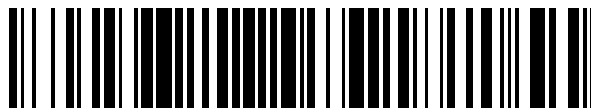


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 389 366**

21 Número de solicitud: 201100033

51 Int. Cl.:

**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 200931119**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**25.10.2012**

Fecha de la concesión:

**25.04.2013**

45 Fecha de publicación de la concesión:

**09.05.2013**

62 Número y fecha presentación solicitud principal:

**P 200931119 04.12.2009**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**MANZANERA RUIZ, Maximino;  
GONZÁLEZ LÓPEZ, Jesús Juan y  
NARVÁEZ REINALDO, Juan Jesús**

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

57 Resumen:

La presente invención se refiere a una composición xeroprotectora sintética, similar a la que puede obtenerse a partir del microorganismo de la especie bacteriana *Microbacterium* sp. con número de acceso CECT7624 que comprende trehalosa, ácido oxoglucurónico, lactato, glutamato, glutamina y piruvato, o además comprende fucosa. La presente invención también se refiere al uso de la composición xeroprotectora para la conservación de material biológico y a un método para la conservación de dicho material biológico.

ES 2 389 366 B2

## DESCRIPCIÓN

Composición sintética con efecto xeroprotector.

La presente invención se refiere a una composición xeroprotectora sintética, similar a la que puede obtenerse a partir del microorganismo de la especie bacteriana *Microbacterium* sp. con número de acceso CECT7624 que comprende trehalosa, ácido oxoglucurónico, lactato, glutamato, glutamina y piruvato, o además comprende fucosa.

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

## ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

La conservación de materiales biológicos mediante deshidratación y osmoconcentración es una tecnología conocida. Sin embargo, 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.

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.

Durante la selección natural evolutiva, ciertas especies de plantas y animales adquirieron la notable 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 *Macrobiotus 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 ( $\alpha$ -D-glucopiranosil- $\alpha$ -D-glucopiranosido).

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, hidroxiectoina, maltitol, lactitol (4-O- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-D-glucitol), palatinit [mezcla de GPS ( $\alpha$ -D-glucopiranosil-1-6-sorbitol) y GPM ( $\alpha$ -D-glucopiranosil-1-6-manitol)] y sus componentes individuales GPS y GPM. Los glicósidos no reductores de compuestos polihidroxilados pueden ser neotrehalosa, laconeotrehalosa, galactosil-trehalosa, sacarosa, lactosacarosa, rafinosa, etc. Otros conservantes formadores de cristales amorfos incluyen aminoácidos tales como la hidroxiectoina.

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

La presente invención se refiere a una composición sintética con efecto xeroprotector que comprende trehalosa, ácido oxoglucurónico, lactato, glutamato, glutamina y piruvato, o además comprende fucosa, similar a la que puede obtenerse a partir del microorganismo de la especie bacteriana *Microbacterium* sp. con número de acceso CECT7624. 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 o una célula, o una molécula con actividad biológica como por ejemplo una enzima con actividad lipasa. Además, la presente invención se refiere un método para la conservación de dicho material biológico.

En adelante se podrá hacer referencia al microorganismo CECT7624, depositado en la colección española de cultivos tipo (CECT) el 10 de noviembre de 2009 al que le correspondió el nº de depósito CECT7624, con el término "3J1", 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).

Una realización preferida de la presente invención se refiere a la composición xeroprotectora sintética, que comprende trehalosa, ácido oxoglucurónico, lactato, glutamato, glutamina, fucosa y piruvato.

