



**República Federativa do Brasil**  
Ministério da Indústria, Comércio Exterior  
e Serviços  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(11) BR 112013003244-8 B1**

**(22) Data do Depósito:** 12/08/2011

**(45) Data de Concessão:** 17/07/2018



---

**(54) Título:** COMPOSIÇÃO SECA ESTABILIZANTE PARA MATERIAL BIOLÓGICO, SEU MÉTODO DE PREPARAÇÃO, E FORMULAÇÃO DE CARREAMENTO ORAL

**(51) Int.Cl.:** A23L 3/40; A23L 3/3463; C12N 1/00; C12N 7/01

**(30) Prioridade Unionista:** 13/08/2010 US 61/373,711

**(73) Titular(es):** ADVANCED BIONUTRITION CORPORATION

**(72) Inventor(es):** MOTI HAREL; QIONG TANG

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**COMPOSIÇÃO SECA ESTABILIZANTE PARA MATERIAL BIOLÓGICO, SEU MÉTODO DE PREPARAÇÃO, E FORMULAÇÕES DE CARREAMENTO ORAL**".

REFERÊNCIA CRUZADA AOS PEDIDOS DE PATENTE RELACIONADOS

[001] O presente pedido de patente reivindica prioridade ao Pedido de Patente Provisório U.S. No. : 61/373.711 depositado no escritório de Patentes e Marcas dos Estados Unidos, em 13 de Agosto de 2010, cujo conteúdo é incorporado na presente invenção por referência para todos os fins

ANTECEDENTES DA PRESENTE INVENÇÃO

Campo da presente invenção

[002] A presente invenção refere-se a estabilização de materiais biológicos em uma estrutura vítrea a seco.

Técnica Relacionada

[003] A preservação da estrutura e a função dos materiais biológicos durante o armazenamento de longo prazo a alta temperatura e a umidade é de importância fundamental para as indústrias de alimentos, nutracêuticos e farmacêuticos. Os materiais biológicos sensíveis, tais como proteínas, enzimas, células, bactérias e vírus tem frequentemente de ser preservado para armazenamento a longo prazo para uso posterior. A congelação simples é muitas vezes feita quando a secagem é prejudicial ou inadequada ou no produto final. Para a preservação no estado seco – secagem por congelação tem sido tradicionalmente o método mais comum. Outros métodos, tais como o ambiente de secagem ao ar, secagem sob vácuo a temperaturas ambientes (secagem por vácuo) ou secagem por meio do contato de uma névoa fina de gotículas com ar quente (secagem por atomização) e secagem por meio da dessecação não são geralmente adequados para os bioativos

sensíveis, tais como bactérias e vírus vivas ou atenuadas. As elevadas temperaturas de secagem usadas nestes métodos resultam em danos significativos para o bioativo propriamente dito.

[004] Muitas vezes, o processo de secagem por congelação pode resultar em perda significativa de atividade e de danos para o agente bioativo devido à formação de cristais de gelo durante o processo de secagem lenta.

[005] A secagem por congelação combina a tensões devidas tanto ao congelamento e secagem. A etapa de congelação deste processo pode ter efeitos indesejáveis, tais como a desnaturação de proteínas e enzimas e a ruptura de células. Os danos causados por meio do congelamento podem ser contornados, até um certo grau, através da adição de compostos ou agentes crioprotetores na solução. Tais agentes protetores são, em geral, produtos químicos altamente solúveis que são adicionados a uma formulação para proteger as membranas celulares e proteínas durante o congelamento e para aumentar a estabilidade durante o armazenamento. Os estabilizadores mais comuns incluem açúcares tais como sacarose, trealose, glicerol, sorbitol ou, em concentrações elevadas (Morgan et al, 2006, Capela et al, 2006). Os dissacarídeos, tais como sacarose e trealose, são crioprotetores naturais com boas propriedades de proteção. A trealose é um crioprotetor particularmente atrativo porque foi realmente isolado a partir de plantas e organismos vivos que permanecem em um estado de animação suspenso durante os períodos de seca. A trealose tem mostrado ser um protetor eficaz para uma variedade de materiais biológicos, (vide Crowe, JH, 1983). Várias patentes descrevem a utilização de trealose, ou de trealose em combinação com outros agentes crioprotetores para proteger as proteínas e outras macromoléculas biológicas, tais como enzimas, o soro de complemento, soro, anticorpos, antigênicos, proteínas fluorescentes e componentes de vacina durante o con-

gelamento, secagem e re-hidratação (Patente U.S. No. 5.556.771).

[006] No entanto, existem algumas desvantagens associadas com a utilização de trealose ou outros dissacarídeos ou monossacarídeos como o único crioprotetor. A trealose não pode penetrar de forma adequada na célula para proteger os componentes ativos dentro do volume intracelular, o que pode conduzir a instabilidade durante a armazenagem das substâncias criodessecadas. Além disso, as concentrações de trealose maior do que 60% em peso de um dado meio de preservação são por vezes necessárias. Um problema ainda mais sério associado com a utilização de trealose é que os materiais biológicos preservados utilizando trealose por si só não são estáveis em armazenagem durante períodos de tempo prolongados, especialmente os armazenados a temperaturas elevadas e / ou em ambientes úmidos. Por conseguinte, continua a ser um desafio importante para o desenvolvimento de uma formulação otimizada e processo de secagem, que minimiza as perdas de secagem ao conseguir a estabilidade de armazenamento adequada do material seco.

[007] Alguns dos problemas associados com a trealose e o processo de secagem por meio da congelação foram resolvidos por meio de uma combinação de certas formulações e secagem sob vácuo em um estado vítreo, particularmente vidros de açúcar (Patente U.S. No. 6.190.701). Naquelas formulações, o agente bioativo é protegido no interior de uma matriz vítrea contra ambientes hostis tais como temperaturas elevadas e umidade. No entanto, nessas formulações, na presença de água, como a umidade no ambiente atua como um agente plastificante e tem o efeito de baixar a temperatura de transição vítrea (Tg) da matriz vítrea. No maior teor de água, a Tg é significativamente reduzida à medida que a formulação seca está no estado indesejável de borracha ou de plástico à temperatura ambiente.

[008] As vantagens de retenção sob a forma de vidro de formula-

ção incluem o aumento da estabilidade física do sólido e a redução de reações intermoleculares deletérias. Uma discussão detalhada da química física das interações água-polímero como alimentos relacionados com o estado vítreo e às temperaturas de transição podem ser encontrados em M. Le meste, et al. 2002. No entanto, as limitações dos sistemas amorfos, tais como a instabilidade física e reatividade química maior, atua como um obstáculo na sua comercialização extensiva.

[009] Dessa maneira, existe uma necessidade para uma composição de estabilização que é útil para a ampla gama de materiais biológicos. A necessidade adicional existe para uma composição de estabilização, que pode ser eficazmente utilizada em ambos os processos de secagem por meio congelamento e os processos de secagem que envolvam o ambiente de temperatura de secagem. Há também uma necessidade de uma mistura de composição que é menos dispendiosa do que as presentemente a ser utilizadas. Finalmente, e mais importante, existe uma necessidade de uma mistura de composição que fornece meios estáveis para preservação de materiais biológicos durante períodos de tempo prolongados a temperaturas elevadas e diferentes graus de umidade, que podem ser encontradas durante o transporte e armazenagem dos materiais, enquanto ainda mantém um quantidade significativa de atividade após re-hidratação.

[0010] Todas estas necessidades são satisfeitas por meio da mistura da composição, métodos de secagem, resultando nas composições de material biológico preservado da presente invenção.

#### SUMÁRIO DA PRESENTE INVENÇÃO

[0011] A presente invenção refere-se as composições e métodos de secagem para preservar os materiais bioativos sensíveis, tais como peptídeos, proteínas, hormonas, ácidos nucleicos, anticorpos, vacinas, fármacos, leveduras, bactérias probióticas (ou de outra forma), vírus e

/ ou suspensões de células, em armazenamento.

[0012] A composição da presente invenção refere-se a uma mistura de carboidratos de di-, oligo- e polissacarídeos e íons de ácido orgânico, de preferência ácido cítrico e / ou ácido ascórbico. A formulação é preparada por meio da dispersão de todos os componentes sólidos em solução. A solução é congelada por meios conhecidos na técnica tal como nitrogênio líquido ou gelo seco, com a finalidade de formar grânulos pequenos, cordas ou gotículas. As contas congeladas podem ser armazenadas em um congelador de profundidade (entre -30°C e -80°C) para utilização posterior em estado congelado ou colocadas em tabuleiros em um estado congelado para secagem em um secador por congelação convencional. O método de secagem preferido é opcionalmente iniciado por uma etapa de purga curta e estabilizar a estrutura das partículas congeladas sob uma pressão de vácuo de menos do que  $< 0,26$  KPa (2000 mTorr) seguido por meio de uma etapa de secagem primária, sob pressão de vácuo de mais do que  $> 0,26$  (2000mTorr) e a uma temperatura desejada. Durante a etapa final e secundária de secagem do material, uma pressão de vácuo total e temperatura elevada são aplicados, para conseguir uma atividade de água final desejável do material seco.

[0013] Em uma modalidade particular, o material biológico compreende as bactérias vivas (por exemplo, bactérias probióticas). Exemplos de microorganismos adequados incluem, mas não estão limitados a, leveduras tais como *Saccharomyces*, *Debaromyces*, *Candida*, *Pichia* e *Torulopsis*, fungos tais como *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Penicillium* e *Torulopsis* e bactérias tais como o gênero *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Fusobacterium*, *Melissococcus*, *Propionibacterium*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Kocuriaw*, *Staphylococcus*, *Peptostreptococcus*, *Bacillus*, *Pediococcus*, *Micrococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Aerococcus*, *Oenococcus* e *Lactobacillus*. Exem-

plos específicos de microorganismos probióticos adequados seriam representados por meio das seguintes espécies e incluem todos os biotipos de cultura dentro destas espécies : *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *Bacillus coagulans*, *B. lentus*, *B. licheniformis*, *B. mesentericus*, *B. punzilius*, *B. subtilis*, *B. natto*, *Bacteroides amylophilus*, *Bac. capillosus*, *Bac. ruminicola*, *Bac. suis*, *Bifidobacterium adolescentis*, *B. animalis*, *B. breve*, *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. lactis*, *B. longum*, *B. pseudolongum*, *B. thermophilum*, *Candida pintolepesii*, *Clostridium butyricunz*, *Enterococcus cremoris*, *E. diacetylactis*, *E faecium*, *E. intermedius*, *E. lactis*, *E. muntidi*, *E. thermophilus*, *Escherichia coli*, *Kluyveromyces fragilis*, *Latobacillus acidophilus*, *L. alimentarius*, *L. amylovorus*, *L. crispatus*, *L. brevis*, *L. L. caso 4 curvatus*, *L. cellobiosus*, *L. delbrueckii ss. bulgaricus*, *L farciminis*, *L. fermentum*, *L. gasseri*, *L. helveticus*, *L. lactis*, *L. plantarum*, *L. johnsonii*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *L. sakei*, *L. salivarius*, *Leuconostoc mesenteroides*, *P. cereviseae (damnosus)*, *Pediococcus acidilactici*, *P. pentosaceus*, *Propionibacterium freudenreichii*, *Prop shermanii*, *Saccharomyces cereviseae*, *Staphylococcus carnosus*, *Staph. xylosus*, *Streptococcus infantarius*, *Strep. ss salivarius. thermophilus*, *Strep. Thermophilus* e *Strep. lactis*.

[0014] Em uma modalidade, a formulação compreende uma mistura de carboidratos di-, oligo- e poli-sacarídeos, nas quais o material bioativo está incorporado. Os exemplos de um polissacarídeo adequado, incluem, mas não se limitam a, ftalato de acetato de celulose (CAP), carbóxi-metil-celulose, pectina, alginato de sódio, sais de ácido algínico, hidroxil propil metil celulose (HPMC), metil celulose, carreegmina, goma de gelano, goma de guar, goma de acácia, goma de xantana, goma de alfarroba, quitosano e derivados de quitosano, de colagênio, ácido poliglicólico, amidos e amidos modificados. Exemplos de um oligossacarídeo adequados, incluem, mas não se limitam as ciclodextrinas, inulina, FOS, maltodextrinas, dextranos, etc, e as combina-

ções dos mesmos. Exemplos de um dissacarídeo apropriado, incluem, mas não estão limitados a, lactose, trealose, sacarose, etc. Em uma modalidade particular, o polissacarídeo preferido é o alginato de sódio ou goma de gelano. De preferência, a mistura de carboidratos compreende, em porcentagem em peso, de matéria seca total, os 0,1 a 10 % de polissacarídeos, 1 a 10 % de oligossacarídeos, 10 a 90 % de dissacarídeos. Em uma modalidade adicional, a mistura de carboidratos compreende di-, oligo- e poli-sacarídeos em uma proporção em peso de 10 : 0.1 a 4 : 0.1 a 2 e, mais preferivelmente, em que a proporção em peso de dissacarídeos / oligossacarídeos / polissacarídeos é de cerca 10 : 0.2 : 0.1 a cerca de 10 : 0.2 : 0.1.

[0015] Em ainda outra modalidade da presente invenção, os polisacarídeos na mistura de carboidratos são reticulados com íons bivalentes de metais com a finalidade de formar um hidrogel firme.

