

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 763 968**

51 Int. Cl.:

**A01N 1/02** (2006.01)  
**C12N 1/04** (2006.01)  
**C12N 11/12** (2006.01)  
**C12N 11/04** (2006.01)  
**C12N 11/10** (2006.01)  
**C12N 1/20** (2006.01)  
**A23L 33/135** (2006.01)  
**A61K 35/00** (2006.01)  
**A61K 35/747** (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.07.2014 PCT/EP2014/064087**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **08.01.2015 WO15000972**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.07.2014 E 14744005 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.10.2019 EP 3016511**

54 Título: **Un método para liofilizar células encapsuladas, composiciones adecuadas para congelar células encapsuladas y los usos de dichas composiciones**

30 Prioridad:

**02.07.2013 EP 13174681**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**01.06.2020**

73 Titular/es:

**AUSTRIANOVA SINGAPORE PTE LTD. (100.0%)  
3 Biopolis Drive, 05-19 Synapse  
Singapore 138623, SG**

72 Inventor/es:

**GUENZBURG, WALTER H.;  
SALMONS, BRIAN y  
DANGERFIELD, JOHN A.**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**Observaciones:**

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

ES 2 763 968 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 método para liofilizar células encapsuladas, composiciones adecuadas para congelar células encapsuladas y los usos de dichas composiciones

### Campo de la invención

5 La presente invención se refiere en general a un método de liofilización de células encapsuladas. La presente invención también se refiere a composiciones adecuadas para congelar células encapsuladas. Además, se describen diversos usos de estas células, por ejemplo, como productos farmacéuticos, nutracéuticos, como aditivos alimentarios o como aditivos en cosméticos. La composición de la presente invención contiene leche desnatada, glicerol y trehalosa, y puede usarse para la liofilización de las células.

### 10 Antecedentes de la descripción

Los probióticos son microorganismos vivos que, según la Organización Mundial de la Salud (OMS) cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud del huésped. Particularmente, las bacterias lactobacillus acidophilus promueven la salud intestinal, que es un aspecto importante del bienestar general del huésped. Los productos probióticos requieren algunos pasos del proceso que aseguran su estabilidad y viabilidad. Pueden verse influenciados negativamente por el almacenamiento y durante su paso por el tracto gastrointestinal tras el consumo.

Muchos productos probióticos se liofilizan para preservarlos hasta que se usan. Esto significa que primero se congelan y luego se deshidratan al vacío. El proceso de liofilización es crucial para mantener la estabilidad y la viabilidad de las bacterias probióticas como aditivo alimentario, suplemento alimenticio o nutracéutico.

20 Técnicamente, la liofilización, también conocida como criodesecación, puede definirse como el enfriamiento de una muestra líquida, lo que resulta en la conversión de la solución congelable en hielo, la cristalización de solutos cristalizables y la formación de una matriz amorfa que comprende solutos no cristalizantes asociados con la mezcla no congelada, seguido de la evaporación (sublimación) de agua de la matriz amorfa. La evaporación (sublimación) del agua congelada en el material generalmente se lleva a cabo reduciendo la presión circundante para permitir que el agua congelada en el material se sublime directamente de la fase sólida a la fase gaseosa. La gran ventaja de la liofilización es estabilizar los materiales para el almacenamiento.

Además, la liofilización no tiene el riesgo de descongelarse en las células encapsuladas (Santivarangkna, C., Kulozik, U. y Foerst, P. (2007). Alternative drying processes for the industrial preservation of lactic acid starter cultures. *Biotechnology Progress*, 23 (2), 302-315). Se ha mostrado una mortalidad significativa de las células bacterianas después de la liofilización debido a la pérdida de la integridad de la membrana y la desnaturalización de las macromoléculas. Ver Franks, F. (1995) "Protein destabilization at low temperatures". *Advances in Protein Chemistry*, 46, 105-139; Thammavongs, et al (1996) "Physiological response of Enterococcus faecalis JH2-2 to cold shock: Growth at low temperatures and freezing/thawing challenge" *Letter in Applied Microbiology*, 23(6), 398-402; De Angelis, M. and Gobbetti, M. (2004) "Environmental stress responses in Lactobacillus: A review" *Proteomics*, 4(1), 106-122.

Se ha demostrado que la encapsulación de bacterias en sulfato de celulosa puede ejercer un efecto protector sobre las bacterias durante la liofilización. Un estudio realizado con alginato-quitosano como material de encapsulación mencionó que las cápsulas se hinchaban cuando se incubaban en fluido intestinal simulado (Paulraj Kanmani, R. Satish Kumar, N. Yuvaraj, KA Paari, V. Pattukumar y Venkatesan Arul (2011) Cryopreservation and Microencapsulation of a Probiotic in Alginate-chitosan Capsules Improves Survival in Simulated Gastrointestinal Conditions. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, (16) 1106-1114. Kanmani et al. también describen en este estudio que las microcápsulas recubiertas de alginato de sodio y quitosano se redujeron en un 10% al entrar en contacto con el fluido gástrico simulado.

45 Por lo tanto, la acción perjudicial del proceso de liofilización en las células de tal manera que las células bacterianas pueden compensarse mediante microencapsulación con sulfato de celulosa de sodio, ya que dicho material de encapsulación puede dar como resultado una mayor estabilidad de las cápsulas y una mayor viabilidad de las bacterias encapsuladas. Sin embargo, todavía existe la necesidad de superar la acción perjudicial del proceso de liofilización en células como las células bacterianas. El documento WO 2010/124387 describe una composición oral, que comprende una bacteria altamente activa bsh, aislada o el sobrenadante de la misma, para reducir el colesterol sérico, los lípidos séricos, la grasa corporal y el índice aterogénico y para la profilaxis y el tratamiento de la aterosclerosis, enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares. Huang et al. (L. Huang, Z. Lu, Y. Yuan, F. Lu y X. Bie (2006) Optimization of a protective medium for enhancing the viability of freeze-dried Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus based on response surface methodology. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 33: 55-61) describen la metodología de superficie de respuesta (RSM) para optimizar un medio protector para mejorar la viabilidad celular de Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus LB14 durante la liofilización.

Por lo tanto, la acción perjudicial del proceso de liofilización en las células de tal manera que las células bacterianas pueden ser atenuadas por la microencapsulación con sulfato de celulosa de sodio, ya que dicho material de

encapsulación puede mejorar la estabilidad de las cápsulas y la mayor viabilidad de las bacterias encapsuladas. Sin embargo, todavía existe la necesidad de superar la acción perjudicial del proceso de liofilización en células tales como las células bacterianas.

**Sumario de la invención**

- 5 La presente invención aborda esta necesidad proporcionando nuevos métodos para liofilizar células encapsuladas. Además, se describen células encapsuladas obtenidas por tales métodos y diversos usos de estas células encapsuladas. La presente invención también proporciona un método para preparar células encapsuladas para su liofilización y composiciones adecuadas para la congelación de células encapsuladas, así como los usos de estas composiciones.
- 10 En un primer aspecto, la descripción proporciona un método de liofilización de células encapsuladas, comprendiendo el método al menos dos pasos de incubación consecutivos, en el que las células encapsuladas se incuban en cada paso de incubación en una solución de incubación que contiene crioprotector durante un período de tiempo adecuado, donde la concentración de crioprotector en la solución de incubación aumenta con cada etapa de incubación posterior, donde la concentración de crioprotector en la solución de incubación aumenta con cada paso
- 15 de incubación posterior, donde las células encapsuladas son células bacterianas o células de levadura, y donde el crioprotector es una mezcla de leche desnatada, glicerol y un carbohidrato, donde la leche desnatada está presente en un concentración de 3% (p/v) a 8% (p/v), el glicerol está presente en una concentración de 0,5% (p/v) a 2% (p/v) y el carbohidrato es trehalosa y está presente en un concentración del 5% (p/v) al 13% (p/v).
- 20 Además, se describe en el presente documento una célula encapsulada liofilizada que se obtiene mediante un método de liofilización de células encapsuladas como se describe en el presente documento.
- Se describe adicionalmente en el presente documento una composición que comprende un vehículo adecuado y una célula encapsulada que se obtiene mediante un método de liofilización de células encapsuladas como se describe en el presente documento. En realizaciones ejemplares, la composición puede ser, por ejemplo, un complemento
- 25 alimenticio para humanos o animales, una formulación de jabón, una composición cosmética o una composición farmacéutica.
- Se describe adicionalmente en el presente documento un método para tratar o prevenir diarrea, diarrea causada por antibióticos, artritis, obesidad, síndrome del intestino irritable, acidez estomacal, síndrome de fatiga crónica, cáncer gastrointestinal y otras formas de sufrir consecuencias por poseer una población bacteriana desequilibrada en el intestino, comprendiendo el método administrar a un sujeto una célula encapsulada liofilizada o una composición
- 30 que contiene una célula encapsulada liofilizada como se describe en este documento.
- Se describe adicionalmente en el presente documento el uso de una célula encapsulada liofilizada o una composición que contiene una célula encapsulada liofilizada como se describe en el presente documento para tratar o prevenir diarrea, diarrea causada por antibióticos, artritis, obesidad, síndrome del intestino irritable, acidez estomacal, síndrome de fatiga crónica, cáncer gastrointestinal y otras formas de sufrir consecuencias por poseer una
- 35 población bacteriana desequilibrada en el intestino.
- Se describe adicionalmente en el presente documento el uso de una célula encapsulada liofilizada o una composición que contiene una célula encapsulada liofilizada como se describe en este documento como un producto farmacéutico, un aditivo alimentario o un aditivo en cosmética. Cuando se usa como aditivo alimentario, el alimento puede ser un producto a base de leche, como un yogur, requesón o suero de leche. Cuando se usa como aditivo
- 40 alimentario, una célula encapsulada liofilizada o la composición que contiene una célula encapsulada liofilizada se almacena en un compartimento separado de un paquete de alimentos que contiene los alimentos.
- En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para preparar células encapsuladas para su liofilización, comprendiendo el método al menos dos pasos de incubación consecutivos, en el que las células encapsuladas se incuban en cada paso de incubación en una solución de incubación que contiene crioprotector durante un período de tiempo adecuado, en el que la concentración de crioprotector en la solución de incubación
- 45 aumenta con cada etapa de incubación posterior, en el que las células encapsuladas son células bacterianas o células de levadura, y en el que el método comprende incubar las células encapsuladas en una composición que comprende leche desnatada, glicerol y un carbohidrato, en donde la leche desnatada está presente en una concentración de 3% (p/v) a 8% (p/v), el glicerol está presente en una concentración de 0,5% (p/v) a 2% (p/v) y el carbohidrato es trehalosa y está presente en una concentración del 5% (p/v) al 13% (p/v).
- 50 Se describe adicionalmente en el presente documento una célula procariota de células encapsuladas liofilizadas o una célula de levadura encapsulada liofilizada.
- En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición adecuada para la congelación de células encapsuladas, comprendiendo la composición leche desnatada, glicerol y un carbohidrato, en donde la leche desnatada está presente en una concentración del 3% (p/v) a 8 % (p/v), el glicerol está presente en una concentración de 0,5% (p/v) a 2% (p/v) y el carbohidrato es trehalosa y está presente en una concentración de 5%
- 55 (p/v) a 13 % (p/v).

Se describe adicionalmente en el presente documento el uso de una composición que comprende leche desnatada, glicerol y un carbohidrato para preparar células encapsuladas para liofilización.

En otro aspecto, la presente invención proporciona el uso de una composición como se definió anteriormente para la congelación de células encapsuladas, en donde las células encapsuladas son células bacterianas o células de levadura.

### Descripción de los dibujos

La invención se entenderá mejor con referencia a la descripción detallada, cuando se considere, junto con los ejemplos no limitantes y los dibujos adjuntos, en los que:

La Fig. 1 muestra imágenes microscópicas de campo brillante de células encapsuladas de *Lactobacillus acidophilus* en forma liofilizada después de ser tratadas con el método de la invención usando 5% de leche desnatada en polvo y 1% de glicerol como crioprotector, en donde las células se incubaron en cada etapa de incubación en una solución de incubación que contenía una concentración creciente del crioprotector. Las concentraciones crecientes del crioprotector se logran diluyendo en serie en cada etapa de incubación la solución de crecimiento bacteriano del 100% al 50% al 25% al 12,5% al 6,25% al 3,125% al 0% con solución de citoprotector (5% de leche desnatada en polvo y 1% de glicerol).

La Fig. 2 muestra el efecto protector de las cápsulas sobre la bacteria *Lactobacillus acidophilus* durante la liofilización, usando una solución de incubación que contiene leche desnatada y glicerol (5% de leche desnatada y 1% de glicerol en agua) como crioprotector. El efecto de protección se examinó mediante una prueba de viabilidad después de la rehidratación de las bacterias liofilizadas. La viabilidad se comparó con células bacterianas recién encapsuladas como referencia y se expresa en % de viabilidad.

