

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 381 289**

21 Número de solicitud: 201100030

51 Int. Cl.:

C07H 3/02 (2006.01)

C07H 3/04 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

22 Fecha de presentación:

04.12.2009

30 Prioridad:

04.12.2009 ES 200931116

43 Fecha de publicación de la solicitud:

24.05.2012

Fecha de la concesión:

27.11.2012

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:

10.12.2012

62 Número de la solicitud inicial:

P 200931116

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE GRANADA (100.0%)
Hospital Real, Cuesta del Hospicio s/n
18071 Granada, (Granada), ES**

72 Inventor/es:

**MANZANERA RUIZ, Maximino;
GONZALEZ LOPEZ, Jesus Juan;
NARVAEZ REINALDO, Juan Jesus y
SANTA CRUZ CALVO, Lucia**

54 Título: **COMPOSICION SINTETICA CON EFECTO XEROPROTECTOR**

57 Resumen:

Composición sintética con efecto xeroprotector
La presente invención se refiere a una composición xeroprotectora sintética, similar a la que puede obtenerse a partir del microorganismo de la especie bacteriana *Arthrobacter* sp. con número de acceso CECT7623, que comprende glutamina, glucosa y trehalosa. La presente invención también se refiere al uso de la composición xeroprotectora para la conservación de material biológico con un contenido de humedad residual igual o inferior al 10%.

ES 2 381 289 B2

DESCRIPCIÓN

Composición sintética con efecto xeroprotector.

5 La presente invención se refiere a una composición xeroprotectora sintética, similar a la que puede obtenerse a partir del microorganismo de la especie bacteriana *Arthrobacter* sp. con número de acceso CECT7623, que comprende glutamina, glucosa y trehalosa.

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

15 **Estado de la técnica anterior**

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

20 Los métodos actuales de conservación requieren de gran costo en energía y generalmente necesitan de almacenaje a bajas temperaturas. En ocasiones, después de su conservación el material biológico tiene una actividad y/o viabilidad que no alcanza los niveles satisfactorios. Los métodos de conservación, tales como el secado a temperatura ambiente, formulaciones en líquido, el congelado con crioprotectores o la liofilización producen reducciones significativas en la actividad/viabilidad del material conservado.

30 Los procesos usados actualmente son lentos e implican un elevado consumo de energía. Además, la liofilización confiere sólo un nivel modesto de termotolerancia en el producto final, y se requiere aún refrigeración para reducir el deterioro durante el almacenamiento. Éste es un problema particular para vacunas vivas destinadas a usarse en climas tropicales, ya que éstas pierden actividad, con el desafortunado resultado de que los programas de vacunación realizados en el campo en países tropicales, donde el control de la “cadena de frío” es difícil, pueden conducir finalmente a la vacunación de pacientes con vacuna inferior a la estándar o, en algunos casos, inservible.

35 Durante la selección natural evolutiva, ciertas especies de microorganismos, plantas y animales adquirieron la notable y elegante capacidad de tolerar la deshidratación extrema, permaneciendo latentes en medios hostiles durante períodos muy largos de tiempo y aún capaces de adquirir una actividad vital completa una vez hidratadas nuevamente. Ejemplos incluyen la “planta de la resurrección” *Selaginella lepidophylla*, el camarón de mar *Artemia salina*, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* o el tardígrado *Macrobotus hufelandi*. Estos organismos se denominan criptobióticos y el procedimiento por el que sobreviven se conoce como anhidrobiosis. Todas las especies de animales y plantas que presentan esta capacidad, contienen moléculas protectoras formadoras de cristales amorfos como el disacárido trehalosa (α -D-glucopiranosil- α -D-glucopiranosido).

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

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

Explicación de la invención

60 La presente invención se refiere a una composición sintética con efecto xeroprotector que comprende glutamina, glucosa y trehalosa, similar a la que puede obtenerse a partir del microorganismo de la especie bacteriana *Arthrobacter* sp. con número de acceso CECT7623, según se describe en la patente P200931116.

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

La capacidad para conservar material biológico sensible por períodos de tiempo indefinido en forma activa o viable es de importancia en aplicaciones para los sectores médico, agrícola e industrial. En la presente invención se ofrecen herramientas para solucionar la conservación de material biológico que presenta dificultades para su estabilización. El material biológico preservado con la composición es estable por períodos largos de tiempo.

