



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 348 461**

51 Int. Cl.:

C11D 17/00 (2006.01)

C11D 3/38 (2006.01)

C11D 3/22 (2006.01)

C11D 3/12 (2006.01)

C11D 3/386 (2006.01)

C12N 9/98 (2006.01)

B01J 2/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05026512 .3**

96 Fecha de presentación : **10.10.2000**

97 Número de publicación de la solicitud: **1632561**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.03.2006**

54 Título: **Gránulos que contienen proteínas y formulaciones de gránulos.**

30 Prioridad: **15.10.1999 US 419391**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.12.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.12.2010

73 Titular/es: **DANISCO US Inc.**
925 Page Mill Road
Palo Alto, California 94304, US

72 Inventor/es: **Ghani, Mahmood**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 348 461 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).

DESCRIPCIONCampo técnico

- 5 Esta invención se refiere a procedimientos para producir gránulos soporte de proteínas, por ejemplo, gránulos de enzimas.

Técnica anterior

- 10 El uso de proteínas tales como proteínas con importancia desde el punto de vista farmacéutico, por ejemplo, hormonas y proteínas con importancia desde el punto de vista industrial, por ejemplo, enzimas, ha experimentado un rápido crecimiento en los últimos años. Hoy en día, por ejemplo, las enzimas encuentran un uso frecuente, entre otras, en industrias del almidón, láctea y de detergentes.

- 15 En la industria de detergentes, en particular, las enzimas se configuran con frecuencia en una forma granular, con el deseo de conseguir una o más características de almacenamiento y/o comportamiento deseables, dependiendo de la aplicación concreta particular. En este sentido, la industria ha ofertado numerosos desarrollos en la granulación y revestimiento de enzimas, algunos de los cuales se ejemplifican en las siguientes patentes y publicaciones:

- 20 La patente de Estados Unidos 4.106.991 describe una formulación mejorada de gránulos de enzimas mediante la inclusión en la composición que se somete a granulación, de fibras de celulosa finamente divididas en una cantidad de 2 a 40% en peso/peso tomando como base el peso seco de toda la composición. Además, esta patente describe que se pueden usar sustancias céreas para revestir las partículas del
25 granulado.

- La patente de Estados Unidos 4.689.297 describe partículas que contienen enzimas que comprenden un núcleo dispersable en agua en forma de partículas que tiene una dimensión más grande de 150 a 2.000 micrómetros, una capa uniforme de enzima alrededor de la partícula de núcleo que constituye de 10% a 35% en peso del
30 peso de la partícula de núcleo, y una capa de un agente de revestimiento soluble o dispersable en agua, formador de película y macromolecular que rodea de forma uniforme a la capa de enzima, constituyendo la combinación de enzima y agente de revestimiento de 25 a 55% del peso de la partícula de núcleo. El material de núcleo descrito en esta patente incluye arcilla, un cristal de azúcar inmerso en capas de
35 almidón de maíz que está revestido con una capa de dextrina, almidón de patata

aglomerado, sal en partículas, citrato trisódico aglomerado, copos de NaCl cristalizado en cubeta, gránulos o perlas de bentonita, gránulos que contienen bentonita, caolín y tierra de diatomeas o cristales de citrato sódico. El material formador de película puede ser un éster de ácido graso, un alcohol etoxilado, un poli(alcohol vinílico) o un alquilfenol etoxilado.

La patente de Estados Unidos 4.740.469 describe una composición granular de enzima que consiste esencialmente en 1 a 35% en peso de una enzima y de 0,5 a 30% en peso de un material fibroso sintético que tiene una longitud media de 100 a 500 micrómetros y una finura en el intervalo de 0,05 a 0,7 denier (0,7 g en 9.000 metros de hilo), siendo el resto un extendedor o carga. La composición granular puede comprender además un material céreo molido, tal como polietilenglicol, y opcionalmente un colorante tal como dióxido de titanio.

La patente de Estados Unidos 5.324.649 describe gránulos que contienen enzima que tienen un núcleo, una capa de enzima y una capa de revestimiento externa. La capa de enzima y, opcionalmente el núcleo y la capa de revestimiento externa contienen un polímero de vinilo.

El documento WO 91/09941 describe una preparación que contiene enzima en la que al menos el 50% de la actividad enzimática está presente en la preparación en forma de cristales de enzima. La preparación puede ser una suspensión o un granulado.

