

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 856 678**

(51) Int. Cl.:  
**A01N 25/00** (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.11.2013 PCT/GB2013/053065**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **30.05.2014 WO14080199**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.11.2013 E 13821702 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.12.2020 EP 2922397**

---

(54) Título: **Conservantes**

(30) Prioridad:

**21.11.2012 GB 201220940**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**28.09.2021**

(73) Titular/es:

**EDEN RESEARCH PLC (100.0%)  
67c Innovation Drive, Milton Park  
Abingdon, Oxfordshire OX14 4RQ, GB**

(72) Inventor/es:

**ABREY, ALEXANDER JOHN;  
BROOKS, KENNETH WILLIAM;  
GILL, SIR ARTHUR BENJAMIN NORMAN y  
NEWITT, CLIVE ROLAND**

(74) Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 856 678 T3**

---

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Conservantes

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a composiciones novedosas, a métodos de preparación y a usos relacionados con las mismas.

10 Más particularmente, la invención se refiere a composiciones que comprenden sistemas de administración microscópicos, es decir, un sistema para la administración de agentes activos, tales como agentes farmacéuticamente activos, pesticidas, bactericidas, etc.

15 Antecedentes de la invención

15 Se conoce el uso de sistemas microscópicos de administración de agentes activos tales como los que comprenden microcápsulas, micropartículas y liposomas.

20 Por ejemplo, la Solicitud de Patente Internacional No. WO 2006/007372 describe un sistema de administración de partículas que comprende una pared celular de levadura extraída que comprende beta-glucano, una molécula de carga útil y una molécula de captura de carga útil.

25 Además, la Solicitud de Patente Internacional No. WO 2005/113128 describe composiciones que comprenden partículas huecas de glucano o partículas huecas de pared celular que encapsulan una cantidad eficaz de un componente de terpeno que son apropiadas para prevenir y tratar infecciones en plantas y animales, incluidos los seres humanos, comprendiendo dichas composiciones de 1 a 99 % en volumen de terpenos. Además, el documento WO 2007/063268 A1 describe partículas huecas de glucano que encapsulan un componente de terpeno para matar microorganismos. Adicionalmente, se sabe que incluyen conservantes en tales composiciones, por ejemplo hidroxibenzoato de metilo, ácido ascórbico y ácido sórbico.

30 Los materiales antimicóticos se agregan a menudo a los alimentos para prolongar la vida útil de los alimentos para inhibir el crecimiento de mohos, levaduras, hongos, etc.

35 Ciertas composiciones de micropartículas comprenden materiales perecederos, tales como partículas de levadura o glucano. Tales composiciones son susceptibles de degradación o deterioro por el crecimiento de moho, levadura u hongos. La vida útil de las micropartículas se puede reducir drásticamente debido al deterioro por el crecimiento de moho, levadura o hongos.

40 Ahora se ha descubierto sorprendentemente que la inclusión en una composición de micropartículas de una cantidad de uno o más terpenos, por debajo del nivel eficaz entendido convencionalmente, puede proporcionar un efecto conservante útil sobre la micropartícula.

Sumario de la invención

45 Por lo tanto, según un primer aspecto de la presente invención, se proporciona una composición que comprende un componente de micropartículas; opcionalmente un agente activo encapsulado; y una cantidad conservante de uno o más terpenos.

50 Preferiblemente, la composición de este aspecto de la invención incluye un agente activo encapsulado en el componente de micropartículas.

55 Una cantidad conservante de uno o más terpenos será generalmente una cantidad antimicótica, pero comprenderá una cantidad inferior a la que se entiende convencionalmente que es una cantidad eficaz de un terpeno. La cantidad eficaz convencionalmente entendida de un terpeno, incorporará el uso de un terpeno como agente terapéuticamente activo, un pesticida, por ejemplo, insecticida, fungicida, acaricida, etc.

60 Por lo tanto, el término "cantidad conservante" o "cantidad antimicótica" de uno o más terpenos se interpretará en el sentido de una cantidad antimicótica o antibacteriana, es decir, una cantidad que sea suficiente para inhibir o prevenir el crecimiento de mohos, levaduras y/u hongos indeseables en la micropartícula o en las composiciones de micropartículas, pero no suficientes para ser eficaces de otra manera, por ejemplo, al ambiente externo a las micropartículas. De este modo, una cantidad de un componente de terpeno que puede considerarse una cantidad conservante o una cantidad antimicótica es del 1 % p/p o menos, es decir, ≤1 % p/p, <1 % p/p, ≤0.9 % p/p, ≤0.8 % p/p, ≤0.7 % p/p, ≤0.6 % p/p, ≤0.5 % p/p, ≤0.4 % p/p, ≤0.3 % p/p, ≤0.2 % p/p, ≤0.1 % p/p, ≤0.09 % p/p, ≤0.08 % p/p, ≤0.07 % p/p, ≤0.06 % p/p, ≤0.05 % p/p, ≤0.04 % p/p, <0.03 % p/p, ≤0.02 % p/p, ≤0.01 % p/p de la composición. La cantidad de conservante o cantidad antimicótica del uno o más terpenos puede ser desde aproximadamente 0.01 % p/p a aproximadamente 0.99 % p/p.

La elección del terpeno puede variar y se pueden usar mezclas de terpenos en una cantidad apropiada. De este modo, en una realización, el componente de terpeno incluye uno o más terpenos que contienen oxígeno. El citral, por ejemplo el citral 95, es un terpeno  $C_{10}H_{16}$  oxigenado,  $C_{10}H_{16}O$  CAS No. 5392-40-5 (3,7-dimetil-2,6-octadien-1-al).

5 Se puede formar una suspensión estable de citral hasta aproximadamente 2500 ppm. El citral se puede convertir en una solución hasta aproximadamente 500 ppm. Se puede preparar una suspensión estable de partículas huecas de glucano que incorporen citral de 25 ppt de citral.

10 El uno o más terpenos empleados en una cantidad conservante o cantidad antimicótica de la composición de la presente invención como se describió anteriormente en este documento pueden comprender los que se encuentran en la naturaleza y generalmente no están modificados. De este modo, los terpenos preferidos están clasificados como GRAS (generalmente considerados seguros) por the Environmental Protection Agency de los EE. UU. y se han usado durante muchos años en las industrias de aromas y fragancias. Los terpenos que están exentos de las regulaciones de EE. UU. y que se enumeran en la regulación de la EPA 40 C. F.R. Parte 152 (incorporada en este documento como referencia en su totalidad) son apropiados para su uso en esta invención. La unidad estructural de los terpenos es el isopreno de 16 hidrocarburos ( $C_5H_8$ )n.

15 El término "terpeno" como se usa en este documento se refiere no solo a terpenos de fórmula ( $C_5H_8$ )n, sino que también abarca derivados de terpeno, tales como aldehídos de terpeno o polímeros de terpeno. Se incluyen terpenos naturales y sintéticos, por ejemplo monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos y tetraterpenos. Además, la referencia a un solo nombre de un compuesto abarcará los diversos isómeros de ese compuesto. Por ejemplo, el término citral incluye el isómero cis citral-a (o geranal) y el isómero trans citral-b (o neral). Los terpenos particularmente apropiados para su uso en la presente invención incluyen aquellos seleccionados del grupo que consiste en citral, pineno, nerol, b-ionona, geraniol, carvacrol, eugenol, carvona (por ejemplo L-carvona), terpeniol, anetol, alcanfor, mentol, timol, limoneno, nerolidol, farnesol, fitol, caroteno (vitamina A<sub>1</sub>), escualeno, timol, tocotrienol, alcohol perílico, borneol, mirceno, simeno, careno, terpeno, linalol y mezclas de los mismos.

20 Los terpenos usados en la presente invención pueden tener la estructura general  $C_{10}H_{16}$ .

25 30 El componente de terpeno puede comprender un terpeno seleccionado del grupo que consiste en uno o más de geraniol, timol, citral, carvona (por ejemplo L-carvona), eugenol y b-ionona, o una mezcla de los mismos. De este modo, el componente de terpeno puede comprender geraniol. Alternativamente, el componente de terpeno puede comprender timol. Alternativamente, el componente de terpeno puede comprender citral. Alternativamente, el componente de terpeno puede comprender carvona (por ejemplo, L-carvona). Alternativamente, el componente de terpeno puede comprender eugenol. Alternativamente, el componente de terpeno puede comprender b-ionona.

35 Cabe señalar que los terpenos también se conocen por los nombres del extracto o aceite esencial que los contienen, por ejemplo, aceite de limoncillo (contiene citral).

40 45 El componente de terpeno de la presente invención puede comprender un solo terpeno o una mezcla de terpenos como se definió anteriormente en este documento. Un terpeno apropiado es el citral. Otro terpeno apropiado es una combinación de terpenos. También puede ser apropiada una combinación de uno o más de geraniol, timol y eugenol, por ejemplo, geraniol y timol; o geraniol y eugenol; o timol y eugenol; o geraniol, timol y eugenol. Cuando se usa una combinación de terpenos, la proporción de terpenos puede variar.

50 Ciertas formulaciones de terpenos que pueden ser apropiadas incluyen (los porcentajes están en p/p):

55 60 65 100 % de timol;

60 65 100 % de geraniol;

65 100 % de eugenol;

100 % de citral; y

100 % de L-carvona.

Otras formulaciones de terpenos que pueden ser apropiadas incluyen (los porcentajes están en p/p):

100 % de timol;

50 % de geraniol y 50 % de timol;

50 % de eugenol y 50 % de timol;

33 % de geraniol, 33 % de eugenol y 33 % de timol;

