

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 534 720**

51 Int. Cl.:

A01N 1/02 (2006.01)

C09K 5/20 (2006.01)

C09K 3/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.11.2000 E 00992378 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.01.2015 EP 1242558**

54 Título: **Prevención de la nucleación de hielo por medio de poliglicerol**

30 Prioridad:

30.11.1999 US 167963 P

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

27.04.2015

73 Titular/es:

**21ST CENTURY MEDICINE (100.0%)
10844 EDISON COURT
RANCHO CUCAMONGA, CA 91730, US**

72 Inventor/es:

**FAHY, GREGORY, M. y
WOWK, BRIAN**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 534 720 T3

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

DESCRIPCIÓN

Prevención de la nucleación de hielo por medio de poliglicerol

5 La presente invención se refiere a métodos de inhibición de la formación de hielo usando poliglicerol y moléculas relacionadas.

10 La prevención de la congelación de agua, y soluciones que contienen agua, es un problema de interés ambiental, agrícola, industrial y biomédico sustancial. El hielo sobre las calles peatonales, carreteras y alas de los aviones constituye un peligro ambiental para el transporte. La formación de hielo sobre y en el interior de las plantas provoca daños costosos en cultivos y jardinería. La congelación de soluciones anti-congelación, contenidos de tuberías, pinturas, cemento fresco y otras soluciones acuosas sometidas a temperaturas frías son cuestiones de interés en la industria. El hecho de evitar la formación de hielo durante el almacenamiento en frío de proteínas, virus, células, tejidos y órganos es un problema importante en criobiología.

15 Por debajo de una temperatura crítica (el punto de congelación de equilibrio), la cristalización de agua para dar lugar a hielo se ve termodinámicamente favorecida. El punto de congelación de equilibrio de agua se puede rebajar por medio de la adición de solutos que reducen la presión de vapor de agua de manera que se convierte en equivalente a la presión de vapor del hielo únicamente a baja temperatura. Este medio clásico de rebaja del punto de congelación se denomina reducción del punto de congelación "coligativa", y es aproximadamente independiente de la naturaleza del soluto añadido, siendo el efecto proporcional a la fracción molar del soluto añadido independientemente de su naturaleza. La reducción del punto de congelación coligativa es la base física sobre la cual operan los agentes anti-congelación esencial y actualmente usados (tales como glicoles y sales). La desventaja de la reducción del punto de congelación coligativa es que se requieren cantidades grandes de solutos (10 % o más) para rebajar el punto de congelación incluso unos pocos grados Celsius.

20 Más allá de la reducción del punto de congelación coligativa, existen dos medios independientes de rebajar el punto de congelación práctico del agua. El primero es inactivar los agentes de nucleación heterogéneos, y el segundo es inhibir la formación de pequeños cristales de hielo a pesar del enfriamiento por debajo del punto de congelación de equilibrio.

35 El agua pura se congela espontáneamente (nucleación homogénea) justo por encima de $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ cuando el hielo no ha experimentado nucleación por medio de las impurezas del agua, conocidas genéricamente como agentes de nucleación heterogéneos. Con frecuencia, los agentes de nucleación heterogéneos biogénicos simplemente se denominan agentes de nucleación de hielo (INAs). INAs biogénicos se han visto implicados de forma evidente para reducir o eliminar el super-enfriamiento en varios contextos, pero también existen minerales y agentes de nucleación orgánicos. Incluso el agua de calidad de laboratorio altamente pura conserva una tendencia de nucleación significativa. Si se pueden retirar o inhibir INAs, se puede someter el agua o las soluciones acuosas a super-enfriamiento hasta temperaturas muchos grados por debajo del punto de congelación sin que tenga lugar realmente la congelación.

40 Las plantas, insectos y peces resistentes al frío han implicado proteínas anti-congelación que selectivamente se adsorben sobre la superficie de hielo o INAs, evitando de este modo que las moléculas de agua entren en contacto con superficies que activan el crecimiento de hielo (Devries, A.L. y Wohlschlag, D.E. "Freezing resistance in some Antarctic fishes" Science 163, pp. 1074-1075, 1969). De este modo, las proteínas anti-congelación actúan como agentes anti-congelación no coligativos, y concentraciones muy pequeñas (menores que 1 %) son capaces de evitar la temperatura a la cual se forma el hielo, en algunos casos en varios grados. Poco después del descubrimiento original de proteínas anti-congelación, se especuló que "muchas moléculas poliméricas (ya no proteínas) debían ser capaces de inhibir la nucleación (de hielo) de esta forma" (Klotz, I.M. en "The Frozen Cell" pp. 5-26, J. & A. Churchill, London, 1970). Estas especulaciones abrieron la puerta a la posibilidad de encontrar compuestos sintéticos no costosos con actividad anti-congelación no coligativa.

55 En 1983, Caple et al. ("Polymeric Inhibition of Ice Nuclei Active Sites" Cryo-Letter 4, pp. 51-58, 1983 y la patente de Estados Unidos 4.484.409) presentaron una mejora importante de la tendencia de super-enfriamiento de agua por medio de la adición de pequeñas cantidades de polímero de acrilato de metilo y co-vinil pirrolidona o un polímero de metacrilato de metilo y co-vinil pirrolidona. Mientras se muestra una prueba del concepto, estas observaciones se vieron limitadas en un número de aspectos importantes. En primer lugar, estos copolímeros no se sometieron a ensayo en cuanto a toxicidad y pueden resultar tóxicos. En segundo lugar, la liberación de estos polímeros en el medio ambiente, o su inclusión en alimentos, puede no resultar permisible. En tercer lugar, los polímeros requirieron una naturaleza hidrófoba en cuanto a eficacia, lo cual limita su utilidad en soluciones acuosas. En cuarto lugar, la naturaleza de estos polímeros y de los métodos para su síntesis puede convertirlos en muy costosos para usos prácticos. Finalmente, su rendimiento se ha caracterizado de forma completa, y puede verse limitado de varias formas. En cualquier caso, no ha aparecido uso comercial de los polímeros de Caple en 16 años desde su publicación, lo cual implica deficiencias de estos polímeros para aplicaciones prácticas anti-nucleación de hielo. Similarmente, los investigadores japoneses Watanabe et al. mostraron que podían reducir la nucleación por medio de yoduro de plata usando un método de ensayo de RMN haciendo reaccionar las proteínas con cadenas alifáticas

5 hidrófobas de longitudes variables (Solicitud de Patente de Estados Unidos, recientemente caducada). Pero parece que este método requería que las proteínas modificadas resultantes formaran micelas con el fin de obtener la actividad anti-nucleación presentada, un factor que limita la accesibilidad de los agentes anti-nucleación a los cuerpos de nucleación en general, y que puede evitar el uso de la invención en aplicaciones de perfusión de órganos en las cuales puede ocurrir que las micelas no penetren a través de los capilares en el interior del espacio intersticial. En cualquier caso, no se conoce uso industrial alguno de su invención, y los derechos de Estados Unidos de la invención han caducado recientemente debido al impago de las tasas de mantenimiento por parte del cesionario, lo que implica la pérdida de utilidad. Se han descrito otras varias sustancias anti-nucleación, pero generalmente estas son sustancias químicamente reactivas que destruyen los agentes de nucleación de hielo y que 10 cabría esperar también dañen a las biomoléculas vitales presentes en las células o el medio ambiente, o son cadenas orgánicas complicadas que pueden presentar una toxicidad inaceptable y reactividad química y que tienden a ser hidrófobas y con ello su uso resulta difícil o problemático.

15 En 1995, Fahy ("Novel Ice-Controlling Molecules and Their Applications" Solicitud de Patente Internacional PCT/US96/04284, Publicación # WO 96/30459, 1996, antecedida por la solicitud PCT/US98/20834, Publicación # WO 99/18169, publicada el 15 de abril de 1999) propuso la creación de agentes de impurificación de interfaz de hielo sintéticos ("agentes de bloqueo de hielo") específicamente diseñados para unirse al plano basal y a las caras de los prismas de los cristales de hielo (y agentes de nucleación de hielo). Los moléculas estaban diseñadas por medio de espaciado de grupos polares a intervalos que corresponden al espaciado reticular de moléculas de agua sobre las caras de los cristales de hielo. Se propusieron numerosas moléculas específicas y polímeros, y se presentaron los datos que mostraban la reducción de las tasas de crecimiento de cristales de hielo en 6 % en peso/volumen, 1,3-cis-ciclohexanodiol y el aumento del efecto de histéresis térmica de la glicoproteína anti-congelación de pescado por medio de 1,3,5-cis,cis-ciclohexanotriol, pero se dijo que el efecto último era imposible de utilizar debido al efecto pro-nucleación de 1,3,5-cis,cis-ciclohexanodiol. De igual forma, no se mostraron datos que indicaran el aumento de histéresis térmica por parte de ningún otro agente, ni tampoco que confirmaran ningún efecto de unión de hielo de 1,3-cis-ciclohexanodiol o cualquier otro agente propuesto. 25

30 Se presentaron las reivindicaciones para varios polímeros específicos como agentes de inhibición del crecimiento de cristales de hielo, pero no se mostró que ninguno de estos polímeros inhibiese el crecimiento de cristales, y ninguno constituyó anterioridad alguna con respecto a los copolímeros de anti-nucleación de poli(acetato de vinilo)/poli(alcohol vinílico) (PVA) de Wowk (solicitud de patente de Estados Unidos 09/400.791) o las nuevas especies anti-nucleación divulgadas en la presente memoria.

35 En concentraciones suficientemente elevadas (normalmente de 50 % o más), los agentes anti-congelación convencionales coligativos puede evitar la formación de hielo de forma completa, permitiendo que las soluciones se enfríen hasta temperaturas arbitrariamente bajas sin congelación. En el campo de la microbiología, esto es la base de la crio-conservación por medio de vitrificación (Fahy, G.M. et al. "Vitrification as an approach to cryopreservation" Cryobiology 21 pp., 407-426, 1984). No obstante, la utilidad de la vitrificación se ha visto limitada actualmente por la toxicidad de las elevadas concentraciones de crioprotector coligativo necesarias para lograr la vitrificación. La crioconservación por medio de vitrificación sería más práctica para una variedad más amplia de tipos de células y tejidos si se pudieran encontrar medios para rebajar las concentraciones de crioprotector coligativo necesarias para lograr la vitrificación. 40

45 En 1990, se propuso que las proteínas anti-congelación de pescado podrían resultar útiles como inhibidores de INAs de fondo en soluciones de vitrificación (Fahy, G.M., Saur, J. y Williams, R.J. "Physical problems with the vitrification of large biological systems" Cryobiology 27, pp. 492-510, 1990). La inhibición de INAs permitiría rebajar las concentraciones de crioprotectores a usar para la vitrificación, en particular para la vitrificación de sistemas grandes para los cuales los episodios discretos de nucleación de hielo provocados por los INAs de fondo son un problema grande debido al enfriamiento lento y a las tasas de calentamiento que se pueden conseguir para los sistemas grandes. Posteriormente, se validó la propuesta de Fahy cuando Sutton y Pegg lograron una disminución espectacular de la tasa de calentamiento crítica necesaria para evitar la formación de hielo en soluciones vitrificadas por medio de la adición de 1 % de proteína anti-congelación de pescado ("Devitrification in Butane-2,3-diol Solutions Containing Anti-Freeze Peptide" Cryo-Letters 14, pp. 13-20, 1993). El valor de los agentes anti-congelación no coligativos para mejorar las soluciones de vitrificación pronto resultó evidente. No obstante, hasta el descubrimiento de los efectos inhibidores de hielo de PVA y las moléculas de la presente invención no han existido agentes 50 inhibidores de INA de bajo coste fácilmente disponibles. 55

60 La prevención de la formación de hielo claramente tiene una aplicación en cualquier situación en la cual la formación de hielo tenga consecuencias negativas o no deseadas. Además, cabe esperar que la utilidad de la presente invención sea muy amplia.

A continuación, se describen estas y otras características, aspectos y ventajas de la presente invención con referencia a los dibujos de la realización preferida, cuya realización se pretende que ilustre y no limite la invención, y en la que: 65

La **Figura 1** muestra la concentración de CPA necesaria para el super-enfriamiento estable a aproximadamente -20 °C usando Decaglicerol (dG) y dG + X1000.

