

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 731 816**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/48** (2006.01)

**A61K 35/744** (2015.01)

**A61K 35/644** (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.09.2015 PCT/GB2015/052594**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.03.2016 WO16038355**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.09.2015 E 15766194 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2019 EP 3177301**

54 Título: **Un proceso mejorado para producir una cápsula de gelatina blanda que comprende bacterias probióticas viables y una cápsula de gelatina blanda que comprende bacterias probióticas viables que tienen un periodo de conservación largo**

30 Prioridad:

**08.09.2014 GB 201415862**

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

**19.11.2019**

73 Titular/es:

**AYANDA GMBH (100.0%)  
Am Hünengrab 20  
16928 Pritzwalk, DE**

72 Inventor/es:

**PHILIPP, JESSICA;  
KURTMANN, LONE;  
WINNING, METTE y  
KAPPELGAARD, JULIE MAHLER**

74 Agente/Representante:

**AZNÁREZ URBIETA, Pablo**

ES 2 731 816 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**

Un proceso mejorado para producir una cápsula de gelatina blanda que comprende bacterias probióticas viables y una cápsula de gelatina blanda que comprende bacterias probióticas viables que tienen un periodo de conservación largo

**Campo de la invención**

La presente invención se refiere al campo de las cápsulas de gelatina blanda que comprenden bacterias probióticas y a un proceso mejorado para producir una cápsula de gelatina blanda que comprende bacterias probióticas.

**Antecedentes de la invención**

Para cápsulas de gelatina blanda que comprenden bacterias probióticas es una práctica común mencionar el número de bacterias probióticas en el momento de la fabricación o al final del periodo de almacenamiento. En la técnica anterior se han descrito diversos intentos para producir cápsulas de gelatina blanda que comprenden bacterias probióticas viables que tienen un periodo de almacenamiento largo, por ejemplo, como se resume en el documento WO 2012/021432 que se incorpora en el presente documento como referencia.

El documento WO 2012/021432 describe un proceso de fabricación de una cápsula de gelatina blanda que contiene bacterias probióticas microencapsuladas que son estables a temperatura ambiente durante al menos 24 meses. La solución es proporcionar bacterias probióticas con al menos un revestimiento que comprenda al menos un lípido vegetal que tenga un punto de fusión entre 35 °C y 75 °C.

Los ensayos de productos disponibles en el mercado en la actualidad mostraron que, en general, en los productos analizados, el nivel de actividad del agua era relativamente alto, por encima de 0,3. A menudo, las propiedades de barrera al agua del sistema de envasado aplicado eran bajas, por ejemplo, un blíster de aluminio/PVC y que combinado con un material desecante no activo presente después de un cierto periodo de tiempo tiene un efecto perjudicial sobre el número de bacterias viables en los productos.

El documento CA 2 675 892 describe envasado para cápsulas de gelatina blanda en un recipiente que se puede cerrar herméticamente en la pared o paredes interiores de las cuales se integra una absorbente y al menos un formador de canales, al menos sobre parte del área. Los ejemplos de compuestos sensibles a la humedad que están presentes preferentemente en las cápsulas de gelatina blanda son vitaminas y cultivos probióticos. Los ejemplos del documento CA 2 675 892 muestran datos solo para vitaminas. El documento US 2012/107395 desvela cápsulas de gelatina blanda que comprenden una cubierta de gelatina y un relleno que comprende probiótico y aceite.

Ninguno de los documentos mencionados anteriormente describe o apunta al proceso para producir una cápsula de gelatina blanda que comprenda bacterias probióticas viables ni a las cápsulas de gelatina blanda que comprenden bacterias probióticas viables de la presente invención.

**Sumario de la invención**

La presente invención se refiere a un método para producir y almacenar una cápsula de gelatina blanda que comprende bacterias probióticas cuyo proceso de acuerdo con las reivindicaciones se ha mejorado mediante la optimización del proceso de producción para minimizar la pérdida de células viables durante la producción. El método se puede mejorar aún más reduciendo la pérdida de células viables durante el almacenamiento al controlar cuidadosamente la actividad del agua durante el almacenamiento en estantería para proporcionar una cápsula de gelatina blanca que comprende al menos 1 E+09 bacterias viables después de 24 meses de almacenamiento a 25 °C.

Las bacterias probióticas son microorganismos vivos y esto puede ser un desafío durante la producción y formulación de formas de dosificación finales. Las bacterias probióticas son especialmente sensibles a la temperatura, el contenido de humedad y otros ingredientes en una matriz de formulación.

El uso de una temperatura de relleno baja y, de forma correspondiente, usando una gelatina con menor gelificación y punto de fusión que lo convencional, garantiza la supervivencia de las bacterias probióticas durante la producción. La temperatura de la cuña (para rellenar y ayudar en el cierre hermético), y la temperatura de la caja del esparcidor (para formar la gelatina en una lámina adecuada para entrar en los rodillos del troquel) se deben ajustar en consecuencia. Se debe evitar la tensión mecánica.

Además, el envase de las cápsulas de gelatina blanda que comprenden bacterias probióticas se debería optimizar controlando cuidadosamente la actividad del agua durante el almacenamiento.

La persona con experiencia en la materia sabe bien que la supervivencia de las bacterias probióticas se mejora con una actividad del agua baja. Sin embargo, una cápsula de gelatina blanda se volverá quebradiza y tendrá pérdidas si

la actividad del agua es demasiado baja. La actividad óptima del agua es, por lo tanto, un equilibrio delicado entre la supervivencia de las bacterias probióticas y las cápsulas de gelatina blanda intactas. Se encontró que la actividad del agua debería ser preferentemente de 0,2 como máximo para su almacenamiento a temperatura ambiente, tal como 25 °C.

5

### Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un método para producir una cápsula de gelatina blanda que comprende bacterias probióticas no revestidas, el método comprendiendo mezclar las bacterias probióticas no revestidas con al menos un aceite para obtener un material de relleno a una temperatura en el intervalo de 5 a 15 °C, encapsular el material de relleno en una cápsula de gelatina blanda preparada a partir de una gelatina que tiene un punto de fusión en el intervalo de 11 a 28 °C; y secar la cápsula de gelatina blanda en una o más etapas a una temperatura como máximo de 25 °C hasta una actividad del agua como máximo de 0,25.

15 La actividad del agua ( $a_w$ ) se define como la presión de vapor parcial del agua en una composición a una temperatura especificada dividida entre la presión de vapor parcial del agua en estado estándar a la misma temperatura. Por lo tanto la actividad del agua actúa como una medida de la cantidad de agua libre (es decir, sin unir) en una composición. Se puede calcular como:

$$20 \quad a_w = p/p_0$$

en la que  $p$  es la presión de vapor parcial del agua en la composición y  $p_0$  es la presión de vapor del agua pura la misma temperatura.

25 Como alternativa, la actividad del agua se puede calcular como:

$$a_w = I_w x_w$$

en la que  $I_w$  es el coeficiente de actividad del agua y  $x_w$  es la fracción molar de agua.

30

Los dos cálculos que se han mencionado anteriormente que definen  $a_w$  son equivalentes.

La actividad del agua se puede medir con métodos conocidos por las personas con experiencia en la materia, por ejemplo, mediante la aplicación de un instrumento Hygrolab de Rotronic.

35

Una cápsula de gelatina blanda se define como una cubierta a base de gelatina blanda que rodea un material de relleno. La expresión "material de relleno" se refiere a la totalidad de los materiales incluidos dentro de la cubierta. Como tal, el material de relleno puede ser, por ejemplo, una solución homogénea o una suspensión.

40 El uso de cápsulas de gelatina blanda en la administración de suplementos dietéticos o productos farmacéuticos es amplio. La cápsula de gelatina blanda común se produce principalmente con el denominado proceso de Encapsulación con Troquel Giratorio (inventado por Robert Pauli Scherer), en el que dos cintas semisólidas plana de material de cubierta a base de gelatina se producen a partir de una solución de gelatina líquida, a continuación las dos cintas se ponen juntas en un conjunto de troqueles giratorios (rodillos de troquel), que cortan la cinta de gelatina, a la vez que se sellan herméticamente las dos partes en conjunto. De forma simultánea, la adición precisa de la cantidad correcta de material de relleno líquido a través de la cuña de llenado expande la cinta de gelatina en los bolsillos del troquel, antes del sellado hermético final de la cápsula de gelatina blanda. Después del sellado hermético, la cápsula de gelatina todavía demasiado blanda se seca, ya sea en un proceso en línea pueden bandejas en atmósfera controlada, para conseguir la dureza óptima de la cubierta.

50

El material de relleno debe ser líquido a la temperatura de producción usada y también estable en las condiciones de producción, pero la flexibilidad en la composición del material de relleno es grande. Los materiales de relleno más comunes y fáciles de usar son puramente a base de aceite, tales como aceites de pescado o vitaminas solubles en grasa en un vehículo oleoso. La facilidad de encapsulación y la estabilidad del producto dependerán de cualquier interacción entre material de relleno/cubierta, es decir, las sustancias que son solubles en agua interactuarán con el agua disuelta en la cubierta de gelatina blanda, alterando las características de la cubierta. Las suspensiones de sólidos en un vehículo oleoso también se pueden incorporar en una gelatina blanda, y además de los principios activos, se pueden añadir vehículos/agentes de suspensión para hacer una dispersión homogénea, antioxidantes para prevenir la oxidación del aceite y excipientes si se considera apropiado. El tamaño de partícula de los sólidos en las suspensiones debería ser bajo, y esto se puede conseguir moliendo el material de relleno antes de su encapsulación.