- 33 % de eugenol, 33 % de timol y 33 % de citral;  
25 % de geraniol, 25 % de eugenol, 25 % de timol y 25 % de citral; y  
5 20 % de geraniol, 20 % de eugenol, 20 % de citral, 20 % de timol y 20 % de L-carvona.
- De acuerdo con lo anterior, un componente de terpeno que comprende cualquiera de las formulaciones anteriores es particularmente apropiado para su uso en la presente invención.  
10 En otra realización, el componente de terpeno incluye uno o más terpenos que contienen oxígeno. El citral, por ejemplo el citral 95, es un terpeno  $C_{10}H_{16}$  oxigenado,  $C_{10}H_{16}O$  CAS No. 5392-40-5 (3,7-dimetil-2,6-octadien-1-al). Se puede formar una suspensión estable de citral hasta aproximadamente 2500 ppm. El citral se puede convertir en una solución hasta aproximadamente 500 ppm. Se puede preparar una suspensión estable de partículas huecas de glucano que incorporen citral de 25 ppt de citral.  
15
- El componente conservante de terpeno puede comprender un terpeno seleccionado del grupo no limitante que consiste en geraniol, timol, citral, carvona (por ejemplo, L-carvona), eugenol y b-ionona. El componente conservante de terpeno puede comprender adecuadamente timol.  
20 Otro terpeno particularmente apropiado es el citral, que ha demostrado una eficacia particular como conservante.
- Una combinación de geraniol, timol y eugenol ha demostrado una eficacia particular.  
25 Más preferiblemente, el componente conservante de terpeno comprende un terpeno seleccionado del grupo que comprende uno o más de geraniol, eugenol, carvona, citral y timol. De este modo, el componente conservante de terpeno puede comprender geraniol. El componente conservante de terpeno puede comprender eugenol. El componente conservante de terpeno puede comprender carvona. El componente conservante de terpeno puede comprender citral. El componente conservante de terpeno puede comprender timol.  
30 De acuerdo con lo anterior, una composición que comprende un componente conservante de terpeno que incluye cualquiera de las formulaciones anteriores es particularmente apropiada para su uso en la presente invención.  
35 En una realización, el componente de terpeno incluye uno o más terpenos que contienen oxígeno. Citral, por ejemplo citral 95, es un terpeno  $C_{10}H_{16}$  oxigenado,  $C_{10}H_{16}O$  CAS No. 5392-40-5 (3, 7-dimetil-2, 6-octadien-1-al). Se puede formar una suspensión estable de citral hasta aproximadamente 2500 ppm. El citral se puede convertir en una solución hasta aproximadamente 500 ppm. Se puede preparar una suspensión estable de partículas huecas de glucano que incorporen citral de 25 ppt de citral.  
40 Opcionalmente, la composición puede comprender otros agentes conservantes o agentes antimicóticos, además de los terpenos mencionados en este documento, por ejemplo, conservantes conocidos que incluyen metilo, etilo o n-propil-para-hidroxibenzoatos, ácido ascórbico, ácido sórbico y similares.  
45 Las micropartículas de la presente invención comprenden una variedad de tales partículas, que incluyen partículas de células de levadura, partículas de glucano y mezclas de las mismas.  
50 Las micropartículas pueden comprender microcápsulas y/o microesferas, que normalmente consisten en partículas sustancialmente esféricas, por ejemplo, de 2 mm o menos de diámetro, normalmente 500  $\mu m$  o menos de diámetro. Si las partículas tienen menos de 1  $\mu m$  de diámetro, a menudo se las denomina nanocápsulas o nanoesferas. Las microcápsulas y microesferas generalmente se pueden distinguir entre sí por si un agente activo se forma en un núcleo central rodeado por una estructura encapsulante de un material de matriz (microcápsulas) o si un agente activo está disperso por toda la partícula de material de matriz (microesferas). Se debe entender que está dentro del alcance de la presente invención incluir agentes activos que están encapsulados dentro de la estructura de un material de matriz y agentes activos que están dispersos por todo un material de matriz.  
55 Se puede encontrar una descripción de los métodos de fabricación y uso de microesferas y microcápsulas, por ejemplo, en la Solicitud de Patente Internacional No. WO 09/01336 1.  
60 La liberación del agente activo de una microcápsula o microesfera a menudo está regulada por la biodegradación del material de la matriz. Un tipo de microcápsula particularmente bien conocido son los liposomas, que se puede considerar que comprenden microcápsulas en las que el núcleo del agente activo está rodeado por una membrana lipídica. Los liposomas son vesículas lipídicas artificiales que constan de capas lipídicas, donde el agente activo se puede encapsular dentro de un compartimento acuoso del liposoma o asociarse con la superficie del liposoma mediante técnicas de acoplamiento superficial. Los liposomas se pueden preparar de manera fácil y económica a gran escala y en condiciones suaves.  
65

- Otras formas de micropartículas son partículas de la pared celular de levadura o partículas de glucano. Tales partículas están fácilmente disponibles, son biodegradables y sustancialmente esféricas. Las partículas de la pared celular de levadura y las partículas de glucano tienen generalmente un diámetro de aproximadamente 2-4 µm. La preparación de partículas de la pared celular de levadura extraídas se conoce en la técnica y se describe, por ejemplo, en la Solicitud de la Patente International No. WO 2007/063268.
- Las partículas de la pared celular de levadura o partículas de glucano se pueden denominar "partículas de glucano completas", a menudo denominadas WGP. Las partículas de la pared celular de levadura extraídas se pueden denominar partículas de beta-glucano.
- Tales partículas de la pared celular de levadura pueden estar en forma desarrollada, es decir, pueden haber sido recolectadas de su medio de cultivo e intactas, es decir, no lisadas, es decir, el microbio puede estar vivo.
- Las partículas de la pared celular de levadura extraídas pueden comprender partículas huecas de glucano o partículas huecas de pared celular. El término "partícula hueca de glucano" como se usa en este documento incluye cualquier partícula hueca que comprenda glucano como componente estructural. De este modo, en particular, el término incluye paredes de células de levadura huecas (en formas purificadas o crudas) o partículas huecas de glucano completas. El término "partícula de pared celular" se refiere a una partícula que comprende la pared de una célula (en forma purificada o cruda), en la que el glucano no es un componente estructural. Las partículas apropiadas incluyen las paredes celulares de células vegetales, de algas, fúngicas o bacterianas. Las partículas de la pared celular conservan generalmente la forma de la célula de la que se derivan y, de este modo, como una partícula hueca de glucano, proporcionan una cavidad central hueca apropiadas para encapsular el componente de terpeno. Las partículas huecas de glucano o partículas huecas de pared celular particularmente apropiadas son paredes celulares de hongos, preferiblemente paredes de células de levadura. Las paredes de las células de levadura son preparaciones de células de levadura que retienen la estructura tridimensional de la célula de levadura de la que se derivan. De este modo, tienen una estructura hueca que permite encapsular un componente de terpeno o un agente activo dentro de las paredes de las células de levadura. El término partículas huecas de glucano o partículas huecas de pared celular de levadura pretende significar micropartículas de glucano o partículas de células de levadura en las que los componentes intracelulares se han eliminado sustancialmente. Las paredes de levadura se pueden derivar de manera apropiada, *inter alia*, de células de levadura de Baker (disponibles de Sigma Chemical Corp., St. Louis, MO). Las partículas de la pared celular de levadura con propiedades deseables también se pueden obtener de Biorigin (Sao Paolo, Brasil) con el nombre comercial Nutricell MOS 55. Estas partículas son un extracto secado por pulverización de *S. cerevisiae*.
- Las partículas alternativas son las conocidas por los nombres comerciales SAF-Mannan (SAF Agri, Minneapolis, MN) y Nutrex (Sensient Technologies, Milwaukee, WI). Estas son partículas huecas de glucano que son la corriente de desecho insoluble del procedimiento de fabricación del extracto de levadura. Durante la producción de extractos de levadura, se eliminan los componentes solubles de las células de levadura parcialmente autolisadas y el residuo insoluble es un material apropiado para la carga de terpenos. Estas partículas huecas de glucano comprenden aproximadamente un 25-35 % p/p de beta 1,3-glucano. Un atributo clave de estos materiales es que pueden contener más del 10 % p/p de lípidos y son muy eficaces para absorber terpenos. Además, como producto de la corriente residual, son una fuente relativamente barata de partículas huecas de glucano.
- El uno o más terpenos se pueden absorber en una cantidad conservante o antimicótica y encapsular de forma estable dentro de micropartículas huecas, tales como partículas huecas de glucano o partículas huecas de la pared celular de levadura. Tales partículas son ventajosas porque, *inter alia*, la encapsulación de una cantidad conservante o antimicótica de terpenos en tales partículas se puede lograr mediante la incubación de las partículas con el terpeno.
- El término "partícula hueca de glucano", como se usa en este documento, incluye cualquier partícula hueca que comprenda glucano, por ejemplo, β-glucano, como componente estructural. De este modo, en particular, el término incluye paredes de células huecas de levadura (en formas purificadas o crudas) o partículas de glucano huecas completas. Las partículas de glucano son generalmente carcasas porosas, huecas, esféricas de 2-4 µm extraídas de una levadura, tales como la levadura de Baker, *Saccharomyces cerevisiae*. La superficie de las partículas de glucano está compuesta principalmente por 1,3-β-glucano y las partículas. La cavidad hueca de las partículas de glucano permite una absorción y encapsulación eficientes de las moléculas huésped como agentes activos. El término "partículas de la pared celular" se refiere a partículas que comprenden la pared de una célula (en forma purificada o cruda), en la que el glucano no es un componente estructural o no es el componente estructural principal.
- Las partículas de la pared celular de levadura pueden comprender, por ejemplo, paredes celulares de levadura de Baker que se derivan de células de levadura de Baker y están compuestas por los biopolímeros insolubles β-1, 3-glucano, β-1, 6-glucano, manano y quitina. Por lo general, son microesferas de 2-4 µm de diámetro con una pared de capa que tiene solo 0.2-0.3 µm de espesor rodeando una cavidad abierta. Este material tiene una considerable capacidad de retención de líquidos, absorbiendo por lo general de 5-25 veces su peso en líquido. La carcasa es lo suficientemente poroso como para que cargas útiles de hasta 150,000 Dalton de tamaño puedan pasar a través de la carcasa exterior y ser absorbidas por la cavidad hueca de la partícula esférica. Las paredes celulares de la

levadura de Baker tienen varias propiedades únicas, que incluyen estabilidad térmica (por ejemplo, a 121 °C), estabilidad al cizallamiento, estabilidad del pH (por ejemplo, pH 2-12) y, en concentraciones altas, no generan una viscosidad significativa. Además de sus propiedades físicas, esta composición contiene fibras dietéticas naturales y saludables que brindan beneficios para la salud cardiovascular e inmunoprotección.

- 5 Las paredes de células de levadura se preparan generalmente a partir de células de levadura mediante la extracción y purificación de la fracción de partículas insolubles de los componentes solubles de la célula de levadura. Las paredes de las células fúngicas se pueden producir a partir del subproducto insoluble de la fabricación del extracto de levadura. Adicionalmente, las células de levadura se pueden tratar con una solución acuosa de hidróxido, sin alterar las paredes de las células de levadura, que digiere la proteína y la porción intracelular de la célula, dejando el componente de la pared de la célula de levadura desprovisto de contaminación proteica significativa y teniendo sustancialmente la estructura de la pared de la célula inalterada de glucanos enlazados  $\beta(1-6)$  y  $\beta(1-3)$ . Una descripción más detallada de las partículas completas de glucano y el procedimiento de preparación de las mismas se describe en Jamas et al. en la Patente de los Estados Unidos No. 4,810,646 y en la Patente de los Estados Unidos No. 5,082,936 y la Patente de los Estados Unidos No. 4,992,540. La Patente de los Estados Unidos No. 6,242,594, cedida a Novogen Research Pty Ltd., describe un método de preparación de partículas de glucano de levadura mediante extracción con álcali, extracción con ácido y luego extracción con un disolvente orgánico y finalmente secado. El documento US 5,401,727, cedido a AS Biotech-Mackzymal, describe los métodos para obtener partículas de glucano de levadura y los métodos para usarlas para promover la resistencia en animales acuáticos y como adyuvante para vacunas. El documento US 5,607,677, cedido a Alpha-Beta Technology Inc., describe el uso de partículas de glucano huecas completas como paquete de administración y adyuvante para la administración de una variedad de agentes farmacéuticos. Las enseñanzas de las patentes mencionadas anteriormente se incorporan en este documento como referencia.
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65
- Otros tipos de células de levadura y hongos tienen paredes celulares que no contienen glucano. Las paredes celulares de tales levaduras y hongos se pueden aislar mediante técnicas similares a las mencionadas anteriormente para obtener partículas de la pared celular.
- Adicionalmente, las células de muchas plantas, algas, bacterias y otros microorganismos también comprenden una pared celular. La estructura y composición de la pared celular varía entre microorganismos, pero en general es una estructura robusta y relativamente inerte. Es posible obtener partículas de pared celular derivadas de dichas células mediante técnicas convencionales, tales como las mencionadas anteriormente en relación con la levadura. De este modo, el término "partículas de pared celular" incluirá partículas de la pared celular de levadura y partículas de pared celular derivadas de células vegetales, de algas, bacterias, etc., como se describió anteriormente en este documento.
- El término "partícula hueca de glucano", como se usa en este documento, incluye cualquier partícula hueca que comprenda glucano como componente estructural. De este modo, en particular, el término incluye paredes de células de levadura (en formas purificadas o crudas) o partículas de glucano huecas completas. El término "partícula de pared celular" se refiere a una partícula que comprende la pared de una célula (en forma purificada o cruda), en la que el glucano no es un componente estructural.
- Las partículas apropiadas incluyen las paredes celulares de células vegetales, de algas, fúngicas o bacterianas. Las partículas de la pared celular conservan generalmente la forma de la célula de la que se derivan y, de este modo, como una partícula hueca de glucano, proporcionan una cavidad central hueca apropiada para encapsular el componente de terpeno.
- Para este aspecto de la presente invención, es necesario que la partícula hueca de glucano o partícula de pared celular sea capaz de encapsular de forma estable el componente de terpeno. En general, esto significa que la partícula hueca de glucano o partícula de la pared celular debe poder mantener su estructura durante la incubación con el componente de terpeno (generalmente el componente de terpeno está en una concentración relativamente alta), y ese componente de terpeno debe poder migrar a la partícula. Las partículas huecas de glucano y las partículas de la pared celular se forman generalmente a partir de materiales relativamente inertes y son porosas, y de este modo se puede suponer que, en general, las partículas huecas de glucano y las partículas de la pared celular podrán encapsular un componente de terpeno.
- Las partículas de la pared celular conservan generalmente la forma de la célula de la que se derivan y, de este modo, como una partícula hueca de glucano, proporcionan una cavidad central hueca apropiada para encapsular el componente de terpeno. Las partículas de pared celular preferidas son partículas de la pared celular de levadura, por ejemplo, derivado de *Saccharomyces cerevisiae*.
- Para este aspecto de la presente invención, es necesario que la partícula hueca de glucano o partícula de pared celular sea capaz de encapsular de forma estable el componente de agente activo. En general, esto significa que la partícula hueca de glucano o partícula hueca de la pared celular debe poder mantener su estructura durante la incubación con el componente de agente activo (generalmente el componente de agente activo está en una concentración relativamente alta), y que el componente de agente activo debe poder migrar a la partícula