5 Tal como se muestra en los ejemplos de la presente invención, el uso de una composición que contiene cada uno de los componentes por separado para la conservación de la actividad de una enzima lipasa, es decir, la suma del efecto en la conservación de la actividad enzimática de una composición que contiene glutamina, glucosa o trehalosa, es menor que el efecto de conservación que produce una composición que contiene todos los componentes, es decir, la composición xeroprotectora tiene un efecto sinérgico en su capacidad de conservar material biológico.

15 En adelante se podrá hacer referencia al microorganismo CECT7623, depositado en la colección española de cultivos tipo (CECT) el 10 de noviembre de 2009 al que le correspondió el n° de depósito CECT7623, con el término "4J27", o como "microorganismo de la presente invención" o el "microorganismo de la invención". La dirección de dicha Autoridad Internacional de depósito es: Universidad de Valencia/Edificio de investigación/Campus de Burjassot/46100 Burjassot (Valencia).

20 La composición sintética objeto de esta invención es equivalente a la que conforman los productos de ordeñado bacteriano de la cepa 4J27 tras su extracción por secado mediante incubación al aire (4J27D), según se describe en la patente P20093116.

25 El término "composición xeroprotectora" tal como se entiende en la presente invención, se refiere a una composición que previene los efectos adversos de la desecación total o parcial de material de origen biológico o material de origen sintético.

30 El material biológico se refiere a cualquier compuesto producido directamente por un organismo vivo en cualquier estado de desarrollo, en cualquier compartimento celular, sea cual sea la naturaleza, composición o estructura del mismo, o que procede de un organismo que ya no está vivo. Dicho material biológico puede ser, por ejemplo, pero sin limitarse, una célula, ácido nucleico, proteína, enzima, polisacárido, lípido, fosfolípido, liposomas, virus, partículas virales o cualquier molécula que comprenda cualquiera de los elementos anteriores o cualquier molécula orgánica que tenga un efecto farmacológico, inmunogénico y/o fisiológico de acción local y/o sistémica. El material biológico puede comprender agentes terapéuticos; agentes anti-infectivos como antibióticos, antivirales; analgésicos o combinaciones de analgésicos; antiartríticos, antiasmáticos, antiinflamatorios, antioplásticos, antipruríticos, antipsicóticos, antipiréticos, antiespasmódicos, preparaciones cardiovasculares (incluyendo bloqueantes de canales de calcio, bloqueadores beta, o antiarrítmicos), agentes contra la hipertensión, diuréticos, vasodilatadores, estimuladores del sistema nervioso central, antitusivos, preparaciones anti resfriados, descongestionantes, agentes de diagnóstico, hormonas, estimuladores del crecimiento óseo, inhibidores de la resorción de la médula ósea, inmunosupresores, relajantes musculares, psicoestimulantes, sedantes, tranquilizantes, proteínas, péptidos o fragmentos de los mismos (tanto naturales, como sintéticos, como productos recombinantes), moléculas de ácidos nucleicos (tanto en forma polimérica de dos o más nucleótidos de ADN o ARN, incluyendo tanto moléculas de cadena doble como de cadena sencilla, construcciones genéticas, vectores de expresión, ARN antisentido, sentido o moléculas ARNi) o nucleótidos (como por ejemplo, pero sin limitarse, el dATP, dCTP, dGTP, dTTP o dUTP, de utilidad en la técnica de PCR, secuenciación, etc).

45 El material de origen sintético se refiere a un tipo de material que no ha sido producido o sintetizado por un organismo vivo directamente sino que ha sido creado por el ser humano como por ejemplo, pero sin limitarse, una secuencia de ADN amplificada por PCR, o una proteína o enzima modificada intencionadamente o no. Asimismo, el material biológico se refiere también a un organismo invertebrado, un microorganismo, un órgano aislado, un tejido aislado o una célula.

50 Así, la presente invención se refiere a la una composición xeroprotectora sintética, que comprende glutamina, glucosa y trehalosa.

