



**MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO**  
**DIREZIONE GENERALE PER LA LOTTA ALLA CONTRAFFAZIONE**  
**UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI**

<b>DOMANDA DI INVENZIONE NUMERO</b>	<b>102019000006056</b>
<b>Data Deposito</b>	<b>18/04/2019</b>
<b>Data Pubblicazione</b>	<b>18/10/2020</b>

Classifiche IPC

<b>Sezione</b>	<b>Classe</b>	<b>Sottoclasse</b>	<b>Gruppo</b>	<b>Sottogruppo</b>
C	12	N	1	04

Titolo

Procedimento per la preparazione di una biomassa di cellule di batteri liofilizzate stabili e determinazione della loro stabilita mediante un metodo citofluorimetrico

DESCRIZIONE dell'invenzione avente per titolo:

"PROCEDIMENTO PER LA PREPARAZIONE DI UNA BIOMASSA DI CELLULE DI BATTERI LIOFILIZZATE STABILI E DETERMINAZIONE DELLA LORO STABILITA' MEDIANTE UN METODO CITOFUORIMETRICO"

A nome: PROBIOTICAL S.P.A.  
Di nazionalità: Italiana  
Con domicilio in: Via E. Mattei 3, 28100 Novara  
(NO), Italia  
Inventori designati: MOGNA Vera, PANE Marco, ALLESINA  
Serena

\*\*\*\*\*

CAMPO DELL'INVENZIONE

La presente invenzione si riferisce a una biomassa di cellule di batteri liofilizzate, ad elevata concentrazione e stabili. Inoltre, la presente  
5 invenzione si riferisce a un procedimento per la preparazione di detta biomassa di cellule di batteri liofilizzate, ad elevata concentrazione e stabili. Le cellule di batteri liofilizzate della presente invenzione hanno una stabilità in termini di vitalità  
10 espressa in AFU, determinata mediante un metodo citofluorimetrico, maggiore rispetto alla stabilità determinata sulle stesse cellule mediante conta in piastra ed espressa in UFC.

Infine, la presente invenzione si riferisce a una composizione farmaceutica, o una composizione per dispositivo medico, o una composizione per uso cosmetico, o una composizione per integratore alimentare o una composizione per un prodotto alimentare o una  
5 composizione per un alimento a fini medici speciali - AFMS (tutte quante queste composizioni denominate, per brevità, le "composizioni della presente invenzione") comprendenti, dette composizioni, detta biomassa di  
10 cellule di batteri liofilizzate, ad elevata concentrazione e stabili.

#### SFONDO DELL'INVENZIONE.

Negli ultimi anni, i prodotti contenenti cellule di  
15 batteri stanno guadagnando quote di mercato sempre maggiori sia nel settore alimentare (ad esempio per la produzione di prodotti caseari), sia nel settore degli integratori alimentari (ad esempio prodotti probiotici), che in quello farmaceutico come *Live Biotherapeutic*  
20 *Products* (LBP).

In tali settori industriali, e con specifico riferimento a questo tipo di prodotti, sono di estrema importanza gli aspetti connessi alla stabilità e vitalità delle cellule di batteri. La stabilità in termini di vitalità  
25 ed integrità delle cellule di batteri dipende molto dal procedimento con il quale vengono prodotte. Infatti, i microrganismi o le cellule di batteri contenuti in detti prodotti sono molto sensibili alle condizioni e ai parametri di processo per la loro produzione e risentono  
30 molto anche delle condizioni ambientali di

conservazione, in particolare le cellule di batteri sono sensibili e risentono della temperatura, luce, raggi UV, ossigeno, acqua libera, umidità dell'ambiente di produzione e conservazione a valle del processo  
5 produttivo. Inoltre, una gran parte dei microrganismi sono anaerobi o, comunque, estremamente sensibili all'esposizione all'ossigeno a causa della generazione di radicali liberi dell'ossigeno che riducono la loro vitalità.

10 Tale circostanza costituisce quindi uno dei principali limiti nella distribuzione di biomasse di cellule di batteri in determinate zone geografiche (a titolo di esempio, nelle zone IV.A e IV.B individuate dall'Organizzazione Mondiale della Sanità; *World Health*  
15 *Organization*), in cui è estremamente difficoltoso assicurare condizioni tali da garantire una vitalità di un numero di microrganismi o cellule di batteri sufficientemente elevato, e per tempi sufficientemente lunghi, da avere ancora un'efficacia significativa  
20 all'atto del loro impiego o consumo.

Nell'Ottobre del 2005, la WHO ha raccomandato di dividere in due diverse zone la zona climatica IV, introducendo la zona IV.A (calda e umida) e la zona IV.B (calda e molto umida). Quindi esistono oggi 5 diverse  
25 zone climatiche e 5 diverse condizioni per l'esecuzione degli studi di stabilità, da utilizzare a seconda del mercato target:

- ZONA I: Clima temperato - Condizioni di stoccaggio a lungo termine: 21°C / 45% U.R.
- 30 • ZONA II: Clima subtropicale e mediterraneo -

Condizioni di stoccaggio a lungo termine: 25°C / 60% U.R.

• ZONA III: Clima caldo e secco - Condizioni di stoccaggio a lungo termine: 30°C / 35% U.R.

5 • ZONA IV.A: Clima caldo e umido - Condizioni di stoccaggio a lungo termine: 30°C / 65% U.R.

• ZONA IV.B: Clima caldo e molto umido - Condizioni di stoccaggio a lungo termine: 30°C / 75% U.R.

Allo scopo di facilitare la conoscenza delle condizioni  
10 richieste per l'esecuzione degli studi nei diversi Paesi, la WHO ha pubblicato una lista degli Stati aderenti, con la relativa condizione di stoccaggio a lungo termine nella linea guida WHO *Technical report series N° 953, 2009, Annex 2 "Stability testing of*  
15 *active pharmaceutical ingredients and finished pharmaceutical products"*.

Pertanto è sentita la necessità di poter disporre di un procedimento facile da eseguire e riproducibile per la preparazione di una biomassa di cellule di batteri  
20 liofilizzate, ad elevate concentrazioni, stabili e vitali in grado di poter essere trasportate, lavorate, commercializzate e conservate in paesi presenti in zone climatiche IV.A e IV.B.

25 RIASSUNTO DELL'INVENZIONE.

La presente invenzione si colloca quindi nel precedente contesto, proponendosi di fornire (1) una biomassa di cellule di batteri liofilizzate, ad elevata concentrazione e stabili; (2) un procedimento per la  
30 preparazione di detta biomassa di cellule di batteri

liofilizzate, ad elevata concentrazione e stabili; e (3) una composizione farmaceutica, o una composizione per dispositivo medico, o una composizione per uso cosmetico, o una composizione per integratore alimentare  
5 o una composizione per un prodotto alimentare o una composizione per un alimento a fini medici speciali - AFMS (tutte quante queste composizioni denominate, per brevità, le "composizioni della presente invenzione") comprendenti, dette composizioni, detta biomassa di  
10 cellule di batteri liofilizzate, ad elevata concentrazione e stabili.

Le cellule di batteri liofilizzate, oggetto dell'invenzione, sono cellule con una parete cellulare  
15 (o parete di membrana cellulare) ben conservata in un buono stato fisiologico e, quindi, sono cellule integre e vitali. L'integrità della parete cellulare (o della parete di membrana cellulare) conferisce alle cellule stesse una maggiore stabilità in termini di vitalità  
20 espressa in AFU e determinata mediante un metodo citofluorimetrico. La stabilità è maggiore rispetto alla stabilità determinata sulle stesse cellule mediante conta in piastra ed espressa in UFC. Una maggiore stabilità consente di avere una biomassa di cellule di  
25 batteri con una *shelf-life* prolungata, mentre una maggiore vitalità delle cellule consente di avere un'attività ed un'efficacia superiore una volta impiegate o somministrate ad un soggetto in trattamento.

30 Forma oggetto della presente invenzione una biomassa di

cellule di batteri liofilizzate, ad elevata concentrazione e stabili, avente le caratteristiche come definite nelle unite rivendicazioni.

5 Forma un altro oggetto della presente invenzione un procedimento per la preparazione di detta biomassa di cellule di batteri liofilizzate, ad elevata concentrazione e stabili, avente le caratteristiche come definite nelle unite rivendicazioni.

10

Forma un altro oggetto ancora della presente invenzione una composizione farmaceutica, o una composizione per dispositivo medico, o una composizione per uso cosmetico, o una composizione per integratore alimentare  
15 o una composizione per un prodotto alimentare o una composizione per un alimento a fini medici speciali - AFMS (tutte quante queste composizioni denominate, per brevità, le "composizioni della presente invenzione") comprendenti, dette composizioni, detta biomassa di  
20 cellule di batteri liofilizzate, ad elevata concentrazione e stabili, avente le caratteristiche come definite nelle unite rivendicazioni.

Forme preferite della presente invenzione sono di  
25 seguito riportate in maggior dettaglio senza voler in nessun modo limitare la portata della presente invenzione.

BREVE DESCRIZIONE DEI DISEGNI.

30 La presente invenzione verrà ora descritta con l'ausilio

delle tavole allegate, fornite a solo scopo illustrativo, in cui:

- Figura 1 mostra un primo diagramma secondo l'Esempio 6, test A) discusso a seguire;
- 5 - Figura 2 mostra un secondo diagramma secondo l'Esempio 6, test B) discusso a seguire;
- Figura 3 mostra un terzo diagramma secondo l'Esempio 6, test C) discusso a seguire;
- Figura 4 esemplifica la velocità di decadimento (k)
- 10 dell'Esempio 6, relativo alla ZONA IV.B, assimilabile alla pendenza della retta di interpolazione.

#### DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE.

Dopo un'intensa e prolungata attività di ricerca e  
15 sviluppo, motivata e supportata da una serie di dati sperimentali molto promettenti, la Richiedente è giunta a comprendere l'importanza che riveste la parete delle cellule dei batteri (parete cellulare) presenti in una biomassa (insieme di cellule di batteri).

20 Le risultanze sperimentali hanno confermato che il mantenimento di un buono stato di conservazione ed integrità della parete cellulare durante tutte le fasi di preparazione di una biomassa di cellule di batteri liofilizzate consente di ottenere cellule di batteri  
25 stabili, vitali e ad elevata concentrazione, mediante un processo ottimizzato e riproducibile.

Quanto sopra è stato possibile grazie a uno specifico procedimento di preparazione di una biomassa di cellule di batteri liofilizzate, oggetto della presente  
30 invenzione. Inoltre, quanto sopra è stato anche

possibile grazie a una procedura, oggetto della presente invenzione, che prevede la combinazione di detto procedimento di preparazione con un metodo per valutare la parete cellulare. Il metodo per valutare la parete  
5 cellulare, anch'esso oggetto della presente invenzione, consente di valutare se detta parete cellulare è ben conservata in un buono stato fisiologico. La conservazione di un buono stato fisiologico e l'integrità della parete cellulare sono importanti per  
10 la stabilità e la vitalità (*vitality*) delle cellule.

Il monitoraggio e la valutazione di un buono stato di conservazione ed integrità della parete cellulare, eseguita in tutte le fasi del procedimento di  
15 preparazione di detta biomassa di cellule di batteri, consente di ottimizzare ciascuna delle singole fasi del procedimento di preparazione al fine di ottenere una biomassa di cellule di batteri liofilizzate, stabili, vitali e ad elevata concentrazione, mediante un processo  
20 riproducibile, affidabile e ottimizzato.

