

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 982 907**

51 Int. Cl.:

<b>A23J 3/14</b>	(2006.01)
<b>A23J 3/26</b>	(2006.01)
<b>A23J 1/14</b>	(2006.01)
<b>A23P 10/30</b>	(2006.01)
<b>A23P 30/20</b>	(2006.01)
<b>A23L 5/30</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.12.2015** E 19203958 (4)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2024** EP 3628168

54 Título: **Una solución de proteína de guisante desnaturalizada y sus usos para formar micropartículas**

30 Prioridad:

**15.12.2014 EP 14198051**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**18.10.2024**

73 Titular/es:

**ANABIO TECHNOLOGIES LIMITED (100.0%)  
11 Herbert Street  
Dublin D02, IE**

72 Inventor/es:

**BLEIEL, SINEAD y  
KENT, ROBERT**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 982 907 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

Una solución de proteína de guisante desnaturalizada y sus usos para formar micropartículas

**Campo técnico**

5 La invención se refiere a un método para producir una proteína de guisante desnaturalizada y a una solución de proteína de guisante desnaturalizada producida de acuerdo con el método. La invención también se refiere a un método para producir micropartículas que tienen una matriz de proteína de guisante desnaturalizada que comprende la etapa de proporcionar una solución de proteína de guisante desnaturalizada de la invención.

**Antecedentes de la invención**

10 Las proteínas animales (proteínas del suero de la leche, gelatina, caseína) extraídas de productos de origen animal (leche, colágeno) se usan ampliamente en la encapsulación de sustancias activas. Estos polímeros naturales presentan claras ventajas: biocompatibilidad, biodegradabilidad, buenas propiedades anfífilas y funcionales tales como solubilidad en agua, y capacidad emulgente y espumante. Sin embargo, los costes, el poder alérgico y las limitaciones del mercado representan algunas desventajas de las proteínas de origen animal. En la actualidad, la presencia generalizada de micropartículas basadas en proteínas de origen animal contrasta con el uso muy limitado de las proteínas de origen vegetal en la industria. Esta tendencia debe invertirse en los próximos años. En aplicaciones alimentarias, se sabe que las proteínas de origen vegetal son menos alérgicas que las proteínas de origen animal. Por estas razones, en los últimos años, el desarrollo de nuevas aplicaciones para productos vegetales ricos en proteínas ha pasado a ser un área de investigación cada vez más interesante. Durante la última década, la industria de ingredientes proteicos ha recurrido a las plantas como alternativa preferida a las fuentes de origen animal, p. ej., en las dietas vegetarianas, debido a la mayor preocupación de los consumidores por la seguridad de los productos de origen animal.

15 Las dos técnicas utilizadas principalmente para la microencapsulación de componentes activos con proteínas vegetales son el secado por atomización y la coacervación. Ambos procesos tienen en común el aspecto de "química verde", al ser las proteínas de origen vegetal recursos renovables y biodegradables, y el hecho de que las dos técnicas no necesitan usar disolventes orgánicos. También se pueden considerar otros procesos, tales como las técnicas de evaporación de disolventes; sin embargo, es necesario introducir otros excipientes y polisacáridos para generar una estructura definida.

20 El secado por atomización es un proceso en continuo para convertir un líquido inicial en un polvo sólido de micropartículas. Se trata de un proceso de deshidratación muy común que se utiliza para formar una matriz continua que rodea a las sustancias activas. Esta tecnología tiene varias ventajas: es sencilla, relativamente barata y rápida. El factor importante para una microencapsulación exitosa mediante secado por atomización es que el material de la cubierta tenga una elevada solubilidad en agua y una baja viscosidad cuando el contenido en sólidos es elevado. Las desventajas de esta técnica son la pérdida de una cantidad significativa de producto (debido a la adhesión de las micropartículas a la pared del secador por atomización) y la posibilidad de degradación de los productos sensibles a las altas temperaturas de secado.

25 La microencapsulación por coacervación se lleva a cabo mediante la precipitación de materiales formadores de paredes alrededor del núcleo con componente activo bajo el efecto de uno de los siguientes factores: cambio de pH o temperatura, adición de un no disolvente o un compuesto tipo electrolito. La coacervación se produce por un método simple o complejo. La coacervación simple conlleva un único soluto coloidal y, por lo tanto, la formación de una sola envoltura polimérica. La coacervación compleja se genera mezclando dos polielectrolitos con cargas opuestas para permitir la formación de la cubierta alrededor de un núcleo con componente activo. Ducelet et al. (2004) examinaron el uso de globulina de guisante (punto isoeléctrico en un intervalo de pH de 4,4 a 4,6) para la microencapsulación de triglicéridos mediante coacervación compleja junto con el efecto del pH y la concentración de polímero en el tamaño de las microcápsulas. El aumento de la concentración de mezcla de globulina de guisante/goma arábiga (50:50) en la composición inicial dio lugar a un aumento del tamaño de las microcápsulas. Por ejemplo, a pH 3,5, el diámetro de las microcápsulas varió de 28 µm a 97 µm al modificar la concentración de 1 g/L a 10 g/L, respectivamente. Por el contrario, Lazko et al. (2004a) observaron una disminución del tamaño del coacervado al aumentar la concentración de proteína de soja. De hecho, el diámetro medio de las micropartículas obtenidas disminuyó de 153 µm a 88 µm a medida que la concentración de proteína aumentó de 0,5 g/L a 5 g/L, respectivamente. Esta discordancia entre los resultados publicados se debió probablemente a diferencias en el proceso de coacervación. En el caso de las proteínas de guisante se utilizó coacervación compleja y la aglomeración y coalescencia de las partículas aumentó su tamaño. La presencia de polisacáridos en el preparado inicial también puede influir en la aglomeración de coacervados (Klassen y Nickerson, 2012). Por otro lado, las micropartículas de proteína de soja se prepararon mediante coacervación simple. Las mayores concentraciones de proteínas tensioactivas en la emulsión aumentaron la resistencia a la coalescencia de los coacervados.

30 Klemmer et al. (International Journal of Food Science and Technology, 2011, 46, 2248-2256) describen una solución de proteína de guisante y su uso para fabricar cápsulas que contienen bacterias probióticas. El método de Klemmer conlleva disolver un aislado de proteína de guisante en un disolvente alcalino, calentar la solución para desnaturalizar

la proteína y a continuación enfriar la proteína desnaturalizada. A continuación, se añade alginato a la solución de proteína desnaturalizada y la mezcla de biopolímeros se somete entonces a etapas adicionales de calentamiento y enfriamiento, antes de añadir las bacterias probióticas y extruir la mezcla a través de una aguja para producir gotitas que se reticulan en un baño de calcio para formar cápsulas que tengan un diámetro promedio de aproximadamente 2 mm. El uso de una solución de alginato/guisante como matriz de encapsulación resulta problemático para la digestión por vía oral, ya que la matriz de alginato/guisante no tolera el tránsito gástrico y se disgrega en el estómago, liberando las bacterias probióticas, donde son destruidas en condiciones ácidas. Además, la adición de alginato a la solución de proteína de guisante aumenta la viscosidad de la mezcla de biopolímeros hasta el punto de que es difícil de transformar en microgotitas, lo que significa que las cápsulas resultantes son grandes en lugar de microesferas o microcápsulas.

- 10 En la memoria descriptiva de la Patente de EE. UU. n.º 2014/314944 se describe un método para preparar hidrolizados de proteína de guisante en lugar de soluciones de proteína de guisante desnaturalizada, mientras que Chavan et al. (Food Chemistry, vol. 74, n.º 2, 1 de agosto de 2001 [2001-08-01], págs. 177-187) divulgan un método para preparar una solución de proteína de guisante de playa y Diaeldin M. Ragab et al. (Food Chemistry, vol. 84, n.º 2, 1 de febrero de 2004 [2004-02-01], páginas 207-212) describen un método para preparar una solución de proteína de caupí.
- 15 Stephen Daniels (www.foodnavigator-usa.com, 29 de enero de 2013 (2013-01-29), páginas 1-5) describe una proteína de guisante para agregar a bebidas y Marina Carbonaro et al. (Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 45, núm. 9, 1 de septiembre de 1997 [1997-09-01], páginas 3387-3394) describen una solución que comprende proteína de garbanzo al 3%. Hao Feng (The Free Online Library, 1 de noviembre de 2015 [11 de noviembre de 2015], páginas 1-2) describe una combinación de tratamiento en medio alcalino y sonicación para solubilizar la proteína de guisante.
- 20 Raúl Lanchici et al. (Journal on Processing and Energy in Agriculture, 1 de enero de 2011 [11-01-01], páginas 87-89) describen la influencia de los métodos de extracción y secado de las proteínas de guisante en su solubilidad.

Un objeto de la invención es proporcionar una solución de proteína de guisante desnaturalizada que sea adecuada para la formación de micropartículas, y un proceso para la producción de las mismas. Es un objeto adicional de la invención proporcionar un proceso para formar micropartículas de proteína de guisante.

#### 25 **Declaraciones de la invención**

La invención se expone en el conjunto de las reivindicaciones anexas.

- Una solución de proteína de guisante desnaturalizada de la invención tiene un contenido muy elevado de proteína de guisante soluble (es decir, más que 90% usando el método descrito más adelante) y tiene una viscosidad lo suficientemente baja como para permitir su extrusión o atomización a través de una boquilla (incluidas las boquillas de secado por atomización y las ruedas de atomización) durante la formación de microesferas. El elevado contenido de proteína de guisante desnaturalizada soluble proporciona un proceso eficiente en el cual se maximiza el uso del sustrato de proteína de guisante. Además, una solución de proteína de guisante desnaturalizada formada de acuerdo con el método de la invención, y que tiene una concentración de proteína de guisante de aproximadamente un 6-9% (p/v), se puede polimerizar eficientemente en medio ácido para formar micropartículas de tamaño micrométrico sin necesidad de biopolímeros adicionales en la matriz, y las micropartículas formadas pueden permanecer intactas durante el tránsito gástrico y liberarse en el intestino delgado, específicamente, en el íleon.

- El método para producir micropartículas de proteína de guisante de la invención produce micropartículas que son esféricas, típicamente tienen una distribución homogénea de tamaños, y son capaces de permanecer intactas durante el paso por el estómago de los mamíferos, y posteriormente se disgregan en el intestino delgado, específicamente el íleon. Esto permite que las micropartículas liberen agentes activos lábiles en medio ácido al intestino delgado sin que se degraden. Además, la forma esférica de las micropartículas y la distribución homogénea de tamaños permiten que la cinética de liberación del agente activo sea controlada y repetible. El método para la producción de las micropartículas conlleva la formación de gotitas a partir de la solución de proteína de guisante desnaturalizada de la invención, y a continuación la gelificación en frío de las gotitas en un baño ácido. Sorprendentemente, el solicitante ha descubierto que el uso de un baño ácido de gelificación que tiene un pH igual al pI de la proteína de guisante produce micropartículas de formas irregulares, y que para lograr microesferas altamente esféricas (como las que se muestran en la Fig. 2) es preciso que el pH del baño de gelificación sea inferior al pI de la proteína de guisante.

- Normalmente, la solución de proteína de guisante desnaturalizada enfriada se clarifica para eliminar la materia insoluble. Diversos métodos de clarificación serán evidentes para un experto en la técnica. Preferiblemente, la solución se clarifica por centrifugación.

Normalmente, la solución de proteína de guisante se deja reposar durante al menos 30 minutos. Idealmente, la solución de proteína de guisante se deja reposar durante al menos 40 minutos. En una realización, la solución de proteína de guisante se deja reposar durante al menos 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120 minutos.

En una realización, el disolvente es un disolvente alcalino y la solución tiene un pH de al menos 10.

- 55 Idealmente, la solución de proteína de guisante desnaturalizada comprende proteína de guisante desnaturalizada al 6,5-8,5% (p/v).

Preferiblemente, al menos el 95% de la proteína de guisante en la solución de proteína de guisante desnaturalizada es soluble.