La Fig. 3 muestra la comparación de dos diferentes medios de congelación/soluciones de incubación (solución de incubación 1: medio de Man, Rogosa y Sharpe (MRS) que contiene DMSO como crioprotector, solución de incubación 2: 5% de leche desnatada y 1% de glicerol en agua) con respecto a supervivencia de la bacteria *Lactobacillus acidophilus* durante la liofilización;

La Fig. 4 muestra imágenes microscópicas de campo brillante de una cápsula vacía que se ha rehidratado después de liofilizar. El medio de congelación utilizado fue leche desnatada con 1% de glicerol. La etapa de congelación previa a la liofilización se realizó en nitrógeno líquido.

La Fig. 5 muestra imágenes microscópicas de campo brillante de una cápsula vacía que se ha rehidratado después de liofilizar. El medio de congelación utilizado fue leche desnatada con 1% de glicerol. La etapa de congelación antes de la liofilización se llevó a cabo en un baño de etanol/hielo seco.

La Fig. 6 muestra imágenes microscópicas de campo brillante de una cápsula vacía liofilizada en solución salina tamponada con fosfato (PBS) sin crioprotector con la etapa de pre congelación realizada en un baño de etanol/hielo seco.

La Fig. 7 muestra imágenes microscópicas de campo brillante de una cápsula vacía liofilizada en PBS con DMSO al 10%, realizándose la etapa de pre congelación en un baño de etanol/hielo seco;

La Fig. 8 muestra imágenes microscópicas de campo brillante de una cápsula vacía liofilizada en MRS sin crioprotector, realizándose la pre congelación en nitrógeno líquido;

La Fig. 9 muestra imágenes microscópicas de campo brillante de una cápsula vacía liofilizada en MRS sin crioprotector, y la congelación se lleva a cabo en un baño de etanol/hielo seco;

La Fig. 10 muestra los resultados de una realización del método de liofilización de la invención usando una combinación de 5% de leche desnatada, 1% de glicerol y 10% de trehalosa como crioprotector, ambos como solución de incubación para la incubación secuencial con concentraciones crecientes del crioprotector y como solución de liofilización. En este experimento se emplearon las siguientes muestras: 1) Muestras de *Lactobacillus* libres (no encapsuladas) liofilizadas con leche desnatada/glicerol/trehalosa (rombos negros), 2) muestras de *Lactobacillus* libres liofilizadas sin leche desnatada/glicerol/trehalosa (cuadrados negros), 3) muestras de bacterias *Lactobacillus* encapsuladas liofilizadas utilizando el método de la invención con una concentración de leche desnatada, glicerol y trehalosa como crioprotector en la solución de incubación (cruces) (las concentraciones crecientes del crioprotector se lograron diluyendo en serie en cada paso de incubación la solución de crecimiento bacteriano de 100% a 50% a 25% a 12,5% a 6,25% a 3,125% a 0% con solución de ciproprotector (5% de leche desnatada en polvo, 1% de glicerol y 10% de trehalosa), 4) muestras de bacterias lactobacilos encapsuladas liofilizadas sin trehalosa (triángulos negros). Los momentos en los que las muestras se rehidrataron fueron 1, 2, 3, 4, 6, 7 y 8 semanas después de la liofilización para evaluar la viabilidad de las bacterias después de la crioconservación con o sin trehalosa a temperatura ambiente durante un período de 2 meses después de liofilizar. Cada punto de datos en la FIG. 10 representa el promedio de muestras duplicadas liofilizadas (cada muestra

analizada por cuadruplicado) con dos excepciones: bacterias libres con 10% de trehalosa en la semana 6 y bacterias encapsuladas con 10% de trehalosa en la semana 8.

RFU = unidades fluorescentes relativas.

5 La Fig. 11 muestra cápsulas de *Lactobacillus casei* en diferentes puntos después de la encapsulación y liofilización, con la FIG. 11A que muestra cápsulas de *Lactobacillus casei* inmediatamente después de la encapsulación, la FIG. 11B que muestra cápsulas de *Lactobacillus casei* un día después de la encapsulación antes de la liofilización, y la FIG. 11C que muestra cápsulas de *Lactobacillus casei* rehidratadas y liofilizadas.

La Fig. 12 muestra la comparación de viabilidad de cápsulas de *Lactobacillus casei* un día antes y después de la liofilización.

10 La Fig. 13 muestra las cápsulas de *Bifidobacterium infantis longum* en diferentes puntos después de la encapsulación y liofilización, con la FIG. 13A que muestra las cápsulas de *Bifidobacterium infantis* un día después de la encapsulación y antes de la liofilización, y la FIG. 13B que muestra cápsulas rehidratadas liofilizadas de *Bifidobacterium infantis longum*.

15 La Fig. 14 muestra la comparación de viabilidad de las cápsulas de *Bifidobacterium infantis longum* un día antes y después de la liofilización.

### Descripción detallada

La presente invención proporciona un método de liofilización de células encapsuladas, en el que este método comprende al menos dos etapas de incubación consecutivas. Las células encapsuladas se incuban en cada uno de los pasos de incubación en una solución de incubación que contiene crioprotector durante un período de tiempo adecuado, en el que la concentración de crioprotector en la solución de incubación aumenta con cada paso de incubación posterior. Además, las células encapsuladas son células bacterianas o células de levadura, y el crioprotector es una mezcla de leche desnatada, glicerol y un carbohidrato. La leche desnatada está presente en una concentración del 3% (p/v) al 8% (p/v), el glicerol está presente en una concentración del 0,5% (p/v) al 2% (p/v) y el carbohidrato es trehalosa y está presente en una concentración del 5% (p/v) al 13% (p/v). Los inventores han descubierto que este método proporciona un efecto protector sobre la integridad (estructural) de las cápsulas (el material de encapsulación) tanto antes como durante el proceso de liofilización. Además, la vida útil de las cápsulas con las células encapsuladas en ellas se extiende y la viabilidad de las células encapsuladas aumenta significativamente (véase la sección de ejemplos). A nivel mecanicista, aunque no desea estar vinculado a ninguna teoría, se cree que someter las células encapsuladas a los al menos dos pasos de incubación consecutivos del método de la invención evita que las cápsulas se "arruguen".

El aumento de la concentración del crioprotector (se observa aquí que el término "crioprotector", como se usa en el presente documento, se refiere tanto a un solo crioprotector como a una mezcla/combinación de dos o más crioprotectores) en la solución de incubación durante los pasos de incubación consecutivos, puede ser logrado de varias maneras. Es posible, por ejemplo, agregar a una suspensión de las células encapsuladas, para cada etapa de incubación, una solución madre del crioprotector. Por ejemplo, si se usa un crioprotector como DMSO, formamida, N-metilacetamida (MA) o propanodiol, se puede usar una solución madre del crioprotector puro (solución madre al 100%) y, en cada etapa de incubación, una cierta cantidad de la solución madre se agrega a la suspensión celular para aumentar la concentración del crioprotector (cf. Ejemplo 1 de la sección de ejemplos). Alternativamente, también es posible, por ejemplo, utilizar la solución en la que las células encapsuladas se someterán a la liofilización (es decir, la solución de congelación o el medio de criopreservación) como solución inicial/de reserva para lograr un aumento en la concentración del crioprotector. El uso de la solución de congelación final para este propósito tiene la ventaja de que no se debe preparar una solución madre adicional para los pasos de incubación consecutivos. Este enfoque simplifica el manejo de los pasos de incubación cuando se usa una mezcla de crioprotectores en los pasos de incubación. En tal caso, la solución congelada preparada (por ejemplo, leche desnatada al 5% (p/v), glicerol al 1% (v/v) y 10% (p/v) del carbohidrato trehalosa) se utiliza para "diluir en serie" en cada etapa de incubación el medio en el que se almacenan las células encapsuladas. Esta "dilución en serie" puede, por ejemplo, lograrse de la siguiente manera. La mitad del volumen del medio celular en el que están presentes las células encapsuladas se retira del vial respectivo, y se agrega el mismo volumen de la solución de congelación para la primera etapa de incubación. Las células encapsuladas se incuban luego durante el período de tiempo deseado y luego nuevamente se retira el 50% del volumen de la mezcla de incubación y se reemplaza por el mismo volumen de solución de congelación para la segunda etapa de incubación. Este procedimiento puede repetirse tantas veces como se desee, aumentando así la concentración del crioprotector en cada etapa de incubación. Si se desea, el último paso de incubación puede llevarse a cabo en la solución de congelación.

55 El término "liofilización", que también se conoce como criodesecación, se usa en su significado regular como el enfriamiento de una muestra líquida, lo que resulta en la conversión de la solución congelable en hielo, la cristalización de solutos cristalizables y la formación de una matriz amorfa que comprende solutos no cristalizadores asociados con la mezcla no congelada, seguida de evaporación (sublimación) de agua de la matriz amorfa. En este proceso, la evaporación (sublimación) del agua congelada en el material generalmente se lleva a cabo reduciendo la

presión circundante para permitir que el agua congelada en el material se sublime directamente desde la fase sólida a la fase gaseosa. La liofilización típicamente incluye los pasos de pretratamiento, congelación, secado primario y secado secundario.

5 El pretratamiento incluye cualquier método para tratar el producto deseado, es decir, células encapsuladas in situ, antes de la congelación. El tratamiento previo puede, por ejemplo, incluir el lavado de las células, la revisión de la formulación (es decir, la adición de componentes para aumentar la estabilidad y/o mejorar el procesamiento), o disminuir la cantidad de un solvente de alta presión de vapor o aumentar el área de superficie.

10 La etapa de congelación incluye cualquier método que sea adecuado para la congelación de las células encapsuladas. A pequeña escala, por ejemplo, en un laboratorio, la congelación se puede realizar colocando el material en un matraz de liofilización y haciendo girar el matraz en un baño, también conocido como congelador, que se enfría, por ejemplo, por medios de refrigeración mecánica, por una mezcla de hielo seco con un alcohol como metanol o etanol, o por nitrógeno líquido. Por supuesto, también es posible utilizar un aparato de liofilización disponible comercialmente, como el sistema Thermo Scientific® Modulyo Freeze-Dry distribuido por Thermo Fisher Scientific Inc. En una escala mayor, la congelación generalmente usa una máquina de liofilización comercial con temperatura controlada. Cuando se congelan las células encapsuladas, la congelación generalmente se lleva a cabo rápidamente, para evitar la formación de cristales de hielo. Por lo general, las temperaturas de congelación están entre -50°C y -80°C.

20 El siguiente paso es el secado primario. Durante la fase de secado primario, la presión se reduce (típicamente al rango de unos pocos milibares), y se suministra calor suficiente al material para que el agua sublime. La cantidad de calor necesaria se puede calcular utilizando el calor latente de sublimación de las moléculas sublimadas. En esta fase de secado inicial, se sublima aproximadamente el 95% del agua en el material. Esta fase puede ser lenta (puede ser de varios días en la industria) porque, si se agrega demasiado calor, la estructura del material podría verse alterada.

25 El secado secundario puede seguir como el último paso en la liofilización. La fase de secado secundario tiene como objetivo eliminar, si está presente, las moléculas de agua no congeladas, ya que el hielo se eliminó en la fase de secado primario. En esta fase, la temperatura suele ser más alta que en la fase de secado primaria, e incluso puede estar por encima de 0°C, para romper cualquier interacción fisicoquímica que se haya formado entre las moléculas de agua y el material congelado. Por lo general, la presión también se reduce en esta etapa para fomentar la desorción (generalmente en el rango de microbares o fracciones de un pascal). Una vez que se completa el proceso de liofilización, el vacío generalmente se rompe con un gas inerte, como nitrógeno, antes de que las células encapsuladas liofilizadas se empaqueten y/o almacenen para su uso posterior.

30 Como es evidente a partir de lo anterior, el presente método pertenece al "pretratamiento" tal como lo entiende la persona experta en la técnica y se puede usar junto con cualquier metodología conocida de congelación y secado de material tal como células libres o encapsuladas como se describe en este documento.

35 Por consiguiente, dado que al menos los dos pasos de incubación consecutivos pueden llevarse a cabo con cualquier paso de liofilización adecuado, la invención también se dirige a un método para preparar células encapsuladas para su liofilización, en el que este método comprende al menos dos pasos de incubación consecutivos, donde las células encapsuladas se incuban en cada etapa de incubación en una solución de incubación que contiene crioprotector durante un período de tiempo adecuado, donde la concentración de crioprotector en la solución de incubación aumenta con cada etapa de incubación posterior. Por lo tanto, mientras que a continuación la invención se explicará con más detalle con referencia a un método de liofilización, debe entenderse que todas estas realizaciones se refieren igualmente al método de preparación de células encapsuladas para la liofilización como se define en este documento.

