

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 395 793**

21 Número de solicitud: 201131299

51 Int. Cl.:

A61K 8/14 (2006.01)

A61K 8/96 (2006.01)

A61K 35/00 (2006.01)

A61K 35/60 (2006.01)

C07K 14/435 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

28.07.2011

43 Fecha de publicación de la solicitud:

15.02.2013

71 Solicitantes:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (100.0%)**

Serrano nº 117

28006 Madrid ES

72 Inventor/es:

CARVAJAL ALCARAZ, Micaela;

GARCÍA VIGUERA, Cristina;

MORENO FERNÁNDEZ, Diego Ángel y

MARTÍNEZ BALLESTA, María Del Carmen

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

54 Título: **PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN Y USOS DE VESÍCULAS DE MEMBRANA DE UN ORGANISMO MARINO PARA SU UTILIZACIÓN INDUSTRIAL.**

57 Resumen:

Procedimiento de obtención y usos de vesículas de membrana de un organismo marino para su utilización industrial.

La presente invención se refiere al uso cosmético o terapéutico de vesículas de membrana obtenidas a partir de un organismo marino. Estas vesículas pueden utilizarse como vehículo y contener en su interior sustancias naturales o sintéticas para su uso terapéutico, cosmético o industrial. Preferiblemente se obtienen a partir de organismos filtradores como la medusa.

ES 2 395 793 A1

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de obtención y usos de vesículas de membrana de un organismo marino para su utilización industrial

SECTOR DE LA TÉCNICA

5 La presente invención se enmarca dentro de los sectores de química y farmacia, y concretamente se refiere a vesículas de membrana de origen natural, concretamente obtenidas a partir de un animal marino, que poseen un elevado contenido en proteínas intrínsecas de membrana y cuya aplicación está dirigida a fines dermatológicos, farmacológicos o terapéuticos.

ESTADO DE LA TÉCNICA

Importancia de las proteínas de membrana

10 En células animales, las proteínas de membrana (PM) representan un punto estratégico para una posible intervención terapéutica, haciendo de las proteínas de membrana objetivos diana para fármacos, en investigación contra el cáncer, por ejemplo (Harvey et al., *Physiol. Genomics* 2001, 5, 129-136). En células animales, la PM controla numerosas funciones primarias tales como el transporte de metabolitos e iones, endocitosis, proliferación celular, etc. Todos estos procesos implican una gran diversidad de proteínas altamente variables en cuanto a estructura y función.

15 Esta enorme variabilidad en la naturaleza de las proteínas de membrana, ha hecho que el número de procesos de extracción de las mismas sea a la vez extenso y específico. Así, además del amplio rango de pesos moleculares y puntos isoelectricos, las proteínas difieren en su naturaleza hidrofóbica, en el caso de proteínas intrínsecas, y en la variabilidad de su contenido de lípidos, lo que hace que no siempre sean fáciles de extraer y purificar, especialmente proteínas con varios dominios transmembrana inmersos en la fase lipídica de la membrana.

20 Por tanto, el uso de vesículas de membrana que contengan una proteína de interés capaz de mantener su funcionalidad y propiedades, puede suponer una ventaja adicional en cuanto a su estabilidad y el coste económico de su obtención.

25 Los movimientos de casi todos los solutos a través de la membrana están mediados por proteínas transportadoras de membrana, más o menos especializadas en el transporte de moléculas concretas. Puesto que la diversidad y fisiología de las distintas células de un organismo está relacionada en buena medida con su capacidad de captar unos u otros elementos externos, se postula que debe existir un acervo de proteínas transportadoras específico para cada tipo celular y para cada momento fisiológico determinado (Lodish et al., 2005; *Biología celular y molecular*; Buenos Aires: Médica Panamericana; ISBN 950-06-1974-3); dicha expresión diferencial se encuentra regulada mediante: la transcripción diferencial de los genes codificantes para esas proteínas y su traducción.

30 Se trata de proteínas transmembrana que poseen multitud de hélices alfa inmersas en la matriz lipídica. Dicha estructura probablemente implique una vía de entrada a través de entornos hidrofílicos proteicos que causarían una disrupción en el medio altamente hidrofóbico constituido por los lípidos (Lodish et al., 2005; *Biología celular y molecular*; Buenos Aires: Médica Panamericana; ISBN 950-06-1974-3). Las proteínas intervienen de diversas formas en el transporte: actúan tanto como bombas impulsadas por ATP, esto es, por energía metabólica, o como canales de difusión facilitada.

35 Algunas de estas proteínas son capaces de transportar agua, iones y pequeños solutos a su través, tales como glicerol y urea, ambos agentes higroscópicos ampliamente usados en cosmética.

40 Un problema adicional en la extracción de proteínas integrales de membrana es el hecho de que éstas son constituyentes minoritarios comparado con otras proteínas solubles celulares. Hasta la fecha se ha conseguido extraer estas proteínas funcionales cuando se encuentran insertadas en la bicapa lipídica.

45 Se ha conseguido obtener proteínas hidrofóbicas de las fracciones de membrana con una menor complejidad y un aceptable rendimiento (superior al 1%, referido como el porcentaje en peso de proteína obtenida en la fracción de membrana respecto al peso total de la proteína en el homogeneizado crudo) mediante el método de extracción de membrana empleado en crustáceos por diversos autores (Cuculescu and Bowler, 1993 *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 10611, No. 2, pp. 263-267, 1993). Sin embargo, por este método se obtienen vesículas a partir de homogenización manual del tejido en gradiente de sacarosa/Percoll requiere emplear agentes caros no extrapolables a su uso industrial durante el proceso, como la histidina, el fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) y trifosfato de adenosina (ATP). Además, requiere un procesamiento del material de partida procedente de dicho crustáceo previo al proceso de extracción de vesículas para desechar el caparazón o exoesqueleto que protege al tejido blando del animal, el cual se emplea posteriormente en el proceso de homogenización y obtención de vesículas.

Durante mucho tiempo los liposomas se han considerado como la mayor contribución innovadora en dermatología con fines farmacéuticos y cosméticos. Sin embargo, debido a su alto coste, la pureza variable de sus fosfolípidos y su naturaleza inestable, los surfactantes que contengan vesículas suponen una ventajosa alternativa. Además, estas vesículas contienen proteínas de membrana intrínsecas capaces de actuar como transportadores de ciertas sustancias.

Importancia de las sustancias procedentes de organismos marinos

El estudio de organismos marinos se ha incrementado en los últimos años debido a su potencial bioactivo. Muchas especies marinas, desde tiburones hasta algas producen compuestos bioactivos con importantes aplicaciones en el campo de la medicina (Amador et al., Progress in the development and acquisition of anticancer agents from marine sources. *Ann Oncol* 2003, 14, 1607-1615; Calvert, Kelp Beds as Fish and Invertebrate Habitat in Southeastern Alaska, Masters Thesis 2005, University of Alaska, Fairbanks, p 113; N. Fusetani, 2000, Introduction. In: N. Fusetani, Editor, *Drugs from the Sea*, Karger, Basel (2000), pp. 1-5; Blunt et al., Marine natural products. *Nat Prod Rep* 2008, 25,35-94).