Una realización más preferida de la presente invención se refiere a la composición xeroprotectora sintética, que comprende una proporción de entre 0,5 y 1,5 de trehalosa: 0,15 y 0,45 de ácido oxoglucurónico: 0,7 y 1,7 de lactato: 0,1 y 0,2 de glutamato: 0,15 y 0,45 de glutamina: 1,2 y 3,4 de fucosa: 0,15 y 0,3 de piruvato. Es decir, una proporción (trehalosa):(ácido oxoglucurónico):(lactato):(glutamato):(glutamina):(fucosa):(piruvato), de (0,5 a 1,5) : (0,15 a 0,45) : (0,7 a 1,7) : (0,1 a 0,2) : (0,15 a 0,45) : (1,2 a 3,4) : (0,15 a 0,3), respectivamente. Una realización aún más preferida se refiere a la composición xeroprotectora donde la proporción de (trehalosa):(ácido oxoglucurónico):(lactato):(glutamato):(glutamina):(fucosa):(piruvato), es de (0,7 a 1,3) : (0,25 a 0,35) : (0,9 a 1,6) : (0,12 a 0,18) : (0,2 a 0,4) : (1,8 a 2,8) : (0,2 a 0,25). Preferiblemente la composición xeroprotectora tiene una proporción de (trehalosa):(ácido oxoglucurónico):(lactato):(glutamato):(glutamina):(fucosa):(piruvato) de (1):(0,31):(1,18):(0,14):(0,28):(2,26):(0,23), respectivamente.

Otra realización preferida de la presente invención se refiere a la composición xeroprotectora sintética, que comprende trehalosa, ácido oxoglucurónico, lactato, glutamato, glutamina y piruvato.

Una realización más preferida de la presente invención se refiere a la composición xeroprotectora sintética, que comprende una proporción de entre 0,5 y 1,5 de trehalosa: 0,03 y 0,09 de ácido oxoglucurónico: 0,3 y 0,9 de lactato: 0,05 y 0,15 de glutamato: 0,05 y 0,15 de glutamina: 0,1 y 0,3 de piruvato. Es decir, una proporción (trehalosa):(ácido oxoglucurónico):(lactato):(glutamato):(glutamina):(piruvato), de (0,5 a 1,5) : (0,03 a 0,09) : (0,3 a 0,9) : (0,05 a 0,15) : (0,05 a 0,15) : (0,1 a 0,3), respectivamente. Una realización aún más preferida se refiere a la composición xeroprotectora donde la proporción de (trehalosa):(ácido oxoglucurónico):(lactato):(glutamato):(glutamina):(fucosa):(piruvato), es de (0,7 a 1,3) : (0,05 a 0,07) : (0,5 a 0,7) : (0,07 a 0,12) : (0,07 a 0,12) : (0,15 a 0,25). Preferiblemente la composición xeroprotectora tiene una proporción de (trehalosa):(ácido oxoglucurónico):(lactato):(glutamato):(glutamina):(piruvato) de (1):(0,06):(0,62):(0,1):(0,1):(0,21), respectivamente.

El término "proporción" tal como se entiende en la presente invención se refiere a la correspondencia debida de los elementos de la composición relacionados entre sí. Es decir, se refiere a una relación matemática que vincula los elementos de la composición. Para que sirva de ejemplo, la composición xeroprotectora que tiene una proporción de (trehalosa):(ácido oxoglucurónico):(lactato):(glutamato):(glutamina):(piruvato) de (1):(0,06):(0,62):(0,1):(0,1):(0,21), respectivamente, puede tener por ejemplo, concentraciones de (2):(0,12):(1,24):(0,2):(0,2):(0,42) mg de cada elemento respectivamente/ml.

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 se refiere al uso de la composición de la invención para la conservación de material biológico con un contenido de 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

5 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.

10 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 las que cada célula contiene una variación de algún ácido nucleico.

15 Preferentemente las células son células no anhidrobióticas (células sensibles a desecación) como por ejemplo, pero sin limitarse, células procedentes de microorganismos procariontes no anhidrobiontes que generalmente no sean esporulantes.

20 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.

25 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

30 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).

35 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.

