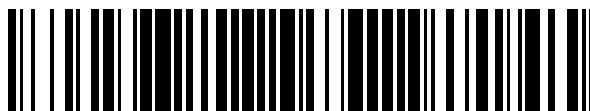


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 389 367**

21 Número de solicitud: 201100031

51 Int. Cl.:

C07H 3/02

(2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **04.12.2009**

30 Prioridad:
04.12.2009 ES 200931117

43 Fecha de publicación de la solicitud: **25.10.2012**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
25.10.2012

62 Número de la solicitud inicial: **P 200931117**

71 Solicitante/s:
**UNIVERSIDAD DE GRANADA (100.0%)
HOSPITAL REAL CUESTA DEL HOSPICIO S/N
18071 GRANADA, ES**

72 Inventor/es:
**MANZANERA RUIZ, Maximino;
GONZÁLEZ LÓPEZ, Jesús Juan y
NARVÁEZ REINALDO, Juan Jesús**

74 Agente/Representante:
No consta

54 Título: **COMPOSICIÓN SINTÉTICA CON EFECTO XEROPROTECTOR.**

57 Resumen:

Composición sintética con efecto xeroprotector.

La presente invención se refiere a una composición xeroprotectora sintética, similar a la que puede obtenerse a partir del microorganismo de la especie bacteriana *Rhodococcus* sp. con número de acceso CECT7625, que comprende acetato, lactato, ácido glutámico, {be}-hidroxibutirato y fructosa. La presente invención también se refiere al uso de la composición xeroprotectora para la conservación de material biológico con un contenido de humedad residual igual o inferior al 10%.

ES 2 389 367 A1

DESCRIPCIÓN

Composición sintética con efecto xeroprotector

La presente invención se refiere a una composición xeroprotectora sintética, similar a la que puede obtenerse a partir del microorganismo de la especie bacteriana *Rhodococcus* sp. con número de acceso CECT7625, que comprende acetato, lactato, ácido glutámico, β -hidroxibutirato y fructosa.

La presente invención también se refiere al uso de la composición xeroprotectora para la conservación de material biológico con un contenido de humedad residual igual o inferior al 10%, donde el material biológico es un organismo invertebrado, una semilla, una plántula, un microorganismo, un órgano aislado, un tejido biológico aislado, una célula o una molécula con actividad biológica como por ejemplo una enzima con actividad lipasa. Además, la presente invención se refiere a un método para la conservación de dicho material biológico.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

La conservación de materiales biológicos mediante deshidratación y osmoconcentración es una tecnología conocida. Cuando la tarea de conservar biomoléculas sensibles se hizo necesaria, el simple secado mediante deshidratación fracasó, ya que se eliminaba el agua estructural, produciendo la desnaturalización posterior y la pérdida de actividad vital. La liofilización se ha convertido en el método más aceptado para la conservación a largo plazo de biomoléculas sensibles, usándose por ejemplo de forma muy extendida para la conservación de vacunas atenuadas vivas.

- Los métodos actuales de conservación requieren de gran costo en energía y generalmente necesitan de almacenaje a bajas temperaturas. En ocasiones, después de su conservación el material biológico tiene una actividad y/o viabilidad que no alcanza los niveles satisfactorios. Los
- 5 métodos de conservación, tales como el secado a temperatura ambiente, formulaciones en líquido, el congelado con crioprotectores o la liofilización producen reducciones significativas en la actividad/viabilidad del material conservado.
- 10 Los procesos usados actualmente son lentos e implican un elevado consumo de energía. Además, la liofilización confiere sólo un nivel modesto de termotolerancia en el producto final, y se requiere aún refrigeración para reducir el deterioro durante el almacenamiento. Éste es un problema particular para vacunas vivas destinadas a usarse en climas
- 15 tropicales, ya que éstas pierden actividad, con el desafortunado resultado de que los programas de vacunación realizados en el campo en países tropicales, donde el control de la “cadena de frío” es difícil, pueden conducir finalmente a la vacunación de pacientes con vacuna inferior a la estándar o, en algunos casos, inservible.
- 20 Durante la selección natural evolutiva, ciertas especies de microorganismos, plantas y animales adquirieron la notable y elegante capacidad de tolerar la deshidratación extrema, permaneciendo latentes en medios hostiles durante períodos muy largos de tiempo y aún capaces
- 25 de adquirir una actividad vital completa una vez hidratadas nuevamente. Ejemplos incluyen la “planta de la resurrección” *Selaginella lepidophylla*, el camarón de mar *Artemia salina*, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* o el tardígrado *Macrobiotus hufelandi*. Estos organismos se denominan criptobióticos y el procedimiento por el que sobreviven se conoce como
- 30 anhidrobiosis. Todas las especies de animales y plantas que presentan esta capacidad, contienen moléculas protectoras formadoras de cristales

amorfos como el disacárido trehalosa (α -D-glucopiranosil- α -D-glucopiranosido).

La formación y uso de los cristales amorfos está bien documentada
 5 (Manzanera et al., 2002. Appl Environ Microbiol, 68: 4328-4333). Algunos
 de los conservantes que forman estos cristales son adecuados para este
 tipo de conservación e incluyen hidratos de carbono no reductores como la
 trehalosa, hidroxietoina, maltitol, lactitol (4-O- α -D-glucopyranosyl-D-
 glucitol), palatinit [mezcla de GPS (α -D-glucopiranosil-1-6-sorbitol) y GPM
 10 (α -D-glucopiranosil-1-6-manitol)] y sus componentes individuales GPS y
 GPM. Los glicósidos no reductores de compuestos polihidroxilados tales
 como neotrehalosa, laconeotrehalosa, galactosil-trehalosa, sacarosa,
 lactosacarosa, rafinosa, etc. Otros conservantes formadores de cristales
 amorfos incluyen aminoácidos tales como la hidroxietoina.

15

La presencia de agua en el estado seco es generalmente inferior a 0,2 g/g
 de peso celular seco en la mayoría de los criptobiontes. Estos niveles de
 agua son suficientes para que estos microorganismos resistan la
 deshidratación extrema, temperaturas elevadas, radiaciones ionizantes o
 20 también, en algunas especies de tardígrados, presiones de hasta 600
 MPa.