hueca. Las partículas huecas de glucano y las partículas huecas de la pared celular se forman generalmente a partir de materiales relativamente inertes y son porosas y, de este modo, se puede suponer que, en general, las partículas huecas de glucano y las partículas huecas de la pared celular podrán encapsular un componente de agente activo.

- 5 La presente invención proporciona especialmente una composición como se definió anteriormente en este documento en la que la micropartícula es una partícula de glucano o una partícula de pared celular como se describió anteriormente en este documento. Tales partículas de glucano o partículas de la pared celular pueden comprender partículas vivas o intactas. Sin embargo, en una realización especialmente preferida de la invención, las partículas comprenden partículas huecas de glucano o partículas huecas de la pared celular de levadura, es decir, partículas de glucano o partículas de células de levadura en las que los componentes intracelulares se han eliminado sustancialmente y en las que las partículas de glucano o partículas de células de levadura están muertas.

10 Por lo tanto, de acuerdo con este aspecto de la invención, se proporciona una composición que comprende una partícula hueca de glucano o un componente de partícula hueca de la pared celular de levadura que encapsula un agente activo; y que comprende una cantidad conservante de uno o más terpenos.

15 Las células de levadura comprenden generalmente una envoltura celular, que es una cápsula protectora, que consiste en tres constituyentes principales, la pared celular, la membrana plasmática y el espacio periplásmico. La envoltura celular tiene un papel importante en el control de las propiedades osmóticas y de permeabilidad de la 20 célula. En *S. cerevisiae*, la envoltura celular comprende aproximadamente el 15 % del volumen celular total. En la realización de la presente invención que proporciona una micropartícula hueca, tal como una partícula hueca de glucano o una partícula hueca de la pared celular de levadura, que comprende una cantidad conservante o antimicótica de uno o más terpenos, el componente de terpeno conservante se puede encapsular en la micropartícula hueca. Alternativamente, el componente de terpeno conservante se puede mantener en la envoltura 25 celular. El experto en la técnica entenderá que está dentro del alcance de la presente invención que una parte del componente de terpeno conservante se encapsule y parte se aloje en la pared celular como se describió anteriormente en este documento.

30 Las partículas huecas de glucano o partículas de pared celular particularmente apropiadas son paredes celulares de hongos, preferiblemente paredes de células de levadura. Las paredes de células de levadura son preparaciones de células de levadura que retienen la estructura tridimensional de la célula de levadura de la que se derivan. De este modo, tienen una estructura hueca que permite que el componente de agente activo se encapsule dentro de las paredes de las células de levadura. Las paredes de levadura se pueden derivar adecuadamente de células de levadura de Baker (disponibles de Sigma Chemical Corp., St. Louis, MO). Las partículas de la pared celular de levadura con propiedades deseables también se pueden obtener de Biorigin (Sao Paolo, Brasil) con el nombre 35 comercial Nutricell MOS 55. Estas partículas son un extracto secado por pulverización de *S. cerevisiae*.

40 Las partículas alternativas son las conocidas por los nombres comerciales SAF-Mannan (SAF Agri, Minneapolis, MN) y Nutrex (Sensient Technologies, Milwaukee, WI). Estas son partículas huecas de glucano que son la corriente de desecho insoluble del procedimiento de fabricación del extracto de levadura. Durante la producción de extractos de levadura, se eliminan los componentes solubles de las células de levadura parcialmente autolizadas y el residuo insoluble es un material apropiado para la carga de agente activo. La cantidad de beta 1,3-glucano en las partículas 45 huecas de glucano puede variar y puede ser desde aproximadamente 25 a aproximadamente 90 % p/p de beta 1,3-glucano. Las partículas huecas de glucano de SAF-mannano comprenden aproximadamente un 25-35 % p/p de beta 1,3-glucano. Un atributo clave de estos materiales es que contienen más de un 10 % p/p de lípidos y son muy eficaces para absorber agentes activos. Además, como producto de corriente residual, son una fuente relativamente barata de partículas huecas de glucano.

50 Las partículas huecas de glucano alternativas que tienen mayor pureza son las producidas por Nutricepts (Nutricepts Inc., Burnsville, MN) y ASA. Biotech. Estas partículas se han extraído con álcali, lo que elimina componentes intracelulares adicionales así como también elimina la capa de manoproteína externa de la pared celular produciendo una partícula de 50-65 % p/p de glucano.

55 Las partículas huecas de glucano de mayor pureza son las partículas WGP de Biopolymer Engineering. Estas partículas se extraen con ácido eliminando componentes de levadura adicionales dando un producto al 75-85 % p/p de glucano.

60 Las partículas huecas de glucano de muy alta pureza son Adjuvax® de Alpha-beta Technology, Inc. (Worcester, MA) y glucano microparticulado de Novogen (Stamford, CT). Estas partículas son extraídas con un disolvente orgánico que elimina los lípidos residuales y, por lo tanto, las partículas pueden comprender más del 90 % p/p de glucano.

65 En algunas realizaciones, se puede requerir una partícula de glucano hueca de alta pureza o una partícula hueca de la pared celular, por ejemplo, cuando se requiere un control estricto sobre posibles contaminantes. En estos casos, se preferirían las partículas de mayor pureza sobre otros productos menos puros. Para otras realizaciones, se preferirían las partículas menos puras por razones económicas; también se ha descubierto que esas partículas son más eficaces para absorber ciertos agentes activos.

- Preferiblemente, la partícula hueca de glucano o partícula de pared celular tiene un ligero contenido de lípidos, tal como 1 o 2 % p/p de lípidos. Un ligero contenido de lípidos puede aumentar la capacidad de la partícula para encapsular el componente de terpeno. El contenido de lípidos de la partícula hueca de glucano o partícula de pared celular es 5 % p/p o más, o 10 % p/p o más.
- De este modo, el contenido de lípidos de las micropartículas, por ejemplo, la partícula hueca de glucano o partícula hueca de la pared celular puede ser  $\geq 1$  % p/p, o  $\geq 2$  % p/p, o  $\geq 3$  % p/p, o  $\geq 4$  % p/p, o  $\geq 5$  % p/p, o  $\geq 6$  % p/p, o  $\geq 7$  % p/p, o  $\geq 8$  % p/p, o  $\geq 9$  % p/p, o  $\geq 10$  % p/p, o  $\geq 15$  % p/p, o  $\geq 20$  % p/p, o  $\geq 25$  %. De este modo, el contenido de lípidos puede ser desde aproximadamente 1 % a aproximadamente 25 % p/p, o desde aproximadamente 2 % a aproximadamente 20 % p/p, o desde aproximadamente 5 % a aproximadamente 15 % p/p, por ejemplo, aproximadamente 10 % p/p.
- Sólo a modo de ejemplo, los agentes activos para su uso en las microcápsulas de la presente invención incluyen, pero no se limitarán a, agentes biológicamente activos, tales como agentes farmacéuticamente activos y pesticidas. Los compuestos biológicamente activos también pueden incluir, por ejemplo, una sustancia nutritiva para las plantas o un regulador del crecimiento de las plantas. Alternativamente, el agente activo puede ser no activo biológicamente, tal como una sustancia nutritiva para plantas, un aromatizante de alimentos, una fragancia y similares.
- En lo sucesivo, la referencia al sistema de administración de micropartículas incluirá la micropartícula conservada, es decir, una micropartícula que incluye una cantidad conservante de un componente de terpeno.
- Los agentes farmacéuticamente activos se refieren a materiales de origen natural, sintéticos o semisintéticos (por ejemplo, compuestos, fermentados, extractos, estructuras celulares) capaces de provocar, directa o indirectamente, uno o más efectos físicos, químicos y/o biológicos, *in vitro* y/o *in vivo*. Tales agentes activos pueden ser capaces de prevenir, aliviar, tratar y/o curar condiciones anormales y/o patológicas de un cuerpo vivo, tal como destruyendo un organismo parásitario o limitando el efecto de una enfermedad o anormalidad alterando materialmente la fisiología del huésped o parásito. Tales agentes activos pueden ser capaces de mantener, aumentar, disminuir, limitar o destruir una función fisiológica del cuerpo. Los agentes activos pueden ser capaces de diagnosticar una condición o estado fisiológico mediante una prueba *in vitro* y/o *in vivo*. El agente activo puede ser capaz de controlar o proteger un medio ambiente o un cuerpo vivo atrayendo, inhabilitando, inhibiendo, matando, modificando, repeliendo y/o retardando un animal o microorganismo. Los agentes activos pueden ser capaces de tratar de otra manera (tal como desodorizar, proteger, adornar, arreglar) un cuerpo. Dependiendo del efecto y/o su aplicación, el agente activo puede denominarse además agente bioactivo, agente farmacéutico (tal como un agente profiláctico o agente terapéutico), agente de diagnóstico, suplemento nutricional y/o un agente cosmético e incluye, sin limitación, profármacos, moléculas de afinidad, moléculas orgánicas sintéticas, polímeros, moléculas con un peso molecular de 2 kD o menos (tal como 1.5 kD o menos, o 1 kD o menos), macromoléculas (tales como las que tienen un peso molecular de 2 kD o más, preferiblemente 5 kD o más), compuestos proteináceos, péptidos, vitaminas, esteroides, análogos de esteroides, lípidos, ácidos nucleicos, carbohidratos, precursores de los mismos y derivados de los mismos. Los agentes activos pueden ser iónicos, no iónicos, neutros, cargados positivamente, cargados negativamente o zwitteriónicos, y se pueden usar solos o en combinación de dos o más de los mismos. Los agentes activos pueden ser insolubles en agua o solubles en agua.
- El término "macromolécula" usado en este documento se refiere a un material capaz de proporcionar una estructura tridimensional (por ejemplo, terciaria y/o cuaternaria).
- En la presente invención se puede usar una amplia variedad de agentes farmacéuticamente activos. De este modo, el agente farmacéuticamente activo puede comprender uno o más de un polinucleótido, un péptido, una proteína, un pequeño agente activo orgánico, un pequeño agente activo inorgánico y mezclas de los mismos.
- Un agente activo polinucleotídico puede comprender uno o más de un oligonucleótido, una construcción antisentido, un ARNip, un ARN enzimático, una construcción de ADN recombinante, un vector de expresión y mezclas de los mismos. El sistema de administración de micropartículas de la presente invención puede ser útil para el suministro *in vivo* o *in vitro* de agentes activos, tales como aminoácidos, péptidos y proteínas. Los péptidos pueden ser moléculas de señalización tales como hormonas, neurotransmisores o neuromoduladores, y pueden ser los fragmentos activos de moléculas más grandes, tales como receptores, enzimas o proteínas de unión a ácidos nucleicos. Las proteínas pueden ser enzimas, proteínas estructurales, proteínas de señalización o proteínas de unión a ácidos nucleicos, tal como factores de transcripción.
- Cuando el agente farmacéuticamente activo comprende un pequeño agente activo orgánico, puede comprender un agente terapéutico o un agente de diagnóstico. En realizaciones particulares, un pequeño agente activo orgánico puede comprender un oligómero de unión a ADN específico de secuencia, un oligómero de poliamidas heterocíclicas, por ejemplo, los descritos en la Patente de los Estados Unidos No. 6,506,906.
- Otros agentes activos orgánicos pequeños pueden comprender los descritos en y por Dervan en "Molecular Recognition of DNA by Small Molecules, Bioorganic & Medicinal Chemistry (2001) 9: 2215-2235",