40

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 (Ariesterasa), EC 3.1.1.3 (Triacilglicerol lipasa), EC 3.1.1.4 (Fosfolipasa A(2)), EC 3.1.1.5 (Lisofosfolipasa), EC 3.1.1.23 (Acilglicerol lipasa), EC 3.1.1.24 (3-oxoadipato enol-lactonasa), EC 3.1.1.25 (1,4-lactonasa), EC 3.1.1.26 (Galactolipasa), EC 3.1.1.32 (Fosfolipasa A(1)), EC 3.1.1.33 (6-acetilglucosa deacetilasa), EC 3.1.1.34 (Lipoproteína lipasa). Preferiblemente la enzima lipasa tiene actividad Triacilglicerol lipasa (EC 3.1.1.3).

45

50 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.

## 55 DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

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

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

5 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. 3J1 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 3J1 mediante choque hiper/hiposmótico respectivamente. 3J1D 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 3J1 mediante tratamiento de secado y posterior hidratación.

#### EJEMPLO

A continuación se ilustrará la invención mediante un ensayo ilustrativo y de carácter no limitante que muestran la capacidad xeroprotectora de la composición objeto de esta invención así como del método de xeroprotección descrito.

15 En la tabla 1 se pueden observar las composiciones de los productos de ordeñado bacteriano de la cepa 3J1 tras su extracción mediante choque hiper/hiposmótico (3J1), o tras su extracción por secado mediante incubación al aire (3J1D), tal y como se describe en la patente P200931119.

**Tabla 1.** Composición del producto de ordeñado bacteriano (POB) de la cepa 3J1.

3J1		3J1D	
Trehalosa	1	Trehalosa	1
Ac. oxoglucurónico	0,31	Ac. oxoglucurónico	0,06
Lactato	1,18	Lactato	0,62
Glutamato	0,14	Glutamato	0,1
Glutamina	0,28	Glutamina	0,1
Fucosa	2,26	-	-
Piruvato	0,23	Piruvato	0,21

#### 20 EJEMPLO.- Ensayo de xeroprotección de enzimas.

El objetivo de este ensayo fue determinar la capacidad de la fracción producto del ordeñado bacteriano para proteger enzimas frente a la desecación. Para ello se utilizó la enzima lipasa. Partiendo de 1 µl que contenía 0,00554 unidades de lipasa de *Burkholderia cepacia* (Sigma-Aldrich 62309-100 mg) se adicionaron 15 µl de la fracción producto del ordeñado bacteriano a estudiar. Como control positivo se adicionaron 15 µl de una solución al 10% de trehalosa a 1 µl (0,00554 U) de solución de lipasa y como control negativo se añadió 15 µl de agua a 1 µl (0,00554 U) de solución de lipasa. Las mezclas de 16 µl con lipasa se depositaron en un microtubo de 2ml de capacidad y se secaron a 50°C durante 120 minutos. Una vez secas se incubaron a 100°C durante 5 minutos. Finalmente fueron almacenadas en un desecador a temperatura ambiente durante 24 horas. Pasado el tiempo de incubación, las reacciones se resuspendieron en 50 µl de una solución de TrisHCl (50 mM) y se transfirieron a un microtubo junto con 950 µl de Tris HCl (50 mM) pH8 y 1 ml de Solución de Sustrato. La determinación de la capacidad xeroprotectora de cada fracción producto de ordeñado bacteriano (POB) se determinó por el ensayo de medición de la actividad lipasa.