Es conocido que las biopelículas (*Subaerial biofilms*), formadas por
 bacterias del género *Rhodococcus* sp entre otras, son capaces de producir
 25 compuestos osmoprotectores, es decir, sustancias extracelulares
 poliméricas (EPS) (Gorbushina, 2007. Environmental Microbiology, 9(7):
 1613-1631). Asimismo, Ortega-Morales et al. (2007) (Ortega-Morales et al.
 2007. Journal of Applied Microbiology, 102: 254–264), describen bacterias
 de las biopelículas de las zonas intermareales tropicales, donde se han
 30 aislado bacterias que pertenecen al género *Microbacterium* sp. como
 fuente de nuevos exopolímeros protectores de las células contra la

dsecación. Por otra parte, LeBlanc (2008) (LeBlanc, 2008. Applied and environmental microbiology, 74(9): 2627-2636), se refiere al microorganismo *Rhodococcus jostii* RHA1, un actinomiceto con capacidades metabólicas favorables para la biorremediación de suelos
5 contaminados, capaz de secretar los osmoprotectores ectoína y trehalosa.

EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a una composición sintética con efecto
10 xeroprotector que comprende acetato, lactato, ácido glutámico, β -hidroxibutirato y fructosa, similar a la que puede obtenerse a partir del microorganismo de la especie bacteriana *Rhodococcus* sp. con número de acceso CECT7625. La presente invención también se refiere al uso de la composición xeroprotectora para la conservación de material biológico con
15 un contenido de humedad residual igual o inferior al 10%, donde el material biológico es un organismo invertebrado, una semilla, una plántula, un microorganismo, un órgano aislado, un tejido biológico aislado o una célula, o una molécula con actividad biológica como por ejemplo una enzima con actividad lipasa. Además, la presente invención se refiere un
20 método para la conservación de dicho material biológico.

La capacidad para conservar material biológico sensible por periodos de tiempo indefinido en forma activa o viable es de importancia en aplicaciones para los sectores médico, agrícola e industrial. En la presente
25 invención se ofrecen herramientas para solucionar la conservación de material biológico que presenta dificultades para su estabilización. El material biológico preservado con la composición xeroprotectora es estable por periodos largos de tiempo. Tal como se muestra en los ejemplos de la presente invención, el uso de una composición que
30 contiene cada uno de los componentes por separado para la conservación de la actividad de una enzima lipasa, es decir, la suma del efecto en la

conservación de la actividad enzimática de una composición que contiene acetato, o lactato, o ácido glutámico, o β -hidroxibutirato o fructosa, es menor que el efecto de conservación que produce una composición que contiene todos los componentes, es decir, la composición xeroprotectora
5 tiene un efecto sinérgico en su capacidad de conservar material biológico.

En adelante se podrá hacer referencia al microorganismo CECT7625, depositado en la colección española de cultivos tipo (CECT) el 10 de
10 noviembre de 2009 al que le correspondió el nº de depósito CECT7625, con el término "4J2A2", o como "microorganismo de la presente invención" o el "microorganismo de la invención". La dirección de dicha Autoridad Internacional de depósito es: Universidad de Valencia / Edificio de investigación / Campus de Burjassot / 46100 Burjassot (Valencia).

15

El término "composición xeroprotectora" tal como se entiende en la presente invención, se refiere a una composición que previene los efectos adversos de la desecación total o parcial de material de origen biológico o material de origen sintético. El material biológico se refiere a cualquier
20 compuesto producido directamente por un organismo vivo en cualquier estado de desarrollo, en cualquier compartimento celular, sea cual sea la naturaleza, composición o estructura del mismo, o que procede de un organismo que ya no está vivo. Dicho material biológico puede ser, por ejemplo, pero sin limitarse, una célula, ácido nucleico, proteína, enzima,
25 polisacárido, lípido, fosfolípido, liposomas, virus, partículas virales o cualquier molécula que comprenda cualquiera de los elementos anteriores, o cualquier molécula orgánica que tenga un efecto farmacológico, inmunogénico y/o fisiológico de acción local y/o sistémica. El material biológico puede comprender agentes terapéuticos; agentes anti-infectivos
30 como antibióticos, antivirales; analgésicos o combinaciones de analgésicos; agentes antiartríticos, antiasmáticos, antiinflamatorios,

antioplásticos, antipruríticos, antipsicóticos, antipiréticos,
 antiespasmódicos, preparaciones cardiovasculares (incluyendo
 bloqueantes de canales de calcio, bloqueadores beta, o antiarrítmicos),
 agentes contra la hipertensión, diuréticos, vasodilatadores, estimuladores
 5 del sistema nervioso central, antitusivos, preparaciones anti resfriados,
 descongestionantes, agentes de diagnóstico, hormonas, estimuladores del
 crecimiento óseo, inhibidores de la resorción de la médula ósea,
 inmunosupresores, relajantes musculares, psicoestimulantes, sedantes,
 tranquilizantes, proteínas, péptidos o fragmentos de los mismos (tanto
 10 naturales, como sintéticos, como productos recombinantes), moléculas de
 ácidos nucleicos (tanto en forma polimérica de dos o más nucleótidos de
 ADN o ARN, incluyendo tanto moléculas de cadena doble como de cadena
 sencilla, construcciones genéticas, vectores de expresión, ARN
 antisentido, sentido o moléculas ARNi) o nucleótidos (como por ejemplo,
 15 pero sin limitarse, el dATP, dCTP, dGTP, dTTP o dUTP, de utilidad en la
 técnica de PCR, secuenciación, etc). El material de origen sintético se
 refiere a un tipo de material que no ha sido producido o sintetizado por un
 organismo vivo directamente sino que ha sido creado por el ser humano
 como por ejemplo, pero sin limitarse, una secuencia de ADN amplificada
 20 por PCR, o una proteína o enzima modificada intencionadamente o no.

Así, la presente invención se refiere a la composición xeroprotectora
 sintética, que comprende fructosa, ácido glutámico, β -hidroxibutirato,
 acetato y lactato.