El documento WO 97/12958 describe una composición de enzima microgranular. Los gránulos están elaborados por aglomeración en lecho fluido que da lugar a gránulos con numerosas partículas soporte o iniciadoras revestidas con enzima y unidas entre si por medio de un aglomerante.

El documento WO 99/32613 describe una composición granular que incluye un núcleo que comprende una proteína o enzima mezclada con un azúcar o azúcar-alcohol y un agente estructurante, tal como un polisacárido o un polipéptido. La composición granular puede incluir además una capa de barrera formada sobre el núcleo, así como un material de revestimiento externo. La capa de barrera puede estar compuesta de, por ejemplo, sales inorgánicas o sales o ácidos orgánicos. Materiales de revestimiento ejemplo incluyen, por ejemplo, materiales formadores de película solubles o dispersables en agua, tales como poli(alcohol vinílico) (PVA), polivinil pirrolidona (PVP) o derivados de la celulosa tales como metilcelulosa. De forma típica, el revestimiento externo incluye además un pigmento tal como TiO_2 , para impartir un color deseado a la composición.

El documento EP 0 258 068 describe un método para preparar un gránulo, que comprende (i) proporcionar una partícula que soporta una enzima criosecada, y (ii) revestir la partícula en tres etapas, de la siguiente manera: 5% de polietilenglicol (MW 600), 11,25% de TiO_2 /silicato de Mg (4:1), 4% de polietilenglicol (MW 600).

5 A pesar de tales desarrollos, existe una continua necesidad de gránulos de enzimas que tengan unas características beneficiosas o mejoradas adicionales. Una de tales características necesarias en la industria de la granulación de enzimas son formulaciones de gránulos que tengan una buena estabilidad, en particular a alta temperatura y humedad. Se desean de modo especial gránulos de enzimas con una
10 buena estabilidad durante el almacenamiento en, por ejemplo, fórmulas detergentes que contienen blanqueantes, tales como las que contienen blanqueantes de peróxígeno, por ejemplo, perborato sódico o percarbonato sódico.

Un objeto de la presente es proporcionar un método para preparar gránulos de enzimas que tengan una buena estabilidad al almacenamiento.

15

Sumario de la invención

La presente invención proporciona un método para preparar un gránulo, que comprende (i) disponer una partícula soporte de proteína; donde dicha partícula soporte de proteína se forma mediante una capa de un material que contiene la
20 enzima sobre un material central, (ii) formar una capa matriz de barrera alrededor de la partícula aplicando una mezcla que incluye (a) un agente secante finamente dividido, (b) un agente aglutinante y (c) un agente estructurante polimérico, y (iii) aplicar una capa de revestimiento que comprende un polímero formador de película alrededor de dicha capa matriz de barrera, estando la capa de revestimiento exterior
25 sustancialmente exenta de pigmentos.

Componentes de matriz ejemplo incluyen: (i) un pigmento o arcilla como agente secante, (ii) un azúcar o azúcar-alcohol como agente aglutinante, y (iii) un polisacárido o polipéptido como agente estructurante. Por ejemplo, el agente secante puede ser TiO_2 , el agente aglutinante puede ser sacarosa y el agente estructurante puede se
30 almidón.

Por ejemplo, de acuerdo con una realización, el revestimiento está formado por un material polimérico sustancialmente exento de pigmento (por ejemplo, HPMC).

De acuerdo con una realización, la partícula soporte de proteína se forma aplicando una enzima mezclada junto con al menos un aglomerante seleccionado del

grupo consistente en hidratos de carbono, derivados de hidratos de carbono, sales y cualquiera de sus mezclas, sobre un material inerte en forma de partículas.

Los gránulos descritos en la presente memoria se adaptan particularmente bien para usar en formulaciones detergentes, tales como detergentes para la ropa y/o lavavajillas.

El resto de características, aspectos y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, en combinación con las reivindicaciones adjuntas.

10 Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona una composición adecuada para usar en relación con gránulos soporte de proteínas, por ejemplo, gránulos de enzimas y similares. Por lo general, la composición comprende una mezcla que incluye un agente secante, un agente aglutinante y un agente estructurante polimérico; definiendo juntos una matriz. La matriz se puede aplicar como revestimiento o capa alrededor de una partícula soporte de proteínas. Con preferencia, la matriz se diseña para que actúe a modo de barrera, o divisor físico, que ralentice o evite la difusión de sustancias, tales como humedad y blanqueantes, que puedan afectar de modo adverso a la proteína o enzima en la región que contiene proteína del gránulo. Por consiguiente, por lo general en la presente memoria se hace referencia a la matriz como “matriz de barrera”.