En el mar Mediterráneo, la mayoría de las moléculas bioactivas (antibacterianos, antifúngicos, antivirales, citotóxicos) se han aislado de especies como algas o fanerógamas y particularmente animales como esponjas, equinodermos, poliquetos, ascidias, moluscos, briozoarios y cnidarios (Ballesteros et al., Biological activity of extract from some Mediterranean macrophytes. *Botanica Marina* 1995, 35, 481-485; Becerro et al., Multiple functions for secondary metabolites in encrusting marine invertebrates. *J. Chem. Ecol.* 1997, 23, 1527-1547).

Así, proteínas procedentes de organismos marinos tienen múltiples aplicaciones. Por ejemplo se están obteniendo moléculas bioluminiscentes, tales como la luciferina, procedentes de organismos del género Cnidaria fundamentalmente, para su uso en el campo de la biología celular y molecular. Así, de la medusa *Aequorea victoria* se obtuvo por primera vez la denominada proteína de fusión verde por cuyo descubrimiento sus autores obtuvieron el premio Nobel de química en 2008.

También, las enzimas procedentes de bacterias marinas tienen diversos usos. Como las proteasas extracelulares que se emplean en detergentes y aplicaciones de limpieza industriales. Otras enzimas son resistentes a salinidad, lo que les confiere características especiales para su uso en determinados sectores industriales, como la ósmosis.

Otros organismos marinos producen sustancias naturales que los protegen a su vez de sustancias patógenas. Usando la biotecnología investigadores de todo el mundo tratan de reproducir los efectos de estas sustancias, al igual que intentan duplicar las sustancias adhesivas producidas por determinados moluscos.

Algunas algas marinas contienen colágeno, proteína que forma parte del organismo en muchos mamíferos y que en humanos constituye el 35% del total de proteínas. Así, un tipo de colágeno (colágeno VIII) forma parte del revestimiento de las vesículas de la sangre, mientras que la piel contiene colágeno tipo I y III fundamentalmente.

Se ha descrito una composición anti-incrustaciones que comprende una enzima que se puede obtener de un organismo marino y un sustrato para dicha enzima [MX PA01012448(A)]. De igual modo, se ha descrito un método para obtener oligosacáridos de quitina específicos procedente de un organismo marino, concretamente *Vibrio furnissii* así como sus aplicaciones [MX PA01004251(A)].

Igualmente se ha descrito el método de obtención de un extracto bioactivo procedente de un organismo marino (*Holothuria scabra*) para usarlo como colorante fluorescente natural y emplearlo en una composición cosmética [DE 10117303(A1)]. Otros extractos de organismos marinos se han empleado también en cosmética [KR 20050078283(A), FR 2590273(A1)].

La proteína denominada acuaporina 3 (AQP3) está presente en la membrana plasmática de los queratinocitos de la epidermis (Sougrat et al., *J. Invest. Dermatol.* 2002, 118, 678-85) y desempeña un importante papel en el control del flujo de agua a través de la piel. Así, estas acuaporinas son capaces de transportar glicerol el cual a su vez está involucrado en la constitución de la película hidrolípida que permite mantener la flexibilidad y cualidades sensoriales del estrato córneo. La hidratación y el contenido de AQP3 en queratinocitos están relacionados y un incremento de AQP3 en la piel supone una mejora de la hidratación de la epidermis (Dumas et al., *J. Drugs Dermatol.* 2007, 6 Suppl, s20-24).

Sin embargo, el reciente descubrimiento de que células del carcinoma de piel en humanos sobre-expresan altamente acuaporinas AQP3 (Hara-Chikuma and Verkman, *Molecular and Cellular Biology* 2008b, 28, 326-332) sugiere ser cautos en el uso de moduladores de la expresión de acuaporinas para promover la hidratación de la piel.

Una alternativa al empleo de ingredientes capaces de activar la síntesis de acuaporinas sería el uso de vesículas de origen natural enriquecidas no sólo en acuaporinas, sino también en otras proteínas de membrana que se emplearían como vehículo lipídico en la liberación de agua u otras sustancias en la epidermis.

En plantas, la extracción de vesículas de membrana se obtiene mediante sucesivas centrifugaciones (Larsson et al., *Methods Enzymol.* 1987, 148, 558-568) que consigue separar la fracción de membrana del resto de fracciones celulares. Para ello, se procede a la homogenización en frío del tejido y separación en dextrano/polietilenglicol.

Se han descrito métodos de extracción para la obtención de fracciones lipídicas a partir de organismos marinos y acuáticos, sin embargo estos métodos emplean disolventes orgánicos tipo cetona [JP 2008150586(A)] o disolventes presurizados como propano, butano o hexano [WO 0023546(A1)] que pueden resultar incompatibles con la posterior aplicación tópica del producto final. Además, estas fracciones lipídicas, comprenden lípidos que no constituyen vesículas completas de membrana, y carecen de las proteínas transportadoras de membrana necesarias para actuar como vehículo de determinadas sustancias.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de vesículas de membrana ricas en proteínas transportadoras de membrana a partir de un organismo marino no explorado para este fin, y en las que, una vez obtenidas, se pueden incluir en su interior otros productos, naturales o sintéticos, con fines dermatológicos, farmacológicos, terapéuticos o industriales, como por ejemplo un producto químico higroscópico.

Entre alguno de los fines industriales, estas vesículas de membrana pueden ser utilizadas por ejemplo para la fabricación de biomembranas que las contengan y permitan el transporte selectivo de determinadas sustancias a través de ellas, ya que estas vesículas son ricas en proteínas transportadoras de membrana.

Un primer aspecto de la invención hace referencia al procedimiento de extracción y uso de un organismo marino, preferentemente de origen animal, para la obtención de vesículas de membrana ricas en proteínas transportadoras.

En la presente invención, la expresión "vesícula de membrana rica en proteínas transportadoras" se refiere a una vesícula de membrana de origen natural a partir de un organismo marino que pertenece a la familia Cnidaria.

De manera general, el procedimiento de obtención de vesículas de membrana (igualmente referido en esta memoria como procedimiento de extracción de vesículas de membrana o procedimiento de la invención) con alto contenido en proteínas intrínsecas de membrana a partir de un organismo marino comprende:

- homogeneización en frío de un tejido proveniente de un animal marino por acción de una homogeneizadora mecánica automática, donde dicho tejido puede ser un animal marino completo o al menos una parte de dicho animal,
- separación de una fracción de membranas por medio de centrifugaciones sucesivas y uso de un sistema de extracción de dos fases acuosas dextrano-polietilenglicol,
- resuspensión de la fracción de membrana en un tampón de conservación farmacéuticamente aceptable.

El proceso de extracción de vesículas de la presente invención se basó en la técnica de Larsson et al., 1987, que se incorpora como referencia en esta memoria. Sin embargo, en la metodología se incluyeron algunas modificaciones que hacen que el proceso se pueda escalar a nivel industrial, pues se abaratan los costes y se acorta el tiempo de extracción.

