

MINISTERIO DE INDUSTRIA Y ENERGIA  
Registro de la Propiedad Industrial



ESPAÑA

19 ES	11 NUMERO	10 A1
	21 486575	
	22 FECHA DE PRESENTACION	
	= 4 DIC. 1979	

(CASO O.Z.1009/31)

**PATENTE DE INVENCION**

Concedido el Registro de acuerdo con los datos que figuran en la presente descripción y según el contenido de la memoria adjunta.

40 PRIORIDADES:		
31 NUMERO	32 FECHA	33 PAIS
12392/78	5 Diciembre 1978	Suiza
47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C12K 1/02; A61K 9/50	
64 TITULO DE LA INVENCION		
"PROCEDIMIENTO PARA LA FABRICACION DE MICROBOLAS QUE COMPRENDEN MICROORGANISMOS"		
71 SOLICITANTE (S)		
SOCIETE DES PRODUITS NESTLE S.A.		
DOMICILIO DEL SOLICITANTE		
VEVEY (Suiza)		
72 INVENTOR (ES)		
Tomaso SOZZI, Alfred SCHRENK y Marcel BUHLER		
73 TITULAR (ES)		
SOCIETE DES PRODUITS NESTLE S.A.		
74 REPRESENTANTE		
D. JAIME ISERN CUYAS, Agente Oficial de la Propiedad Industrial.		

POOR  
QUALITY

MEMORIA DESCRIPTIVA

El presente invento tiene por objeto una microbota que comprende microorganismos y su procedimiento de fabricación.

5. El uso sistemático de antibióticos presenta peligros indudables, dado que altera la flora intestinal y favorece el desarrollo de mutantes resistentes a los antibióticos. La flora intestinal se compone en más del 80% de lactobacilos y de bifidobacterias. Estas últimas, llamadas en el pasado Lactobacillus bifidus, forman actualmente el género distinto Bifidobacterium. Las bifidobacterias son características de la flora intestinal de los recién nacidos con buena salud. Se busca actualmente la sustitución de los antibióticos por cultivos puros de microorganismos capaces de regenerar o de reconstituir una flora intestinal sana y vigorosa que impida el desarrollo de los gérmenes patógenos. Pero un microorganismo del género Lactobacillus es en general anaerobio y un microorganismo del género Bifidobacterium es incluso estrictamente anaerobio, lo que hace que sea difícil conservarlos vivos fuera de su medio natural que es el intestino y conservarlos largo tiempo en medicamentos.
- 10.
- 15.
- 20.

- El presente invento se propone satisfacer la necesidad de un medio de presentación, de conservación y de utilización por vía oral de microorganismos de la flora
- 25.

intestinal. El presente invento proporciona dicho medio en forma de una microbola que comprende microorganismos.

La microbola según el invento se caracteriza porque comprende microorganismos del género Lactobacillus

5. y/o Bifidobacterium y/o de otros géneros de la flora intestinal envueltos en una grasa sólida a la temperatura del cuerpo.

10. En efecto, se ha descubierto que era posible presentar estos microorganismos en forma de microbolas de grasa sólida en las que conservan toda su vitalidad incluso después de una larga conservación de los microorganismos a temperatura ambiente, en el frigorífico a 5°C, o en el congelador a -30°C, por ejemplo.

15. Se ha comprobado que es posible administrar estas microbolas por vía oral y que lo esencial de su contenido en microorganismos llegaba intacto al tracto intestinal sin haberse dañado por las condiciones fuertemente ácidas, pH inferior a 2, que reinan en el estómago. Así, un microorganismo conocido como frágil, como por ejemplo
20. un Bifidobacterium, puede ser conservado y administrado sin problemas a partir de ahora. El presente invento representa por tanto un paso decisivo en la búsqueda de la sustitución de antibióticos por medios naturales que permitan reconstituir una flora intestinal sana y vigorosa que se oponga
25. a la proliferación de microorganismos patógenos.