La invención proporciona además un revestimiento o capa polimérica para usar en un gránulo que contiene proteína. El revestimiento está sustancialmente exento de pigmentos y similares. A los revestimientos formulados conforme a la invención se hace referencia por lo general como “revestimientos claros”. Se apreciará, en este sentido, que el término “claro”, en el contexto de la expresión “revestimiento claro” incluye los revestimientos transparentes, así como los revestimientos semitransparentes y opacos. La característica clave en la presente es que el revestimiento está sustancialmente exento de pigmentos.

Como se describe con más detalle más adelante, la matriz y revestimiento de la presente invención se usan en combinación en una formulación de gránulo de enzimas, presentando los gránulos resultantes una buena estabilidad cuando se los ensaya de forma deliberada con ciertos factores y/o sucesos desestabilizadores. Más adelante se describen detalles de la matriz y revestimiento.

Como se ha citado anteriormente, la matriz de barrera de la presente invención comprende una mezcla de componentes, incluyendo un agente secante finamente dividido, un agente aglutinante y un agente estructurante polimérico.

Agentes secantes contemplados para usar en la matriz de barrera de la invención incluyen materiales dispersables en agua, sustancialmente insolubles en agua. El agente secante está en forma finamente dividida, por ejemplo, un material en forma de partículas que tiene un diámetro medio no superior a aproximadamente 30 micrómetros y, con preferencia no superior a aproximadamente 10 micrómetros, preferiblemente comprende un material inorgánico. En una de dichas realizaciones, el material secante tiene un diámetro medio de aproximadamente 1 a 5 micrómetros.

Agentes secantes ejemplo incluyen pigmentos y arcillas. Por ejemplo, el agente secante puede comprender uno o más de los siguientes materiales: TiO_2 , talco, carbonato de calcio, bentonita, tierra de diatomeas y cualquier mezcla de los mismos. En una realización preferida de modo particular, el agente secante es TiO_2 .

En la matriz de barrera de la invención se puede(n) utilizar cualesquiera agente(s) secante(s) adecuado(s). Por ejemplo, se pueden utilizar polisacáridos de cadena corta, es decir, no más de aproximadamente veinte subunidades de longitud. En una realización, el agente aglutinante comprende hidrolisatos de almidón, tales como maltodextrina y jarabe de glucosa sólidos. En otra realización, el agente aglutinante es un azúcar o azúcar-alcohol. Ejemplos de agentes aglutinantes incluyen glucosa, fructosa, rafinosa, maltosa, lactosa, trehalosa, sacarosa, manitol, sorbitol, inositol y cualquier mezcla de los mismos. En una realización particularmente preferida, el agente aglutinante es sacarosa.

El agente estructurante de la matriz es un material polimérico. Por ejemplo, el agente estructurante puede comprender un polisacárido, polipéptido o una mezcla de los mismos. En una realización, el agente estructurante comprende un polisacárido seleccionado del grupo que consiste en almidón, carragenano, celulosa, goma arábica, goma de acacia, goma xantán, goma de algarrobilla y goma guar y cualquier mezcla de los mismos. En una realización preferida de modo particular, el agente estructurante es un polisacárido sustancialmente insoluble en agua tal como almidón (por ejemplo, maíz no hidratado o en bruto no modificado). En otra realización, el agente estructurante es un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en quitosano, gelatina, colágeno, caseína, ácido poliaspártico, ácido poliglutámico, y cualesquiera mezclas de los mismos. Se debe apreciar que el agente estructurante

puede comprender un solo tipo de polipéptido o polisacárido, o se puede usar en los gránulos de la presente invención una combinación de dos o más de tales materiales.

Haciendo referencia de nuevo al agente estructurante, se apreciará que los polisacáridos y polipéptidos tienen de forma típica las propiedades deseables de alto peso molecular y alta solubilidad en agua. Sin pretender estar limitado por la teoría, se cree que el alto peso molecular del agente estructurante contribuye a dos importantes propiedades de las que un azúcar o azúcar-alcohol solo carecería: (1) proporcionar cohesión y resistencia a la partícula, reduciendo enormemente la tendencia de la partícula a formar polvo; y (2) servir como barrera de difusión al agua y pequeñas moléculas gracias a la formación de una red polimérica o "jaula" a través de toda la estructura de la matriz. Esto mejora enormemente la estabilidad del gránulo.

