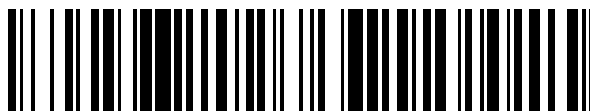


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 676 656**

51 Int. Cl.:

A23L 3/40	(2006.01) A23L 3/44	(2006.01)
A23L 3/3463	(2006.01) A61K 39/00	(2006.01)
C12N 1/00	(2006.01) A23L 33/135	(2006.01)
C12N 7/01	(2006.01) A23K 20/00	(2006.01)
A01N 1/02	(2006.01) A23K 30/00	(2006.01)
A23L 3/3508	(2006.01) A23P 10/30	(2006.01)
A23L 3/42	(2006.01) A23L 3/00	(2006.01)
A61K 47/00	(2006.01) A23K 40/30	(2006.01)
C12N 1/04	(2006.01) A23K 20/10	(2006.01)
A61K 39/12	(2006.01) A23K 10/18	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.08.2011** **PCT/US2011/047547**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.02.2012** **WO12021783**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.08.2011** **E 11817090 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.04.2018** **EP 2603100**

54 Título: **Composición estabilizante de almacenamiento en seco para materiales biológicos**

30 Prioridad:

13.08.2010 US 373711 P

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

23.07.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

HAREL, MOTI y
TANG, QIONG

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 676 656 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 estabilizante de almacenamiento en seco para materiales biológicos

Campo de la invención

La presente invención está en el campo de la estabilización de materiales biológicos en una estructura seca vítrea.

5 Técnica relacionada

La preservación de la estructura y la función de los materiales biológicos durante almacenamiento a largo plazo a alta temperatura y humedad es de importancia fundamental en las industrias alimentarias, nutracéuticas y farmacéuticas. Los materiales biológicos sensibles, tales como las proteínas, las enzimas, las células, las bacterias y los virus deben preservarse comúnmente a un almacenamiento a largo plazo para su uso posterior. Se realiza normalmente la congelación sencilla cuando el secado es dañino o bien inadecuado en el producto final. Para la preservación en un estado en seco - el secado por congelación ha sido tradicionalmente el procedimiento más común. Otros procedimientos, tales como secado al aire ambiental, secado al vacío a temperaturas ambiente (secado por vacío) o secado por contacto con una fina niebla de gotitas con aire caliente (secado por pulverización) y secado por desecación generalmente no son adecuados para bioactivos sensibles tales como bacterias y virus vivos o atenuados. Las altas temperaturas de secado usadas en estos procedimientos dan como resultado un daño significativo al propio bioactivo.

El documento EP 0 259 739 A1 desvela un procedimiento para preservar bacterias del ácido láctico secando por congelación al añadir una composición crioprotectora y un potenciador que comprende ácido cítrico en combinación con glucosa o un carbohidrato que contiene glucosa tal como Maltrina M100 (véase el documento XP055120984), que aumentan la viabilidad celular durante el almacenamiento.

El documento WO 01/36590 A1 desvela un procedimiento para secar bacterias en un procedimiento en 2 etapas que implica secar a temperaturas elevadas y en lo sucesivo secar al vacío en presencia de agentes protectores tales como carbohidratos.

El documento US 3 897 307 A describe que la combinación de ascorbato con glutamato o bien aspartato tiene un efecto beneficioso en la viabilidad de las bacterias del ácido láctico en un procedimiento de secado por congelación o de secado por pulverización.

El documento US 2010/120014 A1 describe un procedimiento de secado en dos etapas de especímenes biológicos durante el que se logra una vitrificación. La primera etapa implica por ejemplo secar por congelación o PBV, la segunda etapa implica secar a temperaturas elevadas.

El documento WO 2008/076975 A1 desvela una combinación del 10-60 % de azúcar, el 2-2β % de proteína o hidrolizado de la misma y el 0,5-5 % de polisacáridos para la conservación de las bacterias probióticas durante, por ejemplo, el secado por congelación.

A menudo el procedimiento de secado por congelación puede dar como resultado una pérdida significativa de actividad y un daño al bioactivo debido a la formación de cristales de hielo durante el procedimiento de secado lento.

El secado por congelación combina los estreses debido tanto a la congelación como al secado. La etapa de congelación de este procedimiento puede tener efectos indeseables, tales como la desnaturalización de proteínas y enzimas y la ruptura de las células. El daño provocado por la congelación puede evitarse, en un cierto grado, mediante la adición de compuestos crioprotectores a la solución. Dichos agentes protectores son generalmente productos químicos altamente solubles que se añaden a una formulación para proteger las membranas celulares y las proteínas durante la congelación y para potenciar la estabilidad durante el almacenamiento. Los estabilizantes comunes incluyen azúcares tales como sacarosa, trehalosa, glicerol o sorbitol, a altas concentraciones (Morgan y col., 2006; Capela y col., 2006). Los disacáridos, tales como sacarosa y trehalosa, son crioprotectores naturales con buenas propiedades protectoras. La trehalosa es un crioprotector particularmente atractivo porque realmente se ha aislado de plantas y organismos vivos que se mantienen en un estado de animación suspendida durante periodos de sequía. Se ha demostrado que la trehalosa es un protector eficaz para una diversidad de materiales biológicos (véase, Crowe, J. H., Crowe, L. M. y Mouradian, R., Cryobiology, 20, 346-356 (1983)). Varias patentes desvelan el uso de trehalosa o trehalosa en combinación con otros crioprotectores para proteger proteínas y otras macromoléculas biológicas, tales como enzimas, suero, complemento del suero, anticuerpos, antígenos, proteínas fluorescentes y componentes de vacunas durante la congelación, el secado y la rehidratación (unos pocos ejemplos son los documentos de Pat. de EE.UU. N.º 5.556.771; Pat. de EE.UU. N.º 5.512.547 y Pat. de EE.UU. N.º 4.891.319).

Sin embargo, hay algunas desventajas asociadas al uso de trehalosa u otros disacáridos o monosacáridos como el único crioprotector. La trehalosa puede no penetrar adecuadamente dentro de la célula para proteger a los componentes activos dentro del volumen intracelular, lo que puede dar lugar a una inestabilidad tras el almacenamiento de las sustancias secadas por congelación. Además, son a veces necesarias concentraciones de trehalosa mayores del 60 % en peso de un medio de preservación dado. Problemas incluso más serios asociados al

uso de la trehalosa es que los materiales biológicos preservados usando trehalosa sola no son estables al almacenamiento durante periodos de tiempo extendidos, especialmente aquellos almacenados a altas temperaturas y/o ambientes húmedos. Por lo tanto, se mantiene siendo un desafío significativo desarrollar una formulación óptima y un procedimiento de secado que minimice las pérdidas de secado logrando una estabilidad al almacenamiento adecuada del material secado.

Algunos de los problemas asociados a la trehalosa y al procedimiento de secado por congelación se han resuelto usando una combinación de ciertas formulaciones y secando al vacío en un estado vítreo, particularmente vidrios de azúcar (Pat. de EE.UU. n.º 6.190.701). En esas formulaciones, el bioactivo se protege dentro de una matriz vítrea contra ambientes hostiles tales como altas temperaturas y humedad. En estos casos, la presencia de agua como humedad en el ambiente actúa como un agente plastificante y tiene el efecto de disminuir la temperatura de transición vítrea (T_g) de la matriz vítrea. A contenidos hídricos más altos, la T_g se disminuye significativamente hasta el grado de que la formulación seca está en el estado gomoso o plástico indeseable a temperatura ambiente.

Las ventajas de retener la forma vítrea de la formulación es una estabilidad física aumentada del sólido y una reducción de las reacciones intermoleculares deletéreas. Una discusión detallada de la química física de las interacciones poliméricas agua-comida con referencia al estado vítreo y sus temperaturas de transición puede encontrarse en M. Le Meste, D. Champion, G. Roudaut, G. Blond y D. Simatos, "Glass Transition and Food Technology: A Critical Appraisal". 2002. Journal of Food Science 67:2444-2458, que se incorpora en el presente documento por referencia. Sin embargo, las limitaciones de los sistemas amorfos tales como la inestabilidad física y la reactividad química más alta, actúan como un obstáculo en su comercialización extensiva.

De esta manera, existe una necesidad de una composición de estabilización que sea útil para materiales biológicos de amplio intervalo. Existe una necesidad adicional de una composición de estabilización que pueda usarse eficazmente tanto en procedimientos de secado por congelación como en procedimientos de secado que implican secado a temperatura ambiente. También hay una necesidad de una mezcla de composición que sea menos costosa que otras que actualmente se están usando. Finalmente, y de forma muy importante, hay una necesidad de una mezcla de composición que proporcione medios estables para la preservación de materiales biológicos durante periodos de tiempo extendidos a temperaturas elevadas y grados variables de humedad, que pueden encontrarse durante el transporte y el almacenaje de los materiales, manteniendo aún una cantidad significativa de actividad tras la rehidratación.

Todas estas necesidades se cumplen por los procedimientos de secado y las resultantes composiciones de material biológico preservado de la presente invención.

Sumario de la invención

La presente invención incluye composiciones de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas y procedimientos de secado de acuerdo con las reivindicaciones 7-10 para preservar materiales bioactivos sensibles, tales como péptidos, proteínas, hormonas, ácidos nucleicos, anticuerpos, vacunas de fármacos, levaduras, bacterias (probióticos o de otra manera), virus y/o suspensiones celulares, en almacenamiento. La composición de la invención de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas incluye una mezcla de carbohidratos de di-oligo y polisacáridos e iones de ácido orgánico, preferentemente ácido cítrico y o ácido ascórbico. La formulación se prepara dispersando todos los componentes sólidos en una solución. La solución se congela instantáneamente por medios conocidos en la técnica como nitrógeno líquido o hielo seco para formar pequeñas perlas, cordeles o gotitas. Las perlas congeladas pueden almacenarse en un ultra-congelador (entre -30 °C y -80 °C) para su uso posterior en estado congelado o se coloca en bandejas en un estado congelado para secar en un secador por congelación convencional. El procedimiento de secado preferido de acuerdo con las reivindicaciones 7-10 se inicia opcionalmente por una purga corta y una etapa de estabilización de estructura de las partículas congeladas a una presión de vacío de <266 Pa seguido de una etapa de secado primaria a presión de vacío de más de >266 Pa y a una temperatura deseada. Durante la etapa secundaria y final del material se aplican una presión de vacío completa y una temperatura elevada, para lograr una actividad hídrica deseable final del material seco.

En una realización particular, el material biológico comprende bacterias vivas (por ejemplo, bacterias probióticas). Los ejemplos de microorganismos adecuados incluyen, pero no se limitan a, levaduras tales como *Saccharomyces*, *Debaromyces*, *Candida*, *Pichia* y *Torulopsis*, hongos tales como *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Penicillium* y *Torulopsis* y bacterias tales como los géneros *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Fusobacterium*, *Melissococcus*, *Propionibacterium*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Kocuriaw*, *Staphylococcus*, *Peptostrepococcus*, *Bacillus*, *Pediococcus*, *Micrococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Aerococcus*, *Oenococcus* y *Lactobacillus*. Los ejemplos específicos de microorganismos probióticos adecuados se representarían por las siguientes especies e incluyen todos los biotipos de cultivo dentro de esas especies: *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *Bacillus coagulans*, *B. lentus*, *B. licheniformis*, *B. mesentericus*, *B. pumilus*, *B. subtilis*, *B. natto*, *Bacteroides amylophilus*, *Bac. capillosus*, *Bac. ruminicola*, *Bac. suis*, *Bifidobacterium adolescentis*, *B. animalis*, *B. breve*, *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. lactis*, *B. longum*, *B. pseudolongum*, *B. thermophilum*, *Candida pintolepesii*, *Clostridium butyricum*, *Enterococcus cremoris*, *E. diacetylactis*, *E. faecium*, *E. intermedius*, *E. lactis*, *E. muntidi*, *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. farciminius*, *L. fermentum*, *L. gasseri*, *L. helveticus*, *L. lactis*, *L. plantarum*,