Preferiblemente, la solución de proteína de guisante desnaturalizada tiene una viscosidad que es lo suficientemente baja como para permitir que la solución se pueda extraer formando microgotitas.

- 5 Preferiblemente, la boquilla se calienta en el método para producir micropartículas que tienen una matriz de proteína de guisante desnaturalizada.

Normalmente, el montaje de la boquilla comprende un sistema de voltaje electrostático configurado para aplicar un potencial eléctrico entre la boquilla y un electrodo dispuesto debajo de la boquilla. La boquilla empleada en el método para producir micropartículas que tienen una matriz de proteína de guisante desnaturalizada también puede representar una boquilla estándar que se encuentra en un secador por atomización.

En el método para producir las micropartículas de la invención, las micropartículas normalmente son micropartículas esféricas, e idealmente micropartículas esféricas que tienen una distribución homogénea de tamaños.

Las micropartículas formadas de acuerdo con el método de la invención pueden ser una microcápsula que tiene una cubierta y un núcleo que comprende proteína de guisante nativa. La microcápsula es gastrorresistente (puede pasar intacta por el estómago de mamíferos, especialmente, el de seres humanos). La microcápsula es capaz de liberar el núcleo en el intestino delgado de mamíferos (especialmente, de seres humanos), preferiblemente en el íleon, e idealmente en el íleon proximal. La cubierta es proteína de guisante desnaturalizada y la microcápsula puede estar recubierta con quitosano o con gelatina.

Las micropartículas formadas de acuerdo con el método de la invención también pueden ser microesferas que tengan una matriz continua formada por proteína de guisante desnaturalizada y un agente activo dispersado por toda la matriz de proteína de guisante desnaturalizada. La microesfera es gastrorresistente y es capaz de liberar el agente activo en el intestino delgado de mamíferos (especialmente, de seres humanos), preferiblemente en el íleon, e idealmente en el íleon proximal. La microesfera puede estar recubierta de quitosano o gelatina.

Las micropartículas formadas según un método de la invención (es decir, microesferas o microcápsulas) pueden estar recubiertas de quitosano o gelatina. Esto se puede lograr sumergiendo las micropartículas en un baño que contenga quitosano o gelatina, y dejando las micropartículas sumergidas durante un período de tiempo para que el quitosano o la gelatina en el baño formen un recubrimiento sobre las micropartículas. Un baño de quitosano puede comprender quitosano al 0,5-2,0% (p/v) en un disolvente que sea ácido orgánico débil (es decir, ácido acético). Un baño de gelatina puede comprender gelatina al 0,5-5,0% (p/v) en un disolvente que sea ácido orgánico débil (es decir, ácido acético) o en un disolvente acuoso. Los métodos de la invención pueden incluir una etapa adicional de recubrimiento de las micropartículas en una solución de quitosano o gelatina, opcionalmente por inmersión de las micropartículas en un baño de gelatina o quitosano.

### Breve descripción de las figuras

Fig. 1: Espectros de infrarrojo de las microesferas y cápsulas de proteína de guisante.

35 Fig. 2: Imagen obtenida por microscopía óptica de las microesferas de proteína de guisante después de la encapsulación (A) y en presencia de cultivos de probióticos encapsulados (B). La barra representa 200 micrómetros.

Fig. 3: Imagen obtenida por microscopía confocal de las microesferas de proteína de guisante usando tinción confocal BACLIGHT. La fluorescencia verde indica probióticos vivos y la fluorescencia roja indica probióticos muertos. En la Figura A se ilustra la topografía de las microesferas; B y C ilustran el gran área superficial de la membrana de las microesferas.

40 Fig. 4: Imagen de microscopía de fuerza atómica de la superficie de una microcápsula (A) y microesfera (B) de proteína.

Fig. 5: Ilustración con microscopio óptico de la administración por vía gastrointestinal in vitro de microesferas de proteína de guisante. Las imágenes ilustran (A) la incubación en el estómago después de 30 minutos a un pH de 1,6; (B) la incubación en el estómago después de 180 minutos a un pH de 1,6; la Figura C ilustra la digestión de las microesferas después de 5 minutos de incubación intestinal (a un pH de 7,2).

Fig. 6: Resistencia a la tracción de las microesferas de proteína de guisante durante la incubación en el estómago in vitro.

Fig. 7: Visualización de la disolución progresiva de las microesferas de proteína de guisante durante la incubación gastrointestinal ex vivo. La liberación de proteínas/péptidos de microcápsulas (B) después de 30 minutos de incubación intestinal se determinó mediante HPLC de exclusión molecular. La curva de calibración de los patrones (♦) de proteínas/péptidos indicaba los pesos moleculares del péptido habitual que se espera encontrar en muestras intestinales.

Fig. 8: Eficacia de la encapsulación de una cepa bacteriana en microesferas de aislados de proteína de guisante comercial al 8% (p/v). La suspensión de proteína de guisante representa células libres en presencia del aislado de proteína de guisante comercial. Las microesferas de proteína de guisante representan las cantidades de células viables detectadas después de la microencapsulación de la suspensión de proteína de guisante y el lavado (en agua). La Figura B ilustra la comparación de UFC/g de una matriz preencapsulante/mezcla de bacterias (naranja) y las microesferas bacterianas posteriores (gris) con una elevada capacidad celular.

Fig. 9: Supervivencia de células bacterianas libres en el producto/prototipo final, células bacterianas encapsuladas en microesferas de aislados de proteína de guisante comercial al 8% (p/v) y células bacterianas libres en una suspensión de aislado de proteína de guisante comercial al 8% (p/v). Las barras grises ilustran la concentración celular en el prototipo/producto final. Cada prototipo se añadió por separado al agua mantenida a ~85 °C y se mantuvo durante 90 segundos antes de enfriar sobre hielo. La viabilidad celular se analizó mediante el método de recuento en placa.

Fig. 10: Ilustra la presencia de cápsulas de proteína de guisante in vivo en el estómago de seres humanos.

Fig. 11: Liberación de péptidos y aminoácidos libres en el yeyuno durante el tránsito gastrointestinal in vivo de la microcápsula de proteína de guisante.

Fig. 12: Ilustra la presencia de proteína inalterada (línea azul) y la liberación de péptidos (línea negra) determinadas por HPLC de exclusión molecular en el yeyuno y el íleon de seres humanos. Las trazas de péptidos detectadas en la digestión intestinal a los 10 min están representadas por la línea base roja.

Fig. 13: Microesferas fabricadas por el método de encapsulación con una solución de proteína de guisante desnaturalizada que no se dejó reposar antes de la etapa de desnaturalización térmica.

## Descripción detallada de la invención

### Definiciones

Por "proteína de guisante" se debe entender una fuente de proteína de guisante, por ejemplo, proteína de guisante total. Preferiblemente, la proteína de guisante es un aislado de proteína de guisante (APG), concentrado de proteína de guisante (CPG) o una combinación de cualquiera de estos. En una realización, la proteína de guisante tiene una pureza de al menos 70% (es decir, al menos 90% en peso de la fuente de proteína de guisante es proteína de guisante). En una realización, la proteína de guisante tiene una pureza de al menos 80%. En una realización, la proteína de guisante tiene una pureza de al menos 90%. Entre los ejemplos de proteína de guisante que tienen una elevada pureza se incluyen materiales con un bajo contenido en cenizas.

"Parcialmente solubilizada" significa que la proteína de guisante se solubiliza sustancialmente, pero no completamente, en un disolvente adecuado. En general, se solubiliza hasta el 60% o el 70% de la proteína de guisante. La solubilización parcial por lo general se logra por medios químicos (es decir, solubilización en medio alcalino). Se requiere una etapa de reposo para lograr una solubilización más completa, por ejemplo, la solubilización del 90% o más de la proteína de guisante.

"Disolvente alcalino" significa una solución acuosa de una base adecuada, por ejemplo, NaOH o KOH. Preferiblemente, el disolvente alcalino comprende una solución acuosa de una base con una concentración de 0,05-0,2 M, más preferiblemente, de 0,05-0,15 M. Idealmente, el disolvente alcalino comprende una solución acuosa de una base con una concentración de 0,075-0,125 M. Normalmente, el disolvente alcalino es una solución acuosa de NaOH, por ejemplo, NaOH 0,05-0,2 M. Preferiblemente, el disolvente alcalino comprende una solución acuosa de NaOH o KOH 0,05-0,2 M, más preferiblemente NaOH o KOH 0,05-0,15 M. Idealmente, el disolvente alcalino comprende una solución acuosa de NaOH o KOH 0,075-0,125 M.

"pH de al menos 10" significa un pH superior a 10, normalmente un pH de 10-13 ó 10-12. Idealmente, el pH de la solución de proteína de guisante es de 10,5 a 11.

"Sonicación" significa la aplicación de energía sonora para solubilizar e hidratar parcialmente la proteína de guisante y es una alternativa a la solubilización en un disolvente alcalino que no está abarcada por las reivindicaciones. El proceso por lo general conlleva preparar una dispersión/solución de proteína de guisante, y a continuación aplicar energía sonora, por lo general, sonido de frecuencias ultrasónicas, a la dispersión/solución durante un período de tiempo suficiente para solubilizar e hidratar la proteína de guisante. Los sonicadores están disponibles en el mercado y se pueden adquirir en Qsonica LLC y SinapTec.

"Solución de proteína de guisante" significa una composición de proteína de guisante líquida que comprende proteína de guisante soluble y opcionalmente proteína de guisante insoluble. Los métodos de la invención proporcionan soluciones de proteína de guisante que comprenden elevadas concentraciones de proteína de guisante soluble, normalmente superior al 90%, o al 95% (por ejemplo, 95-98% de proteína de guisante soluble). Cuando la proteína de guisante se mezcla con un disolvente alcalino, o se somete a sonicación, la cantidad de proteína de guisante soluble aumenta gradualmente durante la etapa de reposo hasta que se solubilizan las elevadas concentraciones de proteína de guisante, momento en el que la solución de proteína de guisante se somete a desnaturalización térmica. Esto

produce una solución de proteína de guisante desnaturalizada que tiene concentraciones muy elevadas de proteína de guisante desnaturalizada presente en forma de agregados de proteína de guisante desnaturalizada soluble.

5 Los términos "soluble" o "solubilizado/a", cuando se aplica a la proteína de guisante (o a la proteína de guisante desnaturalizada), significa que la proteína de guisante está presente en forma de agregado de proteína de guisante soluble. Normalmente, los términos significan que los agregados solubles no precipitan en solución tras la centrifugación a  $10.000 \times g$  durante 30 minutos a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ .

10 "Reposo de la solución de proteína de guisante" significa dejar reposar la solución de proteína de guisante durante un período de tiempo para permitir que la proteína de guisante se solubilice en el disolvente alcalino. En general, la solución de proteína de guisante se deja reposar durante al menos 20, 25, 30, 35, 40 ó 45 minutos. Normalmente, la solución de proteína de guisante se deja reposar a temperatura ambiente. Normalmente, la solución de proteína de guisante se deja reposar durante un período de tiempo hasta que se haya solubilizado al menos el 90% de la proteína de guisante. Antes de reposar, la solución de proteína de guisante tiende a ser turbia y opaca y contiene sedimento, pero después de un período de reposo, la turbidez se disipa a medida que aumenta la cantidad de proteína de guisante solubilizada. Por ejemplo, la etapa de reposo puede aumentar el porcentaje de proteína solubilizada del 60% al 90% o más.

20 "Condiciones suficientes para la desnaturalización térmica de la proteína de guisante sin causar la gelificación de la solución de proteína de guisante" significa un tratamiento térmico y temporal que desnaturaliza al menos el 90%, 95% ó 99% de la proteína de guisante presente en la solución mientras se mantiene la solución en una forma adecuada para la extrusión (es decir, fluye con facilidad y posee una viscosidad adecuada). La temperatura y los tiempos empleados pueden variar en función de la concentración de la solución de proteína de guisante. Por ejemplo, cuando se usa una solución de proteína de guisante al 8% (p/v), la solución puede tratarse a una temperatura de  $80\text{-}90 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 20-30 minutos (o preferiblemente a  $85 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 25 minutos). Sin embargo, se apreciará que también se pueden emplear temperaturas más altas y tiempos más cortos.