Los agentes estructurantes elegidos particulares -polisacáridos y polipéptidos- también tienen de forma típica una característica antipegajosidad que sirve de ayuda para reducir las características aglomerantes del azúcar o azúcar-alcohol y permite que las capas de la matriz se acumulen (por ejemplo en un revestimiento en lecho fluido) a altas velocidades sin aglomeración.

Azúcares y azúcar-alcohol y los agentes estructurantes poliméricos también tienen una elevada solubilidad o dispersabilidad en agua. Se puede preparar de forma sencilla una fórmula de matriz que incluya un azúcar o azúcar-alcohol, un agente estructurante polimérico y un agente secante finamente dividido como solución o suspensión con una elevada concentración de sólidos totales. Se pueden formular concentraciones de sólidos totales en solución o suspensión de 20 a 50% peso/peso o más. Estas mezclas concentradas son muy deseables porque se pueden conformar en forma de gránulos con unas mínimas necesidades de evaporar agua, una ventaja en cualquier proceso de granulación y secado.

De modo opcional, la matriz de la presente invención puede incluir además un tensioactivo o agente humectante. El tensioactivo o agente humectante puede ser útil, por ejemplo, para ayudar a mantener el agente secante en la matriz, por ejemplo, TiO_2 en suspensión. Materiales ejemplo que se pueden incorporar en la matriz incluyen Neodol, alcoholes de sebo, ácidos grasos, sales de ácidos grasos tales como estearato de magnesio y ésteres de ácidos grasos. En una realización particularmente preferida, se emplea en la matriz Neodol.

A continuación se describirán detalles del revestimiento o capa polimérico de la presente invención. El revestimiento comprende un polímero formador de película, tal

como poli(alcohol vinílico), polivinil pirrolidona, derivados de la celulosa tales como metilcelulosa, hidroxipropil metilcelulosa, hidroxixelulosa, etilcelulosa, carboximetil celulosa, hidroxipropil celulosa, polietilenglicol, poli(óxido de etileno), quitosán, goma arábica, goma xantán, carragenano o cualquiera de sus mezclas. Como se ha citado
5 anteriormente, el revestimiento polimérico está sustancialmente exento de pigmentos y componentes similares. En una realización particularmente preferida, se forma un revestimiento claro de hidroxipropil metilcelulosa (HPMC), o una combinación de HPMC y otros polímeros. Por ejemplo, está disponible de forma comercial Methocel E15, una hidroxipropil metilcelulosa, de Dow Chemical Co., Midland Mich. De forma
10 opcional, el revestimiento claro puede incluir un agente para elevar la temperatura de gelificación, tal como uno o más azúcares (por ejemplo, sacarosa) y un plastificador. Plastificadores adecuados incluyen, por ejemplo, polioles tales como azúcares, azúcar-alcohol o polietilenglicoles (PEG), urea, glicol, propilenglicol u otros plastificadores conocidos tales como citrato de trietilo, ftalato de dibutilo o dimetilo o
15 agua. En una realización preferida, el plastificador es polietilenglicol (por ejemplo, PEG 400 y/o PEG 600).

Como se ha descrito anteriormente, la matriz de barrera y el revestimiento claro de la presente invención se usan en combinación en una formulación de gránulo de enzimas. El revestimiento claro está dispuesto directamente adyacente a la matriz de
20 barrera, siendo el revestimiento el más externo de los dos. Se apreciará sin embargo, que se pueden incluir además una o más capas intermedias (es decir, entre la matriz y el revestimiento).