[0016] Em outra modalidade, a composição compreende as quantidades significativas de compostos de intensificadores de vidro, incluindo os sais de ácidos orgânicos tais como ácido láctico, ácido ascórbico, ácido maleico, ácido oxálico, ácido malônico, ácido málico, ácido succínico, ácido cítrico, ácido glucônico, ácido glutâmico, e similares. Os sais podem incluir cátions tais como sódio, potássio, cálcio, magnésio, e similares. Os exemplos incluem o citrato de sódio, lactato de sódio, maleato de sódio, gluconato de magnésio, ascorbato de sódio, e similares. Os sais com elevada temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) e alta solubilidade são preferidos. O ácido orgânico mais preferido é ácido cítrico e os sais dos mesmos (por exemplo, sódio ou citrato de potássio, citrato trissódico desidratado) e ácido ascórbico e sais dos mesmos (por exemplo, ascorbato de sódio, ascorbato de potássio, ascorbato de magnésio). A quantidade total preferida de citrato ou ascorbato de íons na composição seca é tal que a proporção molar de íons para mols de compostos de carboidratos é de cerca de 0,01 a cerca de



0,3 e ainda mais preferivelmente de cerca de 0,1 a cerca de 0,2.

[0017] Outros intensificadores de vidro úteis incluem proteínas, hidrolisados de proteínas, polipeptidos e aminoácidos. Estes incluem gelatina, albumina, proteína de soro de proteína de soja, caseína, caseinato, imunoglobulinas, proteínas de soja, proteína de ervilha, proteína de semente de algodão ou de outros produtos alimentares e as proteínas do leite ou vegetais e / ou hidrolisados dos mesmos. Exemplos de ácidos poliamino incluem polialanina, poliarginina, poliglicina, ácido poliglutâmico e similares. Os aminoácidos úteis incluem lisina, glicina, alanina, arginina ou histidina, bem como aminoácidos hidrofóbicos (triptofano, tirosina, leucina, fenilalanina, etc) e uma metilamina tal como a betaína. A quantidade total preferida de proteínas, hidrolisados de proteínas e aminoácidos na composição seca é de cerca de 1 % a cerca de 30 % da massa total dos carboidratos e mistura o mais preferível de cerca de 5 % a cerca de 20 % da massa de carboidratos. Idealmente, os compostos que são geralmente reconhecido como compostos seguros (GRAS) têm preferência sobre aqueles que não são GRAS.

[0018] Deve notar-se que a quantidade apropriada dos intensificadores de vidro na composição pode depender das características desejadas da composição seca. A determinação da quantidade apropriada de intensificadores de vidro deve ser feita de acordo com as condições de armazenamento desejadas. Por exemplo, uma composição contendo mistura de carboidratos e proteínas ou hidrolisados de proteínas pode ser usada com a finalidade de melhorar a estabilidade química de um material biológico, enquanto está a ser armazenado sob condições de temperatura e umidade relativa suave, tal como 25°C e 25 % de HR. Os íons de citrato podem ser preferidos incluir o intensificador de vidro para obter benefício adicional de estabilizar a temperatura mais elevada e da exposição a umidade. Alternativamente, pode ser o

caso de uma combinação de citrato e / ou ascorbato de íons com um outro potenciador de vidro, tais como proteínas ou hidrolisados de proteínas, é o mais preferido para compor a composição.

[0019] O processo preferido de mistura do material biológico e da composição é através da adição da mistura de composição seca total de uma cultura ou de concentrado de solução de meio contendo material biológico. A massa do peso do material biológico no meio de cultura é, tipicamente, entre cerca de 5 % e 30 % p / v, e mais preferivelmente entre cerca de 10 % e 20 % p / v da a massa em peso adicional de composição da mistura no meio de cultura é, tipicamente, entre cerca de 10 % e cerca de 60 %, e mais preferivelmente entre cerca de 20 % e 40 %. O teor final de sólidos na pasta fluida mista é de cerca de 20 % a cerca de 60 % e, mais especificamente desde cerca de 30 % a cerca de 50 %. De preferência, a solução é misturada à temperatura ambiente ou ligeiramente aquecida com a finalidade de ajudar na solubilização dos materiais na solução viscosa (por exemplo, a partir de 20°C a 40°C). Em uma variação da presente invenção, a quantidade total da mistura de carboidratos da formulação é ajustada para atingir uma formulação de viscosidade desejada e densidade que permitiu uma secagem eficiente, evitando a formação de borracha ou excessiva formação de espuma que pode ocorrer durante a etapa de secagem. A viscosidade da pasta fluida preferida é de cerca de 1000 cP a cerca de 500.000 cP, e mais preferido é o intervalo desde cerca de 10.000 até cerca de 300.000 cP cP. A viscosidade desejada e da densidade da pasta fluida final pode ser conseguida por meio de quaisquer meios conhecidos na técnica, por exemplo, ajustando levemente a quantidade de polissacarídeos na mistura de carboidratos ou por meio da desgasificação ou injeção de gás, tal como ar, nitrogênio, dióxido de carbono, argônio etc

[0020] A pasta fluida de material biológico do presente invento é

tipicamente snap-congelado a entre  $-30^{\circ}\text{C}$  a  $-180^{\circ}\text{C}$ , mais preferivelmente, a formulação é snap-congelado em nitrogênio líquido por pulverização, gotas ou injetáveis em banho de nitrogênio líquido . Recolha das partículas, grânulos, cordas ou gotículas a partir do banho de nitrogênio líquido e secagem em um secador por congelação ou secador de vácuo, ou, alternativamente, armazenando-a em um congelador (entre  $-30^{\circ}\text{C}$  e  $-80^{\circ}\text{C}$ ) para posterior utilização em um congelada forma ou até a secagem.

[0021] Em geral, as técnicas do processo de secagem que são úteis incluem a secagem por atomização; secagem por congelação seguida de moagem a micronizar o pó; congelação em uma superfície fria, seguida por sublimação e recolha do pó micronizado ; secagem evaporativa de uma solução não congelada em uma estufa de vácuo ou evaporador centrífugo a temperaturas acima da temperatura de congelação da pasta fluida ( $-20$  a  $50^{\circ}\text{C}$ ), seguida por moagem de tamanho de partícula desejável. As partículas em pó resultantes são vítreas ou cristalinas internamente com a maior parte do revestimento de material vítreo sobre a superfície. A vantagem do revestimento do material biológico com materiais vítreos é aumentar a estabilidade física do produto e a redução de reações deletérias intermoleculares dentro da partícula. Em uma modalidade preferida, as partículas congeladas são carregadas em bandejas e imediatamente transferidas para uma câmara de secagem sob vácuo em que os rendimentos do processo de secagem em três fases principais que incluem : (1) Uma etapa da estrutura de estabilização de purga opcional, curta das partículas congeladas sob um vácuo pressão de menos do que  $< 0,26$  KPa (2000mTorr), (2) uma etapa de secagem primária, sob pressão de vácuo de mais do que  $> 0,26$  KPa (2000 mTorr) e a uma temperatura acima do ponto de congelação da mistura, e (3) etapa secundária e secagem final do material vítreo amorfo sob pressão de vácuo total e a

temperatura elevada durante um tempo suficiente para reduzir a atividade da água da formulação em pó para 0,3 ou menos Aw.

[0022] A composição seca e estável biológica pode ser utilizada de uma maneira direta, como um floco, ou moído em pó e peneirado até um tamanho de partícula médio de cerca de 10 µm a cerca de 1000 µm. A formulação pode ser administrada de uma maneira direta a um animal, incluindo o homem, como um pó concentrado, tal como um líquido reconstituído, (por exemplo, de bebidas), ou pode ser incorporado quer na forma de pó ou de flocos para um alimento ou produto alimentar.

[0023] Estas e outras vantagens e características da presente invenção serão descritas mais completamente em uma descrição detalhada das modalidades preferidas que se segue.

#### BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0024] A Figura 1 mostra a estabilidade de aceleração de bactérias probióticas e bactérias probióticas disponíveis comercialmente na composição seca da presente invenção.

[0025] A figura 2 mostra o efeito de várias proporções molares entre os intensificadores de vidro e a mistura de carboidratos na composição na estabilidade probiótica (*L. paracasei*) sob condições de armazenagem aceleradas (37°C e 33 % de RH ).

[0026] A Figura 3 mostra o efeito da composição da presente invenção sobre a estabilidade de armazenamento do que as bactérias probióticas *L. acidophilus*. A estabilidade das bactérias probióticas seca foi testada em condições de armazenagem aceleradas de 24°C e 33 % de RH durante 537 dias.

[0027] A Figura 4 mostra o efeito de vários compostos intensificadores de vidro sobre a estabilidade de armazenamento do que as bactérias probióticas *L. acidophilus*. A estabilidade das bactérias probióticas seca foi testada em condições de armazenagem aceleradas de

24°C e 43 % de RH durante 180 dias.

[0028] A Figura 5 mostra o efeito de várias proteínas de proporções de hidrolisado / açúcar sobre a estabilidade de armazenamento (35°C e 43 % de RH) das bactérias probióticas *Bifidobacterium lactis*.

[0029] A Figura 6 mostra a otimização de pH para a estabilidade máxima do probiótico *L. Rhainnosus* (Condições de aceleração de armazenamento a 40°C e 33 % HR durante 8 semanas).

### DESCRIÇÃO DETALHADA DA PRESENTE INVENÇÃO

#### DEFINIÇÕES

[0030] É para ser compreendido que a terminologia utilizada na presente invenção é para o propósito de descrever apenas as modalidades particulares, e não se destina a ser limitativa. Tal como utilizado no presente relatório descritivo e nas reivindicações em anexo, as formas singulares "a", "um" e "o" incluem os referentes plurais a menos que o conteúdo dite claramente de outra forma. Dessa maneira, por exemplo, a referência a "uma proteína" inclui proteínas singulares ou uma combinação de duas ou mais proteínas, referência a "enzima", "bactéria", etc, inclui singular ou misturas de vários tipos, e similares.

[0031] Na descrição e reivindicações da presente invenção, a seguinte terminologia será utilizada de acordo com as definições estabelecidas abaixo.

[0032] Os termos "material biológico", "composição biológica", ou "formulação bioativa" refere-se a preparações que estão em uma forma tal como para permitir que a atividade biológica dos ingredientes bioativos ou agentes para ser inequivocamente eficaz.

[0033] O termo "intensificador de vidro" é um composto químico com a capacidade de formar a estrutura amorfa ou vítrea abaixo de uma temperatura crítica, a temperatura de transição vítrea (Tg). Se um potenciador de vidro é seco abaixo da sua Tg, o vidro irá ser formado. No entanto, se o intensificador de vidro é seco acima da sua Tg, em

seguida, o vidro não se forma. Durante a formação da estrutura vítrea, a substância biológica pode tornar-se incorporada dentro da estrutura do vidro. Os intensificadores de vidro adequados para utilização com a presente invenção incluem, mas não estão limitados a, os sais de ácidos orgânicos tais como ácido láctico, ácido ascórbico, ácido maleico, ácido oxálico, ácido malônico, ácido málico, ácido succínico, ácido cítrico, ácido glucônico, ácido glutâmico, e similares. Os sais podem incluir cátions tais como sódio, potássio, magnésio, cálcio, fosfato e similares. Outros intensificadores de vidro úteis incluem proteínas, hidrolisados de proteínas, polipeptídeos e aminoácidos. A combinação de agentes formadores de vidro também é contemplada dentro de uma única composição. O processo usado para obter uma estrutura vítrea para os efeitos da presente invenção é geralmente uma sublimação do solvente e / ou a técnica de evaporação. Idealmente, os compostos que são compostos GRAS são preferidos em relação aqueles que não são GRAS.

[0034] O termo "carboidratos" ou "composto poli-hidróxi" refere-se a sacarídeos principalmente constituídos por carbono, oxigênio e hidrogênio. Um sacarídeo é tipicamente composto por uma cadeia principal de unidades de repetição de açúcar estruturais ligadas em forma linear ou não linear, algumas das quais contêm positivamente ou negativamente os grupos químicos carregados. As unidades de repetição podem variar de dois a vários milhões. Os sacarídeos úteis incluem a redução e a não redução de açúcares e álcoois de açúcar, dissacarídeos, oligossacarídeos, polissacarídeos solúveis em água e os derivados dos mesmos. Dois monossacarídeos ligados em conjunto, formam um dissacarídeo. Os dois monossacarídeos utilizados com a finalidade de formar um dissacarídeo pode ser o mesmo ou diferente. Exemplos de dissacarídeos que podem ser utilizados na mistura de carboidratos da presente invenção incluem, sacarose, trealose, lactose, maltose,

isomaltose. Os dissacarídeos sulfatados podem também ser usados. O pequeno número de monossacarídeos ligados em conjunto (tipicamente 3 a 10) formam um oligossacarídeo. Os monossacarídeos utilizados com a finalidade de formar um oligossacarídeo podem ser os mesmos ou diferentes componentes de açúcares. Exemplos de oligossacarídeos adequados para utilização incluem, inulina, maltodextrinas, dextrans, fruto-oligossacarídeos (FOS), galacto-oligossacarídeos (GOS), manana-oligossacarídeos (MOS) e as combinações dos mesmos. Grande número de monossacarídeos ligados em conjunto (tipicamente mais do que 10), formam um polissacarídeo. Os monossacarídeos utilizados com a finalidade de formar um polissacarídeo podem ser os mesmos ou diferentes componentes de açúcares. Os exemplos de polissacarídeos adequados para utilização incluem, mas não estão limitados a, hidroxipropilcelulose, metilcelulose, hidroxietilcelulose, e hipromelose, amidos solúveis ou frações de amido, goma xantana, goma de guar, pectinas, carragenina, galactomanano, goma de gelano, incluindo quaisquer derivados destes, acetato ftalato de celulose (CAP), carboxi-metil-celulose, alginato de sódio, sais de ácido algínico, hidroxipropil propil metil celulose (HPMC), goma de acácia, goma de alfarroba, quitosano e derivados de quitosano, de colagênio, ácido poliglicólico, amidos e amidos modificados e ciclodextrinas.

