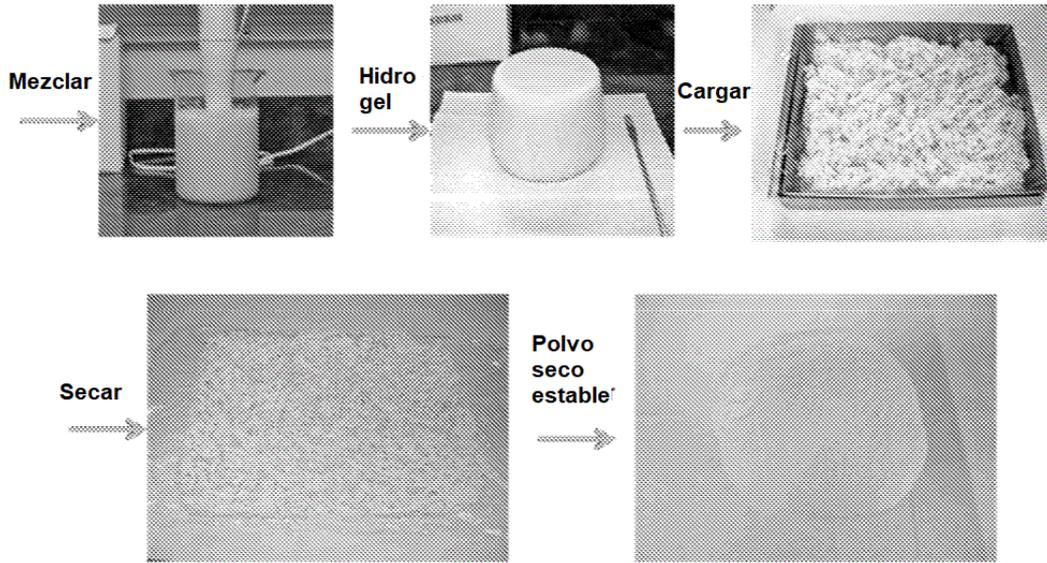


Figura 11

REFERENCES CITED IN THE DESCRIPTION

5 La lista de referencias citadas por el solicitante es para la comodidad del lector solamente. No forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha puesto gran cuidado para la recopilación de las referencias, no se puede excluir la existencia de errores u omisiones y la Oficina de Patentes Europea declina toda responsabilidad al respecto.

Documentos de patente citados en la descripción

10

- US 6964771 B, Roser [0005]
- US 5766520 A, Bronshtein [0005]
- US 7153472 B [0005]
- 15 • US 6534087 B, Busson y Schroeder [0005] [0044] [0054]
- US 6884866 B, Bronshtein [0007]
- US 6306345 B [0007]
- US 20080229609 A [0007]
- 20 • WO 2005060937 A1 [0008]
- US 2003165472 A1 [0008]
- WO 2007079147 A2 [0008]
- WO 2008076975 A1 [0008]
- 25 • US 2008102132 A2 [0008]
- US2008241244 A1 [0010]
- US 6258362 B1 [0011]
- WO 2007035455 A2 [0011]
- US 2004038825 A1 [0011]
- 30 • WO 6964771 A [0105]
- WO 5766520 A [0105]
- WO 6534087 A [0105]
- WO 6884866 A [0105]
- WO 7153472 A [0105]
- 35 • WO 20080229609 A [0105]
- WO 6306345 A [0105]

Literatura no patente citada en la descripción

40

- CAPELA y col. *Food Research International*, 2006, vol. 39, 2003-2011 [0008]
- SCHWAB y col. *Cryobiology*, 2007, vol. 55, 108-114 [0008]
- 45 • PERRY. *Molecular Biotechnology*, 1998, vol. 9, 59-64 [0009]
- BENEDICT y col. *Applied Microbiology*, 1958, vol. 6, 401-407 [0009]
- HINCHA y col., *European Biophysics Journal*, 2007, vol. 37, 503-208 [0011]
- 50 drying; a review. *J. Microbiol. Methods*, 2006, vol. 66 (2), 183-93 [0105]
- CAPELA, P.; HAY, T.K.C.; SHAH, N.P. Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yoghurt. *Food Research International*, 2006, vol. 39(3), 203-2011 [0105]
- ANNEAR. The Preservation of Leptospire by Drying From the Liquid State. *J. Gen. Microbiol.*, 1962, vol. 27, 341-343 [0105]
- 65
- 55 • MORGAN, C.A.; HERMAN, N.; WHITE, P.A.; VESEY, G. Preservation of micro-organisms by