25 "Enfriar rápidamente la solución de proteína de guisante desnaturalizada" significa enfriar activamente la solución para acelerar el enfriamiento en comparación con simplemente dejar que la solución se enfríe a temperatura ambiente, lo que, según ha descubierto el solicitante, hace que la solución gelifique. Se puede lograr enfriar rápidamente colocando la solución en un refrigerador o congelador, o sobre hielo desmenuzado, hasta que la temperatura de la solución se haya reducido como mínimo hasta la temperatura ambiente.

30 "Al menos 90% (p/p) de la proteína de guisante en la solución de proteína de guisante desnaturalizada es soluble" significa que al menos el 90% en peso de la proteína de guisante total en la solución está en forma solubilizada. Preferiblemente, al menos 95% (p/p) e, idealmente, del 95% al 98% de la proteína de guisante está solubilizada. El método para determinar la solubilidad es el método del matraz agitado que se describe más adelante.

35 "Tratada para eliminar la materia soluble" significa una separación o etapa de clarificación para eliminar la materia soluble, tal como la proteína de guisante insoluble, de la solución de proteína de guisante. En las realizaciones específicas descritas en la presente memoria, se emplea la centrifugación ( $10.000 \times g$  durante 30 minutos a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ), pero otros métodos serán evidentes para los expertos, tales como, por ejemplo, filtración o similares.

"Solución de proteína de guisante desnaturalizada" significa una solución de proteína de guisante en la que se desnaturaliza al menos el 90%, 95% ó 99% de la proteína total de guisante. Más adelante se proporciona un método para determinar el porcentaje de proteína de guisante desnaturalizada en una solución de proteína de guisante.

40 "Tratamiento de una solución de proteína de guisante desnaturalizada para formar microgotitas" normalmente significa pasar la solución a través de un orificio pequeño de manera que la solución se divide en gotitas de tamaño micrométrico. Preferiblemente, la solución se extruye a través de un orificio. Varios métodos para la formación de gotitas, por ejemplo, la granulación y la atomización (es decir, secado por atomización), serán evidentes para los expertos en la técnica. Un método preferido para producir las microesferas es una técnica de boquilla vibratoria, en la cual la suspensión es atomizada (extruida) a través de una boquilla y se induce la disgregación laminar del chorro atomizado al aplicar una frecuencia sinusoidal con una amplitud definida al aerosol procedente de la boquilla. Ejemplos de máquinas con boquillas vibratorias son Encapsulator (Inotech, Suiza) y una máquina producida por Nisco Engineering AG, o una versión equivalente a gran escala, tales como las producidas por Brace GmbH. Normalmente, la boquilla de atomización tiene una abertura de entre 50 y 600 micrómetros, preferiblemente de entre 50 y 200 micrómetros, de manera conveniente de 50-200 micrómetros, normalmente de 50-150 micrómetros, e idealmente de aproximadamente 80-150 micrómetros. De manera conveniente, la frecuencia operativa de la boquilla vibratoria es de 900 a 3000 Hz. Por lo general, el potencial electrostático entre la boquilla y el baño de acidificación es de 0,85 a 1,3 V. De manera conveniente, la amplitud es de 4,7 kV a 7 kV. Normalmente, la distancia de caída (desde la boquilla al baño de acidificación) es inferior a 50 cm, preferiblemente inferior a 40 cm, de manera conveniente entre 20 y 40 cm, preferiblemente entre 25 y 35 cm, e idealmente de aproximadamente 30 cm. El caudal de suspensión (que pasa a través de la boquilla) es normalmente de 3,0 y 10 mL/min; el caudal ideal depende del tamaño de la boquilla utilizada en el proceso.

“Gelificación inmediata de las gotitas en un baño ácido de gelificación para formar microesferas” significa que las gotitas gelifican instantáneamente al ser sumergidas en el baño ácido. Esto es importante, ya que garantiza que las gotitas tengan una forma esférica y una distribución homogénea de tamaños. La gelificación instantánea se logra al emplear un baño ácido que tenga un pH inferior al pI de la proteína de guisante, por ejemplo, un pH de 3,8 a 4,2.

5 “Baño ácido de gelificación” significa un baño que tiene un pH inferior al pI de la proteína de guisante y que puede gelificar instantáneamente las gotitas. Normalmente, el baño ácido de gelificación tiene un pH inferior a 4,3, por ejemplo, 3,5 a 4,2, 3,7 a 4,2, ó 4,0 a 4,2. El baño ácido de gelificación por lo general se forma a partir de un ácido orgánico. Idealmente, el ácido es ácido cítrico. Normalmente, el baño ácido de gelificación tiene una concentración de ácido de 0,1 M a 1,0 M, preferiblemente de 0,3 M a 0,7 M, y más preferiblemente de 0,4 M a 0,6 M. Normalmente, el  
10 baño ácido de gelificación tiene una concentración de ácido cítrico de 0,1 M a 1,0 M, preferiblemente de 0,3 M a 0,7 M, y más preferiblemente de 0,4 M a 0,6 M. Preferiblemente, el baño ácido de gelificación comprende ácido cítrico 0,4-0,6 M y tiene un pH inferior a 4,3, normalmente de 4,0 a 4,2.

15 Por “micropartículas” se debe entender partículas por lo general esféricas que comprenden un polímero gelificado, es decir, proteína de guisante desnaturalizada, y que tienen un diámetro promedio de 50 a 500 micrómetros, determinado mediante el método de microscopía óptica que se detalla más adelante. Preferiblemente, las micropartículas tienen un diámetro promedio de 50-200 micrómetros, determinado mediante el método de microscopía óptica que se detalla más adelante. Preferiblemente, las micropartículas tienen un diámetro promedio de 80-200 micrómetros, determinado mediante el método de microscopía óptica que se detalla más adelante. Preferiblemente, las micropartículas tienen un diámetro promedio de 80-150 micrómetros, determinado mediante el método de microscopía óptica que se detalla más adelante. Dependiendo del método de fabricación, las micropartículas pueden ser microesferas o microcápsulas.  
20

“Microesferas” significa partículas de tamaño micrométrico que por lo general son esféricas y tienen una matriz polimerizada continua, es decir, matriz de proteína de guisante desnaturalizada, y opcionalmente un agente activo dispersado por toda la matriz de proteína de guisante.

25 “Microcápsulas” significa partículas de tamaño micrométrico que por lo general son esféricas y tienen una cubierta formada por polímero gelificado, es decir, proteína de guisante desnaturalizada y un núcleo en el interior de la cubierta. El núcleo comprende, por ejemplo, proteína de guisante nativa.

30 “Agente activo” significa cualquier componente adecuado para la administración al intestino delgado o el íleon de un mamífero, pero normalmente significa un componente que es sensible a una condición externa, por ejemplo, el calor, el pH, la presión, condiciones químicas extremas o las enzimas. Por lo tanto, es posible que el componente activo sea sensible al pH, a las enzimas (es decir, a las proteasas), a la presión elevada, al cizallamiento elevado y a la tensión térmica durante el almacenamiento. En una realización particularmente preferida de la invención, el componente activo es una célula, normalmente una célula bacteriana, e idealmente una célula probiótica. Estas células son sensibles a pHs bajos, tales como el del estómago, y, por lo tanto, necesitan ser protegidas del medio gástrico y las sales biliares. Las bacterias probióticas, y de hecho otros tipos de células, también son sensibles al cizallamiento elevado o a la presión elevada, tales como los que se aplican en métodos convencionales para generar esferas poliméricas micrométricas. Otros tipos de componentes activos que pueden ser encapsulados en las microesferas de la invención incluyen micronutrientes, vitaminas, minerales, enzimas, bacterias iniciadoras, extractos celulares, proteínas y polipéptidos (nativos o desnaturalizados), azúcares y derivados de azúcares, ácidos nucleicos y constructos de ácidos nucleicos, agentes farmacéuticamente activos, colorantes y ligandos para imágenes, anticuerpos y fragmentos de anticuerpos, compuestos fitoquímicos y similares.  
35  
40

“Solución de agente activo” significa un agente activo contenido en un vehículo líquido adecuado en forma de solución, dispersión o suspensión.

45 “Montaje de la boquilla” significa un aparato que comprende al menos una boquilla que está configurada para extruir la solución de proteína de guisante a través de al menos una boquilla. En una realización, el montaje de la boquilla comprende una única boquilla, de manera que una mezcla de solución de proteína de guisante y agente activo se puede extruir a través de la única boquilla para formar gotitas que forman microesferas al gelificar. En otra realización, el montaje de la boquilla comprende una boquilla exterior dispuesta concéntricamente alrededor de una boquilla interior, y en donde la solución de proteína de guisante se extruye a través de la boquilla exterior y una solución/suspensión/dispersión de agente activo se extruye a través de la boquilla interior para formar gotitas que al gelificar forman microencapsulados con una cubierta de proteína de guisante gelificada y un núcleo que contiene el agente activo.  
50

“Curado en el baño ácido de gelificación” significa que se deja que las microesferas permanezcan en el baño de gelificación durante un período de tiempo suficiente para curar (endurecer) las microesferas. El período de tiempo varía dependiendo de las microesferas, pero, normalmente, se emplea un tiempo de curado de al menos 30 minutos.

55

### Ejemplo 1

Formación de una solución de proteína de guisante desnaturalizada muy solubilizada (solubilización en medio alcalino)

Preparar una solución de proteína de guisante en solución acuosa de NaOH 0,1 M hasta una concentración del 8% en p/v (es decir, 8 g/100 mL).

5 Comprobar que el pH se encuentra en el intervalo de 10,5 a 11,0.

Almacenar la solución durante 45 min a temperatura ambiente hasta que la proteína se haya solubilizado por completo.

Ajustar a un pH de 10 con HCl o NaOH/KOH según sea necesario.

Someter la solución a tratamiento térmico a una temperatura de 85 °C y mantener esa temperatura durante 25 min.

Después de calentar, enfriar inmediatamente sobre hielo desmenuzado durante 30-45 minutos.

10 Centrifugar la solución enfriada a 10.000 × g durante 30 minutos a 4 °C.

### Ejemplo 2. Comparativo a título ilustrativo

Formación de una solución de proteína de guisante desnaturalizada muy solubilizada (solubilización por sonicación (no está abarcada por las reivindicaciones))

Sonicador

15 Sonicador Hielscher 1000hd, actualmente ubicado cerca de BFE en Teagasc Moorepark.

Procedimiento

- Hidratar la proteína en H<sub>2</sub>O durante un mínimo de 1 h antes del proceso.
- Ajustar al pH requerido (p. ej., 7).
- 20 • El volumen óptimo para este sistema es 200-600 mL de muestra. No se debe llenar en exceso el vaso de precipitados de la muestra para permitir la introducción de la sonda del sonicador.
- Colocar el vaso de precipitados de la muestra sobre hielo antes del procedimiento.
- En la sala con el sonicador, mover el dispositivo a la esquina derecha de la sala y conectar el enchufe negro de tres patas a la parte posterior del dispositivo.
- 25 • Colocar la muestra en el sonicador y ajustar la altura (se pueden usar libros, cajas de guantes, etc.) de manera que ¾ de la sonda estén introducidos en la muestra.
- Tras asegurarse de que se haya instalado la protección correcta de los oídos, encender el dispositivo con el interruptor que hay en la parte superior derecha de la máquina.
- No es necesario cerrar la puerta del sonicador para un funcionamiento satisfactorio.
- 30 • La potencia del dispositivo se puede ajustar con una rueda situada en el panel de control (el funcionamiento actual utiliza la potencia máxima durante 10 min).
- Sonicar a la potencia requerida durante el tiempo requerido.
- Retirar la muestra, se recomienda registrar la temperatura de la muestra tras el procedimiento.
- 35 • El proceso puede dar lugar a la formación de fragmentos en la muestra. Si es necesario, se puede utilizar un equipo Ultra Turrax para disgregar cualquier fragmento que pudiera aparecer (particularmente si se va a utilizar la muestra para la encapsulación/secado por atomización) (véase el procedimiento del Ultra Turrax en el Apéndice 2).
  - El tiempo y las RPM dependen de la muestra.