La **Figura 2** muestra estadísticamente una reducción no coligativa significativa del punto de congelación medio de agua por parte de tetraglicerol y decaglicerol en muestras de 22 ml congeladas muy lentamente desde 0 °C y colocadas en un baño grande de enfriamiento lento de 60 % en volumen/volumen de etilen glicol.

La **Figura 3** expresa los datos de la Figura 2 en términos de tiempo necesario para que tenga lugar la nucleación durante un enfriamiento muy lento desde 0 °C, que muestra la extensión estadísticamente significativa de tiempo medio para la nucleación en comparación con agua pura, al contrario que la ausencia de extensión significativa de tiempo por parte de un agente coligativo diluido (dextrosa).

La **Figura 4** compara las temperaturas de nucleación para muestras individuales que se enfrían muy lentamente desde 0 °C, mostrando un super-enfriamiento intenso con 1 % de decaglicerol, eliminación de este efecto por parte de 1 % de dextrosa y conservación de la congelación de 10 % de DMSO por medio de 5 % de decaglicerol hasta -13 °C.

La **Figura 5** muestra la comparación de super-enfriamiento en anticongelante de automóvil de 5 % en volumen/volumen y tetraglicerol de 1 % en volumen/volumen, y la mejora de super-enfriamiento de anticongelante de automóvil de 5 % en volumen/volumen por medio de la adición de 0,2 % en peso/volumen de tetraglicerol.

La **Figura 6** muestra que la probabilidad de congelación de 5 % en volumen/volumen de anticongelante de automóvil tras 10 horas de enfriamiento (100 %) puede hacerse equivalente a la probabilidad de congelación de 15 % en volumen/volumen de anticongelante (50 %) por medio de la adición de un 0,2 % en peso/volumen de tetraglicerol.

La **Figura 7** muestra una reducción estadísticamente significativa ($p = 0,012$) de la temperatura de nucleación media (T_n) de agua por parte de 10 % en peso/volumen de decaglicerol bruto (9 % en peso/volumen de concentración actual de decaglicerol) vs fallo de un polímero comparable para reducir significativamente T_n , cuando se sumergen soluciones de ensayo en un baño pre-enfriado a -15 °C.

La **Figura 8** muestra la ausencia de toxicidad de PGL tal y como se usa en una solución de conservación de órganos en lugar de glucosa para la conservación de cortes de riñón.

La **Figura 9** muestra la ausencia de toxicidad de PGL usado en un perfundido empleado para la conservación de riñones completos.

La **Figura 10** muestra el espectro de agente de nucleación de hielo diferencial para diversas concentraciones de PGL y PVA en agua que contiene 1 ppm de bacterias de nucleación de hielo de *P. syringae*, mostrando una inhibición de agentes de nucleación bacterianos por medio de PGL.

La **Figura 11** muestra espectros de agente de nucleación de hielo diferenciales para una muestra de agua extraída de la superficie del Lago Elsinore, California, en presencia y ausencia de 0,1 % en peso/peso de PVA o PGL, y muestra el efecto comparativamente débil de PGL para esta muestra.

La **Figura 12** demuestra la inhibición complementaria y aditiva de la nucleación en etilen glicol acuoso de 55 % en peso/peso complementado con agente de nucleación bacteriano, e indica que la combinación de copolímero de poli(alcohol vinílico)/poli(acetato de vinilo) (PVA) y poliglicerol puede permitir la vitrificación de una disolución que ningún agente solo puede vitrificar a la misma concentración total.

El objetivo de la presente invención es proporcionar compuestos que eviten la nucleación de hielo no coligativa al tiempo que conservan propiedades físicas, biológicas e industriales deseables.

Otro objetivo de la invención es proporcionar aditivos que complementen otros inhibidores de nucleación de hielo, especialmente copolímeros de poli(acetato de vinilo)/poli(alcohol vinílico).

Otro objetivo de la invención es proporcionar aditivos que complementen o aumenten la histéresis térmica y los efectos anti-nucleación de las proteínas anti-congelación naturales.

Otro objetivo de la invención es proporcionar aditivos que reduzcan la nucleación de hielo en soluciones acuosas diluidas, en soluciones crioprotectoras concentradas y en preparaciones anti-congelación comerciales.

Otro objetivo de la invención es proporcionar aditivos que sean no tóxicos y útiles en soluciones de conservación de órganos como solutos impermeables capaces de evitar el hinchamiento celular durante períodos de varios días a temperaturas de cero grados Celsius o próximas con excelente mantenimiento de la viabilidad celular.

Otro objetivo de la invención es proporcionar aditivos que sean suficientemente no tóxicos para facilitar la conservación hipotérmica de los materiales biológicos en estado super-enfriado por debajo de 0 °C.

Otro objetivo de la invención es proporcionar compuestos que se adsorban sobre agentes de nucleación de hielo con fines de extracción de agentes de nucleación de hielo a partir de agua y soluciones acuosas.

Otro objetivo de la invención es proporcionar aditivos que sean compatibles con la conservación de perfusiones de órganos, especialmente para la inclusión en perfundidos aptos para vitrificación.

Otro objetivo de la invención es proporcionar compuestos que se puedan dispersar en la atmósfera para alterar la precipitación en nubes de lluvia por medio de la inhibición de los agentes atmosféricos de nucleación de hielo.

5 Estos y otros objetivos de la presente invención resultarán evidentes para los expertos en la técnica a la luz de la memoria descriptiva siguiente y las reivindicaciones adjuntas.

Poliglicerol (PGL) es un polímero soluble en agua determinado por la fórmula $H[-OCH_2CHOHCH_2-]_n OH$. PGL se encuentra comercialmente disponible con $n=2$ (diglicerol) hasta $n=10$ (decaglicerol) y más allá. Para tetraglicerol, $n=4$ y para hexaglicerol, $n=6$.

10 PGL es un compuesto no costoso, no tóxico usado en cosmética y en forma esterificada como aditivo alimentario que puede sustituir más de un 50 % de las calorías grasas en algunos alimentos (Babayan, J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol. 6: 15-24, 1986). En el interior del cuerpo, se metabolizan los ésteres de PGL de nuevo para dar lugar a PGL, lo cual subraya la naturaleza no tóxica de este compuesto. Los consumidores de donut de MACDONALD y de pastelitos de cumpleaños, helados de crema de WEIGHT WATCHER, postres dietéticos y chocolate emulsionado con ácido poliglicerol poliricinoleico, por ejemplo, presentan PGL liberado en su organismo sin consecuencias negativas.

15 La utilidad previamente desconocida de las diversas variedades de PGL para evitar la nucleación y mejorar el super-enfriamiento de agua se divulga en la presente memoria. Una teoría para la utilidad es que el compuesto se puede adsorber preferentemente sobre las partículas de nucleación de hielo y las superficies de manera análoga a las proteínas anti-congelación naturales. Como muestran los datos a continuación, cantidades de PGL muy pequeñas (tan pequeñas como 10 partes por millón) mejoran significativamente la capacidad de las soluciones de agua y soluciones acuosas para super-enfriar sin formación de hielo. PGL es eficaz por sí solo, en combinación con PVA, en combinación con proteínas anti-congelación naturales.

20 PGL se puede detectar como eficaz como agente de inhibición de hielo a concentraciones que varían de 10 partes por millón hasta decenas por ciento. Las concentraciones que varían desde un 0,01 % hasta un 10 % resultan preferidas. Se prefieren más las concentraciones que varían desde un 0,1 % hasta un 2 %. Las más preferidas son las concentraciones que varían desde un 0,3 % hasta un 2 %. Los expertos en la técnica comprenderán que la elección de la concentración de PGL en cualquier aplicación anti-congelación también depende de factores diferentes de la inhibición de hielo máxima, incluyendo el coste y las consideraciones de viscosidad de la disolución.

25 Se encontró que tetraglicerol, hexaglicerol y decaglicerol eran todos útiles, con buena actividad de bloque de hielo (anti-nucleación), baja viscosidad, ausencia de formación de espuma y propiedades humectantes plásticas en disolución acuosa diluida (además de facilidad de toma de muestra con pipeta) y ausencia de obstrucción observada con PVA. (En el caso de PVA, se requiere calentamiento para revertir la obstrucción antes del uso para reactivar la tendencia anti-nucleación). Decaglicerol puede ser ligeramente superior para rebajar las variantes de longitud de cadena de PGL como agente anti-nucleación en algunos casos, aunque en otros casos pareció que tetraglicerol era ligeramente superior. Se anticipa que PGL es activo como agente anti-nucleación para $n=2$, $n=3$, $n=5$, $n=7-9$ y $n > 10$, por ejemplo $n=11-1000$.

35 La actividad de al menos ciertos tipos de moléculas de proteína anti-congelación se puede mejorar sometiéndolas a formación de complejos o exponiéndolas a otras moléculas, tales como anticuerpos (Wu, D.W., Duman, J.G. y Xu, L. "Enhancement of insect antifreeze protein activity by antibodies" Biochim Biophys Acta 1076, pp. 416-420, 1991) y solutos bivalentes pequeños tales como ácido cítrico y glicerol. Se presenta en la presente memoria que decaglicerol (dG) también activa en gran medida la actividad práctica de la proteína 1 anti-congelante Dendroides recombinante, aumentando su histéresis térmica (definida a continuación) como viene determinado por criomicroscopio desde aproximadamente 0,3-1,5 grados C sin dG hasta 3,5 grados en presencia de dG. Decaglicerol puede actuar para evitar nuevos episodios de nucleación de hielo en el ambiente intensamente super-enfriado que, de lo contrario, conduce a formación de hielo de manera más rápida de lo que las proteínas anti-congelación pueden ligarse a nuevo hielo, lo cual supera la capacidad de la proteína para controlar el hielo pre-existente.

40 El aumento de actividad de las proteínas anti-congelación como se ha comentado anteriormente se puede deber a un aumento en el área de hielo que queda cubierta de manera eficaz por el complejo proteína-soluto. Por tanto, se anticipa que la actividad de bloqueo de hielo de los compuestos de PGL también se puede mejorar por medio de la adición de apéndices moleculares que aumentan el alcance lateral de la molécula cuando se une a una superficie de nucleación de hielo. Una parte de los grupos hidroxilo de PGL (que preferentemente no excede un 20 % del número total de hidroxilos) se puede convertir fácilmente en enlaces de éster o éter para conectar estos apéndices.

45 PGL es eficaz a la hora de inhibir la nucleación de hielo provocada por INA bacteriano. Esta demostración es significativa ya que se piensa que las proteínas de nucleación de hielo de origen bacteriano son una fuente principal de INAs de fondo en el medio ambiente. En particular, se piensa que las bacterias de nucleación de hielo tales como *Pseudomonas syringae* y *Erwinia herbicola* presentes en las superficies de plantas son la causa principal del daño por hielo en plantas a temperaturas entre $-6^{\circ}C$ y $0^{\circ}C$.

50

55

60

65

Se han propuesto diversos métodos de la técnica anterior para controlar las bacterias de nucleación de hielo sobre plantas con riesgo de daño por hielo. Estos métodos incluyen la aplicación de bactericida (patentes de Estados Unidos 4.834.899 y 5.079.868), bacteriófagos (patente de Estados Unidos 4.375.734) y desplazamiento de las bacterias INA con bacterias similares que no producen proteínas INA (patentes de Estados Unidos 4.045.910/4.161.084/4.432.160). Los métodos más similares a la presente invención son propuestas para disolución de pulverización que contienen compuestos de inhibición de nucleación de hielo naturales (patente de Estados Unidos 4.601.842) o sintéticos (patente de Estados Unidos 4.484.409) sobre las plantas. La presente invención resulta superior en cuanto a estas invenciones ya que los compuestos de PGL son muchos menos costosos que las proteínas anti-congelación naturales, y debido a que los compuestos PGL se conocen como no tóxicos a diferencia de los polímeros de la patente de Estados Unidos 4.484.409.