Vantaggiosamente, la procedura che comprende il procedimento di preparazione della presente invenzione unito al metodo per valutare il mantenimento di un buono  
25 stato di conservazione ed integrità della parete cellulare ha consentito di ottenere una biomassa di cellule di batteri liofilizzate con una parete cellulare integra e ben conservata (integrità di membrana) che conferisce alle cellule di batteri liofilizzate stesse  
30 una stabilità prolungata e un ottimo stato di vitalità.

Nel contesto della presente invenzione con "integra/e" si intende dire che la membrana cellulare o la parete di membrana cellulare non presenta elementi o zone di permeabilità dovute ad un incremento di un danno  
5 arrecato alla membrana stessa.

Il procedimento di preparazione della presente invenzione migliora la tenuta della membrana cellulare del batterio riducendo la permeabilità della cellula.

Per stabilità prolungata si intende una stabilità alla  
10 conservazione (*Shelf-life*), determinata mediante un metodo citofluorimetrico, che risulta essere maggiore rispetto alla stabilità di una stessa biomassa di cellule di batteri misurata mediante il metodo standard di conta in piastra.

15 Inoltre una parete cellulare integra e ben conservata (integrità di membrana) conferisce alle cellule di batteri liofilizzate stesse una maggiore vitalità ed efficacia una volta che dette cellule sono state somministrate a un soggetto.

20 Grazie al procedimento di preparazione della presente invenzione è possibile preparare una biomassa di cellule di batteri in cui le cellule presentano una stabilità per un periodo di tempo compreso da 1 minuto a 10 anni, preferibilmente compreso da 1 giorno a 5 anni, più  
25 preferibilmente compreso da 4 mesi oppure da 12 mesi a 48 mesi, ancora più preferibilmente da 18 mesi a 32 mesi, ulteriormente, preferibilmente da 24 mesi a 30 mesi, anche in condizioni di zona IV.A e zona IV.B.

30 La presente invenzione si riferisce a un procedimento

per la preparazione di una biomassa di cellule di batteri liofilizzate, comprendente le seguenti fasi:

- (i) fermentare una biomassa di cellule di batteri (biomassa di batteri) precedentemente preparata  
5 comprendente almeno un ceppo di cellule di batteri per ottenere una biomassa di cellule di batteri fermentata (biomassa fermentata);
- (ii) concentrare la biomassa fermentata ottenuta dalla fase (i) fino ad ottenere una biomassa di cellule di  
10 batteri concentrata (biomassa concentrata) avente una concentrazione di cellule di batteri compresa da  $1 \times 10^6$  cellule/ml di biomassa liquida a  $1 \times 10^{12}$  cellule/ml di biomassa liquida;
- (iii) miscelare la biomassa concentrata ottenuta dalla  
15 fase (ii) con una soluzione che comprende o, alternativamente, consiste di: (a) almeno un sale del fosforo scelto dal gruppo comprendente o, alternativamente, consistente di un sale dello ione  
20 fosfato o acido fosforico, un sale dello ione fosfito o acido fosforoso, un sale dello ione mono-idrogeno fosfato, un sale dello ione di-idrogeno fosfato, un sale dello ione pirofosfato o acido pirofosforico, e loro miscele, e (b) almeno una sostanza poli-idrossi scelta  
25 dal gruppo comprendente o, alternativamente, consistente di saccarosio, fruttosio, lattosio, lattitolo, trealosio o mannitolo, e loro miscele per ottenere una biomassa di cellule di batteri crioprotette (biomassa crioprotetta);
- (iv) liofilizzare la biomassa crioprotetta ottenuta dalla fase (iii) per ottenere una biomassa di cellule di  
30 batteri liofilizzate (biomassa liofilizzata).

Nella fase (iii) la biomassa concentrata della fase (ii) può essere miscelata con una soluzione che comprende o, alternativamente, consiste di (a) almeno un sale del fosforo, (b) almeno una sostanza poli-idrossi e (c) L-cisteina.

Il procedimento della presente invenzione può inoltre prevedere, oltre alle fasi (i), (ii), (iii) e (iv), una o più delle seguenti fasi preferite.

10

In una realizzazione preferita, il procedimento della presente invenzione può inoltre prevedere, oltre alle fasi (i), (ii), una fase preferita (ii.a) prima della fase (iii). Nella fase preferita (ii.a) la biomassa concentrata ottenuta dalla fase (ii) viene lavata a dare una biomassa lavata.

15

In accordo con una forma di realizzazione, nella fase (ii.a) la biomassa concentrata ottenuta dalla fase (ii) viene lavata con un liquido di lavaggio, preferibilmente acqua.

20

In una realizzazione preferita, il procedimento della presente invenzione può inoltre prevedere, oltre alle fasi (i), (ii), (ii.a), una fase preferita (ii.b) prima della fase (iii). Nella fase preferita (ii.b), la biomassa lavata ottenuta dalla fase (ii.a) viene riconcentrata a dare una biomassa riconcentrata.

25

In una biomassa riconcentrata secondo la presente invenzione, le cellule di batteri hanno preferibilmente

30

- una concentrazione compresa da  $1 \times 10^6$  cellule/ml a  $1 \times 10^{12}$  cellule/ml, preferibilmente compresa da  $1 \times 10^7$  cellule/ml a  $1 \times 10^{12}$  cellule/ml, ancora più preferibilmente compresa da  $1 \times 10^8$  cellule/ml a  $1 \times 10^{11}$  cellule/ml, più preferibilmente ancora compresa da  $1 \times 10^9$  cellule/ml a  $1 \times 10^{11}$  cellule/ml oppure compresa da  $1 \times 10^{10}$  cellule/ml a  $1 \times 10^{11}$  cellule/ml, per ogni millilitro di biomassa liquida riconcentrata.
- 10 In una realizzazione preferita, la biomassa lavata e riconcentrata ottenuta dalla fase (ii.a) e (ii.b) viene miscelata con una soluzione che comprende o, alternativamente, consiste di: (a) almeno un sale del fosforo scelto dal gruppo comprendente o,
- 15 alternativamente, consistente di un sale dello ione fosfato o acido fosforico, un sale dello ione fosfito o acido fosforoso, un sale dello ione mono-idrogeno fosfato, un sale dello ione di-idrogeno fosfato, un sale dello ione pirofosfato o acido pirofosforico, e loro
- 20 miscele, e (b) almeno una sostanza poli-idrossi scelta dal gruppo comprendente o, alternativamente, consistente di saccarosio, fruttosio, lattosio, lattitolo, trealosio, mannitolo, e loro miscele, per ottenere la biomassa crioprotetta. Preferibilmente, la soluzione
- 25 comprende o, alternativamente, consiste di (a) almeno un sale del fosforo, (b) almeno una sostanza poli-idrossi, preferibilmente anche (c) L-cisteina.

In una realizzazione preferita, il procedimento della presente invenzione può inoltre prevedere, oltre alle

30

fasi (i), (ii), (ii.a) e (ii.b), una fase preferita (ii.c) prima della fase (iii). Nella fase preferita (ii.c) il pH della biomassa riconcentrata ottenuta dalla fase (ii.b) viene regolato, se necessario, ad un valore di pH compreso da  $5\pm 0,1$  a  $7\pm 0,1$ , a dare una biomassa a pH regolato; preferibilmente il valore di pH potrebbe essere compreso da  $5,5\pm 0,1$  a  $6,5\pm 0,1$ , ancor più preferibilmente il valore di pH potrebbe essere di  $6,2\pm 0,1$ .

10

In accordo con una forma di realizzazione, la regolazione del valore di pH nella fase (ii.c) è eseguita attraverso un'aggiunta di una base debole, di preferenza inorganica. Preferibilmente, la base debole comprende oppure, alternativamente, consiste di idrato di ammonio ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ; CAS N. 1336-21-6).

15

A titolo di esempio, un idrato di ammonio utilizzabile per regolare il valore di pH nella fase (ii.c) potrebbe essere una soluzione acquosa con un titolo in ammoniaca del 31-32%, e preferibilmente con un peso specifico di  $0,887-0,890 \text{ g/cm}^3$ .

20

In una realizzazione preferita, la biomassa lavata, riconcentrata e a pH regolato ottenuta dalla fase (ii.a), (ii.b) e (ii.c) viene miscelata con soluzione che comprende o, alternativamente, consiste di: (a) almeno un sale del fosforo scelto dal gruppo comprendente o, alternativamente, consistente di un sale dello ione fosfato o acido fosforico, un sale dello ione

30

fosfito o acido fosforoso, un sale dello ione mono-idrogeno fosfato, un sale dello ione di-idrogeno fosfato, un sale dello ione pirofosfato o acido pirofosforico, e loro miscele, e (b) almeno una sostanza  
5 poli-idrossi scelta dal gruppo comprendente o, alternativamente, consistente di saccarosio, fruttosio, lattosio, lattitolo, trealosio, mannitolo, e loro miscele, per ottenere la biomassa crioprotetta. Preferibilmente, la soluzione che comprende o,  
10 alternativamente, consiste di (a) almeno un sale del fosforo, (b) almeno una sostanza poli-idrossi, e preferibilmente anche (c) L-cisteina.

Nella fase (iii) - successiva alla fase (ii), oppure  
15 successiva alla fase (ii.a) e (ii.b), oppure successiva alla fase (ii.a), (ii.b) e (ii.c) - la biomassa concentrata ottenuta dalla fase (ii), oppure la biomassa lavata e riconcentrata ottenuta dalla fase (ii.a) e (ii.b), oppure la biomassa lavata, riconcentrata e a pH  
20 regolato ottenuta dalla fase (ii.a), (ii.b) e (ii.c), viene miscelata con soluzione che comprende o, alternativamente, consiste di: (a) almeno un sale del fosforo scelto dal gruppo comprendente o, alternativamente, consistente di un sale dello ione  
25 fosfato o acido fosforico, un sale dello ione fosfito o acido fosforoso, un sale dello ione mono-idrogeno fosfato, un sale dello ione di-idrogeno fosfato, un sale dello ione pirofosfato o acido pirofosforico, e loro miscele, e (b) almeno una sostanza poli-idrossi scelta  
30 dal gruppo comprendente o, alternativamente, consistente

di saccarosio, fruttosio, lattosio, lattitolo, trealosio, mannitolo, e loro miscele, per ottenere la biomassa crioprotetta. Preferibilmente, la soluzione che comprende o, alternativamente, consiste di (a) almeno un  
5 sale del fosforo, (b) almeno una sostanza poli-idrossi può inoltre comprendere anche (c) L-cisteina.

Il pirofosfato di sodio o di potassio  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  o  $\text{K}_4\text{O}_7\text{P}_2$  è un sale di sodio o di potassio dell'acido pirofosforico  
10  $\text{H}_4\text{P}_2\text{O}_7$ . Il pirofosfato di sodio viene anche chiamato pirofosfato tetrasodico per distinguerlo dal pirofosfato acido di sodio  $\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ . A temperatura ambiente il pirofosfato di sodio o di potassio si presenta come un solido incolore, inodore, solubile in acqua. Assieme  
15 agli altri difosfati di sodio o di potassio è codificato nella lista degli additivi alimentari come E450.