Así, en lugar de filtración al vacío y homogeneización manual se empleó un sistema de homogeneizado mecánico automático en frío empleando una homogeneizadora mecánica automática tipo batidora mecánica (Politron o Thermomix) con diferentes combinaciones de velocidad y tiempo, en un intervalo de temperatura preferido comprendido entre 4 y 15 °C, y más preferentemente entre 4 y 10 °C, incluídos dichos límites. Sin carácter limitante, la velocidad de homogeneizado varió de 0 a 5000 rpm, con una etapa inicial de entre 0 y 1 min y una velocidad de 1000-4000 rpm y una segunda etapa de homogeneizado entre 0 y 25 s con una velocidad de entre 3000-5000 rpm.

También se realizaron modificaciones en el tampón de conservación, eliminando compuestos que pudieran resultar tóxicos o perjudiciales para la salud humana, como por ejemplo el tampón PIPES que se absorbe a través de la piel y que aparece descrito en el método de extracción publicado, y se sustituyó por un tampón farmacéuticamente aceptable, que de manera preferida fue seleccionado de entre los siguientes: tampón bicarbonato, tampón fosfato, tampón acetato.

La expresión "tampón farmacéuticamente aceptable" se refiere a un tampón que no es biológicamente o de otro modo indeseable, y que se puede administrar a una persona o un animal sin provocar efectos biológicos indeseables o sin interactuar de manera perjudicial con otros productos o componentes contenidos en las vesículas.

En una realización preferida el organismo marino es un animal marino, y más preferiblemente un animal marino filtrador.

Este tipo de animales filtradores se caracterizan por su gran capacidad para transportar agua y otros solutos, debido en parte a la expresión de proteínas específicas para ese fin y que son de utilidad para la presente invención.

A modo de ejemplo, y sin carácter limitante, el animal marino filtrador puede ser un animal filtrador de una especie de los poríferos (*Porifera*), un animal filtrador de una especie de los equinodermos (*Echinodermata*), un animal filtrador de una especie de los poliquetos (*Polychaeta*), un animal filtrador de una especie de los ascidiáceos (*Ascidiacea*), un animal filtrador de una especie de los moluscos (*Mollusca*), un animal filtrador de una especie de los cnidarios (*Cnidaria*), etcétera, y combinaciones de los mismos.

En una realización más preferida el organismo marino filtrador es un animal marino filtrador perteneciente al filo *Cnidaria*, y más preferiblemente, perteneciente a la clase *Scyphozoa* (escifozoos).

El término filo (también referido en taxonomía como división) se refiere a la categoría taxonómica fundamental de la clasificación biológica, que agrupa a los organismos de ascendencia común y que responden a un mismo modelo de organización, como por ejemplo los moluscos, los cordados o los anélidos.

El término clase hace referencia al grupo taxonómico situado entre las categorías taxonómicas filo o división y orden, que comprende varios órdenes de plantas o de animales con muchos caracteres comunes.

Un segundo aspecto hace referencia a las vesículas de membrana que, obtenidas según la metodología anterior, comprenden una cantidad efectiva de proteínas de membrana para su aplicación en los diferentes campos, y más preferiblemente, para su aplicación con fines cosméticos, farmacológicos o terapéuticos.

En la presente invención "cantidad efectiva" se refiere a la cantidad de proteínas de membrana suficiente en las vesículas obtenidas mediante el procedimiento de la invención para que sean eficaces a nivel de hidratación/aplicación sanitaria tanto para humanos como para animales.

Un tercer aspecto de la presente invención hace referencia a los campos de aplicación de las vesículas de membrana obtenidas a partir de un organismo marino, las cuales permiten la liberación de agua u otras sustancias, y también pueden actuar como biofiltros.

En el ámbito de esta memoria biofiltros, también denominados filtros biológicos, se refiere a los dispositivos obtenidos de material orgánico utilizados para filtrar y eliminar una amplia gama de compuestos. En este sentido, las vesículas de la presente invención pueden ser utilizadas como biofiltros, para filtrar aguas, fluidos químicos o biológicos, y más concretamente referidos, por ejemplo, a filtros para purificación de aguas o filtros para diálisis sanguínea.

En este sentido, una aplicación se refiere al uso de estas vesículas de membrana enriquecidas en proteínas transportadoras de membrana a nivel de explotación comercial, ya que pueden ser un medio natural de liberación bien de agua, sustancias bioactivas, agentes higroscópicos, sales u otras sustancias químicas tales como antibióticos o cualquier formulación con fines cosméticos o terapéuticos. En consecuencia, uno de los aspectos de la invención se refiere a las vesículas de membrana de la presente invención para su aplicación con fines cosméticos, farmacológicos o terapéuticos.

En el tratamiento de un proceso fisiopatológico, es deseable que la administración de medicamentos se realice de forma que el fármaco alcance su lugar de actuación a una determinada concentración. En esta línea, se han empleado como vectores de fármacos lipoproteínas y glucoproteínas entre otros, que poseen la ventaja de ser biodegradables y endocitables.

Por otra parte es ampliamente conocido que los lisosomas son vesículas microscópicas constituidas por bicapas fosfolípídicas concéntricas con compartimentos acuosos que tienen la capacidad de captar una gran variedad de sustancias activas hidrosolubles, liposolubles o anfifílicas.

Por lo tanto, y en base a lo anterior, esta invención hace referencia al uso de las vesículas de membrana de origen animal como sistema de transporte o vectores de determinadas sustancias para su aplicación tópica (cremas, champú, pomadas, sueros, tónicos) cosmética y/o terapéutica.

Estas vesículas de membrana contienen proteínas transportadoras de membrana en su estructura permitiendo la liberación de agua, iones y otras sustancias, como urea y glicerol (agentes hidratantes), capaces de ser transportados por las proteínas de membrana, y por tanto de ser empleadas en formulaciones cosméticas o dermatológicas con fines hidratantes o en la cura de suturas, quemaduras y otras heridas.

Así mismo, la invención hace referencia al uso de vesículas de membrana que pueden incluir la toxina que liberan las medusas con utilidades terapéuticas y el colágeno extraído de la propia medusa. También se pueden incluir compuestos de origen vegetal (bien vitaminas, proteínas, ácidos grasos, glucosinolatos, o compuestos fenólicos), con capacidad antioxidante y/o hidratante para emplearlas en las formulaciones preparadas para tal fin.

5 Dicho de otro modo, otro aspecto de la invención se refiere al uso de una vesícula obtenida según el procedimiento anteriormente descrito, como sistema de transporte o vector de al menos una sustancia adicional (compuesto bioactivo o farmacéutico), para que puedan ser aplicadas con fines cosméticos, farmacológicos o terapéuticos. En una realización preferida, el uso de esta vesícula obtenida por el procedimiento de la presente invención, es como sistema de transporte o vector de una toxina de medusa con utilidades terapéuticas.