25

El término "acetato" se refiere al anión acetato presente en una solución,
 es decir el anión acetato $(C_2H_3O_2)^-$, es un carboxilato y es base conjugada
 del ácido acético. El término "lactato" se refiere al anión lactato presente
 en una solución, es decir el anión lactato $(C_3H_5O_3)^-$, es un carboxilato y es
 30 base conjugada del ácido láctico. El glutamato, forma ionizada del ácido
 glutámico, se refiere a uno de los 20 aminoácidos esenciales que forman

parte de las proteínas. El β -hidroxibutirato (o beta-hidroxibutirato) es el anión que deriva de la disolución del ácido 3-hidroxibutírico. La fructosa (o levulosa) es una cetohehexosa (6 átomos de carbono) con formula química $C_6H_{12}O_6$, monosacárido con la misma fórmula empírica que la glucosa pero con diferente estructura.

Una realización más preferida se refiere a la composición xeroprotectora sintética, que comprende una proporción de entre 35 y 45 de fructosa: 1,4 y 3,4 de ácido glutámico: 0,5 y 1,5 de acetato. Es decir, una proporción (fructosa):(ácido glutámico):(acetato) de (35 a 45) : (1,4 a 3,4) : (0,5 a 1,5), respectivamente. Una realización aún más preferida se refiere a la composición xeroprotectora donde la proporción de (fructosa):(ácido glutámico):(acetato) es de (38 a 44) : (2 a 3) : (0,7 a 1,3), respectivamente. Preferiblemente la composición xeroprotectora tiene una proporción de (fructosa):(ácido glutámico):(acetato) de (41):(2,4):(1), respectivamente.

Una realización más preferida se refiere a la composición xeroprotectora sintética, que comprende una proporción de entre 14 y 18 de fructosa: 3 y 5 de ácido glutámico: 0,6 y 1 de β -hidroxibutirato: 0,5 y 1,5 de acetato: 1 y 2 de lactato. Es decir, una proporción (fructosa):(ácido glutámico):(β -hidroxibutirato):(acetato):(lactato) de (14 a 18):(3 a 5):(0,6 a 1):(0,5 a 1,5):(1 a 2). Una realización aún más preferida se refiere a la composición xeroprotectora donde la proporción de (fructosa):(ácido glutámico):(β -hidroxibutirato):(acetato):(lactato) es de (15 a 17):(3,5 a 4,5):(0,7 a 0,9):(0,7 a 1,2):(1,2 a 1,6). Preferiblemente la composición xeroprotectora tiene una proporción de (fructosa):(ácido glutámico):(β -hidroxibutirato):(acetato):(lactato) de (16):(4):(0,8):(1):(1,4), respectivamente.

El término "proporción" tal como se entiende en la presente invención se refiere a la correspondencia debida de los elementos de la composición

(fructosa, ácido glutámico, β -hidroxibutirato, acetato y lactato) relacionados entre sí. Es decir, se refiere a una relación matemática que vincula los elementos de la composición. Para que sirva de ejemplo, la composición xeroprotectora que tiene una proporción de (fructosa):(ácido glutámico):(β -hidroxibutirato):(acetato):(lactato) de (16):(4):(0,8):(1):(1,4), respectivamente, puede tener por ejemplo, concentraciones de (32):(8):(1,6):(2):(2,8) mg de cada elemento respectivamente/ml.

En adelante se podrá hacer referencia a cualquiera de las composiciones anteriores como la “composición de la presente invención” o “composición de la invención”.

Otro aspecto de la presente invención es el uso de la composición de la invención para la conservación de material biológico con un contenido en humedad residual igual o inferior al 10%. El contenido de humedad residual del material biológico puede ser igual o inferior al 9, 8, 7, 6 5, 4, 3, 2 ó 1% de humedad residual. La conservación de dicho material puede llevarse a cabo mediante la estabilización del mismo. En la presente invención, para referirse a este tipo de material biológico se puede emplear la expresión “material biológico en estado seco”. En estas condiciones, el conservante o estabilizador coalesce para alcanzar un estado no-cristalino, vítreo, y sólido (por ejemplo un cristal amorfo). Las partículas de cristal orgánico que están formadas al secar el material biológico con el estabilizador están cubiertas por el estabilizador que produce una alta estabilidad al reducir drásticamente las reacciones químicas. De esta forma el material biológico seco está incrustado en el cristal amorfo formado por el estabilizador.

El material biológico seco en presencia del estabilizador que forma el cristal amorfo es resistente a plásticos en estado líquido, mientras que el

material que no está seco en presencia de estos estabilizadores no es resistente a plásticos en estado líquido.

El material biológico seco en estas formas puede encontrarse en estado no particulado y puede suministrarse en formas por ejemplo, pero sin limitarse, molduras o sólidos en 3 dimensiones como por ejemplo, pero sin limitarse, bloques, pastillas, parches, hojas, bolas, o pepitas de material biológico seco.

10 El término "humedad residual" tal como se emplea en la presente invención se refiere a la cantidad de humedad que contiene un producto después de pasado por algún tipo de proceso capaz de eliminar agua del mismo. La humedad residual es el porcentaje de masa del producto que corresponde a agua respecto del total de la masa. Es decir, un valor de
15 humedad residual de un producto igual a un 10% significa que 10 g de cada 100 g del producto corresponden a agua. La humedad residual puede ser medida mediante métodos conocidos en el estado de la técnica como por ejemplo, pero sin limitarse, mediante el método titrimétrico, el método azeotrópico o el método gravimétrico.

20

El término "conservación de material biológico" hace referencia al mantenimiento o cuidado de la permanencia de las características intrínsecas del material biológico.