Successivamente, la biomassa crioprotetta ottenuta dalla fase (iii) viene liofilizzata in accordo con la fase  
20 (iv) per ottenere una biomassa di cellule di batteri liofilizzate, stabili, vitali e ad elevata concentrazione, mediante un processo ottimizzato e riproducibile.

25 Si precisa che, nella presente descrizione il termine "concentrata" nell'espressione "biomassa concentrata" oppure nell'espressione "biomassa di cellule di batteri concentrata" si intende far riferimento a una biomassa ottenuta dalla fase (ii) in cui le cellule di batteri  
30 risultano aumentate in numero, per unità di volume,

rispetto a quelle ottenute al termine della fase di fermentazione (i).

Nella biomassa concentrata le cellule di batteri hanno  
5 una concentrazione compresa da  $1 \times 10^6$  cellule/ml a  $1 \times 10^{12}$   
cellule/ml, preferibilmente compresa da  $1 \times 10^7$  cellule/ml  
a  $1 \times 10^{12}$  cellule/ml, ancora più preferibilmente compresa  
da  $1 \times 10^8$  cellule/ml a  $1 \times 10^{11}$  cellule/ml, più  
preferibilmente ancora compresa da  $1 \times 10^9$  cellule/ml a  
10  $1 \times 10^{11}$  cellule/ml oppure compresa da  $1 \times 10^{10}$  cellule/ml a  
 $1 \times 10^{11}$  cellule/ml, per ogni millilitro di biomassa  
liquida concentrata.

Quando la biomassa di cellule di batteri è prodotta in  
15 fase solida a seguito di un processo di essiccazione (ad  
esempio scaglie, granuli o polvere) o un processo di  
liofilizzazione (ad esempio polvere liofilizzata), il  
termine "concentrata" come impiegato in questa  
descrizione, indicherà una concentrazione di cellule di  
20 batteri compresa da  $1 \times 10^6$  cellule/g a  $1 \times 10^{13}$  cellule/g,  
preferibilmente una concentrazione compresa da  $1 \times 10^7$   
cellule/g a  $1 \times 10^{12}$  cellule/g, ancora più preferibilmente  
una concentrazione compresa da  $1 \times 10^8$  cellule/g a  $1 \times 10^{12}$   
cellule/g, più preferibilmente ancora una concentrazione  
25 compresa da  $1 \times 10^9$  cellule/g a  $1 \times 10^{12}$  cellule/g, per ogni  
grammo di biomassa essiccata, oppure di biomassa  
liofilizzata ottenuta dalla fase (iv).

Per quanto attiene al valore di attività di acqua libera  
30  $A_w$  che consente, quanto più è basso, di ridurre/inibire

l'attività metabolica delle cellule di batteri, è importante che il valore di  $A_w$ , presente nella biomassa liofilizzata ottenuta dalla fase (iv), sia compreso da 0,01 a 0,3; preferibilmente da 0,05 a 0,2; ancor più preferibilmente da 0,1 a 0,15. La misurazione e determinazione del valore di attività di acqua libera  $A_w$  possono essere eseguite utilizzando lo strumento modello "AQUALAB 4TE", prodotto dalla società statunitense METER Group, Inc.

La tecnica sfruttata dallo strumento "AQUALAB 4TE" è quella del punto di rugiada su specchio raffreddato. Secondo tale tecnica, un campione da analizzare è introdotto in una camera dello strumento, successivamente chiusa in modo ermetico, e le condizioni di umidità della camera sono progressivamente portate in equilibrio con l'"acqua libera" di tale campione (definita come l'acqua non vincolata da legami cellulari alle cellule di batteri della biomassa). Lo strumento comprende inoltre almeno uno specchio termoregolato, inserito nella camera a chiusura ermetica, e uno o più sensori di rilevazione funzionalmente collegati con lo specchio termoregolato. Nel corso dell'analisi, con il raggiungimento delle condizioni di equilibrio tra camera e campione, una superficie dello specchio termoregolato viene progressivamente portata ad una temperatura pari o inferiore alla temperatura di rugiada dell'umidità alla pressione interna della camera. L'umidità della camera si deposita quindi su tale superficie dello specchio termoregolato in forma di condensa. Il sensore di rilevazione provvede quindi a rilevare una prima

condensazione sulla superficie dello specchio, in modo che lo strumento possa visualizzare l'attività dell'acqua Aw (che corrisponde all'acqua libera del campione) e la temperatura della superficie dello specchio a cui è avvenuta la prima condensazione.

Il procedimento per la preparazione della biomassa liofilizzata secondo la presente invenzione comprende la fase (i) nella quale una biomassa di cellule di batteri (biomassa di batteri) precedentemente preparata e comprendente almeno un ceppo di cellule di batteri viene fermentata per ottenere una biomassa di cellule di batteri fermentata (biomassa fermentata).

La biomassa di batteri destinata alla fase (i) comprende almeno un ceppo di cellule di batteri scelto dal gruppo comprendente o, alternativamente, consistente dei ceppi di cellule batteriche appartenenti alle famiglie: *Firmicutes*, *Actibacteria*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, e loro miscele. Detto almeno un ceppo di cellule batteriche è scelto dal gruppo comprendente o, alternativamente, consistente dei ceppi di cellule batteriche appartenenti ai generi: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Akkermansia*, *Intestinimonas*, *Eubacterium*, *Faecalibacterium*, *Neisseria*, *Roseburia*, *Cutibacterium* e loro miscele. Detto almeno un ceppo di cellule di batteri è scelto dal gruppo comprendente o, alternativamente, consistente dei ceppi di cellule di batteri appartenenti alle specie: *Lactobacillus*

- acidophilus*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*,  
5 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus reuteri*,  
10 *Lactobacillus johnsonii*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifobacterium catenulatum*, *Bifobacterium pseudocatenulatum*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium infantis*,  
15 *Bifidobacterium longum*, *Akkermansia munichipila*, *Intestinimonas butyriciproducens*, *Eubacterium hallii*, *Faecalobacterium prausnitzii*, *Neisseria lactamica*, *Roseburia hominis*, *Cutibacterium acnes*, e loro miscele.
- 20 In una forma di realizzazione, una biomassa di batteri destinata alla fase (i) del ceppo di batteri di interesse viene inoculata in un substrato di fermentazione liquido (o brodo di fermentazione) comprendente: i) una fonte di carbonio, preferibilmente  
25 destrosio in una concentrazione compresa da 20 g/l a 80 g/l, ii) una fonte di azoto, preferibilmente comprendente una combinazione di un peptone di origine vegetale (ad esempio, di patata, di riso oppure di pisello in funzione del ceppo di batteri fermentato), e  
30 iii) un estratto di lievito in una concentrazione

compresa da 5 g/l a 50g/l.

In accordo con una forma di realizzazione, il substrato di fermentazione liquido può essere addizionato, in  
5 funzione della biomassa di batteri di interesse, con sali di fosfato o solfato di potassio, magnesio o manganese alla concentrazione di ciascuno di tali sali preferibilmente compresa da 10 g/l a 0,01 g/l di detto substrato o brodo di fermentazione.

10

La biomassa di batteri di interesse viene inoculata nel substrato di fermentazione liquido sopra descritto in ragione del 1-10%, preferibilmente 2-4%, in volume rispetto al volume del substrato di fermentazione  
15 liquido.

La biomassa di batteri così inoculata viene incubata ad una temperatura compresa da 30°C a 40°C, preferibilmente da 34°C a 37°C, per un tempo compreso da 1 ora a 48 ore,  
20 preferibilmente da 5 ore a 30 ore, in funzione dell'inoculo e dell'acidificazione del substrato di fermentazione liquido.

Al termine della fase di fermentazione (i) si ottiene  
25 una biomassa di batteri la quale viene sottoposta ad una concentrazione in accordo con la fase (ii).

La fase (ii), nella quale la biomassa di batteri della fase (i) viene concentrata, viene realizzata mediante  
30 una fase di separazione, in cui una frazione liquida

viene separata da una frazione solida o cellulare costituita appunto dalle cellule di batteri cresciuti nel substrato di fermentazione liquido della fase (i). In una realizzazione, detta fase di separazione può  
5 essere realizzata mediante centrifugazione.

La fase di separazione consente di separare dalla biomassa di batteri, che si trova nello stato fisico di una soluzione, la frazione liquida in essa contenuta in  
10 modo che la stessa biomassa si concentri sempre più delle altre componenti quali ad esempio le cellule di batteri.

La concentrazione si realizza passando da una biomassa  
15 di batteri che contiene, nella fase (i), detto almeno un ceppo di batteri ad una concentrazione compresa da  $1 \times 10^6$  cellule/ml a  $1 \times 10^{11}$  cellule/ml di substrato o brodo di fermentazione, a una biomassa concentrata che contiene, dopo la fase (ii), detto almeno un ceppo di batteri ad  
20 una concentrazione compresa tra  $1 \times 10^6$  cellule/ml a  $1 \times 10^{12}$  cellule/ml.

La fase preferita (ii.a), aggiuntiva alle fasi (i), (ii) e precedente la fase (iii), prevede che la biomassa  
25 concentrata ottenuta dalla fase (ii) sia lavata con il liquido di lavaggio, preferibilmente acqua, a dare la biomassa lavata.

Nella fase (iii) la biomassa concentrata ottenuta dalla fase (ii), oppure la biomassa a pH regolato ottenuta  
30 dalla fase (ii.b), è miscelata con la soluzione che

comprende o, alternativamente, consiste di (a) e (b), e opzionalmente (c).

Tale soluzione (o soluzione di crioprotezione) è in grado di conferire alla biomassa concentrata, o alla biomassa lavata, o alla biomassa a pH regolato, o alla biomassa riconcentrata, una crioprotezione nel senso che la biomassa di batteri viene crioprotetta. Questo significa che le cellule del ceppo di batteri impiegato, contenute in detta biomassa di batteri, vengono crioprotette. La crioprotezione delle cellule comporta che i tessuti biologici (ad esempio la membrana cellulare) delle cellule del ceppo di batteri risultano protetti da possibili danni conseguenti a un congelamento nella fase di liofilizzazione (iv) della biomassa crioprotetta. A titolo di esempio, un danno alle cellule potrebbe comprendere una lacerazione o una lesione della membrana cellulare, accompagnata da un possibile aumento della permeabilità attraverso la membrana stessa.

In accordo con una forma di realizzazione, detta soluzione della fase (iii) è una soluzione acquosa, ad esempio di acqua distillata oppure bidistillata a temperatura ambiente di 20°C - 25°C.

In accordo con una forma di realizzazione, il sale del fosforo (a) è un sale pirofosfato.

In accordo con un'altra forma di realizzazione, almeno

un sale del fosforo (a) è scelto dai composti di potassio fosfato ( $K_3PO_4$ ), potassio mono-idrogeno fosfato ( $K_2HPO_4$ ), potassio di-idrogeno fosfato ( $KH_2PO_4$ ) e/o potassio pirofosfato ( $K_4P_2O_7$ ).

5

A titolo di esempio, un potassio mono-idrogeno fosfato utilizzabile in questa invenzione è in forma di cristalli di colore bianco e ha un titolo compreso da 90% a 100% in peso, preferibilmente compreso da 95% a 10 99% in peso, ancora più preferibilmente compreso da 97% a 99% in peso.

A titolo di esempio ulteriore, un potassio pirofosfato (CAS N. 7320-34-5) utilizzabile in questa invenzione è 15 in forma di particelle, di polvere o di granuli e ha un titolo compreso da 90% a 100% in peso, preferibilmente compreso da 95% a 99% in peso, ancora più preferibilmente compreso da 96% a 98% in peso.