45 En el método de la invención, puede llevarse a cabo cualquier número adecuado de al menos los dos pasos de incubación consecutivos siempre que el número sea suficiente para proporcionar un efecto deseado sobre, por ejemplo, la viabilidad de las células encapsuladas después de la liofilización. En realizaciones ilustrativas, el método comprende 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 etapas de incubación, donde en cada etapa de incubación se incrementa la concentración del crioprotector. La incubación en cada uno de los pasos de incubación puede llevarse a cabo durante cualquier cantidad de tiempo adecuada, por ejemplo, un tiempo en el que se pueda lograr la estabilidad deseada a largo plazo de las cápsulas y/o la viabilidad de las células encapsuladas. Se puede determinar empíricamente un tiempo de incubación adecuado, así como un número adecuado de etapas de incubación, por ejemplo, evaluando la viabilidad de las células encapsuladas después de la liofilización seguida de (después de un cierto período de tiempo) la rehidratación de las células (cf. la sección de ejemplos al respecto). En algunas realizaciones, el tiempo de incubación es típicamente de aproximadamente varios minutos a aproximadamente 55 varias horas por etapa de incubación (véase, también a este respecto, la Sección de Ejemplos en la que se incubaron células bacterianas en cada etapa de incubación durante aproximadamente 25 minutos). La incubación puede llevarse a cabo sin agitación, sino también con agitación (como, por ejemplo, agitación o balanceo) para mejorar la absorción del crioprotector por el material de encapsulación y las células.

En algunas realizaciones del método de la presente invención, se usa el mismo crioprotector o una mezcla del mismo crioprotector en cada etapa de incubación. Se describe además en este documento un crioprotector que puede ser cualquier compuesto que pueda proporcionar protección durante la liofilización contra daños en el uso del material de encapsulación o en la célula encapsulada. Se describen además en este documento ejemplos de crioprotectores adecuados que incluyen, entre otros, leche desnatada, glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO), formamida, una mezcla de formamida y DMSO, N-metilacetamida (MA), polivinilpirrolidona, propanodiol (ya sea 1,2-propanodiol o 1,3-propanodiol o una mezcla de ambos), propilenglicol, albúmina sérica, una mezcla de albúmina sérica con metanol, un carbohidrato y alginato. Se describen además en este documento ejemplos de alginatos que se pueden usar como crioprotectores e incluyen alginato Satialgine® o alginato Algogel® que están disponibles en Cargill (cf. P. Capelaa et al, "Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yoghurt", Food Research International Volumen 39, Número 2, marzo de 2006, páginas 203-211).

Se describen además en este documento ejemplos de carbohidratos que se pueden usar como crioprotectores que incluyen, entre otros, sacarosa, glucosa mezclada con metanol, lactosa, trehalosa, rafinosa, dextrano, pectina (por ejemplo, Unipectine™ que también está disponible de Cargill y que también ha sido discutido como crioprotector por P. Capelaa et al, Food Research International Volume 39, supra), hidroxietilalmidón (HES) y sulfato de celulosa.

También es posible usar en la presente invención una mezcla de dos o más crioprotectores en la solución de incubación (cf. La sección de Ejemplos). En tales realizaciones, es posible que la concentración de solo uno de los crioprotectores aumente en los pasos de incubación consecutivos, mientras que la concentración del segundo (o cualquier otro) crioprotector se mantiene constante durante el curso de la incubación (véase también la Sección de Ejemplos). En una de tales realizaciones, el crioprotector cuya concentración se mantiene constante puede ser la trehalosa. En una realización particular, la concentración de leche desnatada se incrementa en cada uno de al menos los dos pasos de incubación consecutivos mientras se mantiene la concentración del carbohidrato constante en al menos los dos pasos de incubación consecutivos.

Se describe en este documento: Se puede usar cualquier célula adecuada (encapsulada). La célula encapsulada puede ser una célula eucariota o una célula procariota o una mezcla de varias células eucariotas o varias células procariotas. Las células también pueden ser una mezcla de células eucariotas con células procariotas. Los ejemplos de células eucariotas incluyen, entre otras, células de mamífero, células fúngicas o células de levadura. Un ejemplo puramente ilustrativo para las células de mamíferos son las células epiteliales de pigmento retiniano humano (RPE) descritas por Wikström et al. "Viability of freeze dried microencapsulated human retinal pigment epithelial cells", Eur. J. Pharm. Sci. Volumen 47, Número 2, 29 de septiembre de 2012, Páginas 520-526 o las células madre mesenquimales descritas por Gordon et al, 2001, "Recovery of human mesenchymal stem cells following dehydration and rehydration", Cryobiology 43, 182. En los métodos de la presente invención, las células encapsuladas son células bacterianas o células de levadura. Los ejemplos de células de levadura adecuadas incluyen *Saccharomyces*, *Debaromyces*, *Candida*, *Pichia* y *Torulopsis*, por mencionar solo algunos ejemplos ilustrativos. Además se describen en este documento ejemplos de células fúngicas que incluyen, entre otros, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor* o *Penicillium*. Las células bacterianas usadas en la presente invención pueden ser células aerobias o anaerobias. En ejemplos ilustrativos de los métodos de la presente invención, las células bacterianas pueden seleccionarse del grupo que consiste en *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Fusobacterium*, *Melissococcus*, *Propionibacterium*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Staphylococcus*, *Peptostreptococcus*, *Bacillus*, *Pediococcus*, *Micrococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Aerococcus*, *Oenococcus*, *Geobacillus*, *Lactobacillus* y mezcla de estas células.

En algunas realizaciones del método de la presente invención, las células que se someten a la incubación como se describe en este documento son células probióticas. Ejemplos de células probióticas adecuadas incluyen, entre otras, *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bifidobacterium angulatum*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium longum*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus alimentarius*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus casei* Shirota, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus farciminus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus lacti*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus pentosaceus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus* (*Lactobacillus* GG), *Lactobacillus sake*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus thermotolerans*, *Lactobacillus mucosae*, *Lactococcus lactis*, *Micrococcus varians*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus halophilus*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus thermophilus*, *Staphylococcus carnosus*, *Staphylococcus xylosus* y cualquier mezcla de xilococos.

En algunas realizaciones de la invención, las células están en una fase de crecimiento exponencial cuando se encapsulan. Sin embargo, también es posible evidentemente encapsular y posteriormente liofilizar células que se encuentran en cualquier otra fase de crecimiento, por ejemplo, células de mamíferos (no de acuerdo con la invención) que crecen hasta confluencia (véase a este respecto Wikström et al, Eur. J. Pharm. Sci. (2012) supra).

En realizaciones típicas de la presente invención, las células se han encapsulado en una microcápsula que tiene una pared de cápsula porosa. La pared de la cápsula porosa (cubierta) puede comprender un material seleccionado del

grupo que consiste en un polímero de alginato, colágeno, gelatina, quitosano, agarosa, un polímero de poli-lisina, un polímero de sulfato de celulosa y combinaciones de los mismos.

En este contexto, se observa que el término "encapsulación" se usa en la presente invención de acuerdo con su significado convencional dentro de la técnica. La encapsulación, como se usa en el presente documento, se refiere al procedimiento de formar un recubrimiento continuo alrededor de una matriz interna o célula que está totalmente contenida dentro de la pared de la cápsula como un núcleo de material encapsulado. La encapsulación se debe distinguir de la "inmovilización", que se refiere a la captura de material como las células dentro o a lo largo de una matriz. A diferencia de la encapsulación, la inmovilización es un procedimiento aleatorio que da como resultado un tamaño de partícula indefinido donde un porcentaje de elementos inmovilizados estarán expuestos en la superficie. La encapsulación o microencapsulación (ambos términos se usan indistintamente en el presente documento) ayuda a separar un material del núcleo de su entorno, mejorando así su estabilidad y extendiendo la vida útil del material del núcleo. La estructura formada por el agente de microencapsulación alrededor de la sustancia central se conoce como la pared o cubierta. Las propiedades del sistema de pared están típicamente diseñadas para proteger el material del núcleo y para liberar potencialmente el material del núcleo en condiciones específicas mientras se permite que pequeñas moléculas entren y salgan de la pared de la cápsula porosa (que actúa como una membrana). Cualquier cápsula y material de encapsulación se puede someter al método de liofilización como se describe en este documento. Las cápsulas pueden, por ejemplo, variar de tamaño submicrométrico a varios milímetros y pueden tener diferentes formas.

De acuerdo con la descripción anterior, varios biopolímeros de grado alimenticio tales como alginato, almidón, goma de xantano, goma guar, goma de algarroba y goma de carragenano, así como proteínas de suero, se han probado como materiales de microencapsulación para proteger, por ejemplo, células microbianas sensibles al ácido con éxitos variables. Para una revisión reciente, ver Islam et al. "Microencapsulation of Live Probiotic Bacteria" J. Microbiol. Biotechnol (2010), 20(10), 1367-1377. Todos estos materiales de encapsulación y también todas estas bacterias probióticas pueden usarse en la presente invención. En la solicitud de patente internacional WO 2012/101167 "Protection Of Microbial Cells From Acidic Degradation" se ofrece una visión general sobre todo el material de encapsulación y, por ejemplo, las células microbianas que se pueden usar en la presente invención.

El polímero de alginato, si se usa en este documento como material de encapsulación deseado para células, podría ser un polímero de alginato puro, un polímero de alginato-almidón modificado, goma de alginato-inulina-xantano, alginato y polímero de poli-L-lisina, un polímero de quitosano/alginato y un polímero de quitosano/xantano. Numerosos ejemplos de tales materiales de encapsulación de alginato se describen en Wikström et al, supra o la solicitud de patente internacional WO 2012/101167 y las referencias citadas en esta solicitud internacional.

En otras realizaciones de la presente invención, el material de encapsulación puede ser un polímero de sulfato de celulosa. Este polímero puede ser cualquier polímero de sulfato de celulosa conocido, que incluye, entre otros, un polímero de sulfato de celulosa que comprende un complejo formado a partir de sulfato de celulosa de sodio (NaCS)/poli [cloruro de dialil(dimetil)amonio] (pDADMAC). Numerosos ejemplos de tales materiales de encapsulación de alginato se describen en la solicitud de patente internacional WO 2012/101167 y las referencias citadas en esta solicitud internacional.

En realizaciones del presente método de liofilización de una célula encapsulada (o del método de preparación de una célula encapsulante para liofilización), las células encapsuladas se transfieren, después de al menos dos pasos de incubación consecutivos, a un medio de liofilización adecuado sin un paso intermedio de lavado. Por "etapa de lavado" se entiende en particular una etapa en la que las células incubadas se ponen en contacto con un tampón/medio de lavado que carece del crioprotector.

En otras realizaciones, las células encapsuladas, tales como las células bacterianas, se liofilizan en el medio de liofilización adecuado después de la última etapa de incubación. En estas realizaciones, el medio de liofilización también puede contener un crioprotector. En estas realizaciones, el medio de liofilización contiene el mismo crioprotector que la solución de incubación.

Los ejemplos de crioprotectores adecuados que se pueden usar en la etapa de congelación (que se puede llevar a cabo después del método de la presente invención) incluyen, entre otros, leche desnatada, glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO), formamida, una mezcla de formamida y DMSO, N-metilacetamida (MA), albúmina sérica, una mezcla de albúmina sérica con metanol, polivinilpirrolidona, propanodiol, propilenglicol, un carbohidrato y alginato, por mencionar nuevamente solo algunos ejemplos ilustrativos.

Los ejemplos de crioprotectores basados en carbohidratos adecuados incluyen, entre otros, sacarosa, glucosa mezclada con metanol, lactosa, trehalosa, raffinosa, dextrano, pectina, hidroxietilalmidón (HES) y sulfato de celulosa.

En realizaciones típicas de esta etapa de congelación, el medio de liofilización es una solución acuosa que contiene uno o más crioprotectores que se han elegido para la etapa de congelación.

De acuerdo con la descripción anterior, la presente invención también se dirige a una célula encapsulada liofilizada que se obtiene mediante un método como se describe en este documento. También se incluye en la invención una composición que comprende una célula encapsulada como se describe en el presente documento junto con un

vehículo adecuado. El vehículo puede ser cualquier vehículo convencional que, por ejemplo, se use en productos farmacéuticos, cosméticos o alimentos. Como se describe además en el presente documento, la composición puede ser un complemento alimenticio, una composición cosmética o una composición farmacéutica.