Muchas de las realizaciones posibles de la presente invención para la protección de plantas frente al daño por congelación resultarán evidentes para los expertos en la técnica. Se divulga en la presente memoria que los compuestos de PGL se pueden incluir en las pulverizaciones de agua que se usan para pulverizar la superficie de las plantas con riesgo agudo de congelación. También se divulga en la presente memoria que los compuestos de PGL se pueden incluir en el agua normal de riego a largo plazo. Únicamente serían necesarias concentraciones muy pequeñas debido a que la evaporación concentraría el compuesto sobre las superficies de la planta. También se divulga en la presente memoria que se podrían incluir compuestos de PGL de bajo peso molecular en el agua de riego, formulaciones de fertilizantes, o suelos de relleno para plantas de manera que estos compuestos sean absorbidos por parte de las plantas para proporcionar protección frente a la congelación en el interior de los tejidos de la planta. También se divulga en la presente memoria que los compuestos PGL podrían dispersarse en forma de polvo sobre las plantas. También se divulga en la presente memoria que PGL se puede incluir como componente de otras soluciones anti-congelación usadas para la protección de las plantas frente al hielo. Por ejemplo, se podría usar PGL de peso molecular apropiado en lugar de otros polímeros como agente espesante de la invención en la patente de Estados Unidos 5.653.054.

Se espera que las soluciones que contienen compuestos de PGL exhiban una acción limpiadora frente a INAs, adhiriéndose a INAs de manera que se produzca el lavado de INAs desde la superficie, empobreciendo finalmente las superficies de material de INA. Incluso se ha sugerido que los agentes de fijación de INA podrían exhibir una actividad bactericida específica frente a las bacterias de INA por medio de bloqueo de los conductos de transporte de la pared celular bacteriana (patente de Estados Unidos 4.484.409).

Más allá de la agricultura, se anticipa que la presente invención resultará ampliamente útil para evitar la congelación de agua a temperaturas pocos grados por debajo de la congelación. Los compuestos de PGL pueden tener utilidad como agentes anti-congelación no coligativos en diversas configuraciones industriales en las que resulta deseable inhibir la congelación de agua, y resulta permisible la adición de cantidades pequeñas de soluto. Los compuestos de PGL pueden resultar especialmente útiles para inhibir la congelación de agua que está presente en cantidades pequeñas como contaminante en fluidos hidrófobos, tales como combustibles. En la presente realización, el compuesto de PGL se puede formular con un grupo hidrófobo que da lugar a la molécula soluble en el fluido hidrófobo, pero que todavía es capaz de separarse en fase de agua para inhibir la formación de hielo. El compuesto también resultaría apropiado para su uso como adyuvante en criocirugía, en la cual la maximización del super-enfriamiento antes de la congelación maximiza la probabilidad de formación de hielo intracelular tras la congelación y, por consiguiente, la muerte celular. Otra aplicación podría ser la mejora de las soluciones "anticongelantes" coligativas tradicionales tales como "anticongelante" para automóviles. Normalmente, las soluciones anticongelantes se evalúan como que proporcionan protección frente a la congelación hasta una temperatura igual al punto de congelación de la solución. No obstante, esto generalmente subestima el potencial protector de la disolución anti-congelante debido a que puede tener lugar, y de hecho tiene lugar, un super-enfriamiento significativo de las soluciones. La adición de los compuestos PGL a las soluciones convencionales anticongelantes permitiría el super-enfriamiento de manera más fiable y hasta temperaturas más extremas que las que se dan de manera común. Esto proporcionaría un margen mayor de seguridad en la protección frente a la congelación. Esto beneficiaría a las soluciones anticongelantes (tales como las soluciones de anticongelante y refrigerante de motor y las soluciones de eliminación de hielo (que mantienen las superficies libres de hielo durante más tiempo después de la eliminación de hielo).

El ejemplo más obvio de soluciones en las cuales la promoción del super-enfriamiento resultaría beneficioso son las soluciones "anticongelantes" coligativas tradicionales tales como el "anticongelante" de los automóviles. Normalmente, las soluciones anticongelantes se evalúan como que proporcionan protección frente a la congelación hasta una temperatura igual al punto de congelación de la disolución. No obstante, generalmente esto subestima el potencial protector de las soluciones anti-congelación ya que puede tener lugar, y de hecho tiene lugar, un super-enfriamiento significativo de las soluciones. La adición de los compuestos PGL a las soluciones anti-congelantes convencionales permitiría que tuviese lugar el super-enfriamiento de manera más fiable y hasta temperaturas más extremas que las que se dan de manera común. Esto proporcionaría un margen mayor de seguridad en la protección frente a la congelación. Esto beneficiaría a las soluciones anti-congelantes (tal como anti-congelante y refrigerante de motor) y a las soluciones de eliminación de hielo (que mantienen las superficies libres de hielo durante más tiempo después de la eliminación de hielo).

También se contemplan otros usos para facilitar el super-enfriamiento de las soluciones acuosas. Cualquier producto de base acuosa que pueda verse perjudicado por congelación durante el almacenamiento o el uso se beneficia de la adición de los compuestos anti-congelantes no coligativos. Por ejemplo, los productos que pueden estar expuestos al frío durante el proceso de curado se benefician de los aditivos de la presente invención. De manera más específica, se pueden proteger pinturas de base acuosa frente a la congelación durante el almacenamiento o el secado por medio de cantidades pequeñas de PGL. También se puede proteger el fraguado de cemento y hormigón frente a la congelación por medio de estos aditivos.

La criopreservación de material biológico por medio de vitrificación es un ejemplo extremo de super-enfriamiento. Se usan concentraciones grandes de solutos coligativos (crioprotectores) para preparar soluciones de conservación con puntos de congelación por debajo de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Posteriormente, por medio de enfriamiento rápido, es posible super-enfriar estas soluciones de vitrificación por debajo de $-120\text{ }^{\circ}\text{C}$ sin formación de hielo. A temperaturas por debajo de -110 a $-135\text{ }^{\circ}\text{C}$, la disolución super-enfriada experimenta una transición hasta un sólido vítreo, y se dice que experimenta "vitrificación".

La capacidad de super-enfriamiento de las soluciones de vitrificación depende de forma sensible de la concentración de crioprotector. Una concentración de crioprotector crítica, indicada como C_{vit} , resulta necesaria para super-enfriar de forma satisfactoria sin formación de hielo a una tasa de enfriamiento concreta. La toxicidad de las soluciones de vitrificación también depende de forma sensible de la concentración, con frecuencia aumentando de forma no lineal a medida que se alcanza C_{vit} . Por tanto, los medios para reducir C_{vit} incluso en un cierto porcentaje son extremadamente valiosos. La inhibición de INAs de fondo en las soluciones de vitrificación por medio de PGL ofrece la oportunidad de lograr esto.

La conservación de los tejidos y órganos a temperaturas hipotérmicas (temperaturas próximas a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$) durante varias horas o días también es un área activa de interés en criobiología. Un enfoque para la conservación hipotérmica implica mantener órganos en un estado super-enfriado a temperaturas ligeramente por debajo del punto de congelación (Conn Med 59, pp, 387-99, 1995). Los estados super-enfriados están en riesgo de congelación de manera inherente. La inclusión de compuestos que inhiben la nucleación de hielo de la presente invención en las soluciones de conservación de super-enfriamiento reduce este riesgo, ampliando las fronteras de este campo. Los inventores también han encontrado que PGL se puede usar para la conservación de cortes de tejido en lugar de un componente más permeable (glucosa) en una disolución de lavado/almacenamiento en frío de órganos a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ convencional, sin efectos negativos, lo que implica una utilidad potencial de PGL bien para el almacenamiento por debajo de $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ o bien para el almacenamiento convencional a una temperatura de 0 a $10\text{ }^{\circ}\text{C}$.

La afinidad de enlace de los compuestos de la presente invención por INAs posibilita contemplar sistemas diseñados para limpiar soluciones de INAs en lugar de simplemente inhibirlos. En un ejemplo, se podría hacer pasar agua u otras soluciones acuosas a través de columnas (de forma repetida, si fuese necesario) que contienen peso molecular elevado y/o PGL reticulado que sea insoluble en agua. En otro ejemplo, el material de columna podría contener un compuesto de PGL como apéndice covalente o una resina insoluble u otro sustrato. Se anticipa que dichas columnas retirarían INAs de los fluidos que se han hecho pasar a través de las mismas por medio de adsorción sobre el PGL. Incluso en otro ejemplo limpiador de INA, se puede introducir un compuesto de PGL en la disolución y posteriormente se puede retirar por medio de exposición al material con una afinidad de unión por un ligando sobre la molécula de PGL, o el propio PGL. Los procesos limpiadores de INA serían particularmente útiles para las soluciones de vitrificación, o soluciones usadas para la conservación hipotérmica super-enfriada.

INAs ambientales juegan un papel clave en el inicio de la precipitación en la atmósfera. Por tanto, los inhibidores de INA que no son costosos, tales como compuestos de PGL, pueden tener también utilidad para la modificación de las condiciones meteorológicas, como se comenta en la patente de Estados Unidos 4.484.409.

Parece que PGL y PVA inhiben INAs de forma complementaria, siendo cada compuesto óptimo para la inhibición de diferentes clases de INAs. Por tanto, cabe esperar que la elección óptima del agente de inhibición de INA pueda depender de la aplicación, y que la mejor formulación con finalidad general para la inhibición de hielo consiste en una mezcla de compuestos de PVA y PGL.

El motivo para la eficacia de PGL como agente anti-nucleación y mejorador del efecto de histéresis térmica de proteínas anti-congelación todavía no está claro. Los inventores creen que el efecto requiere la unión de hidrógeno que implica los grupos OH de la molécula, en particular los que se encuentran en la parte media de la molécula, y sigue siendo posible que las uniones de oxígeno de la cadena principal de la molécula contribuyan también a la eficacia. Por tanto, las variantes de PGL en las cuales se eliminan uno o ambos de los grupos OH terminales también son susceptibles de ser eficaces, en particular si la longitud de cadena implica al menos 6 unidades monoméricas de glicerol, de manera que el número de grupos OH disponibles sigue siendo equivalente al número de grupos OH presentes en tetraglicerol, lo cual resulta eficaz como agente anti-nucleación. Excepto para los hidrógenos presentes en los grupos OH de la molécula, se pueden sustituir los otros hidrógenos de manera sensata por otros átomos o grupos con un cierto alcance (por ejemplo, 10 % de sustitución), sin abolir la actividad de PGL.

Los siguientes Ejemplos contienen una explicación adicional de la invención y la descripción de los mejores usos de modo.

Ejemplos

5

Ejemplo 1

El primer ejemplo del uso de PGL para mejorar el super-enfriamiento fue su uso como aditivo en soluciones crioprotectoras almacenadas en un compartimiento de congelador de frigorífico doméstico a aproximadamente menos 20 °C durante varios días (Figura 1). El crioprotector usado (Veg) es una mezcla de DMSO y formamida en una proporción molar de 1:1 (equivalente a 1,732 con respecto a uno de proporción en peso de sulfóxido de dimetilo con respecto a formamida), a la cual se añade etilen glicol en una proporción de 1 gramo de etilen glicol por cada 2,27 gramos de (DMSO + formamida). Las soluciones de vehículo usadas fueron RPS-2 (una disolución descrita en la bibliografía científica que contiene glucosa 180 mM [para fórmula completa véase, por ejemplo, G.M. Fahy et al., Capítulo 20, en "Cell Biology of Trauma" (J.J. Lemasters y C. Oliver, Eds.), CRC Press, Boca Raton, FL, 1995, pp. 333-356]) o RPS-T (una disolución idéntica a RPS-2 pero que contenía glucosa 5 mM y trehalosa 175 mM en lugar de la glucosa sustraída de RPS-2). Las soluciones que contenían RPS-2 no mostraron una capacidad de super-enfriamiento mejorada con decaglicerol (dG). Las soluciones estuvieron formadas por un 22 % en peso/volumen a un 33 % en peso/volumen de Veg con o sin la inclusión de un 1 % en peso/volumen de decaglicerol (PGL para el que n = 10 unidades monoméricas, abreviado como dG) o un 0,5 % en peso/volumen de dG más un 0,5 % de PVA (abreviado como X1000 en la leyenda de la figura). En ausencia de dG, se requirió un 30 % en peso/volumen de Veg para evitar la congelación de las muestras, volviendo todas las muestras bien desde un 28 % en peso/volumen de Veg en RPS-2 o bien desde un 28 % en peso/volumen de RPS-T hasta el estado congelado. La inclusión de un 1 % en peso/volumen de Dg en las soluciones de Veg basadas en RPS-T permitieron un super-enfriamiento estable de larga duración de un 23 % en peso/volumen de Veg, y una mezcla de un 0,5 % en peso/volumen de dG y un 0,5 % en peso/volumen de X1000 permitió un super-enfriamiento estable de una disolución de Veg de un 22 % en peso/volumen en el mismo vehículo. De este modo, dG, solo o en combinación con PVA, redujo la concentración necesaria para el super-enfriamiento en un 6-7 % en peso/volumen. Asumiendo una concentración crítica sin dG de aproximadamente un 29 % en peso/volumen, esto representa una reducción relativa de hasta un 100 % x 7/29 = 24 %. Además, y de manera sorprendente, estas soluciones super-enfriadas permanecieron en estado no congelado, incluso tras agitación intensa, una acción que normalmente induce la congelación casi de forma inmediata en soluciones intensamente super-enfriadas. La figura también muestra, no obstante, que este nivel de protección no se observó cuando el vehículo fue RPS-2, las soluciones de Veg de 22 y 23 % en peso/volumen se congelaron de forma espontánea incluso en presencia de 1 % de dG o la combinación de dG y PVA. Dado que únicamente la diferencia entre RPS-2 y RPS-T es la concentración más elevada de glucosa en RPS-2, resulta evidente que dG y la combinación de dG y PVA se usan del mejor modo para mejorar el super-enfriamiento de las soluciones que contienen menos de 180 mM de glucosa. El volumen de muestra en estos experimentos fue de aproximadamente 15 ml.