- El presente invento comprende igualmente un procedimiento de fabricación de estas microbolas, caracterizado porque se prepara una dispersión de microorganismos del género Lactobacillus y/o Bifidobacterium y/o de otros
5. géneros de la flora intestinal en la grasa fundida que presenta un punto de fusión superior a la temperatura del cuerpo, se pulveriza la dispersión en un recinto en el que la temperatura es inferior al punto de fusión de la grasa y se recogen las microbolas solidificadas.
  10. Es esencial que los microorganismos no se pongan en contacto con el aire. Una grasa sólida a temperatura ambiente los mantiene al abrigo del aire durante todas las manipulaciones que preceden la ingestión. Esta grasa debería permanecer también sólida durante el paso por el estómago,
  15. de modo que los gérmenes que contiene estén todo el tiempo protegidos contra la acidez. Se elige así de preferencia una grasa comestible vegetal, en particular una grasa hidrogenada de palma, de cacahuete, de nuez de coco, de cacao, de colza, o de soja, o animal, cuyo punto de fusión esté
  20. comprendido entre 40 y 60°C. No es recomendable emplear una grasa cuyo punto de fusión sea superior a 60°C, porque la temperatura necesaria para licuar esta grasa y preparar la emulsión podría destruir los microorganismos cuya viabilidad se desea precisamente conservar totalmente.
  25. De preferencia, las microbolas comprenden ...

- de  $10^7$  a  $10^{10}$  individuos o gérmenes de Lactobacillus y/o Bifidobacterium revivibles por gramos de grasa. Las microbolas pueden comprender, entre otros, los microorganismos Bifidobacterium (B.) animalis P23 o B.sui Su 806, o B infantis Bi 1 y Bi 5 y/o B. longum B1 10 y B1 11 y/o B. Breve Bbr 8 obtenidos en el instituto de microbiología agrícola de la universidad de Bolonia en Italia. Las microbolas tienen de preferencia un diametro comprendido entre 0,1 y 0,5 mm. Un diametro inferior no presenta ningún inconveniente grave, excepto que la relación entre la superficie y el volumen es mayor, lo que significa una pérdida más grande de microorganismos tomados incompletamente en la masa. Un diametro superior no presenta tampoco inconvenientes considerables, con la excepción de que puede oponerse al paso a través de agujeros pequeños, como orificios de tetinas de biberón por ejemplo. A fin de mejorar las propiedades de fluidez de un polvo formado por una cantidad de estas bolas, o evitar en todo lo posible la formación de aglomerados de microbolas, se las puede revestir con una capa de un agente antiglomerante, como por ejemplo una proteína. Se obtienen especialmente muy buenos resultados con una capa exterior de cefina o de un agente protector utilizado en farmacia.

- Para poner en práctica el procedimiento de fabricación de las microbolas según el presente invento, se

pueden cultivar los microorganismos en un medio líquido apropiado hasta la producción de una cantidad suficiente de células y recoger éstas por centrifugación. Después se las puede dispersar finamente tal cuales, o previo socado por criodesecación, en grasa fundida que tenga un punto de fusión comprendido entre 40 y 60°C, a razón de  $10^7$  a  $10^{10}$  individuos o gérmenes por gramos de grasa.

Para formar las microbolas, se puede pulverizar la dispersión al mismo tiempo que nitrógeno líquido en la cúspide de un recinto lleno de aire esterilizado, por ejemplo.

Pero en una modalidad de realización preferida, idónea para fabricar todas las microbolas de grasa que contienen un agente activo delicado al que no conviene el aire, el calor y el ácido por ejemplo, se pulveriza la dispersión de agente activo en grasa fundida en la cúspide de un recinto que presenta una zona superior de temperatura moderada y una zona inferior a baja temperatura.

Se ha comprobado, en efecto, que de este modo se podían obtener microbolas con una buena esfericidad y que presentasen poca dispersión en el grosor.

De preferencia, se pulveriza la dispersión en la cúspide del recinto a una presión comprendida entre 3 y 6 bares. A una presión inferior a 3 bares se produce una dispersión excesiva en el grosor de las bolas. A una presión superior a 6 bares se obtienen bolas demasiado



5 a 15°C. Se los puede acondicionar, conservar y utilizar tal cuales o revestirlos primeramente con una capa de materia que impida que se peguen entre sí, es decir, con un agente antiaglomerante. Este agente puede ser, por ejemplo, una proteína, concretamente la caseína o un agente protector utilizado en farmacia. Esta capa se puede aplicar pulverizando una solución de este agente sobre las microbolas, por ejemplo en lecho fluidizado. Las microbolas pueden conservarse en el refrigerador, en el congelador o a temperatura ambiente.