### Ejemplo 3

Producción de microesferas (encapsulación)

40 FINALIDAD: Administración de componentes bioactivos al íleon proximal para la protección térmica frente a las condiciones ambientales del procesamiento y la administración gástrica.

La solución de proteína de guisante desnaturalizada preparada según los Ejemplos 1 ó 2 se puede combinar con componentes activos, es decir, probióticos, colores, etc.

La dispersión de la solución de proteína de guisante desnaturalizada + componente activo se extruye a través de un orificio para que caiga libremente a un baño de polimerización.

- 5 El baño de polimerización se compone de ácido cítrico (0,5 M), NaCl (0,3 M), (0,4 M) y polisorbato 80 (0,01%).

Optimizar la amplitud y ajustar la magnitud de la carga positiva para generar una corriente constante de microgotitas que caen libremente. El baño de polimerización se atempera a 37 °C con una distancia de caída libre de 16 cm desde el orificio y una velocidad de agitación de 90 rpm, a fin de permitir la polimerización instantánea de la solución de proteína de guisante desnaturalizada y el componente activo formando microesferas.

- 10 Se deja que las microesferas se curen en la solución amortiguadora de polimerización a una velocidad de agitación baja durante 2 horas a temperatura ambiente.

#### **Ejemplo 4**

Producción de microcápsulas

- 15 FINALIDAD: Administración de proteína de guisante nativa al íleon proximal para la liberación estimuladora de la hormona de la saciedad GLP-1 y para la supresión del apetito.

Se prepararon microcápsulas monodispersas y mononucleares mediante la técnica de disgregación del chorro laminar por coextrusión. El encapsulador estaba equipado con una de dos boquillas concéntricas de distintos tamaños (interna y externa).

- 20 Se preparó una solución de proteína de guisante desnaturalizada (7% en p/v) de acuerdo con el Ejemplo 1 ó 2. La solución de proteína de guisante desnaturalizada se suministra a la boquilla externa usando un sistema de regulación con presión de aire que permite generar caudales de 1-3 L/min a una presión de descarga máxima de 0,5-0,8 bares.

El caudal deseado se fijó mediante una válvula de reducción de la presión. La fase interna (proteína de guisante nativa, no desnaturalizada) se suministró mediante una bomba de jeringa de precisión conectada a la boquilla interna para suministrar la fase interna a caudales de entre 5 y 15 L/min.

- 25 Si se agregan componentes bioactivos, se incorporarán a la fase interna.

Las microcápsulas esféricas se obtuvieron mediante la aplicación de una frecuencia vibracional fija, con una amplitud definida, al chorro de líquido coextruido que consistía en proteína de guisante desnaturalizada y proteína nativa del núcleo.

- 30 El material en la boquilla interna y externa se calienta a 40 °C con el fin de mejorar la capacidad de fluir en las operaciones comerciales.

El chorro concéntrico resultante se disgregó formando microcápsulas que cayeron a un baño de gelificación con agitación magnética situado 20 cm por debajo de la boquilla.

El baño de gelificación consistía en ácido cítrico 36 g/L, MOPS 10 mM, con un pH de 4,0.

Se añade Tween 80 (0,1-0,2% en v/v) para reducir la tensión superficial de la solución de gelificación.

- 35 Para evitar la coalescencia de las microcápsulas durante la disgregación del chorro y/o al entrar en el baño de gelificación, se indujo una elevada carga negativa en su superficie usando un sistema de voltaje electrostático que aplicaba un potencial eléctrico de 0-2,15 kV entre la boquilla y un electrodo, colocado directamente debajo de la boquilla.

- 40 Cuando las microcápsulas caen a través del electrodo, se desvían de su posición vertical, lo que da lugar a que su impacto ocurra sobre una superficie mayor en la solución de gelificación.

Se dejó que las microcápsulas se endurecieran durante al menos 30 minutos para garantizar una gelificación completa y a continuación, se lavaron y filtraron usando una malla porosa para eliminar los componentes que no hubieran reaccionado.

#### **Ejemplo 5 (comparativo)**

- 45 Producción de microesferas (encapsulación)

Las microesferas se producen según el Ejemplo 3, pero usando una solución de proteína de guisante desnaturalizada que no se dejó reposar antes de la desnaturalización térmica. Las microesferas resultantes se muestran en la Fig. 13.

Caracterización de las microesferas del Ejemplo 3 y las microcápsulas de los Ejemplos 4 y 2

#### Análisis de la distribución del tamaño

5 Se validó la distribución del tamaño medio de las cápsulas y las microesferas de proteína de guisante para garantizar la reproducibilidad del proceso de producción. Los D (v, 0,9) (tamaño en el que el volumen acumulado alcanza el 90% del volumen total) de los lotes encapsulados se determinaron con un difractor láser en un intervalo de 0,2-200  $\mu\text{m}$ . Para el análisis del tamaño de partícula, los lotes se resuspendieron en agua Milli-Q y la distribución del tamaño se calculó a partir de los datos de distribución de la intensidad de la luz dispersada.

#### Contenido de proteína

10 El contenido de proteína (nitrógeno  $\times$  6,25) se determinó mediante métodos estándar (AOAC, 1990). Los aislados de proteína (200 mg) se suspendieron en 20 mL de agua desionizada y el pH de las suspensiones se ajustó a un valor entre 2,0 y 9,0 con soluciones de NaOH o HCl 0,1 N. Estas suspensiones se agitaron magnéticamente durante 1 h; se comprobó y ajustó el pH si era necesario, y luego se centrifugó a 8.000  $\times$  g durante 10 min. El contenido de proteína (N  $\times$  6,25) del sobrenadante se calculó mediante estimación del contenido de nitrógeno (método de Kjeldahl).

#### Potencial zeta ( $\zeta$ ) e hidrofobia superficial ( $H_0$ )

15 Se determinaron el potencial zeta ( $\zeta$ ) y la hidrofobia superficial ( $H_0$ ) de las microesferas y microcápsulas de proteína de guisante. El potencial zeta ( $\zeta$ ) de los aislados de proteína se midió con un equipo Zetasizer Nano ZS (Malvern Instrument Ltd., Reino Unido). Las microesferas y microcápsulas de proteína recién preparadas se suspendieron en agua desionizada antes del análisis. La hidrofobia superficial ( $H_0$ ) de las microesferas/microcápsulas de proteína de guisante se estimó con una sonda hidrófoba de ANS, siguiendo el método de Kato y Nakai, 1980 (Hydrophobicity determined by a fluorescence probe method and its correlation with surface properties of proteins, *Biochim Biophys Acta*. 1980 Jul 24;624(1):13-20). Las dispersiones para encapsulación se incubaron en la oscuridad durante 15 min y se determinó la intensidad de la fluorescencia (IF) a longitudes de onda de excitación y emisión de 390 nm y 470 nm, respectivamente, mediante espectrometría de fotoluminiscencia/fluorescencia. También se determinó la IF del blanco de ANS y de las soluciones diluidas de proteína sin ANS, y se sustrajo de la IF de las dispersiones de proteína encapsulada con ANS. La pendiente inicial de la representación gráfica de la IF corregida frente a la concentración de proteína se calculó mediante análisis de regresión lineal y se utilizó como índice de proteína  $H_0$ . Los resultados se muestran en la Tabla 1 a continuación:

Tabla 1

Formato	Contenido de proteína (%)	Potencial zeta $\zeta$ (mV)	Hidrofobia superficial ( $H_0$ )
Microesferas	94,35 $\pm$ 0,34%	-48,32 $\pm$ 2,31 mV	587 $\pm$ 21,23
Microcápsulas	94,08 $\pm$ 0,21%	-41,32 $\pm$ 1,92 mV	522 $\pm$ 19,62

#### 30 FTIR

Se registraron espectros de infrarrojo de las microesferas y microcápsulas de proteína de guisante en un espectrómetro de FTIR (Vertex 70, Bruker Optics Inc., Alemania) equipado con una celda de reflectancia total atenuada (ATR) (PIKE Technology Inc., EE. UU.). Las microcápsulas/microesferas de proteína se almacenaron en desecadores sobre  $\text{P}_2\text{O}_5$  durante más de dos semanas para eliminar la humedad. Los aislados exentos de humedad se colocaron sobre el cristal de ATR y se presionaron para garantizar un buen contacto. El espectrómetro se purgó continuamente con aire seco. Los espectros se adquirieron en el intervalo de 4000-600  $\text{cm}^{-1}$  (promedio de 120 espectros a una resolución de 4  $\text{cm}^{-1}$ ) tomando como referencia el espectro de una celda vacía. Los espectros se sometieron a una autodesconvolución de Fourier (FSD), análisis de la segunda derivada (SD) y procedimientos de ajuste de la curva para localizar picos superpuestos en la región de amida-I (1700-1600  $\text{cm}^{-1}$ ). La Figura 4 de más adelante ilustra el contraste en la estructura secundaria de las microesferas y microcápsulas fabricadas a partir de proteína de guisante. El gráfico también ilustra la diferencia entre las microesferas de proteína de leche y las que se componen de proteína de guisante. Por lo tanto, la estructura secundaria es diferente y la polimerización del material también es diferente durante la encapsulación.

#### Microscopía

45 Además de la microscopía óptica, se realizaron análisis adicionales de las imágenes usando un microscopio láser confocal de barrido (CSLM) Leica TCS SP5 a fin de evaluar la morfología de las micropartículas. La Figura 5 ilustra la distribución homogénea del tamaño de las microcápsulas de proteína de guisante (diámetro promedio de 150 micrómetros). La Figura 5b muestra además la encapsulación de los probióticos en una microesfera de proteína de guisante con una distribución celular preferible por toda la microesfera.

50

También se utilizó análisis confocal para demostrar la distribución uniforme del material bioactivo, es decir, *Lactobacillus rhamnosus GG*) en el interior de una microcápsula después del proceso de producción. La Figura 6 demuestra que el proceso de microencapsulación no es perjudicial para la supervivencia de los probióticos.

5 El análisis confocal se llevó a cabo mediante iluminación con un láser de argón (excitación con láser de 488 nm) y las imágenes de color rojo-verde-azul (24 bits), 512 por 512 píxeles, se adquirieron utilizando un factor de zoom de 2,0, con una resolución final de 0,2  $\mu\text{m}/\text{pixel}$ .

10 También se utilizaron microscopía de fuerza atómica (AFM; Asylum Research MFP-3D-AFM) y microscopía electrónica de barrido (SEM) para investigar la importancia y la magnitud de las interacciones electrostáticas entre los probióticos y la proteína de guisante durante la encapsulación. La Figura 7 ilustra la topografía de la superficie de una microesfera de proteína de guisante (Fig. 7A) y una microcápsula de proteína de guisante (Fig. 7B). Resulta obvio que la superficie de una microesfera tiene más grietas y posibles poros que la superficie de una microcápsula. Por lo tanto, la cápsula de proteína de guisante tendrá potencialmente una gran capacidad para tolerar los efectos de difusión y transferencia de masa, es decir, la absorción de agua. Las microcápsulas también ilustran la capacidad de proteger contra la oxidación el aceite de krill y los ácidos grasos (DHA y ARA).