5 Los ejemplos de composiciones cosméticas en las que se puede incluir una célula encapsulada de la invención son composiciones tópicas tales como jabones (tanto líquidos como sólidos), lociones, maquillaje, cremas, geles de baño, sales de baño o champús. Ejemplos ilustrativos de tales composiciones incluyen células bacterianas probióticas tales como Lactobacillus, Bifidobacterium o Bacillus coagulans (por ejemplo, la cepa GanedenBC<sup>30®</sup> (Bacillus coagulans GBI-30, 6086 de Ganeden Biotec, Cleveland, Ohio, EE. UU.). Dicha composición cosmética, por ejemplo, se puede usar para mejorar la hidratación de la piel, la elasticidad, las bolsas de debajo de los ojos o para reducir las líneas finas y las arrugas en los humanos.

10 Si una célula encapsulada o una composición que contiene dicha célula encapsulada se usa como suplemento para alimentos, la comida puede ser, por ejemplo, un cereal o un producto a base de leche como yogur, cuajada, pudín, requesón, o suero de leche. Si se usa como aditivo para alimentos como yogur o pudín, una célula encapsulada o una composición que contiene una célula encapsulada se puede almacenar en un compartimento separado de un paquete de alimentos que contiene el alimento. Por ejemplo, el compartimento separado puede doblarse para permitir vaciar su contenido, es decir, células encapsuladas o una composición respectiva en el otro compartimento del envase de alimentos que se llena, por ejemplo, con yogur o pudín. El uso de un compartimento así separado permite agregar, por ejemplo, células probióticas encapsuladas a los alimentos solo antes de su consumo.

15 En línea con esta descripción, la invención también se dirige a diversos usos farmacéuticos o nutracéuticos. Dichos usos incluyen, entre otros, tratar o prevenir la diarrea, diarrea causada por antibióticos, artritis, obesidad, síndrome del intestino irritable, acidez estomacal, síndrome de fatiga crónica y otras formas de sufrir consecuencias por poseer una población bacteriana desequilibrada en el intestino. Para tales usos, las células encapsuladas o una composición que contiene tales células encapsuladas se administran a un sujeto, generalmente un mamífero como un humano o un animal doméstico o un animal de granja como gatos, perros, ovejas, vacas, cerdos, aves de corral o peces, por nombrar solo algunos ejemplos ilustrativos.

20 La presente invención se dirige además a una composición que es adecuada para la congelación de células encapsuladas. Dicha composición comprende leche desnatada, glicerol y un carbohidrato. Dicha composición comprende leche desnatada, glicerol y un carbohidrato, donde la leche desnatada está presente en una concentración de 3% (p/v) a 8% (p/v), el glicerol está presente en una concentración de 0.5% (p/v) al 2% (p/v) y el carbohidrato es trehalosa y está presente en una concentración del 5% (p/v) al 13% (p/v). Por lo tanto, esta composición puede ser una solución de congelación (o solución de criopreservación) que puede usarse en cualquier metodología de liofilización como se describe en este documento y como también se conoce en la técnica. Tal composición comprende así un vehículo para los crioprotectores (leche desnatada, glicerol y el carbohidrato trehalosa). El vehículo es típicamente agua (pura) o una solución acuosa que contiene sales, por ejemplo.

25 Se describe en este documento que el carbohidrato pueda ser, entre otros, sacarosa, glucosa mezcla con metanol, lactosa, trehalosa, rafinosa, dextrano, pectina, hidroxietilalmidón (HES), sulfato de celulosa y mezclas de estos carbohidratos. Se describe en este documento que el carbohidrato es sacarosa, lactosa, rafinosa o trehalosa.

30 La leche desnatada está presente en una concentración adecuada que proporcione suficiente protección de las células o células encapsuladas durante la congelación. De acuerdo con la presente invención, la leche desnatada está presente en una composición (solución de congelación) de la presente invención en una concentración de aproximadamente 3% (p/v) a aproximadamente 8% (p/v). En este contexto, se observa que la leche desnatada (también conocida como leche descremada) se usa en su significado regular para referirse a la leche que se obtiene cuando toda la nata (también llamada grasa de leche) se elimina de la leche entera. Cualquier leche desnatada/leche descremada que esté disponible puede usarse en una solución/composición de congelación de la presente invención. Típicamente, la leche desnatada en polvo se usa para la preparación de la composición de congelación de la presente invención. Por lo tanto, la concentración de la leche desnatada dada en este documento se denomina % en peso de leche desnatada en función del volumen de la solución de congelación.

35 También el glicerol puede estar presente en una composición de la presente invención en cualquier concentración adecuada que proporcione suficiente protección de las células o células encapsuladas durante la congelación, donde el glicerol está presente en una solución de 0,5 (p/v) a 2% (p/v).

Además, el carbohidrato trehalosa está presente en una composición de la presente invención en cualquier concentración adecuada que proporcione suficiente protección de las células o células encapsuladas durante la congelación, donde el carbohidrato trehalosa está presente en una concentración de 5% (p/v) a 13% (p/v).

40 Por tanto, en tal composición de la presente invención, la leche desnatada está presente en una concentración de 3% (p/v) a 8% (p/v), el glicerol está presente en una concentración de 0,5% (p/v) a 2% (p/v) y el carbohidrato es trehalosa y está presente en una concentración de 5% (p/v) a 13% (p/v). En una realización ilustrativa adicional, una composición de congelación de la invención contiene aproximadamente 5% (p/v) de leche desnatada, aproximadamente 1% (p/v) de glicerol y aproximadamente 10% (p/v) del carbohidrato. En aras de la ilustración, se

observa en este documento que dicha solución se puede preparar pesando 1 g de glicerol, 5 g de leche desnatada en polvo y 10 g de trehalosa en un dispositivo de medición graduado de 100 ml. Luego, el volumen de la solución se completa hasta 100 ml con agua estéril doblemente destilada.

5 En línea con la descripción anterior, una composición de la presente invención que contiene leche desnatada, glicerol y trehalosa puede ser un carbohidrato que puede usarse para la congelación de células encapsuladas como se describe en este documento. Sin embargo, dicha composición de la presente invención que contiene leche desnatada, glicerol y trehalosa como carbohidrato también se puede usar para preparar células encapsuladas para liofilización, lo que significa una incubación consecutiva de células encapsuladas con concentraciones crecientes de crioprotector como se describe en este documento. Por consiguiente, la presente invención también se dirige a un  
10 método para preparar células encapsuladas para su liofilización, en el que el método comprende al menos dos pasos de incubación consecutivos, donde las células encapsuladas se incuban en cada paso de incubación en una solución de incubación que contiene crioprotector durante un período de tiempo adecuado, donde la concentración de crioprotector en la solución de incubación se incrementa con cada paso de incubación posterior, donde las células encapsuladas son células bacterianas o células de levadura, y donde el método comprende incubar las  
15 células encapsuladas en una composición que comprende leche desnatada, glicerol y un carbohidrato, donde la leche desnatada está presente en una concentración del 3% (p/v) al 8% (p/v), el glicerol está presente en una concentración de 0,5% (p/v) a 2% (p/v) y el carbohidrato es trehalosa y está presente en una concentración de 5% (p/v) a 13% (p/v).

La invención se ilustrará a continuación adicionalmente mediante los siguientes ejemplos experimentales.

## 20 EJEMPLOS

Ejemplo 1: Liofilización con adición gradual de crioprotector a la solución de incubación

Datos experimentales:

25 Las bacterias probióticas *Lactobacillus acidophilus* se encapsularon, se liofilizaron, se rehidrataron y se evaluó su actividad metabólica como medida de viabilidad. Se analizó la integridad estructural de las cápsulas después de su liofilización y rehidratación.

Encapsulación bacteriana

30 Un cultivo bacteriano de *Lactobacillus acidophilus* a una densidad óptica de 1 OD a una longitud de onda de 600 nm se recogió y se encapsuló en sulfato de celulosa de sodio y cloruro de polial dialildimetilamonio (pDADMAC, también conocido bajo el nombre Gel8 en la Nomenclatura Internacional de los Ingredientes Cosméticos (INCI)). Las bacterias encapsuladas se cultivaron en medio de Man, Rogosa y Sharpe (MRS) a 37°C con agitación a 50 rpm.

Liofilización

35 Las bacterias encapsuladas y las bacterias libres se congelaron en un baño de etanol/hielo seco mediante la adición gradual de leche desnatada al 5%, glicerol al 1% o DMSO en agua estéril doblemente destilada como crioprotector y luego se almacenaron a -80°C. El medio de congelación para la bacteria libre es el mismo que para las bacterias encapsuladas, excepto que no se agrega de forma gradual.

Para las células bacterianas encapsuladas, se añadieron crioprotectores de manera gradual de la siguiente manera:

Procedimiento general (para "dilución en serie" de los medios de cultivo):

Usando un máximo de 1.000 cápsulas por ml de o cualquier múltiplo de las mismas, las cápsulas (que contienen las bacterias) se colocaron en un tubo falcon de 50 ml que contenía medio MRS nuevo.

40 A esta suspensión celular (solución de incubación), se añadieron 0,5 ml/ml del medio de congelación como crioprotector para producir un medio de congelación con una concentración del 50% del crioprotector (v/v). En términos ilustrativos, si el volumen total de la suspensión celular era de 1 ml, se eliminaban entonces 0,5 ml de medio y se agregaban 0,5 ml de medio de congelación para obtener una dilución al 50% de ambos). Las células encapsuladas se incubaban durante 25 minutos y luego se cambiaba 50% más (v/v) de la solución de incubación por  
45 medios de crioconservación (es decir, en el caso de un volumen total de 1 ml, luego se retiraban 0,5 ml y 0,5 ml de medio de congelación se añadían para producir una concentración del 75% (v/v) de los medios de congelación. La incubación se llevaba a cabo nuevamente durante 25 minutos antes de que en los pasos posteriores se reemplazara nuevamente el 50% de los medios de incubación por medios de congelación. En el último paso de incubación, el medio en las cápsulas era 100% de medio de congelación.

50 (A) Adición por pasos del crioprotector DMSO

16 cápsulas se colocaron en un tubo falcon de 50 ml que contenía 9 ml de medio MRS nuevo. A esta suspensión celular (solución de incubación), se añadieron 200 µl de DMSO como crioprotector para producir una concentración inicial de DMSO de aproximadamente 2% (v/v). Las células encapsuladas se incubaron durante 25 minutos y luego

se añadieron otros 200 µl de DMSO para producir una concentración de DMSO de aproximadamente 4,2% (v/v). La incubación se llevó a cabo nuevamente durante 25 minutos antes en 3 pasos posteriores, se agregaron 200 µl adicionales de DMSO para alcanzar una concentración final de DMSO del 10% (1 ml de DMSO en 10 ml de solución de incubación).

- 5 (B) Adición por etapas de una mezcla de leche desnatada/glicerol como crioprotector (5% de leche desnatada y 1% de glicerol en agua)

En este ejemplo, se colocaron 100 cápsulas grandes hechas a mano en un tubo falcon de 50 ml que contenía 9 ml de medio MRS nuevo. Se sacaron 5 ml del medio MRS del tubo falcon y se añadieron 5 ml de una solución de incubación que contenía leche desnatada como crioprotector (5% de leche desnatada (p/v) y 1% de glicerol (p/v) en agua) en los subsiguientes pasos de incubación consecutivos. En este experimento, se realizaron seis pasos de incubación, en los que la concentración del crioprotector se incrementó en un orden del 50%, 75%, 87,5%, 93,75%, 97% y 100%, lo que significa que en el último paso de incubación las células encapsuladas están en los medios de congelación. El período de incubación en cada paso, después de la adición del crioprotector de leche desnatada, fue de aproximadamente 25 minutos. Al final de cada etapa de incubación, las cápsulas se depositan por gravedad, permitiendo así que el medio de incubación se elimine mediante pipeteo. Después del último paso de incubación con leche desnatada al 5% (p/v) y glicerol al 1% (p/v) en agua, las bacterias encapsuladas congeladas y las bacterias libres se sometieron directamente a esta solución de congelación (es decir, sin ningún paso de lavado) a liofilización durante la noche. Para la liofilización, en primer lugar, las cápsulas más el 100% de medio de congelación se congelan rápidamente mediante un baño de etanol al 96%/hielo seco. El gránulo congelado rápidamente puede almacenarse a -80°C o enviarse a liofilizar inmediatamente. Cualquier máquina de liofilización puede usarse para el proceso de liofilización siguiendo las instrucciones del fabricante. Para los presentes experimentos, se utilizó el dispositivo Thermo Scientific ModulyoD-230. Los resultados de estos experimentos se muestran en la FIG. 1 a la fig. 9. Como se puede ver en las imágenes microscópicas de campo brillante de las cápsulas de la FIG. 1, la incubación consecutiva de las cápsulas en el método de la presente invención proporciona, después de la rehidratación, una encapsulación intacta y, por lo tanto, mejora la integridad estructural de la encapsulación. Ver a este respecto también las imágenes mostradas en la FIG. 4 y la FIG. 5 que muestran que las cápsulas de sulfato de celulosa que fueron tratadas usando una realización del método de la invención (usando concentraciones crecientes de leche desnatada en los pasos de incubación) y luego liofilizadas en nitrógeno líquido o en etanol/hielo seco mantienen su forma esférica original con superficie lisa después de la rehidratación, mientras que, como es evidente a partir de las imágenes mostradas en las FIGs. de 6 a 9, las cápsulas que se secaron por congelación en varios tampones sin crioprotector se dañaban o destruían en gran parte.