Ejemplo 2

La Figura 2 muestra el espectro de nucleación de los agentes de nucleación en muestras individuales de ~ 20 ml de agua de laboratorio pura (purificada por medio de ósmosis inversa y desionización pero no por medio de destilación) modificado por medio de PVA, dG y tetraglicerol (tG, un polímero de PGL que comprende 4 monómeros de glicerol). En este ejemplo, la adición de PVA (agente de bloque de hielo X1000, disponible en 21^o Century Medicine, Rancho Cucamonga, CA91730) no tuvo efecto alguno, mientras que dG y tG proporcionaron mejoras estadísticamente significativas (p = de 0,004 a 0,018 y p = de 0,002 a 0,012, respectivamente) en la temperatura media de nucleación (Tn) de agua pura o dextrosa de 1 % en agua como control adicional. Además, la naturaleza no coligativa de la reducción de Tn lograda resulta evidente a partir del fallo de 1 % de dextrosa, que es más coligativamente activa que un polímero de peso molecular más elevado, para reducir sustancialmente Tn. En este experimento, se enfriaron lentamente 12 muestras de cada disolución y se contó el número de muestras congeladas en cada grado por debajo de 0 y se convirtió al formado mostrado anteriormente.

Ejemplo 3

En este ejemplo (Figura 3), los datos del Ejemplo 2 se expresan en términos del tiempo necesario para que tenga lugar la nucleación. Tanto decaglicerol como tetraglicerol retrasaron de forma estadísticamente significativa la aparición de la nucleación. En un contexto ambiental, dicha ralentización podría permitir que las plantas permanecieran en condición super-enfriada hasta que la temperatura aumentase con la salida del sol.

Ejemplo 4

Se enfriaron juntas soluciones formadas por ~ 20 ml de agua que contenían uno de seis aditivos diferentes o combinaciones de aditivos como se indica en la Figura 4, y se detectó la nucleación de cada muestra por medio de la presencia de una exoterma repentina registrada por medio de control continuo por ordenador de un termopar fino acoplado en cada recipiente de muestra. La tasa de enfriamiento fue similar a la de los Ejemplos 2 y 3. De manera

coherente con el Ejemplo 1 anterior, las muestras con un 1 % (15 mM) de dextrosa + un 1 % de Dg, un 1 % de dextrosa + un 1 % de tG y con un 1 % de X1000 solo se congelan a temperaturas más elevadas, mientras que la muestra de un 1 % de dG en agua se congela a una temperatura más baja que una muestra que contiene un 10 % de DMSO (el punto de fusión/congelación termodinámico de la última muestra está por encima de aproximadamente -3 °C). La adición de un 5 % de dG a un 10 % de DMSO evitó la congelación de un 10 % de DMSO hasta por debajo de la temperatura más baja alcanzada en el presente experimento (-13 °C).

(Las excursiones menores de temperatura en sentido ascendente están inducidas por congelación de las muestras vecinas; las excursiones mayores de temperatura en sentido ascendente son señales para la congelación de la muestra que contiene la sonda usada para llevar a cabo los registros. El pico marcado como "10 % de DMSO + 5 % de decaglicérol" fue el resultado de la congelación de una muestra extraña cercada cuya historia térmica no se incluye en el gráfico por motivos de simplicidad. En esta operación y en operaciones similares, se puede inducir cierta nucleación por medio de las sondas de temperatura, subestimando de este modo el potencial anti-nucleación de los poliglicérols).

Ejemplo 5

En este ejemplo (Figura 5) se enfriaron muestras de ~ 20 ml de forma similar a las muestras de los Ejemplos 2-4. El tetraglicérol de un 1 % fue casi equivalente a un anticongelante de PRESTONE™ comercial de un 5 % en volumen/volumen en cuanto a inhibición de la nucleación, y un 0,2 % en peso/volumen de tetraglicérol redujo la probabilidad de nucleación de PRESTONE™ de un 5 % en volumen/volumen a temperaturas por debajo de -9 °C.

Ejemplo 6

La Figura 6 es un ejemplo adicional de estabilización de anticongelante PRESTONE™, basado en la inmersión directa de las muestras de PRESTONE™ en un baño de baja temperatura, con una puntuación basada en el tiempo necesario para que las muestras se congelen en los primeros 300 minutos o la probabilidad acumulada de congelación tras 600 minutos (no se observaron las muestras entre 300 y 600 minutos). En este ejemplo, un elevado porcentaje de muestra mostró fallo en cuanto a congelación tras el enfriamiento durante la noche hasta aproximadamente -14,6 °C en comparación con el Ejemplo 5, quizás debido a la nucleación a partir de sondas de termopar del Ejemplo 5.

La línea de puntos clara de la Figura 6 representa una disolución de control de dextrosa de 56 o 560 mM. El valor de X1000 se refiere de nuevo al polímero PVA/PVA referido anteriormente en el texto. Nótese que en este ejemplo, la probabilidad de congelación de PRESTONE™ de un 5 % podría ser la misma que la probabilidad de congelación de PRESTONE™ de un 5 % en volumen/volumen tras el enfriamiento durante toda la noche hasta aproximadamente -14,6 °C por medio de la adición de únicamente tetraglicérol de 0,2 % en peso/volumen a PRESTONE™ de un 5 %.

Ejemplo 7

Veg (solutos de Veg de 55 % en peso/volumen [véase la solicitud de patente de Estados Unidos N° Ser. 09/400.793]) es una disolución no tóxica de crioprotectores que es inestable, por sí misma, para la vitrificación. La adición de dG de un 1 % a esta disolución no permite la vitrificación de la misma en presencia de RPS-2 (180 mM de glucosa presente). No obstante, la adición de dG de un 0,5 % más X1000 de un 0,5 % a Veg en un vehículo de RPS-T permitió la vitrificación del mismo tras el enfriamiento a 10 °C por minuto y abandonar prácticamente la vitrificación tras el calentamiento a aproximadamente 60 °C por minuto. Cabe esperar que esta disolución proporcione un rendimiento de un 90 % de viabilidad celular en cortes de riñón.

Ejemplo 8

La incapacidad de Veg para vitrificar en RPS-T solo se soluciona por medio de una modificación de RPS-T que es el objetivo de una solicitud de patente por separado. La adición de dG de un 0,5 % y X1000 de un 0,5 % a 2X RPS-T redujo la concentración de Veg necesaria para vitrificar hasta un total de Veg de un 52 % en peso/volumen. Cabe esperar que esto diera como resultado una buena supervivencia celular. Este es un ejemplo adicional de otro contexto en el que las propiedades antinucleación de PGL quedan demostradas.

Ejemplo 9

La Figura 7 compara la actividad anti-nucleación de dG de un 10 % en peso/volumen con la de polietilén glicol de un 10 % en peso/volumen de masa molecular media ~ 1000 dalton (PEG 1000). Decaglicérol produjo una reducción estadísticamente significativa de la temperatura media de nucleación en comparación con agua, pero PEG 1000 no lo hizo, a pesar del hecho de que la masa molecular de PEG 1000 es similar a la de dG (~ 750 dalton), lo que indica además el carácter único de dG.

Ejemplo 10

RPS-2 es una disolución excelente para el almacenamiento estático (sin perfusión) de cortes de riñón y riñones de conejo enteros (véase por ejemplo Khirabadi y Fahy, *Cryobiology* 30: 10-25, 1994). Como se muestra en la Figura 8, los cortes de riñón almacenados en RPS-2 (curva marcada como "Glucosa", círculos abiertos) se pudieron almacenar durante 3 días casi a cero grados C sin deterioro demostrable, basado en su capacidad posterior para acumular potasio y para someter el sodio a extrusión durante la incubación en disolución de Cross-Taggart (véase Fahy et al., en "Cell Biology of Trauma", J.J. Lemasters y C. Oliver, Eds., CRC Press, 1995, pp. 333-356, y las citas de la misma, para la metodología precisa del ensayo funcional). RPS-2 contiene glucosa 180 mM como componente principal. Cuando se sustituye glucosa de 170 mM por una cantidad osmóticamente equivalente de decaglicerol (círculos Negros, curva marcada como "decaglicerol"), se conservaron los cortes tan bien o casi tan bien como con glucosa. Esta modificación puede convertir la disolución en aplicable a órganos tales como hígado, cuyas células son demasiado permeables frente a glucosa, para permitir el uso de RPS-2 para la conservación ideal. También puede proteger los órganos durante el enfriamiento, calentamiento y exposición (por ejemplo, durante el trasplante) a temperaturas que sean suficientemente elevadas ($> 5\text{ }^{\circ}\text{C}$) para permitir un transporte de glucosa suficientemente rápido de interés para el hinchamiento celular. La modificación también puede permitir el uso de la disolución con resultados mejorados para perfusión, al contrario que para almacenamiento estático. Además, la inclusión de PGL en lugar de cierta glucosa en RPS-2 o soluciones de vehículo de tipo Eurocollins puede facilitar la vitrificación de las soluciones y, por tanto, de las células, tejidos y órganos que contienen crioprotectores a la vista de los efectos de antinucleación de PGL. Hexaglicerol (triángulos negros invertidos) fue casi tan bueno como decaglicerol, y la diferencia en cuanto a los resultados se asoció a la formación de un precipitado en las soluciones de hexaglicerol, lo que probablemente se podría evitar ajustando las concentraciones de calcio, fosfato y/o bicarbonato sin efectos adversos. Polietilén glicol de masa molecular media de ~ 1000 dalton (PEG-1000, cajas abiertas) también dio lugar a resultados excelentes, mientras que la sacarosa (triángulos abiertos) fue peculiarmente peor que glucosa, y PVA (hexágonos negros) fue directamente tóxico a una concentración de ~ 170 miliosmolal. Cualquier concentración de decaglicerol, PEG-1000, y hexaglicerol entre 0 y 170 mOsm debería proporcionar resultados de transporte iónico iguales o superiores a los mostrados. Cabe esperar que PGL que contiene 3-5, 7-9 y < 10 monómeros de glicerol también sea eficaz. El ejemplo de la Figura 8 subraya la ausencia de toxicidad de concentraciones de PGL incluso elevadas.

Ejemplo 11

Se sometieron a perfusión dos riñones durante 5 horas a aproximadamente $3,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ con una disolución de tipo RPS-2 que contenía decaglicerol de 1 % en peso/volumen además de otros componentes. Se trasplantaron los riñones y se midió su recuperación por medio de los niveles logrados de creatinina en suero posoperatorio. Como viene indicado en la Figura 9, la recuperación funcional posoperatoria de estos riñones fue buena, mostrando la ausencia de toxicidad de PGL para el sistema vascular y la aplicabilidad de PGL para su uso en perfundidos, incluyendo perfundidos que contienen crioprotectores cuya vitrificación se provoca con ayuda de PGL incluido.