25 Una realización preferida se refiere al uso de la composición de la invención para la conservación de material biológico en estado seco, donde el material biológico es un organismo invertebrado, una semilla, una plántula, un microorganismo, un órgano aislado, un tejido biológico aislado o una célula. La célula puede ser procariota o eucariota. La célula puede
30 ser una célula de un microorganismo en cualquier estado de desarrollo. La célula puede ser somática o germinal, vegetal o animal. Dicha célula

puede proceder de cualquier organismo o microorganismo y puede presentarse en cualquier estado de diferenciación, como por ejemplo, pero sin limitarse, procedente de un cultivo de un tejido celular o de órganos, esperma, óvulos o embriones. La célula puede ser una célula madre

5 totipotente, multipotente o unipotente. El microorganismo puede ser unicelular o multicelular. El organismo unicelular se selecciona de la lista que comprende, pero sin limitarse, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas putida*., *Salmonella* spp, *Rhizobium* spp, *Pseudomonas* spp, *Rhodococcus* spp, *Lactobacillus* spp. o *Bifidobacterium*

10 spp. El organismo pluricelular puede ser por ejemplo, pero sin limitarse, un nematodo.

La célula conservada por la composición de la presente invención es una célula viable es decir, es capaz de realizar las funciones normales de la

15 célula incluyendo la replicación y división celular. Por otra parte la célula puede haber sido tratada, manipulada o mutada antes de su conservación. Por ejemplo, pero sin limitarse, una célula puede haberse hecho competente para transformaciones o transfecciones, o puede contener ácidos nucleicos recombinantes. Las células que se conservan pueden

20 formar una población homogénea o heterogénea, por ejemplo, pero sin limitarse, una librería de células en la que cada una contiene una variación de algún ácido nucleico. Preferentemente, las células son células no anhidrobióticas (células sensibles a desecación) como por ejemplo, pero sin limitarse, células procedentes de microorganismos procariotas no

25 anhidrobiontes que generalmente no sean esporulantes.

La conservación del microorganismo puede mejorarse mediante cultivo bajo condiciones que aumenten la concentración intracelular de trehalosa o de otros estabilizadores formadores de cristales amorfos. Por ejemplo,

30 pero sin limitarse, en condiciones de alta osmolaridad (alta concentración

de sales) que estimulen la producción intracelular de trehalosa o de otros estabilizantes formadores de cristales amorfos.

El organismo invertebrado es pero sin limitarse, una larva de insecto o un crustáceo. Dichos organismos invertebrados pueden ser preservados en condiciones de desecación, permitiendo la actividad vital del mismo, de modo que, cuando se rehidratan, dichos organismos presentan la capacidad de movimiento. La plántula es una planta en sus primeros estadios de desarrollo, desde que germina hasta que se desarrollan las primeras hojas verdaderas.

La composición de la invención puede usarse para la conservación de material biológico en estado seco, donde el material biológico es un organismo vertebrado perteneciente a la Superclase Tetrapoda (con cuatro extremidades), Clase Amphibia (anfibios) o Clase Reptilia (reptiles), o cualquiera de sus partes (Vernon y Jackson, 1931. The biological bulletin, 60: 80-93). Vernon y Jackson llevaron a cabo un estudio sobre la rana Leopardo (*Rana pipiens*), en el que de forma natural se seca su piel, lengua, bazo, e hígado con una pérdida de agua de entre un 43-81% del contenido de agua total.

Un órgano aislado, o un tejido biológico aislado (incluida la sangre) pueden conservarse mediante la composición de la presente invención. En Serrato et al. (2009) pueden observarse resultados de protocolos de criopreservación de tejidos biológicos (Serrato et al., 2009. Histology and histopathology, 24: 1531-1540).

Una realización más preferida se refiere al uso de la composición de la invención, donde el material biológico es una molécula con actividad biológica. El término “molécula con actividad biológica” tal como se entiende en la presente invención se refiere a una molécula biológica cuyo

origen sea un organismo vivo o que haya estado vivo, o derivados o análogos de dicha molécula. El término “derivados” se refiere a moléculas obtenidas por la modificación de una molécula con actividad biológica, que presentan una funcionalidad similar. Por otra parte, el término “análogos”
 5 se refiere a moléculas que presentan una función similar a la molécula con actividad biológica.

Según otra realización aún más preferida de la composición de la presente invención la molécula con actividad biológica es una enzima. Una
 10 realización todavía más preferida de la presente invención se refiere al uso de la composición de la invención, donde la enzima es una enzima con actividad lipasa. La enzima con actividad lipasa se selecciona de la lista de enzimas con números EC (*Enzyme Commission numbers*) que comprende las hidrolasas de éster carboxílico (EC 3.1.1) EC 3.1.1.1
 15 (Carboxilesterasa), EC 3.1.1.2 (Ariesterasa), EC 3.1.1.3 (Triacilglicerol lipasa), EC 3.1.1.4 (Fosfolipasa A(2)), EC 3.1.1.5 (Lisofosfolipasa), EC 3.1.1.23 (Acilglicerol lipasa), EC 3.1.1.24 (3-oxoadipato enol-lactonasa), EC 3.1.1.25 (1,4-lactonasa), EC 3.1.1.26 (Galactolipasa), EC 3.1.1.32 (Fosfolipasa A(1)), EC 3.1.1.33 (6-acetilglucosa deacetilasa), EC 3.1.1.34
 20 (Lipoproteína lipasa). Preferiblemente la enzima lipasa tiene actividad Triacilglicerol lipasa (EC 3.1.1.3).

Otro aspecto de la presente invención se refiere al método para la conservación de material biológico que comprende:

25

- a) mezclar la composición de la invención con una muestra de material biológico, y
- b) deshidratar el producto obtenido en el paso (a) hasta una humedad residual igual o inferior al 10%.

30

Una realización preferida se refiere al método para la conservación de material biológico, donde el material biológico del paso (a) es un organismo invertebrado, una semilla, una plántula, un microorganismo, un órgano aislado, un tejido biológico aislado o una célula.

5

Otra realización preferida se refiere al método para la conservación de material biológico, donde el material biológico es una molécula con actividad biológica.

10 Una realización más preferida de la presente invención se refiere al método, donde la molécula con actividad biológica es una enzima. Según una realización más preferida de la presente invención la enzima es una lipasa.

15 Otra realización aún más preferida se refiere a cualquiera de los métodos para la conservación de material biológico, donde la deshidratación de la mezcla de la composición xeroprotectora y del material biológico según el paso (b) se lleva a cabo por medio de una solución hipertónica o por medio de una corriente de aire.