60

Una cierta cantidad de sólido, tal como bacterias probióticas secas, se puede incluir en el material de relleno, pero para mantener la viscosidad del material de relleno a un nivel en el que es posible producir la gelatina blanda, la

cantidad de sólido se limita hasta aproximadamente un 30 % (p/p) del material de relleno, preferentemente de un 10 a un 25 %, por ejemplo de un 15 a un 20 %. Aumentar aún más la cantidad de sólido significará aumentar la cantidad de material de relleno, por lo tanto, el tamaño de la cápsula. Esto solo se puede hacer hasta cierto punto, de lo contrario, la dimensión de la cápsula de gelatina blanda será demasiado grande para que la ingiera una  
 5 persona. Generalmente, las cápsulas de gelatina blanda tienen un peso en el intervalo de 0,05 a 2,0 g, preferentemente de 0,5 a 1,5 g, por ejemplo, de 0,7 a 1,0 g. La mayoría de las veces, las cápsulas de gelatina blanda se definen como un tamaño (por ejemplo, 10 oval, 12 oval, etc., u oblonga, 4, 6, etc.).

Por lo tanto, para obtener una cápsula de gelatina blanda que comprenda bacterias probióticas que tengan un  
 10 periodo de almacenamiento largo, se tiene que garantizar un alto grado de supervivencia de las bacterias viables durante el proceso de producción y esta alta cantidad se debe mantener controlando cuidadosamente la actividad del agua de las cápsulas de gelatina blanda durante el almacenamiento en estantería después de la producción y una o más etapas iniciales de secado.

Los presentes inventores se dieron cuenta de que era necesaria una mejora sustancial del proceso de producción para minimizar la pérdida de bacterias probióticas a través del proceso de producción usando una temperatura más baja del material de relleno que la usada convencionalmente. La preparación y almacenamiento del material de relleno es la operación de la unidad que más tiempo lleva, por lo que las bacterias probióticas son las más vulnerables. Se observó que cuando se usa una temperatura de de lleno más baja que la usada convencionalmente,  
 15 también son necesarios ajustes en las condiciones del proceso en el resto del proceso para adaptarse a la temperatura más baja del material de relleno.

Lo más importante, la gelatina usada se debe adaptar a una temperatura baja del material de relleno. La gelatina debe tener un punto de gelificación más bajo y un punto de fusión más bajo que el que se usa convencionalmente para que la gelatina permanezca lo suficientemente blanda durante el rellenado en frío. Esta blandura es importante para hacer un sellado hermético adecuado por la acción final del rodillo del troquel; un mal sellado dará lugar a cápsulas con pérdidas.  
 25

Los presentes inventores se dieron cuenta de que la gelatina de pescado generalmente tiene puntos de fusión inferiores a los de las gelatinas de mamíferos (Karim y Bhat, 2009). Las diferentes gelatinas de pescado conocidas generalmente tienen puntos de gelificación entre 8 y 25 °C, y puntos de fusión de 11-28 °C. Los valores más bajos pertenecen a gelatinas de peces de agua fría que rara vez tienen resistencias de Bloom eficientes para la producción de gelatina blanda. La resistencia de Bloom que generalmente se usa para la producción de gel blanda suele estar entre 150-200 bloom (Podczeczek y Jones, 2004), pero, basándose en la experiencia de los presentes inventores, la resistencia de Bloom podría estar entre 100-300 bloom. Los puntos de gelificación habituales para las gelatinas bovinas y porcinas varían de 20-25 °C y los puntos de fusión habituales varían de 28-31 °C, con la gelatina porcina presentando la gelificación y los puntos de fusión más elevados. Las gelatinas de pescado generalmente se obtienen a partir de peces de agua fría (por ejemplo, bacalao, eglefino, merluza, abadejo, brosmio, lenguado, platija, rodaballo, mero, solla, lumpo, corvinón ocelado, lucio, trucha y salmón) o peces de agua caliente (por ejemplo, tilapia, tiburón o carpa). Estos se diferencian en sus puntos de gelificación y de fusión, con las gelatinas de peces de agua fría (CWFGs) a menudo teniendo puntos de gelificación inferiores a 15 °C, generalmente de 4 a 12 °C, y puntos de fusión por debajo de 22 °C, generalmente de 12 a 19 °C, mientras que las gelatinas de pescados de agua caliente (WWFGs) a menudo tienen puntos de gelificación superiores a 15 °C, generalmente de 18 a 24 °C, y puntos de fusión en el intervalo de 22 a 32 °C. Para las finalidades actuales, se puede considerar que los peces de agua fría se refieren a cualquier especie de pez que vive predominantemente en agua de 18 °C o inferior.  
 30  
 35  
 40  
 45

El presente proceso usa una gelatina que tiene un punto de fusión en el intervalo de 11 a 28 °C. Preferentemente, el punto de fusión está en el intervalo de 19 a 27 °C, incluso más preferentemente en el intervalo de 21 a 26 °C, lo más preferentemente en el intervalo de 23 a 25 °C.  
 50

El proceso actual usa preferentemente una gelatina de pescado que tiene una resistencia de Bloom en el intervalo de 100-300, tales como al menos 180, al menos 190, preferentemente 200-285 o 200-250 bloom. Sin embargo, una gelatina bovina adecuada que cumpla con los parámetros anteriores también podría ser adecuada si se ajusta a los parámetros necesarios para uso en el método de producción de cápsula de gelatina blanda a baja temperatura de acuerdo con la presente invención.  
 55

Opcionalmente la gelatina que tiene un punto de fusión en el intervalo de 11 a 28 °C puede ser una mezcla de gelatinas de diferentes orígenes (por ejemplo, una mezcla de gelatina de pescado de agua fría y gelatina de pescado de agua caliente, una mezcla de gelatina de pescado y gelatina bovina, o una mezcla de gelatina de pescado y gelatina porcina) siempre que la mezcla de gelatina total mantenga un punto de fusión en el intervalo de 11 a 28 °C, preferentemente en el intervalo de 19 a 27 °C, incluso más preferentemente en el intervalo de 21 a 26 °C, lo más preferentemente en el intervalo de 23 a 25 °C, y/o una resistencia de Bloom en el intervalo de 100-300, tales como 200-285 bloom. Sin embargo, la gelatina usada preferentemente está sustancialmente libre de gelatinas de mamíferos, es decir, que no contiene más de un 1 %, preferentemente un 0 % en peso con respecto al peso total de gelatina. La gelatina particularmente preferente tiene un contenido de gelatina de pescado de al menos un 90 % en peso, más preferentemente al menos un 95 % en peso, especialmente un 100 % en peso.  
 60  
 65

Como se ha indicado anteriormente, las gelatinas de pescado de agua fría tienden a tener valores de Bloom bajos o inexistentes y, por lo tanto, no siempre son adecuadas para la producción de gelatina blanda (por ejemplo, debido a una resistencia mecánica baja y/o una estabilidad térmica deficiente). Sin embargo, las cápsulas de gelatina blanda compuestas por una cantidad significativa de gelatinas de pescado de agua fría se pueden fabricar usando un equipo de encapsulación convencional si también se usa una cantidad de gelatina de pescado de agua caliente. Las mezclas adecuadas de gelatinas de pescado de agua fría y de agua caliente se describen en el documento WO 2009/095670. Por lo tanto, por ejemplo, en el método y cápsula de la presente invención, la gelatina puede ser una mezcla de gelatinas que incluye al menos un 40 % en peso de gelatina de pescado de agua fría (con respecto al peso total de la gelatina), por ejemplo, de un 20 a un 80 % en peso, de un 35 a un 70 % en peso, de un 40 a un 65 % en peso, o al menos un 55 % en peso; o la gelatina puede comprender agua gelatina de pescado de agua fría y de agua caliente en una proporción de peso de 99.9:0,1 a 35:65, especialmente de 65:35 a 40:60; con la condición de que la mezcla total de gelatina mantenga un punto de fusión en el intervalo de 11 a 28 °C y/o una resistencia de Bloom en el intervalo de 100-300.

Opcionalmente, la gelatina usada en la presente invención puede comprender además una carragenina (por ejemplo, kappa-carragenano), por ejemplo, con un contenido de un 0,01 a un 2 % en peso de la gelatina en base a sólidos secos, especialmente de un 0,05 a un 1 % en peso, en particular de un 0,06 a un 0,5 % en peso. Para mejorar la gelificación, también se puede incluir una sal de metal fisiológicamente tolerable (por ejemplo, una sal de potasio tal como cloruro de potasio para kappa-carragenano). Por lo general esto estará en una concentración en la gelatina de hasta 50 mM, especialmente de 10 a 30 mM.

Las gelatinas adecuadas para su uso en las cápsulas y métodos de la invención se pueden definir por supuesto en términos tanto de resistencia de Bloom como de punto de fusión. Por lo tanto se contemplan las gelatinas que tienen cualquier combinación de las resistencias resistencia de Bloom y puntos de fusión que se han mencionado anteriormente, por ejemplo una gelatina que tiene un punto de fusión en el intervalo de 11 a 28 °C y una resistencia de Bloom de 100 a 300 bloom.

La cubierta de la cápsula de gelatina blanda puede contener, además de gelatina, ingredientes adicionales tales como plastificante(s), agua, colorante(s), sabor(es), opacificante(s) y/o conservante(s), todos los cuales son ingredientes conocidos por los expertos en la materia (véase también Stanley, J.P., "Part Two. Soft Gelatin Capsules", en *The Theory and Practice of Industrial Pharmacy*, Lachmann, L., *et al.*, eds. Lea & Febiger, Philadelphia, PA, pp. 398-412 (1986).

Los ejemplos de plastificantes incluyen glicerol, sorbitol y mezclas de los mismos. Cuando esté presente, el plastificante puede estar presente en una cantidad de hasta un 35 % en peso, por ejemplo, de un 5 a un 35 % en peso o de un 15 a un 30 % en peso de la gelatina.

Una bacteria probiótica se define como un microorganismo vivo que, cuando se administra en cantidades adecuadas, puede otorgar un beneficio para la salud al hospedador (FAO/OMS 2001).

En condiciones de falta de nutrición, ciertas bacterias como *Bacilli* y *Clostridia* son capaces de formar endoesporas, una estructura inactiva, resistente y no reproductora. Las endoesporas pueden sobrevivir sin nutrientes. Son resistentes a la radiación ultravioleta, desecación, alta temperatura, congelación extrema y desinfectante químico. Algunos productos probióticos contienen *Bacilli*. Como es evidente a partir de lo anterior, el método de la presente invención, sin embargo, no es necesario para que las bacterias formadoras de esporas sobrevivan al proceso de encapsulación. En una realización preferente, por lo tanto, las bacterias usadas en las cápsulas de gelatina blanda de la invención son bacterias no formadoras de esporas.

