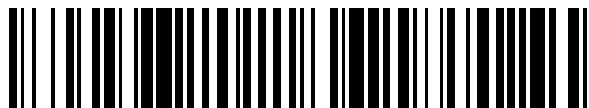


19

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 502 666**

21 Número de solicitud: 201330466

51 Int. Cl.:

C12Q 1/26 (2006.01)**A61K 31/70** (2006.01)**A61K 47/06** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

02.04.2013

43 Fecha de publicación de la solicitud:

03.10.2014

Fecha de la concesión:

20.10.2015

45 Fecha de publicación de la concesión:

27.10.2015

73 Titular/es:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (100.0%)
Serrano nº 117
28006 Madrid (Madrid) ES**

72 Inventor/es:

**GONZÁLEZ GRAU, Juan Miguel;
PORTILLO GUIADO, María Carmen;
CRUCES TOVA, Jorge y
CUECAS MORANO, María De Piedras Alba**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier54 Título: **Procedimiento de estabilización de biomoléculas**

57 Resumen:

La presente invención se refiere a un procedimiento para la estabilización de biomoléculas caracterizado porque dicha estabilización se consigue manteniendo la viscosidad del medio en el cual se encuentran dichas biomoléculas. Es de aplicación a un amplio número de biomoléculas tales como ATP o NADH y permite la utilización de las mismas en procedimientos analíticos, clínicos o médicos que se vayan a llevar a cabo en condiciones no adecuadas para el mantenimiento de su estabilidad.

ES 2 502 666 B1

PROCEDIMIENTO DE ESTABILIZACIÓN DE BIOMOLÉCULAS

DESCRIPCIÓN

5 **SECTOR Y OBJETO DE LA INVENCION**

La presente invención se encuadra en el ámbito del sector farmacéutico y de la biotecnología. El procedimiento de estabilización de biomoléculas objeto de la presente invención pretende dar solución al problema técnico que representa el hecho de que ciertas moléculas orgánicas necesarias para que la maquinaria celular pueda seguir funcionando (como ATP, NADH, ARN, y muchas proteínas y enzimas) son muy inestables, sobre todo cuando las condiciones a que se ven expuestas son extremas, por ejemplo pero no exclusivamente, por aumentos de temperatura.

Para la utilización de estas moléculas en ensayos o reacciones y para su empleo clínico, esas biomoléculas han de mantenerse en condiciones estables hasta su utilización. Además, su almacenamiento o transporte no siempre es posible hacerlo en frío y en muchas ocasiones algunos reactivos que contienen algunas de estas biomoléculas han de ser transportados o mantenidos en condiciones inadecuadas para el mantenimiento de su estabilidad. La tecnología propuesta presenta la posibilidad de aumentar significativamente la estabilidad de biomoléculas lo que tiene aplicaciones prácticas para su utilización en reacciones o ensayos enzimáticos o analíticos, en procedimientos clínicos o médicos, o cualquier otra utilización.

ESTADO DE LA TÉCNICA

Las células vivas se componen de un amplio número de moléculas orgánicas. La gran mayoría de ellas son propias de esas células por lo que se suelen denominar biomoléculas. Aunque las células parecen perfectamente estables, se sabe que un gran número de biomoléculas son relativamente inestables en solución dependiendo de las condiciones en las que se mantengan (Stryer L, Berg JM, Tymoczko JL. 2002. Bioquímica. Ed. Reverté, Barcelona). Por ejemplo, la gran mayoría de biomoléculas no resisten exposición a temperaturas relativamente elevadas. Como ejemplos típicos de biomoléculas inestables podemos citar, entre otras, el ATP (adenosin trifosfato), NAD (nicotinamida adenina dinucleótido) y NADP (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato), ARN (ácido ribonucleico) y un largo número de proteínas (Stryer et al. 2002).

A pesar de la inestabilidad de muchas moléculas biológicas, hoy en día sabemos que existen microorganismos que necesitan temperaturas elevadas, incluso alrededor de los 100°C, para crecer y desarrollarse (Grogan, DW. 1998. Hyperthermophiles and the problem of DNA instability. Mol Microbiol. 28: 1043-1049; Vieille C, Zeikus GJ. 2001. Hyperthermophilic enzymes: Sources, uses, and molecular mechanisms of thermostability. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 65: 1-43). Estos microorganismos termófilos, sin embargo, utilizan las mismas biomoléculas que cualquier otro ser vivo (Stetter, KO. 1999. Extremophiles and their adaptation to hot environments. FEBS Lett 452: 22-25; Daniel, RM, DA Cowan. 2000. Biomolecular stability and life at high temperatures. Cell Mol Life Sci. 57: 250-264). Un problema fundamental es como moléculas tan lábiles como el ATP, que es la molécula energética por excelencia en las células, pueden permitir que continúe la vida de esas células a temperaturas elevadas. El ATP, por ejemplo, se descompone un 60% al exponerse 1 h a 95°C y el NAD más del 95% en dichas condiciones (Daniel and Cowan, 2000) en solución a pH 7.

Existen un sinfín de casos en los que distintas biomoléculas de uso comercial se exponen a elevadas temperaturas u otras condiciones adversas para su estabilidad. En la actualidad, prácticamente todas las biomoléculas inestables se transportan y almacenan bajo refrigeración. Sin embargo, existen muchas ocasiones que no es posible mantenerlas refrigeradas o un sistema de refrigeración adecuado no está disponible. El caso más típico sería el envío de biomoléculas para análisis o procedimientos médicos o clínicos a países del tercer mundo, o el mantenimiento de reactivos para análisis en condiciones de calor intenso como pueden ser ambulancias o coches de policía en épocas veraniegas en España. El problema es conseguir mantener biomoléculas estables en cualquier condición ambiental sin necesidad de sistemas caros de congelación.