55 Una realización más preferida se refiere a la composición xeroprotectora producida por el microorganismo de la invención o a la composición xeroprotectora sintética que comprende una proporción de entre 0,5 y 1,5 de glutamina, 2 y 4 de glucosa, y 4 y 8 de trehalosa. Es decir, una proporción (glutamina):(glucosa):(trehalosa), de (0,5 a 1,5):(2 a 4):(4 a 8), respectivamente. Una realización aún más preferida se refiere a la composición xeroprotectora donde la proporción de (glutamina):(glucosa):(trehalosa), es de (0,7 y 1,3):(2,5 y 3,5):(5 y 7), respectivamente. Preferiblemente la composición xeroprotectora tiene una proporción de (glutamina):(glucosa):(trehalosa), de (1):(2,8):(5,8), respectivamente.

60 El término "proporción" tal como se entiende en la presente invención se refiere a la correspondencia debida de los elementos de la composición (β -hidroxibutirato, ácido glucurónico, ácido glutámico, glutamina y glucosa; o glutamina, glucosa y trehalosa) relacionados entre sí. Es decir, se refiere a una relación matemática que vincula los elementos de la composición.

65 En adelante se podrá hacer referencia a cualquier composición descrita en los párrafos anteriores como "composición de la presente invención" o "composición de la invención".

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

El material biológico seco en presencia del estabilizador que forma el cristal amorfo es resistente a plásticos en estado líquido, mientras que el material que no está seco en presencia de estos estabilizadores no es resistente a plásticos en estado líquido.

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

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

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

Una realización preferida se refiere al uso de la composición de la invención para la conservación de material biológico en estado seco, donde el material biológico es un organismo invertebrado, una semilla, una plántula, un microorganismo, un órgano aislado, un tejido biológico aislado o una célula. La célula puede ser procariota o eucariota. La célula puede ser una célula de un microorganismo en cualquier estado de desarrollo. La célula puede ser somática o germinal, vegetal o animal. Dicha célula puede proceder de cualquier organismo o microorganismo y puede presentarse en cualquier estado de diferenciación, como por ejemplo, pero sin limitarse, procedente de un cultivo de un tejido celular o de órganos, esperma, óvulos o embriones. La célula puede ser una célula madre totipotente, multipotente o unipotente. El microorganismo puede ser unicelular o multicelular. El microorganismo unicelular se selecciona de la lista que comprende, pero sin limitarse *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas putida*., *Salmonella* spp, *Rhizobium* spp, *Pseudomonas* spp, *Rhodococcus* spp, *Lactobacillus* spp. o *Bifidobacterium* spp.. El microorganismo pluricelular puede ser por ejemplo, pero sin limitarse, un nematodo.

La célula conservada por la composición de la presente invención es una célula viable es decir, es capaz de realizar las funciones normales de la célula incluyendo la replicación y división celular. Por otra parte la célula puede haber sido tratada, manipulada o mutada antes de su conservación. Por ejemplo, pero sin limitarse, una célula puede haberse hecho competente para transformaciones o transfecciones, o puede contener ácidos nucleicos recombinantes. Las células que se conservan pueden formar una población homogénea o heterogénea, por ejemplo, pero sin limitarse, una librería de células en la que cada una contiene una variación de algún ácido nucleico. Preferentemente las células son células no anhidrobióticas (células sensibles a desecación) como por ejemplo, pero sin limitarse, células procedentes de microorganismos procariotas no anhidrobiontes que generalmente no sean esporulantes.

La conservación del microorganismo puede mejorarse mediante cultivo bajo condiciones que aumenten la concentración intracelular de trehalosa o de otros estabilizadores formadores de cristales amorfos. Por ejemplo, pero sin limitarse, en condiciones de alta osmolaridad (alta concentración de sales) que estimulen la producción intracelular de trehalosa o de otros estabilizantes formadores de cristales amorfos.

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

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

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

Una realización más preferida se refiere al uso de la composición de la invención, donde el material biológico es una molécula con actividad biológica. El término “molécula con actividad biológica” tal como se entiende en la presente invención se refiere a una molécula biológica cuyo origen sea un organismo vivo o que haya estado vivo, o derivados o análogos de dicha molécula. El término “derivados” se refiere a moléculas obtenidas por la modificación de una molécula con actividad biológica, que presentan una funcionalidad similar. Por otra parte, el término “análogos” se refiere a moléculas que presentan una función similar a la molécula con actividad biológica.