En determinadas realizaciones, el oligómero puede comprender subunidades monoméricas seleccionadas del grupo que consiste en N-metilimidazol carboxamida, N-metilpirrol carboxamida, beta-alanina y dimetilaminopropilamina.

- 5 En otra realización de la presente invención, el sistema de administración de micropartículas de la presente invención puede incluir un agente activo inorgánico, por ejemplo, agentes terapéuticos gastrointestinales tales como hidróxido de aluminio, carbonato de calcio, carbonato de magnesio, carbonato de sodio y similares.
- 10 En otra realización de la invención, puede incluirse más de un tipo de polinucleótido dentro del sistema de administración de micropartículas. Tales polinucleótidos proporcionan la capacidad de expresar múltiples productos génicos bajo control, en determinadas realizaciones, al menos un producto génico expresable es una proteína de membrana, tal como un receptor de membrana, lo más preferiblemente un receptor unido a membrana para una molécula de señalización. En algunas realizaciones, al menos un producto génico expresable es una proteína soluble, tal como una proteína secretada, por ejemplo, una proteína o péptido de señalización. En otras 15 realizaciones, la presente invención proporciona un método de administración de un fármaco a una célula de macrófago que incluye las etapas de proporcionar una pared celular de levadura hueca extraída sustancialmente esférica que comprende beta-glucano, definiendo la pared celular de levadura hueca un espacio interno; poner en contacto la pared celular de levadura hueca extraída con un agente farmacéuticamente activo en el que el agente farmacéuticamente activo está, al menos parcialmente, encerrado dentro del espacio interno para formar un sistema 20 de administración del fármaco en partículas; y poner en contacto una célula de macrófagos con el sistema de administración del fármaco en partículas. El método también puede incluir la etapa de internalización del sistema de administración del fármaco en micropartículas por parte del macrófago. En otra realización, el método también puede incluir la etapa de transportar el sistema de administración de fármacos por el macrófago. El macrófago 25 puede administrar el sistema de administración de fármaco de micropartículas a un sitio que atrae macrófagos, tal como un sitio de infección, reacción inflamatoria, hipoxia o hiperplasia. En determinadas realizaciones, el macrófago puede administrar el sistema de administración del fármaco de micropartículas a un tumor. En otra realización, el método puede incluir la etapa de liberar el fármaco o el agente farmacéuticamente activo del sistema de administración de fármacos en micropartículas, incluyendo opcionalmente además la etapa de liberar el fármaco o el agente farmacéuticamente activo en el espacio extracelular. En determinadas realizaciones, la etapa de liberar el 30 fármaco o el agente farmacéuticamente activo incluye las etapas de expresar una proteína recombinante y secretar la proteína en el espacio extracelular.

La presente invención también proporciona un método de inmunización de un individuo contra un patógeno. El método puede comprender la etapa de poner en contacto las células de dicho individuo con un sistema de administración de micropartículas que comprende una micropartícula, por ejemplo, una pared celular de levadura hueca extraída que comprende beta-glucano y una composición de ácido nucleico, administrando así a las células una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido que comprende al menos un epítopo idéntico o sustancialmente similar a un epítopo presentado en dicho patógeno como antígeno, y dicha secuencia de nucleótidos está unida operativamente a secuencias reguladoras, en el que la molécula de ácido nucleico es capaz de expresarse en las células del individuo. En otra realización, la presente invención proporciona un método de producción de inmunidad a un toxoide que comprende las etapas de proporcionar un sistema de administración de micropartículas que comprende una micropartícula, por ejemplo, una pared celular de levadura hueca extraída que comprende beta-glucano y un toxoide, que pone en contacto una célula fagocítica con el sistema de administración de micropartículas e induce la fagocitosis del sistema de administración de micropartículas. La célula fagocítica puede ser uno o más macrófagos, las células M de las placas de Peyer, monocitos, neutrófilos, células dendríticas, células de Langerhans, células de Kupffer, fagocitos alveolares, macrófagos peritoneales, macrófagos de la leche, microglia, eosinófilos, granulocitos, fagocitos mesangiales y células A sinoviales.

40 La presente invención proporciona un método de inmunización de un individuo contra una enfermedad hiperproliferativa o una enfermedad autoinmune. El método puede comprender la etapa de poner en contacto las células de dicho individuo con un sistema de administración de micropartículas que comprende una micropartícula, por ejemplo, una pared celular de levadura hueca extraída que comprende beta-glucano y una composición de ácido nucleico, administrando así a las células una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido que comprende al menos un epítopo idéntico o sustancialmente similar a un epítopo mostrado en una proteína asociada a enfermedad hiperproliferativa o una proteína asociada a enfermedad autoinmune, respectivamente, y está unida operativamente a secuencias reguladoras, en las que la molécula de ácido nucleico es capaz de expresarse en las células del individuo.

45 50 55 60 65 La presente invención también proporciona un método de tratamiento de un individuo que padece una enfermedad autoinmune que comprende la etapa de poner en contacto las células de dicho individuo con un sistema de administración de micropartículas que comprende una micropartícula, por ejemplo, una pared celular de levadura hueca extraída que comprende beta-glucano y una composición de ácido nucleico, administrando así a las células una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que restaura la actividad de un gen ausente, defectuoso o inhibido, o que codifica una proteína que produce un efecto terapéutico en el individuo y está unida operativamente a secuencias reguladoras; siendo capaz de expresarse la molécula de ácido nucleico en

dichas células. En una realización adicional, la presente invención proporciona un método de inmunización de un individuo contra una enfermedad hiperproliferativa que comprende la etapa de poner en contacto las células de dicho individuo con un sistema de administración de micropartículas que comprende una micropartícula, por ejemplo, una pared celular de levadura hueca extraída que comprende beta-glucano y un polinucleótido que comprende una secuencia de control unida operativamente a un marco de lectura abierto que codifica un péptido que comprende un epítopo idéntico o sustancialmente similar a un epítopo presentado en una proteína hiperproliferativa asociada a una enfermedad, en la que el péptido codificado es capaz de expresarse en las células del individuo.

5           10 En otra realización, la presente invención proporciona un método de tratamiento de un individuo que padece una enfermedad genética que comprende la etapa de poner en contacto las células de dicho individuo con un sistema de administración de micropartículas que comprende una micropartícula, por ejemplo, una pared celular de levadura hueca extraída que comprende beta-glucano, y un polinucleótido administrando así a las células un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que restaura la actividad de un gen ausente, defectuoso o inhibido. El polinucleótido puede comprender una secuencia reguladora unida operativamente a un marco de lectura abierto que codifica una proteína que produce un efecto terapéutico en el individuo, siendo la proteína capaz de expresarse en dichas células.

15           20 La presente invención también se refiere a métodos de tratamiento de un individuo que padece una enfermedad autoinmune que comprenden las etapas de poner en contacto las células de dicho individuo con un sistema de administración de micropartículas que comprende una micropartícula, por ejemplo, una pared celular de levadura hueca extraída que comprende beta-glucano y una composición de ácido nucleico, administrando así a las células una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que restaura la función de un gen ausente, defectuoso o inhibido, o que codifica una proteína que produce un efecto terapéutico en el individuo y está unida operativamente a secuencias reguladoras; siendo capaz de expresarse la molécula de ácido nucleico en dichas células.

25           30 De acuerdo con lo anterior, la presente invención también proporciona composiciones y métodos que inmunizan profiláctica y/o terapéuticamente a un individuo contra un patógeno o una célula anormal relacionada con la enfermedad. El material genético codifica un péptido o una proteína que comparte al menos un epítopo con una proteína inmunogénica que se encuentra en el patógeno o las células a las que se dirige. El material genético es expresado por las células del individuo y sirve como un objetivo inmunogénico contra el cual se desencadena una respuesta inmune. La respuesta inmune resultante tiene una base amplia: además de una respuesta inmune humoral, se desencadenan ambos brazos de la respuesta inmune celular. Los métodos de la presente invención son útiles para conferir inmunidad profiláctica y terapéutica. De este modo, un método de inmunización incluye tanto métodos de protección de un individuo de la exposición a patógenos, o aparición o proliferación de células específicas, así como métodos de tratamiento de un individuo que padece infección por patógenos, enfermedad hiperproliferativa o enfermedad autoinmune. De este modo, la presente invención es útil para provocar amplias respuestas inmunes contra una proteína diana, es decir, proteínas específicamente asociadas con patógenos o las propias células "anormales" del individuo. La presente invención también es útil para combatir enfermedades y trastornos hiperproliferativos tal como el cáncer, provocando una respuesta inmune contra una proteína diana que está específicamente asociada con las células hiperproliferativas. Tales cánceres incluyen, pero no se limitan a, se seleccionan de uno o más de cáncer primario, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer de pulmón de células no pequeñas, glioblastoma, linfoma, mesotelioma, cáncer de hígado, cáncer de vías biliares intrahepáticas, cáncer de esófago, cáncer de páncreas, cáncer de estómago, cáncer de laringe, cáncer de cerebro, cáncer de ovario, cáncer de testículo, cáncer de cuello uterino, cáncer oral, cáncer de faringe, cáncer de riñón, cáncer de tiroides, cáncer de útero, cáncer de vejiga urinaria, carcinoma hepatocelular, carcinoma de tiroides, osteosarcoma, cáncer de pulmón de célula pequeña, leucemia, mieloma, carcinoma gástrico y cánceres metastásicos.