[0035] Uma formulação "estável" ou a composição é uma em que o material biologicamente ativo a partir dos mesmos essencialmente retém a sua estabilidade física, a estabilidade química e / ou atividade biológica após armazenamento. A estabilidade pode ser medida a uma condição de temperatura e umidade, selecionada por um período de tempo selecionado. A análise de tendência pode ser utilizada para estimar uma vida útil esperada antes de um material ter sido realmente em armazenamento para esse período de tempo. Para bactérias vivas, por exemplo, a estabilidade é definida como o tempo que demora a

perder um log de CFU / g de formulação seca, em condições pré-definidas de período de temperatura, umidade e tempo.

[0036] O termo "viabilidade" no que diz respeito a bactérias, refere-se à capacidade de formar uma colônia (CFU ou unidade formadoras de colônias) em um meio nutriente apropriado para o crescimento das bactérias. A viabilidade, em relação aos vírus, refere-se à capacidade de infectar e se reproduzir em uma célula hospedeira adequada, resultando na formação de uma placa sobre uma camada de células hospedeiras.

[0037] O termo "ambiente" ou condições a temperatura ambiente são aquelas em qualquer dado momento em um dado ambiente. Tipicamente, a temperatura ambiente do ambiente é 22 a 25°C, à pressão atmosférica ambiente, e a umidade ambiente é facilmente mensurável e variará de acordo com a época do ano, o tempo e as condições climáticas, altitude, etc

[0038] O termo "atividade de água" ou "Aw", no contexto das composições de formulação em pó, refere-se a disponibilidade de água, e representa o estado de energia da água de um sistema. É definida como a pressão de vapor de água acima de uma amostra dividida pelo que a da água pura à mesma temperatura. A água destilada pura tem uma atividade de água de exatamente um ou  $A_w = 1,0$ .

[0039] O termo "umidade relativa" ou "HR" no contexto da estabilidade durante o armazenamento refere-se à quantidade de vapor de água no ar, a uma dada temperatura. A umidade relativa é geralmente menor do que a necessária para saturar o ar e expressa em porcentagem de umidade de saturação.

[0040] O termo "a seco" e as variações dos mesmos referem-se a um estado físico que está desidratado ou anidro, líquido, ou seja substancialmente inexistente. Inclui, por exemplo, secagem, secagem por atomização, secagem em leito fluidizado, secagem por congelamento e



secagem a vácuo.

[0041] O termo "liofilização" ou secagem por congelação refere-se à preparação de uma composição seca em forma de uma congelação rápida e desidratação no estado congelado (por vezes referido como sublimação). A secagem por congelação é realizada a uma temperatura que resulta na cristalização dos polímeros. Este processo pode realizar-se sob vácuo, a uma pressão suficiente para manter o produto congelado, de preferência inferior a cerca de  $< 0,26$  KPa (2000mTorr).

[0042] O termo "secagem primária" ou "secagem líquida", no que diz respeito aos processos descritos no presente documento, refere-se à secagem de desidratação que ocorre a partir do momento da descongelação das partículas congeladas para o ponto onde começa as secagens secundárias. Tipicamente, a maior parte da secagem primária é realizada por meio da evaporação extensiva, enquanto que a temperatura do produto manteve-se significativamente mais baixas do que as temperaturas da fonte de calor. Este processo pode realizar-se sob vácuo, a uma pressão suficiente para manter o produto descongelado, de preferência superior a cerca de  $> 0,26$  KPa (2000 mTorr).

[0043] O termo "secagem secundária", no que diz respeito aos processos descritos na presente invenção, refere-se a um etapa de secagem que tem lugar a temperaturas superiores a temperaturas de congelação da formulação e perto da temperatura da fonte de calor. Este processo pode realizar-se sob vácuo, a uma pressão suficiente para reduzir a atividade da água de uma formulação, de preferência menos de cerca de  $< 0,13$  KPa (1000mTorr). Em um processo de formulação típica de secagem, uma etapa de secagem secundária reduz a atividade da água da formulação a um nível de  $A_w$  de 0,3 ou menos.

[0044] As composições e os métodos de secagem da presente invenção resolvem o problema de proporcionar um custo eficaz e industrialmente escalável das formulações congeladas ou secas conten-

do materiais bioativos sensíveis, tais como peptídeos, proteínas, hormonas, ácidos nucleicos, anticorpos, fármacos, vacinas, levedura, bactérias, vírus e / ou suspensões de células, com um tempo de vida significativamente prolongada, no estado seco. A presente invenção proporciona uma composição e um método de preservação de secagem que compreende um material biológico rodeado por uma estrutura vítrea amorfa de compostos altamente solúveis. O processo de congelamento e secagem compreende: a mistura do material biológico e a composição de uma pasta líquida, congelação snap da referida composição da pasta em nitrogênio líquido com a finalidade de formar gotículas, cordas ou contas, de purgar as partículas congeladas sob alto vácuo, seguido por meio da secagem do material bioativo, em uma formação de vidro de açúcar por meio da evaporação da umidade sob um regime de pressão reduzida enquanto o fornecimento de calor à composição.

[0045] A presente invenção é baseada na descoberta notável de que os materiais biológicos podem ser protegidos na estrutura vítrea, enquanto retendo a atividade substancial. Quando o material biológico é combinado com a mistura de composição e seco sob vácuo, de acordo com a presente invenção uma estabilidade superior foi realizada durante tempo prolongado de exposição à temperatura e as condições de umidade dura. A presente invenção inclui as composições que contêm um material biológico, uma mistura de carboidratos solúveis e de vidro aumentando os sais de ácidos carboxílicos. As composições da presente invenção são inerentemente diferentes na sua estrutura física e a função das composições não-viscosas ou concentradas açucaradas que foram simplesmente secos sob um processo de secagem típico. Por exemplo, a Patente U.S. No. 6.919.172 descreve uma composição em pó na forma de aerossol para administração pulmonar, a qual contém uma mistura de carboidratos diferentes e citrato de sódio.

No entanto, a composição descrita na patente de invenção não tem o composto adicional protéico que é essencial para a estabilidade e para a formação de uma estrutura desejável física durante a secagem de soluções com alta concentração de açúcares. A composição descrita nesta patente também carece de viscosidade ou estrutura de hidrogel, o que permite uma secagem eficiente de solução descongelada ou descongelada para a formação de vidro reforçada. Em contraste, o processo de composição e de secagem da presente invenção ultrapassa todos estes problemas simultaneamente, atingindo uma estabilidade superior do material biológico.

[0046] A estrutura vítrea reforçada foi geralmente conseguida na técnica anterior por meio da formação de espuma ou por meio da ebulição da solução sob vácuo, a fim de facilitar a secagem eficaz. A etapa de formação de espuma, geralmente resultou em uma extensa ebulição e erupção da solução que é uma consequência inevitável da secagem de uma solução não congelada, e, como resultado, apenas uma capacidade de carga muito baixa de solução em um frasco ou um recipiente pode ser conseguida (vide, por exemplo, Patente U.S. No. 6.534.087, em que a espessura da espuma final, o produto é inferior a 2 mm). As composições e os métodos de secagem da presente invenção evitam a formação de espuma e de ebulição da formulação permitindo a carga muito mais elevada de material de secagem por zona e, como resultado, pode ser facilmente dimensionado para a produção de grandes quantidades de material, sem a utilização de vasos e bandejas ou equipamentos especificamente projetados.

[0047] Uma ampla variedade de materiais biológicos pode ser utilizada com a composição da presente invenção com a finalidade de formar o meio de preservação aquoso da presente invenção. Este meio de preservação pode então ser submetido aos processos de secagem da presente invenção para fazer um pó seco estável de materi-

al biológico. Estes materiais biológicos, incluem, sem limitação: enzimas, tais como enzimas pancreáticas, lipases, amilases, proteases, fitase, lactato desidrogenase ; proteínas, tais como insulina ; vacinas ; vírus, tais como adenovírus, células, incluindo células procarióticas (incluindo bactérias) e células eucarióticas, outros materiais biológicos, incluindo fármacos, ácidos nucleicos e vesículas de lipídeos.

[0048] As bactérias probióticas têm sido mostrados para beneficiar particularmente a partir das composições e os métodos de secagem da presente invenção. O pó seco estável probiótico é preparado de acordo com as composições e métodos da presente invenção, incluindo as misturas frescas, congeladas ou secas culturas de bactérias probióticas com uma mistura de carboidratos e de vidro, melhorando os compostos congelação de encaixe a formulação viscosa em nitrogênio líquido, com a finalidade de formar gotas sólidas congeladas, cordas ou grânulos, e secagem a vácuo inicialmente por meio da aplicação de pressão de vácuo suficiente para purgar e estabilizar a estrutura das partículas congeladas, aumentando a temperatura de formulação acima da temperatura de congelação e fornecimento de uma fonte de calor de 20°C e mais elevada a fim de facilitar a remoção da água primária . Mantendo a temperatura da formulação acima do ponto de congelação, pode ser realizado ajustando a pressão de vácuo e por meio da condução de calor para a formulação. Para completar o processo de secagem e reduzir ainda mais a atividade da água da formulação abaixo de  $A_w$  de 0,3 ou inferior, uma etapa de secagem secundária é aplicada a pressão de vácuo máximo e a temperatura elevada de até 70°C. Tal composição pode manter-se estável em condições de armazenamento adversas, tais como 40°C e 33 % HR durante 60 dias ou mais.

#### Preparação das composições

[0049] A composição para a preparação de pó congelado ou seco

estável de materiais biológicos, de acordo com a presente invenção, incluem uma mistura de carboidratos e reforçador de vidro. Esses materiais, quando misturado com os grânulos de materiais bioativos preferidos formam cadeias ou gotículas em nitrogênio líquido e podem ser eficientemente secos em uma estrutura amorfa vítreo de acordo com os métodos da presente invenção e para proporcionar grandes quantidades de composições estáveis secas de armazenagem e administração do referido material bioativo (vide Figura 1 - para observações físicas e atividade da água ( $A_w$ ) de formulação diferente após a secagem). A mistura de carboidratos proporciona uma estabilidade estrutural para a formulação e / ou físico-químicas dos benefícios protetores nos materiais bioativos e evita ou reduz os efeitos adversos após a reconstituição ou a re-hidratação.

[0050] A fração de polissacarídeo da mistura de carboidratos pode proporcionar a viscosidade da formulação para o espessamento e um melhor controle sobre as propriedades de formulação de densidade sob a pressão de vácuo e um aumento da resistência estrutural para a formulação das composições secas da presente invenção. Os polissacarídeos preferidos, em particular para os organismos vivos, são gomas solúveis em água, devido à sua característica distintiva com a finalidade de formar gel viscoso a temperaturas moderadas. As gomas de determinada concentração também foram encontradas para estabilizar eficazmente a estrutura de formulação sob vácuo, proporcionando a viscosidade e a densidade adequada para a formulação e permitindo uma secagem eficaz da formulação durante a etapa de secagem primária de líquido a uma viscosidade específica. Determinadas gomas podem também formar hidrogel por meio da ligação cruzada com cátions bivalentes ou multivalentes (por exemplo, alginatos, pectinas, quitosano) ou por meio da temperatura ou por meio das alterações de pH (por exemplo, gelatinas, CMC, PAC, goma de gelano). As soluções

hidrogelificadas iriam evitar problemas associados com a secagem em vácuo de soluções congeladas.

[0051] A fração de dissacarídeo em uma mistura de carboidratos inclui vários açúcares e álcoois de açúcar. O dissacarídeo preferido é um que não cristalize e / ou danifique ou desestabilize o material biologicamente ativo na formulação, a temperaturas de congelação (por exemplo, menor do que  $-20^{\circ}\text{C}$ ) e durante a remoção de água. Por exemplo, o material bioativo pode ser fisicamente incorporado no vidro formando açúcares, tais como sacarose, lactose ou trealose com a finalidade de promover a retenção da estrutura molecular durante o processo de secagem e conferir rigidez estrutural à matriz amorfa, no estado seco. Um dissacarídeo apropriado seria eficazmente para substituir a água de hidratação perdida durante a secagem, para evitar danos às membranas celulares e desnaturação de enzimas (vide revisão por Crowe et al., 1998). Outras funções do dissacarídeo na composição podem incluir proteger o bioativo material de exposição à luz nociva, o oxigênio, os agentes oxidantes e umidade. Um dissacarídeo apropriado deve dissolver prontamente em uma solução. A trealose é um protetor particularmente atraente porque é um dissacarídeo não redutor encontrado em plantas e organismos vivos (por exemplo, bactérias, fungos e invertebrados, tais como insetos e nemátodes) que permanecem em um estado de dormência, durante os períodos de seca. A trealose tem mostrado ser um protetor eficaz para uma variedade de materiais biológicos, incluindo as proteínas e outras macromoléculas biológicas, tais como enzimas, soro, anticorpos, antigênicos e componentes de vacina (Sanchez et al., 1999, Intl. J. Pharm. 185, 255 a 266 ; Esquisabel et al, 1997, J. Microencapsulation, 14, 627 a 638). Em alguns casos, pode ser benéfico incluir dois ou mais diferentes dissacarídeos, tais como uma mistura de sacarose e trealose a inibir a formação de cristais, com a finalidade de melhorar a estabilidade da

formulação em pó de material bioativo, em condições de armazenagem durante períodos de tempo prolongados e para reduzir custos.