L. johnsonii, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *L. sakei*, *L. salivarius*, *Leuconostoc mesenteroides*, *P. cerevisiae* (*damnosus*), *Pediococcus acidilactici*, *P. pentosaceus*, *Propionibacterium freudenreichii*, *Prop. shermanii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Staphylococcus carnosus*, *Staph. xylosus*, *Streptococcus infantarius*, *Strep. salivarius* ss. *thermophilus*, *Strep. Thermophilus* y *Strep. lactis*. La formulación comprende una mezcla de carbohidratos de di-oligo y polisacáridos, en la que se embebe el material bioactivo. Los ejemplos de polisacáridos adecuados son ftalato de acetato de celulosa (CAP), carboxi-metil-celulosa, pectina, alginato sódico, sales de ácido alginico, hidroxipropil metil celulosa (HPMC), metil celulosa, carragenina, goma gelana, goma guar, goma acacia, goma xantana, goma de garrofin, quitosano y derivados de quitosano, colágeno, ácido poliglucólico, almidones y almidones modificados. Los ejemplos de oligosacáridos adecuados son ciclodextrinas, inulina, EOS, maltodextrinas, dextranos, etc.; y combinaciones de los mismos. Los ejemplos de disacáridos adecuados, pero no se limitan a, lactosa, trehalosa, sacarosa, etc. En una realización particular, el polisacárido preferido es alginato sódico o goma gelana. Preferentemente, la mezcla de carbohidrato comprende, en porcentaje en peso de la materia seca total, un 0,1-10 % de polisacáridos, un 1-10 % de oligosacáridos y un 10-90 % de disacáridos. En una realización adicional, la mezcla de carbohidratos comprende di-oligo y polisacáridos en una relación en peso de 10:0,5-1:0,1-0,5. En aún otra realización de la presente invención, los polisacáridos en la mezcla de carbohidratos se reticularon con iones metálicos divalentes para formar un hidrogel firme. La composición comprende cantidades significativas de compuestos potenciadores de vidrio incluyendo sales de los ácidos orgánicos ácido láctico, ácido ascórbico, ácido maleico, ácido oxálico, ácido malónico, ácido málico, ácido succínico, ácido cítrico, ácido glucónico y ácido glutámico. Las sales pueden incluir cationes tales como sodio, potasio, calcio, magnesio y similares. Los ejemplos incluyen citrato sódico, lactato sódico, maleato sódico, gluconato magnésico, ascorbato sódico y similares. Se prefieren las sales que tienen alta temperatura de transición vítrea (Tg) y alta solubilidad. El ácido orgánico más preferido es el ácido cítrico y sus sales (por ejemplo citrato sódico o potásico, deshidrato de citrato trisódico) y el ácido ascórbico y sus sales (por ejemplo, ascorbato sódico, ascorbato potásico, ascorbato magnésico). La cantidad total preferida de iones citrato o ascorbato en la composición seca es de tal manera que la relación molar de iones a moles de compuestos de carbohidratos es de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,3 y más preferentemente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,2.

Otros potenciadores de vidrio útiles incluyen proteínas, hidrolizados de proteínas, polipéptidos y aminoácidos. Estos incluyen gelatina, albúmina, proteína de suero, proteína de soja, caseína, caseinato, inmunoglobulinas, proteína de soja, proteína de guisante, proteína de semilla de algodón u otras proteínas alimenticias y lácteas o vegetales y/o sus hidrolizados. Los ejemplos de poliaminoácidos incluyen polialanina, poliarginina, poliglicina, ácido poliglutámico y similares. Los aminoácidos útiles incluyen lisina, glicina, alanina, arginina o histidina, así como aminoácidos hidrófobos (triptófano, tirosina, leucina, fenilalanina, etc.) y una metilamina tal como betaína. La cantidad total preferida de proteínas, hidrolizados de proteínas y aminoácidos en la composición seca es de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 30 % de la masa total de la mezcla de carbohidratos y más preferentemente de aproximadamente el 5 % a aproximadamente el 20 % de la masa de carbohidratos. Idealmente, los compuestos que son compuestos GRAS se prefieren sobre aquellos que no son GRAS.

Nótese que la cantidad apropiada de los potenciadores de vidrio en la composición puede depender de las características deseadas de la composición seca. La determinación de la cantidad apropiada de potenciadores de vidrio debe realizarse de acuerdo con las condiciones de almacenamiento deseadas. Por ejemplo, una composición que contenga una mezcla de carbohidratos y proteínas o hidrolizados de proteína puede usarse para potenciar la estabilidad química de un material biológico mientras se almacena a temperatura y humedad relativa suaves, tales como 25 °C y 25 % de HR. Pueden preferirse los iones citrato para comprender el potenciador vítreo para obtener beneficio añadido de estabilización a una exposición de temperatura y humedad más altas. Alternativamente, puede ser el caso de que una combinación de iones citrato y/o ascorbato con otro potenciador vítreo, tales como una proteína o hidrolizado de proteína, sea más preferida para comprender la composición.

El procedimiento de mezcla preferido del material biológico y la composición es la adición de la mezcla de composición seca total en una solución concentrada de cultivo o de medio que contiene material biológico. La masa en peso del material biológico en el medio de cultivo está típicamente entre aproximadamente el 5 % y el 30 % p/v y más preferentemente entre aproximadamente el 10 % y el 20 % p/v. La masa en peso añadida de la mezcla de composición en el medio de cultivo es típicamente entre aproximadamente el 10 % y aproximadamente el 60 % y más preferentemente entre aproximadamente el 20 % y el 40 %. El contenido en sólidos final en la suspensión mixta es de aproximadamente el 20 % a aproximadamente el 60 % y más específicamente de aproximadamente el 30 % a aproximadamente el 50 %. Preferentemente, la solución se mezcla a temperatura ambiente o se calienta ligeramente para ayudar a solubilizar los materiales en la solución viscosa (por ejemplo, de 20 °C a 40 °C). En una variación de la presente invención, la cantidad total de la mezcla de carbohidratos en la formulación se ajusta para lograr una viscosidad y una densidad de la formulación deseadas que permitan un secado eficiente evitando la formación gomosa o una formación de espuma excesiva que pueden ocurrir durante la etapa de secado. Una viscosidad de la suspensión preferida es de aproximadamente 1.000 cP a aproximadamente 500.000 cP y el intervalo más preferido es de aproximadamente 10.000 cP a aproximadamente 300.000 cP. Una viscosidad y una densidad deseadas de la suspensión final pueden lograrse por cualquier procedimiento conocido en la técnica, por ejemplo, ajustando ligeramente la cantidad de los polisacáridos en la mezcla de carbohidratos o desgasificando o inyectando gases tales como aire, nitrógeno, dióxido de carbono, argón, etc.

La suspensión de material biológico de la presente invención se congela de forma instantánea típicamente a entre -

30 °C a -180 °C, más preferentemente, la formulación se congela instantáneamente en nitrógeno líquido atomizando, goteando o inyectando en un baño de nitrógeno líquido. Se recogen las partículas, las perlas, los cordeles o las gotitas del baño de nitrógeno líquido y se secan en un secador por congelación o un secador de vacío o alternativamente se almacenan en un ultra-congelador (entre -30 °C y -80 °C) para su uso posterior en una forma congelada o hasta que se sequen. En general, las técnicas del procedimiento de secado que son útiles incluyen secado por pulverización; liofilización seguida de molienda para micronizar el polvo; atomización sobre una superficie fría, seguida de sublimación y recogida del polvo micronizado; secado evaporativo de una solución no congelada en un horno de vacío o en un evaporador centrífugo a temperaturas por encima de la temperatura de congelación de la suspensión (-20 a 50 °C), seguido de molienda a un tamaño de partícula deseado. Las partículas de polvo resultantes son internamente vítreas o cristalinas recubriendo la superficie una mayoría de los materiales vítreos. Las ventajas de recubrir el material biológico con materiales vítreos son aumentar la estabilidad física del producto y la reducción de reacciones intermoleculares deletéreas dentro de la partícula. En una realización preferida, las partículas congeladas se cargan en bandejas y se transfieren inmediatamente a una cámara de secado por congelación donde el procedimiento de secado avanza en tres etapas principales; 1. Una etapa opcional de purga corta y de estabilización de la estructura de las partículas congeladas a una presión de vacío de menos de <266 Pa, 2. Una etapa de secado primario a una presión de vacío de más de >266 Pa y a una temperatura por encima del punto de congelación de la suspensión, 3. Una etapa de secado secundario y final del material amorfo vítreo a presión de vapor completa y temperatura elevada durante un tiempo suficiente para reducir la actividad hídrica de la formulación seca a 0,3 Aw o menos.

La composición biológica seca y estable puede usarse directamente como un copo o molerse en un polvo y tamizarse a un tamaño de partícula promedio de aproximadamente 10 µm a aproximadamente 1.000 µm. La formulación puede administrarse directamente a un animal, incluyendo el hombre, como un polvo concentrado, como un líquido reconstituido (por ejemplo, una bebida) o puede incorporarse vienen forma de copos o de polvo en un alimento o producto alimenticio existentes.

Definiciones

Como se usa en la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “una” y “el/la” incluyen referentes plurales salvo que el contexto claramente dicte lo contrario. De esta manera, por ejemplo, la referencia a “una proteína” incluye la proteína singular o una combinación de dos o más proteínas; la referencia a “enzima”, “bacteria”, etc., incluye el singular o mezclas de varios tipos y similares.

Al describir y reivindicar la presente invención, se usará la siguiente terminología de acuerdo con las definiciones expuestas a continuación.

“Material biológico”, “composición biológica” o “formulación bioactiva” se refiere a preparaciones, que están en una forma tal que permita que la actividad biológica de los ingredientes bioactivos sea inequívocamente eficaz.

Un “potenciador vítreo” es un compuesto químico con la capacidad de formar una estructura amorfa o vítreo por debajo de una temperatura crítica, la temperatura de transición vítrea (Tg). Si un potenciador vítreo se seca por debajo de su Tg, se formará vidrio. Sin embargo, si el potenciador vítreo se seca por encima de su Tg, entonces no se forma vidrio. Durante la formación de la estructura vítrea, la sustancia biológica puede embeberse dentro de la estructura vítrea. Los potenciadores vítreos adecuados para su uso con la presente invención incluyen, pero no se limitan a, sales de ácidos orgánicos tales como ácido láctico, ácido ascórbico, ácido maleico, ácido oxálico, ácido malónico, ácido málico, ácido succínico, ácido cítrico, ácido glucónico, ácido glutámico y similares. Las sales pueden incluir cationes tales como sodio, potasio, calcio, magnesio, fosfato y similares. Otros potenciadores vítreos útiles incluyen proteínas, hidrolizados de proteína, polipéptidos y aminoácidos. También se contempla una combinación de agentes formadores de vidrio dentro de una única composición. El procedimiento usado para obtener una estructura vítrea para los fines de la presente invención es generalmente una técnica de sublimación y/o evaporación del disolvente. De forma ideal, los compuestos que son compuestos GRAS se prefieren sobre aquellos que no son GRAS.

“Carbohidratos” o “compuesto polihidroxi” se refieren a sacáridos compuestos predominantemente por carbono, hidrógeno y oxígeno. Un sacárido está típicamente compuesto por un esqueleto de azúcar de unidades estructurales repetitivas unido de manera lineal o no lineal, alguna de las cuales contiene grupos químicos cargados positiva o negativamente. Las unidades de repetición pueden variar de dos a varios millones. Los sacáridos útiles incluyen azúcares y alcoholes de azúcares reductores y no reductores, disacáridos, oligosacáridos, polisacáridos hidrosolubles y derivados de los mismos. Dos monosacáridos unidos juntos forman un disacárido. Los dos monosacáridos usados para formar un disacárido pueden ser el mismo o diferentes. Los ejemplos de disacáridos que pueden usarse en la mezcla de carbohidratos de la presente invención incluyen, sacarosa, trehalosa, lactosa, maltosa, isomaltosa. También pueden usarse disacáridos sulfatados. Un número pequeño de monosacáridos unidos juntos (típicamente de tres a diez) forman un oligosacárido. Los monosacáridos usados para formar un oligosacárido pueden ser los mismos o diferentes azúcares componentes. Los ejemplos de oligosacáridos adecuados para su uso incluyen, inulina, maltodextrinas, dextranos, fructo-oligosacáridos (FOS), galacto-oligosacáridos (GOS), manano-oligosacáridos (MOS) y combinaciones de los mismos. Un gran número de monosacáridos unidos juntos (típicamente más de diez) forman un polisacárido. Los monosacáridos usados para formar un polisacárido pueden

ser el mismo o diferentes azúcares componentes. Los ejemplos de polisacáridos adecuados para su uso incluyen, pero no se limitan a, metilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxietilcelulosa e hipromelosa; almidones solubles o fracciones de almidón, goma xantana, goma guar, pectinas, carragenina, galactomanano, goma gelana, incluyendo cualquier derivado de estas, ftalato de acetato de celulosa (CAP), carboxi-metil-celulosa, alginato sódico, sales de ácido algínico, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), goma acacia, goma de garrofin, quitosano y derivados de quitosano, colágeno, ácido poliglucólico, almidones y almidones modificados y ciclodextrinas.