20 In accordo con una forma di realizzazione, gli ioni fosfato, gli ioni mono-idrogeno fosfato, gli ioni di-idrogeno fosfato e/o gli ioni pirofosfato potrebbero essere presenti nella soluzione (considerando tale soluzione prima della propria miscelazione alla biomassa 25 di batteri nella fase (iii)) in una quantità compresa da 6 a 27% P/V, laddove % P/V intende una percentuale in peso (ossia grammi) dei suddetti composti rispetto al volume totale della soluzione.

30 In accordo con una forma di realizzazione, la

concentrazione del sale o dei sali del fosforo (a) nella soluzione utilizzata nella fase (iii) potrebbe essere compresa da 6 a 20 % P/V, preferibilmente compresa da 6 a 15 % P/V, ancora più preferibilmente compresa da 10 a  
5 14 % P/V.

La sostanza poli-idrossi (b) è scelta dal gruppo comprendente o, alternativamente, consistente di saccarosio, fruttosio, lattosio, lattitolo, trealosio o  
10 mannitolo, e loro miscele.

In accordo con una forma di realizzazione, il saccarosio potrebbe essere impiegato nel ruolo di sostanza poli-idrossi. In accordo con una forma di realizzazione, il  
15 saccarosio potrebbe avere una concentrazione compresa da 25 % P/V a 45 % P/V, laddove % P/V intende una percentuale in peso (ossia grammi) del saccarosio rispetto al volume totale della soluzione di crioprotezione (considerando tale soluzione prima della  
20 propria miscelazione alla biomassa di batteri nella fase (iii)).

A titolo di esempio, un saccarosio utilizzabile come sostanza poli-idrossi (b) potrebbe essere in forma di  
25 cristalli di colore bianco e solubili in acqua. Preferibilmente, una percentuale in peso compresa da 85% a 100%, preferibilmente compresa da 90% a 95%, dei cristalli di saccarosio ha una distribuzione delle dimensioni particellari compresa da 0,05 a 0,50  
30 millimetri, preferibilmente compresa da 0,1 a 0,35

millimetri.

Pertanto, secondo una forma di realizzazione, la soluzione utilizzata nella fase (iii) potrebbe  
5 comprendere un solvente (preferibilmente acqua), ioni pirofosfato e/o ioni fosfato, ioni mono-idrogeno fosfato, e/o ioni di-idrogeno fosfato, preferibilmente L-cisteina, e saccarosio.

10 In accordo con una forma di realizzazione, la L-cisteina nella soluzione utilizzata nella fase (iii) potrebbe essere presente in una quantità compresa da 0,5 grammi di L-cisteina a 5 grammi di L-cisteina per ogni litro di soluzione, preferibilmente compresa da 1 grammo a 4  
15 grammi di L-cisteina per ogni litro di soluzione, ancora più preferibilmente compresa da 2 grammi a 3 grammi di L-cisteina per ogni litro di soluzione.

Nello specifico, la L-cisteina (CAS N. 52-90-4) funziona  
20 da sequestrante dell'ossigeno e pertanto, quando aggiunta nella soluzione, limita o impedisce la formazione di specie radicaliche dell'ossigeno (ROS; *reactive oxygen species*). Inoltre, la L-cisteina è caratterizzata da un basso peso molecolare, e pertanto  
25 può penetrare facilmente le membrane cellulari delle cellule di batteri, in tal modo aumentando la protezione dai danni derivanti dai radicali liberi dell'ossigeno, e migliorando l'integrità di struttura della membrana stessa.

A titolo di esempio, una L-cisteina utilizzabile nell'ambito della presente invenzione potrebbe essere monoidrata.

- 5 In accordo con una forma di realizzazione, una L-cisteina utilizzabile in questa invenzione è in forma di polvere cristallina e ha un titolo compreso da 90% a 100% in peso, preferibilmente compreso da 95% a 100%.
- 10 Secondo una forma di realizzazione, la soluzione utilizzata nella fase (iii) potrebbe comprendere ioni pirofosfato e saccarosio in un rapporto molare ioni pirofosfato:saccarosio compreso da circa 1:1,5 a circa 1:6, preferibilmente di 1:3.
- 15 Secondo una forma di realizzazione ulteriore, la soluzione utilizzata nella fase (iii) potrebbe comprendere ioni fosfato, mono-idrogeno fosfato, di-idrogeno fosfato e saccarosio in un rapporto molare ioni
- 20 fosfato, mono-idrogeno fosfato, di-idrogeno fosfato:saccarosio compreso da circa 1:0,75 a circa 1:3, preferibilmente 1:1,5.
- Pertanto, secondo tale forma di realizzazione, la
- 25 soluzione della fase (iii) potrebbe comprendere un solvente (preferibilmente acqua), ioni pirofosfato e/o ioni fosfato, mono-idrogeno fosfato, di-idrogeno fosfato, saccarosio, e preferibilmente L-cisteina.
- 30 Nella fase (iv) la biomassa crioprotetta ottenuta dalla

fase (iii) viene liofilizzata per ottenere la biomassa liofilizzata.

L'espressione "liofilizzare" o "liofilizzazione" - salvo  
5 che non sia diversamente indicato - farà riferimento a  
una disidratazione controllata della biomassa  
crioprotetta preventivamente congelata, e si riferirà  
all'intero processo di liofilizzazione (congelamento,  
essiccamento primario ed essiccamento secondario).

10

L'Esempio 4 descrive un processo di liofilizzazione  
secondo una possibile forma di realizzazione di questa  
invenzione.

15 In accordo con una forma di realizzazione, la  
liofilizzazione della fase (iv) comprende, dopo la fase  
(iii), le seguenti fasi:

(iv.a) congelamento della biomassa crioprotetta ottenuta  
dalla fase (iii) per ottenere una biomassa congelata;

20 (iv.b) sublimazione del ghiaccio (o essiccamento) della  
biomassa congelata ottenuta dalla fase (iv.a) a dare la  
biomassa liofilizzata.

Preferibilmente, la sublimazione della fase (iv.b)  
25 comprende una fase di essiccamento primario (iv.b.1)  
della biomassa congelata ottenuta dalla fase (iv.a), e  
un successivo essiccamento secondario (o desorbimento)  
(iv.b.2), sulla biomassa ottenuta dalla fase (iv.b.1), a  
dare la biomassa liofilizzata.

30

Nella fase di essiccamento primario (iv.b.1), la biomassa congelata ottenuta dalla fase (iv.a) è inizialmente sottoposta ad una pressione ridotta, in modo da sublimare una parte della soluzione congelata, a  
5 dare una biomassa a pressione ridotta e successivamente, nella fase di essiccamento secondario (iv.b.2), la biomassa a pressione ridotta viene riscaldata a dare la biomassa liofilizzata.

10 Preferibilmente, la fase di essiccamento secondario (iv.b.2) inizia quando è sublimato tutto il ghiaccio dalla biomassa a pressione ridotta nella precedente fase di essiccamento primario (iv.b.1).

15 Nella fase di essiccamento secondario (iv.b.2) viene desorbita la soluzione adsorbita sulla biomassa a pressione ridotta ottenuta dalla fase di essiccamento primario (iv.b.1), tramite un innalzamento della temperatura della biomassa a pressione ridotta.

20

In accordo con una forma di realizzazione, la fase di essiccamento secondario (iv.b.2) termina quando l'umidità della biomassa è compresa da 0,5% a 2,5% in peso, preferibilmente compresa da 0,75% a 2,0% in peso,  
25 più preferibilmente compresa da 0,9% a 1,5% in peso, ancora più preferibilmente compresa da 0,95% a 1,1% in peso della biomassa.

Secondo una forma di realizzazione, il procedimento può comprendere, oltre alle fasi (i), (ii), (iii) e (iv),  
30 una fase (v) successiva alla fase (iv).

Nella fase preferita (v) la biomassa liofilizzata ottenuta dalla fase (iv) viene frantumata a dare una biomassa frantumata.

5 Infatti, la biomassa liofilizzata ottenuta dalla fase (iv) è una massa compatta (*cake*) che deve essere frantumata, o macinata, o disgregata, al fine di ottenere la biomassa frantumata. Preferibilmente, la frantumazione della fase (v) viene eseguita tramite una  
10 rete o un setaccio.

Più precisamente, nella fase preferita (v) la massa compatta o *cake* ottenuta dalla fase (iv) viene forzata attraverso la suddetta rete oppure il suddetto setaccio  
15 al fine di frantumare, o macinare, o disgregare la massa compatta.

Una biomassa frantumata, ottenuta al termine della fase (v), è in forma di polvere o di granulo, ed è più  
20 facilmente gestibile e manipolabile rispetto alla biomassa liofilizzata della fase (iv). Ad esempio, tale migliorata manipolazione si può rivelare utile in successive operazioni di pesatura e/o di confezionamento.

25

Secondo una forma di realizzazione, il procedimento può comprendere, oltre alle fasi (i), (ii), (iii) e (iv), una fase (vi) successiva alla fase (v).

30 Nella fase preferita (vi), la biomassa frantumata

ottenuta dalla fase (v) viene confezionata in un contenitore sterile, preferibilmente in assenza di umidità, a dare una biomassa confezionata.

5 In una forma di realizzazione, la biomassa confezionata ottenuta dalla fase (vi) è confezionata nel contenitore sterile in modo tale che la quantità di spazio di testa nel contenitore sterile (nello specifico, la quantità di aria tra la biomassa confezionata e la parte superiore del contenitore) sia molto ridotta. Preferibilmente, la  
10 quantità di spazio di testa è trascurabile (ossia, quasi nulla).

In accordo con una forma di realizzazione, la biomassa  
15 confezionata ha una concentrazione di cellule di batteri compresa da  $1 \times 10^8$  cellule/g a  $1 \times 10^{11}$  cellule/g, preferibilmente una concentrazione compresa da  $1 \times 10^9$  cellule/g a  $1 \times 10^{10}$  cellule/g, per ogni grammo di biomassa confezionata ottenuta al termine della fase (vi).

20

Secondo una forma di realizzazione, il procedimento può comprendere, oltre alle fasi (i), (ii), (iii) e (iv), una fase (vii) successiva alla fase (vi).

25 Nella fase preferita (vii), la biomassa confezionata ottenuta dalla fase (vi) viene ricostituita con acqua dopo un tempo predefinito, a dare una biomassa ricostituita.

30 In merito al tempo predefinito della fase (vii), tale

tempo è preferibilmente compreso da 1 minuto a 10 anni, preferibilmente compreso da 1 giorno a 5 anni, più preferibilmente compreso da 4 mesi oppure da 12 mesi a 48 mesi, ancora più preferibilmente da 18 mesi a 32  
5 mesi, ulteriormente, preferibilmente da 24 mesi a 30 mesi, anche in condizioni di zona IV.A e zona IV.B.

In accordo con una forma di realizzazione, la ricostituzione della fase (vii) prevede una riaddizione  
10 di un volume di acqua alla biomassa confezionata ottenuta dalla fase (vi), tipicamente, ma non necessariamente, equivalente al volume ridotto durante la liofilizzazione della fase (iv).

15 In accordo con diverse forme di realizzazione, l'acqua utilizzata nella fase (vii) è selezionata dal gruppo comprendente oppure, alternativamente, consistente di acqua pura, soluzione fisiologica, o soluzione tampone.