[0052] A fração de oligossacarídeo na mistura de carboidratos inclui inulina, maltodextrinas, dextranos, fruto-oligossacarídeos (FOS), galacto-oligossacarídeos (GOS), manana-oligossacarídeos (MOS) e suas combinações. Os oligossacarídeos mitigam vários problemas associados com a utilização de trealose sozinha como um protetor para uma variedade de materiais biológicos preservados. Embora muito eficaz para proteger o material biológico durante a desidratação e rehidratação, trealose sozinha como um estabilizador não proporciona a estabilidade de armazenamento desejável, por meio de períodos de tempo prolongados, especialmente a temperaturas elevadas e / ou em ambientes úmidos. Este problema foi resolvido na presente invenção com a adição de oligossacarídeos, de preferência, a inulina, a mistura de carboidratos.

[0053] A razão de massa preferida dos sacarídeos na mistura de carboidratos é 10 : 0.1 a 4 : 0.1 a 2 dissacarídeos / oligossacarídeos / polissacarídeos e, mais preferencialmente, em que a proporção em peso de dissacarídeos / oligossacarídeos / polissacarídeos é de cerca de 10 : 0.2 : 0,1 a cerca de 10 : 0.2 : 0.1. De preferência, a mistura de carboidratos compreende, em porcentagem em peso, de matéria seca total, 10 a 90 % fr dissacarídeos, 1 a 10 % de oligossacarídeos e 0,1 a 10 % de polissacarídeos.

[0054] Os intensificadores de vidro da estrutura da presente invenção incluem os sais de ácidos orgânicos tais como ácido láctico, ácido ascórbico, ácido maleico, ácido oxálico, ácido malônico, ácido málico, ácido succínico, ácido cítrico, ácido glucônico, ácido glutâmico, e similares. Os sais podem incluir cátions tais como sódio, potássio, cálcio, magnésio, sais de tampão, tampão de fosfato e similares. Os exemplos incluem o citrato de sódio, lactato de sódio, maleato de sódio, glu-

conato de magnésio, ascorbato de sódio, ascorbato de potássio, sais de fosfato tamponado e similares. Geralmente, os ânions multivalentes formam vidros mais facilmente com uma Tg mais elevada do que os ânions monovalentes. O ânion preferido terá uma Tg elevada solubilidade e suficiente para inibir a cristalização e, dessa maneira, formar uma estrutura robusta vítrea. Em alguns casos, as misturas de sais orgânicos podem ser úteis (por exemplo, citrato de sódio e ascorbato de sódio). O citrato de sódio foi encontrado para interagir com os grupos hidroxila da molécula de açúcar e colagem forma, através dos seus grupos carboxila, que resulta em um aumento dramático da temperatura de transição vítrea de sacarose vitrificada (Kets et al., 2004. Citrate increases glass transition temperature of vitrified sucrose preparations *Cryobiology*, 48 : 46 a 54). O citrato de sódio é um aditivo alimentar comum afirmado como GRAS (21 CFR 184,1751 - citrato de sódio). As funções adicionais do citrato de sódio, nas composições estão associadas com as suas mudanças de capacidade de tamponamento e impedindo mudanças drásticas no pH do meio líquido durante a congelação, o que pode conduzir à desnaturação da proteína de ser liofilizada.

[0055] Outros intensificadores de vidro adequados que são incluídos na composição, para aumentar ainda mais a estabilidade incluem proteínas, hidrolisados de proteínas, polipeptidos e aminoácidos. De preferência, a caseína ou ervilha e, mais preferivelmente, caseína hidrolisada ou hidrolisados de proteínas de ervilha, são utilizados. O termo "proteína hidrolisada" refere-se a proteína que tenha sido submetido a ácido ou hidrólise enzimática parcial ou completo, para se obter um hidrolisado de proteínas com um peso molecular de cerca de 1 kDa e cerca de 50 kDa. De preferência, pelo menos 20 % do substrato proteína é convertido em peptídeos com massas moleculares de 200 a 2000 daltons. A proteína hidrolisada tem aproximadamente a



mesma composição de aminoácido como a proteína total e pode ser obtida a partir de qualquer número de fontes comerciais. Sendo hipoa-lergênico, a proteína hidrolisada pode vantajosamente ser usada em determinado alimento para os consumidores Hiper sensíveis, tais como crianças e idosos.

[0056] A quantidade de intensificadores de vidro utilizada na composição variará dependendo da composição global e as suas condições de armazenagem de secagem pretendidas. Geralmente, a razão molar dos intensificadores de vidro para os carboidratos totais serão de cerca de 0,01 a cerca de 0,3. Uma composição preferida compreende uma razão molar de cerca de 0,1 a 0,2.

[0057] Uma composição preferida compreende de cerca de 0,5 % a cerca de 90 % de um componente de carboidrato incluindo pelo menos um di-, oligo- e poli-sacarídeos e um componente de proteína que compreende cerca de 0,5 % a cerca de 40 % de uma proteína hidrolisada. Mais preferivelmente, a composição compreende cerca de 30 % a cerca de 70 % do componente de carboidrato e cerca de 10 % a cerca de 40 % de um componente melhorador de vidro tal como uma proteína de proteína hidrolisada e ácido carboxílico, em que o componente carboidrato compreende cerca de 10 % a 90 % e mais preferivelmente de cerca de 40 % a 80 % de um dissacarídeo ; cerca de 1 % a cerca de 10 % e mais preferivelmente de cerca de 5 % a 10 % de um oligosacarídeo, e cerca de 0,1 a cerca de 10 % e mais preferivelmente de cerca de 5 % a cerca de 10 % de um polissacarídeo. A composição compreende ainda um sal de um ácido orgânico, que é considerado como um outro componente intensificador de vidro e compreende entre cerca de 0,5 % e 20 % de ácido carboxílico, com base no peso total da composição.

[0058] A solução contendo o material biológico e a composição de estabilização da presente invenção pode incluir uma quantidade subs-

tancial de sólidos totais (constituintes menos o solvente, tal como água), a partir de cerca de 20 % a cerca de 60 %, de preferência cerca de 30 a 50 % por cento em peso. A maior parte dos sólidos totais pode consistir no material bioativo, a mistura de carboidratos e os intensificadores de vidro. Por exemplo, o material bioativo pode estar presente na formulação em uma concentração que varia entre cerca de 5 % e 30 % p / v, preferivelmente cerca de 10 a 20 % p / v. A massa em peso da mistura de composição no meio de cultura é, tipicamente, entre cerca de 10 % e cerca de 60 %, de preferência cerca de 20 a 40 %. A viscosidade das formulações da presente invenção é tipicamente maior do que 1000 centipoise (cP), mais preferivelmente, superior a 5000 cP, e mais preferivelmente superior a 10000 cP.

#### MÉTODOS DE PREPARAÇÃO DE FORMULAÇÕES ESTÁVEIS A SECO

[0059] Diversas técnicas de secagem podem ser eficazmente usadas para secar a composição. Estes métodos, ao passo que menos complicado e menos dispendioso do que a secagem ou secagem por congelamento a vácuo, são geralmente mais destrutivos para materiais biológicos. Muitos materiais biológicos têm maior tendência a mudanças conformacionais grosseiras e reações indesejadas, quando preservados utilizando métodos que têm lugar à temperatura ambiente ou mais elevada do que quando o processo de secagem por congelamento ou secagem por atomização é utilizado. Como resultado, mesmo quando os agentes protetores conhecidos presentemente são utilizados, a atividade de muitos materiais biológicos re-hidratados é insatisfatório no seu próprio direito, e significativamente menor do que se preservado por secagem a baixas temperaturas.

[0060] Os métodos preferidos para a preparação de formulações estáveis secas contendo materiais bioativos incluem: (1) preparação de uma formulação de pasta fluida viscosa, misturando o material bi-

oativo com a composição da presente invenção em uma solução aquosa, (2) congelamento snap da formulação da pasta fluida de modo a formar as partículas sólidas congeladas, (3) opcionalmente, submetendo a partícula congelada a pressão de vácuo elevada para um curto período de tempo para eliminar as partículas e estabilizar a sua estrutura, (4) a remoção da água por evaporação da umidade a uma temperatura acima da temperatura de congelação de formulação, (5) continuar a reduzir a atividade da água a formulação  $A_w$  inferior a 0.3 sob vácuo total e uma temperatura elevada.

[0061] Por exemplo, uma forma seca do material bioativo pode ser formulada em uma solução ou pasta fluida contendo a mistura de pó da composição. A mistura da composição pode ser dissolvida em uma solução aquosa quente com agitação pura baixa, antes de resfriar e a mistura com o material bioativo. O material bioativo, tal como vírus ou bactéria cultivada, pode ser concentrado e separado do meio de cultura por meio de centrifugação ou filtração antes de re-pasta fluida na formulação. Alternativamente, a totalidade da água da formulação é fornecida no líquido do material concentrado biológico. A pasta fluida é mantida a uma temperatura ligeiramente acima da temperatura ambiente e a mistura de composição de pó seco é adicionada lentamente à pasta fluida (25°C a 40°C) quente contendo o material biológico. A pasta fluida é agitada suavemente em um misturador planetário até que todos os componentes estão completamente dispersos ou dissolvidos e a pasta fluida uniforme é obtido.

[0062] A solução viscosa pode ser seguida de ligação cruzada de modo a formar um hidrogel (dependendo das propriedades de polissacarídeos) pela adição de íons de metal ou de alterar a temperatura ou pH da pasta fluida e, em seguida, seca de acordo com os métodos de secagem da presente invenção. De uma maneira alternativa, a pasta fluida pode ser snap-congelada por meio da congelação através de um

bico, gotas ou injetáveis em gelo seco ou banho de nitrogênio líquido, com a finalidade de formar partículas sólidas ou cordas pequenas de gotículas ou grânulos. As partículas sólidas congeladas podem ser armazenadas em um congelador entre  $-30^{\circ}\text{C}$  e  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior utilização como um produto estável congelada ou até a secagem. O método de secagem preferido é a secagem de vácuo, onde a temperatura do produto seja mantida ligeiramente acima da sua temperatura de congelação. As gotículas ou grânulos congelados são colocados em tabuleiros com uma capacidade de carga de cerca de 0,1 kg / pé quadrado a cerca de 1,5 kg / sq pés e seco de acordo com o método da presente invenção. De preferência, o processo de secagem é iniciado por uma curta etapa de purga, a qual permite o produto de aclimação à temperatura inicial e da estrutura das partículas congeladas para relaxar e estabilizar o excesso de ar e desgaseificada. Tipicamente, a etapa de purga leva entre 1 e 60 minutos, dependendo da viscosidade do produto e carregamento na bandeja. As contas ou partículas devem permanecer sob uma forma sólida congelada durante a etapa de toda a purga. A temperatura do produto é, então, trazida para acima da sua temperatura de congelação e a etapa de secagem primária, seguida até toda a água livre ser evaporada a partir do produto. Uma vez que a temperatura da formulação atingiu a temperatura desejada, o calor é ajustado para manter a temperatura e a etapa de secagem primária líquida por evaporação é progredia. Neste etapa, a formulação é já descongelada e a evaporação de água acelerou ocorrendo sem fervura ou a formação de espuma. O processo de secagem é completado com uma fase de secagem adicional secundária em vácuo máximo e temperatura elevada.

[0063] Os métodos típicos do estado da técnica envolvem a formação de espuma extensa e / ou salpicos de ebulição violenta e que podem ser prejudiciais para os agentes biológicos sensíveis e causam

dificuldades para a escala industrial até a capacidade de carregamento elevada (vide, por exemplo, Patente U.S. No. 6.534.087, em que a pressão aplicada em vácuo resulta na ebulição violenta e na formação de espuma). No entanto, as composições e os métodos atuais evitam a ebulição ou a formação de espuma da formulação ao conseguir uma taxa significativamente mais rápida de secagem e permitindo uma elevada capacidade de carregamento da formulação. Além disso, uma desgaseificação completa e eficiente de pasta fluidas viscosas líquidas é difícil e pode exigir um longo período de tempo. Estes obstáculos foram todos resolvidos na presente invenção, utilizando uma composição adequada que permita uma eficaz secagem líquido primária que forma uma estrutura vítrea, sem qualquer ponto de ebulição e formação excessiva de espuma. O carregamento de partículas sólidas congeladas em um tabuleiro como se opõe a pasta fluida ou xarope viscoso permite que a capacidade de carga muito mais elevada por secagem em tabuleiros de área foi produzido de acordo com a técnica anterior.