Una formulación o composición "estable" es una en la que el material biológicamente activo en el mismo retiene esencialmente su estabilidad física, su estabilidad química y/o su actividad biológica tras el almacenamiento. La estabilidad puede medirse a unas condiciones de temperatura y humedad seleccionadas durante un periodo de tiempo seleccionado. Puede usarse un análisis de tendencia para estimar y esperar una vida media antes de que un material ya esté en almacenamiento durante ese periodo de tiempo. Para bacterias vivas, por ejemplo, la estabilidad se define como el tiempo que toma perder 1 log de UFC/g de formulación seca en condiciones predefinidas de temperatura, humedad y periodo de tiempo.

"Viabilidad" con respecto a bacterias, se refiere a la capacidad de formar una colonia (UFC o Unidad Formadora de Colonias) en un medio nutriente apropiado para el crecimiento de las bacterias. Viabilidad, con respecto a los virus, se refiere a la capacidad de infectar y reproducirse en una célula hospedadora adecuada, dando como resultado la formación de una calva en un césped de células hospedadoras.

Las temperaturas o condiciones "ambiente" son aquellas en cualquier momento dado en un ambiente dado. Típicamente, la temperatura ambiente es 22-25 °C, la presión atmosférica ambiente y la humedad ambiente se miden fácilmente y variarán dependiendo del momento del año, el tiempo y las condiciones climáticas, la altitud, etc.

"Actividad hídrica" o "Aw" en el contexto de las composiciones de formulación secas, se refiere a la disponibilidad de agua y representa el estado de energía del agua en un sistema. Se define como la presión de vapor de agua por encima de una muestra dividida por aquella del agua pura a la misma temperatura. El agua pura destilada tiene una actividad hídrica de exactamente uno o $A_w = 1,0$.

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

"Seco" y variaciones del mismo se refieren a un estado físico que está deshidratado o anhidro, es decir, que sustancialmente carece de líquido. El secado incluye por ejemplo, secado por pulverizado, secado en lecho fluidizado, liofilización y secado al vacío.

"Liofilizar" o secar por congelación se refiere a la preparación de una composición en forma seca por congelación rápida y deshidratación en estado congelado (a veces denominado sublimación). La liofilización tiene lugar a una temperatura que da como resultado la cristalización de los polímeros. Este procedimiento puede tener lugar al vacío a una presión suficiente para mantener el producto congelado, preferentemente menor de aproximadamente <266 Pa.

"Secado primario" o "secado líquido", con respecto al procedimiento descrito en el presente documento, se refiere al secado de deshidratación que tiene lugar desde el momento de descongelación de las partículas congeladas hasta el punto en que empieza el secado secundario. Típicamente, el grueso del secado primario tiene lugar por evaporación extensiva, mientras que la temperatura del producto se mantiene significativamente menor que las temperaturas de la fuente de calor. Este procedimiento puede tener lugar al vacío a una presión suficiente para mantener el producto descongelado, preferentemente mayor de aproximadamente >266 Pa.

"Secado secundario", con respecto a los procedimientos 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. Este procedimiento puede tener lugar al vacío a una presión suficiente para reducir la actividad de agua de una formulación, preferentemente menos de aproximadamente <133 Pa. En un procedimiento de secado de formulación típico, una etapa de secado secundario reduce la actividad hídrica de la formulación a una A_w de 0,3 o menos.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Estabilidad de aceleración de bacterias probióticas disponibles en el mercado y bacterias probióticas en la composición seca de la presente invención.

Figura 2. El efecto de diversas relaciones molares entre los potenciadores vítreos y la mezcla de carbohidratos en la composición en la estabilidad de probióticos (*L. paracasei*) en condiciones de almacenamiento aceleradas (37 °C y 33 % de HR).

Figura 3. Efecto de la composición de la presente invención en la estabilidad de almacenamiento de la bacteria probiótica *L. acidophilus*. La estabilidad de la bacteria probiótica seca se ensayó a condiciones de almacenamiento aceleradas de 24 °C y 33 % de HR durante 537 días.

Figura 4. Efecto de diversos compuestos potenciadores vítreos en la estabilidad de almacenamiento de la

bacteria probiótica *L. acidophilus*. La estabilidad de la bacteria probiótica seca se ensayó a condiciones de almacenamiento aceleradas de 24 °C y 43 % de HR durante 180 días.

Figura 5. Efecto de diversas relaciones de hidrolizado de proteína/azúcar en la estabilidad de almacenamiento (35 °C y 43 % de HR) de la bacteria probiótica *Bifidobacterium lactis*.

Figura 6. Optimización de pH para estabilidad máxima del probiótico *L. rhamnosus* (aceleración de las condiciones de almacenamiento a 40 °C y 33 % de HR durante 8 semanas).

Descripción detallada de la invención

Las composiciones y los procedimientos de secado de la presente invención resuelven el problema de proporcionar formulaciones secas costosas y a escala industrial que contienen materiales bioactivos sensibles, tales como péptidos, proteínas, hormonas, ácidos nucleicos, anticuerpos, fármacos, vacunas, levaduras, bacterias, virus y/o suspensiones celulares, con un tiempo de vida significativamente extendido en estado seco. La invención proporciona composiciones de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas que comprenden un material biológico rodeado de una estructura vítrea amorfa de compuestos altamente solubles. El procedimiento de secado de acuerdo con las presentes reivindicaciones 7-10 comprende: mezclar el material biológico y la composición de estabilización en una suspensión líquida, congelar instantáneamente dicha suspensión de composición en nitrógeno líquido para formar gotitas, cordeles o perlas, purgar las partículas congeladas en alto vacío seguido del secado del material bioactivo en una formación de vidrio de azúcar evaporando la humedad en un régimen de presión reducida mientras se suministra calor a la composición.

COMPOSICIONES DE LA INVENCION

La presente invención se basa en el descubrimiento remarcable de que los materiales biológicos pueden protegerse en una estructura vítrea reteniendo actividad sustancial. Cuando el material biológico se combina con la mezcla de composición y se seca al vacío de acuerdo con la presente invención se logró una estabilidad superior durante la exposición a tiempo extendido a condiciones de temperatura y humedad duras. La presente invención incluye composiciones de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas que contienen un material biológico, una mezcla de carbohidratos solubles y sales de ácidos carboxílicos potenciadores de vidrio. Las composiciones de la invención son inherentemente diferentes en su estructura física y su función de las composiciones azucaradas no viscosas o concentradas que se secaron de forma sencilla en un procedimiento de secado típico. Por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos 6919172 (Glassy state Preservation and storage Composition for biological materials) desvela una composición en polvo aerosolizada para la administración pulmonar, que contiene una mezcla de diversos carbohidratos y citrato sódico. Esa composición carece del compuesto proteico adicional que es esencial para una estabilidad añadida y para la formación de una estructura física deseable durante el secado de las soluciones que tienen alta concentración de azúcares. Esa composición carece también de viscosidad o estructura de hidrogel; lo que permite un secado eficiente de la solución descongelada o sin congelar para la formación de vidrio potenciada. La composición y el procedimiento de secado de la presente invención superan todos estos problemas logrando una estabilidad superior del material biológico. La estructura vítrea potenciada se logró habitualmente en la técnica anterior espumando o hirviendo la solución al vacío para facilitar el secado eficaz. La etapa de formación de espuma dio como resultado generalmente una ebullición extensiva y la erupción de la solución que es una consecuencia inevitable del secado de la solución sin congelar y como resultado, solamente pudo lograrse una capacidad de carga muy baja de la solución en un vial o un recipiente (véase por ejemplo la Pat. de EE.UU. N.º 6534087, en la que el espesor del producto espumado final es menos de 2 mm). Las composiciones y los procedimientos de secado de la presente invención evitan la ebullición y la formación de espuma de la formulación permitiendo de esta manera una carga mucho más alta del material por área de secado y, como resultado, puede escalarse fácilmente a la producción de grandes cantidades de material sin el uso de recipientes y bandejas o equipo diseñados específicamente.

Puede usarse un amplio intervalo de materiales biológicos con la composición estabilizante para formar un medio de conservación acuoso, que puede someterse después a los procedimientos de secado de la presente invención para producir un polvo seco estable de material biológico. Estos materiales biológicos incluyen, sin limitación: enzimas, tales como enzimas pancreáticas, lipasas, amilasas, proteasa, fitasa, lactato deshidrogenasa; proteínas, tales como insulina; vacunas; virus, tales como adenovirus; células, incluyendo células procariotas (incluyendo bacterias) y células eucariotas, otros materiales biológicos, incluyendo fármacos, ácidos nucleicos y vesículas lipídicas.

Se ha demostrado que las bacterias probióticas se benefician particularmente de las composiciones y los procedimientos de secado de la presente invención. El polvo probiótico seco estable se prepara de acuerdo con los procedimientos de la invención de acuerdo con las reivindicaciones 7-10 incluyendo mezclar cultivos frescos, congelados o secos de bacterias probióticas con una mezcla de carbohidratos y compuestos potenciadores del vidrio, congelar inmediata la formulación viscosa en nitrógeno líquido para formar gotitas, cordeles o perlas sólidos congelados y secar al vacío aplicando inicialmente suficiente presión de vacío para purgar y estabilizar la estructura de las partículas congeladas, aumentar la temperatura de la formulación por encima de la temperatura de congelación y suministrar una fuente de calor de 20 °C y más alta para facilitar la retirada de agua primaria. El mantenimiento de la temperatura de la formulación por encima del punto de congelación puede lograrse ajustando la presión de vapor y dirigiendo el calor a la formulación. Para completar el procedimiento de secado y reducir adicionalmente la actividad hídrica de la formulación por debajo de A_w de 0,3 o menor, se aplica una etapa de

secado secundario a presión de vacío máxima y a temperatura elevada de hasta 70 °C. Dicha composición puede mantenerse estable en condiciones de almacenamiento duras tales como 40 °C y 33 % de HR durante 60 días o más (véase la Figura 8).

Preparación de las composiciones

5 La composición para la preparación de polvos congelados o secos estables de materiales biológicos de acuerdo con la invención como se expone en las reivindicaciones adjuntas incluye una mezcla de carbohidratos y un potenciador de vidrio. Dichos materiales, cuando se mezclan con el material bioactivo preferido, forman perlas, cordeles o gotitas en nitrógeno líquido y pueden secarse eficientemente en una estructura vítrea amorfa de acuerdo con los procedimientos de la invención y proporcionan grandes cantidades de composiciones secas estables para el almacenamiento y la administración de dicho material bioactivo (véase la Figura 1 - para para observaciones físicas y actividad hídrica (Aw) de diferentes formulaciones después de secar). La mezcla de carbohidratos proporciona estabilidad estructural a la formulación y/o beneficios protectores físicos y químicos a los materiales bioactivos y previene o reduce los efectos adversos tras la reconstitución o rehidratación.

15 La fracción de polisacárido en la mezcla de carbohidratos puede proporcionar una viscosidad espesante a la formulación y un mejor control sobre las propiedades de densidad de formulación a presión de vacío y resistencia estructural aumentada a las composiciones de formulación seca de la invención. Los polisacáridos preferidos, particularmente para organismos vivos, son gomas hidrosolubles, debido a su característica distintiva de formar un gel viscoso a temperaturas suaves. También se descubrió que las gomas a cierta concentración estabilizan eficazmente la estructura de la formulación al vacío, proporcionando viscosidad y densidad apropiadas a la formulación y permitiendo un secado eficaz de la formulación durante la etapa de secado líquido primario a una viscosidad particular. Ciertas gomas también pueden formar un hidrogel reticulándose con cationes divalentes o multivalentes (por ejemplo, alginatos, pectinas, quitosano) o por cambios de temperatura o pH (por ejemplo, gelatinas, CMC, CAP, goma gelana). Las soluciones hidrogelificadas evitarían problemas asociados al secado al vacío de soluciones sin congelar.