40           45           50 La presente invención es además útil para combatir enfermedades y trastornos autoinmunes provocando una respuesta inmunitaria contra una proteína diana que está específicamente asociada con células implicadas en la enfermedad autoinmunitaria.

55           60           65 La presente invención también proporciona un kit farmacéutico que comprende un recipiente que comprende un agente farmacéuticamente activo seleccionado del grupo que consiste en una composición de ácido nucleico, composición de proteína, molécula orgánica pequeña y mezclas de las mismas, y un recipiente que comprende una micropartícula, por ejemplo, una partícula hueca de la pared celular de levadura. Opcionalmente, dicho kit puede incluir uno o más excipientes, portadores, conservantes y vehículos del tipo descrito en este documento con respecto a las composiciones farmacéuticas. El término kit farmacéutico también pretende incluir múltiples inoculantes usados en los métodos de la presente invención. Tales kits incluyen recipientes separados que comprenden diferentes inoculantes y unidades estructurales de transferencia. También se contempla que los kits farmacéuticos de acuerdo con este aspecto de la presente invención incluyan un conjunto de inoculantes usados en los métodos de tratamiento e inmunización y/o métodos terapéuticos, como se describe en este documento.

Las macromoléculas no limitantes usadas para formar las micropartículas incluyen, *inter alia*, polímeros, copolímeros, proteínas (por ejemplo, enzimas, proteínas recombinantes, albúminas tales como albúmina de suero humano, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales), péptidos, lípidos, carbohidratos (por ejemplo, monosacáridos, disacáridos, polisacáridos), ácidos nucleicos, vectores (por ejemplo, virus, partículas virales) y complejos y conjugados de los mismos (por ejemplo, asociaciones covalentes y/o no covalentes entre dos macromoléculas tales como complejos o conjugados carbohidrato-proteína, o entre un agente activo y una macromolécula tal como complejos o conjugados hapteno-proteína). Las macromoléculas pueden ser neutras, cargadas positivamente, cargadas negativamente o zwitteriónicas, y se pueden usar solas o en combinación de dos o más de las mismas.

Los "compuestos proteináceos" se refieren a compuestos naturales, sintéticos, semisintéticos o recombinantes o relacionados estructural y/o funcionalmente con proteínas, tales como los que contienen o consisten esencialmente en  $\alpha$ -aminoácidos asociados covalentemente a través de enlaces peptídicos. Los compuestos proteináceos no limitantes incluyen proteínas globulares (por ejemplo, albúminas, globulinas, histonas), proteínas fibrosas (por ejemplo, colágenos, elastinas, queratinas), proteínas compuestas (incluidas las que contienen uno o más componentes no peptídicos, por ejemplo, glicoproteínas, nucleoproteínas, mucoproteínas, lipoproteínas, metaloproteínas), proteínas terapéuticas, proteínas de fusión, receptores, antígenos (tales como antígenos sintéticos o recombinantes), proteínas de superficie viral, hormonas y análogos de hormonas, anticuerpos (tales como anticuerpos monoclonales o policlonales), enzimas, fragmentos Fab (fragmentos de unión al antígeno) péptidos cíclicos, péptidos lineales y similares. Las proteínas terapéuticas no limitantes incluyen proteínas morfogénicas óseas, proteínas de resistencia a fármacos, toxoides, eritropoyetinas, proteínas de la cascada de coagulación sanguínea (por ejemplo, Factor VII, factor VIII, factor IX), subtilisina, ovoalbúmina, alfa-1-antitripsina (AAT), DNasa, superóxido dismutasa (SOD), lisozima, ribonucleasa, hialuronidasa, collagenasa, hormona del crecimiento humano (hGH), eritropoyetina, insulina y factores de crecimiento similares a la insulina o sus análogos, interferones, glatiramer, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos, factor estimulante de colonias de granulocitos, desmopresina, agonistas de la hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH) (por ejemplo, leuprolida, goserelina, buserelina, gonadorelina, histrelina, nafarelina, deslorelin, fertirelina, triptorelina), antagonistas de LHER, vasopresina, ciclosporina, calcitonina, hormona paratiroidea, péptidos similares a la hormona paratiroidea, insulina, péptidos similares al glucógeno y análogos de los mismos.

Los compuestos proteináceos pueden ser neutros, cargados positivamente, cargados negativamente o zwitteriónicos, y se pueden usar solos o en combinación de dos o más de los mismos.

"Péptidos" se refiere a compuestos naturales, sintéticos o semisintéticos formados al menos en parte a partir de dos o más aminoácidos y/o iminoácidos iguales o diferentes. Los ejemplos no limitantes de péptidos incluyen oligopeptídos (tales como los que tienen menos de 50 unidades de monómero amino/iminoácido, incluidos dipéptidos y tripéptidos y similares), polipéptidos, compuestos proteináceos como se definen en este documento, así como precursores y derivados de los mismos (por ejemplo, glicosilado, hiperglicosilado, PEGilado, marcado con FIT C y sus sales). Los péptidos pueden ser neutros, cargados positivamente, cargados negativamente o zwitteriónicos, y se pueden usar individualmente o en combinación de dos o más de los mismos.

Los "lípidos" se refieren a compuestos naturales, sintéticos o semisintéticos que generalmente son anfifílicos. Los lípidos por lo general comprenden un componente hidrófilo y un componente hidrófobo. Los ejemplos no limitantes incluyen ácidos grasos, grasas neutras, fosfátidos, aceites, glicolípidos, surfactantes, alcoholes alifáticos, ceras, terpenos y esteroides. Los lípidos pueden ser iónicos, no iónicos, neutros, cargados positivamente, cargados negativamente o zwitteriónicos, y se pueden usar solos o en combinación de dos o más de los mismos.

Los "ácidos nucleicos" se refieren a compuestos naturales, sintéticos, semisintéticos o recombinantes formados al menos en parte a partir de dos o más de los nucleótidos iguales o diferentes, y pueden ser monocatenarios o bicatenarios. Los ejemplos no limitantes de ácidos nucleicos incluyen oligonucleótidos (tales como los que tienen 20 o menos pares de bases, por ejemplo, sentido, antisentido o sin sentido), aptámeros, polinucleótidos (por ejemplo, sentido, antisentido o sin sentido), ADN (por ejemplo, con sentido, antisentido o sin sentido), ARN (por ejemplo, de sentido, antisentido o sin sentido), ARNip, construcciones de ácidos nucleotídicos, segmentos monocatenarios o bicatenarios de los mismos, así como precursores y derivados de los mismos (por ejemplo, nucleósidos glicosilados, hiperglicosilados, PEGilados, etiquetados con FITC y sales de los mismos). Los ácidos nucleicos pueden ser neutros, cargados positivamente, cargados negativamente o zwitteriónicos, y se pueden usar solos o en combinación de dos o más de los mismos.

"Carbohidratos" se refiere a compuestos naturales, sintéticos o semisintéticos formados al menos en parte a partir de unidades de azúcar monoméricas. Los carbohidratos no limitantes incluyen polisacáridos, azúcares, almidones y celulosas, tal como carboximetilcelulosa, dextranos, hetaalmidones, ciclodextrinas, alginatos, quitosanos, condroitinas, heparinas, así como precursores y derivados de los mismos (por ejemplo, glicosilados, hiperglicosilados, PEGilados, etiquetados con FITC y sales de los mismos). Los carbohidratos pueden ser iónicos o no iónicos, pueden ser neutros, cargados positivamente, cargados negativamente o zwitteriónicos, y se pueden usar solos o en combinación de dos o más de los mismos.

Los pesticidas apropiados incluyen, por ejemplo, herbicidas, insecticidas y fungicidas. Como compuestos biológicamente activos, se pueden mencionar específicamente compuestos insecticidas, compuestos fungicidas, compuestos nematicidas, compuestos herbicidas, etc.