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

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

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

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

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

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

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

Cualquier método para la conservación de material biológico de la presente invención permite el empleo de dicho material en procesos de manufacturación en los cuales el material biológico sería demasiado inestable si no estuviera conservado mediante el uso de la composición de la presente invención. La invención incluye extrusiones o moldes en los que se incluye el material conservado por cualquier método de la presente invención. Un método de producción de una moldura que contenga biomaterial activo mediante estabilizadores puede incluir soluciones de materiales plásticos. Por ejemplo una moldura de material plástico con biomaterial activo encapsulado puede ser útil como componentes de biosensores. Por ejemplo un biosensor puede incluir bacterias que sean capaces de detectar sustancias tóxicas, patógenos o toxicidad en general.

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

Descripción de las figuras

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

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

El control positivo es trehalosa al 10%. El control negativo (-) se corresponde con la ausencia de compuesto alguno como aditivo previo a la desecación de la enzima. 4J27 es el valor de actividad lipasa registrada tras la estabilización por secado y posterior reconstitución de la enzima en presencia de POB extraídos de la cepa 4J27 mediante choque hiper/hipoosmótico respectivamente. 4J27D es la actividad lipasa registrada tras la estabilización por secado y posterior reconstitución de la enzima en presencia de POBSIA (Producto de Ordeñado Bacteriano extraído por Secado

mediante Incubación al Aire) extraídos de la cepa 4J27 mediante tratamiento de secado y posterior hidratación, que comprende los mismos componentes que la composición sintética objeto de esta invención.

5 Fig. 2. Muestra el porcentaje de estabilización de la actividad de la enzima lipasa por medio de algunas mezclas de solutos contra la desecación, respecto de la estabilización por trehalosa (100%).

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

15 4J27 es el valor de actividad lipasa registrada tras la estabilización por secado y posterior reconstitución de la enzima en presencia de POB extraídos de la cepa 4J27 mediante choque hiper/hiposmótico respectivamente. 4J27D es la actividad lipasa registrada tras la estabilización por secado y posterior reconstitución de la enzima en presencia de POBSIA, que comprende los mismos componentes que la composición sintética objeto de esta invención.

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

20 SIN es sintético.

T es trehalosa.

Ejemplos

25 A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos ilustrativos y de carácter no limitante que muestran la capacidad xeroprotectora de la composición objeto de esta invención así como del método de xeroprotección descrito.

30 En la tabla 1 se pueden observar las composiciones de los productos de ordeñado bacteriano de la cepa 4J27 tras su extracción por secado mediante incubación al aire (4J27D).

35 Asimismo, en la Fig. 2 se muestra la actividad lipasa (en porcentaje relativo a un 100% de actividad del control positivo) tras secado de la enzima lipasa en presencia de glucosa y glutamina, compuestos químicos presentes en la composición sintética objeto de la invención. Las mezclas descritas se combinaron en la misma relación descrita en la mezcla de la presente invención y de esa mezcla se tomaron 10 g y se disolvieron en 100 ml de agua. El control positivo es trehalosa al 10%. El control negativo se corresponde con la ausencia de compuestos como aditivo previo a la desecación de la enzima (agua).

40 Tal como puede observarse en dicha Fig. 2, la combinación de los compuestos glucosa+glutamina, no presenta un efecto de conservación de la actividad de la enzima ni siquiera similar al que se muestra en la Fig. 1. En dicha Fig. 1 se muestra cómo las composiciones de los productos de ordeñado bacteriano de la cepa 4J27 tras su extracción por secado mediante incubación al aire (4J2A2D), presentan un efecto de protección de la enzima lipasa frente a la desecación mayor que en el caso de composiciones de conocida capacidad xeroprotectora.

45 TABLA 1

Composición del producto de ordeñado bacteriano (POB) de la cepa 4J27 tras su extracción por secado mediante incubación al aire

50

| 4J27D | |
|--------------|-----|
| Trehalosa | 5,8 |
| Glucosa | 2,8 |
| Glutamina | 1 |