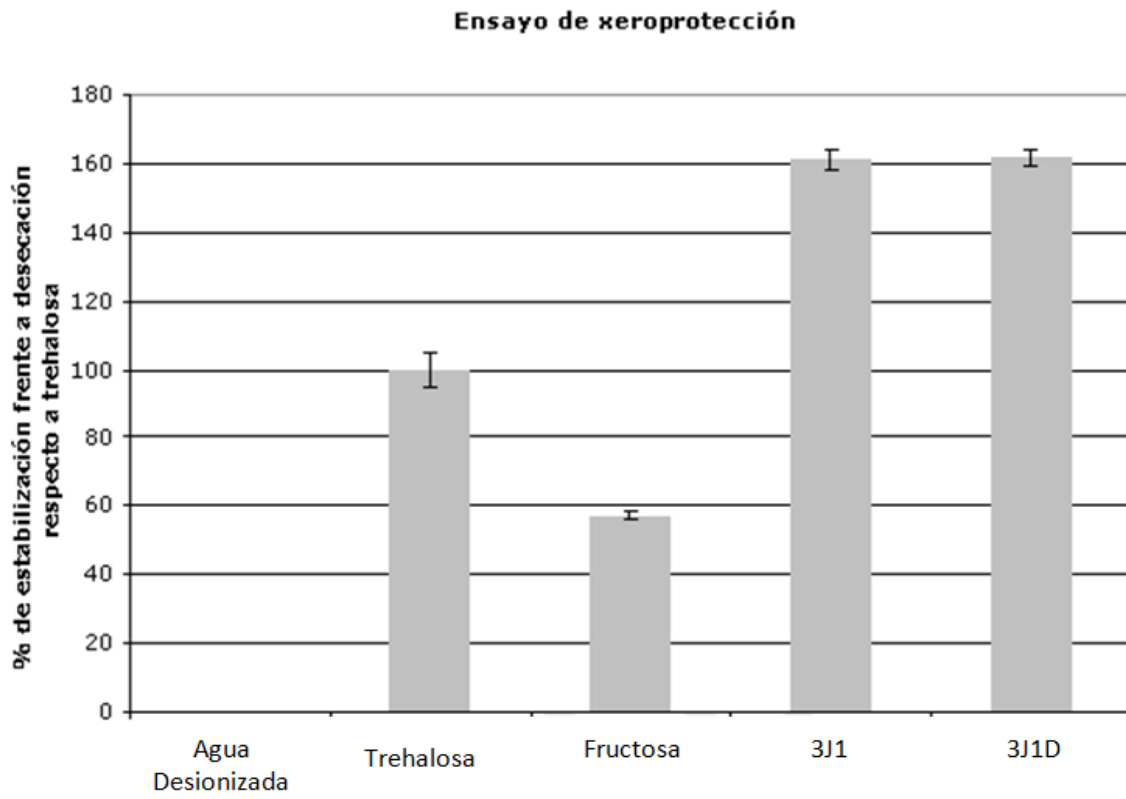
Para la medida de la actividad lipasa se utilizó una variación del método descrito por Gupta y colaboradores (2002) consistente en la cuantificación espectrofotométrica del *p-nitrofenol* liberado por la enzima lipasa de *Burkholderia cepacia* (Sigma-Aldrich 62309-100 mg) a partir del sustrato *p-nitrofenol palmitato* (pNPP) (Gupta et al., 2002. Analytical Biochemistry, 311: 98-99). Para ello se utilizó 1 ml de medio libre de células (985 µl de Tris-HCl 0,05M junto a 15 µl de POB obtenido por el método del "ordeñado bacteriano") mezclado con 1 ml de solución sustrato de un cultivo en fase 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 (0,1g de goma arábiga y 0,4 ml de Tritón X-100 en 90 ml tampón Tris-HCl 50mM pH8). La mezcla de

solución A y B se agitó suavemente hasta su total disolución. La FIG. 1 muestra los valores de protección de la enzima lipasa al secado generados por los POBs y POBSIAs producidos por la cepa.

5 La composición 3J1 de los productos de ordeñado bacteriano comprende trehalosa, ácido oxoglucurónico, lactato, glutamato, glutamina, piruvato y fucosa, mientras que la composición 3J1D comprende comprende trehalosa, ácido oxoglucurónico, lactato, glutamato, glutamina y piruvato, por lo que empleando composiciones sintéticas se obtienen efectos xeroprotectores similares.