Además de mantener la integridad estructural de las cápsulas con las células contenidas en ellas, el método de liofilización de la invención también proporciona una tasa de supervivencia significativamente mayor de las células encapsuladas. La FIG. 2 muestra el efecto protector de las cápsulas (intactas) respecto a las bacterias probadas durante la liofilización, cuando se usa, en la preparación de la congelación, una solución de incubación que contiene cantidades crecientes de leche desnatada y glicerol como crioprotector. El efecto protector se examinó mediante una prueba de viabilidad que se realizó un día después de la liofilización después de la rehidratación de las bacterias liofilizadas. La viabilidad se comparó con células bacterianas recién encapsuladas como referencia y se expresó en % de viabilidad. Como se ilustra en la FIG. 2, después de someterse al método de liofilización de la invención, las cápsulas protegen a las bacterias de la liofilización (98% de viabilidad en bacterias encapsuladas en comparación con 25% de viabilidad en células libres), lo que significa que la viabilidad de las bacterias encapsuladas es significativamente mayor que la de bacterias libres.

La FIG. 3 muestra la comparación de las dos soluciones diferentes/de incubación utilizadas en el presente ejemplo (solución de incubación 1: medio MRS que contiene cantidades crecientes de DMSO como crioprotector, solución de incubación 2 que contiene cantidades crecientes de leche desnatada con respecto a la supervivencia de las bacterias durante la liofilización. Como se representa en la FIG. 3, la incubación con una concentración creciente de leche desnatada (además de tener glicerol, un crioprotector adicional) proporciona una tasa de supervivencia sin cambios en comparación con las células bacterianas recién encapsuladas que no se han liofilizado, mientras que el tratamiento de DMSO funciona pero es menos eficiente con una tasa de supervivencia de solo el 9%.

- 50 Ejemplo 2. Efecto de la trehalosa y la leche desnatada como crioprotector sobre la supervivencia del lactobacilo encapsulado en sulfato de celulosa sódica

En este ejemplo, la supervivencia de *Lactobacillus acidophilus* encapsulado liofilizado se probó con o sin trehalosa al 10% como un crioprotector suplementario cuando se almacena en condiciones ambientales. La solución de liofilización que también se usó para la etapa de incubación consecutiva fue una solución acuosa que contenía 5% de leche desnatada (p/v), 1% de glicerol (p/v) y 10% de trehalosa (p/v).

Detalles experimentales:

Un vial previamente congelado de la bacteria probiótica, *Lactobacillus acidophilus* se descongeló a -80°C y se agregaron 20 µl en 50 ml de medio MRS. Las bacterias se cultivaron posteriormente durante la noche a 37°C con una velocidad de agitación de 50 rpm. Al día siguiente, se determinó la densidad óptica del cultivo bacteriano a 600

nm ( $OD_{600}$ ) en un Tecan Infinite M200. Típicamente, una lectura de  $OD_{600}$  de 1 corresponde a cuando las bacterias están en la fase de crecimiento exponencial. La bacteria debe estar en la fase de crecimiento exponencial cuando se encapsula.

5 Para la encapsulación de la bacteria, se mezclaron 100  $\mu$ l de un cultivo bacteriano con una lectura de  $OD_{600}$  de 1 con 2 ml de sulfato de celulosa sódica al 1,8% que contenía cloruro de sodio al 0,9%. Se usaron una jeringa de 5 ml y una aguja 23G para el proceso de encapsulación. El cultivo de bacterias se mezcló con el sulfato de celulosa de sodio y se dejó caer en un baño de gelificación que contenía 150 ml de pDADMAC al 1,3% (24 kDa), cloruro de sodio al 0,9%. Las cápsulas se dejaron gelificar en el pDADMAC durante 4 minutos. Posteriormente, se añadieron 10 300 ml de 1  $\times$  solución salina tamponada con fosfato (PBS) y las cápsulas se lavaron durante 8 minutos. Luego se eliminaron 300 ml de la solución de lavado y se agregaron otros 400 ml de PBS y las cápsulas se lavaron durante 4 minutos adicionales. La solución de lavado se drenó y se realizaron 3 lavados adicionales de 100 ml con PBS y luego se lavaron 3 veces con 30 ml con MRS reciente. Las cápsulas se transfirieron luego a un matraz cónico de 250 ml con 100 ml de medio MRS nuevo. Estas cápsulas se cultivaron durante la noche a 37°C con una velocidad de agitación de 50 rpm.

15 Para las bacterias libres, 5 ml del cultivo nocturno de células de Lactobacillus a  $OD_{600} = 1$  se transfirieron a un tubo falcon de 15 ml y se centrifugaron a 3000 g durante 5 minutos. El sedimento bacteriano se volvió a suspender en 5 ml de medio de criopreservación (5% de leche desnatada (p/v), 1% de glicerol (p/v) en agua) con o sin 10% (p/v) de trehalosa. Las bacterias resuspendidas se dividieron en partes alícuotas en porciones de 10 x 0,5 ml en tubos halcón de 15 ml. Se colocaron 5  $\mu$ l de las células resuspendidas en cada uno de los 4 pocillos de una placa de 96 pocillos y se realizó un ensayo de Azul Alamar para determinar la actividad metabólica de las células bacterianas. Alamar 20 Blue® es un indicador comprobado de viabilidad celular que utiliza el poder reductor natural de las células vivas para convertir la resazurina en la molécula fluorescente, la resorufina. La resazurina, un colorante indicador no fluorescente, se convierte en resorufina roja fluorescente brillante a través de las reacciones de reducción de las células metabólicamente activas. La cantidad de fluorescencia producida es proporcional al número de células vivas. 25 Se añadieron 100  $\mu$ l de medio MRS nuevo y 10  $\mu$ l del reactivo Azul Alamar a la muestra bacteriana de 5  $\mu$ l y las muestras se incubaron a 37°C con una velocidad de agitación de 50 rpm durante 1 hora. La placa de ensayo Alamar Blue se leyó en un Tecan Infinite M200. El resto de las células bacterianas libres en los medios crioprotectores se congelan en etanol/baño de hielo seco y luego se almacenan a -80°C.

30 Después del cultivo durante la noche, las cápsulas que contenían bacterias se lavaron primero con 3 x 50 ml de medio MRS nuevo en el matraz de 250 ml y luego se colocaron en un tubo halcón de 15 ml con 10 ml de medio MRS nuevo. Se extrajeron 5 ml de medio MRS y se añadieron 5 ml de medio de criopreservación (como para bacterias libres) con o sin trehalosa al 10% (p/v). Las cápsulas se incubaron en esta suspensión durante 25 minutos, luego se retiraron 5 ml del medio y se reemplazaron con 5 ml de medio de criopreservación reciente (con o sin trehalosa al 10%, según corresponda). Este procedimiento se repitió 4 veces más, aumentando así la proporción de 35 medio de criopreservación del 50% después de la primera adición de medio de criopreservación al 98,5% finalmente. Posteriormente, se colocó 1 cápsula del medio en cada uno de los 4 pocillos de una placa de 96 pocillos y se realizó un ensayo de Azul Alamar para determinar el nivel de actividad metabólica de las células bacterianas en las cápsulas. Se añadieron 10  $\mu$ l de reactivo de Alamar Blue y 100  $\mu$ l de medio MRS nuevo a cada pocillo que contenía las cápsulas y las muestras se incubaron a 37°C con una velocidad de agitación de 50 rpm durante 1 hora. 40 La placa de ensayo Alamar Blue se leyó en un Tecan Infinite M200. Se colocaron 4 cápsulas del medio de criopreservación en tubos falcon de 15 ml con 500  $\mu$ l de solución acuosa de liofilización que contenía 5% de leche desnatada, 1% con o sin 10% de trehalosa (según corresponda). Estas cápsulas se congelaron luego en un baño de etanol/hielo seco y luego se almacenaron a -80°C.

45 Los tubos falcon que contenían bacterias libres o cápsulas con el crioprotector de leche desnatada con o sin trehalosa al 10% se liofilizaron durante la noche usando un liofilizador ThermoScientific Modulyo D-230. Para evaluar la supervivencia de las bacterias liofilizadas, en cada punto se rehidrataron muestras duplicadas de Lactobacillus liofilizado y Lactobacillus encapsulado utilizando 500  $\mu$ l de agua Millipore, o 5-10 ml de medio MRS, respectivamente, durante 5 minutos. Luego se realizó un ensayo de Alamar Blue en las cápsulas libres de Lactobacillus y Lactobacillus. El ensayo consistió en réplicas cuadruplicadas de cada una de las siguientes 50 condiciones para cada una de las muestras duplicadas:

1. Muestras control (100  $\mu$ l de medio MRS + 10  $\mu$ l azul de alamar)
2. Muestras de Lactobacillus libres liofilizadas con trehalosa (5  $\mu$ l de cultivo rehidratado + 100  $\mu$ l de medio MRS + 10  $\mu$ l de azul Alamar)
3. Muestras de Lactobacillus libres liofilizadas sin trehalosa (5  $\mu$ l de cultivo rehidratado + 100  $\mu$ l de medio MRS + 10 55  $\mu$ l de azul Alamar)
4. Muestras de bacterias encapsuladas liofilizadas con trehalosa (1 cápsula por pocillo + 100  $\mu$ l de medio MRS + 10  $\mu$ l azul de alamar)

5. Muestras de bacterias encapsuladas liofilizadas sin trehalosa (1 cápsula por pocillo + 100 µl de medio MRS + 10 µl azul de alamar)

Las muestras se incubaron a 37°C con una velocidad de agitación de 50 rpm durante 1 hora. La placa de ensayo Alamar Blue se leyó en un Tecan Infinite M200. Los puntos en que las muestras se rehidrataron fueron en las semanas 1, 2, 3, 4, 6, 7 y 8 después de la liofilización para evaluar la viabilidad de las bacterias después de la criopreservación con 5% de leche desnatada, 1% de glicerol y con o sin trehalosa al 10% a temperatura ambiente durante un período de 2 meses después de la liofilización.

Los resultados de este experimento se muestran en la FIG. 10. Cada punto de datos en la FIG. 10 representa el promedio de muestras duplicadas liofilizadas (cada muestra analizada por cuadruplicado) con dos excepciones: bacterias libres con 10% de trehalosa en la semana 6 y bacterias encapsuladas con 10% de trehalosa en la semana 8 donde, en ambos casos, una muestra del duplicado se degradó por completo (el motivo no está claro) y no se ha incluido. La tasa de supervivencia se determinó en unidades fluorescentes relativas (RFU). Como se puede ver en la FIG. 10, el método de liofilización de la invención en el que las células bacterianas encapsuladas se incuban consecutivamente en una solución que contiene concentraciones crecientes del medio de congelación (que contiene 5% de leche desnatada, 1% de glicerol, 10% de trehalosa) como crioprotector proporciona una tasa de supervivencia de más del 60% de las células y, por lo tanto, una mejora significativa en la tasa de supervivencia de las células libres. Si bien esta tasa de supervivencia de más del 60% se logró durante un período de almacenamiento de dos semanas para el tratamiento de las células con concentraciones crecientes de leche desnatada solamente, la adición de trehalosa en una concentración del 10% (p/v) logró mantener esta significativamente mayor tasa de supervivencia durante todo el período de prueba de 8 semanas, lo que significa extender la vida útil de las cápsulas/células encapsuladas. Este resultado también muestra que el método de la invención y las células encapsuladas liofilizadas que se pueden obtener mediante este método tienen perspectivas prometedoras para aplicaciones comerciales para células tales como células probióticas (pero también otras células) para las cuales las células se almacenan durante un cierto período de tiempo hasta su uso.

Ejemplo 3. Liofilización de *Lactobacillus casei* encapsulado utilizando una composición que comprende leche desnatada, trehalosa y glicerol como crioprotector

Un vial previamente congelado de la bacteria probiótica, *Lactobacillus casei*, se descongeló a -80°C y se agregaron 20 µl en 50 ml de medio MRS. Las bacterias se cultivaron posteriormente durante la noche a 37°C con una velocidad de agitación de 50 rpm. Al día siguiente, se determinó la densidad óptica del cultivo bacteriano a 600 nm (OD<sub>600</sub>) en un Tecan Infinite M200. Típicamente, una lectura de OD<sub>600</sub> de 1 corresponde a cuando las bacterias están en la fase de crecimiento exponencial. La bacteria debe estar en la fase de crecimiento exponencial cuando se encapsula.