25 La fracción de disacárido en la mezcla de carbohidratos incluye diversos azúcares y alcoholes de azúcar. El disacárido preferido es uno que no cristalice y/o dañe o desestabilice el material biológicamente activo en la formulación a temperaturas de congelación (por ejemplo, menores de - 20 °C) y durante la retirada de agua. Por ejemplo, el material bioactivo puede embeberse físicamente en azúcares formadores de vidrio tales como sacarosa, lactosa o trehalosa para promover la retención de la estructura molecular a lo largo de todo el procedimiento de secado e impartir rigidez estructural a la matriz amorfa en el estado seco. Un disacárido adecuado reemplazaría eficazmente el agua de hidratación perdida durante el secado, para evitar el daño a las membranas celulares y la desnaturalización de enzimas (véase la revisión por Crowe y col., 1998). Otras funciones del disacárido en la composición pueden incluir proteger el material bioactivo de la exposición a la luz, el oxígeno, los agentes oxidativos y la humedad dañinos. Un disacárido adecuado debe disolverse fácilmente en una solución. La trehalosa es un protector particularmente atractivo porque es un disacárido no reductor encontrado en plantas y organismos vivos (por ejemplo, bacterias, hongos e invertebrados tales como insectos y nematodos) que se mantienen en un estado de dormancia durante periodos de sequía. Se ha demostrado que la trehalosa es un protector eficaz para una diversidad de materiales biológicos incluyendo proteínas y otras macromoléculas biológicas, tales como enzimas, suero, anticuerpos, antígenos y componentes de vacunas (Sánchez y col., 1999, Intl. J. Pharm. 185, 255-266; Esquisabel y col., 1997, J. Microencapsulation, 14, 627-638). En algunos casos, puede ser beneficioso incluir dos o más disacáridos diferentes tales como una mezcla de trehalosa y sacarosa para inhibir la formación de cristales, para potenciar la estabilidad de la formulación de material bioactivo seco en condiciones de almacenamiento durante periodos de tiempo extendidos y para reducir costes.

45 La fracción de oligosacárido en la mezcla de carbohidrato incluye inulina, maltodextrinas, dextranos, fructo-oligosacáridos (FOS), galacto-oligosacáridos (GS), manano-oligosacáridos (MOS) y combinaciones de los mismos. Los oligosacáridos mitigan varios problemas asociados al uso de trehalosa sola como un protector para una diversidad de materiales biológicos preservados. Aunque es muy eficaz protegiendo el material biológico durante la deshidratación y la rehidratación, la trehalosa sola como un estabilizante no proporciona una estabilidad de almacenamiento deseable durante periodos de tiempo extendidos, especialmente a temperaturas altas y/o ambientes húmedos. Este problema se resolvió en la presente invención con la adición de oligosacáridos, preferentemente inulina, a la mezcla de carbohidrato.

La relación de masa preferida de los sacáridos en la mezcla de carbohidratos es 10:0,5-1:0,1-0,5 de disacáridos/oligosacáridos/polisacáridos. Preferentemente, la mezcla de carbohidratos comprende, en porcentaje en peso de materia seca total, un 0,1-10 % de polisacáridos, un 1-10 % de oligosacáridos y un 10-90 % de disacáridos.

55 Los potenciadores de estructura vítrea de la presente invención incluyen las sales de los ácidos orgánicos ácido láctico, ácido ascórbico, ácido maleico, ácido oxálico, ácido malónico, ácido málico, ácido succínico, ácido cítrico, ácido glucónico y ácido glutámico. Las sales pueden incluir cationes tales como sodio, potasio, calcio, magnesio, sales tampón, tampón fosfato y similares. Los ejemplos incluyen citrato sódico, lactato sódico, maleato sódico, gluconato magnésico, ascorbato sódico, ascorbato potásico, sales tamponadas con fosfato y similares. Generalmente, los aniones multivalentes forman vidrios más fácilmente con una Tg mayor que los aniones

monovalentes. El anión preferido tendrá una Tg alta y una solubilidad suficiente para inhibir la cristalización y de esta manera formar una estructura vítrea robusta. En algunos casos, pueden ser útiles las mezclas de sales orgánicas (por ejemplo citrato sódico y ascorbato sódico). Se descubrió que el citrato sódico interactúa con los grupos hidroxilo de la molécula de azúcar y forma enlaces a través de sus grupos carboxilo, que da como resultado un aumento drástico en la temperatura de transición vítrea de la sacarosa vitrificada (Kets y col., 2004. Citrate increases glass transition temperature of vitrified sucrose preparations Cryobiology, 48:46-54). El citrato sódico es un aditivo alimenticio común afirmado como GRAS (21 CFR 184,1751 - Citrato sódico). Las funciones adicionales del citrato sódico en las composiciones se asocian a su capacidad tamponante y que evitan cambios drásticos en el pH del medio líquido durante la congelación, que puede dar lugar a la desnaturalización de la proteína que se seca por congelación.

Otros potenciadores de vidrio adecuados que se incluyen en la composición para aumentar adicionalmente su estabilidad incluyen proteínas, hidrolizados de proteína, polipéptidos y aminoácidos. Preferentemente, se usan caseína o proteínas de guisante y más preferentemente, caseína hidrolizada o proteínas de guisante hidrolizadas. "Proteína hidrolizada" se refiere a una proteína que se ha sometido a hidrólisis parcial o completa ácida o enzimática para proporcionar una proteína hidrolizada que tiene un peso molecular de aproximadamente 1 kDa a aproximadamente 50 kDa. Preferentemente, al menos el 20 % del sustrato proteico se convierte en péptidos que tienen masas moleculares de 200 a 2000 dalton. La proteína hidrolizada tiene aproximadamente la misma composición de aminoácidos que la proteína completa y puede obtenerse a partir de cualquiera de un número de fuentes comerciales. Al ser hipoalergénica, la proteína hidrolizada puede usarse ventajosamente en ciertos alimentos para consumidores hiper sensibles tales como niños y personas mayores.

La cantidad total preferida de potenciadores de vidrio usada en la composición variará dependiendo de la composición global y sus condiciones de almacenamiento de secado destinadas. Generalmente, la relación molar de potenciadores de vidrio a los carbohidratos totales será de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,3. Una composición preferida comprende una relación molar de aproximadamente 0,1-0,2.

La solución que contiene el material biológico y la composición estabilizante usados en la presente invención pueden incluir una cantidad sustancial de sólidos totales (constituyentes menos el disolvente, tal como agua), de aproximadamente el 20 % a aproximadamente el 60 % con preferencia aproximadamente el 30-50 % en porcentaje en peso. Una porción principal de los sólidos totales puede consistir en el material bioactivo, la mezcla de carbohidratos y los potenciadores de vidrio. Por ejemplo, el material bioactivo puede estar presente en la formulación en una concentración que varía de aproximadamente el 5 % al 30 % p/v, con preferencia de aproximadamente el 10-20 % p/v. La masa en peso de la mezcla de composición en el medio de cultivo está típicamente entre aproximadamente el 10 % y aproximadamente el 60 %, con preferencia aproximadamente el 20-40 %. La viscosidad de las formulaciones de la invención es típicamente mayor que 1.000 centipoises (cP); más preferentemente, mayor que 5.000 cP y lo más preferente mayor que 10.000 cP.

PROCEDIMIENTOS DE PREPARACIÓN DE FORMULACIONES SECAS ESTABLES

Pueden usarse diversas técnicas de secado para secar eficazmente la composición. Estos procedimientos, aunque menos complicados y menos costosos que el secado por congelación o el secado al vacío, son generalmente más destructivos para los materiales biológicos. Muchos materiales biológicos son más propensos a cambios conformacionales brutos y reacciones indeseadas cuando se preservan usando procedimientos que tienen lugar a temperatura ambiente o más alta que cuando se usa el secado por congelación o el secado por enfriamiento. Como resultado, incluso cuando se usan agentes protectores actualmente conocidos, la actividad de muchos materiales biológicos rehidratados es tanto insatisfactoria en su propio derecho, como significativamente menor que si se preserva por secado a baja temperatura.

Los procedimientos preferidos para preparar formulaciones secas estables que contienen materiales bioactivos incluyen; (1) preparación de una formulación en suspensión viscosa mezclando el material bioactivo con la composición estabilizante de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas en una solución acuosa, (2) congelar instantáneamente la formulación en suspensión para formar partículas congeladas sólidas, (3) Opcionalmente, someter la partícula congelada a presión de alto vacío durante un tiempo corto para purgar las partículas y estabilizar su estructura, (4) retirar el agua evaporando la humedad a una temperatura por encima de la temperatura de congelación de la formulación, (5) reducir adicionalmente la actividad hídrica de la formulación a menos que 0,3 Aw a vacío completo y temperatura elevada.

Por ejemplo, una forma seca de material bioactivo puede formularse en una solución o suspensión que contiene la mezcla en polvo de la composición. La mezcla de composición puede disolverse en una solución acuosa templada con baja agitación pura antes de enfriar y mezclar con el material bioactivo. El material bioactivo, tales como el virus o la bacteria cultivados, puede concentrarse y separarse del medio de cultivo por centrifugación o filtración antes de la re-suspensión en la formulación. Alternativamente, la totalidad del agua en la formulación se proporciona en el líquido del material biológico concentrado. La suspensión se mantiene a una temperatura ligeramente por encima de la temperatura ambiente y la mezcla en polvo de la composición se añade lentamente a la suspensión templada (25 °C a 40 °C) que contiene el material biológico. La suspensión se agita suavemente en un mezclador planetario hasta que todos los componentes se dispersan o disuelven completamente y se obtiene una suspensión uniforme.

La solución viscosa puede reticularse después para formar un hidrogel (dependiendo de las propiedades del polisacárido) añadiendo iones metálicos o cambiando la temperatura o el pH de la suspensión y después secarse de acuerdo con los procedimientos de secado de la invención. Alternativamente, la suspensión puede congelarse instantáneamente mediante atomización a través de una boquilla, mediante goteo o mediante inyección en hielo seco o un baño de nitrógeno líquido para formar pequeñas partículas o gotitas, cordeles o perlas sólidas. Las partículas sólidas congeladas pueden almacenarse en un ultra-congelador entre -30 °C y -80 °C para su uso más tarde como un producto congelado estable o hasta el secado. El procedimiento de secado es secado al vacío donde la temperatura del producto se mantiene ligeramente por encima de su temperatura de congelación. Las gotitas o perlas congeladas se colocan en bandejas a una capacidad de carga de aproximadamente 1,07 kg/m² a aproximadamente 16,14 kg/m² y se secan de acuerdo con el procedimiento de la invención. Preferentemente, el procedimiento de secado se inicia por una etapa de purga corta, que permite la aclimatación del producto a la temperatura inicial y que la estructura de las partículas congeladas se relaje y se estabilice y se desgasifica el aire en exceso. Típicamente, la etapa de purga toma entre 0 y 60 minutos dependiendo de la viscosidad del producto y la carga de la bandeja. Las perlas o partículas deben mantenerse en una forma congelada sólida durante la etapa de purga entera. La temperatura del producto se lleva después por encima de su temperatura de congelación y se sigue la etapa de secado primaria hasta que toda el agua libre se evapora del producto. Una vez que la temperatura de la formulación alcanza la temperatura deseada, se ajusta el calor para mantener esa temperatura y se avanza la etapa de secado líquido primario por evaporación. En esta etapa la formulación ya se ha descongelado y tiene lugar la evaporación acelerada del agua sin ninguna ebullición ni formación de espuma. El procedimiento de secado se completa con una fase de secado secundario adicional a vacío máximo y temperatura elevada.

Los procedimientos típicos en la técnica anterior implican la formación de espuma y/o salpicadura extensivas y la ebullición violenta que pueden dañar los productos biológicos sensibles y provocar dificultades para el escalado industrial a alta capacidad de carga (véase por ejemplo la Pat. de EE.UU. N.º 6534087, donde la presión de vacío aplicada da como resultado una ebullición y una formación de espuma violentas), mientras que las composiciones y los procedimientos actuales evitan cualquier ebullición o formación de espuma de la formulación logrando una velocidad de secado significativamente más rápida y permite una alta capacidad de carga de la formulación. Adicionalmente, es difícil una desgasificación completa y eficiente de las suspensiones líquidas viscosas y puede requerir un periodo de tiempo extendido. Estos obstáculos se resolvieron todos en la presente invención usando una composición adecuada que permita un secado del líquido primario eficaz que forme una estructura vítrea sin nada de ebullición ni formación de espuma excesiva. La carga de partículas congeladas sólidas en una bandeja en oposición a la suspensión o el jarabe viscoso permite una capacidad de carga mucho más alta por área de secado en bandejas que la que se proporcionó de acuerdo con la técnica anterior.