- 5 Cuando el agente activo es un insecticida, los agentes insecticidas apropiados incluyen, pero no se limitan a, piretroide, piretrina o una combinación de los mismos. Opcionalmente, el insecticida puede comprender al menos un piretroide tal como aletrina, d-aletrina, d-trans aletrina, alfoxilato, biorresmetrina, ciflutrina, beta-ciflutrina, cialotrina, lambda cialotrina, gamma cialotrina, bifentrina, cipermetrina, beta cipermetrina, zeta cipermetrina, cifenotrina, deltametrina, tetrametrina, esfenvalerato, fenflutrina, fenopropatrina, fenpiritrina, fenvalero, fluorocitrina, furametrina, fluvalinato, imiprotrina, permetrina, fenciclato, fenotrina, pralletrina, resmetrina, s-bioaletrina, tau-fluvalinato, teflutrina, tetraletrina, tralocitrina y tralometrina o una combinación de los mismos. Adicionalmente, se puede usar cualquier combinación de los pesticidas anteriores.
- 10 Cuando el agente activo es un fungicida, los agentes fungicidas apropiados incluyen, pero no se limitan a, sulfenamidas, tales como diclofluanida, tolifluanida, folpet y fluorofolpet; bencimidazoles, tales como carbendazim (MBC), benomil, fuberidazol y tiabendazol y sales de los mismos; tiocianatos, tales como tiocianatometiltiobenzotiazol (TCMTB) y bistiocianato de metileno (MBT); compuestos de amonio cuaternario, tales como cloruro de bencil dimetiltetradecilamonio, cloruro de bencildimetildodecyl-amonio y cloruro de dodecil-dimetilamonio; derivados de morfolina, tales como tridemorf, fenpropimorf y falimorf; fenoles, tales como o-fenilfenol, tribromofenol, tetraclorofenol, pentaclorofenol, 3-metil-4-clorofenol, diclorofeno y clorofito y sales de los mismos; azoles, tales como triadimenol, bitertanol, tebuconazol, propiconazol, azaconazol, hexaconazol, procloraz, ciproconazol; derivados de yodopropargilo, tales como yodopropargil-butilcarbamato (IPBC) y yodo-propargiloxietilfenilcarbamato; derivados de yodo, por ejemplo, diyodometyl-p-aryl-sulfonas, tales como diyodometyl-p-tolil-sulfona; derivados de bromo, tales como bromopol; isotiazolinas, tales como N-metilisotiazolin-3-ona, octilinona, bencisotiazolinona y ciclopenteno-isotiazolina; piridinas, tales como 1-hidroxi-2-piridintiona y tetracloro-4-metilsulfonilpiridina; nitrilos, tales como clorotalonil; benzotiazoles, tales como 2-mercaptopbenzotiazol; dicarboximidas, tales como iprodiona, vinclozolin, procimidorna y dazomet; y quinolinas, tales como 8-hidroxiquinolina.
- 15 Cuando el agente activo es un herbicida, tales compuestos herbicidas son apropiados para controlar el crecimiento de plantas no deseadas, tales como matorrales y arbustos. Los agentes herbicidas apropiados incluyen, pero no se limitan a, 2,4-D, aminopiralida, atrazina, clopiralida, dicamba, glufosinato de amonio, fluroxipir, glifosato, imazapir, imazapic, imazamox, linuron, metolaclor, paraquat, pendimetalina, picloram, clorato de sodio y triclopir.
- 20 Cuando el agente activo es un herbicida, tales compuestos herbicidas son apropiados para controlar el crecimiento de plantas no deseadas, tales como matorrales y arbustos. Los agentes herbicidas apropiados incluyen, pero no se limitan a, 2,4-D, aminopiralida, atrazina, clopiralida, dicamba, glufosinato de amonio, fluroxipir, glifosato, imazapir, imazamox, linuron, metolaclor, paraquat, pendimetalina, picloram, clorato de sodio y triclopir.
- 25 Cuando el agente activo es un herbicida, tales compuestos herbicidas son apropiados para controlar el crecimiento de plantas no deseadas, tales como matorrales y arbustos. Los agentes herbicidas apropiados incluyen, pero no se limitan a, 2,4-D, aminopiralida, atrazina, clopiralida, dicamba, glufosinato de amonio, fluroxipir, glifosato, imazapir, imazamox, linuron, metolaclor, paraquat, pendimetalina, picloram, clorato de sodio y triclopir.
- 30 Cuando el agente activo es un herbicida, tales compuestos herbicidas son apropiados para controlar el crecimiento de plantas no deseadas, tales como matorrales y arbustos. Los agentes herbicidas apropiados incluyen, pero no se limitan a, 2,4-D, aminopiralida, atrazina, clopiralida, dicamba, glufosinato de amonio, fluroxipir, glifosato, imazapir, imazamox, linuron, metolaclor, paraquat, pendimetalina, picloram, clorato de sodio y triclopir.
- 35 Los siguientes compuestos se pueden mencionar como ejemplos de sustancias nutritivas para plantas, que pueden estar presentes en las preparaciones de cápsulas según la invención: compuestos metálicos solubles en agua que tienen una estructura basada en clorofila, tales como clorofilina sódica y clorofilina de cobre sódica; compuestos solubles en agua que proporcionan un elemento seleccionado del grupo que consiste en hierro, zinc y magnesio, incluyendo, como compuestos de hierro solubles en agua, cloruro ferroso, nitrato ferroso, sulfato ferroso, sulfato ferroso amónico, acetato férrico, cloruro férrico, nitrato férrico, sulfato férrico, citrato férrico, citrato de amonio y hierro, glicerofosfato de hierro, tartrato férrico, lactato férrico, glicolato férrico, etc.; compuestos de magnesio solubles en agua y compuestos de zinc solubles en agua que corresponden a estos compuestos de hierro solubles en agua; y sales dobles férrica-zinc, sales dobles férrica-manganoso o sales dobles de zinc-manganoso, etc. de citrato y sulfato.
- 40 Los siguientes compuestos se pueden mencionar como ejemplos de sustancias nutritivas para plantas, que pueden estar presentes en las preparaciones de cápsulas según la invención: compuestos metálicos solubles en agua que tienen una estructura basada en clorofila, tales como clorofilina sódica y clorofilina de cobre sódica; compuestos solubles en agua que proporcionan un elemento seleccionado del grupo que consiste en hierro, zinc y magnesio, incluyendo, como compuestos de hierro solubles en agua, cloruro ferroso, nitrato ferroso, sulfato ferroso, sulfato ferroso amónico, acetato férrico, cloruro férrico, nitrato férrico, sulfato férrico, citrato férrico, citrato de amonio y hierro, glicerofosfato de hierro, tartrato férrico, lactato férrico, glicolato férrico, etc.; compuestos de magnesio solubles en agua y compuestos de zinc solubles en agua que corresponden a estos compuestos de hierro solubles en agua; y sales dobles férrica-zinc, sales dobles férrica-manganoso o sales dobles de zinc-manganoso, etc. de citrato y sulfato.
- 45 Las preparaciones de micropartículas según la invención pueden contener un compuesto biológicamente activo o combinaciones de dos o más de tales compuestos.
- 50 Las preparaciones de micropartículas según la invención pueden contener los compuestos biológicamente activos como tales o en mezcla con uno o más auxiliares farmacéutica o agrícolamente aceptables, tales como vehículos, extensores, estabilizantes, agentes surfactantes y colorantes.
- 55 En un aspecto particular de la presente invención, se proporciona un sistema de administración de micropartículas que comprende una micropartícula, un agente activo encapsulado y una cantidad conservante de un componente de terpeno. Según este aspecto de la invención, la micropartícula puede comprender partículas de células de levadura o partículas de glucano, preferiblemente partículas huecas de células de levadura o partículas huecas de glucano.
- 60 En otro aspecto de la invención, cuando se requiere un sistema disolvente, el sistema disolvente puede comprender agua.
- 65 El sistema de administración de micropartículas de este aspecto de la presente invención puede ser útil, *inter alia*, para la administración tanto *in vivo* como *in vitro* de agentes activos. Por lo tanto, las composiciones y/o el sistema de administración de micropartículas de la invención pueden ser útiles en los campos de la medicina humana y/o veterinaria y/o del bienestar agrícola, incluyendo, sin limitación, el tratamiento de mamíferos, por ejemplo, incluidas las especies humana, bovina, ovina, porcina, equina, canina y felina; aves, peces, artrópodos y/o plantas.

En determinadas realizaciones, las paredes de células de levadura extraídas comprenden menos del 90 por ciento en peso de beta-glucano. En determinadas realizaciones, las paredes celulares de levadura extraídas comprenden más del 50 por ciento en peso de quitina. En otra realización, las paredes celulares de levadura extraídas comprenden además más del 30 por ciento en peso de manano. En otras determinadas realizaciones, la pared celular de levadura extraída incluye más del 1 por ciento en peso de proteína. Para evitar dudas, las paredes de células de levadura extraídas se considerarán células de levadura a las que se les han eliminado sus componentes intracelulares, es decir, células de levadura huecas.

Las composiciones de micropartículas según la presente invención pueden contener uno o más agentes biológicamente activos o combinaciones de dos o más de tales agentes.

Las composiciones de micropartículas según la invención pueden contener los compuestos biológicamente activos como tales o mezclados con uno o más auxiliares farmacéutica o agrícolamente aceptables, tales como portadores, extensores, estabilizantes, agentes surfactantes y colorantes.

La cantidad de agente activo en la composición puede variar, dependiendo de, *inter alia*, la naturaleza del agente activo, el uso previsto de la composición, etc.

De este modo, la composición de la presente invención puede comprender desde aproximadamente 1 ppm a aproximadamente 25 ppt (25,000 ppm) del componente de agente activo, en base a la composición total, preferiblemente desde aproximadamente 10 a aproximadamente 5,000 ppm del componente de agente activo, desde aproximadamente 10 a aproximadamente 5,000 ppm, desde aproximadamente 100 a aproximadamente 4,000 ppm, desde aproximadamente 200 a aproximadamente 3,000 ppm, desde aproximadamente 300 a aproximadamente 2,000 ppm, desde aproximadamente 400 a aproximadamente 1,500 ppm, desde aproximadamente 500 a aproximadamente 1,000 ppm. Por ejemplo, 250, 500, 1000, 2000 ppm del mismo. Alternativamente, la cantidad del componente de agente activo en la composición de la presente invención puede comprender desde aproximadamente 0.1 % p/p a aproximadamente 90 % p/p de la composición, en base a la composición total. Por lo tanto, la cantidad del agente activo en la composición puede ser desde aproximadamente 1 % p/p a aproximadamente 90 % p/p, desde aproximadamente 2 % p/p a aproximadamente 90 % p/p, desde aproximadamente 3 % p/p a aproximadamente 90 % p/p, desde aproximadamente 4 % p/p a aproximadamente 90 % p/p, desde aproximadamente 5 % p/p a aproximadamente 90 % p/p, desde aproximadamente 6 % p/p a aproximadamente 90 % p/p, desde aproximadamente 7 % p/p a aproximadamente 90 % p/p, desde aproximadamente 8 % p/p a aproximadamente 90 % p/p, desde aproximadamente 9 % p/p a aproximadamente 90 % p/p, desde aproximadamente 10 % p/p a aproximadamente 90 % p/p, desde aproximadamente 15 % p/p a aproximadamente 90 % p/p, desde aproximadamente 20 % p/p a aproximadamente 90 % p/p, desde aproximadamente 25 % p/p a aproximadamente 90 % p/p, desde aproximadamente 30 % p/p a aproximadamente 90 % p/p, desde aproximadamente 35 % p/p a aproximadamente 90 % p/p, desde aproximadamente 40 % p/p a aproximadamente 90 % p/p, desde aproximadamente 45 % p/p a aproximadamente 90 % p/p, desde aproximadamente 50 % p/p a aproximadamente 90 % p/p, desde aproximadamente 60 % p/p a aproximadamente 90 % p/p, desde aproximadamente 70 % p/p a aproximadamente 90 % p/p, desde aproximadamente 80 % p/p a aproximadamente 90 % p/p, de la composición.

Opcionalmente, el componente de terpeno y/o el componente de agente biológicamente activo de la composición de la presente invención se pueden asociar con un surfactante. El surfactante puede ser no iónico, catiónico o aniónico.

Los ejemplos de surfactantes apropiados incluyen lauril sulfato de sodio, polisorbato 20, polisorbato 40, polisorbato 60, éster de poliglicerilo, monooleato de poliglicerilo, monocaprilato de decaglicerilo, dicaprilato de propilenglicol, monoestearato de triglicerol, polioxietilenosorbitán, monooleato, Tween®, Span® 20, Span® 40, Span® 60, Span® 80, Brig 30 o mezclas de los mismos. El surfactante actúa para mantener el componente de terpeno y/o el componente biológicamente activo en una emulsión y también ayuda a la encapsulación del componente de terpeno en la micropartícula, por ejemplo, partícula hueca de glucano o partícula hueca de la pared celular.

El componente de agente activo encapsulado de la composición de la invención, es decir, el componente de micropartícula/agente biológicamente activo de la composición, puede comprender del 1 al 99 % p/p del agente activo y del 1 al 99 % p/p de micropartículas, por ejemplo, partículas huecas de glucano o partículas huecas de la pared celular. Más específicamente, la composición puede comprender aproximadamente 10 % p/p de micropartículas y aproximadamente 90 % p/p de agente activo, aproximadamente 15 % p/p de micropartículas y aproximadamente 85 % p/p de agente activo, aproximadamente 20 % p/p de micropartículas y aproximadamente 80 % p/p de agente activo, aproximadamente 25 % p/p de micropartículas y aproximadamente 75 % p/p de agente activo, aproximadamente 30 % p/p de micropartículas y aproximadamente 70 % p/p de agente activo, aproximadamente 35 % p/p de micropartículas y aproximadamente 65 % p/p de agente activo, aproximadamente 40 % p/p de micropartículas y aproximadamente 60 % p/p de agente activo, aproximadamente 45 % p/p de micropartículas y aproximadamente 55 % p/p de agente activo, por ejemplo, aproximadamente 50 % p/p de micropartículas y aproximadamente 50 % p/p de agente activo. La composición puede comprender opcionalmente desde aproximadamente 0.1 a aproximadamente 10 % p/p de surfactante.

5 De forma apropiada, una composición de la presente invención comprende desde aproximadamente 500 a aproximadamente 10,000 ppm de micropartículas, por ejemplo, partículas huecas de glucano o partículas huecas de pared celular, donde las partículas contienen una cantidad conservante de uno o más terpenos como se describió anteriormente en este documento. Preferiblemente, la composición comprende desde aproximadamente 1,000 a aproximadamente 2,000 ppm de micropartículas, por ejemplo, partículas huecas de glucano o partículas huecas de pared celular, donde las partículas contienen una cantidad de conservante de uno o más terpenos y desde aproximadamente 0.1 % p/p a aproximadamente 90 % p/p de un componente de agente activo.