Para la encapsulación de la bacteria, se mezclaron 100 µl de un cultivo bacteriano con una lectura de OD<sub>600</sub> de 1 con 2 ml de sulfato de celulosa sódica al 1,8% que contenía cloruro de sodio al 0,9%. Se usaron una jeringa de 5 ml y una aguja 23G para el proceso de encapsulación. El cultivo de bacterias se mezcló con el sulfato de celulosa de sodio y se dejó caer en un baño de gelificación que contenía 150 ml de pDADMAC al 1,3% (24 kDa), cloruro de sodio al 0,9%. Las cápsulas se dejaron gelificar en el pDADMAC durante 4 minutos. Posteriormente, se añadieron 300 ml de 1 × solución salina tamponada con fosfato (PBS) y las cápsulas se lavaron durante 8 minutos. Luego se eliminaron 300 ml de la solución de lavado y se agregaron otros 400 ml de PBS y las cápsulas se lavaron durante 4 minutos adicionales. La solución de lavado se drenó y se realizaron 3 lavados adicionales de 100 ml con PBS y luego se lavaron 3 veces con 30 ml con MRS reciente. Las cápsulas se transfirieron luego a un matraz cónico de 250 ml con 100 ml de medio MRS nuevo. Estas cápsulas se cultivaron durante la noche a 37°C con una velocidad de agitación de 50 rpm.

Después del cultivo nocturno, las cápsulas que contenían bacterias se lavaron primero con 3 x 50 ml de medio MRS nuevo en el matraz de 250 ml y luego se colocaron en un tubo Falcon de 15 ml con 10 ml de medio MRS nuevo. Se extrajeron 5 ml de medio MRS y se añadieron 5 ml de medio de criopreservación con (5% de leche desnatada (p/v), 1% de glicerol (p/v), 10% (p/v) de trehalosa en agua). Las cápsulas se incubaron en esta suspensión durante 25 minutos, luego se retiraron 5 ml del medio y se reemplazaron con 5 ml de medio de criopreservación reciente. Este procedimiento se repitió 4 veces más, aumentando así la proporción de medio de criopreservación del 50% después de la primera adición del medio de criopreservación al 98,5% finalmente.

Finalmente, las cápsulas del medio de criopreservación se colocaron en tubos falcon de 15 ml con 500 µl de solución acuosa de liofilización que contenía 5% de leche desnatada, 1% de glicerol y 10% de trehalosa. Estas cápsulas se congelaron luego en un baño de etanol/hielo seco y luego se almacenaron a -80°C.

Como se puede ver en la FIG. 11A a 11C que muestran las células encapsuladas antes y después de la encapsulación (la figura 11A muestra cápsulas de *Lactobacillus casei* inmediatamente después de la encapsulación, la figura 11B muestra cápsulas de *Lactobacillus casei* un día después de la encapsulación antes de la liofilización, y la figura 11C muestra cápsulas de *Lactobacillus casei* liofilizadas y rehidratadas), las cápsulas de *Lactobacillus casei* parecían estar intactas después de la liofilización, lo que significa que no se vieron afectadas por la liofilización.

Además del examen visual, se comprobó la viabilidad de la bacteria *Lactobacillus casei* encapsulada antes de la liofilización y después de la liofilización como se explicó anteriormente en el Ejemplo 2. Como se puede ver en la FIG. 12, el resultado del mismo muestra que la viabilidad de la bacteria *Lactobacillus casei* se vio afectada por la liofilización, lo que significa que se recogió la viabilidad completa después de la liofilización. Por lo tanto, el Ejemplo 3 confirma la efectividad y la idoneidad del método de liofilización y la composición respectiva de la presente invención.

Ejemplo 4. Liofilización de *Bifidobacterium infantis longum* encapsulado usando una composición que comprende leche desnatada, trehalosa y glicerol como crioprotector

*Bifidobacterium infantis longum* son un ejemplo de bacterias anaerobias estrictas. Por lo tanto, las células se cultivaron en condiciones anaeróbicas en medio MRS, a 37°C y 50 rpm durante la noche. Gaspak (BD) se usó para crear un ambiente anaeróbico estricto durante el cultivo.

Después del cultivo, las bifidobacterias se encapsularon usando sulfato de celulosa de sodio como se describe en los ejemplos 2 y 3, sin embargo, en condiciones anaeróbicas. Después del cultivo nocturno, las cápsulas que contenían bacterias se lavaron primero con 3 x 50 ml de medio MRS nuevo en el matraz de 250 ml y luego se colocaron en un tubo falcon de 15 ml con 10 ml de medio MRS nuevo. Se extrajeron 5 ml de medio MRS y se añadieron 5 ml de medio de crioconservación con (5% de leche desnatada (p/v), 1% de glicerol (p/v), 10% (p/v) de trehalosa en agua). Las cápsulas se incubaron en esta suspensión durante 25 minutos, luego se retiraron 5 ml del medio y se reemplazaron con 5 ml de medio de crioconservación reciente. Este procedimiento se repitió 4 veces más, aumentando así la proporción de medio de crioconservación del 50% después de la primera adición de medio de crioconservación al 98,5% finalmente.

Finalmente, las cápsulas del medio de crioconservación se colocaron en tubos falcon de 15 ml con 500 µl de solución acuosa de liofilización que contenía 5% de leche desnatada, 1% de glicerol y 10% de trehalosa. Estas cápsulas se congelaron luego en un baño de etanol/hielo seco y luego se almacenaron a -80°C.

Como se puede ver en la FIG. 13 que muestra las células encapsuladas antes y después de la encapsulación (la figura 13A muestra las cápsulas un día después de la encapsulación antes de la liofilización, y la figura 13B muestra las cápsulas de *Bifidobacterium infantis longum* liofilizadas rehidratadas), las cápsulas *Bifidobacterium infantis longum* parecían estar ligeramente menos intactas después de la liofilización.

Además del examen visual, se verificó la viabilidad de la bacteria encapsulada *Bifidobacterium infantis* antes de la liofilización y después de la liofilización como se explicó anteriormente en el Ejemplo 2. Como se puede ver en la FIG. 14, la viabilidad de *Bifidobacterium infantis longum* se vio afectada de alguna manera por la liofilización, como la FIG. 14 muestra que aproximadamente el 50% de las bacterias eran viables después de la liofilización. Sin embargo, se cree que la viabilidad de la bacteria *Bifidobacterium infantis* libre (no encapsulada) será mucho menor. Además, se puede esperar una mayor viabilidad debido a que las cápsulas se secan perfectamente durante el proceso de liofilización. Por lo tanto, también el Ejemplo 4 confirma la efectividad y la idoneidad del método de liofilización y una composición respectiva de la presente invención.

## REIVINDICACIONES

1. Un método de liofilización de células encapsuladas, comprendiendo el método al menos dos pasos de incubación consecutivos, en el que las células encapsuladas se incuban en cada paso de incubación en una solución de incubación que contiene crioprotector durante un período de tiempo adecuado, en el que la concentración de crioprotector en la solución de incubación se incrementa con cada etapa de incubación posterior, en donde las células encapsuladas son células bacterianas o células de levadura, y en donde el crioprotector es una mezcla de leche desnatada, glicerol y un carbohidrato, donde la leche desnatada está presente en una concentración del 3% (p/v) a 8% (p/v), el glicerol está presente en una concentración de 0,5% (p/v) a 2% (p/v) y el carbohidrato es trehalosa y está presente en una concentración de 5% (p/v) al 13% (p/v).
2. El método de la reivindicación 1, que comprende 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 pasos de incubación, en el que en cada paso de incubación se incrementa la concentración del crioprotector.
3. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que se usa el mismo crioprotector en cada etapa de incubación.
4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que las células de levadura se seleccionan del grupo que consiste en *Saccharomyces*, *Debaryomyces*, *Candida*, *Pichia* y *Torulopsis*.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que las células bacterianas se seleccionan del grupo que consiste en *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Fusobacterium*, *Melissococcus*, *Propionibacterium*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Staphylococcus*, *Peptostreptococcus*, *Bacillus*, *Pediococcus*, *Micrococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Aerococcus*, *Oenococcus*, *Geobacillus* y *Lactobacillus*.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde las células son células probióticas, preferiblemente donde las células probióticas se seleccionan del grupo que consiste en *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bifidobacterium angulatum*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium longum*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus alimentarius*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus casei* Shirota, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus farciminus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus lacti*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus pentosaceus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus* (*Lactobacillus* GG), *Lactobacillus sake*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactococcus lactis*, *Micrococcus varians*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus halophilus*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus thermophilus*, *Staphylococcus carnosus* y *Staphylococcus xylosus*.
7. Un método para preparar células encapsuladas para la liofilización, comprendiendo el método al menos dos pasos de incubación consecutivos, en el que las células encapsuladas se incuban en cada paso de incubación en una solución de incubación que contiene crioprotector durante un período de tiempo adecuado, en el que la concentración del crioprotector en la solución de incubación aumenta con cada etapa de incubación posterior, donde las células encapsuladas son células bacterianas o células de levadura, y donde el método comprende incubar las células encapsuladas en una composición que comprende leche desnatada, glicerol y un carbohidrato, en donde está presente la leche desnatada en una concentración de 3% (p/v) a 8% (p/v), el glicerol está presente en una concentración de 0,5% (p/v) a 2% (p/v) y el carbohidrato es trehalosa y está presente en una concentración del 5% (p/v) al 13% (p/v).
8. El método de la reivindicación 7, en el que las células de levadura se seleccionan del grupo que consiste en *Saccharomyces*, *Debaryomyces*, *Candida*, *Pichia* y *Torulopsis*.
9. El método de la reivindicación 7, en el que las células bacterianas se seleccionan del grupo que consiste en *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Fusobacterium*, *Melissococcus*, *Propionibacterium*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Staphylococcus*, *Peptostreptococcus*, *Bacillus*, *Pediococcus*, *Micrococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Aerococcus*, *Oenococcus*, *Geobacillus* y *Lactobacillus*.
10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en donde las células son células probióticas, preferiblemente en donde las células probióticas se seleccionan del grupo que consiste en *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bifidobacterium angulatum*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium longum*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus alimentarius*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus casei* Shirota, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus farciminus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus lacti*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus pentosaceus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus* (*Lactobacillus* GG), *Lactobacillus sake*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactococcus lactis*, *Micrococcus varians*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus halophilus*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus thermophilus*, *Staphylococcus carnosus*, y *Staphylococcus xylosus*.

11. Una composición adecuada para congelar células encapsuladas, comprendiendo la composición leche desnatada, glicerol y un carbohidrato, donde la leche desnatada está presente en una concentración del 3% (p/v) al 8% (p/v), el glicerol está presente en una concentración del 0,5% (p/v) al 2% (p/v) y el carbohidrato es trehalosa y está presente en una concentración del 5% (p/v) al 13% (p/v).
- 5 12. El uso de una composición como se define en la reivindicación 11 para la congelación de células encapsuladas, donde las células encapsuladas son células bacterianas o células de levadura.
13. El uso de la reivindicación 12, en el que las células de levadura se seleccionan del grupo que consiste en *Saccharomyces*, *Debaryomyces*, *Candida*, *Pichia* y *Torulopsis*.
- 10 14. El uso de la reivindicación 12, en el que las células bacterianas se seleccionan del grupo que consiste en *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Fusobacterium*, *Melissococcus*, *Propionibacterium*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Staphylococcus*, *Peptostreptococcus*, *Bacillus*, *Pediococcus*, *Micrococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Aerococcus*, *Oenococcus*, *Geobacillus* y *Lactobacillus*.
- 15 15. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, en donde las células son células probióticas, preferiblemente en donde las células probióticas se seleccionan del grupo que consiste en *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bifidobacterium angulatum*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium longum*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus alimentarius*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus casei* Shirota, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus farciminus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus lacti*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus pentosaceus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus* (*Lactobacillus* GG), *Lactobacillus sake*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactococcus lactis*, *Micrococcus varians*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus halophilus*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus thermophilus*, *Staphylococcus carnosus*, y *Staphylococcus xylosus*.
- 20