20

Cualquier método para la conservación de material biológico de la presente invención permite el empleo de dicho material en procesos de manufacturación en los cuales el material biológico sería demasiado inestable si no estuviera conservado mediante el uso de la composición de

25 la presente invención. La invención incluye extrusiones o moldes en los que se incluye el material conservado por cualquier método de la presente invención. Un método de producción de una moldura que contenga biomaterial activo mediante estabilizadores puede incluir soluciones de materiales plásticos. Por ejemplo una moldura de material plástico con
30 biomaterial activo encapsulado puede ser útil como componentes de

biosensores. Por ejemplo un biosensor puede incluir bacterias que sean capaces de detectar sustancias tóxicas, patógenos o toxicidad en general.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

Con la intención de complementar la descripción que se ha llevado a cabo, así como de ayudar a un mejor entendimiento de las características de la invención, de acuerdo con algunos ejemplos realizados, se muestran aquí, con carácter ilustrativo y no limitante, las siguientes figuras:

FIG. 1. Muestra la actividad lipasa (en porcentaje relativo a un 100% de actividad del control positivo) tras secado de la enzima lipasa en presencia de los distintos componentes de productos del ordeñado bacteriano al 10% (p/v).

El control positivo es trehalosa al 10%. El control negativo (-) se corresponde con la ausencia de compuesto alguno como aditivo previo a la desecación de la enzima. 4J2A2 es el valor de actividad lipasa registrada tras la estabilización por secado y posterior reconstitución de la enzima en presencia de POB extraídos de la cepa 4J2A2 mediante choque hiper/hipoosmótico respectivamente. 4J2A2D es la actividad lipasa registrada tras la estabilización por secado y posterior reconstitución de la enzima en presencia de POBSIA (Producto de Ordeñado Bacteriano

extraído por Secado mediante Incubación al Aire) extraídos de la cepa 4J2A2 mediante tratamiento de secado y posterior hidratación, que comprende los mismos componentes que la composición sintética objeto de esta invención.

5

FIG. 2. Muestra la actividad lipasa (en porcentaje relativo a un 100% de actividad del control positivo) tras secado de la enzima lipasa en presencia de los distintos compuestos químicos (fructosa, ácido glutámico, beta-hidroxibutirato, acetato y lactato al 10%).

10

El control positivo (C+) es trehalosa al 10%. El control negativo (C-) se corresponde con la ausencia de compuesto alguno como aditivo previo a la desecación de la enzima. 4J2A2D sintético es la mezcla de fructosa, ácido glutámico, beta-hidroxibutirato, acetato y lactato al 10% en la misma proporción encontrada en el POBSIA de la cepa 4J2A2 mediante tratamiento de secado y posterior hidratación siendo la proporción de 16:4:0,8:1:1,4 respectivamente.

15

20

FIG. 3. Muestra la evolución de la supervivencia de *Escherichia coli* MC4100 frente a desecación mediante el empleo de los productos de ordeñado bacteriano (POB), de los extraídos por Secado mediante Incubación al Aire (POBSIAs), así como de la composición sintética objeto de la invención.

25

4J2A2 es el valor de actividad lipasa registrada tras la estabilización por secado y posterior reconstitución de la enzima en presencia de mezclas de solutos en base a la composición de los POB extraídos de la cepa 4J2A2 mediante choque hiper/hipoosmótico respectivamente. 4J2A2D es la actividad lipasa registrada tras la estabilización por secado y posterior reconstitución de la enzima en presencia de mezclas de solutos en base a

30

la composición de los POBSIA, que comprende los mismos componentes que la composición sintética objeto de esta invención

PVP indica que además se ha adicionado 1,5% de polivinilpirrolidona (PVP).

5 SIN es sintético.

T es trehalosa.

EJEMPLO

10 A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos ilustrativos y de carácter no limitante, realizados por los inventores que describen la capacidad xeroprotección de la composición sintética objeto de la invención.

15 En la tabla 1 se pueden observar las composiciones de los productos de ordeñado bacteriano de la cepa 4J2A2 tras su extracción mediante choque hiper/hipoosmótico (4J2A2), o tras su extracción por secado mediante incubación al aire (4J2A2D), según se describe en la patente P200931117.

20 **Tabla 1.** Composición de los productos de ordeñado bacteriano de la cepa 4J2A2 tras su extracción mediante choque hiper/hipoosmótico (4J2A2), o tras su extracción por secado mediante incubación al aire (4J2A2D).

4J2A2		4J2A2D	
Fructosa	41,3	Fructosa	16,59
Acetato	1	Acetato	1
Ac. glutámico	2,38	Ac. glutámico	4,25
		B-hidroxibutirato	0,84
		Lactato	1,41

En la FIG. 2 se muestra la actividad lipasa (en porcentaje relativo a un 100% de actividad del control positivo) tras secado de la enzima lipasa en presencia de los distintos compuestos químicos de la composición 4J2A2D sintética (fructosa, ácido glutámico, beta-hidroxibutirato, acetato y lactato al 10%). El control positivo es trehalosa al 10%. El control negativo se corresponde con la ausencia de compuestos como aditivo previo a la desecación de la enzima. 4J2A2D sintético es la mezcla de fructosa, ácido glutámico, beta-hidroxibutirato, acetato y lactato al 10% en la misma proporción encontrada en el POBSIA de la cepa 4J2A2 mediante tratamiento de secado por incubación al aire y posterior hidratación siendo la proporción de fructosa, ácido glutámico, beta-hidroxibutirato, acetato y lactato, de 16:4:0,8:1:1,4 respectivamente.

Tal como puede observarse en dicha FIG. 2, la combinación de los compuestos fructosa, ácido glutámico, beta-hidroxibutirato, acetato y lactato (en igual proporción que la mostrada en la tabla 1 (4J2A2D) presenta un efecto sinérgico en la conservación de la actividad lipasa ya que la suma de la actividad lipasa mostrada por composiciones que contienen los compuestos de forma aislada es menor que el resultado obtenido con dicha mezcla.

Ejemplo 1. Ensayo de xeroprotección de enzimas.