En un ejemplo preferido de la presente invención, el material biológico es un cultivo de bacterias probióticas concentradas vivas. Se prepara una mezcla de composición en polvo que contiene un 1-4 % de alginato sódico o goma gelana, un 50-75 % de trehalosa, un 1-10 % de inulina o FOS, un 10-20 % de hidrolizados de proteína, tales como hidrolizados de caseína, suero, guisante, soja o semilla de algodón y un 1-10 % de citrato sódico o ascorbato sódico. El cultivo probiótico puede ser fresco, congelado o ya seco en una forma de polvo seco. La mezcla de composición se añade al medio de cultivo probiótico concentrado para llevar el contenido de sólidos de la mezcla de solución al 40-60 % (p/p) y el pH se ajusta a 6,5-7,5 con iones fosfato o citrato. La solución se mezcla a una temperatura ligeramente por encima de la temperatura ambiente (típicamente entre 25 °C - 37 °C) hasta que todos los componentes se disuelven completamente. La suspensión viscosa se gotea sobre nitrógeno líquido para formar gotitas o perlas pequeñas que se retiran después del nitrógeno líquido, se envasan en bolsitas y se almacenan en un ultra-congelador a -80 °C hasta que se seque.

Un procedimiento típico de secado de bacterias probióticas vivas incluye; esparcir las perlas congeladas sólidas en bandejas en una capa uniforme a una capacidad de carga entre 1070-16140 g/m² y las bandejas se colocan inmediatamente en un secador por congelación. Después se aplica una presión de vacío a aproximadamente 133 Pa o menor y dependiendo del tamaño del secador por congelación y del tipo de la fuente de calor, la temperatura de almacenamiento se ajusta para mantener las partículas a aproximadamente -20-30 °C. Las perlas congeladas sólidas se dejan purgar durante aproximadamente 0-60 minutos y se ajustan al vacío entre 266 y 1.333 Pa y la transferencia de calor aumenta para elevar la temperatura de la formulación a entre -10 °C y +0 °C. Estas condiciones de temperatura y presión de vacío se mantienen durante la etapa de secado de líquido primario que puede durar desde unas pocas horas y hasta 24 horas dependiendo de la carga de la bandeja. En algún punto durante el procedimiento de secado primario, la velocidad de evaporación del disolvente se ralentiza y la temperatura de la formulación empieza a aumentar debido al suministro de calor en exceso en la cámara de secado. Este punto indica el final de la etapa de secado primario en la presente invención. Un disolvente se dirige fuera de la formulación, los compuestos formadores de vidrio en la solución se concentran y se espesan hasta que dejan de fluir como un líquido y forman una estructura vítrea amorfa y/o estable. Después sigue una etapa de secado secundario a un vacío máximo y una temperatura de la formulación entre 30 °C y 50 °C. El fin de la etapa de secado secundario es retirar la humedad restante atrapada o unida y proporcionar una composición que es estable al almacenamiento durante un periodo de tiempo extendido a temperaturas ambiente. La etapa de secado secundario puede durar varias horas y su punto final es cuando la formulación está completamente seca y su actividad hídrica es menor que 0,3 Aw.

Los procedimientos de secado de la invención dan como resultado un material biológicamente activo que se

encapsula dentro de una estructura vítrea amorfa, evitando de esta manera el desplegamiento o la desnaturalización de las proteínas y ralentizando significativamente las interacciones moleculares o la reactividad cruzada, debidas a la movilidad grandemente reducida del compuesto y otras moléculas dentro de la composición vítrea amorfa. Siempre que la estructura sólida amorfa se mantenga a una temperatura por debajo de su temperatura de transición vítrea y que la humedad residual se mantenga relativamente baja (es decir, por debajo de una A_w de 0,5), las bacterias probióticas pueden mantenerse relativamente estables (véase la Figura 8). Nótese que lograr una estructura vítrea no es un prerequisite para la estabilidad a largo plazo ya que algunos materiales biológicos pueden ir mejor en un estado más cristalino.

La estructura vítrea seca puede usarse en bloque, cortarse en formas y tamaños deseados o aplastarse y molerse en un polvo de fluidez libre que proporciona un procesamiento posterior fácil como aglomeración en húmedo o en seco, granulación, formación de comprimidos, compactación, formación de gránulos o cualquier otra clase de procesamiento de administración. Los procedimientos para aplastar, moler, triturar o pulverizar se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, puede usarse un molino de martillo, un molino de aire, un molino de impacto, un molino de chorro, un molino de púas, un molino Wiley o un dispositivo de molienda similar. El tamaño de partícula preferido es menos de aproximadamente 1000 μm y preferentemente menos de aproximadamente 500 μm .

Las composiciones y los procedimientos descritos en el presente documento estabilizan el material biológico y preservan su actividad durante un periodo de almacenamiento extendido por encima de temperatura ambiente y humedad relativa. Por ejemplo, las composiciones se ensayan para su estabilidad someténdolas a temperatura elevada (por ejemplo, 40 °C) y alta humedad (por ejemplo, 33 % de HR) y midiendo la actividad biológica de las formulaciones. Como un ejemplo para bacterias probióticas vivas, los resultados de estos estudios demuestran que las bacterias formuladas en estas composiciones son estables durante al menos 60 días (véase la Figura 8). La estabilidad se define como el tiempo para una pérdida de potencia de log UFC/g. Dichas formulaciones son estables incluso cuando se usan altas concentraciones del material biológicamente activo. De esta manera, estas formulaciones son ventajosas en que pueden transportarse y almacenarse a temperaturas a o por encima de temperatura ambiente durante largos periodos de tiempo.

Ejemplos

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

Ejemplo 1

Preparación de composición seca y estable

Mezcla básica de carbohidratos

Aproximadamente 70 g de trehalosa (Cargill Minneapolis, MN), aproximadamente 5 g de Inulina instantánea (Cargill Minneapolis, MN) y aproximadamente 3 g de alginato sódico (ISP Corp., Wayne, NJ) se mezclaron uniformemente en forma seca.

Mezcla básica de potenciadores vítreos

Aproximadamente 17 g de hidrolizado de caseína o hidrolizado de guisante (hidrolizados ultra filtrados, Marcor, Carlstadt, NJ) y 5 g de citrato sódico o ascorbato sódico (Sigma, St. Louis, MO) se mezclaron uniformemente en forma seca.

Estabilización de bacterias probióticas

Un concentrado fresco de *Lactobacillus rhamnosus* (100 ml al 10 % de sólidos, directo de la cosecha de fermentación) se añadió en un mezclador y se mantuvo a 35 °C. Aproximadamente 78 g de mezcla básica de carbohidratos y aproximadamente 22 g de la mezcla básica de potenciadores se añadieron lentamente al cultivo probiótico y la mezcla se llevó a cabo a 35 °C durante 10 minutos. La suspensión viscosa se transfirió después a un recipiente que tenía un fondo perforado y permitió el goteo en un baño que contiene nitrógeno líquido. Las perlas se retiraron después del nitrógeno líquido y se transfirieron inmediatamente al secado.

Secado de las perlas congeladas que contienen bacterias probióticas

Las perlas congeladas se esparcieron en una bandeja a una capacidad de carga de 2150 g/m² y se colocaron inmediatamente en una estantería en un secador por congelación (Modelo 25 SRC, Virtis, Gardiner, NY). Después se ajustó el vacío a entre 266-358 Pa y la temperatura de la estantería se elevó a +30 °C. Estos ajustes de temperatura y presión de vacío se mantuvieron durante 5 horas. Opcionalmente, la temperatura de las perlas congeladas se aclimató a aproximadamente -20 °C antes de iniciar el secado de líquido primario aplicando una presión de vacío a aproximadamente 133 Pa y permitiendo que las perlas congeladas sólidas se purguen durante aproximadamente 10 minutos. La etapa de secado primario se siguió después por el ajuste de la presión de vapor a entre 266-358 Pa y la temperatura de la estantería se elevó a +30 °C. Estos ajustes de temperatura y presión de vacío se mantuvieron durante 5 horas. Una etapa de secado secundaria se siguió después a vacío completo (20-27

Pa) y la temperatura de la estantería se mantuvo entre 30 °C y 50 °C durante 3 horas adicionales. La formulación se secó completamente y su actividad de agua se midió por un instrumento Hygropalm Aw1 (Rotonic Instrument Corp., Huntington, NY) a una Aw = 0,23.

Ejemplo 2

5 Estabilidad de almacenamiento de las bacterias probióticas secas

La Figura 1 muestra la estabilidad de almacenamiento en dos condiciones aceleradas diferentes de almacenamiento de 40 °C y 33 % de HR y 30 °C 43 % de HR de bacterias probióticas estables del Ejemplo 1 y de bacterias probióticas secas disponibles en el mercado (Culturelle, Amerifit, Inc., Cromwell, CT). Las bacterias probióticas comerciales perdieron completamente su viabilidad dentro de las primeras pocas semanas a las condiciones de almacenamiento aceleradas, mientras que la composición seca de las bacterias probióticas de la presente invención solamente perdió 1,18 log después de 60 días a 30 °C y 43 % de HR y solamente 1,09 log a 40 °C y 33 % de HR.

Ejemplo 3

Producción a escala de composición seca estable que contiene la bacteria probiótica *Lactobacillus rhamnosus*.

15 *Lactobacillus rhamnosus* (400 g de concentrado congelado de una fuente comercial) se descongeló a 37 °C en un mezclador planetario dual con camisa (DPM, 1qt, Ross Engineering, Inc. Savannah, GA) y el contenido de sólidos se ajustó al 10 % en peso de sólidos con agua destilada. Aproximadamente 212 g de trehalosa (Cargill Minneapolis, MN), aproximadamente 20 g de Inulina instantánea (Cargill Minneapolis, MN), aproximadamente 12 g de alginato sódico (ISP Corp., Wayne, NJ), aproximadamente 136 g de hidrolizado de caseína (hidrolizados ultra filtrados, Marcor, Carlstadt, NJ) y aproximadamente 20 g de ascorbato sódico (Sigma, St. Louis, MO) se mezclaron uniformemente en forma seca. La mezcla de polvos se añadió lentamente al cultivo probiótico y la mezcla se llevó a cabo a 40 RPM y 37 °C durante 10 minutos. La solución se transfirió después a un recipiente que tenía un fondo perforado y permitió el goteo en un baño que contiene nitrógeno líquido. Las perlas se retiraron después del nitrógeno líquido, se colocaron en una bolsita de lámina de aluminio sellada y se almacenaron en un ultra-congelador a -80 °C durante varias semanas.

Para secar, las perlas congeladas se esparcieron uniformemente en bandejas a una capacidad de carga que varía de 5380 hasta 16140 g/m² y las bandejas se colocaron en estanterías en un secador por congelación (Modelo 25 SRC, Virtis, Gardiner, NY). Una etapa de secado de líquido primario se inició ajustando la presión de vacío a entre 266-360 Pa y la temperatura del producto se elevó y se estabilizó entre -10 -5 °C. Con el tiempo (aproximadamente 10-16 h) la temperatura del producto aumentó a aproximadamente 20-25 °C en cuyo punto se inició una etapa de secado secundario a un vacío máximo (20-27 Pa) y la temperatura del producto se mantuvo a entre 30-40 °C durante 14 horas adicionales. La formulación se secó completamente y su actividad hídrica se midió a 0,23 Aw.

Ejemplo 4

Producción a escala de composición seca estable que contiene la bacteria probiótica *Bifidobacterium lactis*.