15 Método para determinar la solubilidad de la solución de proteína de guisante

Una técnica estándar para determinar la solubilidad termodinámica del compuesto en medio acuoso es el método del matraz agitado. Los estudios de solubilidad de la proteína de guisante se determinaron equilibrando una cantidad en exceso de proteína de guisante en soluciones amortiguadoras con un pH de 1,2, 4,5, 6,8 y 7,5 y agua purificada. Los ensayos se realizaron en matraces de plástico con una capacidad de 50 mL. A cada matraz se añadieron 10 mL de medio/agua y la cantidad respectiva de proteína de guisante por separado. La cantidad fue suficiente para saturar cada medio, que se caracterizó por la sedimentación de sustancia sin solubilizar. Se usó una incubadora con agitación para mantener las muestras a 37 °C durante el ensayo con agitación a 150 rpm durante 72 horas (hasta alcanzar el equilibrio). Después de este período de tiempo, las muestras se filtraron inmediatamente (0,45  $\mu\text{m}$ ) y se diluyeron en un matraz aforado con los medios correspondientes. Para la cuantificación de la proteína de guisante se utilizó un espectrofotómetro UV-Vis (Varian) a una longitud de onda de absorbancia de 214 nm y 280 nm para cada medio. Los valores de solubilidad se calcularon con curvas/rectas de calibración predeterminadas para fuentes de proteína soluble.

30 Con los resultados de solubilidad se calculó la relación dosis:solubilidad, que se obtiene dividiendo la dosis comercialmente aceptable de proteína de guisante (en miligramos) entre la solubilidad (en miligramos por mililitro) obtenida en los ensayos. A continuación, los valores de la relación dosis:solubilidad se comparan con los criterios establecidos por las directrices del fabricante del ingrediente para verificar si la proteína es muy soluble o no.

Método para determinar el porcentaje de proteína de guisante desnaturalizada

La evaluación de la desnaturalización de la proteína de guisante conlleva tres etapas analíticas esenciales:

- Determinación de la concentración de proteína de guisante
- 35 - Desarrollo de la ecuación de la reacción
- Electroforesis, determinación de la turbidez y aglomerados

i) Determinación de la concentración de proteína de guisante

40 La concentración de proteína de guisante se determinó por HPLC en fase inversa con una columna Source™ 5RPC (Amersham Biosciences Ltd, Reino Unido). El sistema de HPLC consistía en un módulo de separación Waters 2695 con un detector de absorbancia de doble longitud de onda Waters 2487.

ii) Preparación de la ecuación de la reacción

La cinética de la desnaturalización de la proteína de guisante se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$dC/dt = -kC^n$$

45 donde k es la velocidad de la reacción, n es el orden de reacción y C es la concentración de proteína de guisante nativa. Esta ecuación puede integrarse para obtener

$$(C_t/C_0)^{1-n} = 1 + (n-1)kt \quad (\text{para } n > 1)$$

donde  $C_t$  es la concentración de proteína de guisante nativa en el tiempo t,  $C_0$  es la concentración inicial de proteína de guisante.

Una reorganización adicional da,

50 
$$C_t/C_0 = [1 + (n-1)kt]^{1/1-n}$$

Se tomó el logaritmo neperiano de esta ecuación,

$$\ln(C_t/C_0) = [1/(1-n)]\ln[1+(n-1)kt] \quad (\text{Ecuación 1})$$

Los datos registrados del decaimiento como estos igualan los datos por unidad de tiempo y reducen el error al resolver las ecuaciones. Los órdenes y las velocidades de reacción se determinaron ajustando los datos experimentales a la Ecuación 1. Se incluyeron todos los puntos experimentales en el ajuste de la curva/recta, lo que es razonable si se tiene en cuenta el tiempo de calentamiento rápido de la solución de proteína. La introducción de un tiempo de retardo a los datos no alteró significativamente los resultados obtenidos. Los datos también se ajustaron a la ecuación de disminución de la concentración según una cinética de primer orden,

$$\ln(C_t/C_0) = -kt \quad (\text{Ecuación 2})$$

para descartar la posibilidad de una cinética de primer orden.

### iii) Análisis por HPLC

Los agregados unidos por puentes disulfuro se estudiaron mediante cromatografía de exclusión molecular de alta presión. Los agregados formados durante la etapa de calentamiento se trataron con una solución amortiguadora compuesta por Bis-tris 20 mM (pH de 7,0), SDS al 5% y yodoacetamida (IAA) 50 mM. Los agregados tratados se agitaron durante la noche a temperatura ambiente y se filtraron a través de un filtro de jeringa con un tamaño de poro de 0,45 µm antes del análisis. Para la separación se utilizó un sistema de cromatografía AKTA Purifier (Amersham Bioscience UK Ltd) con columnas TSK G2000 y TSK G3000 (TosoHaas, Montgomeryville, PA, EE. UU.) en serie. El eluyente fue una solución amortiguadora de fosfato de sodio 20 mM con un pH de 7,0 que contenía SDS al 1%. Se utilizó un colorante, dextrano azul 2000, para determinar el volumen muerto de las columnas. La determinación de grupos amino libres (NH<sub>2</sub>) se realizó mediante el método del ácido 2,4,6-trinitrobenzeno-1-sulfónico (TNBS) de Adler-Nissen, 1979 (Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid, J. Adler-Nissen; J. Agric. Food Chem., 1979, 27 (6), 1256-1262).

### iv) Electroforesis, determinación de la turbidez y aglomerados

La electroforesis bidimensional se realizó de acuerdo con los métodos descritos anteriormente (Laemmli, Reino Unido. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227(5259): 680-5). La solución amortiguadora utilizada en la electroforesis no tenía β-mercaptoetanol debido al efecto disociativo que este tiene en la proteína. Esto produjo la disgregación de los agregados de proteína al reducir los puentes disulfuro intramoleculares e intermoleculares. La tira de gel se colocó encima de un gel de separación que consistía en acrilamida al 12% y un gel apilador al 4%, y ambos contenían SDS al 0,1%. La electroforesis se llevó a cabo aplicando un voltaje constante de 155 V en un sistema Mini Protean II (Bio-Rad, Alpha Technologies, Dublín, Irlanda). Los geles se tiñeron en una solución de azul brillante Coomassie R-250 al 0,5%, isopropanol al 25% y ácido acético al 10%. La turbidez de las soluciones de proteína de guisante desnaturalizada se determinó con un espectrofotómetro UV/visible Varian Cary 1 (JVA Analytical, Dublín, Irlanda) a una longitud de onda de 590 nm. Al aumentar el tamaño y/o el número de agregados, se dispersó más luz, lo que condujo a un aumento de la absorbancia aparente de las soluciones, de manera que había una correlación con la cinética de la desnaturalización. También se utilizó la dispersión dinámica de la luz (Malvern Zetamaster; modelo 7EM; Malvern Instruments Ltd, Worcester, Reino Unido) para medir los tamaños de los agregados formados durante la etapa de calentamiento de la proteína de guisante. La luz dispersada se detectó a un ángulo fijo de 90°. El promedio medio (promedio z) o el tamaño de una partícula que corresponde a la media de la distribución de la intensidad se determinó mediante el método acumulativo.

### Estabilidad/resistencia gastrointestinal ex vivo

Para determinar la eficiencia de las microesferas/microcápsulas de proteína de guisante como vehículo de administración, es importante elucidar su tolerancia a las condiciones gástricas y posterior digestión en condiciones intestinales. A fin de evaluar estas condiciones, se realizaron estudios en condiciones que simulaban las condiciones gastrointestinales con el contenido estomacal e intestinal de cerdos sacrificados (condiciones ex vivo). Las condiciones estomacales fueron un pH de 1,6 y se determinó la actividad enzimática de la pepsina (44,46 ± 2,34 µmoles de equivalentes de tirosina). El contenido intestinal se obtuvo del ileon proximal y la actividad enzimática se investigó más a fondo. La actividad de la tripsina fue de 21,39 ± 2,13 µmoles y la actividad de la quimotripsina fue de 319,43 ± 23,85 µmoles.

La Figura 8 ilustra la estabilidad en medio ácido de las microesferas/microcápsulas de proteína de guisante durante la digestión ex vivo en un estómago porcino durante 3 horas de incubación. Las microesferas/ microcápsulas permanecen robustas y después de 3 horas la superficie comienza a encogerse, posiblemente en respuesta de un gradiente ácido entre el núcleo de la microesfera y el entorno exterior. Las Figs. 8A y 8B muestran el cambio visual en el aspecto de las microesferas durante el período de incubación de 3 horas; sin embargo, la estructura permanece intacta. La Fig. 8C ilustra la digestión de estas microesferas durante la incubación intestinal en presencia de tripsina, quimotripsina y otras enzimas intestinales habituales. La resistencia de las microesferas durante la incubación en el estómago se muestra en la Figura 10 e ilustra que la resistencia de las microesferas disminuye durante la incubación en el estómago; sin embargo, la resistencia general de las microesferas sigue siendo relativamente elevada (632,32

g ± 24,32 g). La digestión intestinal de las microesferas de proteína de guisante se visualiza en la Fig. 10, donde se detecta la liberación de péptidos mediante cromatografía de permeabilidad en gel.

Encapsulación de probióticos en microesferas de proteína de guisante

5 Tras la caracterización de las microesferas en términos de su resistencia en el estómago y de la digestión intestinal, se encapsuló una cepa probiótica en microesferas de proteína de guisante y se evaluó la supervivencia celular durante i) el proceso de encapsulación (Fig. 10) y bajo tensión térmica (Fig. 11). La Fig. 10 ilustra las condiciones suaves utilizadas en la encapsulación de probióticos en proteína de guisante. La Figura 11 ilustra la supervivencia de los probióticos en presencia de estrés térmico. Esta gráfica ilustra la protección térmica proporcionada por la encapsulación (estructura de una microesfera), que es significativamente mayor que la proporcionada por la proteína de guisante por sí sola.

Datos en seres humanos obtenidos para la administración en cápsulas de proteína de guisante nativa al íleon

Diseño del estudio en seres humanos

15 Cuatro participantes fueron intubados con un catéter nasoduodenal de 145 cm. El catéter se introdujo en el estómago y la punta se colocó en el intestino mediante guía y verificación con imágenes radiológicas. Después del ayuno nocturno, se indicó a los participantes que consumieran el prototipo encapsulado en un plazo de 5 minutos (volumen de 40 mL + aprox. 120 mL de agua). Durante la infusión intraduodenal de bebida, el líquido se infundió durante 10-200 min. Después de 180-220 min, se retiró el catéter nasoduodenal y se permitió a los sujetos comer lo que quisieran. La posición del catéter se muestra a la derecha. La Tabla 2 a continuación ilustra la posición del catéter en el intestino del sujeto.