20 In accordo con una forma di realizzazione, la biomassa liofilizzata confezionata ottenuta dalla fase (vi) potrebbe essere ricostituita (idratata) nella fase (vii) come soluzione acquosa, preferibilmente tramite una soluzione acquosa isotonica, ancora più preferibilmente  
25 ad un valore di pH sostanzialmente neutro o comunque compreso da 6.0 a 7.0. Tale valore di pH compreso da 6.0 a 7.0 è particolarmente preferito per una biomassa confezionata ottenuta dalla fase (vi) in cui le cellule di batteri sono cellule nude, vale a dire prive di un  
30 rivestimento esterno.

In accordo con una forma di realizzazione, la biomassa liofilizzata confezionata ottenuta dalla fase (vi) potrebbe essere ricostituita (idratata) nella fase (vii) come soluzione acquosa di una soluzione tampone borato a  
5 pH 8,4. Tale valore di pH 8,4 è particolarmente preferito per una biomassa confezionata ottenuta dalla fase (vi) in cui le cellule di batteri sono cellule micro-incapsulate, preferibilmente in una matrice lipidica oppure in una matrice glicoproteica.

10

Secondo una forma di realizzazione, nella ricostituzione della fase (vii), la biomassa confezionata ottenuta dalla fase (vi) è diluita sino ad ottenere una concentrazione di cellule di batteri nella biomassa  
15 ricostituita compresa da  $10^5$  a  $10^7$  cellule/ml, preferibilmente circa  $10^6$  cellule/ml.

A tal proposito, la concentrazione di cellule di batteri nella biomassa ricostituita compresa da  $10^5$  a  $10^7$   
20 cellule/ml, preferibilmente circa  $10^6$  cellule/ml, è preferibilmente ottenuta tramite diluizioni successive con acqua.

Secondo una forma di realizzazione, il procedimento può  
25 comprendere, oltre alle fasi (i), (ii), (iii) e (iv), fasi preferite di:

(viii) mettere a contatto la biomassa fermentata ottenuta dalla fase (i), la biomassa concentrata ottenuta dalla fase (ii), la biomassa crioprotetta  
30 ottenuta dalla fase (iii), e la biomassa liofilizzata

ottenuta dalla fase (iv) con due diversi coloranti fluorescenti, in modo da ottenere una biomassa fermentata fluorescente, una biomassa concentrata fluorescente, una biomassa crioprotetta fluorescente e una biomassa liofilizzata fluorescente (complessivamente indicate con l'espressione "biomasse fluorescenti");

(ix) successivamente alla fase (viii), tramite citofluorimetria a flusso, rilevare una quantità di cellule di batteri con membrane cellulari integre (e pertanto vitali) nella biomassa fermentata fluorescente, nella biomassa concentrata fluorescente, nella biomassa crioprotetta fluorescente e nella biomassa liofilizzata fluorescente.

Pertanto, il procedimento secondo questa forma di realizzazione, in cui viene effettuata una rilevazione citofluorimetrica delle biomasse fluorescenti nelle diverse fasi di preparazione della biomassa liofilizzata, consente di monitorare (e quindi intervenire/regolare in maniera migliorativa) i parametri che governano la fase (i), la fase (ii), la fase (iii) e la fase (iv).

In accordo con una forma di realizzazione, nella fase di rilevazione della fase (ix) e in accordo al metodo sancito dalla norma ISO 19344:2015(E), un primo colorante permeabile attraverso le membrane cellulari (preferibilmente: arancio di tiazolo oppure, alternativamente, SYTO® 24 - un colorante fluorescente nello spettro del verde) è in grado di penetrare in

tutte le cellule di batteri, fornendo le unità o cellule fluorescenti totali (TFU; *total fluorescent units*) delle biomasse fluorescenti. Un secondo colorante (preferibilmente: propidio ioduro) è in grado di penetrare solamente nelle cellule di batteri con una membrana cellulare danneggiata, fornendo le unità o cellule di batteri fluorescenti non attive o non vitali (nAFU= *non active fluorescent unit*) delle biomasse fluorescenti.

10

Secondo una forma di realizzazione particolarmente preferita, la quantità di cellule di batteri vitali, con membrane cellulari integre, può essere espressa come unità o cellule fluorescenti attive (AFU; *active fluorescent units*), ossia le unità che risultano positive solo al primo colorante nell'analisi in fluorescenza (preferibilmente: arancio di tiazolo oppure, alternativamente, SYTO® 24), per le quali vale la seguente correlazione:

15

$$TFU = AFU + nAFU$$

dove:

- TFU sono le unità o cellule di batteri fluorescenti totali;

20

- nAFU sono le unità o cellule di batteri fluorescenti non attive, con una membrana cellulare non integra o danneggiata (ossia le unità che risultano positive al secondo colorante, preferibilmente ioduro di propidio).

25  
30

In accordo con una forma di realizzazione, il citofluorimetro a flusso della fase (ix) è configurato

e/o calibrato per effettuare una determinazione volumetrica delle biomasse fluorescenti analizzate, e per calcolare direttamente la concentrazione cellulare (AFU e TFU).

5

Secondo un'altra forma di realizzazione, per ricavare i valori di AFU e di TFU nelle biomasse fluorescenti, il citofluorimetro a flusso della fase (ix) utilizza almeno uno standard interno fluorescente aggiunto alle biomasse fluorescenti.

10

In accordo con una forma di realizzazione, lo standard interno fluorescente è in forma di sfera o di biglia fluorescente ed è aggiunto a ciascuna biomassa fluorescente da analizzare in concentrazione nota. Il valore di AFU e di TFU nella biomassa fluorescente analizzata potrà quindi essere calcolato in proporzione rispetto alle quantità note.

15

Secondo una forma di realizzazione ulteriore, la soluzione o soluzione di crioprotezione è priva di polimeri aventi peso molecolare tra circa 5.000 u a circa 80.000 u, e/o gli ioni fosfato eventualmente presenti nella soluzione miscelata alla biomassa concentrata della fase (ii) non sono parte di una soluzione tampone.

25

I predetti obiettivi sono raggiunti tramite una biomassa liofilizzata ottenuta tramite il procedimento secondo una qualsiasi delle forme di realizzazione discusse in precedenza.

30

Secondo una forma di realizzazione, tale biomassa liofilizzata è in forma solida, preferibilmente in forma di granulo o di polvere.

5 I predetti obiettivi sono infine raggiunti tramite una  
composizione farmaceutica, o una composizione per  
dispositivo medico, o una composizione per uso  
cosmetico, o una composizione per integratore alimentare  
o una composizione per un prodotto alimentare o una  
10 composizione per un alimento a fini medici speciali -  
AFMS comprendenti, dette composizioni, la biomassa  
liofilizzata secondo una qualsiasi delle forme di  
realizzazione discusse in precedenza.

15 In accordo a una forma di realizzazione, le composizioni  
della presente invenzione comprendono oppure,  
alternativamente, consistono di un *Live Biotherapeutic  
Product* (LBP), con tale espressione intendendosi una  
composizione biologica che contiene cellule di batteri  
20 (in particolare vitali) ed almeno un farmaco o principio  
attivo, applicabile per il trattamento, per la  
prevenzione o per la cura di un disturbo, di una  
malattia o di una condizione, e che non comprende né  
consiste in un vaccino immunogeno-specifico.

25

Qui di seguito la presente invenzione sarà illustrata in  
base ad alcuni esempi, forniti a solo titolo  
esemplificativo e non limitativo.

30

ESEMPI.

Esempio 1: Preparazione di una soluzione o soluzione di crioprotezione utilizzabile nella fase (iii).

In un contenitore di volume opportuno si versano, in un  
5 litro di acqua, le seguenti materie prime, nei rapporti indicati:

- saccarosio: 400 g/l;
- sodio citrato: 50 g/l;
- mono-idrogeno fosfato di potassio: 135 g/l
- 10 - L-cisteina: 2,5 g/l.

Un saccarosio utilizzabile in questa invenzione è il prodotto SACCAROSIO RFF EP, cod. 649400, prodotto da Suedzucker AG, commercializzato da Giusto Faravelli S.p.A. ([www.faravelli.it](http://www.faravelli.it)).

15 Un sodio citrato utilizzabile in questa invenzione è in forma di cristalli solubili in acqua. Preferibilmente, una percentuale in peso compresa da 85% a 100%, preferibilmente compresa da 90% a 95%, dei cristalli di sodio citrato ha una distribuzione delle dimensioni  
20 particellari compresa da 149 micrometri a 595 micrometri.

A titolo di esempio, un sodio citrato utilizzabile in questa invenzione è il prodotto SODIO CITRATO TRIB.2H2O CRIST.FINI E331-BP-USP/NF-EP, cod. 674500, prodotto da  
25 S.A. Citrique Belge N.V., commercializzato da Giusto Faravelli S.p.A. ([www.faravelli.it](http://www.faravelli.it)).

Un mono-idrogeno fosfato di potassio utilizzabile in questa invenzione è il prodotto POTASSIO FOSFATO BIB.ANIDRO E340, cod. 593500, commercializzato da Giusto  
30 Faravelli S.p.A. ([www.faravelli.it](http://www.faravelli.it)).

Una L-cisteina utilizzabile in questa invenzione è il prodotto L-CISTEINA HCL MONOIDRATA da ferment, cod. 285400, commercializzato da Giusto Faravelli S.p.A. (www.faravelli.it).

5 La soluzione così ottenuta viene agitata fino a completa dissoluzione delle materie prime.

In una fase successiva, tale soluzione viene sterilizzata, in particolare per via termica. Più precisamente, tale soluzione viene riscaldata  
10 (pastorizzata) ad una temperatura di circa 90°C, e mantenuta a tale temperatura per circa 30-35 minuti.

Dopodiché, la soluzione viene raffreddata fino ad una temperatura di circa 6°C - 8°C ed è in tal modo pronta all'uso.

15 Durante il raffreddamento è possibile insufflare la soluzione con azoto gassoso per allontanare l'ossigeno disciolto e migliorare quindi la compatibilità della soluzione di crioprotezione nei confronti di microrganismi strettamente anaerobi.

20

Esempio 2: Preparazione di un'altra soluzione di crioprotezione utilizzabile nella fase (iii).

Si procede come nell'Esempio 1, utilizzando circa 128 g/l di pirofosfato alcalino, preferibilmente pirofosfato  
25 di potassio (CAS N. 7320-34-5), al posto del monoidrogeno fosfato di potassio, il solvente e le altre materie prime essendo immutate anche nei rapporti.

Un pirofosfato di potassio utilizzabile in questa invenzione è il prodotto "Potassium pyrophosphate 97%",  
30 numero prodotto 322431, commercializzato da Sigma-

Aldrich (Saint Louis, MO 63103, Stati Uniti; sigma-aldrich.com).

Esempio 3: Preparazione di una biomassa fermentata  
5 secondo la fase (i) e di una biomassa concentrata  
secondo la fase (ii).

A partire da una coltura di cellule di batteri vitali  
(fattispecie di biomassa di batteri) contenente un ceppo  
di *Lactobaccillus rhamnosus* GG (ATCC 53103), si effettua  
10 una fermentazione in opportuno substrato (o brodo) di  
fermentazione, per circa 16-18 ore.