35 *Bifidobacterium lactis* (400 g de concentrado congelado de una fuente comercial) se descongeló a 37 °C en un mezclador planetario dual con camisa (DPM, 1qt, Ross Engineering, Inc. Savannah, GA). Aproximadamente 212 g de trehalosa (Cargill Minneapolis, MN), aproximadamente 20 g de Inulina instantánea (Cargill Minneapolis, MN), aproximadamente 12 g de alginato sódico (ISP Corp., Wayne, NJ) y aproximadamente 20 g de ascorbato sódico (Sigma, St. Louis, MO) se mezclaron uniformemente en forma seca. La mezcla de polvos se añadió lentamente al cultivo probiótico. Aproximadamente 136 g de hidrolizado de guisante (hidrolizados ultra filtrados, Marcor, Carlstadt, NJ) se disolvieron en 80 g de agua destilada y la mezcla se sometió a microondas poco tiempo o se calentó en un baño de agua a 60 °C hasta la disolución completa y después se enfrió a aproximadamente 35 °C. La mezcla seca en polvo y la solución que contenía hidrolizado de proteína se añadieron al concentrado probiótico y la mezcla se llevó a cabo a 40 RPM y 37 °C durante 20 minutos. La suspensión se transfirió después a un recipiente que tenía un fondo perforado y permitió el goteo en un baño que contiene nitrógeno líquido. Las perlas se retiraron después del nitrógeno líquido, se colocaron en una bolsita de lámina de aluminio sellada y se almacenaron en un ultra-congelador a -80 °C durante varias semanas.

Para secar, las perlas congeladas se esparcieron uniformemente en bandejas a una capacidad de carga de 8611 g/m² y las bandejas se colocaron en estanterías en un secador por congelación (Modelo 25 SRC, Virtis, Gardiner, NY). Una etapa de secado de líquido primario se inició ajustando la presión de vacío a entre 266-360 Pa y la temperatura del producto se elevó y se estabilizó entre -10 -5 °C. Con el tiempo (aproximadamente 10-16 h) la temperatura del producto aumentó a aproximadamente 20-25 °C en cuyo punto se inició una etapa de secado secundario a un vacío máximo (20-27 Pa) y la temperatura del producto se mantuvo a entre 30-40 °C durante 14 horas adicionales. La formulación se secó completamente y su actividad hídrica se midió a 0,23 Aw.

55

Ejemplo 5**Preparación de una formulación en hidrogel que contiene la bacteria probiótica *Bifidobacterium lactis*:**

Se prepara una suspensión probiótica concentrada de *Bifidobacterium lactis* de acuerdo con el Ejemplo 1. A la formulación básica, se añaden 0,5 g de fosfato cálcico dibásico, seguido de 0,5 g de gluconolactona. La suspensión se permite endurecer a temperatura ambiente durante las siguientes 2 horas para formar un hidrogel sólido. El gel firme se rebana en hilos finos y largos, usando un cortador/trituradora. Los hilos finos se cargan directamente en bandejas en forma húmeda o congelada instantáneamente en nitrógeno líquido y se carga en una bandeja a una capacidad de carga de 5380 g/m² y se colocó en un secador por congelación para secar como se describe en el Ejemplo 3. La actividad hídrica (Aw) de la formulación es 0,05 (Medida por HygroPalm Aw1, Rotonic Huntington, NY). La formulación seca se muele además a polvo fino usando un equipo de molienda de martillo convencional y se tamiza a través de tamices de 50-250 micrómetros.

Ejemplo 6**Optimización de la relación molar entre los potenciadores vítreos y la mezcla de carbohidratos**

Varias composiciones que contienen diversas proporciones molares de potenciadores vítreos y mezclas de carbohidratos se prepararon de acuerdo con el ejemplo 1. Un cultivo concentrado de la bacteria probiótica *L. paracasei* se obtuvo a partir de una fuente comercial y se preparó en una composición seca como se describe en el Ejemplo 1 excepto por que la suspensión se cargó inmediatamente en bandejas en forma húmeda sin etapas de congelación inmediata ni purga. La suspensión se secó en fases primaria y secundaria como se describe en los Ejemplos 1 & 3 excepto por que la temperatura de la estantería se elevó a 40 °C durante las fases de secado primario y secundario. El polvo estable se sometió a condiciones de almacenamiento de aceleración a 37 °C y 33 % de HR durante 84 días. La Figura 2 muestra el efecto de diversas relaciones molares en la estabilidad de las bacterias secas. Los resultados sugieren que la relación molar óptima entre los potenciadores vítreos y la mezcla de carbohidratos es de aproximadamente 0,12-0,15.

Ejemplo 7**Efecto de la composición de la presente invención en la estabilidad de almacenamiento de la bacteria probiótica *L. acidophilus***

Se preparó una composición que contiene una mezcla de carbohidratos y una mezcla de potenciadores vítreos como se describe en el Ejemplo 1. Un cultivo concentrado de la bacteria probiótica *L. acidophilus* se obtuvo a partir de una fuente comercial y se preparó en una composición seca como se describe en el Ejemplo 1 & 3 y el polvo estable se sometió a condiciones de almacenamiento de aceleración a 24 °C y 33 % de HR durante 537 días. La Figura 3 demuestra la estabilidad superior del probiótico formulado con la composición de la presente invención. Los resultados muestran que la viabilidad probiótica se redujo solamente 0,18 log durante 537 días de almacenamiento en estantería en las condiciones especificadas.

Ejemplo 8**Efecto de diversos compuestos potenciadores vítreos en la estabilidad de almacenamiento de la bacteria probiótica *L. acidophilus*.**

Se prepararon varias composiciones que contienen mezcla de carbohidratos como se describe en el Ejemplo 1 y mezcla de potenciadores vítreos que contiene hidrolizado de caseína y citrato sódico o ascorbato sódico o una combinación de ambos. Un cultivo concentrado de la bacteria probiótica *L. acidophilus* se obtuvo de una fuente comercial y se preparó en una composición seca como se describe en el Ejemplo 1 excepto por que la suspensión se cargó inmediatamente en las bandejas en forma húmeda sin las etapas de congelación inmediata ni purga. La suspensión se secó en fases primaria y secundaria como se describe en los Ejemplos 1 & 3 y el polvo estable se sometió a condiciones de almacenamiento de aceleración a 24 °C y 43 % de HR durante 180 días. La Figura 4 muestra el efecto de diversos compuestos potenciadores vítreos en la estabilidad de las bacterias secas. Los resultados sugieren que se obtuvo una estabilidad mejor significativa mediante la inclusión de un potenciador vítreo adicional en la parte superior del hidrolizado de proteína. En particular, la inclusión de cantidades iguales de acetato sódico y ascorbato sódico proporcionó la composición más estable. Los resultados de ambos Ejemplos 5 & 6 también sugirió que diversos potenciadores vítreos pueden ser más eficaces o incluso pueden actuar como un desestabilizante dependiendo de la cepa bacteriana.

Ejemplo 9**Efecto de diversas relaciones de hidrolizado de proteína/azúcar en la estabilidad de almacenamiento de la bacteria probiótica *Bifidobacterium lactis*.**

Se prepararon varias composiciones que contienen mezcla de carbohidratos y mezcla de potenciadores vítreos como se describe en el Ejemplo 1 y composiciones que contienen iguales cantidades pero a diversas relaciones de

hidrolizado de guisante/trehalosa con o sin ascorbato sódico. Un cultivo concentrado de la bacteria probiótica *Bifidobacterium lactis* se obtuvo de una fuente comercial y se preparó en una composición seca como se describe en el Ejemplo 1 & 3 y el polvo estable se sometió a condiciones de almacenamiento de aceleración a 35 °C y 43 % de HR durante 7 semanas. La Figura 5 muestra el efecto de relaciones 1:4, 1:2,5 y 1:1,5 de hidrolizado de guisante/trehalosa con o sin ascorbato sódico en la estabilidad de las bacterias secas. Los resultados sugirieron que se obtuvo una estabilidad mejor significativa a relaciones en aumento de hidrolizado de guisante/trehalosa. En particular, una relación de 1:1,5 de hidrolizado de guisante/trehalosa proporcionó una composición más estable. La inclusión de ascorbato sódico a mayor relación de hidrolizado de guisante/trehalosa dio como resultado una estabilidad superior en comparación a las formulaciones con ascorbato sódico excluido.

Ejemplo 10

Optimización de pH para la estabilidad máxima del probiótico *L. rhamnosus*.

Varias composiciones que contienen mezcla de carbohidratos y mezcla de potenciadores vítreos como se describe en el Ejemplo 1 se prepararon a diferentes pH. Se obtuvo un cultivo concentrado de la bacteria probiótica *L. rhamnosus* de una fuente comercial y se preparó en una composición seca como se describe en el Ejemplo 1 & 3. El polvo estable se sometió a condiciones de almacenamiento de aceleración a 40 °C y 33 % de HR 8 semanas. La Figura 6 muestra el efecto de pH de la suspensión sobre la estabilidad de las bacterias secas. Los resultados sugirieron que la estabilidad óptima se logró a pH neutro (~7).

Ejemplo 11

Polvo seco estable que contiene una enzima:

Una fórmula de hidrogel que contiene un 40 por ciento en peso de fitasa (BASF, GmBH) se prepara mezclando 400 g de la mezcla de carbohidratos y 200 g de la mezcla de potenciadores vítreos como se describe en el Ejemplo 1 y 4 y 400 g de fitasa en 1000 ml de agua. La formulación de hidrogel triturada se congela instantáneamente en nitrógeno líquido y se seca en un horno de vacío a una temperatura de secado primario y secundario de 50 °C. Para la determinación de la carga y la estabilidad de almacenamiento de la fórmula seca: se pesa de forma precisa una muestra seca (<100 mg) en un tubo de microcentrífuga. Se añaden 200 µl de dimetilsulfóxido (DMSO). La formulación se disuelve en el tampón DMSO sometiendo a vórtex. A esta muestra, se añaden 0,8 ml de una solución que contiene NaOH 0,05 N, SDS al 0,5 % y ácido cítrico 0,075 M (sal trisódica). Los tubos se someten a ultrasonidos durante 10 min a 45 °C, seguido de una breve centrifugación a 5.000 rpm durante 10 min. Las alícuotas de la solución transparente de DMSO/NaOH/SDS/citrato se toman en pocillos de una microplaca y se analizan para su contenido de proteína usando el procedimiento de ensayo Bradford. La estabilidad de la composición seca de enzima estable después de la exposición a 95 °C durante 20 min es significativamente mayor que una enzima seca sin la composición de la presente invención.

Ejemplo 12

Polvo seco estable que contiene una vacuna ISAV:

Se prepara una suspensión concentrada de una vacuna ISAV (Novozyme, Dinamarca) de acuerdo con el Ejemplo 4 excepto por que se añadieron 20 ml de una solución de quitosano al 4 % en ácido acético al 0,5 % a la suspensión que contiene el concentrado de vacuna ISAV, la mezcla de carbohidratos y los potenciadores vítreos. Se añaden 0,5 g de fosfato cálcico dibásico, seguido de 0,5 g de gluconolactona. La suspensión se deja endurecer a temperatura ambiente durante las siguientes 2 horas para formar un hidrogel sólido. El gel firme se rebana en hilos finos y largos, usando un cortador/trituradora disponible en el mercado. Los hilos finos se cargan directamente en bandejas en forma húmeda o congelada instantáneamente en nitrógeno líquido y se carga en una bandeja a una capacidad de carga de 16140 g/m² y se colocó en un secador por congelación para secar como se describe en el Ejemplo 3. La actividad hídrica (Aw) de la formulación es 0,25. La formulación seca se muele además a polvo fino usando un equipo de molienda de martillo convencional y se tamiza a través de tamices de 50-150 micrómetros. La composición de ISAV seca estable se usa para la vacunación oral recubriendo en la parte superior un alimento comercial con la composición seca y suministrándolo al salmón del atlántico.

Ejemplo 13

Preparación de cebo de especies invasoras

Se prepara un cebo granulado para especies invasivas marcadas específicamente como diana de acuerdo con la presente invención que contiene un plaguicida. Se preparan 200 g de una formulación como se describe en el Ejemplo 9 y se añaden a 200 g de agua. A esta solución se añaden 90 g de Rotenona y 0,5 g de fosfato cálcico dibásico, seguido de 0,5 g de gluconolactona. La suspensión se seca por pulverización inmediatamente en un secador de pulverización industrial y la formulación seca se usa para marcar específicamente como diana especies invasivas sin un efecto deletéreo de la toxina en el medio ambiente o cercano a los ecosistemas.