10 Además, en otro aspecto, la invención se refiere a las vesículas que además incorporan, ya sea en su membrana o en su interior, al menos una sustancia adicional capaz de ser aplicada con fines cosméticos, farmacológicos y/o terapéuticos.

15 A modo de ejemplo, y sin que sirva de limitación, dichas sustancias adicionales pueden ser un compuesto bioactivo natural (como por ejemplo un compuesto de origen vegetal con propiedad antioxidante y/o hidratante, tal como una vitamina, una proteína, un ácido graso, un glucosinolato, un compuesto fenólico, un agente higroscópico natural -por ejemplo urea, glicerol,...-, una toxina de medusa, etc.), un agente químico sintético (por ejemplo un antibiótico sintético, un agente higroscópico sintético, etc.)..., así como una combinación de los mismos.

20 En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica o a una composición cosmética que comprende una cantidad aceptable efectiva de al menos una de las vesículas de membrana de origen marino ricas en proteínas transportadoras de membrana objeto de la presente invención, ya sea conteniendo o no sustancias adicionales. Es asimismo objeto de esta invención, el uso de dichas vesículas de membrana para la preparación de una composición farmacéutica o de una composición cosmética.

En la presente memoria, "cantidad aceptable efectiva de vesículas de membrana" se refiere a una cantidad de vesículas de membrana suficiente para que sea efectiva en el uso que se pretende.

25 Otro aspecto de la invención se refiere a una de las vesículas de la presente invención o a una composición farmacéutica que la comprenda, para su uso en medicina. En una realización preferida dicha vesícula o dicha composición farmacéutica se utiliza en el tratamiento de hidratación de la piel, en el tratamiento de una quemadura, en el tratamiento de una herida o en el tratamiento de una sutura.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

30 **Fig. 1.** Vesículas de membrana resultantes de la extracción a partir del organismo marino. Se muestra el precipitado de vesículas de membrana plasmática obtenido por homogenización y separación por centrifugación.

35 **Fig. 2.** Comparativa del efecto hidratante de vesículas con y sin agente higroscópico. La concentración de proteína de membrana plasmática presente en vesículas para la aplicación fue de $2 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$. ■ Aplicación de vesículas con agente higroscópico; ♦ Aplicación de vesículas sin agente higroscópico; ▲ Aplicación directa sin vesículas del agente higroscópico.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1: Procedimiento de extracción de proteínas de membrana de origen animal (Fig. 1)

40 La extracción de proteínas se hizo de forma automática partiendo de tejido de *Scyphozoa* (20 g) proveniente de las partes del animal umbrella, subumbrella y tentáculos. Dicho tejido se homogeneizó empleando una homogenizadora con una etapa inicial de homogenizado de 15 segundos a 4000 rpm y una segunda etapa de 20 segundos a 5000 rpm. La muestra de tejido se homogeniza con tampón de extracción en una relación 2/1 de tampón/muestra.

45 El tampón de extracción contenía ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil]etanosulfónico (HEPES) 50 mM y manitol 0.5 M (pH 7.5), a esta disolución se le adicionó posteriormente ditiotreitól (DTT) 1 mM, ácido ascórbico 5 mM y polivinilpirrolidona (PVP) insoluble 0.6% (p/v) glicerol 10% y β -glicerofosfato 5 mM.

50 El homogenado se centrifugó a 10.000 g durante 20 minutos en frío a 4°C y el sobrenadante se recolectó y se volvió a centrifugar a 55.000 g durante 35 minutos a 4°C. El precipitado se resuspendió en 2 ml de tampón de resuspensión (manitol 0.3 M en tampón bicarbonato 5 mM pH 7.0 – 8.0). En este momento se añade la muestra al sistema de doble fase y se centrifuga en frío a 4°C a 6000 g. La fase superior se volvió a centrifugar a a 55.000 g durante 35 minutos a 4°C y se resuspende la muestra en 1ml tampón final (HEPES 5mM - sacarosa 0.3M). El rendimiento de proteína de membrana plasmática osciló entre 7-10 mg/ml. En esponja *Suberites domuncula* el rendimiento fue de 6.6 mg/ml (Müller et al., 1996 Marine Biology 125:165-170).

ES 2 395 793 A1

Para la incorporación de sustancias adicionales al interior de las vesículas, se procedió a añadir la sustancia adicional al medio de resuspensión de las vesículas en frío (4°C) en molaridad equivalente a la concentración de proteínas de las vesículas. Posteriormente, se procedió a una agitación de 10 segundos a 5000 rpm. Posteriormente, se centrifugó a 55.000 g durante 35 minutos a 4°C.

5 En la tabla 1 se puede apreciar un listado de proteínas de membrana identificadas mediante HPLC-MS-MS en el organismo marino.

Tabla 1. Proteínas de membrana identificadas en vesículas aisladas en el organismo marino objeto de la invención.

Peptidos	Peso Mol.	Especie	Proteína
1	29154,6	<i>Danio rerio</i>	Aquaporina 1a
1	3909,5	<i>Xenopus tropicalis</i>	RuvB- 1
1	8813,1	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Proteína hipotética C52G5.3
1	11915,9	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Proteína hipotética F34H10.2
1	15943,2	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Complexina (proteína sináptica) Miembro de la familia de homologos (cpx-1)
1	16890,3	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Proteína hipotética R11G11.6
1	17195,6	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Proteína hipotética T02H6.8
1	19186,9	<i>Danio rerio</i>	Proteína hipotética LOC566423
1	19695,9	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Familia MLP/CRP (Musculo LIM Protein/Cisteina-enriquecida) (mlp-1)
1	21044,5	<i>Danio rerio</i>	Clase A proteína 15 básica hélice-loop-hélice
1	21049,8	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Proteína hipotética Y54G2A.44
1	21187,8	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Proteína hipotética F42F12.4
1	23183,0	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Proteína hipotética C34B2.5
1	24135,1	<i>Danio rerio</i>	Componente complemento C8 cadena gamma
1	24307,4	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Proteína hipotética F33C8.4
1	25206,2	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Proteína hipotética B0507.4
1	28841,9	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Miembro homólogo de la familia (nth-1) NTH (como endonucleasa 3)
1	31453,6	<i>Danio rerio</i>	Proteína Rab-40B ras
1	31763,4	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Proteína hipotética F58F9.8
1	33515,7	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Proteína hipotética ZK177.2
1	33654,1	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Proteína hipotética Y53F4B.36
1	33654,1	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Proteína hipotética Y53F4B.36
1	33681,6	<i>Xenopus laevis</i>	Proteína desacopladora 3 (transportador de cationes mitocondrial)
1	34061,4	<i>Xenopus laevis</i>	Proteína hipotética LOC414618
1	34338,7	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Proteína hipotética Y71G12B.10
1	35824,5	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Proteína hipotética F53B6.7