El material de relleno comprende al menos una especie de una bacteria probiótica no formadora de esporas sin revestir seca. Las bacterias se pueden secar de acuerdo con métodos conocidos en la técnica. Los ejemplos de bacterias probióticas de ese tipo son *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, y *Streptococcus* y más preferiblemente al menos una especie seleccionada entre el grupo que consiste en *Bifidobacterium* spp., *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium bifidum*, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus cremoris*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus bifidus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus sake*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus delbreuckii*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus johnsonii* y *Streptococcus thermophilus*.

Las cepas particularmente preferentes son *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, por ejemplo, las cepas depositadas como DSM 15954 (comercializadas por Chr. Hansen A/S, Dinamarca, como BB-12®); ATCC 27536 y DSM 10140, respectivamente; *Lactobacillus acidophilus*, por ejemplo, la cepa depositada como DSM 13241 (comercializada por Chr. Hansen A/S, Dinamarca, como LA-5®), *Lactobacillus rhamnosus*, por ejemplo, la cepa depositada como ATCC 53103 (comercializada por Chr. Hansen A/S, Dinamarca, como LGG®), *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, por ejemplo, las cepas depositadas como ATCC 55544, (comercializadas por Chr. Hansen A/S, Dinamarca, como L. casei 431®) y CCTCC M204012, respectivamente, *Lactobacillus reuteri*, por ejemplo, la cepa depositada como

ATCC 55845 (comercializada por Chr. Hansen A/S, Dinamarca, como RC-14®), *Lactobacillus rhamnosus*, por ejemplo, la cepa depositada como ATCC 55826 (comercializada por Chr. Hansen A/S, Dinamarca, como GR-1®), *Lactobacillus paracasei*, por ejemplo, la cepa depositada como LMG-P-17806 (comercializada por Chr. Hansen A/S, Dinamarca, como F19®), *Streptococcus thermophilus*, por ejemplo, la cepa depositada como DSM 15957 (comercializada por Chr. Hansen A/S, Dinamarca, como TH-4®), y *Lactobacillus fermentum*, por ejemplo, la cepa depositada como NM02/31074 (comercializada por Chr. Hansen A/S, Dinamarca, como PCC®).

Se pueden usar combinaciones de varias especies o cepas de bacterias probióticas, es decir, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o incluso más de las especies y cepas mencionadas anteriormente. En las realizaciones precedentes en la actualidad, solo una, dos, tres, cuatro o cinco cepas diferentes están presentes en la cápsula de gelatina blanda de acuerdo con la invención.

Por el término "viable" se hace referencia a que la célula está viva y es capaz de formar una colonia en una placa de Petri durante la siembra en placas mediante vertido o la siembra en placas mediante distribución. El número de bacterias probióticas viables se determina como el número de unidades formadoras de colonias (UFC) mediante métodos de siembra en placas mediante vertido o la siembra en placas mediante distribución con incubación en condiciones adecuadas para el crecimiento de la o las cepas probióticas. Con este método se hará el recuento de las células capaces de crecer y formar colonias. Cuando en la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones se proporciona un número, se debería entender como UFC/cápsula de gelatina blanda a menos que el contexto lo indique de otro modo.

La terminología usada para describir las formulaciones de micropartículas en ocasiones puede ser incoherente y confusa para los lectores que no están familiarizados con el campo. El término "micropartícula", como se usa en el presente documento, se refiere a una partícula con un diámetro de 1-1000 µm, independientemente de la estructura interior o exterior precisa y la subcategoría de "microcápsulas" se aplica a micropartículas que tienen un núcleo rodeado por un material que es claramente diferente de la del núcleo. El núcleo puede ser sólido, líquido o incluso gaseoso.

Los materiales microencapsulados tienen un principio activo núcleo, rodeado de un material que es claramente diferente. Una sustancia se puede microencapsular por varias razones. Los ejemplos pueden incluir la protección del material reactivo de su entorno, la manipulación segura y conveniente de los materiales que de otro modo son tóxicos o nocivos, el enmascaramiento del sabor, los medios para propiedades de liberación controlada o modificada, los medios para manejar líquidos tales como sólidos, la preparación de polvos de flujo libre y para modificar las propiedades físicas de un fármaco.

El documento WO2012/021432 describe bacterias probióticas microencapsuladas y define el término "microencapsulado" como revestido con una composición. De forma coherente con esto, la expresión "sin revestir" usada en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones se refiere a que las bacterias probióticas no están microencapsuladas ni revestidas.

Una etapa de revestimiento puede conducir a una pérdida celular durante el proceso de revestimiento y a un perfil de liberación diferente al de las células naturales no revestidas, y también conducirá a una menor concentración de bacterias probióticas a través de la adición de material de revestimiento a la formulación.

Como es evidente cuando se comparan los resultados de los ejemplos de la presente invención con los resultados de los documentos en el documento WO2012/021432, la presente invención proporciona una mejor supervivencia de las bacterias probióticas durante su almacenamiento a largo plazo a temperatura ambiente en comparación con los resultados que se describen en el documento WO2012/021432 incluso sin usar revestimiento de las bacterias probióticas. Por lo tanto, las bacterias usadas en la presente invención no están revestidas, es decir, no están microencapsuladas.

Se puede añadir un excipiente a las bacterias probióticas, por ejemplo, con el fin de obtener una mezcla seca con una concentración estandarizada de bacterias probióticas. Las realizaciones preferentes en la actualidad tienen una concentración final de un 40-100 % (p/p) en la mezcla de uno o más principios activos tales como bacterias probióticas, tal como un 50 %, un 60 %, un 70 %, un 80 % o un 90 %, la parte restante siendo excipiente(s) tales como maltodextrina. Una concentración de un 100 % (es decir, solo bacterias secas) es preferente en la actualidad con el fin de tener una concentración de bacterias y reducir la cantidad de sólido que se va a añadir al aceite – la adición de demasiado sólido hace que la suspensión sea demasiado viscosa.

Para hacer una suspensión de las bacterias secas para el material de relleno, se puede añadir un agente de suspensión, por ejemplo, un aceite vegetal hidrogenado/parcialmente hidrogenado, monoglicérido o una mezcla de los mismos, lecitina, cera o dióxido de silicio en un intervalo de un 1-10 % (p/p) del material de relleno total, tal como un 1,5-7,5 %, por ejemplo, un 1,5-5 % (p/p). El uso de un agente de suspensión ayuda en la preparación de un material de relleno homogéneo al evitar la sedimentación de las bacterias probióticas aunque las bacterias se añadan en forma de polvo seco.

Básicamente, todos los aceites comestibles pueden ser adecuados para la presente invención. El aceite puede ser considerado como un principio activo o un aceite vehículo solo, tal como MCT (triglicéridos de cadena media), aceite de soja o aceite de girasol. Los aceites particularmente preferentes para uso de acuerdo con la presente invención son aceites que contienen ácidos grasos omega 3, tales como ácido docosahexaenoico (DHA), ácido eicosapentaenoico (EPA), aceite de pescado, y aceite krill, y combinaciones de EPA, DHA y otros ácidos grasos omega 3, y que aceites vegetales que proporcionan, por ejemplo DHA, EPA, ácido alfa-linolénico (ALA), o acilo gamma linolénico (GLA), tales como aceite de colza, aceite de borraja/aceite de onagra, aceite de linaza, aceite de perilla, o aceite de ajo.

Las fuentes de DHA, EPA y ALA incluyen, pero no se limitan a, aceites de pescado, levaduras, algas u otros microorganismos o fuentes monocelulares y aceites vegetales, principalmente aceite de linaza, soja y colza. Las fuentes de GLA incluyen, pero no se limitan a, aceite de onagra/aceite de borraja.

Los aceites adecuados para el uso de acuerdo con la presente invención también incluyen cualquier aceite modificado de origen vegetal, marino o mamífero, tal como, pero no limitado a, aceites hidrogenados, diacilgliceroles, monoacilgliceroles, triglicéridos de cadena media (MCT) y combinaciones de los mismos.

Al menos un aceite, tal como uno, dos, tres, cuatro o más de los aceites que se han mencionado anteriormente, se pueden usar en el método de la presente invención.

Como se ha señalado anteriormente, el método de la presente invención consiste en mezclar las bacterias probióticas no revestidas con al menos un aceite para obtener un material de relleno a una temperatura en el intervalo de 5 a 15 °C. Por lo tanto, el aceite (o mezcla de aceite, en la que se usan dos o más aceites) debería ser líquido a temperaturas en el intervalo de 5 a 15 °C. Esto significa que el aceite (o mezcla de aceite) debería tener un punto de fusión de no más de 15 °C, por ejemplo, un punto de fusión en el intervalo de 5 a 15 °C o preferentemente un punto de fusión por debajo de 5 °C.

Además de las bacterias probióticas, uno o más de otros principios activos, por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro o más principios activos seleccionados entre el grupo que consiste en vitaminas tales como vitamina A, D, E, K2, C, B2, B6, B12, biotina, niacina, ácido fólico; minerales tales como cinc, selenio, cromo, cobre, calcio, cloruro; aceites vegetales tales como aceite de colza, aceite de borraja/aceite de onagra, aceite de linaza, aceite de perilla, aceite de ajo, y extractos vegetales tales como extracto/zumo de arándano, jalea real se podrían incluir en cápsulas de gelatina blanda.

Las composiciones preferentes en la actualidad incluyen *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* como el único principio activo, tales como *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* in MCT; *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* y al menos un aceite omega-3, tales como *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* y ALA, *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* y DHA, y *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis*, DHA y EPA; así como combinaciones con otros principios activos por ejemplo, *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis*, DHA, vitamina B6, ácido fólico, y vitamina D3.