60

Ejemplo 1

Ensayo de xeroprotección de enzimas

65

El objetivo de este ensayo fue determinar la capacidad de la fracción producto del ordeñado bacteriano para proteger enzimas frente a la desecación. Para ello se utilizó la enzima lipasa. Partiendo de 1 μ l que contenía 0,00554 unidades de lipasa de *Burkholderia cepacia* (Sigma-Aldrich 62309-100 mg) se adicionaron 15 μ l de la fracción pro-

ducto del ordeñado bacteriano a estudiar. Como control positivo se adicionaron 15 μ l de una solución al 10% de trehalosa a 1 μ l (0,00554 U) de solución de lipasa y como control negativo se añadió 15 μ l de agua a 1 μ l (0,00554 U) de solución de lipasa. Las mezclas de 16 μ l con lipasa se depositaron en un microtubo de 2 ml de capacidad y se secaron a 50°C durante 120 minutos. Una vez secas se incubaron a 100°C durante 5 minutos. Finalmente fueron almacenadas en un desecador a temperatura ambiente durante 24 horas. Pasado el tiempo de incubación, las reacciones se resuspendieron en 50 μ l de una solución de TrisHCl (50 mM) y se transfirieron a un microtubo junto con 950 μ l de Tris HCl (50 mM) pH8 y 1 ml de Solución de Sustrato. La determinación de la capacidad xeroprotectora de cada fracción producto de ordeñado bacteriano (POB) se determinó por el ensayo de medición de la actividad lipasa.

Para la medida de la actividad lipasa se utilizó una variación del método descrito por Gupta y colaboradores (2002) consistente en la cuantificación espectrofotométrica del *p-nitrofenol* liberado por la enzima lipasa de *Burkholderia cepacia* (Sigma-Aldrich 62309-100 mg) a partir del sustrato *p-nitrofenol* palmitato (pNPP) (Gupta *et al.*, 2002. Analytical Biochemistry, 311: 98-99). Para ello se utilizó 1 ml de medio libre de células (985 μ l de Tris-HCl 0,05 M junto a 15 μ l de POB obtenido por el método del “ordeñado bacteriano”) mezclado con 1 ml de solución sustrato de un cultivo en fase estacionaria. Esta mezcla de ensayo se incubó a 30°C durante 30 minutos en microtubos estériles de 2 ml. La reacción se paró mediante incubación a 100°C durante 4 minutos en termobloque y 2 minutos a -20°C. La absorbancia se midió en un espectrofotómetro Hitachi U-2000 a una longitud de onda de 410 nm. La solución sustrato (SS) se preparó mezclando 10 ml de solución A (30 mg de pNPP en 10 ml de isopropanol) con 90 ml de solución B (0,1 g de goma arábiga y 0,4 ml de Tritón X-100 en 90 ml tampón Tris-HCl 50 mM pH8). La mezcla de solución A y B se agitó suavemente hasta su total disolución. La Fig. 1 muestra los valores de protección de la enzima lipasa al secado generados por los POBs y POBSIAs producidos por la cepa que comprenden los mismos componentes que la composición sintética objeto de la invención.

Ejemplo 2

Ensayo de xeroprotección de microorganismos

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

Las muestras se sellaron al vacío y se almacenaron a 30°C hasta su ensayo de viabilidad a tiempo 1, 15 y 30 días. Pasado este tiempo las muestras se resuspendieron en 1 ml de LB y se realizaron ensayos de viabilidad mediante siembra en placa de LB sólido que se incubaron 24 horas a 37°C, para el conteo de UFC y comparación con las UFC antes del secado, para de esta forma poder calcular la supervivencia de las muestras.

En la Fig. 3 se observa cómo las composiciones sintéticas POBs y POBSIAs de la cepa 4J27 produjeron un aumento de la supervivencia de los microorganismos respecto de la supervivencia experimentada por dichos microorganismos mediante una solución de trehalosa, cuando las soluciones estaban al 34,2% de dichos compuestos xeroprotectores y durante el primer día de conservación. Se observa que la aportación del PVP 1,5% a la supervivencia es nula.

REIVINDICACIONES

1. Composición xeroprotectora sintética que comprende glutamina, glucosa y trehalosa.

5 2. Composición según reivindicación 1 que comprende una proporción de glutamina:glucosa:trehalosa, de entre (0,5 y 1,5):(2 y 4):(4 y 8), respectivamente.

10 3. Composición según la reivindicación 2, donde la proporción de glutamina:glucosa:trehalosa es de entre (0,7 y 1,3):(2,5 y 3,5):(5 y 7), respectivamente.

4. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para la conservación de material biológico con un contenido de humedad residual igual o inferior al 10%.