[0064] Em um exemplo preferido da presente invenção, o material biológico são os meios de cultura concentrados probióticas vivos. A mistura da composição em pó contém, de preferência 1 a 4 % do alginato de sódio de ou goma de gelano, 50 a 75 % da trealose, 1 a 10 % de inulina ou FOS, 10 a 20 % de hidrolisados de proteína de, tal como caseína, soro do leite, hidrolisado de soja, ervilha ou de semente de algodão e 1 a 10 % de citrato de sódio ou ascorbato de sódio. A cultura de probiótico pode ser fresca, congelada ou seca já sob a forma de pó seco. A mistura é adicionada à composição dos meios de cultura concentrados probióticas para trazer o teor de sólidos da mistura de solução a 40 a 60 % (p / p) e o pH ajustado para 6,5 a 7,5 com fosfato ou íons de citrato. A solução é misturada a uma temperatura ligeiramente acima da temperatura ambiente (tipicamente entre 25°C -37°C)

até que todos os componentes estejam completamente dissolvidos. A pasta viscosa é gotejada em nitrogênio líquido, com a finalidade de formar pequenas gotículas ou grânulos que são então removidos do nitrogênio líquido, embalados em sacos e armazenadas em um congelador a  $-80^{\circ}\text{C}$  até à secagem.

[0065] Um método típico de secagem de bactérias probióticas vivas incluem; espalhar as contas sólidas congeladas em tabuleiros com uma camada uniforme de uma capacidade de carga entre 100 a 1500 g / m<sup>2</sup> e os tabuleiros são colocados imediatamente em um liofilizador. A pressão de vácuo é, então, aplicada a cerca de \*0,13 KPa (1000 mTorr) ou inferior e, dependendo do tamanho do secador por congelação e do tipo de fonte de calor, a temperatura da prateleira ajustada para manter as partículas de cerca de  $-20$  a cerca de  $-30^{\circ}\text{C}$ . As contas sólidas congeladas são permitidas para purgar durante cerca de 1 a cerca de 60 minutos e de vácuo ajustado para entre 0,26 e 1,33 KPa (2000 e 10000 mTorr) e transferência de calor aumentada para elevar a temperatura da formulação a entre  $-10^{\circ}\text{C}$  e  $0^{\circ}\text{C}$ . Estas condições de temperatura e de pressão de vácuo são mantidas durante a etapa primária de secagem de líquido, que pode durar entre algumas horas e até 24 horas, dependendo do carregamento de bandeja. Em algum momento durante o processo de secagem primária, a taxa de evaporação de solvente e retarda a temperatura formulação começa a aumentar devido ao excesso de fornecimento de calor na câmara de secagem. Este ponto indica o final da etapa de secagem principal na presente invenção. Como o solvente é conduzido para fora da formulação, o vidro formando os compostos na solução tornam-se mais espesso e concentrado até se pára de fluir como um líquido e formam uma estrutura amorfa e / ou estável vítrea.

[0066] Uma etapa de secagem secundária é então seguida de vácuo e da temperatura máxima de formulação entre  $30^{\circ}\text{C}$  e  $50^{\circ}\text{C}$ . A fi-

nalidade da etapa de secagem secundária é remover a umidade remanescente aprisionada ou ligada e fornecer uma composição que é estável no armazenamento durante um período de tempo prolongado à temperatura ambiente. A etapa de secagem secundária pode durar várias horas e o seu ponto final é quando a formulação é completamente seca e a sua atividade de água inferior a 0,3 Aw.

[0067] Os métodos de secagem da presente invenção resultam em um material biologicamente ativo que é encerrado dentro de uma estrutura amorfa vítrea, impedindo dessa maneira o desdobramento ou a desnaturação de proteínas e retardando as interações moleculares ou a reatividade cruzada, devido à mobilidade muito reduzida do composto e outras moléculas na composição vítrea amorfa. Enquanto a estrutura amorfa sólida é mantida a uma temperatura abaixo, a sua temperatura de transição do vidro e da umidade residual permanece relativamente baixa (isto é, abaixo do nível de Aw de 0,5), as bactérias probióticas podem permanecer relativamente estáveis. Deve notar-se que a obtenção de uma estrutura vítrea não é um pré-requisito para a estabilidade a longo prazo, como alguns materiais biológicos podem ir melhor em um estado mais cristalino.

[0068] A estrutura seca vítrea pode ser usada em bloco, cortada nas formas desejadas e tamanhos, ou esmagado e moído em um pó de escoamento livre que proporciona um processamento a jusante fácil como aglomeração úmida ou seca, granulação, formação de comprimidos, a compactação, a peletização ou por meio de qualquer outro tipo de processo de entrega. Os processos para a trituração, moagem, trituração ou pulverização são bem conhecidos na técnica. Por exemplo, um moinho de martelo, um moinho de ar, um moinho de impacto, em um moinho de jato, um moinho de pinos, um moinho de Wiley, ou o dispositivo de fresagem podem ser semelhante utilizados. O tamanho de partícula preferido é inferior a cerca de 1000). Tm e de preferência

inferior a 500

[0069] As composições e os métodos descritos na presente invenção estabilizam o material biológico e preservam a sua atividade durante um período de armazenamento prolongado à temperatura ambiente e umidade relativa acima. Por exemplo, as composições são testadas quanto a estabilidade, submetendo-as a uma temperatura elevada (por exemplo, 40°C) e alta umidade (por exemplo, 33 % de HR) e a medição da atividade biológica das formulações. Como exemplo para as bactérias probióticas vivas, os resultados destes estudos demonstram que as bactérias formuladas nestas composições são estáveis durante pelo menos 60 dias. A estabilidade é definida como o tempo para uma perda de potência de log UFC / g. Tais formulações são estáveis mesmo quando as concentrações elevadas do material biologicamente ativo são utilizados. Dessa maneira, estas formulações são vantajosas na medida em que podem ser transportadas e armazenadas a temperaturas iguais ou superiores à temperatura ambiente por longos períodos de tempo.

#### EXEMPLOS

[0070] Os exemplos seguintes são apresentados para ilustrar, mas não limitar a invenção reivindicada.

##### Exemplo 1

##### Preparação da composição seca e estável

##### Mistura de Carboidratos Básicos

[0071] Cerca de 70 g de trealose (Cargill Minneapolis, MN), a cerca de 5 g de inulina instantânea (Cargill Minneapolis, MN) e cerca de 3 g de alginato de sódio (ISP Corporation, Wayne, NJ) foram uniformemente misturados na forma seca.

##### Mistura básica de intensificadores vítreos

[0072] Cerca de 17 g de hidrolisado de caseína ou de hidrolisado de ervilha (ultra-hidrolisados filtrados, Marcor, Carlstadt, NJ) e 5 g de



citrato de sódio ou ascorbato de sódio (Sigma, St. Louis, MO) foram uniformemente misturados na forma seca.

#### Estabilização de bactérias probióticas

[0073] Concentrado fresco de *Latobacillus rhamnosus*. (100 ml a 10 % de sólidos, de uma maneira direta a partir da colheita de fermentação) foi adicionada em um misturador e mantida a 35°C. Cerca de 78 g de mistura de carboidratos de base e cerca de 22 g da mistura de base de intensificador de vidro foram lentamente adicionados à cultura de probiótico e mistura foi realizada a 35°C durante 10 minutos. A pasta fluida viscosa foi em seguida transferida para um recipiente que tem uma parte inferior perfurada e deixada gotejar para um banho contendo nitrogênio líquido. As contas foram então removidas do nitrogênio líquido e imediatamente transferidas para a secagem.

#### Secagem dos grânulos congelados contendo as bactérias probióticas

[0074] Os grânulos congelados foram espalhados em uma bandeja com uma capacidade de carga de 200 pés g / sq e imediatamente colocados em uma prateleira em um liofilizador (SRC Model 25, Virtis, Gardiner, NY). O vácuo foi então ajustado para entre 0,26 a 0,35 KPa (2000 a 2700 mTorr) e temperatura da prateleira elevada a 30°C. Estes ajustes de pressão e temperatura foram mantidos sob vácuo durante 5 horas. Opcionalmente, a temperatura dos grânulos congelados foi aclimatada a cerca de -20°C antes de se iniciar a secagem primária líquidos por meio da aplicação de uma pressão de vácuo a cerca de 0,13 KPa (1000 mTorr) e permitindo que os grânulos sólidos congelados viessem a purgar durante cerca de 10 minutos. A etapa de secagem primária foi seguida por meio do ajustamento da pressão de vácuo a entre 0,26 a 0,35 KPa (2000 a 2700 mTorr) e temperatura da prateleira elevada a 30°C. Estes ajustes de pressão e temperatura foram mantidas sob vácuo durante 5 horas. A etapa de secagem secundária foi seguida em vácuo completo 0,02 a 0,026 KPa (150-200

mTorr) e a temperatura da prateleira mantida entre 30°C e 50°C, durante 3 horas adicionais. A formulação foi completamente seca e a sua atividade de água medida por um instrumento Awl Hygropalm (Rotonic Instrument Corp, Huntington, NY.) A  $A_w = 0,23$ .

### EXEMPLO 2

[0075] A estabilidade de armazenamento das bactérias probióticas secas

[0076] A Figura 1 mostra a estabilidade ao armazenamento sob duas diferentes condições de armazenagem aceleradas de 40°C e 33 % RH e 30°C e 43 % HR de secas estáveis bactérias probióticas a partir do Exemplo 1 e bactérias probióticas secas comercialmente disponíveis (Culturelle, Amerifit, Inc., Cromwell, T). As bactérias probióticas comerciais perderam completamente a sua viabilidade dentro das primeiras semanas sob as condições de armazenagem aceleradas, enquanto que a composição seca das bactérias probióticas da presente invenção perdeu apenas 1,18 logs após 60 dias a 30°C e 43 % RH e apenas 1,09 toras a 40°C e 33 % RH.

### EXEMPLO 3

[0077] Produção em escala de crescimento da composição a seco e estável contendo bactérias probióticas *Latobacillus rhamnosus*.

[0078] *Latobacillus rhamnosus* (400 g de concentrado congelado a partir de uma fonte comercial) foi descongelado a 37°C em um misturador planetário duplo encamisado (DPM, 1 qt, Ross Engineering, Inc. Savannah, GA) e o teor de sólidos ajustado para 10 % de sólidos em peso de água destilada). Cerca de 212 g de trealose (Cargill Minneapolis, MN), a cerca de 20 g de inulina instantânea (Cargill Minneapolis, MN), a cerca de 12 g de alginato de sódio (ISP Corporation, Wayne, NJ), a cerca de 136 g de hidrolisado de caseína (hidrolisados ultra filtrados, Marcor, Carlstadt, NJ) e cerca de 20 g de ascorbato de sódio (Sigma, St. Louis, MO) foram uniformemente misturados na forma se-

ca. A mistura de pós foi lentamente adicionada à cultura de probiótico e mistura foi realizada a 40 RPM e 37°C durante 10 minutos. A pasta fluida foi então transferida para um recipiente que tem uma parte inferior perfurada e deixada escorrer para um banho contendo nitrogênio líquido. As contas foram então removidas do nitrogênio líquido, colocadas na bolsa de alumínio seladas frustradas e armazenadas em um congelador a -80°C durante várias semanas.

[0079] Para a secagem, os grânulos foram congelados uniformemente distribuídos em tabuleiros com uma capacidade de carga variando de 500 até 1500 g / m<sup>2</sup> e os tabuleiros colocados em prateleiras de um liofilizador (Modelo 25 SRC, Virtis, Gardiner, NY). A etapa de secagem principal de líquido foi iniciada com a finalidade de ajustar a pressão de vácuo a entre 0,26 a 0,35 KPa (2000-2700 mTorr) e temperatura do produto elevada e estabilizada entre -10 e -5°C. Ao longo do tempo (cerca de 10-16 h) a temperatura do produto aumentou para cerca de 20 a 25°C de altura em que uma etapa de secagem secundária iniciou no vácuo máximo 0,02 a 0,026 KPa (150 a 200 mTorr) e a temperatura do produto manteve-se entre 30 a 40°C durante adicional de 14 horas. A formulação foi completamente seco e a sua atividade de água medida a 0,23 Aw.

#### EXEMPLO 4

[0080] Produção em escala de crescimento da composição seca estável, contendo bactérias probióticas *Bifidobacterium lactis*.

[0081] *Bifidobacterium lactis* (400 g de concentrado congelado a partir de uma fonte comercial) foi descongelado a 37°C em um misturador planetário duplo encamisado (DPM, 1 qt, Ross Engineering, Inc. Savannah, GA.). Cerca de 212 g de trealose (Cargill Minneapolis, MN), a cerca de 20 g de inulina instantânea (Cargill Minneapolis, MN), a cerca de 12 g de alginato de sódio (ISP Corporation, Wayne, NJ) e cerca de 20 g de ascorbato de sódio (Sigma, St. Louis, MO) foram uni-

formemente misturados na forma seca. A mistura de pós foi lentamente adicionada à cultura de probiótico. Cerca de 136 g de hidrolisado de ervilha (ultra-hidrolisados filtradas, Marcor, Carlstadt, NJ) foi dissolvido em 80 g de água destilada e a mistura foi aquecida brevemente em microondas ou em banho-maria a 60°C até à dissolução completa e depois resfriada até cerca de 35°C. A mistura seca em pó e a solução que contém hidrolisado de proteína de ervilha foram adicionados ao concentrado e a mistura probiótica foi realizada a 40 RPM e 37°C durante 20 minutos. A pasta fluida foi então transferida para um recipiente que tem uma parte inferior perfurada e deixada escorrer para um banho contendo nitrogênio líquido. As contas foram então removidas do nitrogênio líquido, colocado na bolsa de alumínio selada frustrado e armazenada em um congelador a -80°C durante várias semanas.