**REIVINDICACIONES**

1. Composición xeroprotectora sintética que comprende trehalosa, ácido oxoglucurónico, lactato, glutamato, glutamina y piruvato.
- 5 2. Composición según la reivindicación 1, que comprende una proporción de trehalosa : ácido oxoglucurónico : lactato : glutamato : glutamina : piruvato, de entre (0,5 y 1,5) : (0,03 y 0,09) : (0,3 y 0,9) : (0,05 y 0,15) : (0,05 y 0,15), (0,1 y 0,3), respectivamente.
3. Composición según la reivindicación 2, donde la proporción de trehalosa : ácido oxoglucurónico : lactato : glutamato : glutamina : piruvato es de entre (0,7 y 1,3) : (0,05 y 0,07) : (0,5 y 0,7) : (0,07 y 0,12) : (0,07 y 0,12) : (0,15 y 0,25), respectivamente.
- 10 4. Composición xeroprotectora sintética según reivindicación 1, que además comprende fucosa.
5. Composición según reivindicación 4, que comprende una proporción de trehalosa : ácido oxoglucurónico : lactato : glutamato : glutamina : fucosa : piruvato, de entre (0,5 y 1,5) : (0,15 y 0,45) : (0,7 y 1,7) : (0,1 y 0,2) : (0,15 y 0,45), (1,2 y 3,4), (0,15 y 0,3), respectivamente.
- 15 6. Composición según la reivindicación 4, donde la proporción de trehalosa : ácido oxoglucurónico : lactato : glutamato : glutamina : fucosa : piruvato es de entre (0,7 y 1,3) : (0,25 y 0,35) : (0,9 y 1,6) : (0,12 y 0,18) : (0,2 y 0,4) : (1,8 y 2,8) : (0,2 y 0,25), respectivamente.
7. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para la conservación de material biológico con un contenido de humedad residual igual o inferior al 10%.
- 20 8. Uso según la reivindicación 7, donde el material biológico es un organismo invertebrado, una semilla, una plántula, un microorganismo, un órgano aislado, un tejido biológico aislado o una célula.
9. Uso según la reivindicación 7, donde el material biológico es una molécula con actividad biológica.
10. Uso según la reivindicación 9, donde la molécula con actividad biológica es una enzima.
11. Uso según la reivindicación 10, donde la enzima es una lipasa.



**FIG. 1**





OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201100033

②② Fecha de presentación de la solicitud: 04.12.2009

③② Fecha de prioridad: **04-12-2009**

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **C07H3/04** (2006.01)

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
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.	1-11
A	US 20080034452 A1 (CORNELL RESEARCH FOUNDATION, INC) 07.02.2008	1-11
A	MX 06014490 A (GABRIEL ITURRIAGA DE LA FUENTE) 10.10.2008	1-11

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  
14.08.2012

Examinador  
I. Rueda Molíns

Página  
1/4

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

C07H

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

INVENES, EPODOC, WPI, TXT

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 14.08.2012

**Declaración**

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

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	CAI Z. et al. Trehalose-6-phosphate synthase 1 from <i>Metarhizium anisopliae</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
D02	US 20080034452 A1 (CORNELL RESEARCH FOUNDATION, INC)	07.02.2008
D03	MX 06014490 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****NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA**

En la solicitud de patente se reivindica una composición xeroprotectora sintética que comprende: trehalosa, ácido oxoglucurónico, lactato, glutamato, glutamina y piruvato.

Los documentos D01, D02 y D03 divulgan como la trehalosa aumenta la tolerancia frente a la desecación. En ninguno de los documentos citados se divulga una composición xeroprotectora sintética que comprenda: trehalosa, ácido oxoglucurónico, lactato, glutamato, glutamina y piruvato. Por tanto, teniendo en cuenta la información divulgada en los documentos D01, D02 y D03, las reivindicaciones 1-11 presentan novedad y actividad según lo establecido en los Artículos 6 y 8 LP11/1986.