15 5. Uso de la composición según la reivindicación 4, donde el material biológico es un microorganismo o una célula.

6. Uso según la reivindicación 4, donde el material biológico es un organismo invertebrado, una semilla, una plántula, un órgano aislado o un tejido biológico aislado.

20 7. Uso según la reivindicación 4, donde el material biológico es una molécula con actividad biológica.

8. Uso según la reivindicación 7, donde la molécula con actividad biológica es una enzima.

9. Uso según la reivindicación 8, donde la enzima es una lipasa.

25 10. Método para la conservación de material biológico que comprende:

a) mezclar la composición xeroprotectora según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 con una muestra de material biológico aislado, y

30 b) deshidratar el producto obtenido en el apartado (a) hasta una humedad residual igual o inferior al 10%.

11. Método según la reivindicación 10, donde el material biológico es un microorganismo o una célula.

35 12. Método según la reivindicación 10, donde el material biológico del paso (a) es un organismo invertebrado, una semilla, una plántula, un órgano aislado o un tejido biológico aislado.

13. Método según la reivindicación 10, donde el material biológico es una molécula con actividad biológica.

40 14. Método según la reivindicación 13, donde la molécula con actividad biológica es una enzima.

15. Método según la reivindicación 14, donde la enzima es una lipasa.

45 16. Método según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 15, donde la deshidratación de la mezcla de la composición xeroprotectora y del material biológico según el paso (b) se lleva a cabo por medio de una solución hipertónica o por medio de una corriente de aire.