La mezcla del material de relleno y la encapsulación del material de relleno en la cápsula de gelatina blanda se debería producir en un ambiente de baja humedad. En el contexto de la presente invención, la expresión "entorno ambiente de baja humedad" se refiere a un entorno con una humedad relativa (RH) inferior a un 50 %. Preferiblemente, se refiere a un entorno con una humedad relativa inferior a un 45 %. Más preferentemente, la humedad relativa está en el intervalo de un 10 %-40 %, más preferentemente en el intervalo de un 20-35 %. La baja humedad se puede alcanzar con cualquier método conocido por el experto en la materia para reducir la humedad relativa, e incluye el uso de aire comprimido seco, enfriamiento, aire acondicionado y purga con un gas inerte, por ejemplo, nitrógeno o argón. La purga con un gas inerte también reduce el estrés oxidativo tanto en las células bacterianas como en otros componentes del material de relleno.

Para garantizar una buena uniformidad de contenido en las cápsulas de gelatina blanda, es importante mantener las bacterias uniformemente suspendidas en el aceite. La agitación suave y la viscosidad elevada, obtenidas, por ejemplo, disminuyendo la temperatura, puede ayudar a prepara incluso una suspensión de las bacterias. Por "suave" se hace referencia a una agitación que es suficiente para ayudar a la formación de una suspensión homogénea sin dar lugar a fuerzas mecánicas que causen una ruptura significativa de las paredes celulares bacterianas. Los métodos adecuados para una agitación/mezcla suave incluyen, pero no se limitan a, agitación o bombeo de circulación. Los expertos en la materia podrán identificar otros métodos.

La tabla 1 resume las diferencias entre las condiciones usadas en el método de la presente invención y las condiciones generalmente utilizadas en este campo.

Tabla 1

Parámetros de producción para la producción de cápsulas de gelatina blanda probióticas		
Parámetro	Valores estándar	Valores de producción probiótica
Temp. de la caja de propagación	50 - 68 °C	40 - 68 °C

(continuación)

Parámetros de producción para la producción de cápsulas de gelatina blanda probióticas		
Temperatura de cuña	28 - 48 °C	28 - 36 °C
Temperatura ambiente	18 - 22 °C	Máx 20 °C
Temperatura de relleno	Ambiente o superior	8 - 15 °C

La reducción de la temperatura del material de relleno necesita el uso de una gelatina de punto de fusión más bajo y cambios en toda la cadena de producción. Lo más importante, la temperatura de cuña (implicada en el relleno preciso y posterior sellado hermético de la cápsula) se debe reducir para tener un buen sellado hermético de la cápsula (sin volver a fundir la gelatina). La caja de propagación asegurará que la masa de gelatina líquida se forma en una película fina antes del proceso de encapsulación. La temperatura en la caja de propagación no calentará el material de relleno, y el límite superior de temperatura puede ser tan elevado como para una producción normal, aunque preferentemente más bajo.

Como es evidente a partir de la tabla, la diferencia principal del proceso convencional es la temperatura de relleno más baja. El Ejemplo 1 demuestra claramente que es importante disminuir la temperatura del material de relleno de la temperatura ambiente usará convencionalmente. De acuerdo con el método de la presente invención, la temperatura de relleno debería ser de 5-15 °C, preferentemente de 6 a 14 °C, lo más preferentemente de 7 a 13 °C. También pueden ser factible de 8 a 12 °C, tal como de 9 a 11 °C.

La temperatura depende de la gelatina elegida. El uso de una gelatina de pescado del punto de fusión más bajo asegura que el proceso de sellado de la cápsula sea todavía eficaz; con el material de relleno más frío y la cuña, la gelatina todavía debe ser lo suficientemente blanda como para dar un sellado sólido después del proceso de relleno. Se contempla que la temperatura de la caja de propagación puede ser tan baja como 40 °C para ajustarse a temperaturas más bajas ambientales y de relleno. Preferentemente en el intervalo de 45-55 °C. En los ejemplos, la temperatura de la caja de propagación más baja usada fue de 51 °C.

El tamaño de partícula de cualquier componente sólido del material de relleno, es decir, las bacterias probióticas secas y el posible excipiente(s) tal como maltodextrina, es importante para asegurar la homogeneidad del producto, y como para permitir el proceso físico real. El tamaño del diámetro de partícula promedio del componente que comprende las bacterias probióticas debería ser inferior a 400 micrómetros, tal como de aproximadamente 150 a 250 micrómetros, y preferentemente inferior a 200 micrómetros. El tamaño de partícula para la producción suave a gran escala se debe optimizar, se puede obtener mediante una reducción cuidadosa del tamaño de partícula mediante molienda o tamizado.

Debido al hecho de que las bacterias probióticas son microorganismos vivos delicados, es importante, sin embargo, minimizar el estrés para las bacterias probióticas/entrada de energía. Por lo tanto, para mantener el recuento viable de bacterias, en la medida de lo posible se deberían evitar procedimientos tales como molienda de los componentes sólidos del material de relleno.

Las cápsulas de gelatina blanda de acuerdo con la invención deben ser firmes, pero no quebradizas ni frágiles. La calidad de la cubierta de cápsula después del secado se mide lo más habitualmente en Newton (dureza de la cubierta), en la que un valor de 9-11 N se refiere a una dureza de la cubierta que no producirá pérdidas en las cápsulas. La dureza se puede determinar con métodos conocidos en la técnica, por ejemplo mediante el uso de un aparato de ensayo de dureza tal como el digi test II Gelomat Härtemessgerät (fabricado por Bareiss Prüf-gerätebau GmbH) y otros dispositivos similares.

A temperatura ambiente (25 °C/humedad relativa de un 60 % (HR)), las cápsulas de gelatina blanda tienen un contenido de agua de aproximadamente un 4 a un 10 % en peso. Si el contenido de agua es prácticamente menor a este, por ejemplo debido a un almacenamiento seco o secado excesivos, esto da como resultado la fragilidad de la cubierta de cápsula, con las consecuencias de un aumento de la fragilidad de la pared de la cápsula y la formación de grietas. En una realización, las cápsulas de gelatina blanda tienen por lo tanto un contenido de agua de al menos un 4 % en peso.

Como será evidente para la persona con experiencia en la materia, el contenido de agua se refiere al agua total. El contenido de agua total de la cápsula de gelatina blanda (agua libre + agua unida, es decir, agua unida en células y en gelatina) se encontrará en mayor medida en la cubierta, ya que el material de relleno de la cápsula hidrófobo no absorberá agua. Como se ha indicado anteriormente, el contenido de agua total en la cápsula puede estar en el intervalo de un 4-10 %, pero el porcentaje total no es relevante para la supervivencia de las bacterias. El agua que se une estrechamente por ejemplo, mediante hidratación de la gelatina en la cubierta, no se puede usar o puede ser perjudicial para las bacterias, y es solamente el agua lo que se puede usar libremente, lo que es necesario medir (la actividad del agua,  $a_w$ ). La actividad del agua es, por definición, el agua libre o unida por vía química en un producto y se puede medir sobre toda la cápsula de gelatina blanda mediante la aplicación de un instrumento Hygrolab de Rotronic.

Las bacterias probióticas están latentes, y para mantenerlas en esta condición, es preferente una actividad del agua no superior a 0,2. Normalmente, una cápsula de gelatina blanda almacenada en condiciones convencionales de gelatina blanda podría crear un entorno con una actividad del agua ( $a_w$ ) que es demasiado elevado para que las bacterias probióticas permanezcan latentes. Por lo tanto, es necesario un control cuidadoso del secado de la cápsula de gelatina blanda que comprende las bacterias probióticas, y un control cuidadoso con respecto al agua atmosférica que puede volver a entrar en la gelatina blanda.

Durante el proceso de secado, el contenido de agua, por lo tanto la actividad del agua, alcanza un equilibrio a través de un proceso en el que el de secante, si estuviera presente, elimina el agua de la cubierta, y cualquier agua en el material de relleno es aceptada por la cubierta. El equilibrio entre la cubierta, material de relleno y desecante asegura la correcta actividad del agua baja, sin el riesgo de que la cubierta allí a ser demasiado quebradiza.

De acuerdo con el método de la presente invención, las cápsulas de gelatina blanda se secan en una o más etapas a una temperatura como máximo de 25 °C hasta una actividad del agua como máximo de 0,25. Para secar las cápsulas de gelatina blanda que comprenden las bacterias se puede usar cualquier método de secado conocido por una persona con experiencia en la materia. En una realización preferente de la invención, las cápsulas se secan principalmente mediante secado en secadora por ejemplo de aproximadamente 18 a 23 °C de aproximadamente 10 a aproximadamente 40 minutos, seguido por secado en bandeja de aproximadamente 19 a 22 °C a una humedad de un 15 a un 22 % durante al menos aproximadamente 1 o 2 días a aproximadamente 14 días hasta que se obtiene una dureza de la cubierta de 9-11 N. como alternativa al método que se ha mencionado anteriormente, se pueden usar túneles de secado en línea.

Después del proceso de secado inicial, las cápsulas de gelatina blanda secas se clasifican y las cápsulas que no se han rellenado de forma apropiada, que tienen burbujas de aire o tamaños no uniformes se descartan. A continuación las cápsulas de gelatina blanda con una calidad comprobada se pueden envasar en el envase final con una cantidad suficiente de desecante tal como sabrá a una persona con experiencia en la materia.

Sin embargo, en la actualidad es preferente añadir una etapa de secado adicional en la que las cápsulas de gelatina blanda se mantienen como un volumen en un material de envasado apropiado con una cantidad suficiente de desecante con el fin de obtener una reducción lenta, adicional del contenido de agua con una actividad del agua ( $a_w$ ) objetivo de 0,2 medida sobre toda la cápsula de gelatina blanda. Las cápsulas se mantienen a una temperatura como máximo de 25 °C, preferentemente a una temperatura baja tal como 2-8 °C, en esta fase, con el fin de minimizar la pérdida de bacterias antes del envasado en el proceso de envasado final.

Como es evidente a partir de lo mencionado anteriormente, no es necesario alcanzar una actividad del agua baja deseada antes de su envasado en un envase final, pero la actividad del agua correcta antes del envasado en el proceso de envasado final prolongará el periodo de duración del desecante en el envasado final y por lo tanto también el periodo de duración de las cápsulas de gelatina blanda. Preferentemente la actividad del agua debería ser  $\leq 0,25$  antes del envasado final.