10. Las microbolas según el presente invento se pueden administrar directamente por vía oral, o mezcladas con ciertos alimentos, sólidos o líquidos. Por ejemplo, las microbolas pueden mezclarse con leche con la cual se llena el biberón del lactante, ya que sus dimensiones les permiten pasar a través del orificio o los orificios de la tetina.

15. A continuación se dan algunos ejemplos a título ilustrativo. Los porcentajes y partes se expresan en peso, salvo indicación en contrario.

Ejemplo 1

20. En una cuba de 100 l se preparan 80 l de medio de cultivo TSAR que presenta la composición siguiente, en tantos por ciento :

Extracto de levadura	0,25 %
Tripticasa	1,00
25. Fitona	0,50

	Glucosa	1,50
	L-cisteína HCL	0,05
	$K_2HPO_4$	0,25
	$ZnSO_4$	0,025
5.	$FeCl_3$	Trazas
	Agua	Resto al 100 %.

- Se inocula con 1 l de cultivo de 20 h. de Bifidobacterium animalis P 23 obtenido en el instituto de microbiología agrícola de la universidad de Bolonia, en Italia. Se incuba 12 horas a 37°C. Se centrifuga el caldo de cultivo y se colectan 240 g de células. Se las diluye en 250 ml de leche desnatada a la que se ha adicionado el 7% de lactosa. Se congela la mezcla con el nitrógeno líquido. Se liofiliza a 40°C durante una noche. Se prepara una dispersión al 5% del polvo obtenido en grasa vegetal hidrogenada que tiene un punto de fusión de 42° y licuada a 45°C.

- Se inyecta la dispersión a 45°C a una presión de 4 bares, al mismo tiempo que el nitrógeno líquido, a razón de 1 parte de dispersión por 5 partes de nitrógeno, en la cúspide de un cilindro vertical de 1,5 m de diámetro y 10 m de altura. En el fondo del cilindro se coloca un recipiente que contiene nitrógeno líquido en el que se recogen microbolas cuyo diámetro oscila entre 0,1 y 0,5 m.

25.

Se pone un tercio de las microbolas en lecho fluidificado y se pulveriza sobre el lecho una solución alcohólica al 8% de ceína, en una cantidad tal que la capa de ceína formada alrededor de las microbolas represente el 5 % de su peso.

5.

De modo análogo, a partir de una mezcla de Budragit L y S (polímeros aniónicos del ácido metacrílico y de ésteres del ácido metacrílico) en solución al 10% en alcohol isopropílico, se reviste un segundo tercio de las microbolas con una capa que representa del 5 al 10% en peso de las microbolas. Al cabo de 6 meses de conservación en el frigorífico a 5°C, así como a la temperatura ambiente, los tres tipos de microbolas contienen todavía más de  $10^8$  microorganismos vivos por gramo.

10.

15.

Ejemplo 2

Se procede de la manera que se ha descrito en el ejemplo 1, con excepción de que en el fondo del cilindro se recogen las microbolas sobre una cinta transportadora enfriada a 5°C.

20.

Ejemplo 3

Se procede de la manera que se ha descrito en el ejemplo 1, con la excepción de que en vez del medio de cultivo TSAR, se utiliza un medio de cultivo que posee la siguiente composición, en tantos por ciento :

25.

Extractos de levadura

0,10 %

	Tripticasa	0,25
	Bacto soytone	0,25
	Glucosa	0,50
	L-cisteína HCl	0,001
5.	$K_2HPO_4$	0,10
	$MgCl_2$	0,002
	$ZnSO_4$	0,001
	$FeCl_3$	0,0002
	Filtrado de suero	4,00
10.	Licor de remojo de maíz	0,50
	Agua destilada	Resto hasta 100 %

Ejemplo 4

Se procede de la manera que se ha descrito en el ejemplo 1, con excepción de que se inocula el medio con 1 l de un cultivo de Lactobacillus acidophilus en vez de Bifidobacterium animalis.