Ejemplo 12

También se estudió la capacidad de PGL para actuar en concierto con agentes anti-nucleación de origen natural y proteínas que inhiben el crecimiento de cristales de hielo y se confirmó. PGL aumentó la actividad de histéresis térmica de proteína anticongelante de *Dendroides canadensis* recombinante de un 1% en peso/volumen (dAFP-1; descrita con detalle en *Biochemistry* 37: 6343-6350, 1998, y *J. Comp. Physiol. [B]* 168: 225-232, 1998, y listado en Genbank, por ejemplo) a partir de un valor esperado [véase la Figura 1 de la patente de Estados Unidos 5.627.051] de $1,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ sin PGL hasta $3,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ con PGL, como viene determinado por medio de observación microscópica de muestras de 0,2 microlitros rodeadas por 1,6 microlitros de aceite mineral en la etapa de un criomicroscopio Linkam BCS 196. En estos experimentos, se congeló la disolución de dAFP por medio de enfriamiento a $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se calentó hasta justo por encima del punto de fusión termodinámico de la disolución, y posteriormente se enfrió lentamente hasta que se observó un crecimiento rápido espontáneo de hielo en la disolución. Se definió la histéresis térmica como la temperatura más elevada a la cual podría existir el hielo (el punto de fusión) menos la temperatura más elevada a la cual pequeñas cantidades de hielo que existen en presencia de la proteína fueran capaces de crecer de forma rápida (el punto de congelación).

Se comprobó que una muestra que consistía en dAFP-1 de un 1 % en peso/volumen dio lugar a valores de histéresis térmica de 0,9 a $1,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ como máximo, una muestra de dAFP-1 de un 2 % en peso/volumen y dAFP-2 tuvo una histéresis térmica de únicamente $1,5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

En estos experimentos, se congeló la disolución de dAFP por medio de enfriamiento hasta $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se calentó justo por encima del punto de fusión termodinámico de la disolución, y posteriormente se enfrió lentamente hasta observar el crecimiento rápido espontáneo del hielo en la disolución. Se definió la histéresis térmica como la temperatura más elevada a la cual podría existir el hielo (el punto de fusión) menos la temperatura más elevada a la cual pequeñas cantidades de hielo que existen en presencia de la proteína fueran capaces de crecer de forma rápida (el punto de congelación). Parece que PGL funciona al menos en parte para evitar la nucleación extraña. Esto permitió romper la histéresis térmica observada por medio del crecimiento del hielo pre-existente al cual ya se había unido dAFP en

lugar de un crecimiento rápido del hielo que no había tenido tiempo de unirse a AFP.

De este modo, la capacidad anti-nucleación de PGL puede permitir que las proteínas anticongelantes sean mucho más eficaces a la hora de evitar la formación de hielo en situaciones en las que parte del hielo ya se había formado por medio de la conversión en inactivo mediante la acción de la proteína anticongelante.

Ejemplo 13

INAs son de naturaleza ubicua, y se sabe que son de origen tanto mineral como biológico (Vali, G. en *Biological Ice Nucleation and Its Applications*, eds Lee, R.E., Warren, J.W. & Gusta, L. V., páginas 1-28, APS Press, St. Paul, Minnesota, 1995). Los INAs de proteínas de origen bacteriano son particularmente potentes, y se piensa que son responsables principalmente de la nucleación de hielo casi a 0 °C en configuraciones naturales. Se muestra en el presente documento que poliglicerol y poli(alcohol vinílico) son capaces de inhibir INAs de la bacteria *Pseudomonas syringae* de nucleación de hielo de manera similar a las proteínas anticongelantes (AFPs) y las glicoproteínas anticongelantes (AFGPs).

Poliglicerol es particularmente eficaz, reduce la temperatura media de congelación en presencia de *P. syringae* tanto como 6 °C. De manera interesante, únicamente poli(alcohol vinílico) resultó eficaz para inhibir INAs en una muestra de agua ambiental. Estos resultados apoyan la existencia de clases separadas de INAs en la naturaleza, y sugieren que la acción inhibitoria de poli(alcohol vinílico) y poliglicerol son complementarias. La disponibilidad de inhibidores de INAs simples y no costosos tiene importantes implicaciones en agricultura y crioconservación biológica. La inhibición de INAs naturales por parte de polímeros hidrófilos comunes no se ha demostrado previamente.

Se prepararon soluciones de INA bacteriano por medio de adición de una parte por millón (en peso) de *Pseudomonas syringae* 31A secada por congelación (Snomax®, York International, Victor, NY) sobre agua ultrapura. El espectro de agente de nucleación diferencial, $k(\theta)$, de la disolución (curva de Control de la Figura 10) se determinó por medio de medición de la distribución de las temperaturas de congelación en una población de gotas de 1 µl (Vali, G. en *Biological Ice Nucleation and Its Applications*, eds. Lee, R.E., Warren, J.W. & Gusta, L.V., páginas 1-28, APS Press, St. Paul, Minnesota, 1995; y Vali, G. Quantitative evaluation of experimental results on the heterogeneous freezing nucleation of supercooled liquids. *J. Atmos. Sci.* 28, páginas 402-409, 1971).

Se obtuvieron espectros de agente de nucleación diferencial por medio de ensayo de congelación de gotas de Vali (Vali, G. en *Biological Ice Nucleation and Its Applications*, eds Lee, R.E., Warren, J.W. & Gusta, L.V., páginas 1-28, APS Press, St. Paul, Minnesota, 1995). Se suministraron siete gotas de 1 µl con una jeringa de microlitro Hamilton en un recipiente de muestra de aluminio (Perkin Elmer 0219-0041) y se cubrieron con aceite mineral para reducir la evaporación. Se colocó el recipiente de muestra abierto en el interior del horno de un calorímetro de barrido diferencial DSC 7 de Perkin Elmer, y se enfrió la muestra a 2 °C/minuto hasta que se congelaron todas las gotas. Se registró la temperatura de congelación de cada gota a partir de su pico sobre el termograma. Se obtuvieron los datos de congelación para una población de 98 gotas (14 recipientes de muestra) para determinar cada espectro. Se computaron los espectros por medio de la fórmula

$$k(\theta) = -(1/V\Delta\theta) \ln[1 - \Delta N/N(\theta)], 0$$

en la que V es el volumen de gota (1 µl), $N(\theta)$ es el número de gotas no congeladas a una temperatura θ , y ΔN es el número de gotas observadas que se congelan en el intervalo de temperatura $\Delta\theta$. Se excluyó la nucleación por causas extrínsecas a las soluciones sometidas a ensayo observando que las muestras de agua de laboratorio ultrapura (Milli-Q Biocel) no se congelaban a temperaturas por encima de -20 °C. Se añadió poliglicerol (PGL) de M_r 750 a la disolución de INA bacteriano en concentraciones de hasta un 1 % en peso. La Figura 10 muestra los espectros de nucleación resultantes. Se rebajó la temperatura media de congelación desde -6,8 °C (control) hasta -8,0, -9,4, -12,5 y 13,4 °C para concentraciones de PGL de un 0,001 %, 0,01 %, 0,1 % y 1 %, respectivamente. También se sometió a ensayo poli(alcohol vinílico) (PVA) de M_r 1500 (80 % hidrolizado, también conocido como X1000) a una concentración de un 0,1 %, y se comprobó que exhibía una inhibición de nucleación significativa (Figura 10). También se sometieron a ensayo los polímeros solubles en agua de polivinil pirrolidona (M_r 5000), polietilén glicol (M_r 1000), poliacrilamida (M_r 1500) y dextrano (M_r 40000) a una concentración de un 0,1 % y se comprobó que no tenían efecto alguno sobre el espectro del agente de nucleación.

También se obtuvieron los espectros de agente de nucleación para una muestra de agua de lago natural (Figura 11). Los INAs presentes en esta muestra experimentaron inhibición por parte de PVA, pero no se vieron comparativamente afectados por PGL. Esto implica que PVA y PGL actúan en gran medida frente a diferentes clases de agente de nucleación, y que la sensibilidad diferencial de nucleación con respecto a inhibición por parte de PGL y PVA puede ser un método útil y novedoso para caracterizar INAs que dependen de los esquemas de clasificación previos que se basan únicamente en temperatura-sensibilidad (Turner, M.A., Arellano, F. & Kozloff, L.M. Three separate classes of bacterial ice nucleation structures. *J. Bacteriol.* 172, 2521-2526, 1990). No obstante, los agentes de nucleación encontrados en el agua de lago se volvieron activos únicamente por debajo de -14 °C, mientras que la actividad del agente anti-nucleación de PGL para los agentes de nucleación de *P. syringae* se redujo

5 en gran medida en la Figura 8 en valores próximos a $-14\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para determinar si el efecto anti-nucleación de PGL estaba limitado más por temperaturas inferiores a $-14\text{ }^{\circ}\text{C}$ o por la clase específica de agente de nucleación, se preparó una disolución de una parte por billón de *P. syringae* secada por congelación, reduciendo la temperatura media de nucleación hasta $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$. Los agentes de nucleación ineficaces de *P. syringae* que quedaron en esta disolución diluida todavía experimentaron inhibición por parte de PGL, lo que indica que es la naturaleza de los INAs, y no la temperatura de nucleación de por sí, lo que determina la sensibilidad de PGL.

10 Estas observaciones confirman colectivamente los Ejemplos proporcionados anteriormente que muestran una actividad de PGL a temperaturas que varían de $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-23\text{ }^{\circ}\text{C}$ en muestras macroscópicas que contienen concentraciones de fondo muy bajas de agentes de nucleación.

Ejemplo 14

15 El super-enfriamiento intenso en presencia de crioprotectores coligativos puede tener como resultado una vitrificación de la disolución, lo que se ha propuesto como medio de crioconservación de tejidos complejos sin daño por hielo (Fahy, G., MacFarlane, D., Angell, C. & Meryman, H. Vitrification as an approach to criopreservation. *Cryobiology*, 21, 407-426, 1984). La toxicidad de las concentraciones elevadas de crioprotector necesarias para la vitrificación sigue siendo un obstáculo para la aplicación en muchos sistemas grandes de interés, tales como órganos aptos para trasplante (Fahy, G.M., Saur, J. y Williams, R.J. Physical problems with the vitrification of large biological systems. *Cryobiology* 27, 492-510, 1990). La Figura 12 demuestra la inhibición complementaria simultánea de subpoblaciones de agente de nucleación de *P. syringae* por parte de PVA y PGL en condiciones similares a las usadas para la crioconservación por vitrificación. La inhibición de INAs de fondo por estos polímeros puede reducir de forma similar las concentraciones de crioprotector necesarias para lograr la vitrificación de los sistemas biológicos.

25

REIVINDICACIONES

1. Un método para evitar la nucleación y mejorar el super-enfriamiento del agua, que comprende añadir poliglicerol que comprende la unidad estructural:

5



en la que n es de 2 a 1000 y en donde se añade poliglicerol en una concentración de una parte por millón a una parte en diez.

10

2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el agua está sobre la superficie de una planta o en el interior de una planta.

15

3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el poliglicerol añadido mejora significativamente la capacidad del agua para super-enfriarse sin formación de hielo.

20

4. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el poliglicerol añadido reduce la nucleación de hielo en soluciones acuosas diluidas, en soluciones de crioprotector concentradas y en preparaciones anticongelantes comerciales.

25

5. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el poliglicerol añadido se usa en combinación con poli(alcohol vinílico) (PVA) o en combinación con proteínas anticongelantes naturales.

30

6. Un método de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el poliglicerol añadido se incluye en soluciones de conservación de super-enfriamiento.

35

7. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el poliglicerol se formula con un grupo hidrófobo para convertirlo en soluble en un fluido hidrófobo pero todavía capaz de experimentar separación en la fase acuosa para inhibir la formación de hielo.