El objetivo de este ensayo fue determinar la capacidad de la fracción producto del ordeñado bacteriano para proteger enzimas frente a la desecación. Para ello se utilizó la enzima lipasa. Partiendo de 1 µl que contenía 0,00554 unidades de lipasa de *Burkholderia cepacia* (Sigma-Aldrich 62309-100 mg) se adicionaron 15 µl de la fracción producto del ordeñado bacteriano a estudiar. Como control positivo se adicionaron 15 µl de una solución al 10% de trehalosa a 1 µl (0,00554 U) de solución de lipasa y como control negativo se añadió 15 µl de agua a 1 µl (0,00554 U)

de solución de lipasa. Las mezclas de 16 µl con lipasa se depositaron en un microtubo de 2ml de capacidad y se secaron a 50°C durante 120 minutos. Una vez secas se incubaron a 100°C durante 5 minutos. Finalmente fueron almacenadas en un desecador a temperatura ambiente

5 durante 24 horas. Pasado el tiempo de incubación, las reacciones se resuspendieron en 50 µl de una solución de TrisHCl (50 mM) y se transfirieron a un microtubo junto con 950 µl de Tris HCl (50 mM) pH8 y 1 ml de Solución de Sustrato. La determinación de la capacidad xeroprotectora de cada fracción producto de ordeñado bacteriano (POB)

10 se determinó por el ensayo de medición de la actividad lipasa.

Para la medida de la actividad lipasa se utilizó una variación del método descrito por Gupta y colaboradores (2002) consistente en la cuantificación espectrofotométrica del *p-nitrofenol* liberado por la enzima lipasa de

15 *Burkholderia cepacia* (Sigma-Aldrich 62309-100 mg) a partir del sustrato *p-nitrofenol palmitato* (pNPP) (Gupta et al., 2002. Analytical Biochemistry, 311: 98-99). Para ello se utilizó 1 ml de medio libre de células (985 µl de Tris-HCl 0,05M junto a 15 µl de POB obtenido por el método del “ordeñado bacteriano”) mezclado con 1 ml de solución sustrato de un cultivo en fase

20 estacionaria. Esta mezcla de ensayo se incubó a 30°C durante 30 minutos en microtubos estériles de 2 ml. La reacción se paró mediante incubación a 100°C durante 4 minutos en termobloque y 2 minutos a -20°C. La absorbancia se midió en un espectrofotómetro Hitachi U-2000 a una longitud de onda de 410 nm. La solución sustrato (SS) se preparó

25 mezclando 10 ml de solución A (30 mg de pNPP en 10 ml de isopropanol) con 90 ml de solución B (0,1g de goma arábica y 0,4 ml de Tritón X-100 en 90 ml tampón Tris-HCl 50mM pH8). La mezcla de solución A y B se agitó suavemente hasta su total disolución. La FIG. 2 muestra los valores de tolerancia de las cepas aisladas.

30

Ensayo de xeroprotección de microorganismos.

El objetivo de este ensayo fue determinar la capacidad para proteger células vivas de *Escherichia coli* MC4100 frente a desecación mediante el empleo de mezclas sintéticas de productos químicos basados en los análisis procedentes del producto de ordeñado bacteriano (POB) así como de los extraídos por Secado mediante Incubación al Aire (POBSIAs) de diversas cepas xerotolerantes de forma análoga a la descrita por Manzanera et al., (2002) (Manzanera et al., 2002. Applied and Environmental Microbiology 68: 4328-33). Para ello se utilizó un preinóculo de *E. coli*, a partir del cual se inoculó medio mínimo más glucosa como fuente de carbono adicionados de 0,6 M de NaCl hasta alcanzar una densidad óptica inicial de 0,05. Tras 12 horas de incubación a 37°C en agitación, se centrifugaron alícuotas de 1ml del cultivo crecido. Las células de *E. coli* se resuspendieron en una solución al 10% de los POBs o POBSIAs extraídos de las células xerotolerantes (extraídos según se describe anteriormente) y además, 1,5% de polivinilpirrolidona (PVP). Igualmente se realizó la misma experiencia mediante la combinación y mezcla de sustratos comerciales identificados en POBs y POBSIAs en iguales proporciones, a los que se llamaron POB *sintético* o POBSIA *sintético* en contraposición al directamente extraído de células que llamamos *natural*. En el caso de los POB/POBSIA *sintéticos* la mezcla se realizó en una solución al 34,2%. La suspensión de células en las distintas soluciones se sometieron a condiciones de desecación por vacío sin congelación, en un congelador-dsecador modificado (Dura - Stop μ P; FTS Systems, Stone Ridge, NY) a 30°C de temperatura media y 100 mTorr (2Pa; 2×10^{-5} atmósferas) durante 20 segundos, con una rampa de temperatura de 2,5°C/min con 15 minutos de pausa después de cada incremento de 2°C, hasta llegar a la temperatura máxima de 40°C.

Las muestras se sellaron al vacío y se almacenaron a 30°C hasta su ensayo de viabilidad a tiempo 1, 15 y 30 días. Pasado este tiempo las

muestras se resuspendieron en 1ml de LB y se realizaron ensayos de viabilidad mediante siembra en placa de LB sólido que se incubaron 24 horas a 37°C, para el conteo de UFC y comparación con las UFC antes del secado, para de esta forma poder calcular la supervivencia de las muestras.

En la FIG. 3 se observa cómo las composiciones sintéticas POBs y POBSIAs de la cepa 4J2A2 produjeron un aumento de la supervivencia de los microorganismos respecto de la supervivencia experimentada por dichos microorganismos mediante una solución de trehalosa, cuando las soluciones estaban al 34,2 % de dichos compuestos xeroprotectores y durante el primer día de conservación así como a las dos semanas. Se observa que la aportación del PVP 1,5% a la supervivencia es nula.