El tiempo necesario para alcanzar esta  $a_w$  baja puede ser un intervalo de días, semanas a meses, por ejemplo, 3 meses, pero, siempre y cuando las cápsulas se mantengan a una temperatura baja, la estabilidad no está comprometida.

El material envasado más adecuado para este en base a granel son materiales de envasado a base de papel de aluminio. Se pueden usar otros materiales de envasado tales como polímeros de HDPE, u otros polímeros de alta barrera frente al agua, pero entonces es necesario un aumento de la cantidad de desecante para controlar la actividad del agua. Los desecantes adecuados incluyen cualquier desecante adecuado tal como sílice, desecantes a base de sílice, tamices moleculares, y zeolitas.

En una realización actualmente preferente de la invención, las cápsulas de gelatina blanda se secan después del reenvasado final (es decir, durante el almacenamiento en estantería) hasta una actividad del agua ( $a_w$ ) como máximo de 0,2, tal como 0,08, 0,09, 0,10, 0,11, 0,12, 0,13, 0,14, 0,15, 0,16, 0,17, 0,18, 0,19, 0,20, 0,21, 0,22, o 0,23.

Las cápsulas obtenidas o que se pueden obtener con los métodos que se describen en el presente documento forman un aspecto adicional de la invención.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una cápsula de gelatina blanda que comprende una cubierta de cápsula y un material de relleno, dicha cubierta de cápsula comprendiendo al menos una gelatina que tiene un punto de fusión en el intervalo de 11 a 28 °C y/o un valor de Bloom de 100 a 300, y dicho material de relleno comprendiendo al menos una cepa de bacterias probióticas no formadoras de esporas, sin revestir dispersadas en un aceite, en la que dicha cápsula de gelatina blanda una actividad del agua como máximo de 0,25.

Los recipientes fabricados a partir de polímeros que comprenden absorbentes y formadores de canales y que son preferentes en la actualidad para el envasado final se describen, por ejemplo, en los documentos WO 97/32663, WO 03/086900, WO2008/086852, EP 1000873, y EP 1421991. Están disponibles en el mercado, por ejemplo, en Capitol

Specialty Plastics Inc., 2039 McMillan Street Auburn, Alabama, USA, con el nombre de marca Activ-Vial o en Sud Chemie, Ostenrieder Str. 15, 85368 Moosburg, Alemania, con el nombre de marca 2 AP Multipolymer.

5 La presente invención proporciona una cápsula de gelatina blanda que comprende bacterias probióticas formadoras de esporas, sin revestir, secas, cápsula de gelatina blanda que comprende al menos  $2 \times 10^9$  bacterias viables después de 12 meses de almacenamiento a  $25^\circ\text{C}$ , más preferentemente al menos  $3 \times 10^9$  bacterias viables, lo más preferentemente al menos  $4 \times 10^9$  bacterias viables, incluso más preferentemente al menos  $5 \times 10^9$  bacterias viables.

10 Dentro del alcance de la invención se encuentra una cápsula de gelatina blanda que comprende bacterias probióticas no formadoras de esporas, sin revestir, secas, cápsula de gelatina blanda que comprende al menos  $1 \times 10^9$  bacterias viables después de 24 meses de almacenamiento en estantería a  $25^\circ\text{C}$ , preferentemente al menos  $2 \times 10^9$  bacterias viables, más preferentemente al menos  $3 \times 10^9$  bacterias viables, incluso más preferentemente al menos  $4 \times 10^9$  bacterias viables, lo más preferentemente al menos  $5 \times 10^9$  bacterias viables.

15 Además, la invención proporciona una cápsula de gelatina blanda que comprende bacterias probióticas no formadoras de esporas, sin revestir, secas, cápsula de gelatina blanda que comprende al menos 4 UFC/g después de 12 meses de almacenamiento en estantería a  $25^\circ\text{C}$ , preferentemente al menos 5 UFC/g, más preferentemente al menos 6 UFC/g, incluso más preferentemente al menos 7 UFC/g, lo más preferentemente al menos 8 UFC/g.

20 Además, la invención incluso proporciona una cápsula de gelatina blanda que comprende bacterias probióticas no formadoras de esporas, sin revestir, secas, cápsula de gelatina blanda que comprende al menos 2 UFC/g después de 24 meses de almacenamiento en estantería a  $25^\circ\text{C}$ , preferentemente al menos 3 UFC/g, más preferentemente al menos 4 UFC/g, incluso más preferentemente al menos 5 UFC/g, lo más preferentemente al menos 6 UFC/g.

25 Como es evidente a partir de los resultados proporcionados en los ejemplos, las cápsulas de gelatina blanda preparadas con el método de la presente invención son muy estables. Los resultados muestran un valor de UFC por cápsula de gelatina blanda de  $6,8 \times 10^9$  después de 6 meses de almacenamiento,  $4,0 \times 10^9$  después de 9 meses de almacenamiento y  $5,3 \times 10^9$  después de 12 meses a  $25^\circ\text{C}$  en viales de plástico con revestimiento de desecante. Basándose en los valores de UFC después de 12 meses de almacenamiento es posible extrapolar que el número de bacterias probióticas viables que probablemente estarán presentes después de 24 meses de almacenamiento a  $25^\circ\text{C}$  será de al menos  $3 \times 10^9$ .

30 Una forma alternativa de medir la estabilidad durante el almacenamiento de las cápsulas de gelatina blanda es calcular la pérdida log de bacterias probióticas durante el almacenamiento en estantería. El método de la presente invención proporciona una pérdida log durante el almacenamiento en estantería que no es superior a 1 después de 12 meses de almacenamiento a  $25^\circ\text{C}$ , preferentemente no más de 0,75, más preferentemente no más de 0,50, incluso más preferentemente no más de 0,33, lo más preferentemente no más de 0,25.

40 Los ejemplos proporcionan que la pérdida log para las cápsulas de gelatina blanda almacenadas en viales de plástico activos a  $25^\circ\text{C}$  después de 6 meses de almacenamiento se puede calcular en 0,12 y la pérdida log después de 12 meses en 0,23. Como se puede observar a partir de la Figura 4 a lo largo del tiempo existe una cierta variación de los números exactos lo más probablemente debido a la variación en la distribución de las bacterias probióticas entre las cápsulas de gelatina blanda individuales y debido a la variación analítica en el método de UFC pero los resultados globales muestran que las cápsulas de gelatina blanda de acuerdo con la invención mantienen una pérdida log notablemente baja.

45 Cuando las cápsulas de gelatina blanda con las bacterias probióticas se mantienen de  $2$  a  $8^\circ\text{C}$ , la pérdida de células es incluso menor que a  $25^\circ\text{C}$  tal como es evidente a partir de las Figuras 3 y 4. La Figura 3 también muestra que las condiciones de almacenamiento a granel se pueden añadiendo desecante adicional para controlar el nivel de actividad del agua que ya está en el nivel de granel.

50 Como aparece a partir de la Figura 4, la supervivencia de las bacterias probióticas es mucho mayor cuando las cápsulas de gelatina blanda que contienen bacterias probióticas se almacenan a  $25^\circ\text{C}$  en comparación con los resultados cuando las cápsulas de gelatina blanda se almacenaron a  $30^\circ\text{C}$ . Es sorprendente que el cambio de  $5^\circ\text{C}$  en la temperatura de almacenamiento de  $25^\circ\text{C}$  a  $30^\circ\text{C}$  pueda proporcionar una diferencia tan significativa en la supervivencia de las bacterias. Las condiciones de almacenamiento preferentes de acuerdo con la invención son el almacenamiento a temperatura ambiente tal como a una temperatura de aproximadamente  $20$  a aproximadamente  $25^\circ\text{C}$ , tal como de aproximadamente  $22$  a  $25^\circ\text{C}$ , de preferencia aproximadamente  $25^\circ\text{C}$ , es decir,  $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ .

55 Se va a interpretar que el uso de los términos "un" y "uno" y "el" y referentes similares en el contexto de la descripción de la invención (especialmente en el contexto de las reivindicaciones que siguen a continuación) cubre tanto el singular como el plural, a menos que se indique de otro modo en el presente documento o que el contexto no contradiga claramente. Los términos "que comprende", "que tiene", "que incluye" y "que contiene" se interpretan como términos de extremos abiertos (es decir, que significan "que incluye, pero no se limita a"), a menos que se indique de otro modo. La mención de intervalos de valores en el presente documento pretende simplemente

servir como un método abreviado para hacer referencia individualmente a cada valor separado que entra dentro del intervalo, a menos que se indique de otro modo en el presente documento, quitará valor separado se incorpora en la memoria descriptiva como si se hubiera mencionado individualmente en el presente documento. Todos los métodos que se describen en el presente documento se pueden realizar en cualquier orden adecuado a menos que se indique de otro modo en el presente documento o que el contexto lo contradiga claramente de otro modo. El uso de todos y cada uno de los ejemplos, o expresiones a modo de ejemplo (por ejemplo, "tal como") proporcionadas en el presente documento, pretende simplemente aclarar mejor la invención y no plantea una limitación en el alcance de la invención a menos que se reivindique de otro modo. En la memoria descriptiva no se debería interpretar ninguna expresión como indicativo de cualquier elemento no reivindicado tal como es esencial para la práctica de la invención.

## FIGURAS

La Figura 1 muestra valores de UFC de cápsulas de gelatina blanda producidas en el ensayo 2 durante su almacenamiento a 25 °C/60 % de HR hasta 18 meses. Las cápsulas de gelatina blanda se envasan en tres sistemas de envasado diferentes. (■) Lámina de aluminio + bolsa de silicato, o envase de tipo blíster, (•) caja + bolsa de silicato.

La Figura 2 muestra valores de UFC de cápsulas de gelatina blanda producidas en el ensayo 2 durante su almacenamiento a 8-12 °C hasta 18 meses. Las cápsulas de gelatina blanda se envasan en tres sistemas de envasado diferentes. (•) Lámina de aluminio + bolsa de silicato, o envase de tipo blíster, (•) caja + bolsa de silicato.