Ejemplo 14

Preparación de una formulación de probiótico de una planta protegida:

5 Se prepara un agente de control biológico tal como *Rhizobacteria* en una composición seca de acuerdo con el Ejemplo 4. La efectividad de la composición de *Rhizobacteria* seca se evalúa en lechuga en condiciones de crecimiento gnotobióticas. Se inoculan dosis de 100 mg de composición seca de *Rhizobacteria* por planta en tarros con arena y se plantan con líneas germinales de lechuga pre-germinadas (24 h). Se aplica una dosis de nutriente de 5 ml de solución de Hoagland esterilizada a las plantas en el tarro. Los tarros se disponen aleatoriamente en la cámara de crecimiento mantenidos a 28 °C con un fotoperiodo de 12 h. Durante un intervalo de cada 7 días después de la inoculación, las plantas y la arena adherida se retiran cuidadosamente de los tarros.

10 Las raíces se lavan en tampón fosfato estéril (pH 7,0) y se graba la medición de la longitud de las raíces.

Referencias de Patente de EE.UU.:

- 6.190.701 Composition and method for stable injectable liquids Marzo de 1999. Roser y col.
- 6.964.771 Method for stably incorporating substances within dry, foamed glass matrices. Septiembre de 1997. Roser y col.
- 15 5.766.520 Preservation by formulation formation Junio de 1998. Bronshtein.
- 6.534.087 Process for preparing a pharmaceutical composition. Junio de 2001. Busson y Schroeder.
- 6.884.866 Bulk drying and the effects of inducing bubble nucleation. Abril de 2005. Bronshtein.
- 7.153.472 Preservation and formulation of bioactive materials for storage and delivery in hydrophobic carriers Diciembre de 2006 Bronshtein.
- 20 20080229609 Preservation by Vaporization. Junio de 2005. Bronshtein
- 6.306.345 Industrial scale barrier technology for preservation of sensitive biological materials at ambient temperatures Octubre de 2001. Bronshtein y col.
- 7381425 Preservation of bioactive materials by freeze dried foam. Septiembre de 2006. Truong-le, Vu.

Otras referencias:

- 25 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 Leptospirae by Drying From the Liquid State, J. Gen. Microbiol., 27:341-343.
- 30 Crowe, J.F., Carpenter, J.F. and Crowe, L.M. 1998. THE ROLE OF VITRIFICATION IN ANHYDROBIOSIS. Annu. Rev. Physiol. 60:73-103.

REIVINDICACIONES

1. Una composición estabilizante seca en un estado vítreo preparada de acuerdo con el procedimiento de preparación de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10 que comprende un material biológico, en la que la composición estabilizante comprende (a) un 0,5-90 % de un componente carbohidrato, en la que el componente carbohidrato comprende un disacárido, un oligosacárido y un polisacárido, (b) un 0,5-40 % de un componente proteico que comprende una proteína hidrolizada y (c) una sal de un ácido orgánico que comprende entre un 0,5-20 % de ácido carboxílico, en la que el material biológico comprende una célula viva, muerta o atenuada, un microbio, un virus, una bacteria, una bacteria probiótica, una bacteria de una planta o del suelo, una levadura, un cultivo celular, una proteína, una proteína recombinante, una enzima, un péptido, una hormona, una vacuna, un antibiótico, un fármaco o una mezcla de los mismos;
 5 en la que el polisacárido se selecciona del grupo que consiste en ftalato de acetato de celulosa (CAP), carboxi-metil-celulosa, pectina, alginato sódico, sales de ácido alginico, hidroxil propil metil celulosa (HPMC), metil celulosa, carragenina, goma gelana, goma guar, goma acacia, goma xantana, goma de garrofín, quitosano y derivados de quitosano, ácido poliglucólico, almidones y almidones modificados y una mezcla de los mismos;
 10 en la que el oligosacárido se selecciona del grupo que consiste en ciclodextrinas, inulina, maltodextrinas, dextranos, fructo-oligosacáridos (FOS), galacto-oligosacáridos (GOS), manano-oligosacáridos (MOS) y una mezcla de los mismos;
 15 en la que el ácido carboxílico se selecciona del grupo que consiste en ácido láctico, ácido ascórbico, ácido maleico, ácido oxálico, ácido malónico, ácido málico, ácido succínico, ácido cítrico, ácido glucónico, ácido glutámico y una mezcla de los mismos.
 20
2. La composición estabilizante seca de la reivindicación 1, en la que el disacárido está presente a un 40-80 %, el oligosacárido está presente a un 5-10 % y el polisacárido está presente a un 5-10 %, cada porcentaje basándose en el peso total del componente carbohidrato.
3. La composición estabilizante seca de la reivindicación 1, en la que la proteína hidrolizada se selecciona del grupo
 25 que consiste en caseína hidrolizada, proteína de suero hidrolizada, proteína de guisante hidrolizada, proteína de soja hidrolizada y una mezcla de las mismas.
4. La composición estabilizante seca de la reivindicación 1, en la que el disacárido se selecciona del grupo que consiste en trehalosa, sacarosa, lactosa y una mezcla de las mismas.
5. La composición estabilizante seca de la reivindicación 1, en la que la relación en peso de
 30 disacárido/oligosacárido/polisacárido es de aproximadamente 10:0,2:0,1 a aproximadamente 10:2:1.
6. La composición estabilizante seca de la reivindicación 1, en la que el disacárido está presente al 10-90 %, el oligosacárido está presente al 1-10 % y el polisacárido está presente al 0,1-10 %, cada porcentaje basado en el peso total del componente carbohidrato.
7. Un procedimiento de preparación para preservar un material biológico, que comprende:
 35 (a) añadir una mezcla de composición seca a un material biológico en un medio de cultivo para formar una suspensión viscosa, en el que la masa en peso del material biológico en el medio de cultivo está entre un 5 % y un 30 % p/v y en el que la mezcla de composición añadida en el medio de cultivo está entre un 10 % y un 60 %, en el que el contenido de sólidos final en la suspensión es de un 20 % a un 60 %, en el que la mezcla de
 40 composición seca comprende un disacárido, un oligosacárido, un polisacárido, una proteína hidrolizada y una sal de ácido carboxílico;
 (b) congelar instantáneamente la suspensión en nitrógeno líquido para formar partículas congeladas sólidas en una forma de perlas, gotitas o cordeles;
 (c) secar con secado primario las partículas congeladas por evaporación, al vacío, a una temperatura por encima de la temperatura de congelación de las partículas congeladas para formar una formulación primariamente
 45 secada; y
 (d) secar con secado secundario la formulación primariamente secada a un vacío máximo y a una temperatura de 20 °C o más alta durante un tiempo suficiente para reducir la actividad hídrica de la formulación primariamente secada, por lo que se prepara un material biológico preservado en estado vítreo,
 50 en el que el material biológico preservado comprende (a) un 0,5-90 % de un componente carbohidrato, en el que el componente carbohidrato comprende el disacárido, el oligosacárido y el polisacárido, (b) un 0,5-40 % de un componente proteico que comprende la proteína hidrolizada y (c) una sal de un ácido orgánico que comprende entre un 0,5-20 % de ácido carboxílico, en la que el material biológico comprende una célula viva, muerta o atenuada, un microbio, un virus, una bacteria, una bacteria probiótica, una bacteria de una planta o del suelo, una levadura, un cultivo celular, una proteína, una proteína recombinante, una enzima, un péptido, una hormona, una vacuna, un
 55 antibiótico, un fármaco o una mezcla de los mismos;
 en el que el polisacárido se selecciona del grupo que consiste en ftalato de acetato de celulosa (CAP), carboxi-metil-celulosa, pectina, alginato sódico, sales de ácido alginico, hidroxil propil metil celulosa (HPMC), metil celulosa, carragenina, goma gelana, goma guar, goma acacia, goma xantana, goma de garrofín, quitosano y derivados de

- quitosano, ácido poliglucólico, almidones y almidones modificados y una mezcla de los mismos;
en el que el oligosacárido se selecciona del grupo que consiste en ciclodextrinas, inulina, maltodextrinas, dextranos, fructo-oligosacáridos (FOS), galacto-oligosacáridos (GOS), manano-oligosacáridos (MOS) y una mezcla de los mismos;
- 5 en el que el ácido carboxílico se selecciona del grupo que consiste en ácido láctico, ácido ascórbico, ácido maleico, ácido oxálico, ácido malónico, ácido málico, ácido succínico, ácido cítrico, ácido glucónico, ácido glutámico y una mezcla de los mismos.
8. El procedimiento de preparación de la reivindicación 7, que comprende además una etapa de aclimatación de la partícula congelada sólida antes de iniciar la etapa de secado primario, en el que la etapa de aclimatación se lleva a
- 10 cabo al vacío y a temperatura por debajo de la temperatura de congelación de las partículas congeladas.
9. El procedimiento de preparación de la reivindicación 7, en el que la suspensión se solidifica a un hidrogel firme por cambio de pH o temperatura o reticulando las cadenas de polímero antes de la congelación instantánea.
10. El procedimiento de preparación de la reivindicación 7, en el que la actividad hídrica (A_w) de la composición estabilizante seca es $A_w < 0,3$ o menor.
- 15 11. Un producto para consumo oral que comprende la composición estabilizante seca de la reivindicación 1.
12. El producto de la reivindicación 11, en el que el producto es un producto nutracéutico, farmacéutico o de vacuna.
13. El producto de la reivindicación 11, en el que el producto es un alimento o un producto de suministro animal.