REIVINDICACIONES

1. Composición xeroprotectora sintética que comprende fructosa, ácido glutámico, β -hidroxibutirato, acetato y lactato.
5
2. Composición según reivindicación 1, que comprende una proporción de fructosa : ácido glutámico : acetato, de entre (35 y 45) : (1,4 y 3,4) : (0,5 y 1,5) respectivamente.
- 10 3. Composición según la reivindicación 2, donde la proporción de fructosa : ácido glutámico : acetato es de entre (38 y 44) : (2 y 3) : (0,7 y 1,3), respectivamente.
- 15 4. Composición según reivindicación 1, que comprende una proporción de fructosa : ácido glutámico : β -hidroxibutirato : acetato : lactato, de entre (14 y 18) : (3 y 5) : (0,6 y 1) : (0,5 y 1,5) : (1 y 2), respectivamente.
- 20 5. Composición según la reivindicación 4, donde la proporción de fructosa: ácido glutámico: β -hidroxibutirato: acetato: lactato es de entre (15 y 17) : (3,5 y 4,5) : (0,7 y 0,9) : (0,7 y 1,2) : (1,2 y 1,6), respectivamente.
- 25 6. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para la conservación de material biológico con un contenido de humedad residual igual o inferior al 10%.
7. Uso de la composición según la reivindicación 6, donde el material biológico es un microorganismo o una célula.

8. Uso de la composición según la reivindicación 6, donde el material biológico es un organismo invertebrado, una semilla, una plántula, un órgano aislado o un tejido biológico aislado.
- 5 9. Uso de la composición según la reivindicación 6, donde el material biológico es una molécula con actividad biológica.
10. Uso de la composición según la reivindicación 9, donde la molécula con actividad biológica es una enzima.
- 10 11. Uso de la composición según la reivindicación 10, donde la enzima es una lipasa.
12. Método para la conservación de material biológico que comprende:
- 15 a) mezclar la composición xeroprotectora según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 con una muestra de material biológico, y
- b) deshidratar el producto obtenido en el apartado (a) hasta una
- 20 humedad residual igual o inferior al 10%.
13. Método según la reivindicación 12, donde el material biológico es un microorganismo o una célula.
- 25 14. Método según la reivindicación 12, donde el material biológico del paso (a) es un organismo invertebrado, una semilla, una plántula, un órgano aislado o un tejido biológico aislado.
15. Método según la reivindicación 12, donde el material biológico es una
- 30 molécula con actividad biológica.

16. Método según la reivindicación 15, donde la molécula con actividad biológica es una enzima.

17. Método según la reivindicación 16, donde la enzima es una lipasa.

5

18. Método según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 17, donde la deshidratación de la mezcla de la composición xeroprotectora y del material biológico según el paso (b) se lleva a cabo por medio de una solución hipertónica o por medio de una corriente de aire.