La Figura 3 muestra valores de UFC de cápsulas de gelatina blanda producidas en el ensayo 4 envasadas en sistemas de envasado a granel simulados, y almacenadas a 5 °C y 25 °C/60 % de HR hasta 12 meses. (■) 5 °C, y (•) 25 °C/60 % de HR.

La Figura 4 muestra valores de UFC de cápsulas de gelatina blanda producidas en el ensayo 4 envasadas en viales de plástico con revestimiento de desecante durante su almacenamiento a 5 °C, 25 °C/60 % de HR y 30 °C/75 % de HR hasta 12 meses. (■) 5 °C, (•) 25 °C/60 % de HR, y (◊) 30 °C/75 % de HR.

La Figura 5 muestra valores de UFC de cápsulas de gelatina blanda producidas en el ensayo 4 envasadas en sistemas de envasado a granel simulados, y almacenadas a 5 °C y 25 °C/60 % de HR hasta 24 meses. (■) 5 °C, y (•) 25 °C/60 % de HR.

La Figura 6 muestra valores de UFC de cápsulas de gelatina blanda producidas en el ensayo 4 envasadas en viales de plástico con revestimiento de desecante durante su almacenamiento a 5 °C, 25 °C/60 % de HR y 30 °C/75 % de HR hasta 24 meses. (■) 5 °C, (•) 25 °C/60 % de HR, y (◊) 30 °C/75 % de HR.

## Ejemplos

General:

Todos los lotes de ensayo tienen un tamaño de lote de 65.000 cápsulas.

Material de relleno:

El aceite y los componentes solubles en aceite se cargan mediante vacío a un recipiente de mezcla de acero inoxidable. Los componentes se mezclan a 12 °C, y se añade dióxido de silicio. La mezcla se combina adicionalmente y se homogenizar hasta que el dióxido de silicio se dispersa. *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* se carga mediante vacío y la mezcla completa se combina (sin homogeneización). El material de relleno acabado a continuación se descarga a través de un tamiz con una apertura del tamiz entre 0,7 y 1,2 mm a un tanque de transferencia enfriado previamente (12 °C). A continuación el tanque de transferencia se conecta a una máquina de encapsulación.

Solución de gelatina

El tamaño del lote de la solución de gelatina es de 100 kg. Gelatina, glicerol y agua se pesan en un recipiente de producción de acero inoxidable equipado calentamiento y agitación. La mezcla se calienta, se agita y se evacúa hasta que se consiguió una viscosidad estable. A continuación la gelatina se filtra (150 micrómetros) en un recipiente de acero inoxidable calentado previamente. Los agentes colorantes a continuación se añaden y se mezclan lentamente hasta homogeneidad. La gelatina se mantiene a 50-68 °C durante la encapsulación.

Secado

El primer secado se realiza en secadoras giratorias de 19,0 a 20,3 °C, en las que el lubricante de las cintas de gelatina se retira mediante toallas de limpieza en las secadoras. El secado final se realizará extendiendo las

## ES 2 731 816 T3

cápsulas en bandejas en una sola capa, y colocando las bandejas en armarios con aire acondicionado con una humedad controlada de un 14-23 % de HR y temperatura de 21-24 °C. El secado se termina cuando se consigue una dureza de la cubierta de 9-11 N. El tiempo de secado habitual es de 31-130 h, con un promedio de 100 horas.

### 5 Inspección y envasado

Las cápsulas de gelatina blanda se inspeccionan y se clasifican para retirar las cápsulas deformadas, las cápsulas no cerradas herméticamente de manera apropiada y otros errores y se envasan en envases a granel de 3500 cápsulas de gelatina blanda que contienen bacterias probióticas con 30 g de desecante en una bolsa de aluminio se cierra herméticamente con calor.

10

En la Tabla 2 se muestra la composición de los lotes producidos en cinco ensayos diferentes.

Tabla 2

Composición de cinco lotes diferentes producidos					
N.º de Ensayo	1	2	3	4	5
Ingredientes en mg por cápsula, 10 oval					
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	21.875	120.000	50.000	50.000	50.000
Tamaño de partícula, promedio, µm mediante microscopía	< 730	< 166			
Tamaño de partícula, promedio, µm mediante dispersión con láser			139	139	223 (sin filtrar) 115 (filtrado)
D90 (90 % del lote), mm			291	291	465 (sin filtrar) 231 (filtrado)
D-a-Tocopherol 1000	9.000	9.000	9.000	9.000	9.000
Triglicéridos de Cadena Media			500		
Aceite de pescado total	550.000	500.000		500.000	500.000
Dióxido de silicio	25.125	25.000	9.300	31.000	31.000
Gelatina de pescado	139,20	139,20	140,00	140,00	140,00
Glicerina al 99,5 %	63,86	63,86	67,49	69,96	67,49
Agua	16,94	16,94	5,75	4,82	5,75
Aceite de Limón			3,50	3,50	3,50
Agente colorante *		4,36	3,26	1,72	3,26
Peso total del relleno	606,0	654,0	568,3	590,0	590,0
Peso total de la cápsula	826,0	878,0	788,3	810,0	810,0
*Óxido de Hierro, Óxido de titanio, riboflavina					

15

Durante la producción de los dos primeros lotes del ensayo, la temperatura se monitorizar muy de cerca durante todo el proceso de encapsulación al identificar cuando se produjo la reducción del número de UFC.

20

Las gelatinas blandas producidas en el ensayo 1 mostraron una pérdida significativa de células viables durante todo el proceso de producción. El cambio de las condiciones de procesamiento y la repetición del ensayo proporcionó un proceso de producción significativamente más estable. Los resultados se muestran a continuación en la Tabla 3:

Tabla 3

Comparación de las temperaturas y valores de UFC durante los primeros dos ensayos					
N.º de ensayo		1		2	
Muestra	Puntos de toma de muestra	UFC/cápsula	Temp. Llenado / °C	UFC/ cápsula	Temp. Llenado/ °C
Recipiente de mezcla	Parte superior	1,39 E+09	20	1,90 E+10	7,5
Recipiente de mezcla	Parte inferior	1,64 E+09	20	7,20 E+09	7,5
Cápsulas	Al principio de la encapsulación	1,84 E+04	20	1,31 E+08	7,5
Cápsulas	En la parte media de la encapsulación	5,10 E+05	20	1,24 E+08	7,5
Cápsulas	Al final de la encapsulación	1,70 E+05	20	4,97 E+07	7,5
Cápsulas	Secadora giratoria, principio	2,12 E+05	20	2,62 E+08	20
Cápsulas	Secadora giratoria, medio	1,64 E+05	20	3,00 E+08	20
Cápsulas	Secadora giratoria, final	5,64 E+05	20	4,91 E+08	20
Cápsulas	Secado de bandeja, principio	4,73 E+05	19	2,94 E+09	20
Cápsulas	Secado de bandeja, medio	1,03 E+08	19	2,62 E+09	20
Cápsulas	Secado de bandeja, final	7,27 E+04	19	2,49 E+09	20

El impacto de la reducción en la temperatura de llenado de 20 °C a 7,5 °C es evidente, la supervivencia de las bacterias probióticas es significativamente mejor.

5 Haciendo más hincapié en los detalles de los resultados, la Tabla 3 muestra una reducción drástica de UFC/cápsula de gelatina blanda durante la encapsulación en el ensayo 1 y eso incluso a la temperatura de llenado baja en el ensayo 2, el recuento celular se reduce durante todo el proceso de encapsulación. Durante el secado, la relación UFC/cápsula aumenta, la razón siendo que durante el secado se pierde agua, de modo que la concentración total de bacterias aumenta (más claramente para el ensayo 2).

10 Esta temperatura se usó para los ensayos posteriores excepto por algunas variaciones en las temperaturas para el material de relleno (12-14 °C). En los ensayos posteriores solo se encontró una pérdida de producción mínima. Como un ejemplo, en el ensayo número 4 se añadieron bacterias probióticas que corresponden a una cantidad calculada de 3,0 E+10 UFC/cápsula de gelatina blanda si todas las cédulas pudieran estar disponibles después de la producción de la cápsula de gelatina blanda. El valor de las UFC encontrado cuando comenzó el estudio de estabilidad fue 9 E+09 UFC/cápsula de gelatina blanda. Estos dos valores confirman la pérdida mínima de bacterias probióticas observada cuando se fabrican cápsulas de gelatina blanda que comprenden bacterias probióticas aplicando el proceso mejorado.

20 El lote del ensayo 2 se distribuyó en diferentes sistemas de envasado que tienen diferentes cantidades de medios de secado. Los estudios de disponibilidad y estabilidad se iniciaron a diferentes temperaturas. Los sistemas de envasado fueron a) una bolsa de papel de aluminio que contenía 100 cápsulas de gelatina blanda y una bolsa de 1 g de sílice, b) un envase de tipo blíster (lámina de PVC/PVDC, 10 cápsulas de gelatina blanda por envase de tipo blíster y c) un frasco de aluminio con tapón de PE y protección de PP con revestimiento de ALU/PE que contiene 60 cápsulas de gelatina blanda y una bolsa de sílice de 0,5 g. Las muestras se almacenaron a 8-12 °C y a 25 °C/65 % de HR hasta 18 meses. Los resultados se proporcionan en las Figuras 1 y 2.

Los resultados en la Figura 1 muestran la importancia de tener un desecante activo presente en el sistema de envasado para las cápsulas de gelatina blanda que comprenden bacterias probióticas.

30 Los resultados en la Figura 2 demuestran que si la temperatura de almacenamiento es baja - en el intervalo de 8-12 °C - el efecto del material desecante presente en el envase es menos importante para los valores de UFC de las cápsulas de gelatina blanda que comprenden bacterias probióticas.

35 Las cápsulas de gelatina blanda del ensayo 4 se han incluido en diversos estudios de estabilidad. En las Figuras 3 y 4 y en las Figuras 5 y 6 se presentan algunos de los resultados.