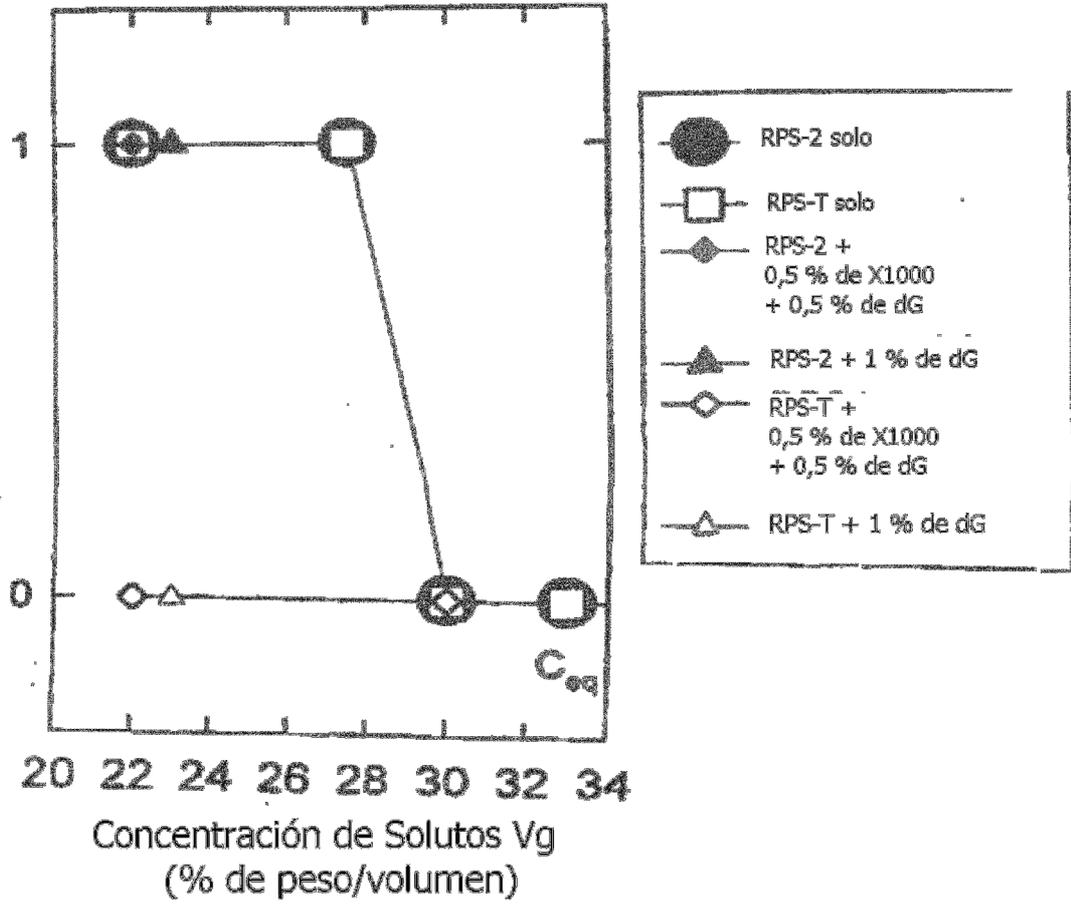
40

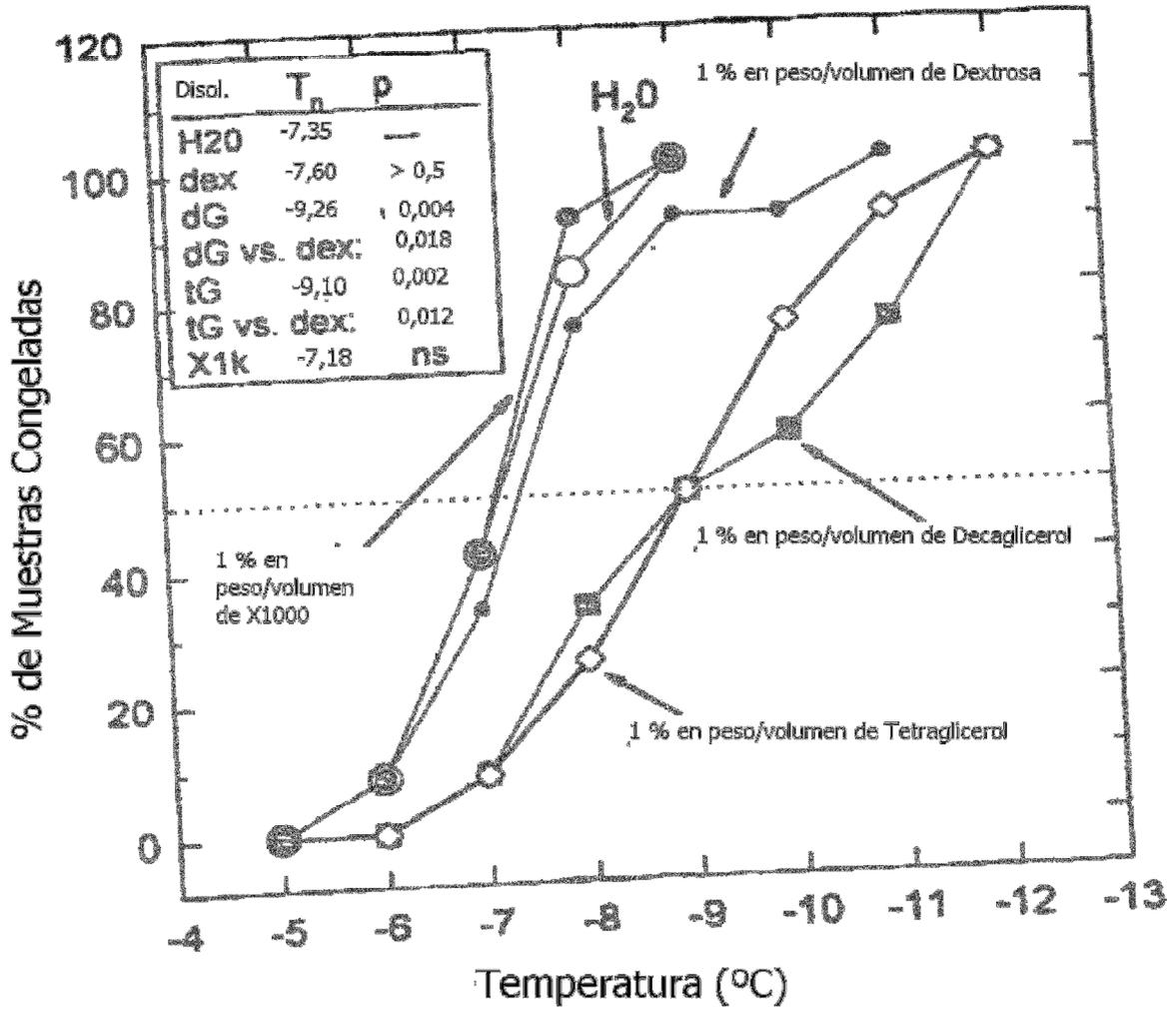
8. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el poliglicerol añadido inhibe la nucleación de hielo provocada por la proteína activa de nucleación de hielo bacteriana (INA).

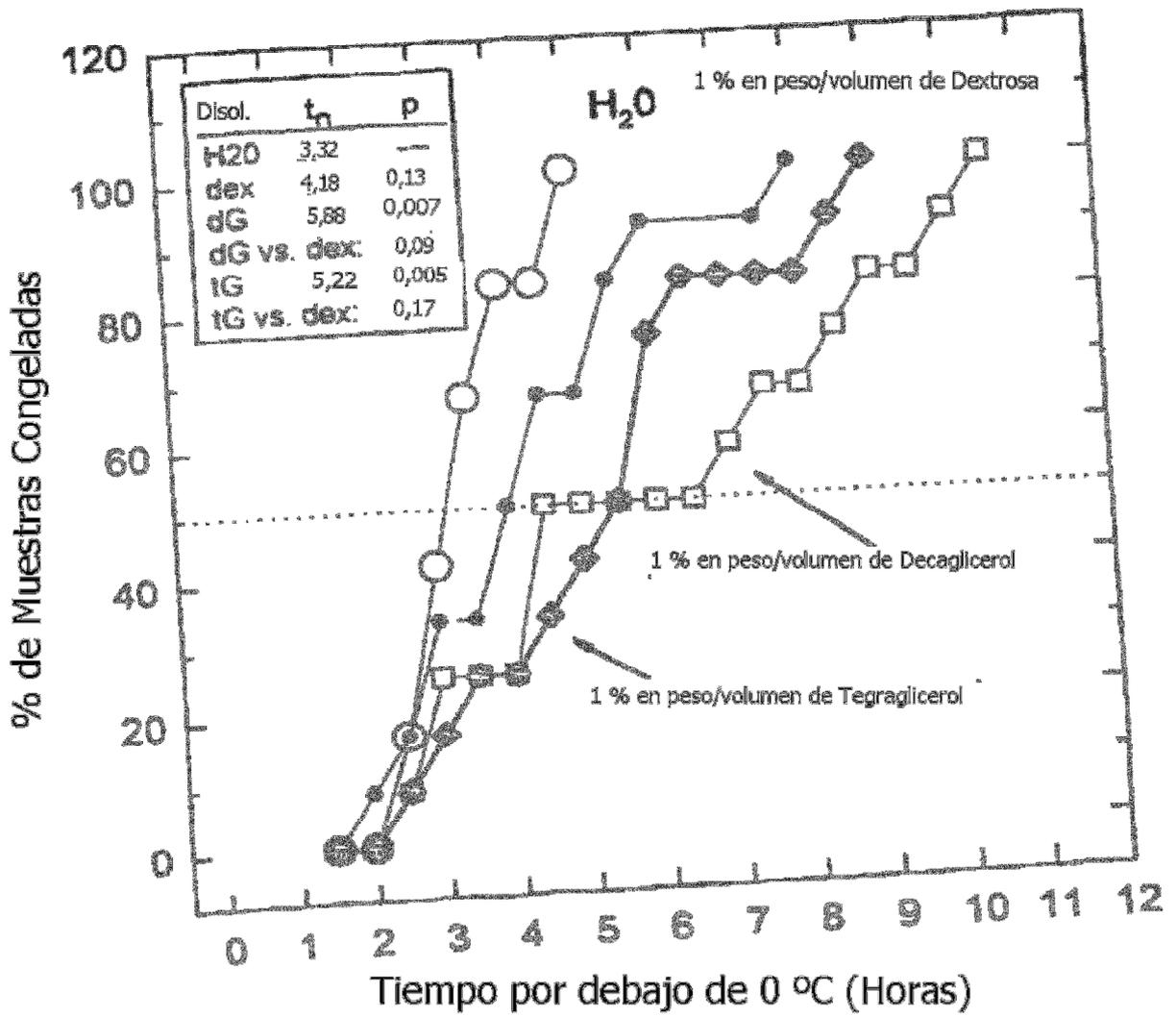
45

9. Un método para evitar la nucleación y mejorar el super-enfriamiento del agua, que comprende añadir variantes de poliglicerol, como se define en la reivindicación 1, en el que se retiran uno o más de los grupos OH terminales.

Puntuaciones de Super-enfriamiento de muestra (Super-enfriada = 0, Congelada = 1) tras el Almacenamiento a aproximadamente -20 °C