10

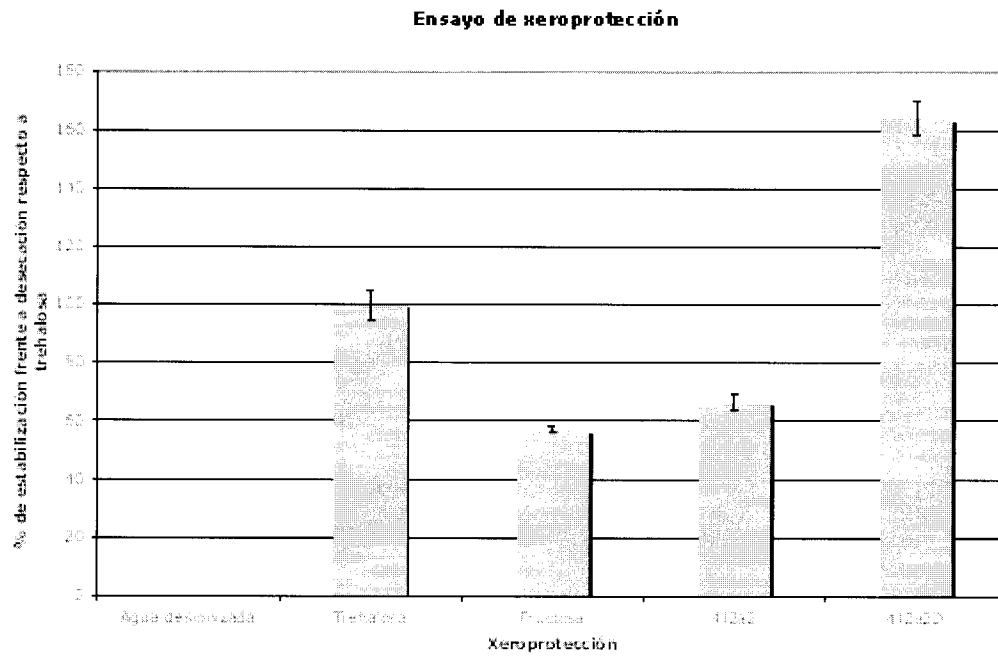


FIG. 1

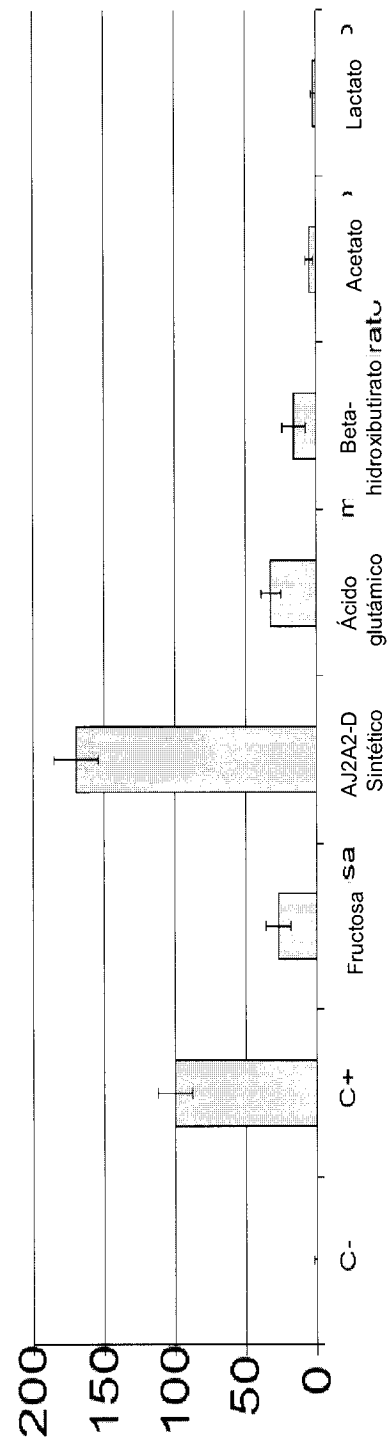


FIG. 2

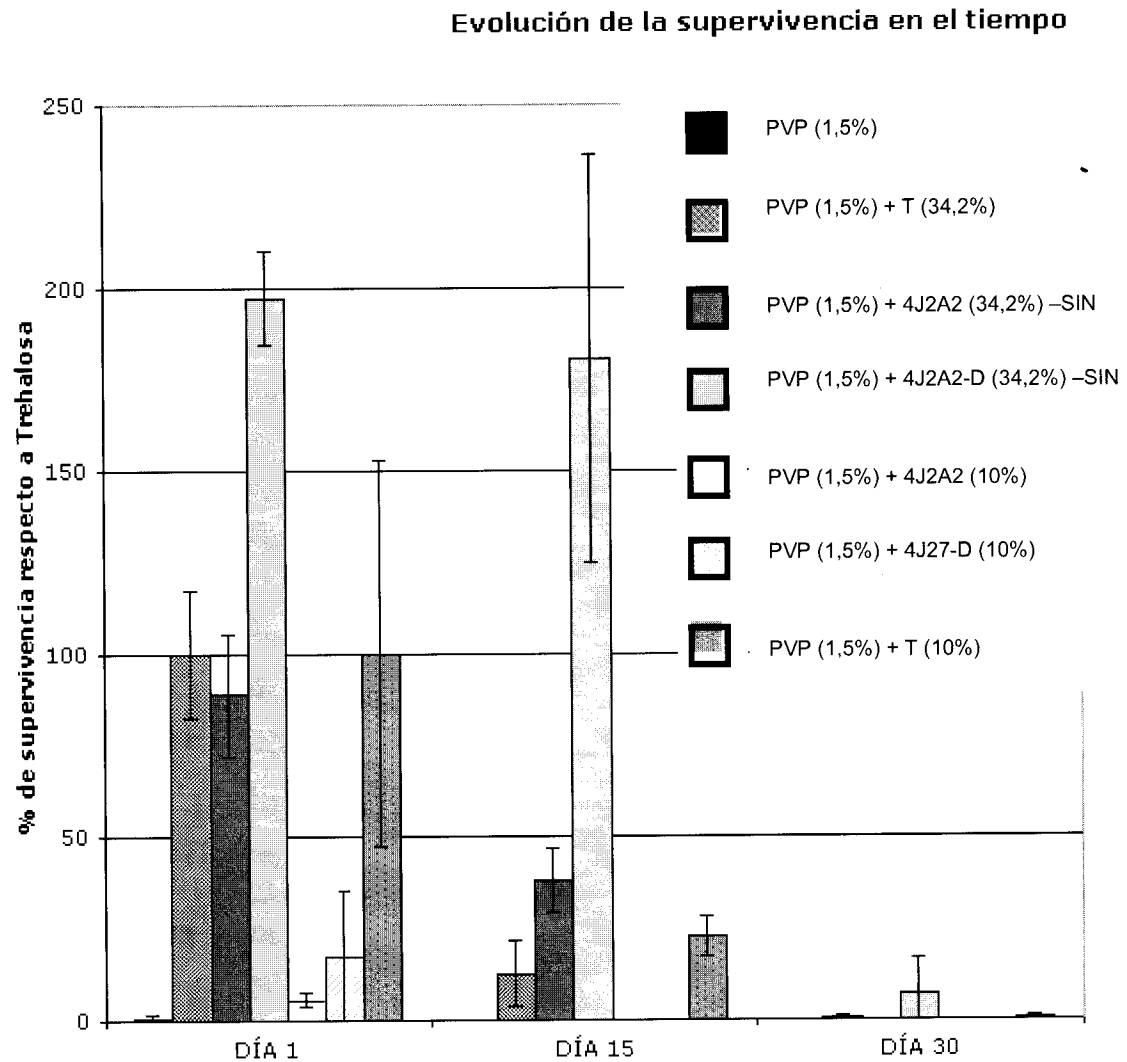


FIG. 3



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201100031

②② Fecha de presentación de la solicitud: 04.12.2009

③② Fecha de prioridad: **04-12-2009**

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **C07H3/02** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	US 20040081714 A1 (PAULY GILLES; MOSER PHILIPPE; DANOUX LOUIS; FREIS OLGA; HENRY FLORENCE; PAULY-FLORENTINY MURIEL; GUEZENNEC ANNE; GUESNET JOELLE) 29.04.2004	1-18
A	US 20040064846 A1 (DANIELL HENRY; LEE SEUNG-BUM; BYUN MYUNG OK) 01.04.2004	1-18

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
16.08.2012

Examinador
I. Rueda Molíns

Página
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07H

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, TXT

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 16.08.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-18	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-18	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	US 20040081714 A1 (PAULY GILLES; MOSER PHILIPPE; DANOUX LOUIS; FREIS OLGA; HENRY FLORENCE; PAULY-FLORENTINY MURIEL; GUEZENNEC ANNE; GUESNET JOELLE)	29.04.2004
D02	US 20040064846 A1 (DANIELL HENRY; LEE SEUNG-BUM; BYUN MYUNG OK)	01.04.2004

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Arts. 6 y 8 LP11/1986)**

En la invención de la solicitud de patente se reivindica una composición xeroprotectora sintética que comprende: fructosa, ácido glutámico, β -hidroxibutirato, acetato y lactato.

Los documentos D01 y D02 muestran una relación entre la fructosa y la tolerancia a la sequía. En ninguno de estos dos documentos citados se divulga una composición xeroprotectora sintética que comprende: fructosa, ácido glutámico, β -hidroxibutirato, acetato y lactato. Por tanto, teniendo en cuenta la información divulgada en los documentos D01 y D02, las reivindicaciones 1-18 presentan novedad y actividad inventiva según lo establecido en los Artículos 6 y 8 LP11/1986.