40 La estabilidad como cápsulas de gelatina blanda a granel se ha estudiado. En las Figuras 3 y 5 se muestra el recuento celular total durante el almacenamiento a 5 °C y 25 °C en sistemas de envasado a granel simulados (bolsa de papel de aluminio cada una conteniendo 30 cápsulas de gelatina blanda y 3,2 g de material desecante). El balance entre el número de cápsulas de gelatina blanda y la cantidad de material desecante no es apropiado para hacer que las cápsulas de gelatina blanda sean estables a 25 °C Como es evidente a partir de la figura, el número de células viables comienza a disminuir ya después de 1 mes de almacenamiento a 25 °C. En la Tabla 4 se presentan las actividades del agua medidas durante el almacenamiento a granel.

45

Tabla 4

Actividades del agua durante almacenamiento a granel		
Meses	Actividad del agua	
	5 °C	25 °C/ 60 % de HR
0	0,24	0,24
1	0,21	0,22
2	0,23	0,22
3	0,20	0,23
6	0,18	0,20
12	0,22	-
24	0,20	-

Los datos del envasado a granel y final demuestran la importancia del control de la actividad del agua de las cápsulas de gelatina blanda durante el almacenamiento para que sean lo más estables posible.

50 La estabilidad de las cápsulas de gelatina blanda en el envasado final se ha estudiado. 30 cápsulas de gelatina blanda probióticas se envasaron en viales de plástico Active Vial, M-3009-336, Capitol Specialty Plastics Inc., 2039 McMillan Street Auburn, Alabama, USA con un revestimiento de desecante (4,3 g de tamiz molecular).

55 Las condiciones de almacenamiento fueron 5 °C, 25 °C/60 % de HR y 30 °C/75 % de HR. El estudio de estabilidad está en desarrollo y los valores de UFC después de 12 meses de almacenamiento están disponibles como se

muestra en la Figura 4. Los valores de UFC después de 24 meses de almacenamiento también están disponibles como se muestra en la Figura 6. Es evidente que las muestras almacenadas a 5 °C o 25 °C/60 % de HR tienen una pérdida log baja mientras que la pérdida log para las puestas almacenadas a 30 °C/75 % de HR es más elevada.

- 5 En la Tabla 5 se presentan las correspondientes actividades del agua medidas durante el almacenamiento. La actividad del agua disminuye durante el primer mes de almacenamiento debido al revestimiento de desecante en el vial de plástico y esto tiene un efecto estabilizante en el valor de UFC.

Tabla 5

Actividades del agua durante almacenamiento en viales de plástico				Aspecto
Tiempo/Meses	Actividad del agua			5 °C, 25 °C/ 60 % de HR, y 30 °C/ 75 % de HR
	5 °C	25 °C/ 60 % de HR	30 °C/ 75 % de HR	
0	0,24	0,24	0,24	En todas las muestras en las tres condiciones de almacenamiento las cápsulas de gelatina blanda son de color rojo-marrón, y no se observan fugas
1	0,20	0,14	0,12	
2	0,22	0,16	0,13	
3	0,18	0,14	0,09	
5	0,14	0,12	0,12	
6	0,12	0,06	0,08	
9	0,14	0,08	0,19	
12	0,14	0,09	0,10	
18	0,18	0,04	0,10	
24	0,10	0,07	0,17	

10

**REFERENCIAS**

- 15 Karim A.A. y Bhat, Rajeev, "Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins", Food Hydrocolloids 23 (2009) 563-576 Lachmann, L., *et al.*, eds. Lea & Febiger, Philadelphia, PA, pp. 398-412 (1986) Podczek, Fridrun y Jones, Brian E., Pharmaceutical Cápsulas, 2004, pp. 195-204 Singh *et al.*, "Microencapsulation: A promising technique for controlled drug delivery", Res Pharm Sci., Jul-Dic de 2010; 5 (2): 65-77

20

Documento CA 2 675 892  
Documento WO2012/021432

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para producir una cápsula de gelatina blanda que comprende bacterias probióticas no revestidas, el método comprendiendo:
- 5 a) mezclar las bacterias probióticas no revestidas con al menos un aceite para obtener un material de relleno para cápsula de gelatina blanda a una temperatura en el intervalo de 5 a 15 °C,  
 b) encapsular el material de relleno en una cápsula de gelatina blanda preparada a partir de una gelatina que tiene un punto de fusión en el intervalo de 11 a 28 °C; y  
 10 c) secar la cápsula de gelatina blanda en una o más etapas a una temperatura como máximo de 25 °C hasta una actividad del agua como máximo de 0,25,
- en el que durante el almacenamiento en estantería la cápsula de gelatina blanda se seca hasta una  $a_w$  como máximo de 0,2 y se almacena en un recipiente que se puede cerrar herméticamente en/sobre la pared o paredes internas en las cuales se integra al menos un formador de canales, al menos sobre parte del área, junto con al menos un absorbente.
2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que las bacterias probióticas no revestidas son no formadoras de esporas.
- 20 3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 en el que al menos un aceite se selecciona entre el grupo que consiste en omega 3s, tales como ácido docosahexaenoico (DHA), ácido eicosapentaenoico (EPA), aceite de pescado, y aceite krill.
- 25 4. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que al menos un aceite se selecciona entre el grupo que consiste en aceites vegetales tales como aceite de colza, aceite de borraja/aceite de onagra, aceite de linaza, aceite de perilla, o aceite de ajo.
- 30 5. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en el que la gelatina tiene una resistencia de Bloom en el intervalo de 100 a 300 bloom.
6. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en el que las bacterias probióticas son Lactobacilos, Lactococos, Pediococos, Streptococos o Bifidobacterias, o una mezcla de los mismos.
- 35 7. Un método de acuerdo con la reivindicación 6 en el que las bacterias probióticas son de la cepa *Bifidobacterium animalis* subespecie *lactis*.
8. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en el que la cápsula de gelatina blanda comprende uno, dos, tres, cuatro o más principios activos seleccionados entre el grupo que consiste en vitaminas, tales como vitamina A, D, E, K2, C, B2, B6, B12, biotina, niacina, ácido fólico; minerales, tales como cinc, selenio, cromo, cobre, calcio, cloruro; y extractos vegetales, tales como extracto/zumo de arándano o jalea real.
- 40 9. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en el que durante el almacenamiento en estantería la cápsula de gelatina blanda se almacena en un recipiente fabricado a partir de polímeros que comprenden absorbentes y formadores de canales.
- 45 10. Un método de acuerdo con la reivindicación 9 en el que durante el almacenamiento en estantería la cápsula de gelatina blanda se almacena en un recipiente fabricado a partir de polímeros de HDPE u otros polímeros de alta barrera frente al agua.
- 50 11. Un método de acuerdo con la reivindicación 9 o 10 en el que durante el almacenamiento en estantería la cápsula de gelatina blanda se almacena en un recipiente que comprende un desecante adecuado tal como sílice, desecantes a base de sílice, tamices moleculares, y zeolitas.
- 55 12. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11 en el que durante el almacenamiento en estantería la cápsula de gelatina blanda se almacena en un vial de plástico con revestimiento de desecante.
- 60 13. Un método de acuerdo con la reivindicación 12 en el que durante el almacenamiento en estantería la cápsula de gelatina blanda se almacena en un vial de plástico con revestimiento de desecante activo.
- 65 14. Una cápsula de gelatina blanda producida con el método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.
15. Una cápsula de gelatina blanda de acuerdo con la reivindicación 14 para su uso como un suplemento dietético, nutracéutico o farmacéutico.