Tabla 2

Puertos del catéter	Centímetros desde la nariz	Ubicación
5	80	Duodeno
7	105	Yeyuno proximal
6	120	Yeyuno
3	130	Yeyuno
4	155	Yeyuno
2	170	Íleon
1	185*	Íleon

\*(El puerto 1 está a -5 cm, numeración en el catéter de -10 a 255)

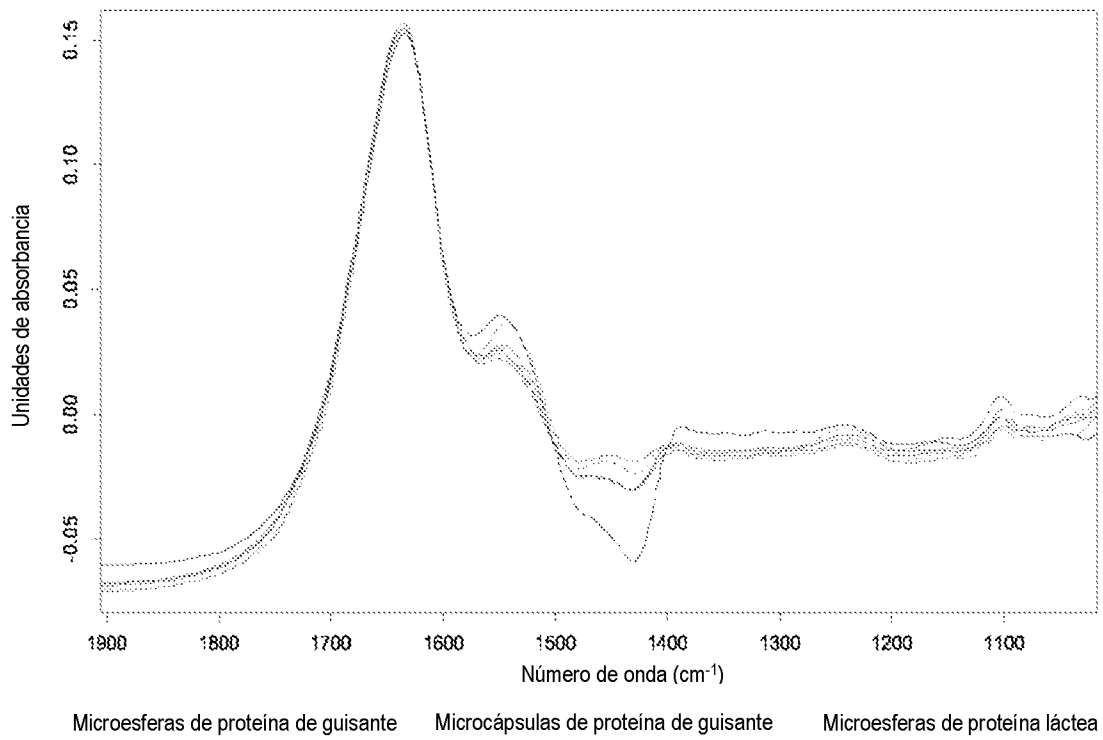
Resultados

- 10-35 minutos: Visualización de microcápsulas intactas en el duodeno.
- 10-55 minutos: Sin aumento significativo del contenido de proteína o péptido en las regiones duodenal, yeyunal o ileal.
- 35-90 minutos: Detección de disgregación de las microcápsulas en las regiones yeyunales.
- 35-120 minutos: Aumento aparente del contenido de proteína en las regiones yeyunales.
- +90 minutos: Aparición espontánea de proteína de guisante nativa en el yeyuno proximal y el íleon.
- +90 minutos: Presencia acumulada de péptidos en el yeyuno proximal y el íleon.
- +180 minutos: Ausencia de proteína de guisante nativa en el yeyuno proximal y el íleon.

**REIVINDICACIONES**

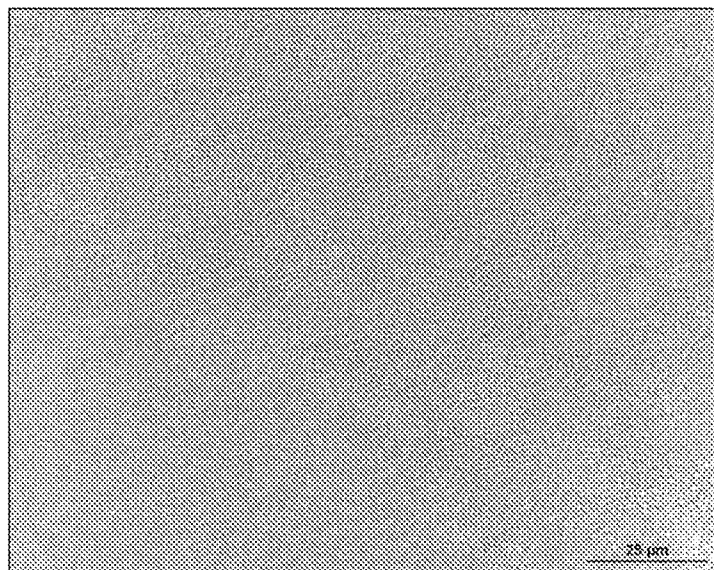
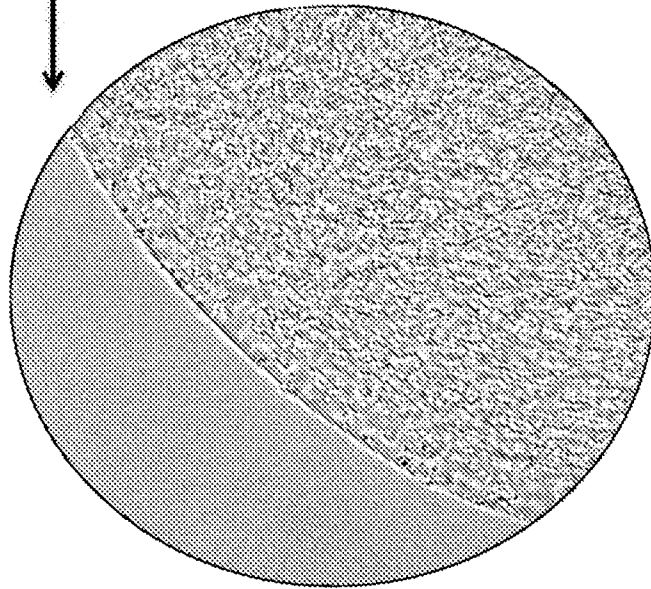
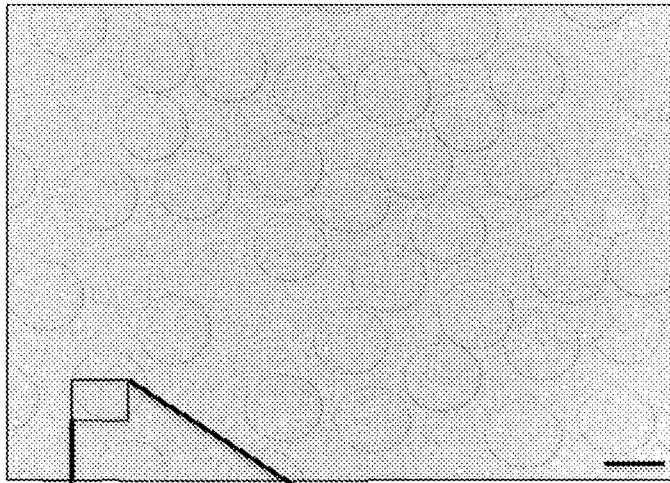
1. Un método para producir una solución de proteína de guisante desnaturalizada que comprende las etapas de:
  - solubilizar la proteína de guisante en un disolvente alcalino para proporcionar una solución de proteína de guisante al 6-9% (p/v) que tiene un pH de al menos 7;
- 5       dejar reposar la solución de proteína de guisante solubilizada durante al menos 15 minutos para solubilizar e hidratar más la proteína de guisante;
  - calentar la solución de proteína de guisante reposada en condiciones suficientes para la desnaturalización térmica de al menos el 90% de la proteína de guisante mientras la solución se mantiene en una forma adecuada para la extrusión; y
- 10       enfriar activamente la solución de proteína de guisante desnaturalizada para acelerar el enfriamiento y evitar la gelificación;
  - en donde al menos 90% en peso de la proteína de guisante en la solución de proteína de guisante desnaturalizada está presente como un agregado de proteína de guisante soluble según se determina por el método del matraz agitado que se describió anteriormente con el título "Método para determinar la solubilidad de la solución de proteína de guisante".
- 15
2. Un método según la reivindicación 1, en el cual la proteína de guisante se solubiliza en un disolvente alcalino para proporcionar una solución de proteína de guisante que tiene un pH de al menos 10.
3. Un método según la reivindicación 1 o 2, en el cual la proteína de guisante se solubiliza en un disolvente alcalino para proporcionar una solución de proteína de guisante que tiene un pH de 10 a 11.
- 20       4. Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el cual la solución de proteína de guisante desnaturalizada enfriada se centrifuga para eliminar materia insoluble.
5. Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el cual la proteína de guisante se selecciona de un aislado de proteína de guisante (APG) o un concentrado de proteína de guisante (CPG).
- 25       6. Una solución de proteína de guisante desnaturalizada producida según el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 que comprende proteína de guisante desnaturalizada al 6-9% (p/v), en la cual al menos el 90% (p/p) de la proteína de guisante en la solución de proteína de guisante desnaturalizada está presente como un agregado de proteína de guisante soluble según se determina por el método del matraz agitado que se describió anteriormente con el título "Método para determinar la solubilidad de la solución de proteína de guisante", en donde la solución tiene una viscosidad que es lo suficientemente baja como para permitir que la solución se pueda extruir formando microgotitas.
- 30
7. Una solución de proteína de guisante desnaturalizada según la reivindicación 6, en la cual al menos el 95% (p/p) de la proteína de guisante en la solución de proteína de guisante desnaturalizada está presente como agregado de proteína de guisante soluble según se determina por el método del matraz agitado que se describió anteriormente con el título "Método para determinar la solubilidad de la solución de proteína de guisante".
- 35       8. Un método para producir micropartículas que tienen una matriz de proteína de guisante desnaturalizada, método que comprende las etapas de:
  - proporcionar una solución de proteína de guisante desnaturalizada según la reivindicación 6 o la reivindicación 7;
  - tratar la solución de proteína de guisante desnaturalizada para formar microgotitas; y
- 40       reticular y quelar las microgotitas para formar micropartículas, en donde la etapa de reticulación y quelación de las microgotitas comprende la gelificación inmediata de las microgotitas en un baño ácido de gelificación que tiene un pH inferior al pI de la proteína de guisante para formar micropartículas.
9. Un método según la reivindicación 8, en el cual la etapa de tratamiento de la solución de proteína de guisante desnaturalizada para formar microgotitas comprende la etapa de extruir la solución a través de un montaje de boquilla para formar las microgotitas.
- 45
10. Un método según la reivindicación 9, en el cual un agente activo se agrega a la solución de proteína de guisante desnaturalizada antes de la etapa de formación de las microgotitas y, opcionalmente, después de la etapa de calentamiento.

11. Un método según la reivindicación 9, en el cual el montaje de la boquilla comprende una única boquilla, y en donde las micropartículas son microesferas que tienen una matriz continua de proteína de guisante desnaturalizada con agente activo distribuido por toda la matriz de proteína de guisante desnaturalizada.
- 5 12. Un método según la reivindicación 9, en el cual el montaje de la boquilla comprende una boquilla exterior dispuesta concéntricamente alrededor de una boquilla interior, en el cual la solución de proteína de guisante desnaturalizada se extruye a través de la boquilla exterior y una solución de agente activo que comprende agente activo se extruye simultáneamente a través de la boquilla interior, y en donde las micropartículas son microcápsulas que tienen una cubierta de proteína de guisante desnaturalizada y un núcleo que comprende agente activo.
- 10 13. Un método según la reivindicación 12, en el cual el montaje de la boquilla comprende un sistema de voltaje electrostático configurado para aplicar un potencial eléctrico entre la boquilla y un electrodo dispuesto debajo de la boquilla.
14. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13, que incluye una etapa adicional de recubrir las micropartículas, microesferas o microcápsulas formadas con quitosano o gelatina, en el cual el recubrimiento se realiza por inmersión de las micropartículas, microesferas o microcápsulas en un baño de quitosano o gelatina.