ES 2 395 793 A1

1	35888,0	<i>Danio rerio</i>	Subunidad 2 de canal de calcio dependiente de voltaje
1	36212,5	<i>Xenopus laevis</i>	MGC52890 proteina
1	37273,7	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Receptor de Serpentina, Clase E(epsilon), miembro de la familia (ser-9)
1	37744,7	<i>Xenopus laevis</i>	serina/treonina kinasa 35
1	38250,7	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Miembro de la familia (srw-75) Receptor serpentín clase W.
1	39923,3	<i>Xenopus laevis</i>	Proteína Efector rab9 con motivos kelch
1	39972,0	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Proteína hipotética Y41D4B.11
1	41815,8	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Proteína hipotética C13A2.12
5	41838,1	<i>Danio rerio</i>	actina, citoplasmática tipo 5
1	42055,3	<i>Danio rerio</i>	Actina del musculo aortico
1	43005,6	<i>Danio rerio</i>	metionina adenosil transferasa
1	43111,5	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Proteína hipotética K09H9.1
1	43731,3	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Proteína hipotética C31B8.4
1	44136,3	<i>Danio rerio</i>	Proteina como gag
1	44229,2	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Miembro de la familia que contiene dominios BTB y MATH
1	44368,2	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Proteína hipotética T25F10.6
1	45370,8	<i>Danio rerio</i>	HomologoLAG1, ceramida sintasa 2
1	45388,5	<i>Danio rerio</i>	Proteína de dedos de Zn AEBP2
1	45456,6	<i>Danio rerio</i>	Proteina Tmem184a
1	45601,7	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Proteína hipotética F47G6.3
1	45806,5	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Proteína hipotética T05H10.6
1	46619,2	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Proteína hipotética Y48B6A.5
1	46786,0	<i>Danio rerio</i>	protein kinasa C
1	47208,8	<i>Danio rerio</i>	flotilina 1b
1	47261,6	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Proteína hipotética T24B8.2
1	48733,2	<i>Danio rerio</i>	Factor crecimiento/diferenciación 9
1	49167,4	<i>Danio rerio</i>	Proteína hipotética LOC678521
1	49736,4	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Proteína hipotética Y38E10A.t
4	49816,3	<i>Xenopus laevis</i>	Cadena de tubulina beta-4
5	49826,3	<i>Danio rerio</i>	Beta tubulina clase
5	50180,0	<i>Danio rerio</i>	Tubulina alpha-1B
2	50668,6	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Factor de elongación (eft-3)

ES 2 395 793 A1

1	50751,5	<i>Danio rerio</i>	Proteína 3 lipido transferasa stAR-relacionada
1	50900,0	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Proteína hipotética Y38F2AR.6
1	51793,6	<i>Xenopus laevis</i>	proteina MGC84721
1	51807,4	<i>Caenorhabditis elegans</i>	GDI (RabGDP inhibidor de disociación) (gdi-1)
1	52081,4	<i>Xenopus laevis</i>	LOC733413 proteina
1	53593,7	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Ciclina-Dependiente miembro de la familia kinasa(cdk-9)
1	54196,3	<i>Danio rerio</i>	calcio/calmodulina-dependiente protein kinasa tipo II delta 1 isoforma 2 de la cadena
1	55004,7	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Miembro de la familia INneXin (inx-21)
1	55265,2	<i>Danio rerio</i>	Nuevo dominio de proteína de dedos de Zn
1	57249,7	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Proteína hipotética F57B7.1
6	57527,1	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Subunidad de la familia ATP sintasa (atp-2)
1	57654,2	<i>Xenopus laevis</i>	LOC431899 proteina
1	58338,4	<i>Danio rerio</i>	Proteina Qrs1
1	58471,3	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Flavina Miembro de la familia MonoOxygenasa (fmo-3)
1	58495,6	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Proteina hipotetica C39B5.6
1	58950,8	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Proteína hipotética C46A5.2
1	59229,2	<i>Xenopus laevis</i>	Peptidilprolil isomerasa- 2
1	59888,2	<i>Xenopus laevis</i>	ATP syntasa subunidad alpha, mitocondrial
1	60065,8	<i>Xenopus laevis</i>	Fosfoglucomutasa 3
1	60116,1	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Proteína hipotética Y51H4A.25
1	60303,2	<i>Danio rerio</i>	Dominio que contiene proteina 2 de esperma movil
1	60844,6	<i>Danio rerio</i>	Harmonina
1	61414,2	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Proteína hipotética F28H7.6
1	61892,7	<i>Danio rerio</i>	Hidrolasa de epoxido 2
1	62425,8	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Proteína hipotética T10B11.2
1	64870,6	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Protein fosfatasa 2A (Two A) Miembro de la subunidad reguladora (pptr-2)
1	65552,7	<i>Danio rerio</i>	Proteina Aatf
1	65772,0	<i>Xenopus laevis</i>	Mediador de la RNA polymerasa II subunidad de transcripción 26
1	66084,3	<i>Danio rerio</i>	Ligatina
1	66890,1	<i>Danio rerio</i>	NADPH-dependiente diflavina oxidoreductasa 1
1	66906,4	<i>Caenorhabditis elegans</i>	WHiTe (wht-1) familia de transporte ABC

ES 2 395 793 A1

			relacionada
1	68060,2	<i>Danio rerio</i>	Proteína como CG17293-PA-
1	68135,9	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Proteína hipotética Y104H12D.3
1	69070,9	<i>Danio rerio</i>	Criptocromo 1b
1	69435,3	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Proteína hipotética T04G9.6
1	69955,7	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Proteína hipotética W03B1.9
1	70484,7	<i>Danio rerio</i>	Ciclo de división celular 16
1	70638,6	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Proteína hipotética C41C4.3
1	70960,8	<i>Xenopus laevis</i>	Plastina 3
1	71408,2	<i>Xenopus laevis</i>	Protein kinasa D1
1	72735,6	<i>Xenopus laevis</i>	Proteína MGC83110
1	74788,9	<i>Xenopus laevis</i>	Proteína LOC398650
1	74819,8	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Proteína hipotética C16A11.5
1	75039,0	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Proteína hipotética T05G5.9
1	75223,3	<i>Xenopus laevis</i>	Proteína de dedos de Zn y BTB dominio
1	75913,4	<i>Danio rerio</i>	Protein kinasa 1cGMP-dependiente
1	78281,1	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Miembro de la familia (ntl-3). Proteína como NOT (componente del complejo CCR4/NOT de levadura)
1	78421,5	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Proteína hipotética T20B6.2
1	78982,8	<i>Xenopus laevis</i>	Proteína LOC446929
1	78988,8	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Proteína hipotética F14D12.1
1	79973,0	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Proteína hipotética Y39G10AR.10
1	80561,3	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Proteína hipotética Y75B8A.19
1	81198,6	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Proteína hipotética Y41D4B.4
1	81611,3	<i>Danio rerio</i>	neurofilamento, polipeptido medio
1	82568,7	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Proteína B0361.8
1	83151,6	<i>Danio rerio</i>	Proteína 30 F-box
1	83346,1	<i>Danio rerio</i>	Proteína novel similar a humanos y ratón, proteína de interacción 2 CASK (CASKIN2)
1	83382,6	<i>Xenopus laevis</i>	Proteína B myb-relacionada
1	83574,9	<i>Xenopus tropicalis</i>	E1A proteína de unión p300
1	85633,2	<i>Danio rerio</i>	Musculo a de fosfofructokinasa
1	86229,9	<i>Danio rerio</i>	Subunidad 7 del complejo de Golgi oligomérico conservado.
1	88406,8	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Proteína hipotética T04F8.6
1	88406,8	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Proteína hipotética T04F8.6