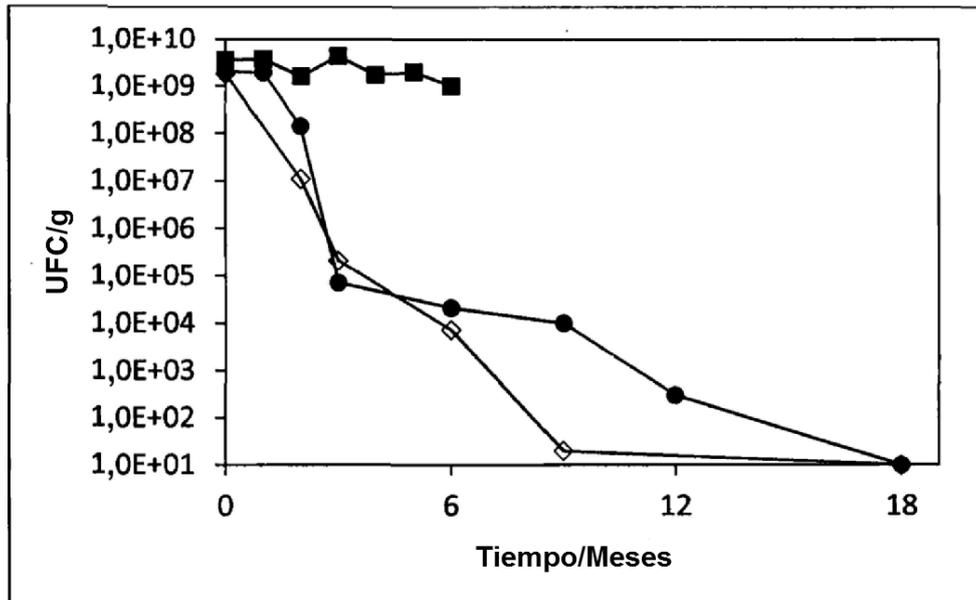


Figura 1

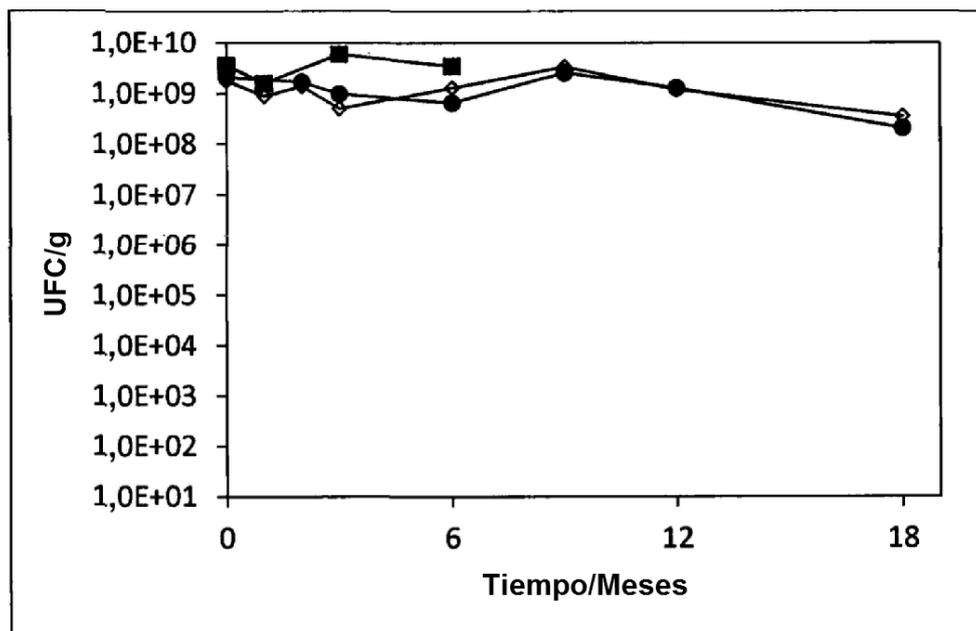


Figura 2

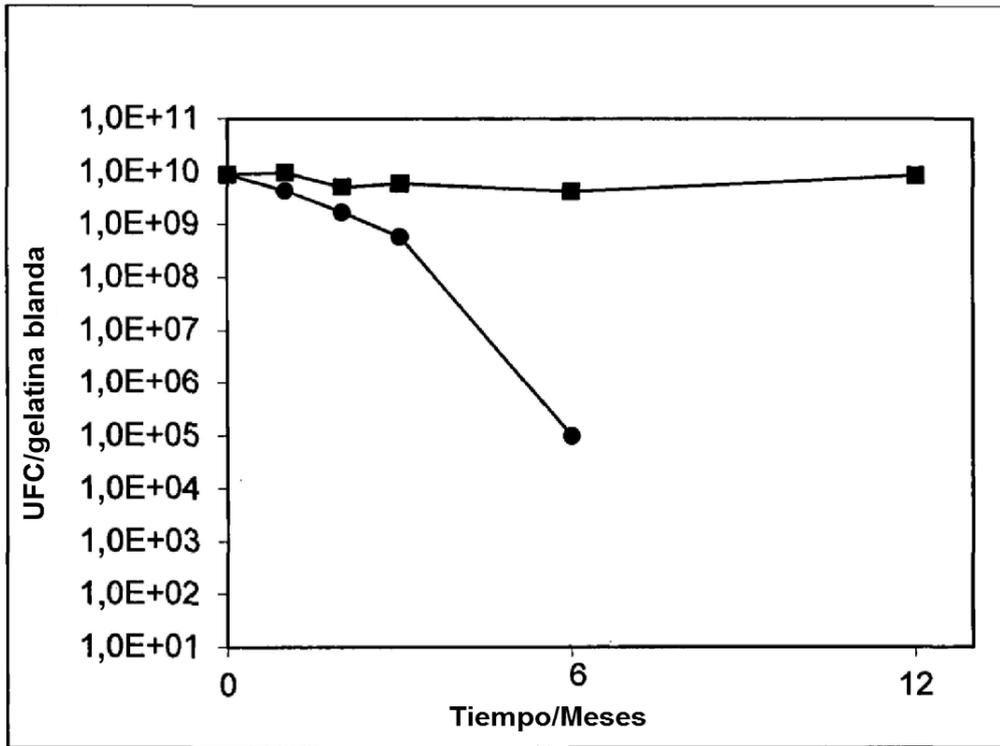


Figura 3

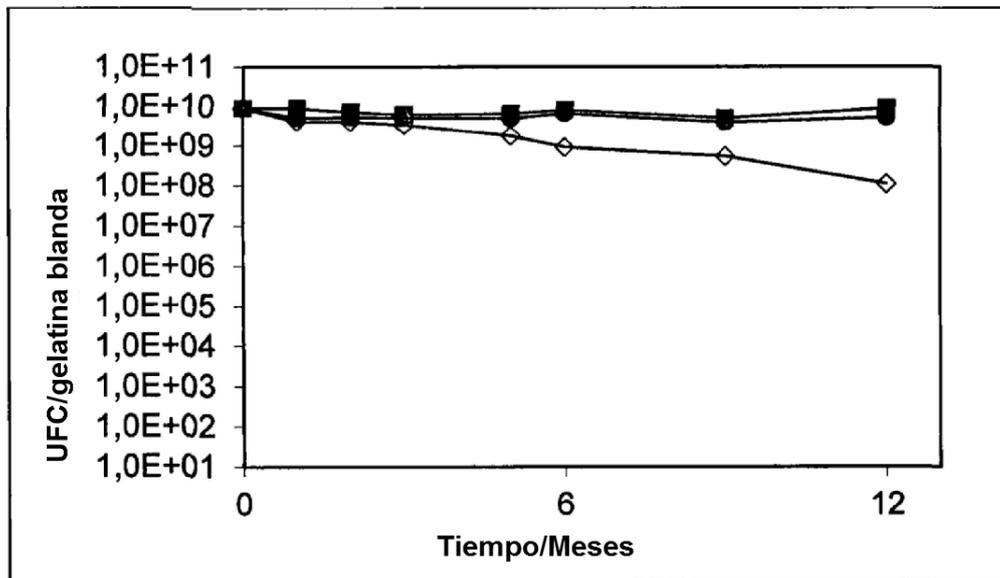


Figura 4

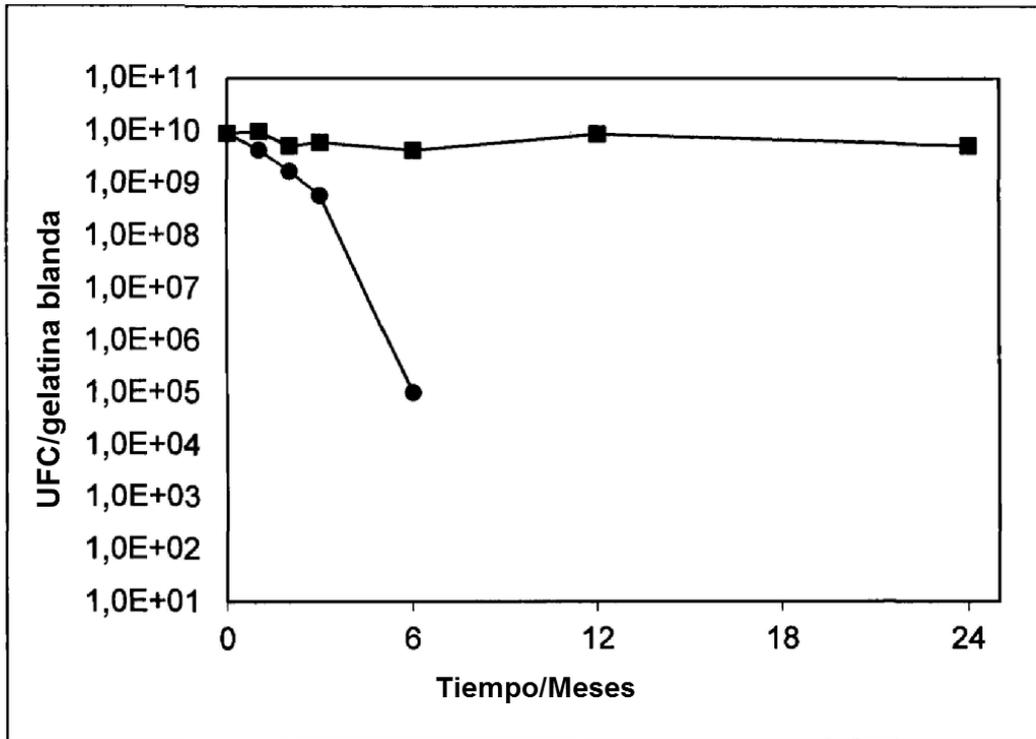


Figura 5

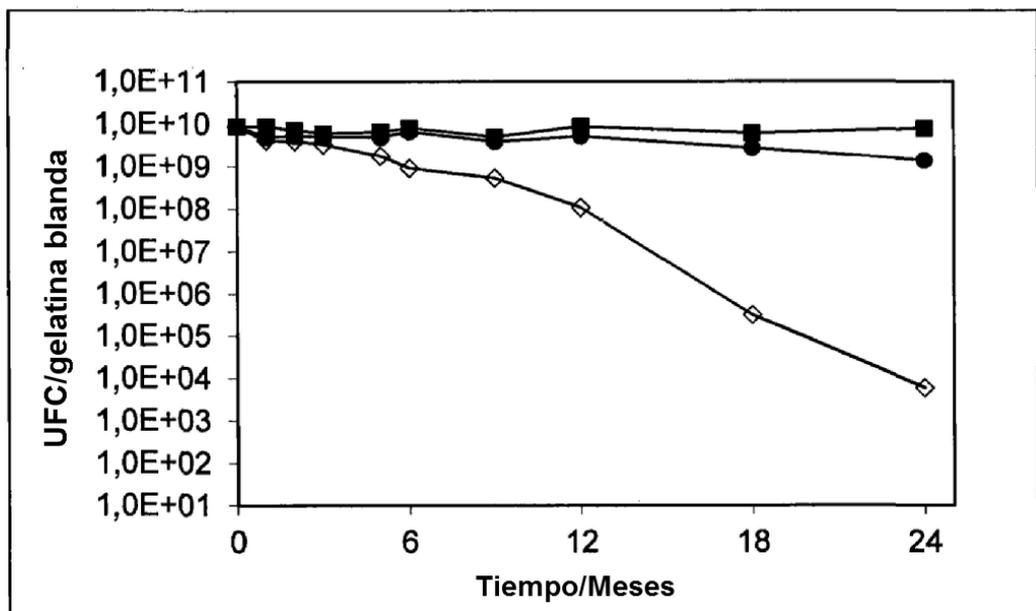


Figura 6