**FIG. 1**

**A**



**FIG. 2**

FIG. 3A

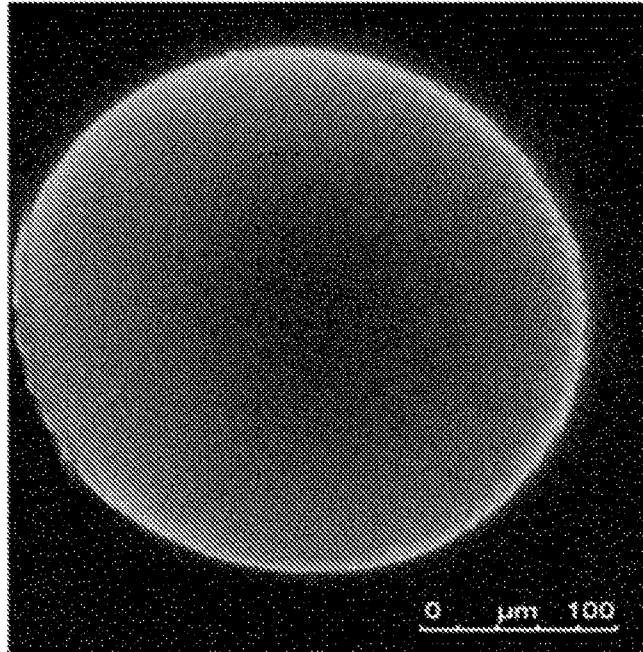


FIG. 3B

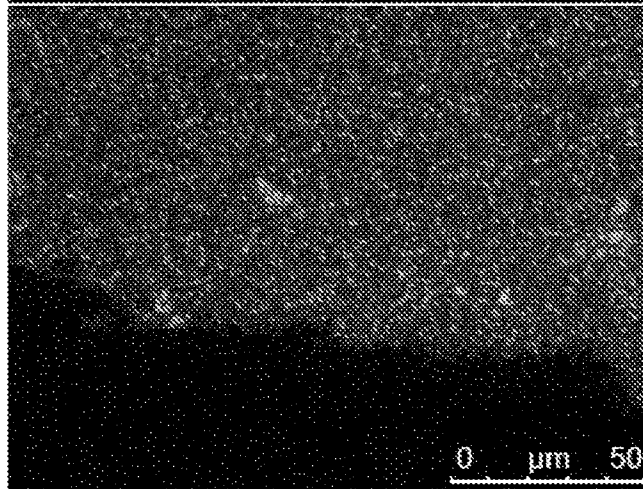
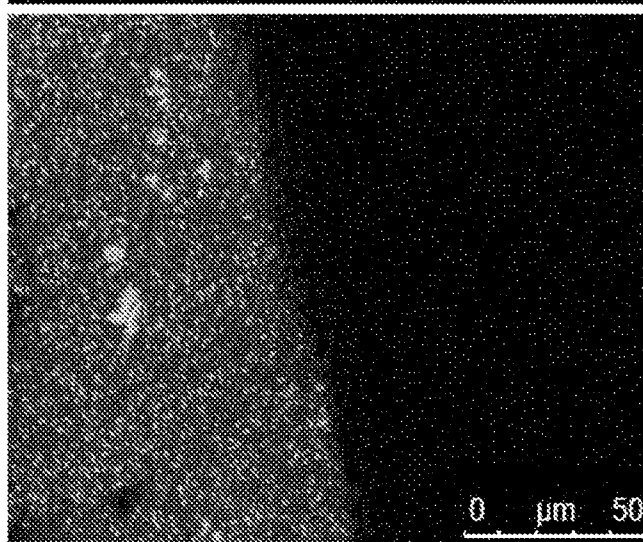
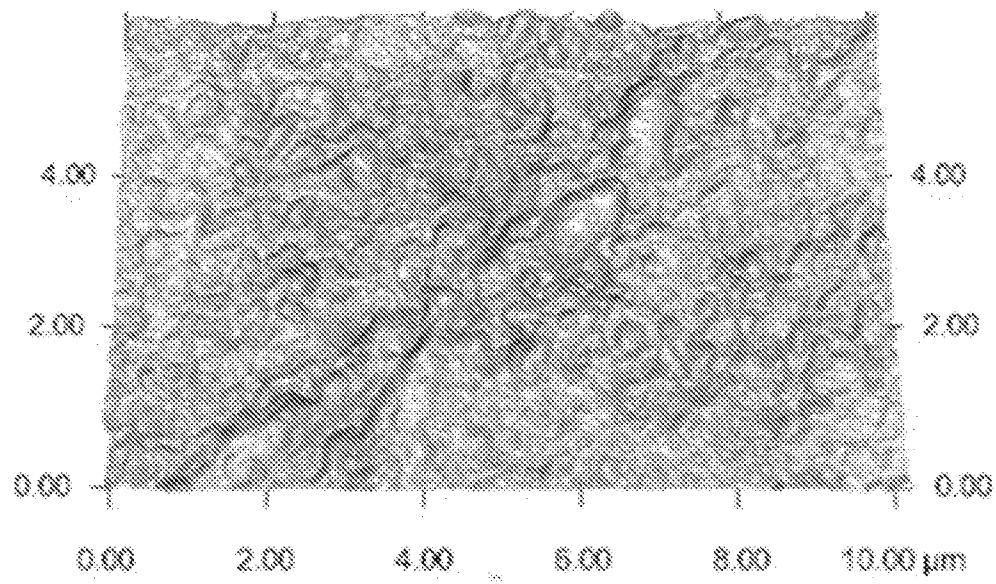
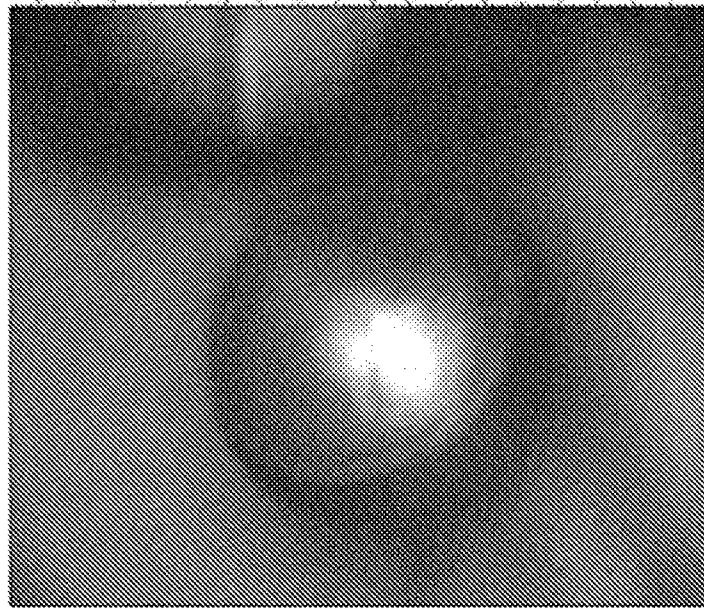