A titolo indicativo, una coltura attiva del ceppo  
suddetto viene inoculata in ragione del 2-4% V/V  
(percentuale in volume della coltura rispetto al volume  
15 del substrato), preferibilmente del 3%; nel substrato di  
fermentazione costituito da destrosio, peptone vegetale  
ed estratto di lievito nei quantitativi precedentemente  
indicati, più sali di manganese e tensioattivo. La  
coltura è incubata a 31°C-33°C per circa 16 ore,  
20 mantenendo costante il pH compreso tra 5,45 e 6,0  
preferibilmente compreso tra 5,80 e 5,90.

Al termine della fase (i) di fermentazione, si procede  
con una prima concentrazione (fase (ii)) della biomassa  
fermentata, nello specifico centrifugando il brodo di  
25 fermentazione di cui sopra, e separando la fase acquosa  
dalla fase solida o cellulare.

I microrganismi contenuti nella fase solida possono  
quindi essere lavati (fase (ii.a)), utilizzando acqua  
sterile (preferibilmente bi-distillata) in un rapporto  
30 4:1 rispetto al peso della biomassa di batteri.

Attraverso una seconda centrifugazione della biomassa di batteri miscelata all'acqua sterile nel suddetto rapporto, si provvede quindi a concentrare nuovamente la biomassa lavata (fase ii.b)), con un fattore di  
5 concentrazione in volume (FCV) complessivo compreso da circa 10 a 30 volte, preferibilmente di circa 20 volte. Ciò significa che il volume finale viene ridotto di circa 10-30 volte, preferibilmente circa 20 volte, rispetto al volume iniziale, a parità di cellule di  
10 batteri contenute.

Si ottiene quindi una biomassa lavata e riconcentrata. Si provvede a regolare il valore di pH (fase (ii.c)) della biomassa lavata e riconcentrata, attraverso un'aggiunta di una base debole, di preferenza inorganica  
15 (preferibilmente  $\text{NH}_4\text{OH}$ ), fino ad un pH di circa  $6,2 \pm 0.1$ , in modo da ottenere una biomassa a pH regolato.

Un idrossido di ammonio utilizzabile in questa invenzione è il prodotto IDRATO DI AMMONIO, commercializzato da F.lli Bonafede S.a.s. (21013  
20 Gallarate (VA), Italia).

Esempio 4: Fase di miscelazione - fase (iii), e fase di liofilizzazione - fase (iv).

Alla biomassa a pH regolato dell'Esempio 3, si aggiunge  
25 poi la soluzione di crioprotezione dell'Esempio 1 (oppure dell'Esempio 2), in tal modo ottenendo la biomassa crioprotetta (BC) come prodotto della fase (iii).

Il rapporto tra il peso della biomassa a pH 6,6 ed il  
30 volume della soluzione di crioprotezione potrebbe essere

compreso da circa 80:20 a 75:25, dopodiché si procede alla liofilizzazione. Ciò significa miscelare la soluzione di crioprotezione dell'Esempio 1 (oppure dell'Esempio 2) in ragione del 20% calcolato sul volume della miscela finale complessiva, o preferibilmente in  
5 ragione del 25% sempre calcolato sul volume della miscela finale complessiva denominata biomassa crioprotetta (BC).

La BC viene quindi caricata ossia collocata in un  
10 liofilizzatore e sottoposta ad un processo di congelamento-essicamento denominato "freeze-drying" (liofilizzazione).

A tale scopo la temperatura della biomassa crioprotetta viene abbassata in modo progressivo al fine di favorire  
15 un congelamento completo della biomassa crioprotetta (fase (iv.a)) a dare una biomassa congelata. Nello specifico il prodotto viene raffreddato sino alla temperatura compresa da  $-40^{\circ}\text{C}$  a  $-45^{\circ}\text{C}$  raggiunta progressivamente (circa  $1^{\circ}\text{C}/4$  min), in un tempo di circa  
20 2 ore, ed è quindi mantenuto in congelamento alla suddetta temperatura per circa 2-4 ore.

A seguito di tale congelamento completo (iv.a), si provvede a ridurre la pressione della camera fino ad un  
valore di circa  $5.00\text{E}-02$  -  $5.00\text{E}-03$  mbar,  
25 preferibilmente  $1.00\text{E}-03$  mbar (fase (iv.b.1)).

Mantenendo questo valore di pressione, si provvede quindi ad innalzare nuovamente la temperatura (fase (iv.b.2)) al fine di provocare una sublimazione della soluzione di crioprotezione. Il fenomeno di sublimazione  
30 è dovuto fondamentalmente alla circostanza che, al di

sotto del punto triplo del diagramma di stato di tale miscela, la soluzione solidificata per congelamento può modificare il proprio stato di aggregazione solamente in fase gas, senza liquefare.

5 Ad esempio, la rampa di riscaldamento applicabile al prodotto prevede che esso venga progressivamente portato da  $-45^{\circ}\text{C}$  ad una temperatura compresa da  $-20^{\circ}\text{C}$  a  $-10^{\circ}\text{C}$  in circa 8 - 10 ore, ad esempio aumentando la temperatura con step di  $5^{\circ}\text{C}$ , quindi mantenuto alla temperatura di  
10 circa  $-10^{\circ}\text{C}$  per altre 4-8 ore. Seguono almeno altre due fasi di riscaldamento prima a  $0^{\circ}\text{C}$  e mantenimento di questa temperatura per circa 4 ore, e poi sino a circa  $15^{\circ}\text{C}$  mantenuti per altre 4 ore circa. Il prodotto è quindi portato alla temperatura finale di circa  $25^{\circ}\text{C}$ - $30^{\circ}\text{C}$   
15 ad una velocità di  $0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , e mantenuto a detta temperatura finale per circa 8 ore - 12 ore.

Il processo di liofilizzazione (fase (iv)) dura generalmente 2-3 giorni, a seconda del ceppo coinvolto. Nel presente caso del *Lactobaccillus rhamnosus* GG (ATCC  
20 53103), il processo di liofilizzazione è durato circa 60-72 ore.

La biomassa liofilizzata così ottenuta può essere conservata, preferibilmente dopo opportuna frantumazione/macinazione (fase (v)) del prodotto (cake)  
25 ottenuto al termine della liofilizzazione, tale conservazione potendo eventualmente essere effettuata a seguito di una fase di confezionamento (fase (vi)) in unità o dosi così come di seguito indicato all'Esempio  
6.

Esempio 5: Analisi della biomassa liofilizzata.

Si è quindi provveduto ad analizzare i campioni ottenuti a seguito del procedimento illustrato nell'Esempio 4.

Nella seguente Tabella 1, nelle colonne da sinistra a  
5 destra, sono riportati i tipi di analisi condotte, i requisiti o valori ottenuti nelle analisi, ed i metodi applicati per testare le grandezze o i valori:

Tabella 1.

Analisi	Requisito	Metodo di test
Esame fisico		
Aspetto	Polvere omogenea di colore da bianco a bianco sporco	Met. Int.* <sup>5</sup> 203 (valutazione visiva del colore della polvere mediante comparazione ad un riferimento interno costituito da tre tonalità di bianco. Il prodotto è conforme se il suo colore risulta all'interno del riferimento)
Attività dell'acqua (Aw)	≤ 0.200	Met. Int.* <sup>5</sup> 201 (analisi effettuata con apposito strumento Aqualab che permette di determinare l'attività dell'acqua del campione sulla base del punto di rugiada)
Saggio/Potenza		
Cellule vitali <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG (Plate Count; PC)	≥ 5 × 10 <sup>9</sup> CFU* <sup>3</sup> / dose (2g)	Met. Int.* <sup>5</sup> 014 (metodo diretto di conta in piastra mediante ricostituzione del campione in tampone fosfato, sue diluizioni decimali in soluzione fisiologica ed inoculo delle diluizioni opportune in terreno

		agarizzato LAPTg)
Cellule vitali <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG (FCM* <sup>1</sup> )	$\geq 5 \times 10^9$ AFU* <sup>4</sup> / dose (2g)	ISO 19344:2015
Purezza		
Conteggio microbico aerobico totale (TAMC)	$\leq 1 \times 10^3$ CFU* <sup>3</sup> /g (conforme secondo Ph. Eur.* <sup>2</sup> 5.1.4 per preparazioni non acquose per uso orale)	Met. Int.* <sup>5</sup> 004 in accordo a Ph. Eur.* <sup>2</sup> 2.6.12
Conteggio totale combinato lieviti / muffe (TYMC)	$\leq 1 \times 10^2$ CFU* <sup>3</sup> /g (conforme secondo Ph. Eur.* <sup>2</sup> 5.1.4 per preparazioni non acquose per uso orale)	Ph. Eur.* <sup>2</sup> 2.6.12
Batteri Gram-negativi bile-tolleranti	$< 100$ CFU* <sup>3</sup> /g	Ph. Eur.* <sup>2</sup> 2.6.13, (4-1.)
<i>Staphylococcus aureus</i>	assente/g	Ph. Eur.* <sup>2</sup> 2.6.13, (4-5.)
<i>Escherichia coli</i>	assente/g (conforme	Ph. Eur.* <sup>2</sup> 2.6.13, (4-2.)

	secondo Ph. Eur.* <sup>2</sup> 5.1.4 per preparazioni non acquose per uso orale)	
<i>Salmonella spp.</i>	assente/10g (conforme)	Ph. Eur.* <sup>2</sup> 2.6.13, (4-3.)

\*<sup>1</sup> FCM = citofluorimetria a flusso;

\*<sup>2</sup> Ph. Eur. = Farmacopea Europea;

\*<sup>3</sup> CFU = unità formanti colonia;

5 \*<sup>4</sup> AFU = unità fluorescenti attive;

\*<sup>5</sup> Met. Int. = metodo interno.

Si precisa che tutte le norme su indicate si intendono nella versione valida alla data di priorità di questa domanda di brevetto.

10

Esempio 6: Analisi della durata di conservazione.

Il prodotto dell'Esempio 5 è stato conservato all'interno di un packaging primario in carta e alluminio con le seguenti stratificazioni, dall'esterno  
 15 del pacchetto verso l'interno: uno strato di carta (40 g/m<sup>2</sup>), due strati di alluminio ciascuno con uno spessore di 9 µm, ed uno strato di polietilene (spessore: 35 µm) direttamente in contatto con la composizione.

Come packaging secondario, accogliente il packaging  
 20 primario, si è usata una scatola in cartone.

I parametri riportati nelle seguenti tabelle A), B), C) sono stati utilizzati nei test contraddistinti con A),





<i>Escherichia coli</i>	conf.	conf.	conf.	conf.	conf.	conf.	conf.	conf.
<i>Staphylococcus aureus</i>	conf.	conf.	conf.	conf.	conf.	conf.	conf.	conf.
<i>Salmonella spp.</i>	conf.	conf.	conf.	conf.	conf.	conf.	conf.	conf.

I precedenti dati sperimentali di conta (CFU e AFU) sono riportati in forma di diagramma in figura 2.

Nella figura 4 si riportano invece le velocità di decadimento (k) CFU e AFU come valori di pendenza delle rette di interpolazione dei dati sperimentali nel modello lineare di Arrhenius, come discusso oltre.

Tabella C): 40°C/75% RH.