10 Concentraciones de partículas huecas de glucano o partículas huecas de la pared celular en la composición de la invención, para la encapsulación de un agente activo, de aproximadamente 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 125, 130, 140, 150, 160, 175, 190, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 575, 600, 625, 650, 675, 700, 725, 750, 775, 800, 825, 850, 875, 900, 925, 950, 975, 1000, 1100, 1250, 1375, 1425, 1500, 1600, 1750, o 2000 ppm se pueden usar como concentraciones eficaces en las composiciones y métodos de la presente invención. Se pueden preparar concentraciones incluso mayores (hasta 25 ppt, es decir, partes por mil) y pueden ser útiles en la presente invención.

15 Opcionalmente, la composición puede comprender otros compuestos activos además de los específicamente mencionados en este documento, por ejemplo, otros agentes antimicrobianos, enzimas y similares.

20 Las composiciones de la invención también pueden comprender un componente antioxidante para reducir la oxidación de la microcápsula y/o los agentes activos. Un ejemplo de dicho antioxidante podría ser el aceite de romero, la vitamina C o la vitamina E.

25 Las composiciones de la presente invención pueden estar en forma de polvo seco. Las composiciones se pueden proporcionar en combinación con un portador o excipiente agrícola, alimenticio o farmacéuticamente aceptable en forma líquida, sólida o similar a un gel.

30 Para composiciones sólidas, los portadores apropiados incluyen grados farmacéuticos o agrícolas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, celulosa, glucosa, sacarosa, carbonato de magnesio y similares. De forma apropiada, la composición se puede formular en forma de comprimidos o pellas.

35 Una pella, comprimido u otra forma sólida de la composición puede contener preferiblemente también un agente de dispersión que promueve la dispersión de la composición cuando se coloca en un líquido, por ejemplo, agua. Los agentes de dispersión apropiados incluyen goma de xantano, maltodextrina, alginatos o similares.

40 Las composiciones líquidas se pueden preparar, por ejemplo, dispersando la composición en agua, solución salina, dextrosa acuosa, glicerol, etanol o similares, para formar una solución o suspensión. Si se desea, estas composiciones pueden contener cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes reguladores del pH (por ejemplo, acetato de sodio, monolaurato de sorbitán, acetato de trietanolamina de sodio u oleato de trietanolamina). Los métodos de preparación de tales composiciones líquidas son conocidos, o resultarán evidentes, para los expertos en esta técnica. Se podría preparar una composición líquida dispersando la composición en un alimento o bebida líquida. Adicionalmente, se podría usar un excipiente líquido apropiado farmacéuticamente aceptable o agrícolamente aceptable.

45 Se pueden usar portadores, bases acuosas, en polvo o aceitosas, espesantes y similares convencionalmente conocidos, según sea necesario o deseable.

50 La presente invención proporciona además un método de administración de un agente activo a un receptor, que comprende las etapas de:

- (i) proporcionar un componente de micropartículas que incluye una cantidad conservante de uno o más terpenos;
- (ii) poner en contacto la micropartícula con el agente activo en el que el agente activo se encapsula, al menos parcialmente, dentro de la micropartícula;
- (iii) poner en contacto al receptor con el componente de micropartículas que encapsula el agente activo.

60 El receptor puede comprender una o más células o mamíferos, por ejemplo, incluidas las especies humana, bovina, ovina, porcina, equina, canina y felina; aves, peces, artrópodos y/o plantas.

65 La invención proporciona además un método de tratamiento de un cuerpo con un agente activo que comprende la etapa de poner en contacto las células del individuo con una composición que comprende un componente de micropartículas, que incluye una cantidad conservante de uno o más terpenos, y un agente activo, administrándose así a las células en una cantidad eficaz del agente activo.

En el método de tratamiento de este aspecto de la invención, donde el agente activo es un agente farmacéuticamente activo, el cuerpo puede comprender un mamífero, por ejemplo, especies bovina, ovina, porcina, equina, canina y felina. El mamífero puede comprender especialmente un ser humano.

5 Cuando el agente activo es un agente farmacéuticamente activo, la invención puede proporcionar además un método de tratamiento de un paciente que padece un trastorno, comprendiendo dicho método administrar una cantidad eficaz de un agente activo en forma de una composición que comprende un agente activo encapsulado en un componente de micropartículas; comprendiendo dicho componente de micropartículas una cantidad conservante de uno o más terpenos.

10 15 Cuando el agente activo es un pesticida, por ejemplo, un insecticida, la invención puede proporcionar además un método para matar una plaga, por ejemplo, un artrópodo, comprendiendo dicho método administrar una cantidad eficaz de un agente activo en forma de una composición que comprende un agente activo encapsulado en un componente de micropartículas; comprendiendo dicho componente de micropartículas una cantidad conservante de uno o más terpenos.

20 25 El método según este aspecto de la invención puede comprender administrar el pesticida a un cuerpo, planta, etc. Donde el agente activo es un pesticida, por ejemplo, un insecticida, la invención puede proporcionar además un método para matar una plaga, por ejemplo, un artrópodo, comprendiendo dicho método administrar una cantidad eficaz de un agente activo en forma de una composición que comprende un agente activo encapsulado en un componente de micropartículas; comprendiendo dicho componente de micropartículas una cantidad conservante de uno o más terpenos.

30 35 El experto en la técnica entenderá que este método de la invención puede comprender aplicar la composición de la invención directamente a un cuerpo como se describió anteriormente en este documento, o a una planta o una plaga.

El término pesticida puede incluir fungicida, insecticida, acaricida, bactericida, herbicida, raticida, etc.

40 45 Según este aspecto de la invención, el término "artrópodos" incluye insectos y arácnidos, tales como, pero sin limitarse a, garrapatas, ácaros, pulgas, mosquitos, mosquitos, etc.

La cantidad de composición administrada dependerá, por supuesto, de la forma de administración, del objetivo, etc. Las composiciones apropiadas son las definidas con más detalle anteriormente.

50 55 La cantidad de agente activo administrada en el método anterior debería ser claramente suficiente para lograr el resultado deseado, es decir, ser fatal para la plaga, por ejemplo, artrópodos, tales como insectos o arácnidos, hongos, bacterias, etc., pero no debe estar a un nivel que induzca efectos tóxicos graves en mamíferos, especialmente seres humanos.

60 Los agentes activos se pueden absorber y encapsular de manera estable dentro de las micropartículas, por ejemplo, las partículas huecas de glucano o partículas huecas de la pared celular, puede reducir la velocidad de liberación y/o degradación del agente activo, aumentando así la duración de acción del agente activo.

65 70 Los agentes activos se pueden absorber y encapsular de manera estable dentro de las micropartículas, por ejemplo, las partículas huecas de glucano o partículas huecas de la pared celular. La encapsulación de agentes activos en tales partículas se puede lograr mediante la incubación de las partículas con el agente activo.

Las composiciones según la presente invención pueden proporcionar, sin limitación, las siguientes ventajas:

- maximizar la encapsulación del agente activo;
- minimizar el agente activo no encapsulado;
- controlar la estabilidad del agente activo;
- controlar la cinética de liberación del agente activo;
- creación de una forma sólida de un agente activo líquido para aumentar la masa y uniformidad;
- simplificar la manipulación y aplicación del agente activo;
- enmascarar el olor y el sabor del agente activo; e
- inhibir el deterioro o la descomposición de la composición debido al crecimiento de mohos, levaduras y/u hongos indeseables.

75 80 El componente de agente activo de la presente invención puede comprender un único agente activo o una mezcla de agentes activos.

85 90 Las micropartículas, agentes activos, componentes conservantes de terpenos, surfactantes y otros componentes de las composiciones de la invención se pueden adquirir o sintetizar fácilmente usando técnicas generalmente conocidas por los químicos de síntesis.

Es muy preferido que los terpenos usados en la presente invención, por razones de seguridad y regulatorias, sean al menos terpenos de calidad alimentaria (como lo define la United States FDA o un organismo regulador nacional equivalente fuera de los Estados Unidos).

- 5 La composición de la presente invención puede estar en forma de polvo seco. La composición se puede proporcionar en combinación con un portador o excipiente aceptable en forma líquida, sólida o similar a un gel.

Para composiciones sólidas, los portadores apropiados incluyen, pero no se limitan a, manitol, lactosa, almidón, esteárate de magnesio, sacarina sódica, talco, celulosa, glucosa, sacarosa, carbonato de magnesio y similares.

- 10 La composición también puede contener un agente de dispersión que promueve la dispersión de la composición cuando se coloca en un líquido, por ejemplo, agua. Los agentes de dispersión apropiados incluyen goma de xantano, maltodextrina, alginatos o similares.

- 15 Las composiciones líquidas se pueden preparar, por ejemplo, dispersando la composición en agua, solución salina, dextrosa acuosa, glicerol, etanol o similares, para formar una solución o suspensión. Si se desea, estas composiciones pueden contener cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes reguladores del pH (por ejemplo, acetato de sodio, monolaurato de sorbitán, acetato de trietanolamina de sodio u oleato de trietanolamina). Los métodos de preparación de dichas composiciones líquidas son conocidos, o resultarán evidentes, para los expertos en esta técnica. Se podría preparar una composición líquida dispersando la composición en un excipiente farmacéuticamente aceptable o agrícolamente aceptable.

- 20 La composición de la invención puede contener aglutinantes y lubricantes. Los polvos o gránulos finos pueden contener agentes diluyentes, dispersantes y/o con actividad de superficie y se pueden presentar en agua o en jarabe.

25 La composición puede estar convenientemente en estado seco. Las soluciones o suspensiones no acuosas de la composición también son apropiadas y pueden contener agentes de suspensión. Cuando sea deseable o necesario, se pueden incluir agentes conservantes, de suspensión, espesantes o emulsionantes.

- 30 La composición también puede contener soluciones reguladoras, diluyentes y otros aditivos apropiados.

- 35 Los ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales (tal como aceite de oliva) y ésteres orgánicos inyectables (tal como oleato de etilo). Los portadores acuosos incluyen agua, soluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, incluidos medios salinos y regulados. Otros vehículos incluyen solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, lactato de Ringer o aceites fijos.

40 También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y similares.

45 La presente invención también proporciona un método de elaboración de un sistema de administración de micropartículas como se describió anteriormente en este documento, comprendiendo dicho método las etapas de:

proporcionar una micropartícula, tal como una pared celular de levadura extraída que comprende beta-glucano, definiendo la pared celular de levadura un espacio interno;

- 50 poner en contacto la micropartícula con una cantidad conservante de un componente de terpeno en el que el componente de terpeno se asocia con la micropartícula; y

poner en contacto la micropartícula con un agente activo en el que el agente activo se asocia con la micropartícula.

- 55 El experto en la técnica entenderá que en el método de este aspecto de la invención el componente conservante de terpeno se puede asociar con la micropartícula antes o después de la asociación del agente activo con la micropartícula. Alternativamente, el método puede comprender asociar el agente activo y el componente de terpeno con la micropartícula simultáneamente.