FIG. 3C

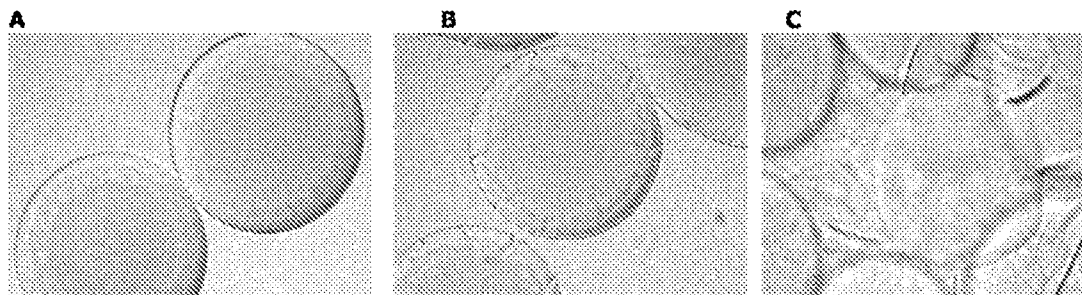


A

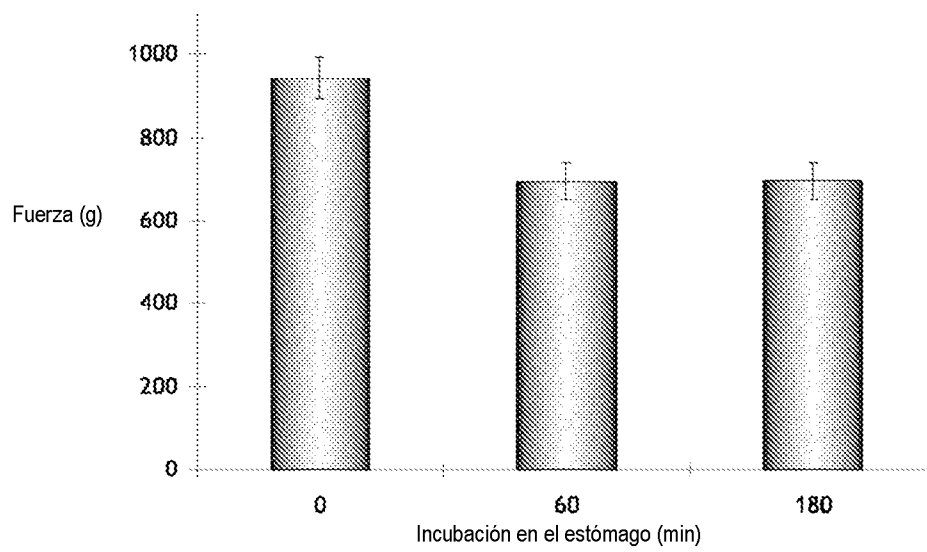


B

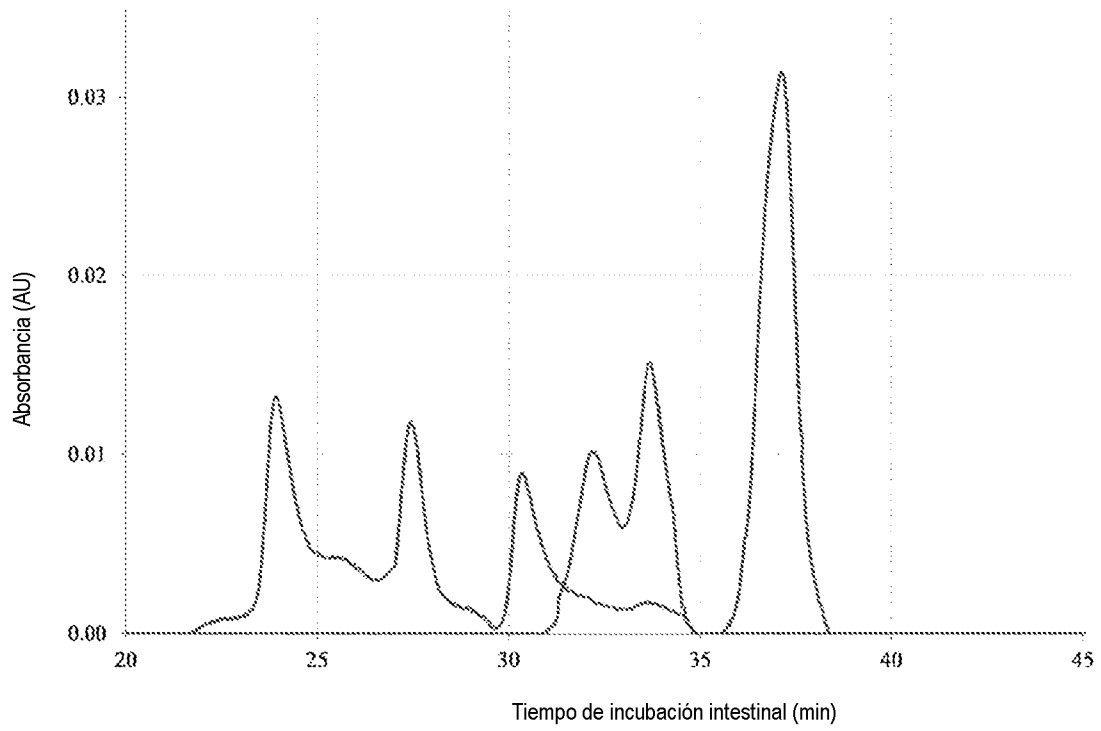
FIG. 4



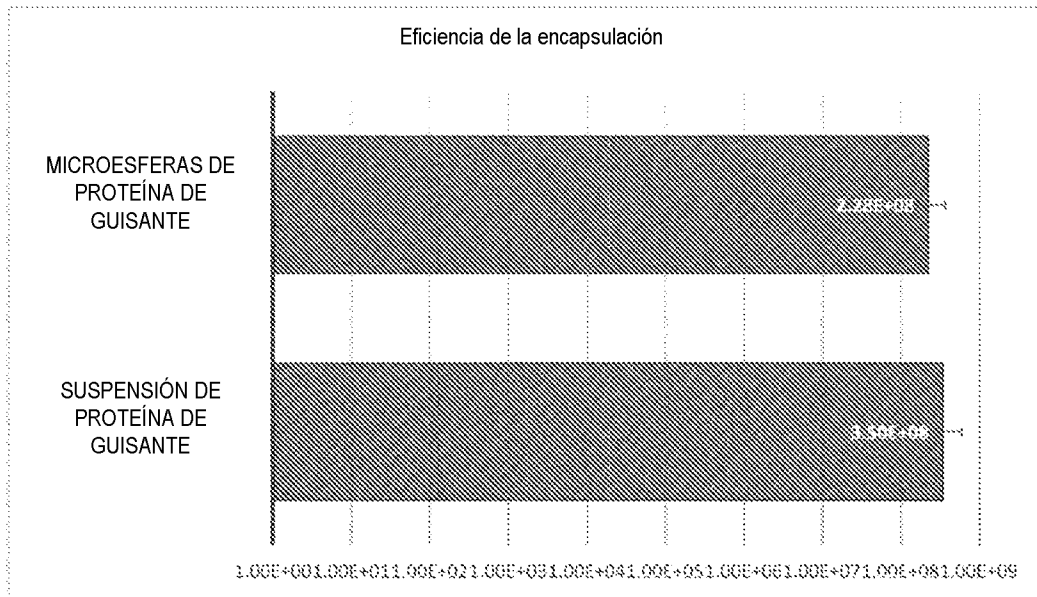
**FIG. 5**



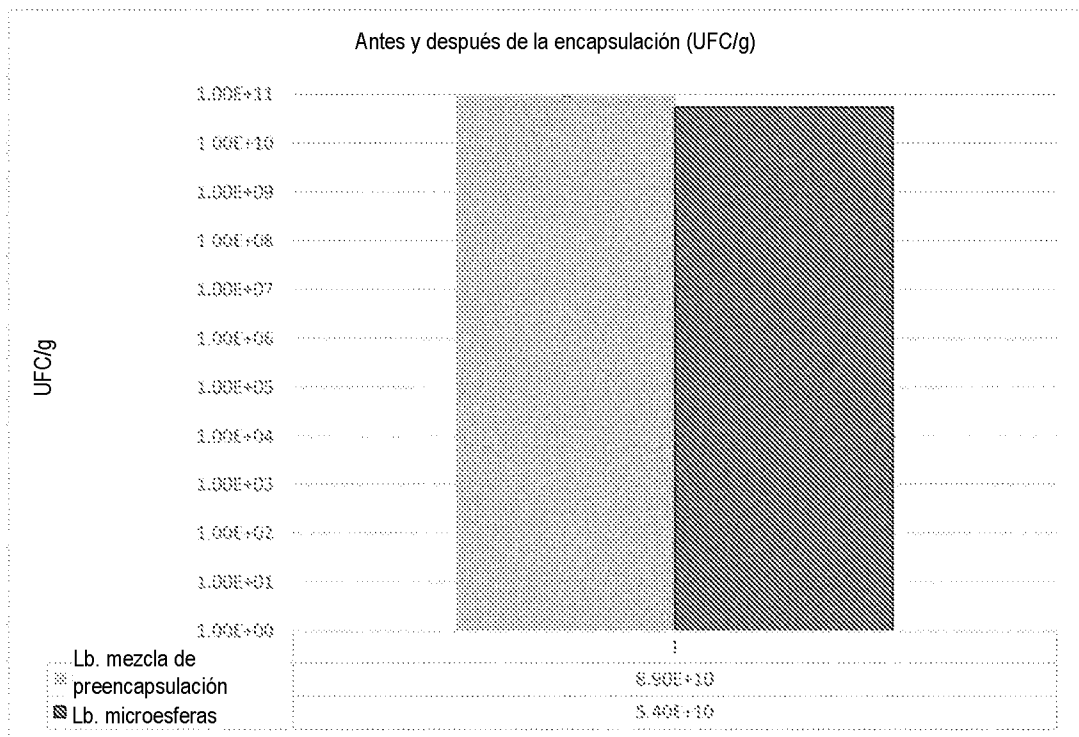
**FIG. 6**



**FIG. 7**

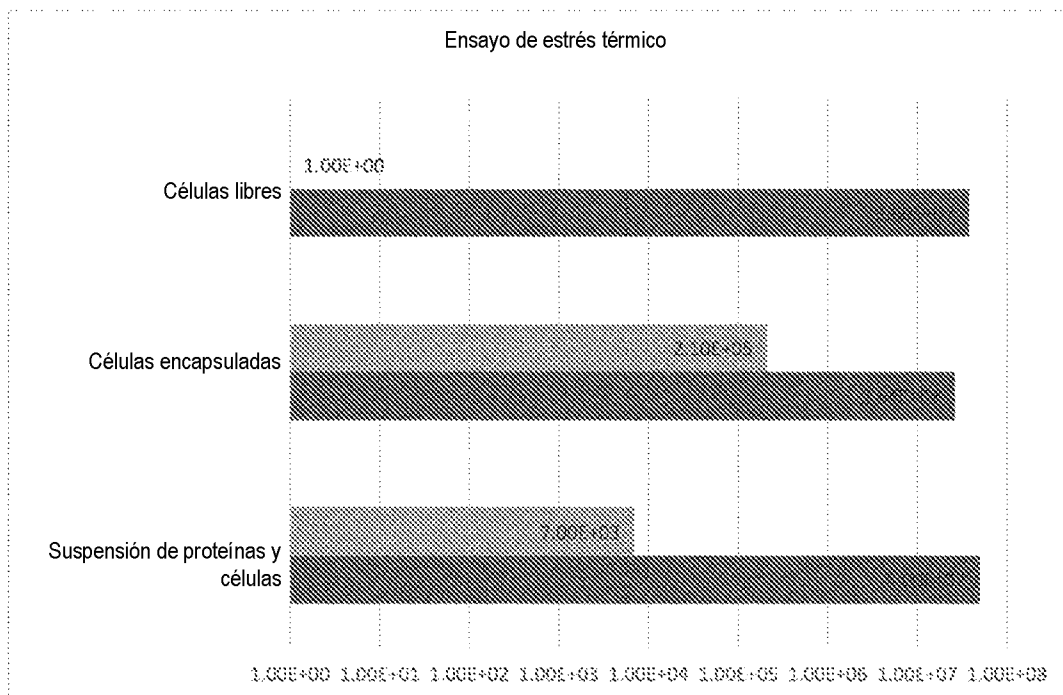


**A**

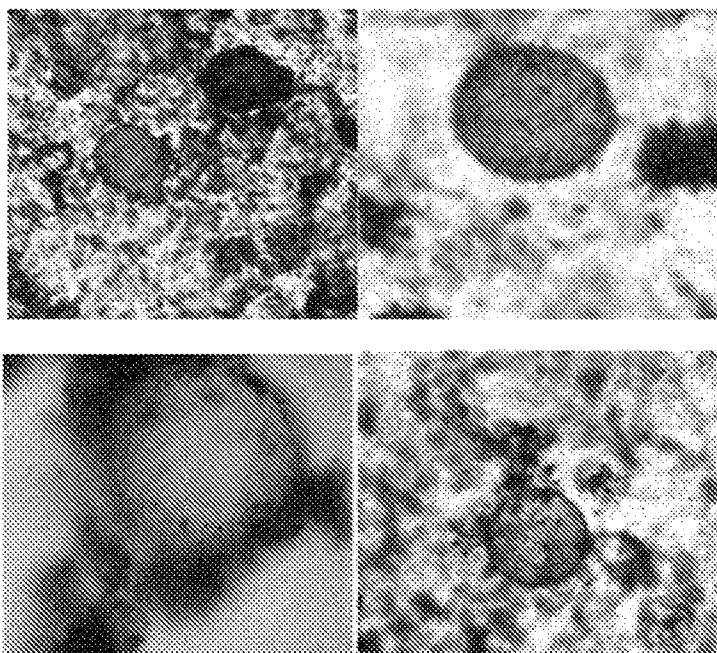


**B**

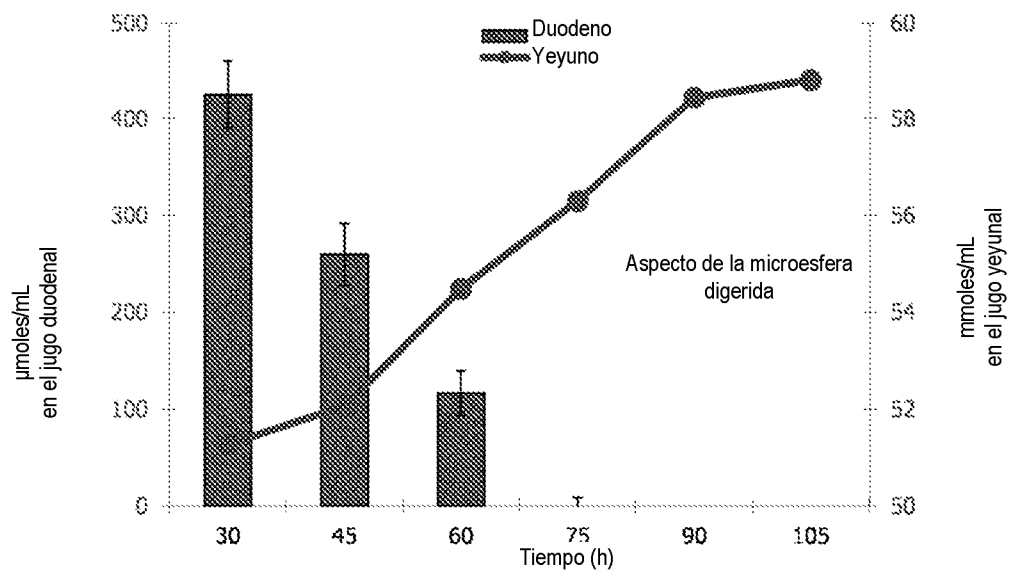
**FIG. 8**



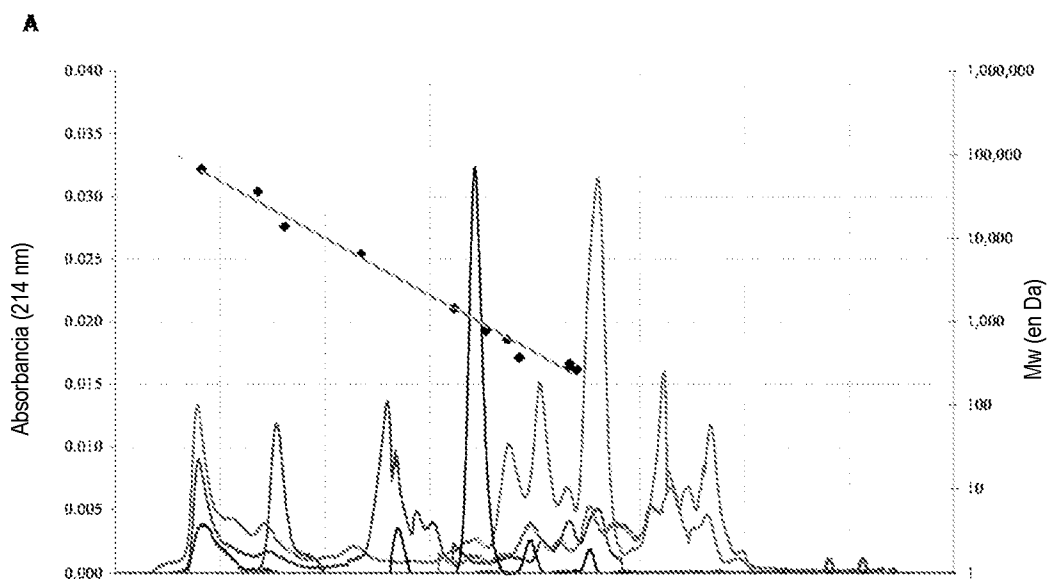
**FIG. 9**



**FIG. 10**



**FIG. 11**



**FIG. 12A**

**FIG. 13**