La matriz y/o el revestimiento de la presente invención puede incorporar una amplia gama de gránulos de enzimas o proteínas. Preferiblemente, la capa matriz está
25 sustancialmente exenta de enzimas. Por ejemplo, la matriz de barrera y/o el revestimiento claro se pueden realizar en perlas, esferas, extrudidos, gránulos estratificados en lecho fluido (por ejemplo, gránulos de Enzoguard®; Genencor International, Inc.), y/o gránulos de matriz obtenidos por alto cizallamiento (por ejemplo, T-granulates; Novo-Nordisk), entre otros. El gránulo incluye una región que
30 contiene una o más proteínas o enzimas alrededor de la cual puede aplicarse la matriz. Preferiblemente, sustancialmente toda la enzima incluida en el gránulo está contenida dentro de la región que contiene la proteína. La región que contiene proteína comprende un núcleo que tiene una o más proteínas o enzimas embebidas o dispersadas en el mismo, y/o revestidas o estratificadas sobre el mismo. De forma
35 alternativa, o adicional, la región que contiene proteínas o enzimas puede incluir una

partícula inerte sobre la cual se estratifica una matriz de proteínas o enzimas. Gránulos ejemplo que se pueden modificar para que incorporen la matriz de barrera y/o el revestimiento claro de la presente invención se describen en las publicaciones de documento PCT números WO 99/32613, WO 99/32595 y WO 99/32612; así como
5 en las patentes de Estados Unidos números 5.814.501, 5.324.649, 4.689.297 y 4.106.991.

Proteínas que están dentro del alcance de la presente invención incluyen proteínas importantes desde el punto de vista farmacéutico tales como hormonas u otras proteínas terapéuticas y proteínas importantes desde el punto de vista industrial
10 tales como enzimas.

En la presente invención se puede usar cualquier enzima o combinación de enzimas. Enzimas preferidas incluyen aquellas que pueden hidrolizar sustratos, por ejemplo, manchas. Tales enzimas, que se conocen como hidrolasas, incluyen, aunque sin quedar limitadas a las mismas, proteasas (bacterianas, fúngicas, ácidas, neutras o
15 alcalinas), amilasas (alfa o beta), lipasas, celulasas y mezclas de las mismas. Enzimas particularmente preferidas son subtilisinas y celulasas. Las más preferidas son subtilisinas tales como las descritas en la patente de Estados Unidos 4.760.025, patente europea 130 756 B1 solicitud PCT WO 91/06637, y celulasas tales como Multifect L250™ y Puradax™, disponibles de forma comercial de Genencor
20 International. Otras enzimas que se pueden usar en la presente invención incluyen oxidasas, transferasas, deshidratasas, reductasas, hemicelulasas e isomerasas.

Los gránulos de la presente invención también comprenden uno o más revestimientos o capas adicionales, por ejemplo, una o más capas intermedias y/ una sobrecapa. Estas pueden servir para cualquiera de una serie de funciones en una
25 composición granular, dependiendo del uso final del gránulo. Por ejemplo, los revestimientos pueden hacer una enzima resistente a la oxidación por blanqueantes, consiguiendo velocidades deseables de disolución al introducir el gránulo en un medio acuoso, y/o reducir la posibilidad de crecimiento microbiano en el gránulo.

Los gránulos descritos en la presente memoria se pueden preparar por
30 procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica de granulación de enzimas, incluyendo el revestimiento en bandeja, revestimiento en lecho fluido, perlado, granulación en placa, secado por pulverización, extrusión, extrusión centrífuga, esferonización, granulación en tambor, aglomeración con alto cizallamiento o combinaciones de estas técnicas.

Un procedimiento preferido, contemplado por la presente invención, es un procedimiento de pulverización en lecho fluido. En una realización ejemplo, el procedimiento conlleva cargar partículas fluidizables, tales como cristales de azúcar, en un aparato de pulverización en lecho fluido, tal como un revestidor de lecho fluido

5 Vector FL1. Con las partículas fluidizadas, se puede aplicar una primera pulverización, con preferencia que comprende una solución acuosa de proteínas o enzimas. Esta primera pulverización puede ser, por ejemplo, un concentrado fluido que incluya una proteasa, un azúcar disuelto y almidón suspendido. De este modo, se puede formar una primera capa o revestimiento sobre las partículas fluidizadas. A

10 continuación se puede aplicar una segunda pulverización, que comprende una matriz de barrera de la presente invención. La segunda pulverización puede ser, por ejemplo, una mezcla fluida que incluye un azúcar disuelto en agua y almidón suspendido y dióxido de titanio. Esta suspensión también puede contener un agente tensioactivo/humectante, tal como Neodol, para mantener el dióxido de titanio en

15 suspensión. A continuación, se puede aplicar una tercera pulverización, que forma un revestimiento claro alrededor de la matriz de barrera. Esta tercera pulverización puede ser, por ejemplo, una solución que incluya HPMC (o una combinación de HPMC y otros polímeros) y, opcionalmente, un azúcar (por ejemplo, sacarosa) para elevar la temperatura de gelificación y/o un plastificador tal como PEG 400 o PEG

20 600.