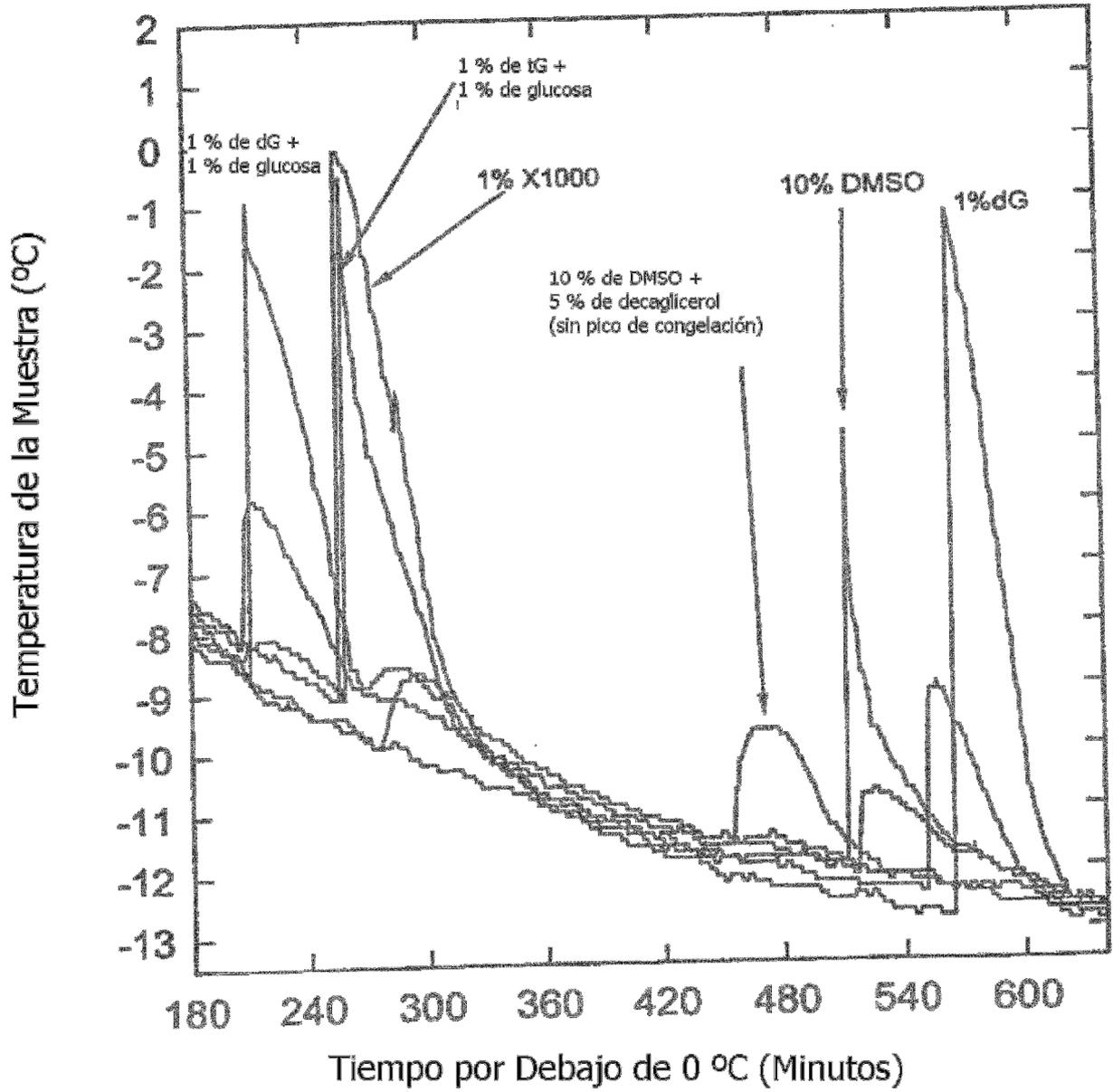
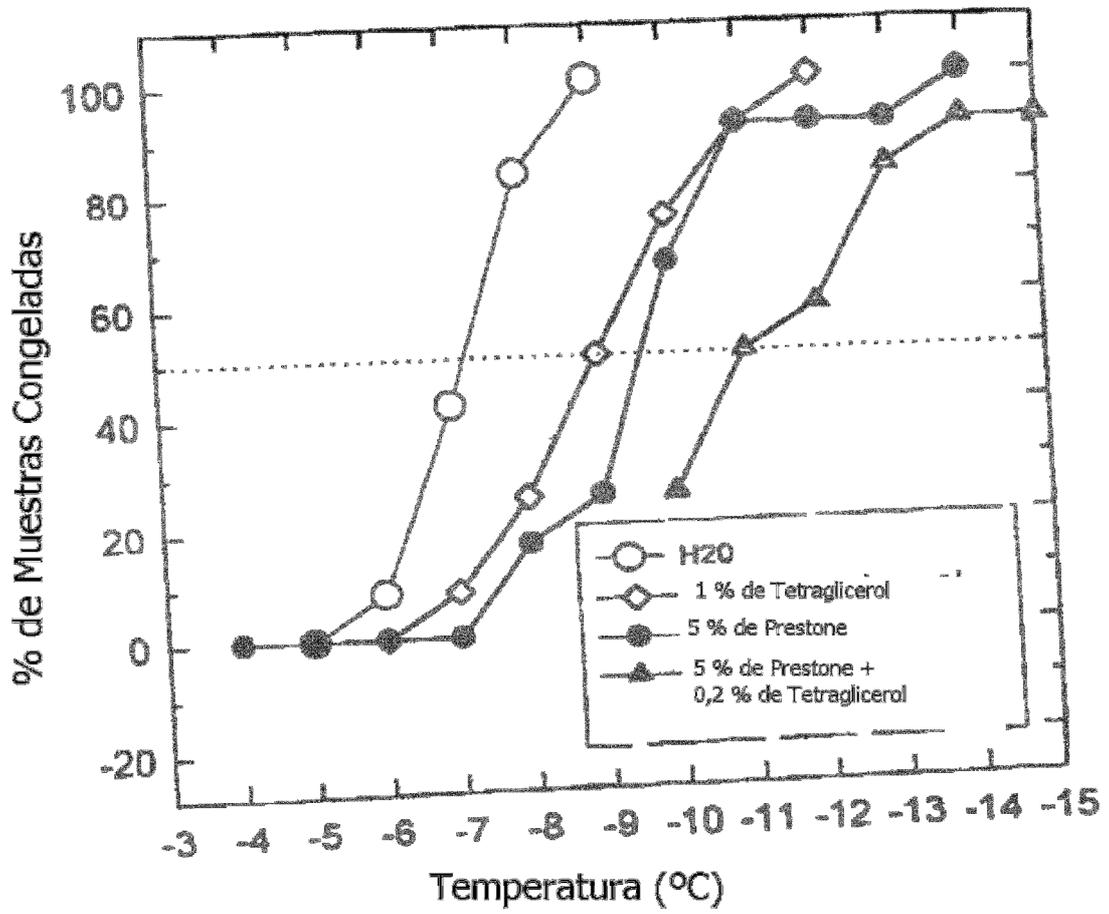
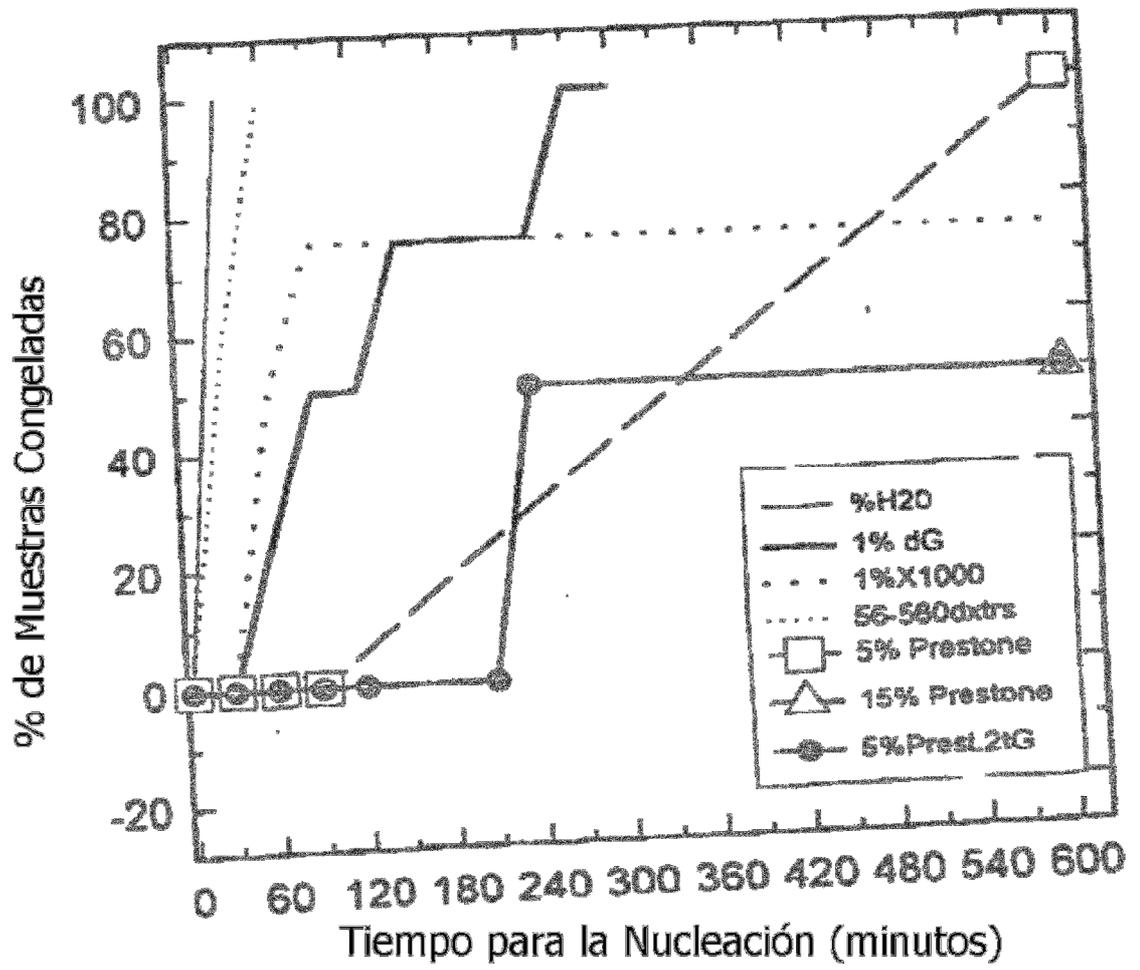
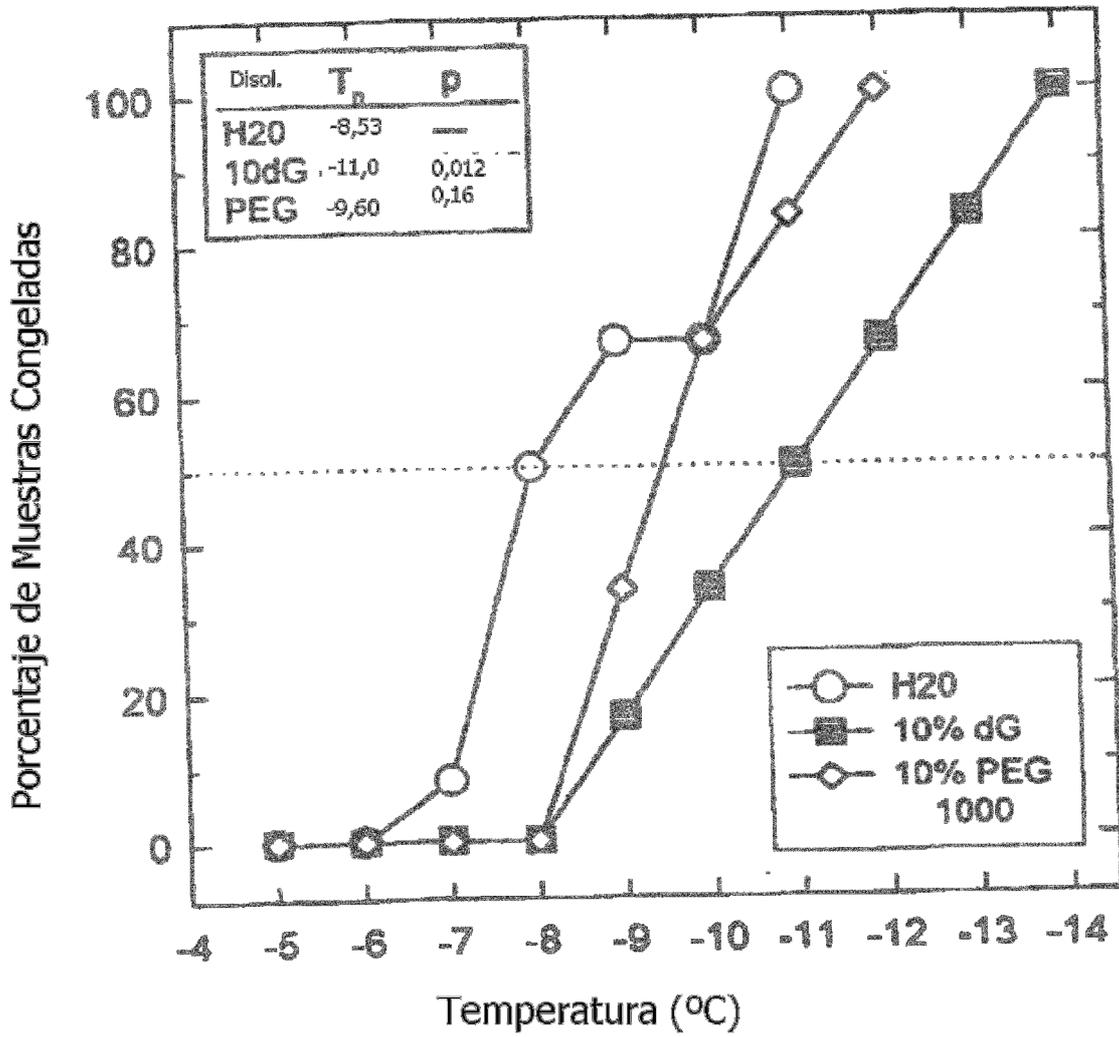