[0082] Para a secagem, as contas congeladas foram uniformemente distribuídas em tabuleiros com uma capacidade de carga de 800 g / m<sup>2</sup> e os tabuleiros colocados em prateleiras de um liofilizador (SRC Model 25, Virtis, Gardiner, NY). A etapa de secagem principal de líquido foi iniciada ajustando a pressão a vácuo entre \*0,26 a 0,35 KPa (2000 a 2700 mTorr) e temperatura do produto elevada e estabilizada entre -10 e -5°C. Ao longo do tempo (cerca de 10 a 16 h) a temperatura do produto aumentou para cerca de 20 a 25°C altura em que uma etapa de secagem secundária iniciou no vácuo máximo 0,02 a 0,026 KPa (150 a 200 mTorr) e a temperatura do produto manteve-se entre 30 a 40°C durante adicional 14 horas. A formulação foi completamente seca e a sua atividade de água medida a 0,23 Aw.

#### EXEMPLO 5

[0083] A preparação de uma formulação de hidrogel contendo as bactérias probióticas *Bifidobacterium lactis* :

[0084] A pasta fluida concentrada de probiótico *Bifidobacterium lactis* é preparada de acordo com o Exemplo 1. Para a formulação bá-

sica, 0,5 g de fosfato dibásico de cálcio é adicionado, seguido por 0,5 g de gluconolaton. A pasta fluida é deixada endurecer à temperatura ambiente durante as 2 horas seguintes, com a finalidade de formar um hidrogel sólido. O gel firme é cortado para fios finos e longos, usando um cortador disponível comercialmente / triturador. As linhas finas são de uma maneira direta carregadas sobre tabuleiros em forma úmida ou snap-congelados em nitrogênio líquido e carregadas sobre uma bandeja com uma capacidade de carga de 500 pé g/sq e colocados em um secador por congelação para a secagem, tal como descrito no Exemplo 3. A atividade de água ( $A_w$ ) da formulação é de 0,05 (medida por HygroPalm Awl, R tonic Huntington, NY). A formulação é ainda seca a pó fino usando um equipamento de moagem padrão martelo e peneirado através de telas de 50 a 250 micra.

#### EXEMPLO 6

[0085] A otimização da relação molar entre os intensificadores de vidro e mistura de carboidratos

[0086] Várias composições contendo diferentes proporções molares de intensificadores de vidro e a mistura de carboidratos foram preparados de acordo com o Exemplo 1. Um concentrado da cultura da bactéria probiótica *L. paracasei* foi obtido a partir de uma fonte comercial e preparado de uma composição seca, como descrito no Exemplo 1, exceto que a mistura foi imediatamente carregada em tabuleiros em forma úmida, sem pressão de congelação e as etapas de purga. A pasta fluida foi seca em fases primária e secundária, tal como descrito nos Exemplos 1 e 3, excepto que a temperatura da prateleira foi aumentada para 40°C durante as fases primárias e secundárias de secagem. O pó estável foi submetido a condições de armazenagem de aceleração a 37°C e 33 % HR durante 84 dias. A Figura 2 mostra o efeito de várias razões molares na estabilidade das bactérias secas. Os resultados sugerem que a proporção molar óptima entre os intensi-

ficadores de vidro e a mistura carboidratos é de cerca de 0,12 a 0,15.

#### EXEMPLO 7

[0087] Efeito da composição da presente invenção sobre a estabilidade de armazenamento das bactérias probióticas *Latobacillus acidophilus*

[0088] Uma composição que contenha a mistura de carboidratos e a mistura de intensificadores de vidro tal como descrito no Exemplo 1 foi preparado. A cultura concentrada de bactérias probióticas de *L. acidophilus* foi obtida a partir de uma fonte comercial e preparada de uma composição seca, tal como descrito nos Exemplos 1 e 3, e o pó estável foi submetido a condições de armazenagem de aceleração a 24°C e 33 % RH durante 537 dias. A Figura 3 demonstra a estabilidade superior do probiótico formulada com a composição da presente invenção. Os resultados mostram que a viabilidade da redução probiótica de apenas 0,18 log mais de 537 dias de armazenamento de prateleira sob as condições especificadas.

#### EXEMPLO 8

[0089] Efeito de compostos intensificadores de vidro diferentes sobre a estabilidade de armazenamento das bactérias probióticas *L. acidophilus*.

[0090] Várias composições contendo a mistura de carboidratos, tal como descrito no Exemplo 1 e mistura de vidro contendo intensificadores de hidrolisado de caseína e de citrato de sódio ou ascorbato de sódio ou uma combinação de ambos foram preparados. A cultura concentrada de bactérias probióticas de *L. acidophilus* foi obtida a partir de uma fonte comercial e preparada de uma composição seca, como descrito no Exemplo 1, exceto que a mistura foi imediatamente carregada em tabuleiros em forma úmida, sem pressão de congelação e as etapas de purga. A pasta fluida foi seca em fases primária e secundária, tal como descrito nos Exemplos 1 e 3, e o pó estável foi submetido

a condições de armazenagem de aceleração a 24°C e 43 % de RH durante 180 dias. A Figura 4 mostra o efeito de vários compostos de vidro que aumentam a estabilidade das bactérias secas. Os resultados sugerem que uma melhor estabilidade significativa foi obtida através da inclusão de intensificador de vidro adicional na parte superior do hidrolisado de proteína. Em particular, a inclusão de quantidades iguais de acetato de sódio e ascorbato de sódio forneceu uma composição mais estável. Os resultados de ambos os Exemplos 5 e 6 também sugeriram que vários intensificadores de vidro podem ser mais eficazes, ou mesmo pode atuar como um desestabilizador dependendo da cepa bacteriana.

#### EXEMPLO 9

[0091] Efeito de várias proporções de proteínas de hidrolisado / açúcar na estabilidade de armazenamento das bactérias probióticas *Bifidobacterium lactis*.

[0092] Várias composições contendo mistura de carboidratos e intensificadores de vidro, tal como descrito no Exemplo 1 e as composições que contêm quantidades iguais, mas em proporções diferentes do hidrolisado de ervilha / trealose, com ou sem ascorbato de sódio foram preparados. A cultura concentrada de bactérias probióticas *Bifidobacterium lactis* foi obtida a partir de uma fonte comercial e preparada de uma composição seca, tal como descrito nos Exemplos 1 e 3, e o pó estável foi submetido a condições de armazenagem de aceleração, a 35°C e 43 % HR durante 7 semanas. A Figura 5 mostra o efeito de proporções de 1 : 4, 1 : 2,5 e 1 : 1,5 de hidrolisado de ervilha / trealose, com ou sem ascorbato de sódio na estabilidade das bactérias secas. Os resultados sugerem que uma melhor estabilidade significativa foi obtida a aumentar a proporção do hidrolisado de ervilha / trealose. Em particular, uma razão de 1 : 1,5 hidrolisado de ervilha / trealose forneceu uma composição mais estável. A inclusão de ascorbato de

sódio de ervilha mais elevada da proporção hidrolisado / trealose resultou em uma estabilidade superior em comparação com formulações de ascorbato de sódio excluídos.

#### EXEMPLO 10

[0093] Otimização de pH para a estabilidade máxima do probiótico *L. rhamnosus*.

[0094] Várias composições contendo mistura de carboidratos e intensificadores de vidro, tal como descrito no Exemplo 1 a diferentes valores de pH foram preparados. A cultura concentrada de bactérias probióticas *L. rhamnosus* foi obtido a partir de uma fonte comercial e preparados de uma composição seca, tal como descrito nos Exemplos 1 e 3. O pó estável foi submetido a condições de armazenagem de aceleração a 40°C e 33 % de HR durante 8 semanas. A Figura 6 mostra o efeito do pH da pasta fluida sobre a estabilidade das bactérias secas. Os resultados sugerem que a estabilidade ótima foi alcançada a um pH neutro (~7).

#### EXEMPLO 11

[0095] Pó seco estável contendo uma enzima:

[0096] A fórmula de hidrogel contendo 40 por cento em peso de fitase (BASF, GmbH) é preparada por meio da mistura de 400 g da mistura de carboidratos e 200 g da mistura de intensificadores de vidro, tal como descrito nos Exemplos 1 e 4, e 400 g de fitase em 1000 ml de água. A formulação de hidrogel é desfiada snap-congelado em nitrogênio líquido e foi seco em um forno de vácuo a uma temperatura de secagem primária e secundária de 50°C. Para a de terminação da carga e estabilidade em armazenagem da fórmula seca : a amostra seca é pesada com precisão (<100 mg) em um tubo de microcentrífuga. 200 uA de sulfóxido de dimetila (DMSO) é adicionado. A formulação é dissolvida no tampão de DMSO em vórtice. Para esta amostra, 0,8 ml de uma solução contendo NaOH a 0,05 N, 0,5 % SDS e ácido



cítrico a 0,075 M (sal trissódico) é adicionado. Os tubos são sonificados durante 10 min a 45°C, seguidos por uma breve centrifugação a 5000 rpm durante 10 min. Alíquotas da solução de citrato clara de DMSO / NaOH / SDS / são tomados em cavidades de uma microplaca e analisadas para teor de proteína utilizando o método de ensaio de Bradford. A estabilidade da composição de enzima a seco estável após exposição a 95°C durante 20 minutos é significativamente mais elevada do que uma enzima a seco, sem a composição da presente invenção.

#### EXEMPLO 12

[0097] Pó seco estável contendo um vírus da vacina de anemia infecciosa do salmão (ISAV)

[0098] A pasta fluida concentrada da vacina ISAV (Novozyme, Dinamarca) é preparada de acordo com o Exemplo 4, exceto que 20 ml de solução de quitosano a 4 % em 0,5 % de ácido acético foi adicionada à pasta fluida que contém o concentrado de vacina ISAV, a mistura de carboidratos e os intensificadores de vidro. 0,5 g de fosfato dibásico de cálcio é adicionado, seguido por 0,5 g de gluconolatonato. A pasta fluida é deixada endurecer à temperatura ambiente durante as 2 horas seguintes, com a finalidade de formar um hidrogel sólido. O gel firme é cortado para os fios finos e longos, usando um cortador / triturador disponível comercialmente. As linhas finas são de uma maneira direta carregadas sobre tabuleiros em forma úmida ou snap-congelados em nitrogênio líquido e carregadas sobre uma bandeja com uma capacidade de carga de 1500 g/sq pé e colocados em um secador por congelamento para a secagem, tal como descrito no Exemplo 3. A atividade de água ( $A_w$ ) da formulação é de 0,25. A formulação é ainda seco a pó fino usando um equipamento de moagem padrão martelo e peneirado através de telas de 50 a 150 micra. A composição ISAV estável seca é usada para a vacinação oral de revestimento superior de uma

ração comercial com a composição seca e alimentação para peixes salmão Atlântico.

#### EXEMPLO 13

[0099] Preparação de Espécies de iscas Invasoras

[00100] A isca peletizada para as espécies invasoras especificamente orientadas de acordo com a presente invenção é preparada contendo um pesticida. 200 g de uma formulação como descrito no Exemplo 9 é preparada e adicionada a 200 g de água. A esta solução adiciona-se 90 gm de rotenona e 0,5 g de fosfato de cálcio dibásico, seguido de 0,5 g de gliconolaton. A pasta fluida é seca por pulverização imediatamente em um secador industrial padrão, e a formulação seca é utilizada para direcionar as espécies invasivas específicas sem efeito deletério da toxina no ambiente ou próximo por ecossistemas.

#### EXEMPLO 14

[00101] Preparação de uma formulação de plantas probióticas protegidas:

[00102] Um agente de controle biológico, tais como *Rhizobacterias* é preparado em uma composição a seco de acordo com o Exemplo 4. A eficácia da composição de *Rhizobacterias a seco* é avaliada em crescimento sob condições de alface gnotobióticos. Doses de 100 mg de composição de *Rhizobacterias a seco* por planta são inoculados em frascos com areia e plantadas com mudas de alface pré-germinadas (24 h). Uma dose de nutrientes de 5 ml da solução Hoagland esterilizado é aplicada às plantas no frasco. Os vasos são dispostos aleatoriamente em uma câmara de crescimento mantida a 28°C, com fotoperíodo de 12 horas. Durante cada intervalo de 7 dias após a inoculação, as plantas e a areia aderentes foram cuidadosamente removidas dos frascos. As raízes são lavadas em tampão fosfato estéril (pH 7,0), e medição do comprimento da raiz é gravado.

### Listagem de Referências

O conteúdo das seguintes referências é incorporado na presente invenção por referência na presente invenção para todos os efeitos.

Referências do pedido de patente e Patentes U.S.:

6.190.701 Composição e método para líquidos injetáveis estáveis, março de 1999, Roser et al.

6.964.771 Método para incorporar as substâncias de forma estável dentro de matrizes de vidro seco, espuma. Setembro de 1997, Roser et al.

5.766.520 Preservação por meio da formação de formulação, Junho de 1998, Bronshtein.

6.534.087 Processo para preparar uma composição farmacêutica, Junho de 2001, Busson e Schroeder.

6.884.866 Secagem a granel e os efeitos de indução de nucleação de bolha, Abril de 2005, Bronshtein.

7.153.472 Preservação e formulação de materiais bioativos para o armazenamento e entrega em portadores hidrofóbicos, Dezembro de 2006, Bronshtein.