Un gránulo particularmente preferido, que se puede preparar como se acaba de describir, consiste esencialmente en (i) un núcleo compuesto por un cristal de azúcar que tiene una matriz de enzimas estratificada sobre el mismo; (ii) una matriz de barrera estratificada sobre la matriz de enzimas; y (iii) un revestimiento claro formado

25 sobre la matriz de barrera. Sin pretender limitarse a una teoría particular, se cree que la estabilidad mejorada de dicho gránulo se debe a la presencia, en la capa matriz de barrera, de un pigmento (por ejemplo, dióxido de titanio) y almidón no hidratado, que actúan como agentes secantes y protegen las enzimas de la humedad. Además, se cree que el revestimiento claro proporciona una sobrecapa en película

30 sustancialmente continua. Los productos de enzimas granulados conocidos tienen de forma típica el pigmento en la capa más externa, creando de este modo una sobrecapa con una estructura más débil.

Los gránulos preferidos, contruidos conforme a la presente invención se caracterizan por una baja afinidad por la humedad. Así, tales gránulos están

35 sustancialmente exentos de capas o revestimientos que tengan una alta afinidad por

la humedad (por ejemplo, capas con sales). Tal y como se usa en la presente memoria “baja afinidad por la humedad” significa que un gránulo expuesto a 50°C y una humedad relativa del 70% captará menos del 10% y, con preferencia menos del 5% de un aumento en peso por la humedad “en equilibrio”. es decir, cuando la absorción de humedad se ha estabilizado generalmente. Como se puede apreciar de los resultados del Ejemplo 5 (más adelante), las formulaciones de gránulos ejemplo que incorporan la matriz de la presente invención por lo general se estabilizan a aproximadamente 2 a 3% de aumento de peso por la humedad. Se cree que, como resultado de dicha baja afinidad por la humedad, se reduce de forma significativa la intrusión no deseada de humedad y sustancias inactivadoras asociadas en la región que contiene la proteína de dichos gránulos. Cuando la matriz de barrera y/o el revestimiento claro están realizados en un gránulo de enzimas, las enzimas rodeadas de este modo presentan de forma típica una muy buena estabilidad.

15

EJEMPLOS

Ejemplo 1:Formulación de gránulo de enzimas

A continuación en la Tabla 1 se muestra una formulación ejemplo de un lote de gránulos, producido usando un proceso de pulverización en lecho fluido. La pulverización inicial en este ejemplo se aplicó a 540,0 g de cristales de sacarosa cargados en una cámara de lecho fluido y suspendidos en la misma. La enzima usada fue Purafect OXP (Genencor International, Inc.). En este y en los siguientes ejemplos, “pulverización 1” denota una matriz de enzimas formada sobre una partícula fluidizable, “pulverización 2” denota la matriz de barrera de la presente invención y “pulverización 3” denota el revestimiento claro de la presente invención. Ciertos detalles del proceso en lecho fluido fueron sustancialmente como se describen en el Ejemplo 2 del documento WO 99/32613.

Tabla 1

PULVERIZACIÓN 1:	OxP conc. 14,3% en sólidos	1542,0 g
	Sacarosa	393,0 g
	Almidón	393,0 g
PULVERIZACIÓN 2:	Almidón de maíz	224,0 g
	Sacarosa	224,0 g
	TiO ₂	125,0 g
	Neodol	28,0 g
PULVERIZACIÓN 3:	Methocel E15	56,0 g
	PEG 400	8,0 g

Ejemplo 2:

5

Formulaciones de gránulo de enzimas

En las Tablas 2, 3 y 4, a continuación, se muestran varias formulaciones ejemplo para gránulos de enzimas, también producidos usando un proceso de pulverización en lecho fluido. Como con el ejemplo anterior, la pulverización inicial para cada una de las siguientes formulaciones se aplicó a 540,0 g de cristales de sacarosa cargados en una cámara de lecho fluido, y suspendidos en la misma. La enzima usada en estas formulaciones fue Properase (Genencor International, Inc.).