- 60 La presente invención proporciona además un método de preparación de una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente farmacéuticamente activo encapsulado y una cantidad conservante de uno o más terpenos, comprendiendo dicho método mezclar un componente de microcápsula con un agente activo, y una cantidad conservante de un componente de terpeno.

- 65 La presente invención también proporciona un método de preparación de una composición de pesticida que comprende una cantidad plaguicidamente eficaz de un agente activo de forma pesticida encapsulado y una cantidad

conservante de uno o más terpenos que comprende mezclar un componente de microcápsula con un agente activo y una cantidad conservante de un componente de terpeno.

Más específicamente, el método de este aspecto de la invención comprende preparar una composición que comprende un agente activo y una cantidad conservante de un componente de terpeno en la que al menos el agente activo está en forma encapsulada que comprende preparar una micropartícula, por ejemplo, una partícula hueca de glucano o partícula hueca de la pared celular, que encapsula un agente activo, comprendiendo dicho método las etapas de;

- 10 a) proporcionar un componente de terpeno;
- b) proporcionar una micropartícula, por ejemplo, una partícula hueca de glucano o partícula de pared celular;
- c) incubar el componente de terpeno con la micropartícula en condiciones apropiadas, por ejemplo, para encapsulación de terpenos;
- d) opcionalmente recuperar el componente de micropartículas/terpeno;
- e) proporcionar un componente de agente activo;
- f) incubar el agente activo con la micropartícula en condiciones apropiadas, por ejemplo, para la encapsulación del agente activo; y
- g) recuperar el componente micropartícula/terpeno.

El experto en la técnica entenderá que el agente activo se puede encapsular simultáneamente con el componente de terpeno. Alternativamente, el agente activo se puede encapsular antes de tratarlo con el componente de terpeno. En la realización preferida, la microcápsula se trata con una cantidad conservante de un componente de terpeno antes de que la microcápsula se trate con el agente activo.

Opcionalmente, el método anterior puede comprender además la etapa de secar las partículas que encapsulan el componente de agente activo. El secado se puede lograr de varias formas y se puede mencionar la liofilización, el secado en lecho fluidizado, el secado en tambor o el secado por pulverización, todos los cuales son procedimientos bien conocidos.

En la etapa a) del método anterior, el componente de terpeno se proporciona adecuadamente como una suspensión en un disolvente acuoso y, opcionalmente, en presencia de un surfactante. De forma apropiada, el disolvente es agua. Un surfactante apropiado es Tween-80 (monooleato de polioxietilensorbitano) y, preferiblemente, el surfactante está presente en una concentración de aproximadamente 0.1 a 10 % en volumen de la mezcla de reacción total, más preferiblemente aproximadamente 1 %. Alternativamente, el componente de terpeno se puede proporcionar como una verdadera solución en un disolvente, por ejemplo, agua. Se puede obtener una verdadera solución de terpeno en agua mezclando el terpeno en agua a alto cizallamiento hasta que se obtenga una verdadera solución.

La Publicación No. WO 03/020024 proporciona más detalles sobre la formación de verdaderas soluciones de terpenos en agua.

En la etapa b) del método anterior, la micropartícula, por ejemplo, la partícula hueca de glucano o partícula de pared celular, se proporciona adecuadamente como una suspensión en agua u otro líquido apropiado.

De forma apropiada, la suspensión comprende aproximadamente de 1 a 1000 mg de partículas por ml, preferiblemente de 200 a 400 mg/ml. Alternativamente, las partículas se pueden proporcionar como un polvo seco y agregar a la suspensión de terpeno-surfactante.

Alternativamente, las partículas se proporcionan en suficiente líquido para hidratar mínimamente las partículas, pero no en un exceso significativo. El término "volumen hidrodinámico" (HV) se usa para describir el volumen de líquido requerido para hidratar mínimamente las partículas. De este modo, de forma apropiada, las partículas se proporcionan con un volumen que varía entre el HV y un volumen de 1.5 veces el HV (1.5HV). Esto hace que la etapa de secado posterior sea más eficaz. Además, cuando se usa un volumen bajo de líquido (es decir, alrededor de HV a 1.5HV), también es posible extruir el producto terminado en forma de pellas o fideos, lo cual es conveniente para el secado en lecho fluidizado. Se ha descubierto que el componente de terpeno se puede encapsular mediante la partícula hueca de glucano o partícula de la pared celular a temperatura ambiente. Sin embargo, la velocidad de encapsulación aumenta a 37 °C, pero la temperatura debe mantenerse por debajo del punto de ebullición o la temperatura de desnaturalización de cualquier componente de la composición. Las condiciones apropiadas para la etapa c) del método anterior son, por lo tanto, la presión atmosférica a una temperatura de 20 a 37 °C. La

optimización de las condiciones para una reacción de encapsulación particular será una cuestión de experimentación rutinaria.

5 Opcionalmente, el método anterior puede comprender además la etapa de secar las partículas que encapsulan el componente de terpeno. El secado se puede lograr de varias formas y se puede mencionar la liofilización, el secado en lecho fluidizado, el secado en tambor o el secado por pulverización, todos los cuales son procedimientos bien conocidos.

10 El componente de agente activo generalmente se puede tratar de manera similar al componente de terpeno.

15 Aunque es un aspecto de la presente invención proporcionar una composición que comprende un componente de micropartículas; un agente activo encapsulado; y una cantidad conservante de uno o más terpenos, se entenderá que las micropartículas provistas de una cantidad conservante de uno o más terpenos, es decir, antes de proporcionar un agente activo, son nuevas *per se*. Por lo tanto, según un aspecto adicional de la invención, se proporciona una composición que comprende una micropartícula y una cantidad conservante de uno o más terpenos. Dicha composición es útil, *inter alia*, para el tratamiento con un agente activo para formar una composición del primer aspecto de la presente invención.

20 Como se describió anteriormente, la incorporación de un componente de agente activo en una micropartícula, por ejemplo, una partícula hueca de glucano o partícula de pared celular, puede reducir la velocidad de liberación y/o degradación del agente activo, aumentando así la duración de acción del agente activo.

25 El uso de un componente de terpeno como conservante de microcápsulas es nuevo *per se*.

30 35 Por lo tanto, según otro aspecto más de la presente invención, se proporciona el uso de un componente de terpeno para inhibir o prevenir el crecimiento de mohos, levaduras y/u hongos indeseables en micropartículas.

30 Según este aspecto de la invención, las micropartículas son preferiblemente partículas de glucano o partículas de levadura, por ejemplo, partículas huecas de glucano o partículas huecas de levadura como se describió anteriormente en este documento.

35 Según este aspecto de la invención, el componente de terpeno que puede considerarse una cantidad conservante o una cantidad antimicótica es ≤1 % p/p, o <1 % p/p, ≤0.9 % p/p, ≤0.8 % p/p, ≤0.7 % p/p, ≤0.6 % p/p, ≤0.5 % p/p, ≤0.4 % p/p, ≤0.3 % p/p, ≤0.2 % p/p, ≤0.1 % p/p, ≤0.09 % p/p, ≤0.08 % p/p, ≤0.07 % p/p, ≤0.06 % p/p, ≤0.05 % p/p, ≤0.04 % p/p, ≤0.03 % p/p, ≤0.02 % p/p, ≤0.01 % p/p de la composición.

40 La cantidad de conservante o cantidad antimicótica del uno o más terpenos puede ser desde aproximadamente 0.01 % p/p a aproximadamente 0.99 % p/p.

45 50 Según otro aspecto más de la invención, se proporciona un método para inhibir o prevenir el crecimiento de mohos, levaduras y/u hongos indeseables en micropartículas, tales como partículas de glucano o partículas de levadura, por ejemplo, partículas huecas de glucano o partículas huecas de levadura como se describió anteriormente en este documento, que comprende tratar las micropartículas con una cantidad de conservante o una cantidad antimicótica de un componente de terpeno como se describió anteriormente en este documento.

55 De este modo, las composiciones de la presente invención pueden ser ventajosas porque, *inter alia*, se pueden encapsular una variedad de agentes activos en microcápsulas conservadas.

La invención se describirá ahora solo a modo de ejemplo.

#### Ejemplo 1

Se prepararon 6 x muestras de suspensión de levadura con las siguientes composiciones:

- 60 1. Composición estándar de partículas de glucano de levadura (sin terpenos agregados).
2. Composición estándar más 1 g/l de geraniol.
3. Composición estándar más 1 g/l de eugenol.
- 65 4. Composición estándar más 1 g/l de carvona.

5. Composición estándar más 1 g/l de citral.

6. Composición estándar más 1 g/l de timol.

5 Se almacenó una muestra de cada preparación a 20 °C y 35 °C. Cada una se revisó semanalmente para detectar cambios físicos, como evidencia de crecimiento de moho.

10 Se terminaron las pruebas si la evaluación indicaba signos de crecimiento de moho. Los resultados se resumen en la tabla I:

Tabla I

Referencia de muestra	Terpeno agregado a 1 g/L	Temperatura de almacenamiento	Momento en que apareció el moho	Cualquier presión en el recipiente de almacenamiento
1	ninguno	35°C	Sin moho después de 12 semanas	Ninguna
		20°C	4 semanas	Ninguna
2	Geraniol	35°C	Sin moho después de 12 semanas	Ninguna
		20°C	Sin moho después de 12 semanas	Ninguna
3	Eugenol	35°C	Sin moho después de 12 semanas	Ninguna
		20°C	Sin moho después de 12 semanas	Ninguna
4	Carvona	35°C	Sin moho después de 12 semanas	Ninguna
		20°C	Sin moho después de 12 semanas	Ninguna
5	Citral	35°C	Sin moho después de 12 semanas	Ninguna
		20°C	Sin moho después de 12 semanas	Ninguna
6	Timol	35°C	Sin moho después de 12 semanas	Ninguna
		20°C	Sin moho después de 12 semanas	Ninguna

15 La única muestra en la que se observó crecimiento de moho fue en la muestra de control No. 1 (sin adición de terpeno) almacenada a 20 °C.

**REIVINDICACIONES**

5 1. Una composición que comprende un componente de micropartículas, el componente de micropartículas que comprende partículas huecas de células de levadura o partículas huecas de glucano; en la que el componente de micropartículas contiene una cantidad de conservante de menos del 1 % p/p de uno o más terpenos, en la que el uno o más terpenos están encapsulados en el componente de micropartículas.

10 2. Una composición según la reivindicación 1, en la que la cantidad de conservante de uno o más terpenos es del 0.01 % p/p al 0.99 % p/p.

15 3. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el terpeno se selecciona del grupo que consiste en geraniol, eugenol, carvona, citral y timol.

20 4. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el terpeno comprende geraniol.

25 5. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el terpeno comprende eugenol.

6. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el terpeno comprende citral.

20 7. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el terpeno comprende timol.

25 8. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la partícula hueca de glucano o la partícula de células de levadura tiene un contenido de lípidos desde 1 % a 25 % p/p.

25 9. Uso de un componente de terpeno para inhibir o prevenir el crecimiento de mohos, levaduras y/u hongos indeseables en una composición que comprende micropartículas, en el que las micropartículas comprenden partículas huecas de células de levadura o partículas huecas de glucano, y en el que el componente de terpeno está encapsulado en las micropartículas en una cantidad de menos de 1 % p/p.

30 10. Uso de un terpeno en la fabricación de una composición de micropartículas conservadas, en la que las micropartículas comprenden partículas huecas de glucano o partículas huecas de levadura y el componente de terpeno comprende menos del 1 % p/p.