2008/0229609, Preservação por vaporização., Junho de 2005, Bronshtein.

6.306.345 Tecnologia de barreira em escala industrial para a preservação da sensibilidade de materiais biológicos em temperaturas ambientes, Outubro de 2001, Bronshtein et al.

7381, 425, Preservação de materiais bioativos por espuma liofilizada, Setembro de 2006, Truong-le, Vu.

### Outras referências:

Morgan, CA, Herman, N., Branco, PA, Vesey, G., 2006, Preservação de micro-organismos por secagem ; uma revisão. *J. Microbiol. Methods.* 66 (2) : 183 a 93.

Capela, P., Hay, TKC, e Shah, NP 2006, Efeito de crioprotetores, probióticos e microencapsulação na sobrevivência de organismos probióticos no iogurte e liofilizados no iogurte. *Food Research International*, 39 (3) 203 a 211).

Annear de 1962, Preservação das leptospiros pela secagem da Estado líquido, *J. Gen. Microbiol.*, 27 : 341 a 343.

Crowe, JF, Carpenter, JF e Crowe, LM, 1998, O PAPEL DE VITRIFICAÇÃO EM ANIDROBIOSE. *Annu. Rev. Physiol.* 60 : 73 a 103.

Crowe, JH, Crowe., LM, e Mouriadian, R., 1983, *Cryobiology*, 20, 346 a 356.

M. Le meste, et al, 2002, Transição de Vidro e Tecnologia de Alimentos: A Avaliação crítica, *Journal of Food Science*, 67 : 2444 a 2458.

Sanchez et al., 1999, *Intl. J. Phartn.* 185, 255 a 266.

Esquisabel et al., 1997, *J. Microencapsulation*, 14, 627 a 638.

Kets et al., 2004. Citrato aumenta a temperatura de transição vítrea de preparações vitrificadas de sacarose, *Cryobiology*, 48 : 46 a 54.

## REIVINDICAÇÕES

1. Composição seca estabilizante para material biológico, caracterizada pelo fato de que compreende um componente de carboidratos compreendendo entre 0,5 % e 90 %, um componente de proteína que compreende entre 0,5 % e 40 % de proteínas hidrolisadas de origem animal ou vegetal; e um sal de um ácido carboxílico, com base no peso total da composição.

2. Composição seca estabilizante, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o componente de carboidrato é de pelo menos um sacarídeo selecionado dentre o grupo consistindo em um oligossacarídeo, polissacarídeo e dissacarídeo, em que o oligossacarídeo está entre 5 % e 10 %, dissacarídeo está entre 40 % e 80 %, e o polissacarídeo está entre 5 % e 10 %, com base no peso total do componente de carboidrato.

3. Composição seca estabilizante, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o material biológico compreende uma célula viva, atenuada ou morta, micróbio, vírus, bactérias, bactérias probióticas, uma bactéria ou uma levedura do solo e de planta, uma cultura de células, uma proteína, uma proteína recombinante, uma enzima, um peptídeo, um hormônio, uma vacina, um antibiótico, um medicamento, e uma mistura dos mesmos.

4. Composição seca estabilizante, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o componente de proteína compreende caseína hidrolisada, proteína de soro de leite hidrolisado, proteína de ervilha hidrolisada, proteína de soja hidrolisada e uma mistura das mesmas.

5. Composição seca estabilizante, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o componente de carboidrato compreende polissacarídeos, oligossacarídeos, dissacarídeos, e uma mistura dos mesmos.

6. Composição seca estabilizante, de acordo com a reivindicação 2, caracterizada pelo fato de que o componente polissacarídeo compreende ftalato acetato de celulose (CAP), carbóxi-metil-celulose, pectina, alginato de sódio, sais de ácido algínico, hidroxipropil propil metil celulose (HPMC), metil-celulose, carragenina, goma de gelano, goma de guar, goma de acácia, goma de xantana, goma de alfarroba, quitosano e derivados de quitosano, colágeno, ácido poliglicólico, amidos e amidos modificados, e uma mistura dos mesmos.

7. Composição seca estabilizante, de acordo com a reivindicação 2, caracterizada pelo fato de que o componente oligossacarídeo é ciclodextrinas, inulina, maltodextrinas, dextranos, fruto-oligossacarídeos (FOS), galacto-oligossacarídeos (GOS), manana-oligossacarídeos (MOS) e uma mistura dos mesmos.

8. Composição seca estabilizante, de acordo com a reivindicação 5, caracterizada pelo fato de que o componente de dissacarídeo é trealose, sacarose, lactose, e uma mistura das mesmas.

9. Composição seca estabilizante, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que compreende o ácido carboxílico entre 0,5 % e 20 %, com base no peso total da composição.

10. Composição seca estabilizante, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o ácido carboxílico é selecionado dentre o grupo consistindo de ácido láctico, ácido ascórbico, ácido maleico, ácido oxálico, ácido malônico, ácido málico, ácido succínico, ácido cítrico, ácido glucônico, ácido glutâmico, e uma mistura dos mesmos.

11. Composição seca estabilizante para material biológico, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que é seca em um estado amorfo vítreo.

12. Composição seca estabilizante, de acordo com a reivindicação 2, caracterizada pelo fato de que a proporção em peso de dis-

sacarídeos/oligosacarídeos/polissacarídeos é de 10:0,2:0,1 a 10:2:1.

13. Método para preparação da composição seca estabilizante para material biológico, como definida na reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) combinação de um material biológico com uma mistura de compostos como definida na reivindicação 1, em um solvente aquoso com a finalidade de formar uma pasta viscosa;

(b) congelação de encaixe da pasta fluida em nitrogênio líquido, com a finalidade de formar partículas, grânulos, gotas ou cordas sólidas congeladas;

(c) etapa de secagem primária de líquido da formulação, por evaporação, sob vácuo, a uma temperatura de formulação acima da sua temperatura de congelamento,

(d) secagem secundária da formulação no vácuo máximo e à temperatura de 20°C ou mais durante um tempo suficiente para reduzir a atividade da água da formulação.

14. Método para preparação, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que compreende ainda uma etapa de aclimatação da partícula sólida congelada antes de se iniciar a etapa de secagem primária.

15. Método para preparação, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que a composição seca estabilizante é seca em um estado amorfo vítreo.

16. Método para preparação, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que a pasta viscosa é solidificada com um hidrogel firme por variação de pH ou de temperatura ou por ligação cruzada de cadeias de polímeros antes da congelação de encaixe.

17. Método para preparação, de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que a pasta viscosa é moldada para

a forma desejada.

18. Método para preparação, de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que a etapa de aclimação é realizada sob vácuo e temperatura abaixo do ponto de congelamento da formulação.

19. Método para preparação, de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que a etapa de aclimação é realizada entre 0 e 60 minutos.

20. Método para preparação, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que a etapa de secagem primária de líquido é efetuada sob a pressão em vácuo maior do que  $> 0,26$  KPa (2000 mTorr).

21. Método para preparação, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que a composição seca estabilizante é cortada, triturada, moída ou respectivamente pulverizada em um pó de escoamento livre.

22. Método para preparação, de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato de que o pó tem um tamanho de partícula inferior a  $1000 \mu\text{m}$ .

23. Método para preparação, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que a atividade da água ( $A_w$ ) da composição seca estabilizante é  $A_w < 0,3$  ou inferior.

24. Formulação de carreamento oral, caracterizada pelo fato de que compreende a composição seca estabilizante, como definida na reivindicação 1, em que a formulação está na forma de um líquido de reconstituição, de um pó moído, um comprimido, um grânulo, uma cápsula, um alimento ou produto alimentar.

25. Formulação de carreamento oral, caracterizada pelo fato de que compreende a composição, como definida na reivindicação 1, em que o material biológico é estável durante a vida útil da formula-



ção.

26. Formulação de carreamento oral, caracterizada pelo fato de que compreende a composição seca estabilizante, como definida na reivindicação 1, em que a formulação é consumida como um alimento, alimentação animal, um produto nutracêutico, um produto farmacêutico ou um produto de vacina.

27. Composição seca estabilizante para material biológico, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que é consumida como um alimento, aditivo alimentar, alimentação animal, aditivo para alimentação animal, produto nutracêutico, produto farmacêutico ou um produto de vacina, sob a forma de uma barra, de uma fórmula líquida, suspensão coloidal, em pó, comprimido, cápsula.