10

Tabla 2 - "Lote 80"

PULVERIZACIÓN 1:	Properase conc. (17,3% en sólidos)	1200,0 ml
	Sacarosa	396,0 g
	Almidón	396,0 g
PULVERIZACIÓN 2:	Almidón de maíz	224,0 g
	Sacarosa	224,0 g
	TiO ₂	125,0 g
	Neodol	28,0 g
PULVERIZACIÓN 3:	HPMC(Methocel E15)	48,0 g
	PEG 600	8,0 g

15

Tabla 3 - "Lote 81"

PULVERIZACIÓN 1:	Properase conc. (17,3% en sólidos)	1200,0 ml
	Sacarosa	396,0 g
	Almidón	396,0 g
PULVERIZACIÓN 2:	Almidón de maíz	224,0 g
	Sacarosa	224,0 g
	TiO ₂	125,0 g
	Neodol	28,0 g
PULVERIZACIÓN 3:	HPMC(Methocel E15)	24,0 g
	Almidón modificado (Pure Cote (50/50))	24,0 g
	PEG 600	8,0 g

Tabla 4 - "Lote 82"

5

PULVERIZACIÓN 1:	Properase conc. (17,3% en sólidos)	1200,0 ml
	Sacarosa	396,0 g
	Almidón	396,0 g
PULVERIZACIÓN 2:	Almidón de maíz	224,0 g
	Sacarosa	224,0 g
	TiO ₂	125,0 g
	Neodol	28,0 g
PULVERIZACIÓN 3:	HPMC (Methocel E15)	48,0 g
	Sacarosa	8,0 g
	PEG 600	8,0 g

Ejemplo 3:Ensayos de estabilidad acelerada usando una base de detergente para la colada

Los gránulos del Ejemplo 2 (Lotes 80, 81 y 82) se analizaron para determinar su estabilidad en tres ensayos de estabilidad bajo condiciones de sobrecarga de tres días. Los métodos para estos procedimientos fueron sustancialmente como se describen en el Ejemplo 3 del documento WO 99/32613. Sin embargo, en este ejemplo, se usó una base de detergente para la colada registrada.

Como se describe en el documento WO 99/32613, el ensayo de estabilidad acelerada se diseña para ayudar a desarrollar y seleccionar formulaciones granulares, puesto que proporciona un medio acelerado para determinar la estabilidad relativa de los gránulos. Las condiciones del ensayo de estabilidad acelerada (AST) (del inglés

Accelerated Stability Test) son bastante más intensas que las que se encontrarían los gránulos de enzimas o detergentes en un transporte o almacenamiento real. El AST es un “ensayo de sobrecarga” diseñado para discriminar diferencias entre formulaciones que de otro modo no serían evidentes durante semanas o meses.

- 5 Los resultados del AST mostrados en la Tabla 5, a continuación, muestran el porcentaje de actividad que queda para cada uno de los Lotes 80, 81 y 82, durante un período de tres días.

Tabla 5 - Porcentaje de actividad del original

	Día 0	Día 1	Día 3
Lote 80	100,0	88,8	49,7
Lote 81	100,0	91,4	41,0
Lote 82	100,0	85,4	39,7
74-A	100,0	89,7	32,0
87-B	100,0	75,5	27,0

10

Los resultados de estabilidad para dos lotes más, denominados 74-A y 87-B, se muestran también en la Tabla 5. Estos lotes adicionales tienen las formulaciones generales mostradas en la Tabla 6, siguiente. Se apreciará que estas formulaciones adicionales se prepararon en un aparato de pulverización en lecho fluido, como antes,

15 aplicando las pulverizaciones a cristales de sacarosa fluidizados en una cámara del aparato.

Tabla 6:

74-A

87-B

PULVERIZACIÓN 1:	Properase conc. (17,3% en sólidos)	Properase conc. (17,3% en sólidos)
	Sacarosa	Sacarosa
	Almidón	Almidón
PULVERIZACIÓN 2:	Almidón de maíz	Ninguno
	Sacarosa	
	Ti ₂	
	Neodol	
PULVERIZACIÓN 3:	Ninguno	HPMC (Methocel E15)
		Sacarosa (opcional)
		PFG 600

Como se puede apreciar de la Tabla 6, los Lotes 74-A y 87-B están compuestos de gránulos, la mayoría como los descritos en los Ejemplos 1 y 2, anteriores, salvo porque los gránulos del Lote 74-A carecen de un revestimiento claro y los gránulos del Lote 87-B carecen de una capa matriz de barrera.