ES 2 395 793 A1

1	88439,7	<i>Xenopus laevis</i>	Receptor de la subfamilia C de canal de cationes. Miembro 4 de la proteína asociada.
1	88948,8	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Proteína hipotética C37H5.5
1	89494,7	<i>Danio rerio</i>	Proteína hipotética LOC563679
1	94147,3	<i>Xenopus laevis</i>	Motivo 12 de proteína de unión de RNA
1	96583,1	<i>Danio rerio</i>	Fosfolipasa DDHD1
1	99050,6	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Proteína hipotética T04C9.1
1	99151,3	<i>Danio rerio</i>	Miembro 1 de la ATP-sub-familia
1	99566,4	<i>Xenopus laevis</i>	Familia con secuencia similar 59, miembro B
1	103471,9	<i>Xenopus laevis</i>	Proteína LOC495508
1	103913,2	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Proteína hipotética Y71A12B.17
1	106368,5	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Transportador de Anion/Bicarbonato (abts-4)
1	108092,1	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Canal de K+ EAG EGL-2
1	108122,0	<i>Danio rerio</i>	Transportador de solutos 8 1a (sodio/calcio intercambiador),
1	108531,2	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Proteína hipotética F56D12.6
1	111666,1	<i>Xenopus laevis</i>	contactina 1
1	112697,8	<i>Xenopus laevis</i>	poli [ADP-ribosa] polymerasa 1
1	118921,6	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Miembro de la familia Valil tRNA Sintetasa (vrs-2)
1	119444,0	<i>Danio rerio</i>	importina-7
1	129275,1	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Factor de iniciación 4G (eIF4G) miembro de la familia(ifg-1)
1	131465,4	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Proteína hipotética F29D11.2
1	133358,2	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Miembro de la familia (spt-5) SPT factor de transcripción (spt-5)
1	133819,5	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Proteína hipotética F49E2.5
1	134478,0	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Na-K-Cl Cotransportador homologo (nkcc-1)
1	137274,6	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Proteína hipotética F26D2.10
1	140213,0	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Familia con centro kinasa germinal (gck-4)
1	145710,5	<i>Danio rerio</i>	erbB-3a
1	148982,4	<i>Xenopus laevis</i>	Familia GLI dedo de zinc 2
1	151064,9	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Proteína hipotética H08M01.2
1	160719,4	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Proteína hipotética F47E1.2
1	175255,6	<i>Danio rerio</i>	Proteína Zgc:63504
1	177863,7	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Proteína hipotética T23F2.2

1	180400,4	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Poros nuclear complejo de la familia de proteínas (npp-10)
1	195781,2	<i>Caenorhabditis elegans</i>	PLexina (plx-2)
1	197587,6	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Proteína hipotética F08F8.4
1	217742,0	<i>Caenorhabditis elegans</i>	plexina A
1	245904,7	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Proteína hipotética Y40C5A.3
1	270640,2	<i>Danio rerio</i>	Talina-1
1	306674,1	<i>Xenopus laevis</i>	Receptor tipo 1 de inositol 1,4,5-trifosfato,
1	403515,1	<i>Danio rerio</i>	subunidad alpha-5 laminina
1	492664,7	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Proteína hipotética F55F10.1

EJEMPLO 3. Ensayo de hidratación de las vesículas sobre la piel.

5 El ensayo se realizó con 5 voluntarios cuya piel tenía valores moderados de pérdida de agua. El proceso se realizó con vesículas puras en concentración de $2 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ en tampón de conservación descrito en el ejemplo 1. Se realizó un estudio comparativo de vesículas que contenían un agente higroscópico y sin el agente higroscópico. Se comparó con el agente higroscópico sólo. Las medidas se realizaron cada 24 h sobre la piel de dorso de la mano. El tratamiento cesó al tercer día.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de obtención de vesículas de membrana con alto contenido en proteínas intrínsecas de membrana a partir de un organismo marino, caracterizado porque comprende:
 - 5 - homogenización en frío de un tejido proveniente de un animal marino por acción de una homogeneizadora mecánica automática,
 - separación de una fracción de membranas por medio de centrifugaciones sucesivas y uso de un sistema de extracción de dos fases acuosas dextrano-polietilenglicol,
 - resuspensión de la fracción de membrana plasmática en un tampón de conservación farmacéuticamente aceptable.
- 10 2. Procedimiento según la reivindicación 1 caracterizado porque el organismo marino es un animal marino.
3. Procedimiento según la reivindicación 2 caracterizado porque el animal marino es un animal marino filtrador.
4. Procedimiento según la reivindicación 3 caracterizado porque el animal marino filtrador pertenece al filo *Cnidaria*.
- 15 5. Procedimiento según la reivindicación 4 caracterizado porque el animal perteneciente al filo *Cnidaria* pertenece a la clase *Scyphozoa*.
6. Procedimiento según la reivindicación 1 caracterizado porque el tampón de conservación farmacéuticamente aceptable es seleccionado dentro del grupo compuesto por: tampón fosfato, tampón bicarbonato y tampón acetato.
7. Vesícula obtenible mediante el procedimiento descrito en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
- 20 8. Vesícula de acuerdo a la reivindicación 7 caracterizada porque comprende una cantidad efectiva de proteínas transportadoras intrínsecas de membrana para su aplicación con fines cosméticos, farmacológicos o terapéuticos.
9. Uso de una vesícula de una de las reivindicaciones 7 u 8 como sistema de transporte o vector de al menos una sustancia adicional.
- 25 10. Uso según la reivindicación 9, caracterizado porque la sustancia adicional es seleccionada entre un compuesto bioactivo natural, un agente químico sintético, y combinaciones de los mismos.
11. Uso según la reivindicación 10, caracterizado porque el compuesto bioactivo natural es una toxina de medusa.
- 30 12. Uso según la reivindicación 10, caracterizado porque el compuesto bioactivo natural es un compuesto de origen vegetal con propiedad antioxidante, hidratante o una combinación de ambas propiedades.
13. Vesícula de acuerdo a una de las reivindicaciones 7 u 8 caracterizada porque además incorpora en su membrana o en su interior al menos una sustancia adicional capaz de ser aplicada con fines cosméticos, farmacológicos o terapéuticos.
- 35 14. Vesícula de acuerdo a la reivindicación 13 caracterizada porque la sustancia adicional es seleccionada entre un compuesto bioactivo natural, un agente químico sintético, y combinaciones de los mismos.
15. Vesícula de acuerdo a la reivindicación 14 caracterizada porque el compuesto bioactivo natural es un compuesto de origen vegetal con propiedad antioxidante, hidratante o una combinación de ambas propiedades.
- 40 16. Uso de la vesícula de una de las reivindicaciones 7, 8, 13, 14 ó 15 para la preparación de una composición farmacéutica o de una composición cosmética.
17. Composición farmacéutica que comprende al menos una cantidad aceptable efectiva de al menos una vesícula de una de las reivindicaciones 7, 8, 13, 14 ó 15.
18. Composición cosmética que comprende al menos una cantidad aceptable efectiva de al menos una vesícula de una de las reivindicaciones 7, 8, 13, 14 ó 15.
- 45 19. La vesícula de una de las reivindicaciones 7, 8, 13, 14 ó 15, o la composición farmacéutica de la reivindicación 17 para su uso en medicina.