Ejemplo 5

Se procede de la manera que se ha descrito en el ejemplo 1, excepto que se inyecta la dispersión en la cúspide de un cilindro vertical de 1,5 m de diámetro y 2,5 m en vez de 10 m de altura.

Ejemplo 6

Se administra en seco a ratas las microbolas revestidas de cefina y conservadas 6 meses del ejemplo 1, a razón de 1 g por comida por día. Al día siguiente se

5. cuentan miles de millones de bifidobacterias en las deposiciones de ratas a las que se administraron las microbolas (ratas tratadas), mientras que las deposiciones de ratas que no han ingerido microbolas (ratas no tratadas) no presentan bifidobacterias. En la tabla siguiente se consiguan los resultados de análisis comparativos de deposiciones de ratas tratadas y no tratadas :

10.

	Antes del tratamiento		Después de 7 días de tratamiento	
	Número total de gérmenes (mil/g)	de los cuales Bifidus (%)	Número total de gérmenes (ml/g)	de los cuales Bifidus (%)
15. Ratas no tratadas	5 000	0	6 500	0
Ratas tratadas	5 500	0	7 500	75

20. Un ensayo de hibridación del DNA de los cultivos de laboratorio con el DNA de las bifidobacterias aisladas de las deposiciones confirma que los dos microorganismos son los mismos. Por lo tanto, las bifidobacterias han sobrevivido a la conservación y al paso al interior del estómago y se han multiplicado en el tracto digestivo de la rata

Ejemplo 7

25. Con el objeto de administrarlas a lechones, se

preparan según el presente invento microbolas que contienen en el microorganismo Bifidobacterium suis Su 806 obtenido en el instituto de microbiología agrícola de la universidad de Bolonia.

5. Ejemplo 8

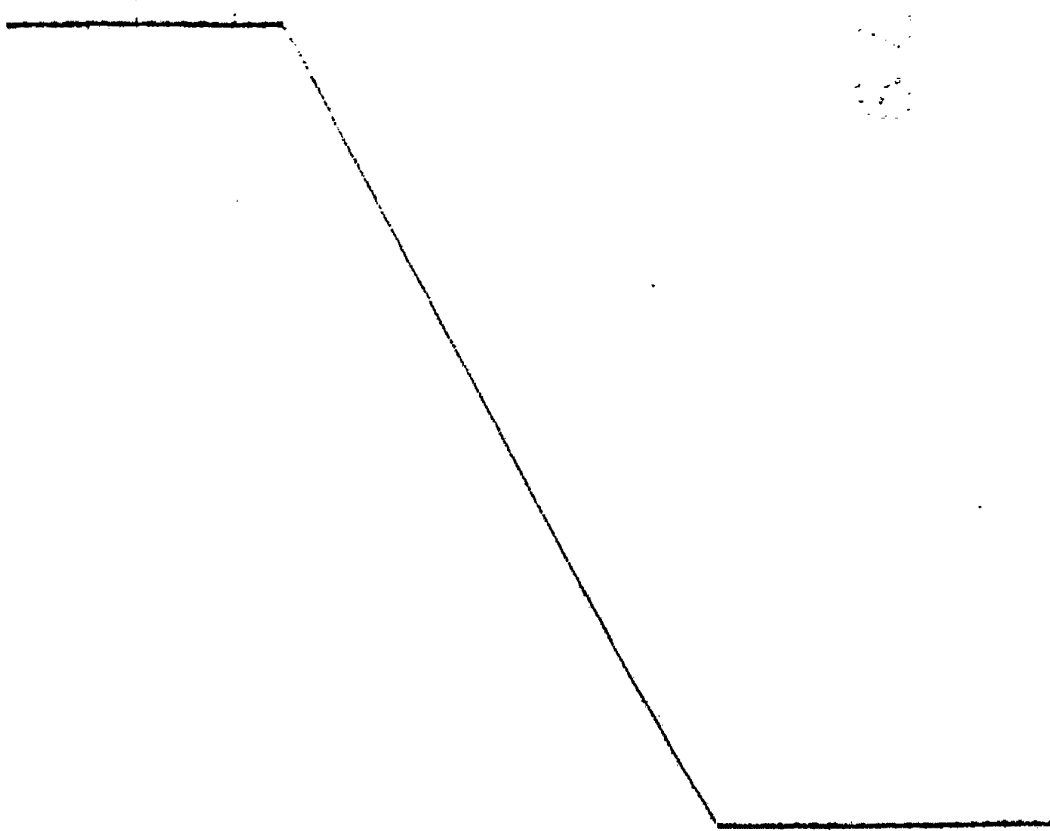
A fin de administrarlas a lactantes al efectuar ensayos clínicos, se preparan según el presente invento microbolas que comprenden los microorganismos Bifidobacterium infantis Bi 1 y Bi 5, Bifidobacterium longum Bi 10 y Bi 11 Bifidobacterium breve Bbr 8 obtenidos en el instituto de microbiología agrícola de la universidad de Bolonia.