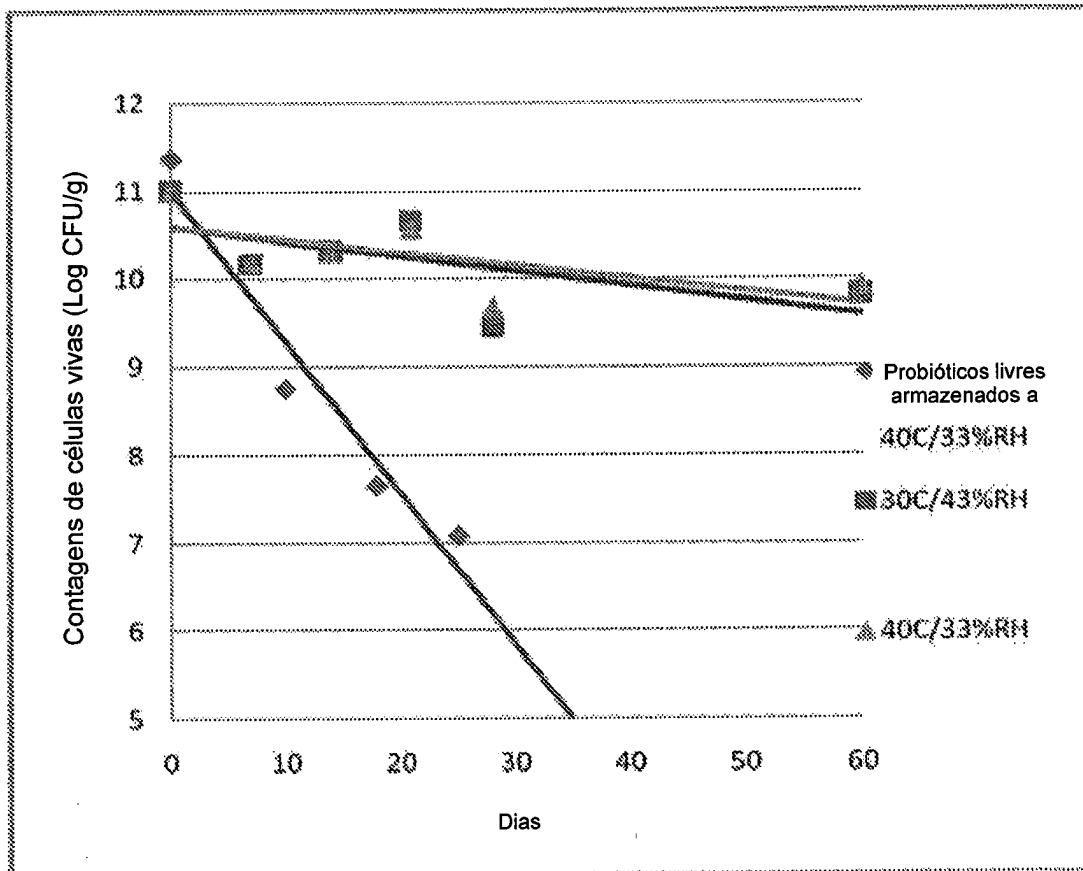


FIG. 1

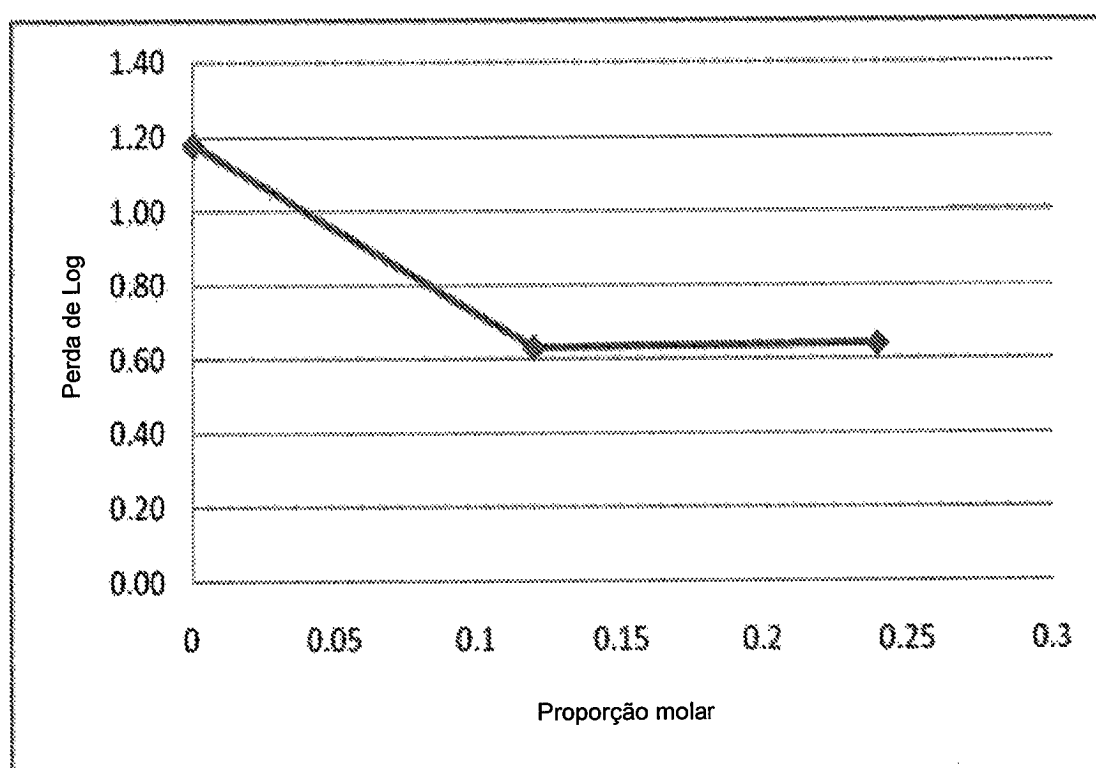


FIG. 2

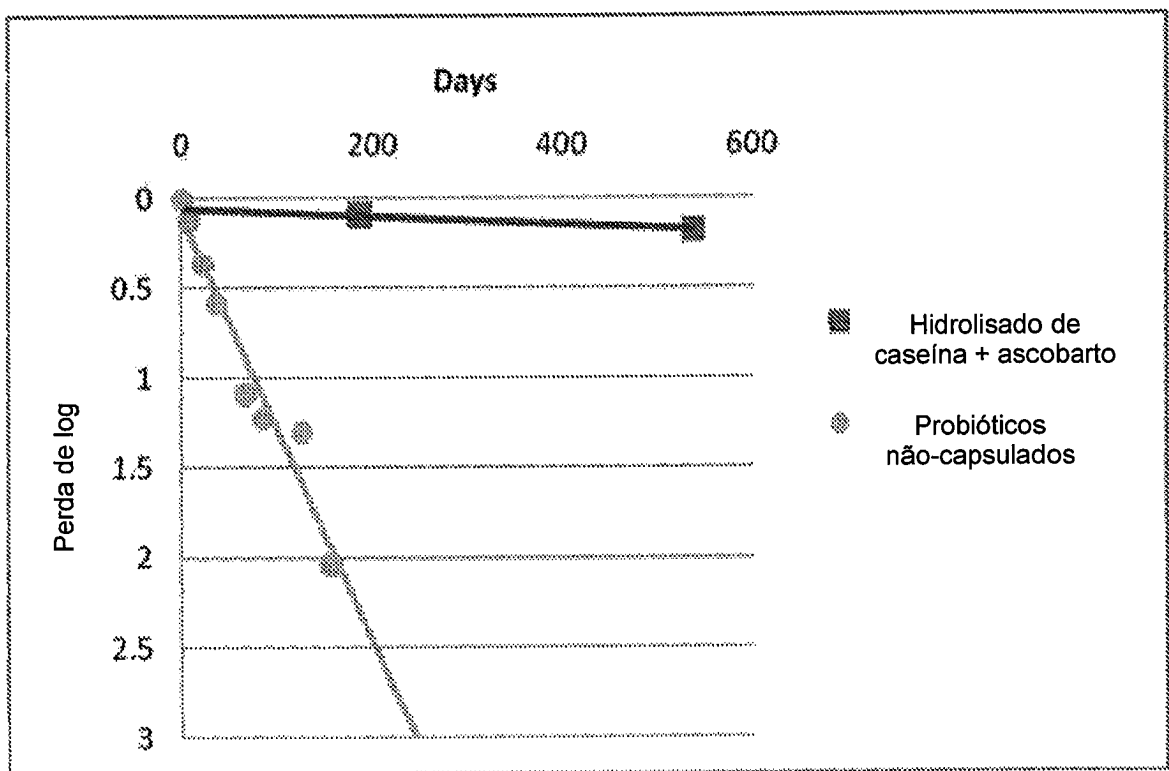


FIG. 3

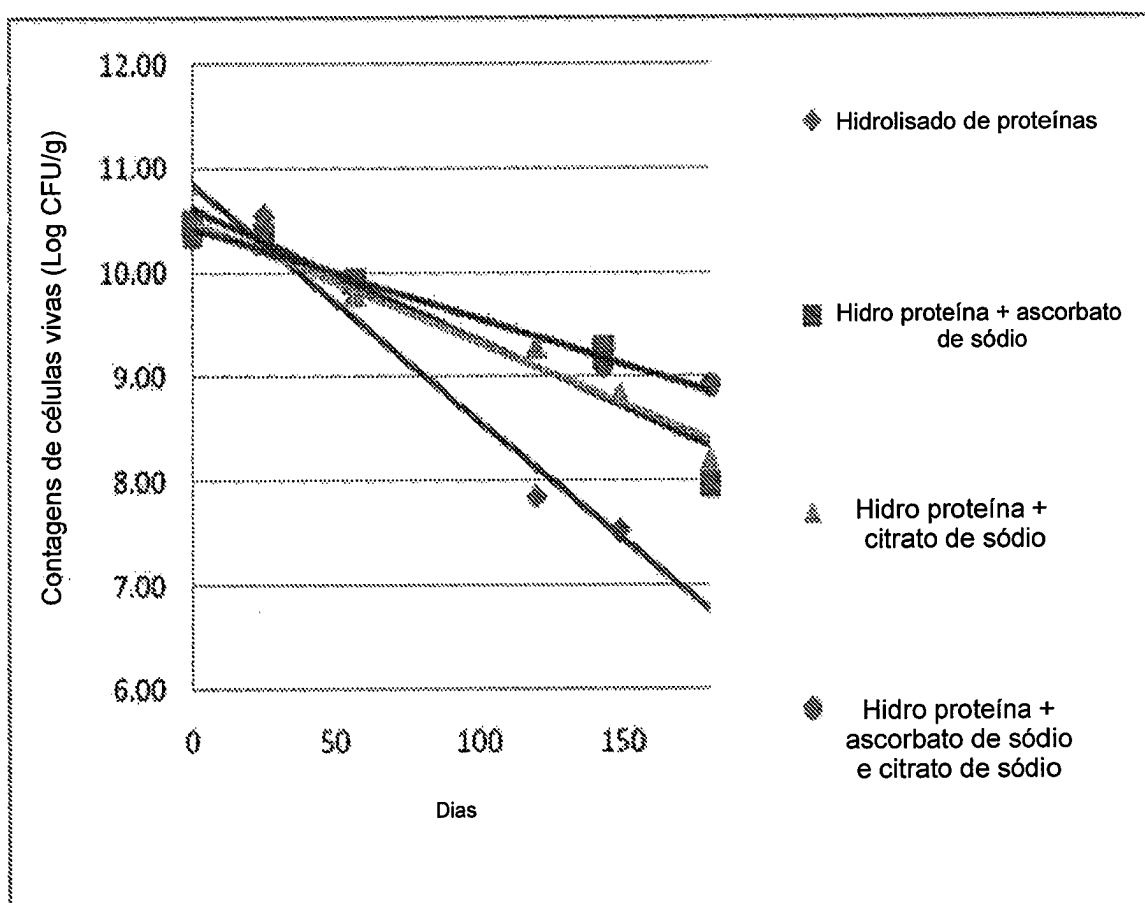


FIG. 4

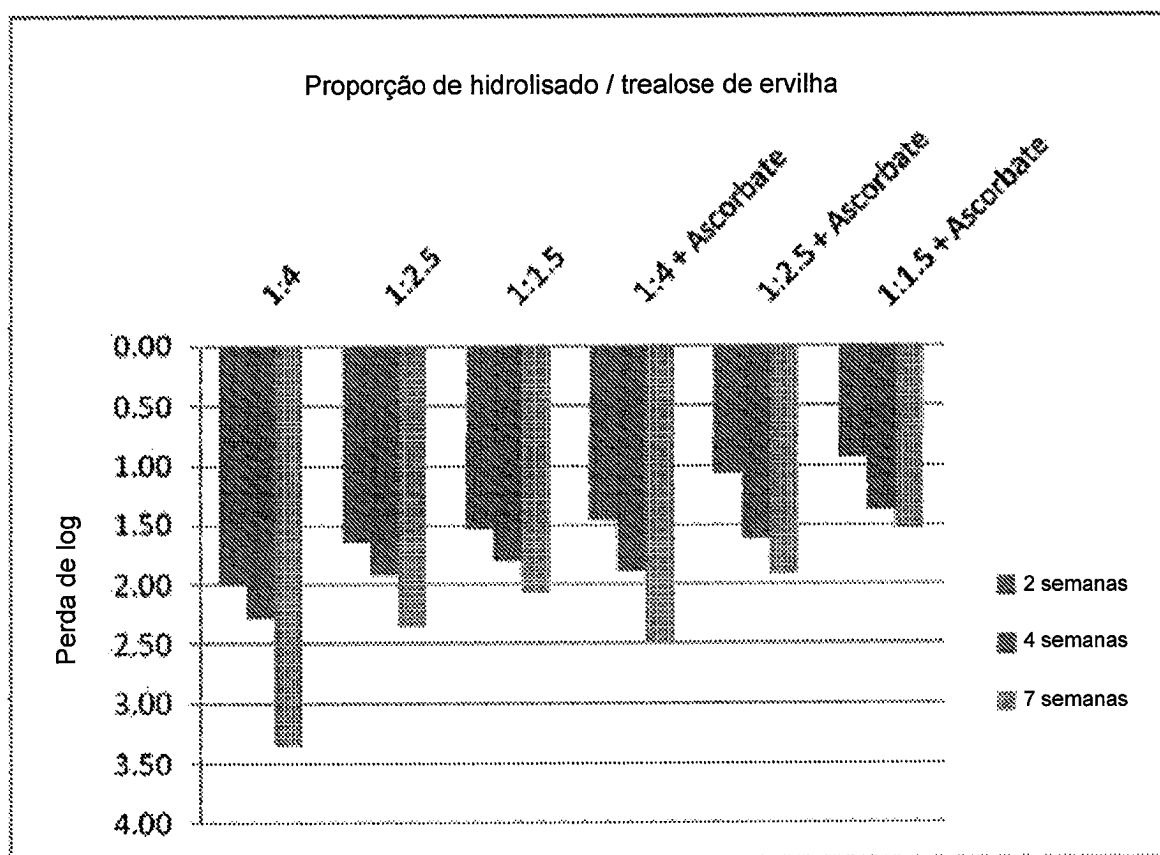


FIG. 5

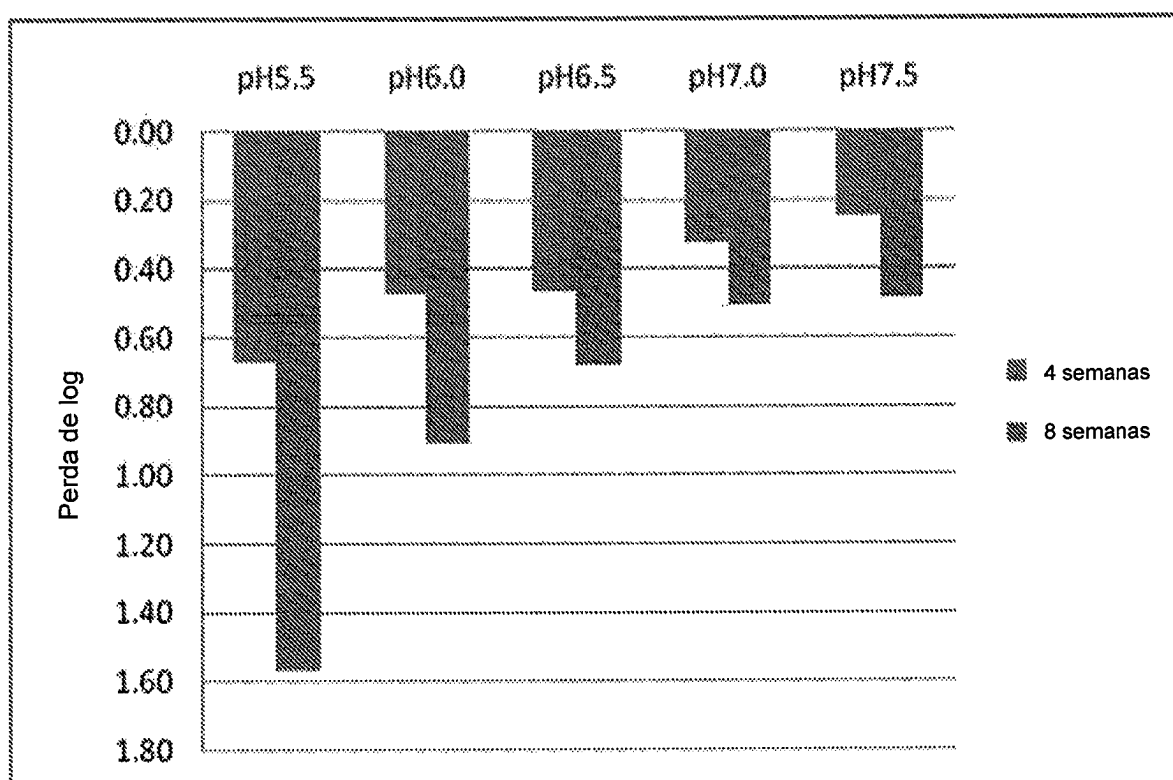


FIG. 6