Fig. 4







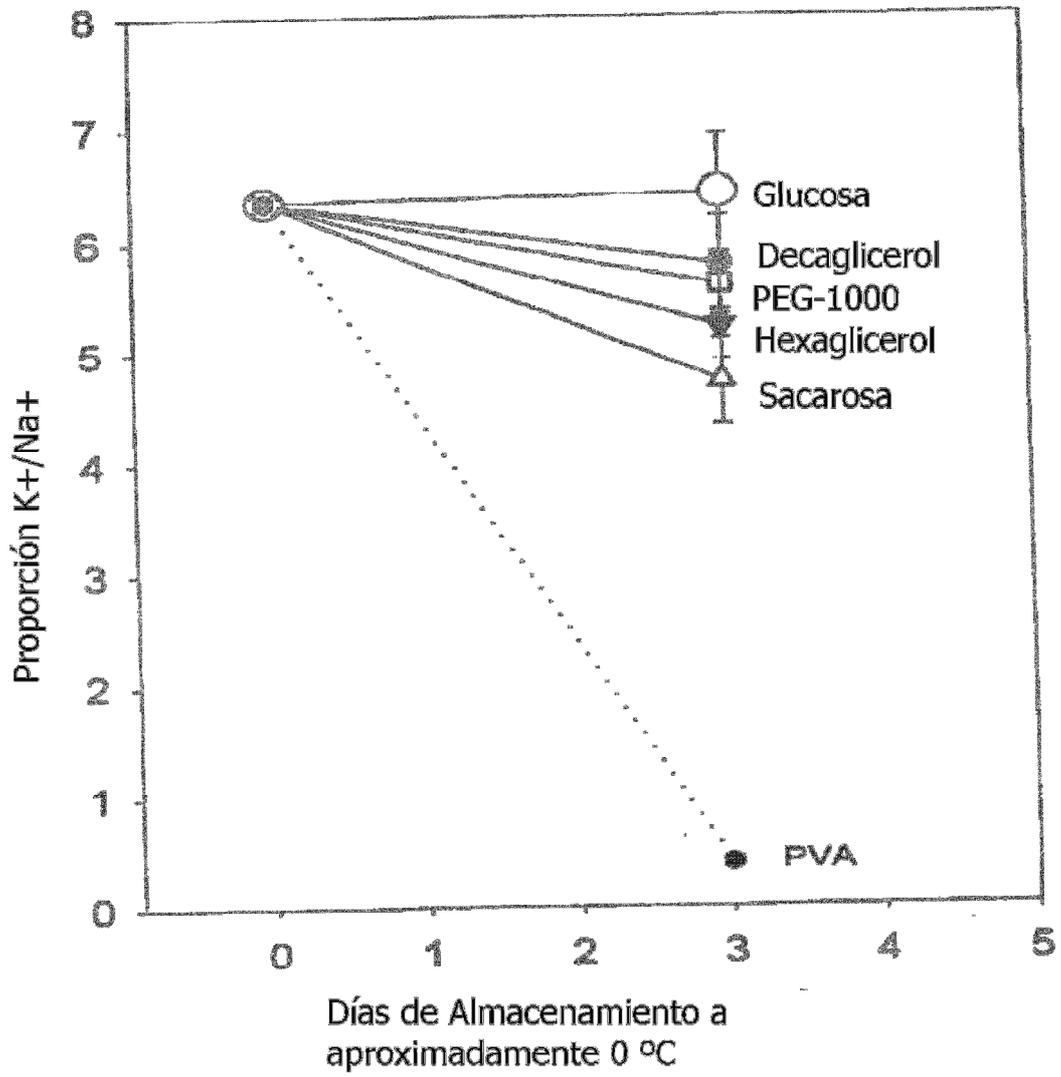
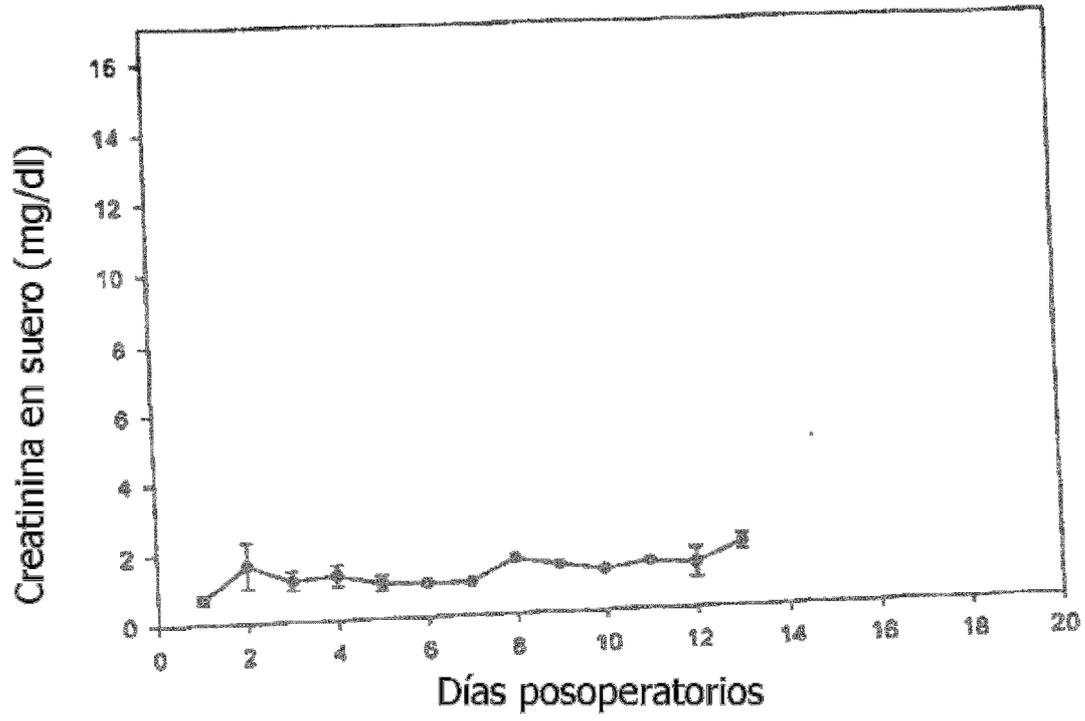


Figura 9



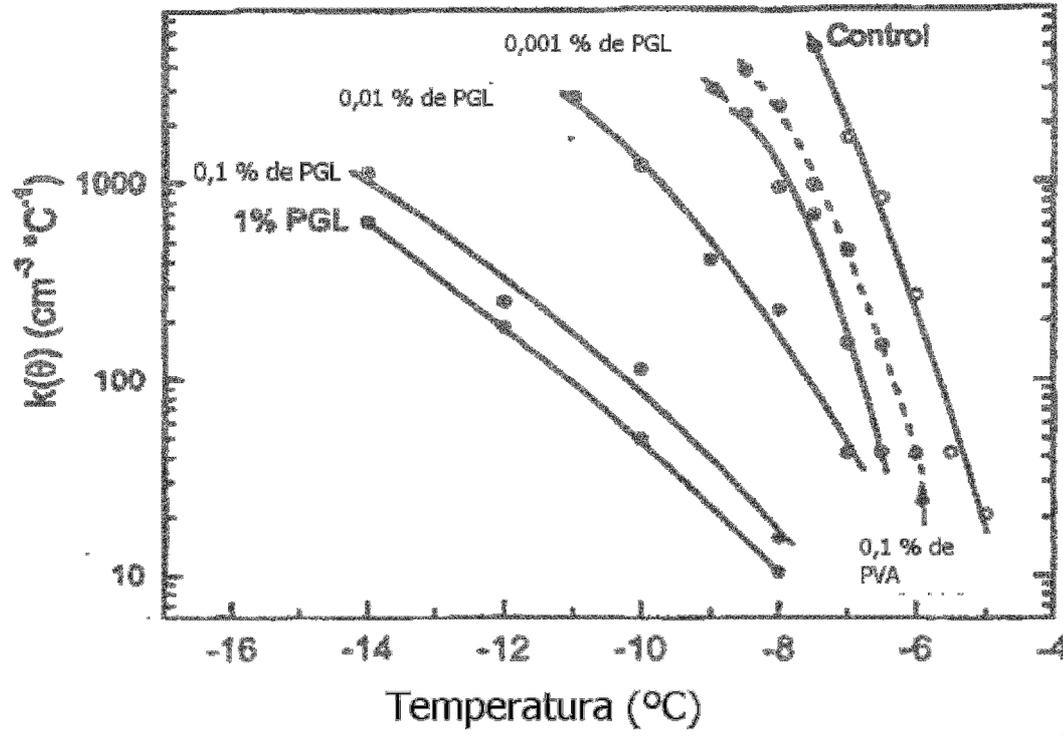


Fig. 10

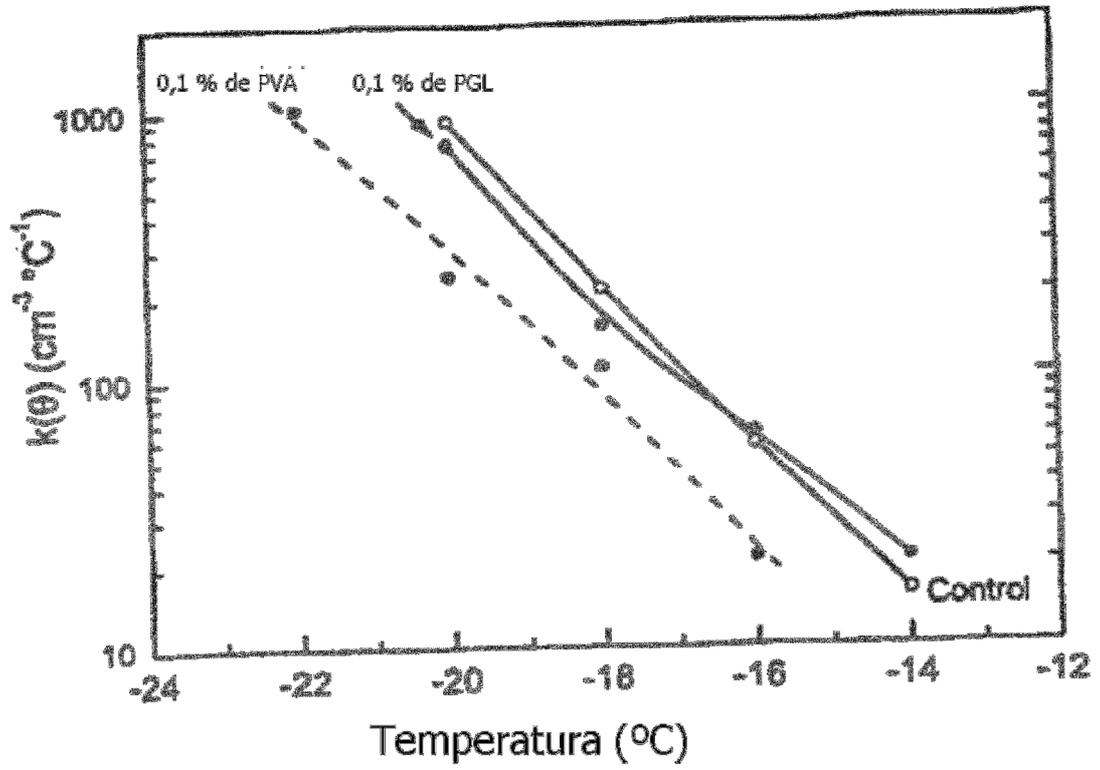
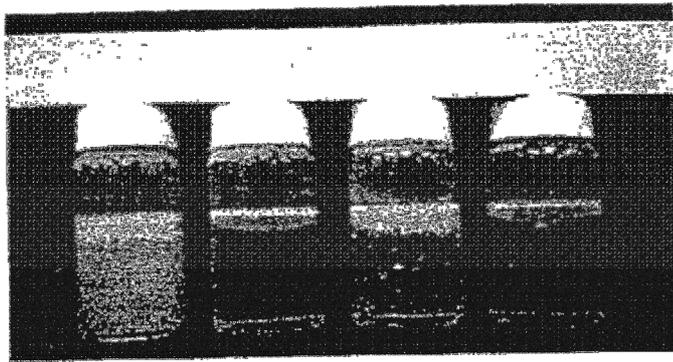


Fig. 11



Fotografía

Vial
Sólido Blanco
con Hielo

Vial
Parcialmente
Turbio

Vial
en su Mayoría
Transparente

Vial
perfectamente
Transparente
(vitrificado)

Fig
12