15. Con tal fin se preparó una biomasa liofilizada de los microorganismos de más arriba. Se dispersaron 0,25 partes de biomasa liofilizada en 5 partes de aceite de palma hidrogenada fundida a una temperatura de 45°C. Sirviéndose de una boquilla SPRAYING SYSTEM CO 5510/422, se pulverizan a 5,5 bares 75 l/hora de dispersión en la cúspide de una cuba de 2,7 m de altura con fondo en embudo.
20. Se mantiene en la parte superior de la cuba una temperatura de 26°C. Se mantiene en la parte inferior de la cuba una temperatura de -145°C inyectando por abajo y a una presión de 1,6 bares, por medio de una boquilla con deflector, una nube de nitrógeno líquido cuya cúspide culmina a 1,2 m
25. por debajo de la boquilla de inyección de grasa. Se recogen

en el fondo del embudo unas microbolas bien redondas cuyo diámetro está comprendido entre 0,1 y 0,2 mm y que contienen  $4 \cdot 10^8$  gérmenes revivibles por gramo.

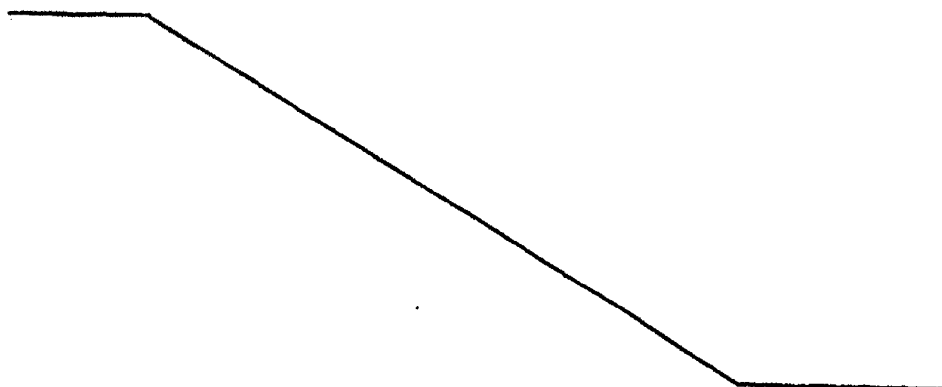
Ejemplo 9-12

5. Se preparan microbolas de la manera que se ha descrito en el ejemplo 8, con excepción de que se inyecta la dispersión y el nitrógeno a diferentes presiones ( $p_D$  y  $p_{N_2}$ ) y que las temperaturas en la parte superior ( $T_H$ ) y en la parte inferior ( $T_B$ ) de la cuba son igualmente variadas. En el cuadro siguiente se agrupan las condiciones de diversos ensayos y los resultados observados con el microscopio.
- 10.



Ejemplo	P <sub>D</sub>	P <sub>N<sub>2</sub></sub>	T <sub>H</sub>	T <sub>B</sub>	Resultados	
Nº	(bares)	(bares)	(°C)	(°C)	(visto con el microscopio)	
5.	9	3,5	1,3	-9,5	-110	Bolas de diametro (∅) de 0,2 a 0,5 mm. Poca dispersión Buena esfericidad
	10	10	1,3	-22,3	-94,2	Bolas de ∅ inferior a 0,1 mm. Demasiadas bolas minúsculas. Bastones en cantidad
10.	11	4	1,6	21	-150	Bolas esféricas de ∅ 0,3 a 0,5 mm. Poca dispersión
15.	12	10	1,6	19,6	-143	Bolas esféricas poro de ∅ inferior a 0,1 mm.