	T0	1	2	3	6
Aspetto	conf.	conf.	conf.	conf.	conf.
Aw	0.053	0.057	0.063	0.069	0.075
CFU (plate count) x 10 <sup>9</sup> /dose (2g)	64.0	32.6	15.0	1.4	1.6
AFU x 10 <sup>9</sup> /dose (2g)	86.0	57.0	43.0	33.8	42.2
TAMC	conf.	conf.	conf.	conf.	conf.
TYMC	conf.	conf.	conf.	conf.	conf.
Batteri Gram-negativi bile-tolleranti	conf.	conf.	conf.	conf.	conf.
<i>Escherichia coli</i>	conf.	conf.	conf.	conf.	conf.
<i>Staphylococcus aureus</i>	conf.	conf.	conf.	conf.	conf.
<i>Salmonella spp.</i>	conf.	conf.	conf.	conf.	conf.

10

I precedenti dati sperimentali di conta (CFU e AFU) sono riportati in forma di diagramma in figura 3.

Dai risultati sperimentali che precedono si può

osservare come i dati relativi ai parametri chimico-fisici e microbiologici (aspetto, aw, TAMC, TYMC, Batteri gram-negativi bile tolleranti, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella spp.*) si sono sempre  
5 rivelati conformi alle norme applicabili in tutte le condizioni applicate, anche quelle più estreme.

Inoltre è importante osservare il valore relativo alle unità fluorescenti attive (AFU) che - lo ricordiamo - è l'indice che definisce il numero di cellule di batteri  
10 con la membrana cellulare integra, e quindi ancora vitali.

Secondo gli ideatori della presente invenzione, i valori AFU sono di importanza estrema per comprendere a fondo la vitalità e funzionalità delle cellule di batteri  
15 analizzate, in quanto il valore CFU potrebbe essere falsato dalla presenza di cellule vitali non coltivabili (VBNC; *viable but not culturable*).

Infatti, il valore CFU non rende conto di cellule dormienti o che non generano colonie, ma che comunque  
20 manifestano un'attività metabolica oppure che - in condizioni ambientali opportune (ad esempio a contatto con il sistema enterico) - potrebbero recuperare da danni subletali.

Inoltre, le cellule integre (AFU), di cui le coltivabili  
25 (CFU) rappresentano un sottogruppo, possono essere intese come pacchetti di unità funzionali rappresentati dal genoma batterico; e che pertanto il monitoraggio di una popolazione batterica in termini di integrità di membrana supera il vincolo della coltivabilità e della  
30 funzionalità della cellula intesa solo come capacità di

replicarsi ed eventualmente colonizzare, ma anche come vettore di informazione genetico. Tale approccio apre pertanto a un potenziale applicativo ancora inesplorato poiché, grazie alla capacità della cellula batterica di

5 trasmettere informazione genetica per via orizzontale, è possibile integrare il microbioma intestinale con nuove informazioni trasportate dalla cellula integra (AFU).

Per quanto attiene al modello Arrhenius menzionato in precedenza, tale modello è stato costruito per valutare

10 l'influenza della temperatura sulla stabilità - a titolo di esempio - del *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103).

La microbiologia predittiva descrive la perdita esponenziale della vitalità batterica nel tempo,

15 seguendo un abbassamento di primo ordine, come indicato dalla rappresentazione del logaritmo naturale LN ( $N_t / N_0$ ) rispetto al tempo (t) come indicato nella seguente equazione:

$$N_t = N_0 e^{-kt}$$

20 in cui:

- $N_t$  = conteggio batterico al tempo t;
- $N_0$  = conteggio batterico al tempo zero;
- k = velocità di decadimento.

Dalla precedente equazione si rende quindi possibile

25 calcolare il tempo di riduzione decimale (D1), che è definito come il tempo necessario affinché la concentrazione delle cellule di batteri vitali raggiunga un decimo della quantità iniziale. Ad esempio, il valore D1 mostrato nelle seguenti tabelle illustra i valori del

30 tempo di riduzione decimale espresso in mesi, calcolato

secondo l'equazione:

$$D1 = \ln 10/k$$

La velocità di decadimento (k) può essere determinata per qualsiasi temperatura, sulla base della pendenza di ciascuna retta di interpolazione.

In riferimento alla figura 4, i dati relativi alla velocità di decadimento sono mostrati nella seguente tabella D) per i valori CFU e nella tabella E) per i valori di AFU.

10

Tabella D): velocità di decadimento CFU (*plate count*).

	1/T*1000 (K <sup>-1</sup> )	k (mesi <sup>-1</sup> )	LNk	D1 (mesi)
Test A): 25°C (298,15 K) 60% RH	3,354016435	0,016	-4,135166557	143,9
Test B): 30°C (303,15K) 75% RH	3,298697015	0,111	-2,198225078	20,7
Test C): 40°C (313,15K) 75% RH	3,193357816	0,6616	-0,413094135	3,5

Nella precedente tabella si riportano anche i calcoli relativi al test A) e al test C), benché tali dati non siano riportati in un diagramma come quello di figura 4 per il test B).

15

Tabella E): velocità di decadimento AFU (citofluorimetria a flusso).

	1/T*1000 (K <sup>-1</sup> )	k (mesi <sup>-1</sup> )	LNk	D1 (mesi)
Test A):	3,354016435	0,0021	-6,165818	1096,5

25°C (298,15 K) 60% RH				
Test B): 30°C (303,15K) 75% RH	3,298697015	0,0038	-5,572754	605,9
Test C): 40°C (313,15K) 75% RH	3,193357816	0,1071	-2,233992	21,5

Nella precedente tabella si riportano anche i calcoli relativi al test A) e al test C), benché tali dati non siano riportati in un diagramma come quello di figura 4 per il test B).

I tempi di riduzione decimale D1 esplicitati in tabella E) mostrano tempi di riduzione decimale delle cellule di batteri sorprendenti, che arrivano a più di 21 mesi nelle condizioni di conservazione più drastiche. Ne consegue che la stabilità della presente composizione è assicurata anche in periodi estivi, e in condizioni di aumento non controllato della climatizzazione.

È altresì importante notare come il parametro AFU consenta di ottenere una fedele fotografia della vitalità reale dei microrganismi, in virtù dell'integrità della membrana cellulare di questi e nonostante l'eventuale presenza di cellule vitali non coltivabili (VBNC).

Esempio 7: Individuazione analitica degli ioni pirofosfato.

Sono state condotte delle prove al fine di individuare gli ioni pirofosfato nella soluzione di crioprotezione,

eseguita seguendo le indicazioni dei saggi riportati in Farmacopea Europea.

In particolare, a 5 ml di una soluzione contenente pirofosfato, neutralizzata se necessario, si aggiungono

5 5 ml di una soluzione di nitrato di argento. Come conseguenza si forma un precipitato bianco.

Si è provveduto a ripetere la prova, in presenza delle cellule di batteri vitali liofilizzate e a seguito di una loro ricostituzione con acqua.

10 Da tale analisi è emerso che le cellule di batteri vitali non hanno effetti mascheranti nell'individuazione degli ioni pirofosfato.

Innovativamente, la presente invenzione consente di raggiungere gli obiettivi prefissati.

15 Più precisamente, la presente invenzione fornisce un procedimento in grado di liofilizzare cellule di batteri vitali in presenza di un crioprotettore, danneggiando una quantità esigua di membrane cellulari dei microorganismi.

20 Vantaggiosamente, la presente invenzione fornisce un protocollo analitico in grado di distinguere in modo affidabile le cellule di batteri vitali, pur non coltivabili, all'interno delle cellule di batteri totali presenti.

25 Alle forme di realizzazione del procedimento, delle composizioni e del prodotto suddetti, un tecnico del ramo potrà apportare sostituzioni o modifiche alle caratteristiche descritte a seconda delle contingenze.

Anche tali forme di realizzazione sono da ritenersi  
30 ricomprese nell'ambito di tutela formalizzato nelle

seguenti rivendicazioni.

Inoltre, si precisa che qualsiasi forma di realizzazione potrà essere implementata in modo indipendente dalle altre forme di realizzazione descritte.

**RIVENDICAZIONI**

1. Un procedimento per la preparazione di una biomassa di cellule di batteri liofilizzate, comprendente le  
5 seguenti fasi:
- (i) fermentare una biomassa di cellule di batteri (biomassa di batteri) precedentemente preparata comprendente almeno un ceppo di cellule di batteri per ottenere una biomassa di cellule di batteri fermentata  
10 (biomassa fermentata);
- (ii) concentrare la biomassa fermentata ottenuta dalla fase (i) fino ad ottenere una biomassa di cellule di batteri concentrata (biomassa concentrata) avente una concentrazione di cellule di batteri compresa da  $1 \times 10^6$   
15 cellule/ml di biomassa liquida a  $1 \times 10^{12}$  cellule/ml di biomassa liquida;
- (iii) miscelare la biomassa concentrata ottenuta dalla fase (ii) con una soluzione che comprende o, alternativamente, consiste di: (a) almeno un sale del  
20 fosforo scelto dal gruppo comprendente o, alternativamente, consistente di un sale dello ione fosfato o acido fosforico, un sale dello ione fosfito o acido fosforoso, un sale dello ione mono-idrogeno fosfato, un sale dello ione di-idrogeno fosfato, un sale  
25 dello ione pirofosfato o acido pirofosforico, e loro miscele, e (b) almeno una sostanza poli-idrossi scelta dal gruppo comprendente o, alternativamente, consistente di saccarosio, fruttosio, lattosio, lattitolo, trealosio o mannitolo, e loro miscele per ottenere una biomassa di  
30 cellule di batteri crioprotette (biomassa crioprotetta);

(iv) liofilizzare la biomassa crioprotetta ottenuta dalla fase (iii) per ottenere una biomassa di cellule di batteri liofilizzate (biomassa liofilizzata).

5 2. Il procedimento secondo la rivendicazione 1, comprendente, prima della fase (iii):

(ii.a) lavare la biomassa concentrata ottenuta dalla fase (ii) a dare una biomassa lavata;

10 (ii.b) riconcentrare la biomassa lavata ottenuta dalla fase (ii.a) a dare una biomassa riconcentrata;

(ii.c) regolare un valore di pH della biomassa riconcentrata ottenuta dalla fase (ii.b), ad un valore di pH compreso da  $5\pm 0,1$  a  $7\pm 0,1$ , a dare una biomassa a pH regolato.

15

3. Il procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui la biomassa concentrata della fase (ii) è miscelata con una soluzione che comprende o, alternativamente, consiste  
20 dell'almeno un sale del fosforo (a), dell'almeno una sostanza poli-idrossi (b) e (c) L-cisteina.

4. Il procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui la biomassa liofilizzata della fase (iv) ha una concentrazione di  
25 cellule di batteri compresa da  $1 \times 10^6$  cellule/g a  $1 \times 10^{13}$  cellule/g, preferibilmente una concentrazione compresa da  $1 \times 10^7$  cellule/g a  $1 \times 10^{12}$  cellule/g, ancora più preferibilmente una concentrazione compresa da  $1 \times 10^8$   
30 cellule/g a  $1 \times 10^{12}$  cellule/g, più preferibilmente ancora

una concentrazione compresa da  $1 \times 10^9$  cellule/g a  $1 \times 10^{12}$  cellule/g, per ogni grammo di biomassa liofilizzata ottenuta dalla fase (iv).

5 5. Il procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui la liofilizzazione della fase (iv) comprende, dopo la fase (iii), le seguenti fasi:

(iv.a) congelamento della biomassa crioprotetta ottenuta  
10 dalla fase (iii) per ottenere una biomassa congelata;

(iv.b) sublimazione del ghiaccio della biomassa congelata ottenuta dalla fase (iv.a) a dare la biomassa liofilizzata.