20. La vesícula de una de las reivindicaciones 7, 8, 13, 14 ó 15, o la composición farmacéutica de la reivindicación 17 para su uso en el tratamiento de hidratación de la piel, en el tratamiento de una quemadura, en el tratamiento de una herida o en el tratamiento de una sutura.
21. Uso de la vesícula de la reivindicación 7 como biofiltro.

5

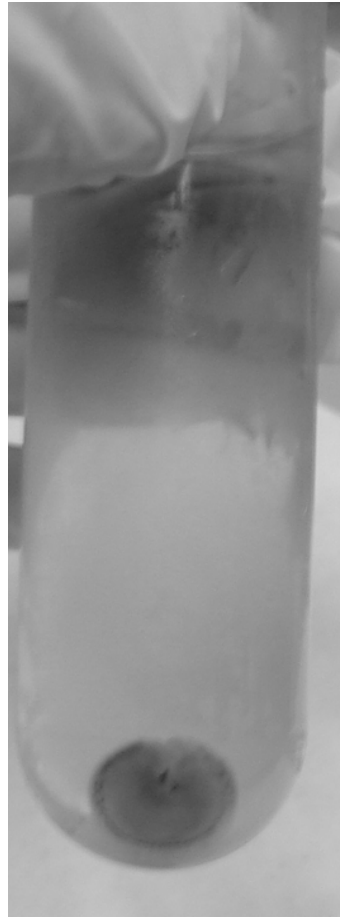


Figura 1

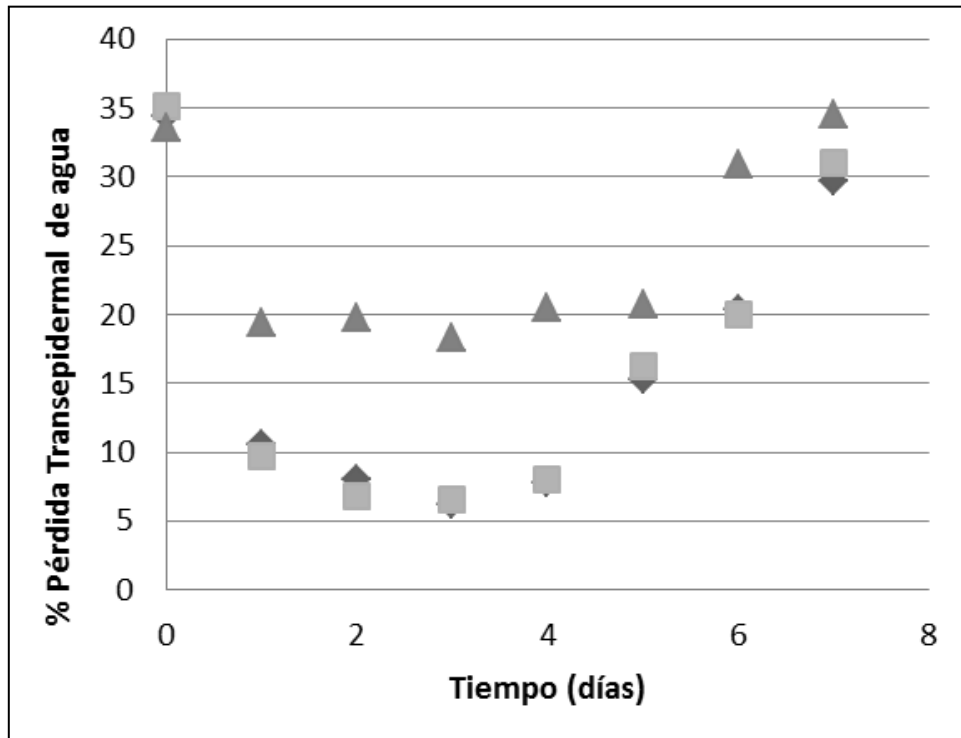


Figura 2



②① N.º solicitud: 201131299

②② Fecha de presentación de la solicitud: 28.07.2011

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	HARTMANN, A y HEILBRONN, E. Synaptic membranes from <i>Torpedo marmorata</i> electric organ. 1. Separation and analysis of nicotinic acetylcholine receptor and acetylcholinesterase-containing membrane vesicles using aqueous two-phase systems. <i>Biochemica et Biophysica Acta</i> , 1978, vol. 513, páginas 382-394.	1-4,6-8,13,14,16, 17,19,20
X	BUCK, M y SCHLICHTER, D. Driving forces for the uphill transport of amino acids into epidermal brush border membrane vesicles of the sea anemone, <i>Anemona sulcata</i> (Cnidaria, Anthozoa). <i>Comp. Biochem. Physiol.</i> , 1987, vol. 88A (2), páginas 273-279.	7-10,13,14,16, 17,19,20
X	MÜLLER, W.E.G et al. The multixenobiotic resistance mechanism in the marine sponge <i>Suberites domuncula</i> : its potential applicability for the evaluation of environmental pollution by toxic compounds. <i>Marine Biology</i> , 1996, vol. 125, páginas 165-170.	7-10,13,14,16, 17,19,20
X	KURELEC, B y PIVCEVIC, B. Evidence for a multixenobiotic resistance mechanism in the mussel <i>Mytilus galloprovincialis</i> . <i>Aquatic Toxicology</i> , 1991, vol. 19, páginas 291-302.	7-10,13,14,16, 17,19,20
X	CUCUSLESCU, M y BOWLER, K. The isolation of a plasma membrane-rich fraction from the skeletal muscle of two species of marine crab, <i>Carcinus maenas</i> and <i>Cancer pagurus</i> . <i>Comp. Biochem. Physiol.</i> , 1993, vol 106B (2), páginas 263-267.	7-10,13,14,16, 17,19,20
A	MORRÉ D. J y MORRÉ, D.M. Preparation of mammalian plasma membranes by aqueous two-phase partition. Cell membrane technique-part 2. <i>Biotechniques</i> , 1989, vol 7 (9), páginas 946-958.	1
A	UEHARA, S y UYEMURA, K. Isolation of neuronal plasma membranes from the crayfish <i>Procambarus clarkii</i> , with an aqueous two phase polymer system followed by sucrose density gradient centrifugation. <i>Biochimica et Biophysica Acta</i> , 1979, vol. 556, páginas 96-104.	1
A	US 6899863 B1 (ANOSYS, INC. INSTITUTE CURIE. INSTITUTE NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE.) 31.05.2005, columna 1.	16,17