20. Los microorganismo B.animalis P 23 y B.sui Su 806 fueron registrados en el "American Type Culture Collection" en Estados Unidos de América y figuran en el catálogo del año 1978 de esta colección bajo los números ATCC 27536 y 27686. En cuanto a los microorganismos B.infantis Bi 5, B.breve Bbr 8, B-longum Bl 10 y B 11 fueron registrados el día 29 de octubre de 1979 en la "Collection Nationales des Cultures de Microorganismes" del "Institut Pasteur" en Francia y han recibido los Nos respectivos I-100, I-101, I-120 y I-103.



N O T A

Descrito el objeto del presente invento se declaran como nuevas y de propia invención las siguientes reivindicaciones.

5. 1.- Procedimiento para la fabricación de microbolas que comprenden microorganismos, caracterizado porque se prepara una dispersión de microorganismos del género Lactobacillus y/o Bifidobacterium y/u otros géneros de la flora intestinal en la grasa sólida fundida, que tiene un punto de fusión superior a la temperatura del cuerpo, se pulveriza la dispersión en un recinto en que hay una temperatura inferior al punto de fusión de la grasa y se recogen las microbolas solidificadas, con un diametro preferentemente comprendido entre 0,1 y 0,5 m/m.
- 10.
15. 2.- Procedimiento de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado en su realización porque se dispersan en la grasa fundida microorganismos liofilizados.
20. 3.- Procedimiento de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la citada dispersión se prepara con microorganismo Bifidobacterium animalis P 23 o B.sui Su 806, o B. infantis Bi 1 y Bi 5 y/o B.longum B1 10 y B1 11 y/o B. breve Bbr 8 obtenidos en el instituto de microbiología agrícola de la universidad de Bolonia, en Italia.
25. 4.- Procedimiento de conformidad con la rei-

vindicación 1, caracterizado porque la citada dispersión se prepara a razón de  $10^7$  a  $10^{10}$  individuos o gérmenes de Lactobacillus y/o Bifidobacterium por gramo de grasa.

- 5.- Procedimiento de conformidad con la reivin-
5. dicación 1, caracterizado porque para su realización se parte de una grasa cuyo punto de fusión está comprendido entre 40 y 60°C, preferentemente constituida por una grasa animal o vegetal, en particular una grasa hidrogenada de palma, de cacahuetes, de nuez de coco, de cacao, de colza o de soja.
10. 6.- Procedimiento de conformidad con la reivin-
- dicación 1, caracterizado porque en una etapa final de su realización se revisten las microcápsulas con un agente antiaglomerante, en particular la ceína.
- 7.- Procedimiento de conformidad con la reivin-
15. dicación 1, caracterizado porque la dispersión del agente activo en la grasa fundida y se pulveriza en la cúspide de un recinto que presenta una zona superior a temperatura moderada y una zona inferior a baja temperatura.
- 8.- Procedimiento de conformidad con la reivin-
20. dicación 7, caracterizado porque la citada pulverización de la dispersión se lleva a cabo a una presión de 3 a 6 bares.
- 9.- Procedimiento de conformidad con la reivin-
25. dicación 7, caracterizado porque la temperatura en la zona superior del recinto donde se verifica la pulverización de la dispersión está comprendida entre -10°C y la temperatura

de fusión de la grasa.

10.- Procedimiento de conformidad con la reivindicación 7, caracterizado porque en el citado recinto donde se pulveriza la dispersión se crea una baja temperatura en la zona inferior pulverizando en ella nitrógeno líquido.

11.- Procedimiento para la fabricación de microbolas que comprenden microorganismos.

Según se describe y reivindica en la presente memoria descriptiva que consta de 18 páginas foliadas y escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, a - 4 DIC. 1979

P.a.

JAIME ISERN

P. P.

Firmado: JESUS PICAZO

rr.