25

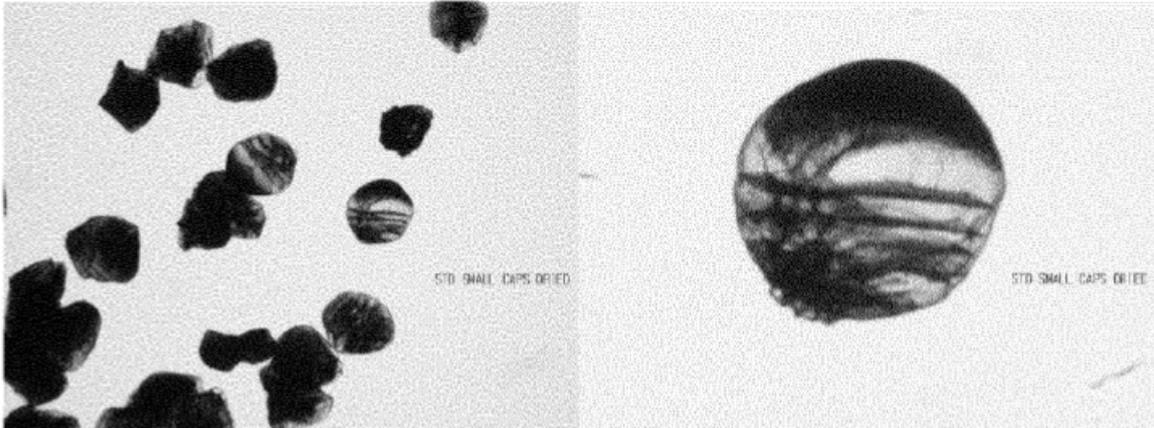


Fig. 1

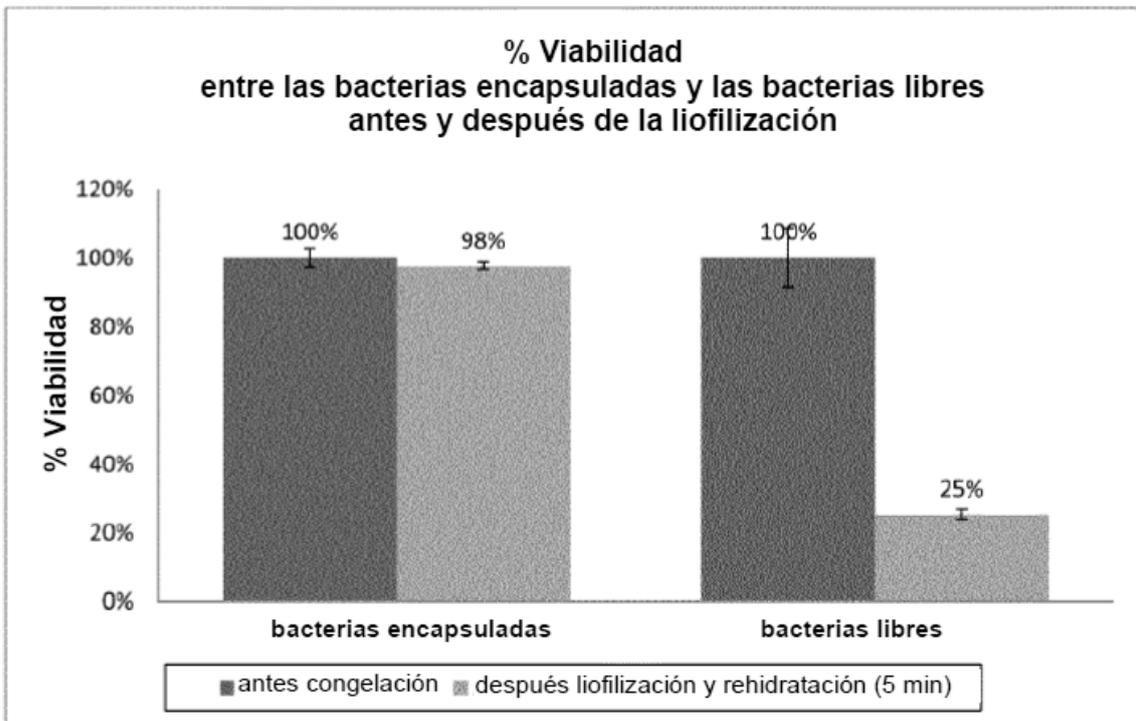
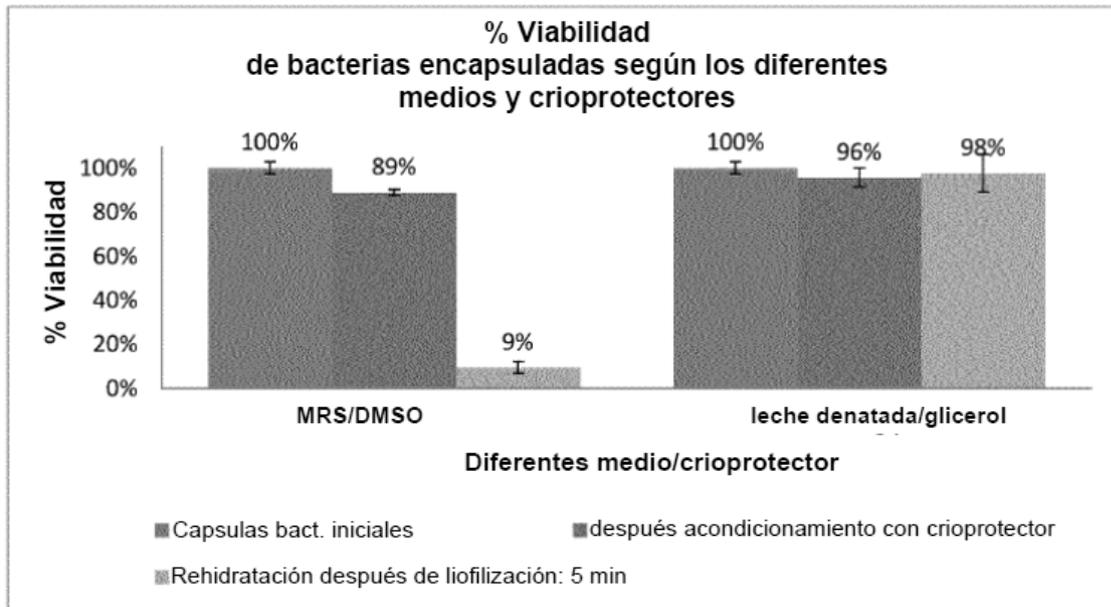
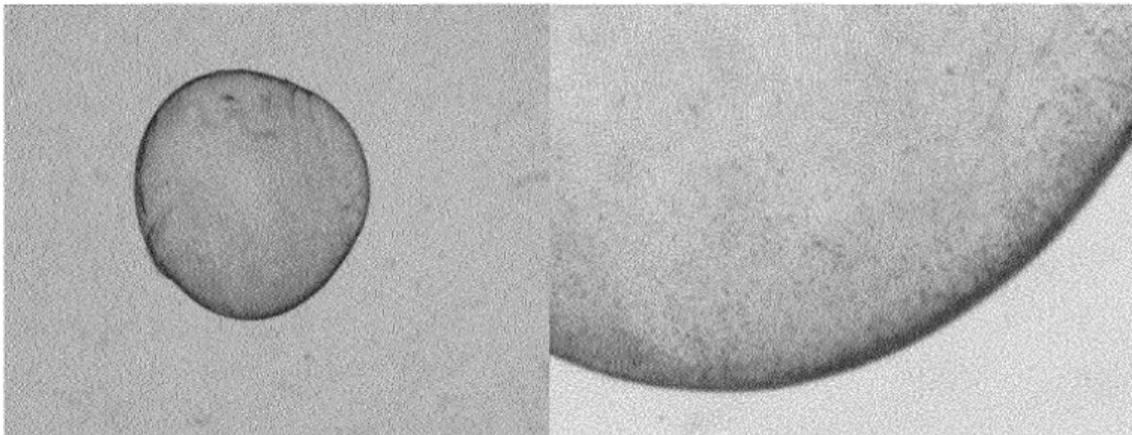