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:

Examinador
A. I. Polo Diez

Página
1/5

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K8/14 (2006.01)

A61K8/96 (2006.01)

A61K35/00 (2006.01)

A61K35/60 (2006.01)

C07K14/435 (2006.01)

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

A61K, C07K

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, MEDLINE, BIOSIS, INTERNET

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 13.12.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 3-5, 11, 12, 15-18, 21	SI
	Reivindicaciones 1, 2, 6-10, 13, 14, 19, 20	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 5, 11, 12, 15, 18, 21	SI
	Reivindicaciones 1-4, 6-10, 13, 14, 16, 17, 19, 20	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	HARTMANN, A y HEILBRONN, E.	1978
D02	BUCK, M y SCHLICHTER, D	1987
D03	MÜLLER, W.E.G et al.	1996
D04	KURELEC, B y PIVCEVIC, B.	1991
D05	CUCUSLESCU, M y BOWLER, K.	1993
D06	MORRÉ D. J y MORRÉ, D.M.	1998
D07	UEHARA, S y UYEMURA, K.	1979
D08	US 6899863 B1 (ANOSYS, INC. INSTITUTE CURIE.)	31.05.2005

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

La invención se refiere a un procedimiento de obtención de vesículas de membrana (reivindicaciones 1 a 6), a las vesículas obtenibles por este procedimiento (reivindicaciones 7, 8, 19, 20), a usos de estas vesículas (reivindicaciones 9-12, 16, 21), a composiciones que contienen dichas vesículas (reivindicaciones 17 y 18) y a éstas vesículas que incorporan sustancias adicionales (reivindicaciones 13-15).

Novedad (art. 6.1 L.P)

El documento D1 utiliza un procedimiento para separar vesículas de membrana de un organismo marino (*Torpedo marmorata*) igual al definido en la primera reivindicación de la solicitud ya que el procedimiento comprende las etapas de homogenizar en frío un órgano de dicho organismo, centrifugar y utilizar un sistema dextrano-polietilenglicol para extraer las vesículas. Por último, las vesículas obtenidas se resuspenden en un tampón fosfato. Las vesículas obtenidas contienen enzimas y receptores.

Este documento afecta a la novedad de las reivindicaciones de procedimiento 1, 2 y 6 y a las de producto 7, 8, 13, 14, 19 y 20.

Por otra parte, los documentos D2 a D5 describen vesículas de membrana obtenidas a partir de organismos marinos diversos: un cnidario de la especie *Anemona sulcata* (D2), un porífero de la especie *Suberites domuncula* (D3), un molusco de la especie *Mytilus galloprovincialis* (D4) o un crustáceo del género *Carcinus* (D5).

En ninguno de estos casos el procedimiento de obtención de dichas vesículas es el mismo que el descrito en la solicitud. Sin embargo, hay que tener en cuenta que para juzgar la novedad de un producto (en este caso las vesículas) hay que considerar las características del producto en sí y compararlas con las características del producto aunque haya sido obtenido por otros procedimientos.

Las vesículas de membrana de las reivindicaciones 7, 8, 13, 14, 19 y 20 tienen como única característica común que provienen de cualquier organismo marino, es decir, en estas reivindicaciones se incluyen las vesículas de cualquier ser vivo (bacteria, vegetal, animal, etc.) que viva en el medio marino. No parece que el procedimiento de la reivindicación 1 llevado a cabo para obtener las membranas les confiera a éstas ninguna propiedad que las pueda diferenciar de otras vesículas de origen marino pero obtenidas por otro procedimiento. Según la descripción, el procedimiento utilizado afecta únicamente a los costes, rendimiento, tiempo de extracción de las vesículas (página 8, línea 29-página 9, línea 2).

Por tanto, se considera que cualquiera de los documentos D2 a D5 por separado afectan a la novedad de las reivindicaciones 7, 8, 13, 14, 19, 20 pues describen vesículas iguales a las de dichas reivindicaciones.

Estos documentos divulgan asimismo la importancia de las vesículas de membrana en el transporte de diversas sustancias, por lo que se considera las reivindicaciones 9 y 10 de la solicitud que hace referencia al uso de las vesículas de membrana en el transporte de sustancias tampoco son nuevas.

En resumen, las reivindicaciones 1, 2, 6-10, 13, 14, 19 y 20 carecen de novedad a la vista de los documentos D1 a D5.

Actividad inventiva (art. 8.1 de L.P)

Las reivindicaciones dependientes 3, 4, 16, 17 no contienen características que, en combinación con las características de las que dependen, les confieran actividad inventiva. Se trata de características ya divulgadas en el estado de la técnica y, por tanto, evidentes para el experto en la materia.

Las reivindicaciones 3 a 4 se refieren a que el procedimiento reivindicado en la reivindicación 1 se lleve a cabo en un tipo concreto de organismo marino (organismos filtradores y cnidarios).

Como se puede ver en el estado de la técnica (documentos D1, D6 y D7), aunque en un principio, el procedimiento se utilizó únicamente en plantas, se ha generalizado con éxito para grupos de animales muy dispares desde mamíferos a peces o crustáceos, por lo que es de esperar que este procedimiento permita obtener vesículas en cualquier tipo de organismo. Este procedimiento es rápido, reproducible y fácil, además de conservar la estabilidad de las vesículas. Es por ello que un experto en la materia lo emplearía como sustituto de cualquier otro procedimiento que se haya utilizado para obtener vesículas de cualquier organismo, con razonables probabilidades de éxito, y, sin ejercer actividad inventiva.

En cuanto a las reivindicaciones 16 a 17, que se refieren al uso las vesículas para la preparación de composiciones farmacéuticas, así como las composiciones que las contienen, se considera que estos los usos farmacéuticos de las vesículas (para vacunación, marcadores tumorales, etc.) ya han sido anteriormente divulgados para otras vesículas de membrana (ver documento D8, columna 1) por lo que dicha utilización sería obvia para un experto en la materia

Sin embargo, las reivindicaciones 5, 11, 12, 15, 18 y 21 contienen características que no han sido divulgadas en el estado de la técnica. Se recomienda elaborar una nueva redacción de las reivindicaciones en las que se incluyan aquellas características tanto de las reivindicaciones como de la descripción que puedan otorgar novedad y actividad inventiva a la solicitud. Las reivindicaciones debe estar soportadas por la descripción, de manera dichas reivindicaciones deben ceñirse a aquello que se ha descrito y a aquellas características que se han comprobado.

En este sentido, la característica de poseer un elevado contenido en proteínas intrínsecas que se atribuye a todas las vesículas de los organismos marinos obtenidas por el procedimiento reivindicado no parece ser una característica debida al procedimiento de obtención ni común a todo los organismo, sino que más bien parece que se debe a que se parte de un organismo concreto de la familia Cnidaria (página 8, línea 8-11). No existen suficientes ejemplos ni datos en la descripción como para afirmar que cualquier vesícula de membrana obtenida de cualquier organismo marino por el procedimiento descrito vaya a tener dicha característica.