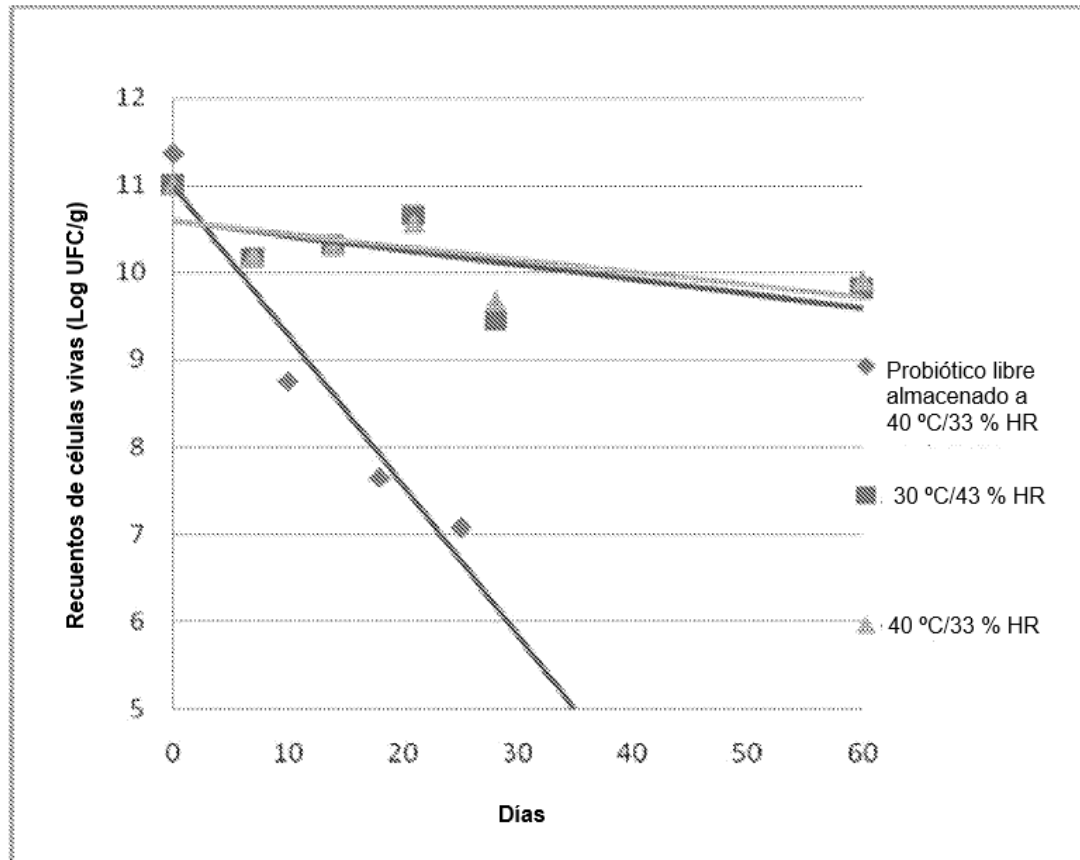


Figura 1

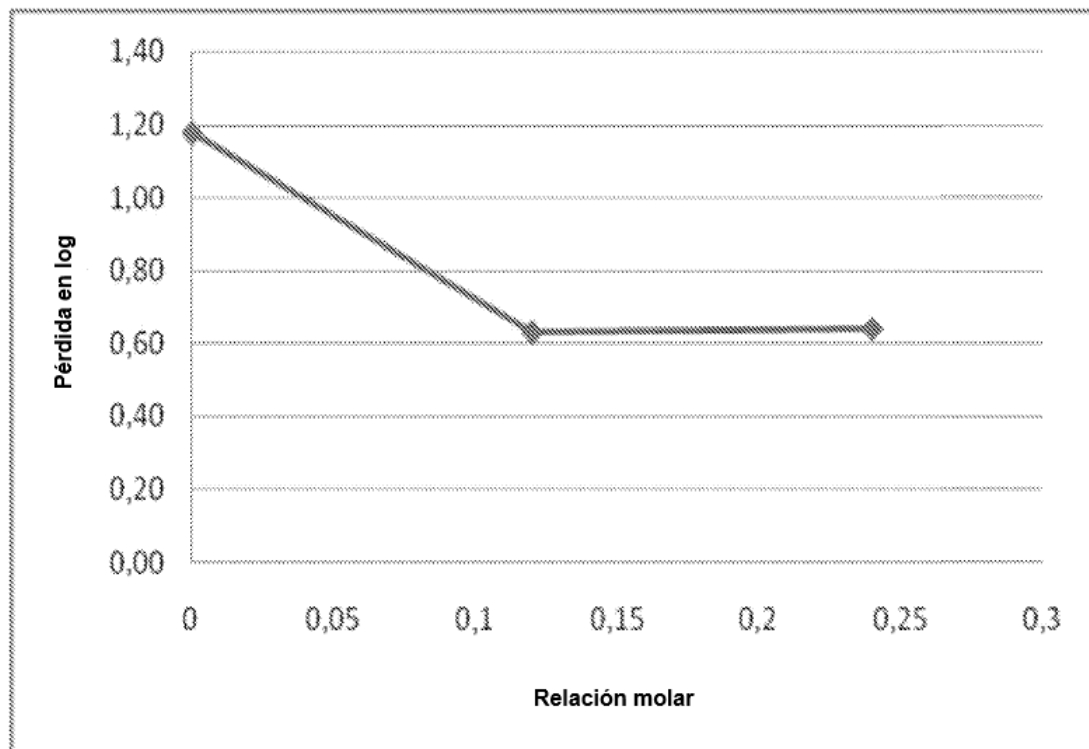


Figura 2

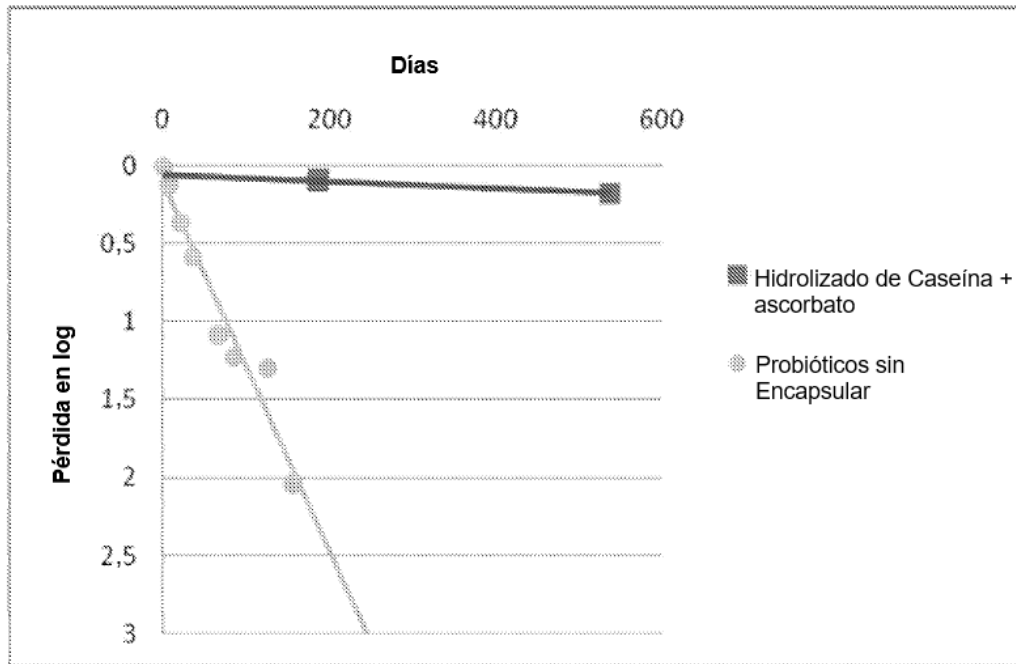


Figura 3

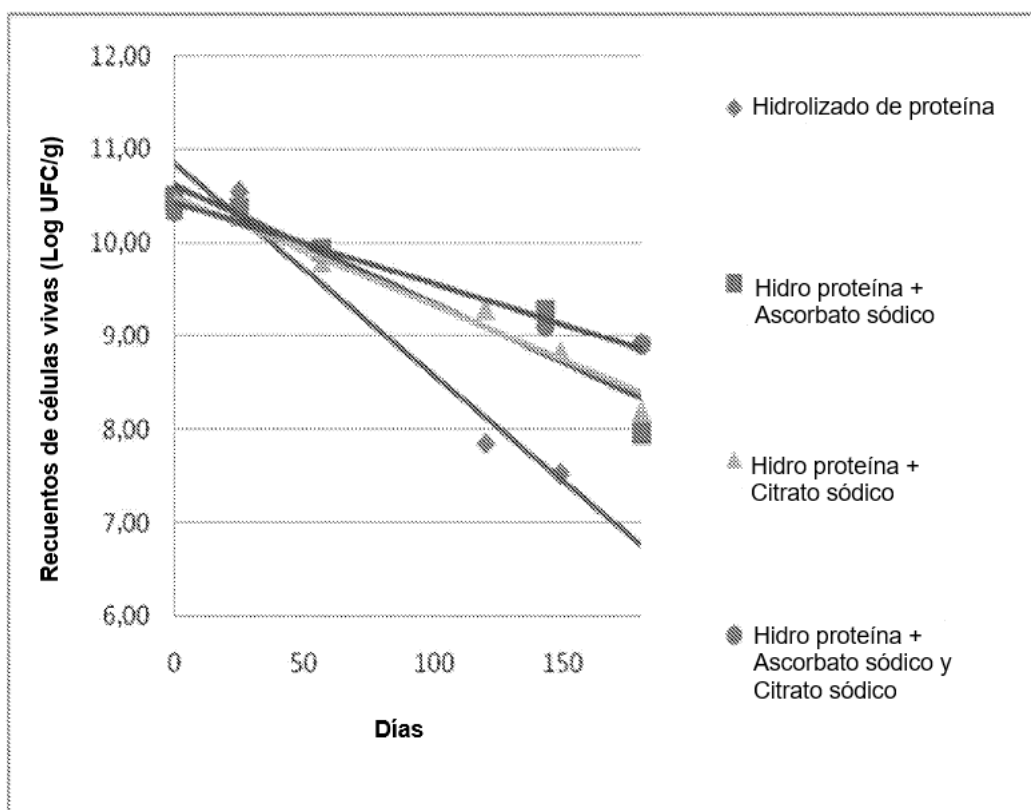


Figura 4

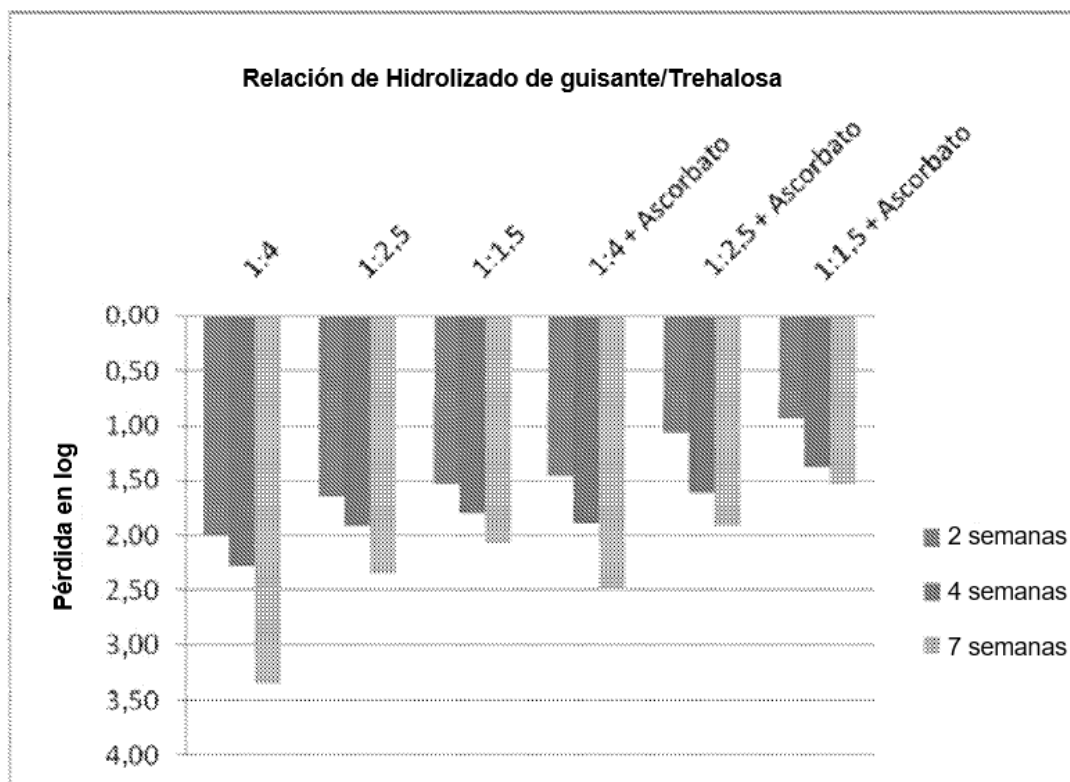


Figura 5

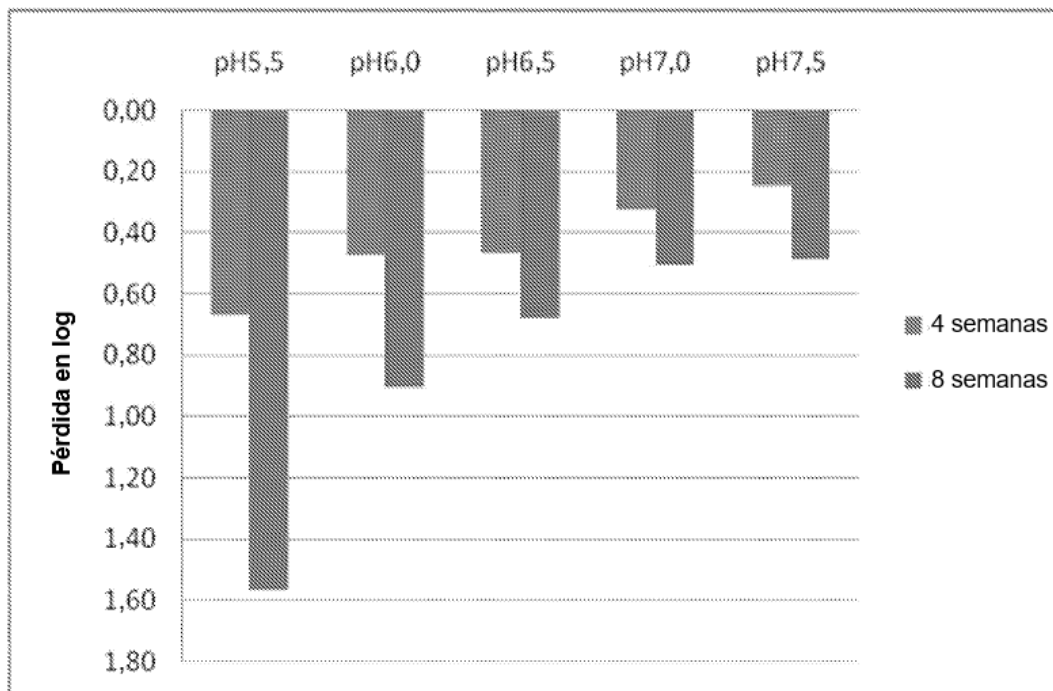


Figura 6