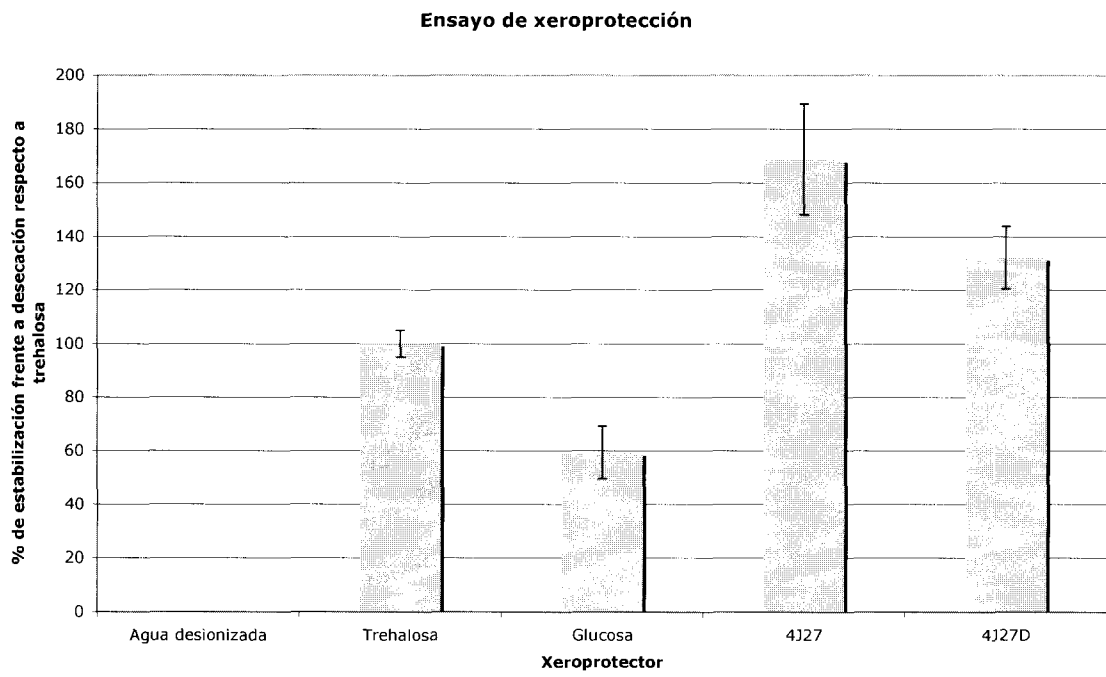


FIG. 1

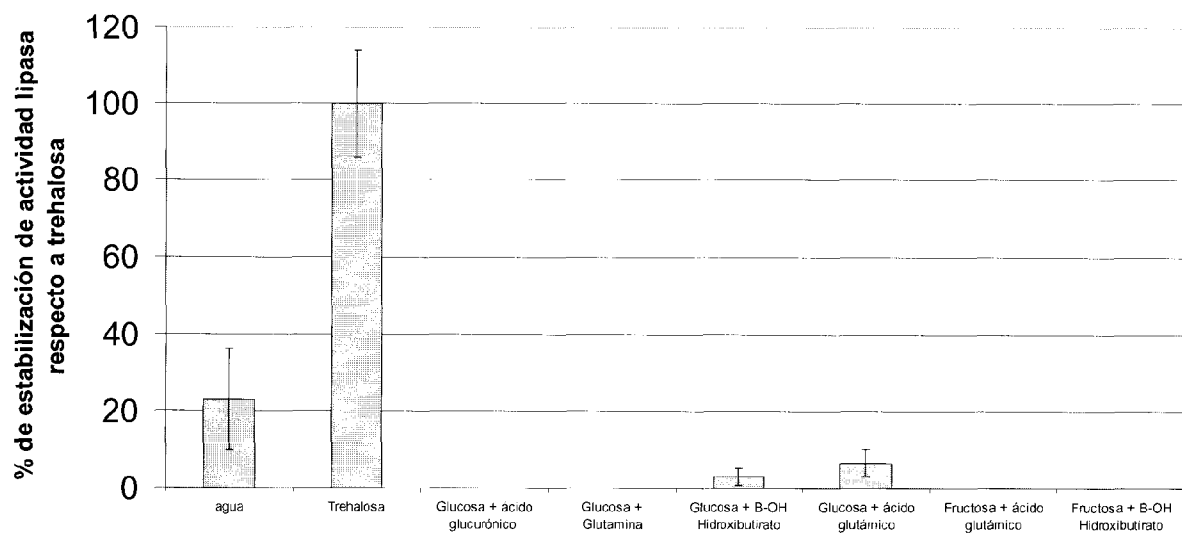


FIG. 2

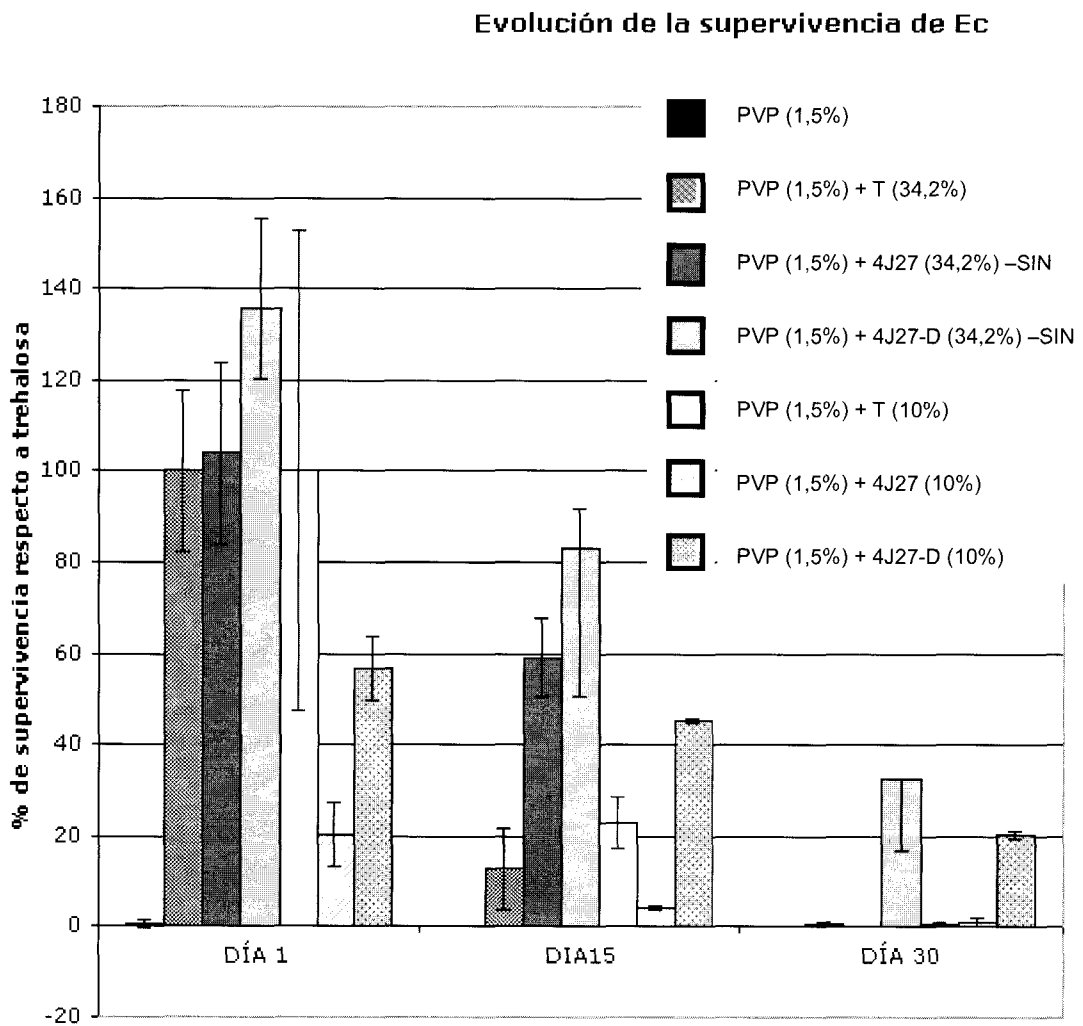


FIG. 3



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

21 N.º solicitud: 201100030

22 Fecha de presentación de la solicitud: 04.12.2009

32 Fecha de prioridad: **04-12-2009**

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

5 Int. Cl.: **C07H3/02** (2006.01)
C07H3/04 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | 56 Documentos citados | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|--|----------------------------|
| A | LI A. ET AL. Ethylene response factor T ERF1 enhances glucose sensitivity in tobacco through activating the expression of sugar-related genes. 2008. <i>Journal of Integrative Plant Biology</i> . Vol. 51, No.2, páginas 184-193. | 1-16 |
| A | CAI Z. ET AL. Trehalose-6-phosphate synthase 1 from <i>Metarhizium anisopliae</i> : clone, expression and properties of the recombinant. 22.04.2009. <i>Journal of Bioscience and Bioengineering</i> . Vol.107, No.5, páginas 499-505. | 1-16 |
| A | MX PA06014490 A (GABRIEL ITURRIAGA DE LA FUENTE) 10.10.2008. | 1-16 |

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
10.05.2012

Examinador
I. Rueda Molíns

Página
1/4

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

C07H

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

INVENES, EPODOC, WPI, TXT

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 10.05.2012

Declaración

| | | |
|---|-----------------------|-----------|
| Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986) | Reivindicaciones 1-16 | SI |
| | Reivindicaciones | NO |
| Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986) | Reivindicaciones 1-16 | SI |
| | Reivindicaciones | NO |

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

Base de la Opinión.-

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

1. Documentos considerados.-

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

| Documento | Número Publicación o Identificación | Fecha Publicación |
|-----------|---|-------------------|
| D01 | LI A. ET AL. Ethylene response factor TERF1 enhances glucose sensitivity in tobacco through activating the expression of sugar-related genes. 2008. <i>Journal of Integrative Plant Biology</i> . Vol. 51, No.2, páginas 184-193. | 2008 |
| D02 | CAI Z. ET AL. Trehalose-6-phosphate synthase 1 from <i>Metarhizium a nisopliae</i> : clone, expression and properties of the recombinant. <i>Journal of Bioscience and Bioengineering</i> . Vol.107, No.5, páginas 499-505. | 22.04.2009 |
| D03 | MX PA06014490 A (GABRIEL ITURRIAGA DE LA FUENTE) | 10.10.2008 |

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

En la invención de la solicitud de patente se reivindica una composición xeroprotectora sintética que comprende glutamina, glucosa y thehalosa.

El documento D01 muestra una relación entre la glucosa y la tolerancia a la sequía. Los documentos D02 y D03 divulgan como la trehalosa aumenta la tolerancia frente a la desecación.

Ninguno de los documentos citados divulga una composición xeroprotectora sintética que comprende glutamina, glucosa y thehalosa. Por tanto, teniendo en cuenta la información divulgada en los documentos D01, D02 y D03 las reivindicaciones 1-16 presentan novedad y actividad inventiva según lo establecido en los Artículos 6 y 8 LP 11/1986.