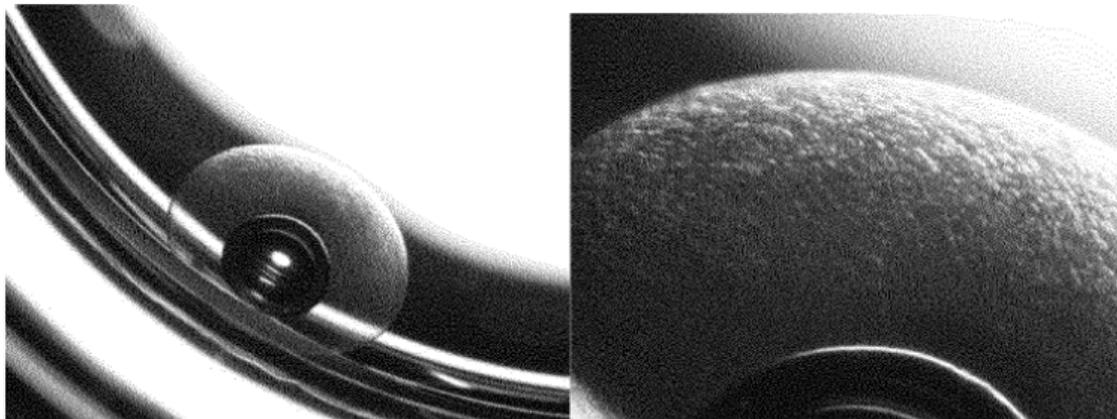
Fig. 2



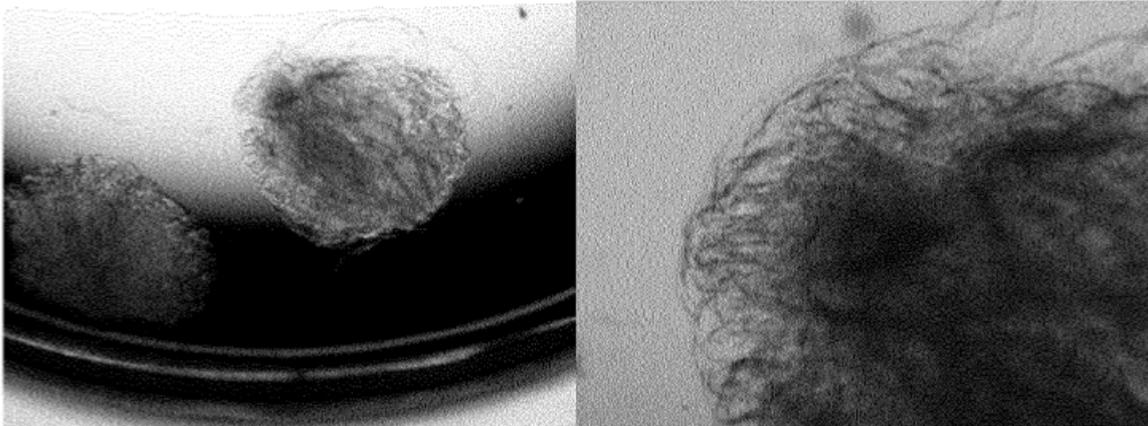
**Fig. 3**



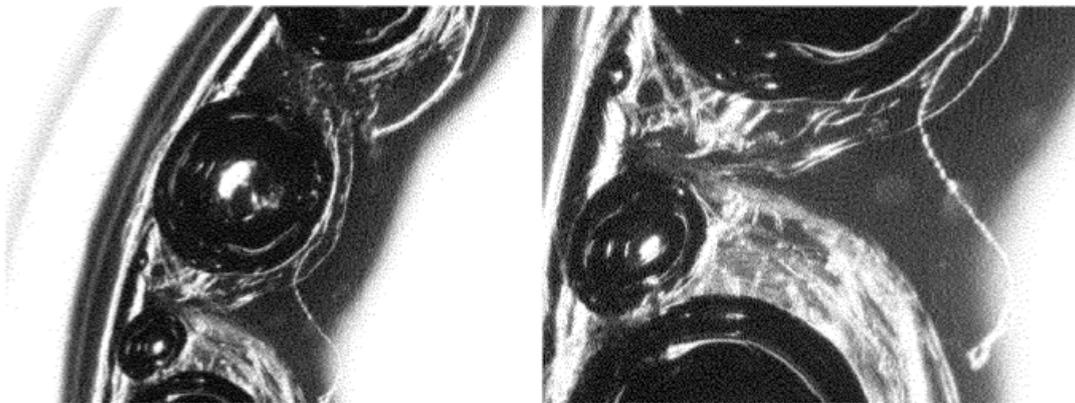
**Fig. 4**



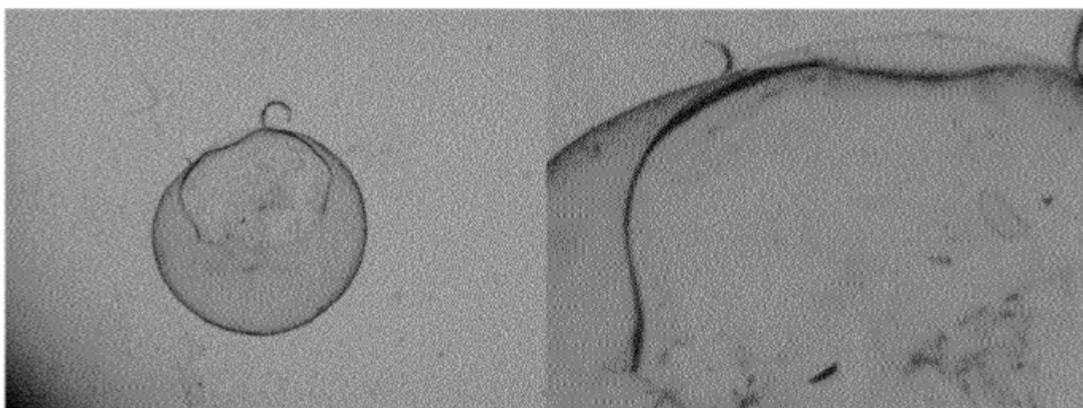
**Fig. 5**



**Fig. 6**



**Fig. 7**



**Fig. 8**

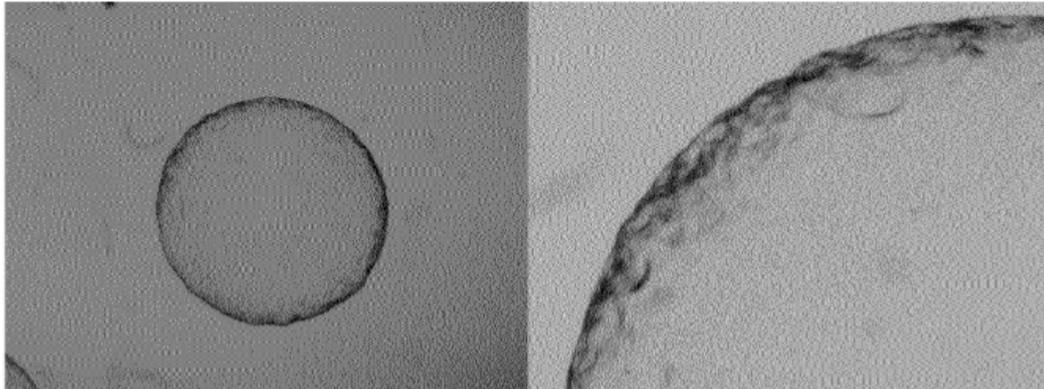


Fig. 9

**Gráfica que muestra la comparación de la supervivencia de *L. acidophilus* libre o encapsulado con o sin trehalosa**

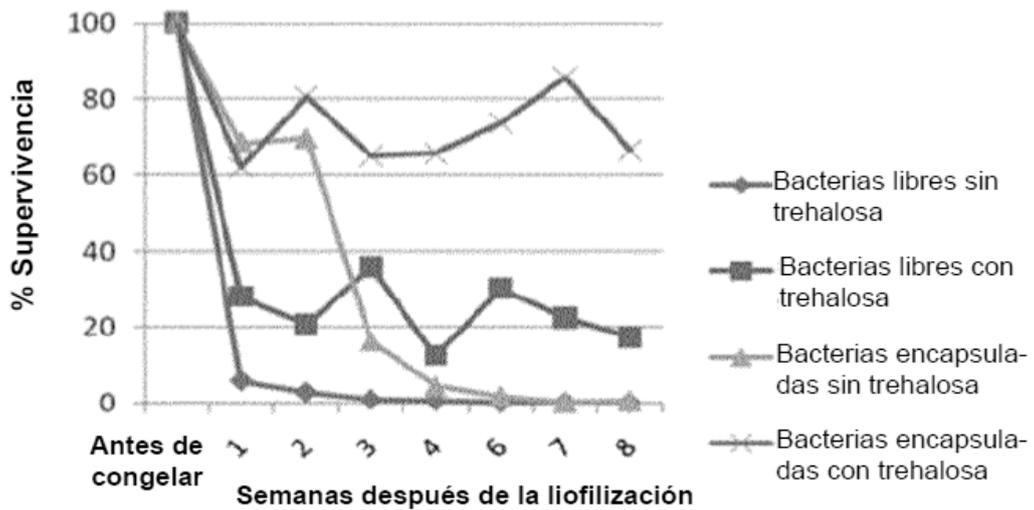
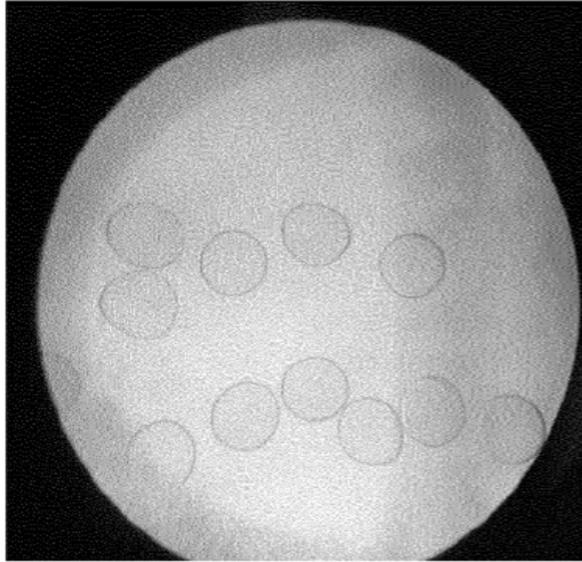
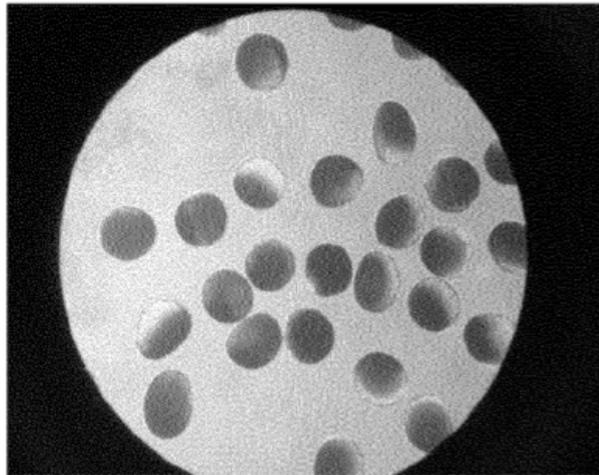


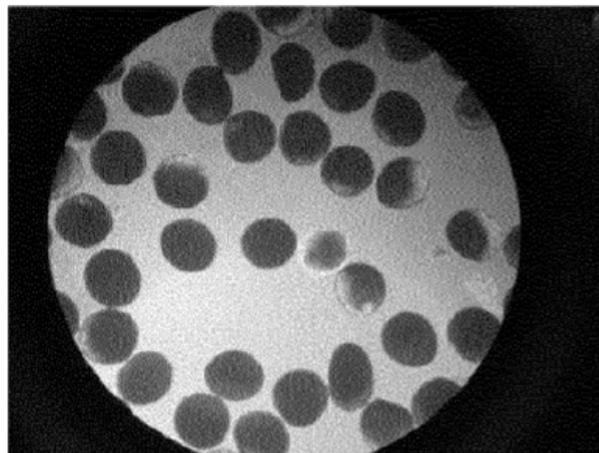
Fig. 10



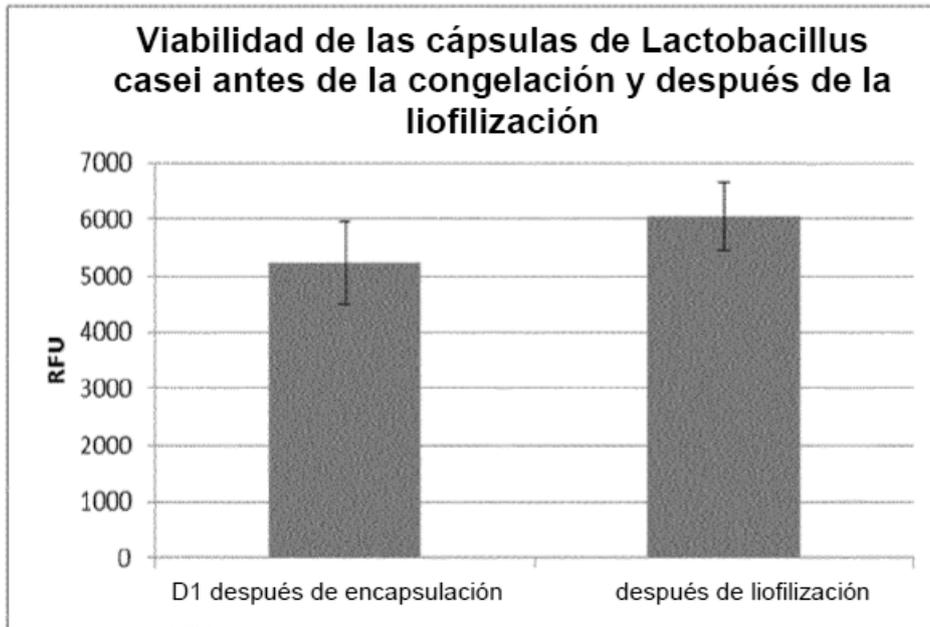
**Fig. 11A**



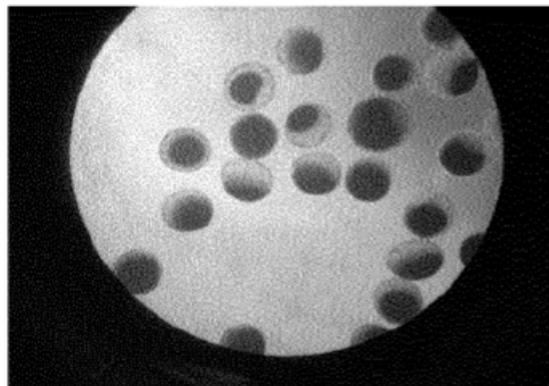
**Fig. 11B**



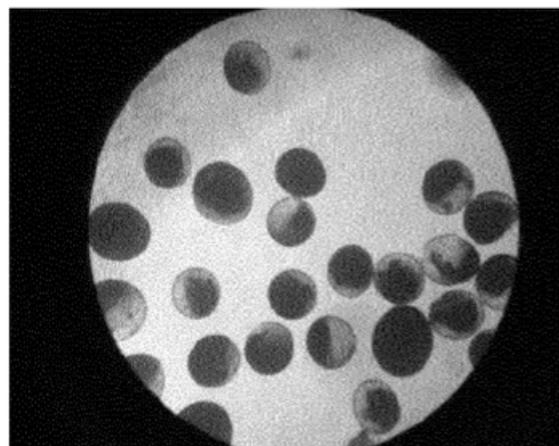
**Fig. 11C**



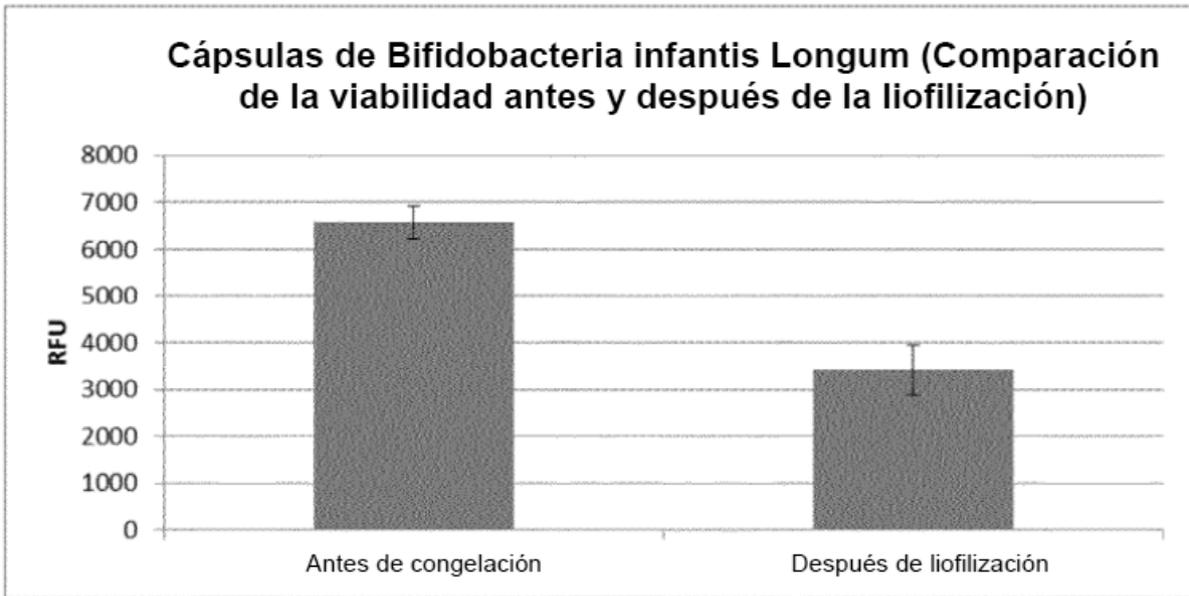
**Fig. 12**



**Fig. 13A**



**Fig. 13B**



**Fig. 14**