- 5 Aunque los gránulos que tienen un núcleo de enzimas rodeado únicamente por la matriz de barrera (por ejemplo, Lote 74-A) o por el revestimiento claro (por ejemplo, Lote 87-B) de la presente invención muestran una buena estabilidad en los ensayos de estabilidad acelerada (véase la Tabla 5 anterior), los gránulos que incluyen ambas capas alrededor de un núcleo de enzimas (por ejemplo, Lotes 80, 81 y 82)
- 10 presentan una estabilidad incluso mejor.

Ejemplo 4:

Ensayos de estabilidad acelerada usando una base de detergente para lavavajillas automáticos

- 15 Se analizaron también los gránulos del Ejemplo 2 (Lotes 80, 81 y 82) en ensayos de estabilidad bajo condiciones de sobrecarga de tres días para determinar la estabilidad en una base de detergente para lavavajillas automáticos. Como con el ejemplo anterior, los métodos para estos procedimientos fueron sustancialmente como se describen en el Ejemplo 3 del documento WO 99/32613. No obstante, aquí, los
- 20 estudios se llevaron a cabo a 40°C y una humedad relativa del 70%.

La Tabla 7, siguiente, muestra el porcentaje de actividad que queda para cada uno de los Lotes 80, 81 y 82, durante un período de tres días. También se muestran los resultados para un gránulo disponible de forma comercial en las mismas condiciones.

25

Tabla 7 - Porcentaje de actividad del original

	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3
Lote 80	100,0	87	51	32
Lote 81	100,0	71	44	27
Lote 82	100,0	86	51	37
Gránulo comercial de proteasa	100,0	55	25	19

Ejemplo 5:

Ensayos de estabilidad acelerada usando una base de detergente para lavavajillas
automáticos

Como se ha citado anteriormente, los gránulos preferidos de la presente invención tienen una baja afinidad por la humedad. Así, tales gránulos (por ejemplo, los gránulos de los Lotes 80, 81, 82, 74-A, 87-B) están sustancialmente exentos de capas o revestimientos que tengan una alta afinidad por la humedad (por ejemplo, capas de sales). Tal y como se usa en la presente memoria, “baja afinidad por la humedad” significa que un gránulo expuesto a 50°C y humedad relativa del 70% captará menos de 10% y, preferiblemente, menos de 5% de aumento de peso por la humedad “en el equilibrio”, es decir, cuando la absorción de humedad se ha estabilizado generalmente. Como se aprecia de los datos de la Tabla 8, siguiente, la formulación de gránulos ejemplo del Lote 81 se estabiliza por lo general a un aumento de peso por la humedad menor que aproximadamente 2 a 3%. Por otro lado, el gránulo de proteasa comercial mostró un aumento de peso por la humedad en equilibrio de al menos 17%.

Tabla 8 - Aumento de peso porcentual

	Día 0	Día 5	Día 12
Gránulo del Lote 81	100	101,631	101,4609
Granulo comercial de proteasa	100	107,0899	117,2339

REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar un gránulo, que comprende:
- 5 (i) disponer una partícula soporte de proteína; donde dicha partícula soporte de proteína se forma mediante una capa de un material que contiene la enzima sobre un material central,
- (ii) formar una capa matriz de barrera alrededor de la partícula aplicando una mezcla que incluye (a) un agente secante finamente dividido, (b) un agente aglutinante y (c) un agente
- 10 (iii) aplicar una capa de revestimiento que comprende un polímero formador de película alrededor de dicha capa matriz de barrera, estando la capa de revestimiento exterior sustancialmente exenta de pigmentos.
- 15 2. El método de la reivindicación 1, en el que dicha partícula soporte de proteína se forma aplicando una enzima mezclada junto con al menos un aglutinante seleccionado del grupo que consiste en carbohidratos, derivados de carbohidratos, sales y cualesquiera mezclas de los mismos, sobre un material inerte en forma de partículas.
- 20 3. El método de la reivindicación 1, en el que dicho agente secante comprende un pigmento o arcilla, dicho agente aglutinante comprende un azúcar o azúcar-alcohol, y dicho agente estructurante comprende un polisacárido o polipéptido.
- 25 4. El método de la reivindicación 3, en el que dicho agente secante comprende TiO_2 , dicho agente aglutinante comprende sacarosa, y dicho agente estructurante comprende almidón.
- 30