15 6. Il procedimento secondo la rivendicazione precedente, in cui la sublimazione della fase (iv.b) comprende:

(iv.b.1) una fase di essiccamento primario della biomassa congelata ottenuta dalla fase (iv.a), e

(iv.b.2) un successivo essiccamento secondario o  
20 desorbimento, sulla biomassa ottenuta dalla fase (iv.b.1), a dare la biomassa liofilizzata.

7. Il procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, comprendente, oltre alle fasi  
25 (i), (ii), (iii) e (iv), fasi preferite di:

(viii) mettere a contatto la biomassa fermentata ottenuta dalla fase (i), la biomassa concentrata ottenuta dalla fase (ii), la biomassa crioprotetta ottenuta dalla fase (iii), e/o la biomassa liofilizzata  
30 ottenuta dalla fase (iv) con due diversi coloranti

fluorescenti, in modo da ottenere una biomassa fermentata fluorescente, una biomassa concentrata fluorescente, una biomassa crioprotetta fluorescente e/o una biomassa liofilizzata fluorescente;

5 (ix) successivamente alla fase (viii), tramite citofluorimetria a flusso, rilevare una quantità di cellule di batteri con membrane cellulari integre nella biomassa fermentata fluorescente, nella biomassa concentrata fluorescente, nella biomassa crioprotetta  
10 fluorescente e/o nella biomassa liofilizzata fluorescente.

8. Il procedimento secondo la rivendicazione precedente, in cui detta quantità è espressa come unità o cellule  
15 fluorescenti attive (AFU; *active fluorescent units*) per le quali vale la seguente correlazione:

$$TFU = AFU + nAFU$$

in cui:

- TFU (*total fluorescent units*) sono le unità o cellule  
20 batteriche fluorescenti totali;  
- nAFU (*non active fluorescent units*) sono le unità o cellule batteriche fluorescenti non vitali, con una membrana cellulare danneggiata.

25 9. Il procedimento secondo la rivendicazione 7 o 8, in cui detta quantità di cellule di batteri con membrane cellulari integre è utilizzata per monitorare i parametri di processo che governano la fase (i), la fase (ii), la fase (iii) e/o la fase (iv).

10. Il procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, comprendente, oltre alle fasi (i), (ii), (iii) e (iv), una fase (v) successiva alla fase (iv) in cui la biomassa liofilizzata ottenuta dalla  
5 fase (iv) viene frantumata a dare una biomassa frantumata.

11. Una biomassa di cellule di batteri liofilizzate ottenuta tramite il procedimento secondo una qualsiasi  
10 delle rivendicazioni precedenti.

12. La biomassa secondo la rivendicazione precedente, caratterizzata per il fatto di essere in forma solida, preferibilmente in forma di granulo o di polvere.  
15

13. Una composizione farmaceutica, o composizione per dispositivo medico, o una composizione per uso cosmetico, o composizione per integratore alimentare o composizione per un prodotto alimentare o composizione  
20 per un alimento a fini medici speciali (AFMS) comprendente, la biomassa di cellule di batteri liofilizzate secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 11-12.

1/2

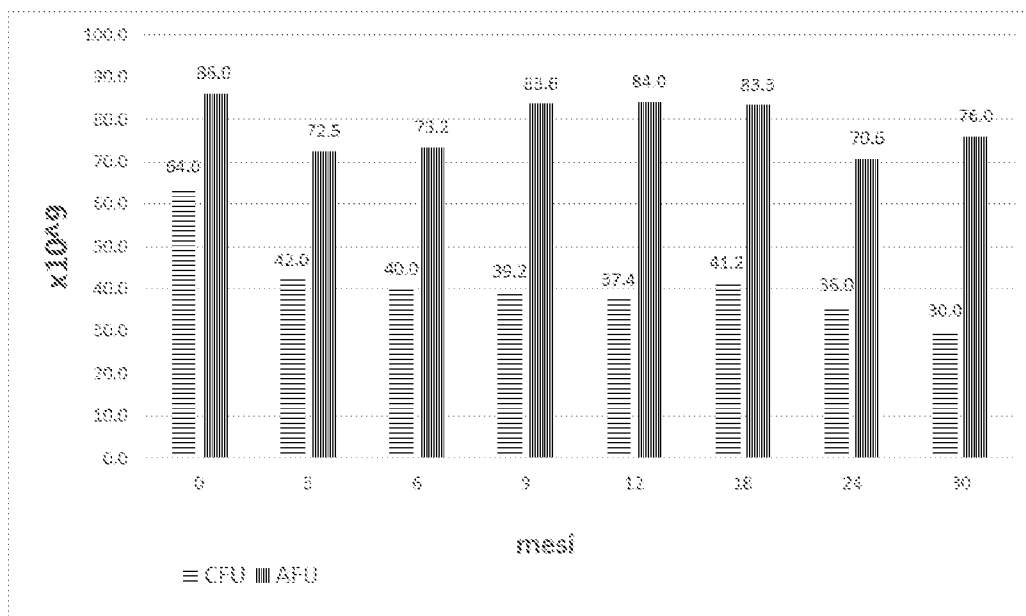


FIG. 1

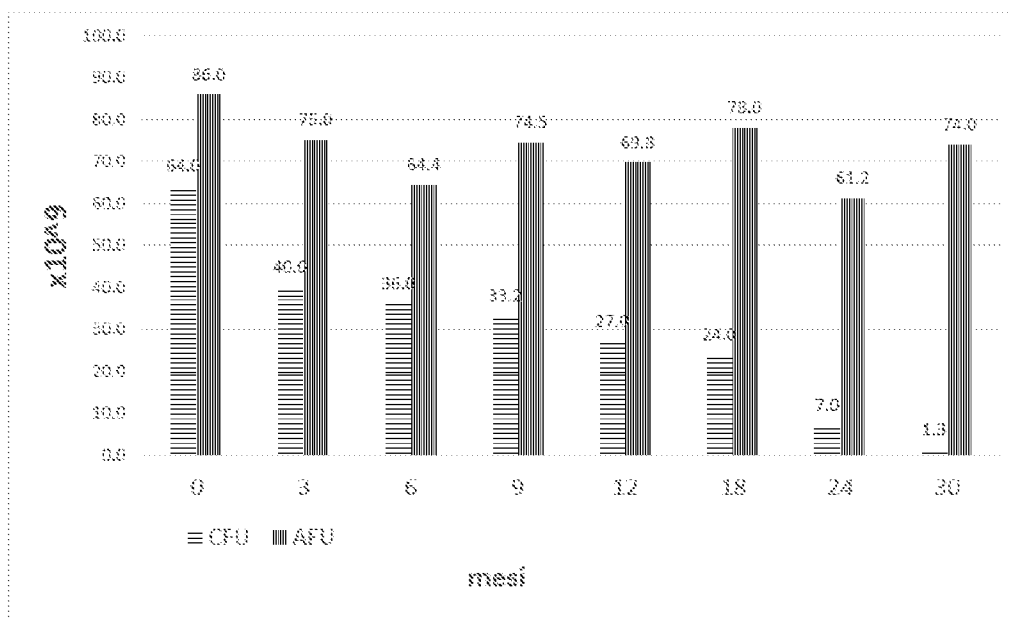


FIG. 2

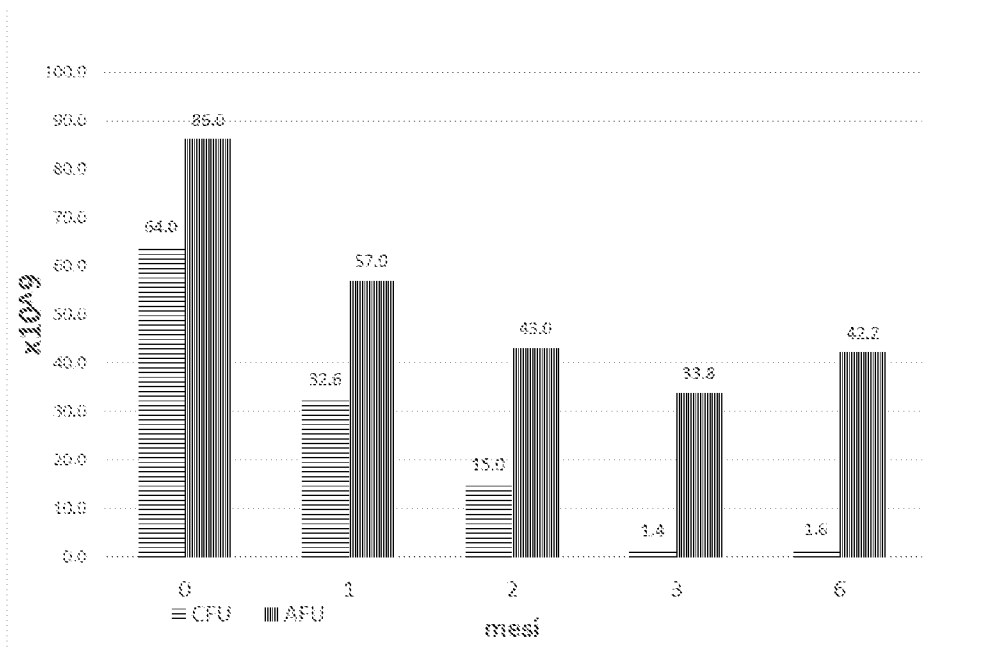


FIG. 3

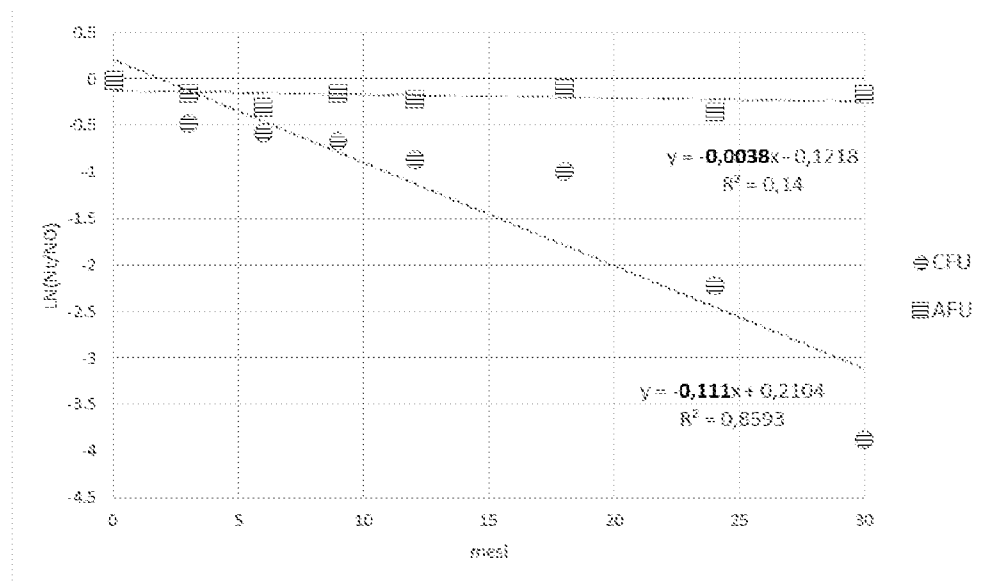


FIG. 4