Se discuten a continuación documentos encontrados que reflejan cual es el estado de la técnica:

CA2568714A1: A biomolecule-containing formulation of increase stability

Esta patente se centra en administrar biomoléculas, glicoproteínas (interferon) en este caso, en una solución relativamente compleja que le confiere mayor estabilidad dentro de un fluido no acuoso. Los interferones son especialmente inestables y han de estabilizarse durante su administración. La solución que proponen incluye la desecación de la biomolécula (por ejemplo, por liofilización) y suspensión de la partícula desecada resultante en un fluido no

acuoso hidrofóbico. La partícula desecada incluye la biomolécula (interferón) un tampón, un surfactante, y uno o más estabilizadores que pueden ser un carbohidrato, un antioxidante y un aminoácido. La temperatura para las que se propone es de 37°C o ligeramente superior.

El procedimiento objeto de la presente invención es mucho más sencillo, es aplicable a cualquier biomolécula (no sólo glicoproteínas) y puede emplearse para el mantenimiento a largo plazo de biomoléculas a elevadas temperaturas (muy superiores a 37°C), no únicamente durante su administración. No se requiere la inclusión de la biomolécula como una suspensión de partículas secas.

10 **EP1449523A1**: Composition and method for stable injectable liquids

Esta patente se basa en la estabilización de vacunas para su transporte sin refrigeración. La vacuna o material bioactivo se estabiliza inmovilizándolo en una sustancia cristalina (glassy; por ejemplo, cristales de azúcares), de la cual las pequeñas partículas siempre se suspenden en uno o más fluorocarbonos líquidos en los que las partículas son insolubles. A efectos de lo buscado en este documento, lo que se utiliza es la elevada densidad de los fluorocarbonos para separarlos en distintas fases de sustancias tampón que disolverían las partículas cuando necesiten ser utilizadas. Un inconveniente de este procedimiento es que los fluorocarbonos están muy regulados por su riesgo ambiental.

20 Frente a lo divulgado en este documento, el procedimiento de la invención no contempla necesariamente el empleo de fluorocarbonos sino que se basa en aumentar la viscosidad como un método sencillo para estabilizar biomoléculas sometidas a situaciones inadecuadas para su almacenamiento, transporte o manipulación.

25 **EP2489736A1**: Verfahren zur Stabilisierung einer biologischen Probe

Se basa en el empleo de amidas para la estabilización de biomoléculas (sondas biológicas). Está dirigida al mantenimiento de diversos tipos de biomoléculas, entre ellas ácidos nucleicos y proteínas que pueden estar refrigeradas o no. Opcionalmente se emplean, además de las amidas, diversos compuestos como alcoholes, disolventes, tampones, sustancias osmóticamente activas, quelatantes u otras, consiguiéndose estabilizar las biomoléculas en un rango de temperaturas comprendido entre -80 y 80°C. El procedimiento de invención propuesto en el presente caso no utiliza amidas y propone un método sencillo de estabilizar biomoléculas aumentando la viscosidad de la solución que contiene dichas biomoléculas.

35

US2012308987A1: Matrices and media for storage and stabilization of biomolecules

Esta invención se basa en el empleo de compuestos, principalmente inorgánicos y solubles en agua, que funcionan como antioxidantes y permiten la estabilización y almacenaje de biomoléculas en estado seco (dry-state). En ciertas composiciones emplean lo que denominan plastificador que es un compuesto que facilita el almacenamiento de la matriz en estado seco. Estos plastificadores mejoran las propiedades de la matriz (por ejemplo, su flexibilidad) y entre muchos de los posibles plastificadores que mencionan se encuentra el etilen glicol. Se menciona que el plastificador no interfiere con la estabilidad química o física de las biomoléculas almacenadas.

5

La principal diferencia con respecto al procedimiento objeto de la presente invención es que en esta patente se requiere que se seque la biomolécula, su uso en seco. Además la formulación es más compleja y se basa en el empleo de compuestos inorgánicos solubles en agua, antioxidantes y una larga lista de otros posibles compuestos (plastificadores) para mejorar el funcionamiento de la formula. La formula puede incluir inhibidores de ARNasas, ADN, ARN, aminoácidos, entre otros. La formulación es altamente compleja.

10

WO0243750A2: Method for stabilizing biomolecules in liquid formulations.

Esta tecnología se centra en el empleo de solventes líquidos para la estabilización de biomoléculas (proteínas con actividad biológica fundamentalmente en el tracto respiratorio) para su empleo en su administración como aerosoles incluyendo sistemas electrostáticos y electrohidrodinámicos. La formula se compone de un líquido portador (agua y un líquido orgánico), la proteína con efecto biológico, un estabilizador (un derivado de un carbohidrato con una cadena carbonada suspendido o disuelto en el líquido portador) y, opcionalmente, un excipiente farmaceutico. Entre los compuestos orgánicos que componen los líquidos portadores o solvente mencionan polietilenglicol entre otros (entre los ejemplos citados proponen la mezcla etanol/polietilen glicol 80%/20%). Lo más característico de esta tecnología es el empleo del agente estabilizador que se compone de un derivado de un carbohidrato con una cadena de entre 8-12 carbonos. La presencia del polietilen glicol como solvente no implica una mayor estabilidad de la proteína ensayada, dicha estabilidad viene dada por el derivado del carbohidrato, según los resultados presentados.

15

20

25

Esta invención se refiere a proteínas y su administración como aerosoles. La estabilidad que proporciona esta formulación parece venir dada (según sus resultados) por el agente estabilizador que es el derivado de un azúcar con una cadena de 8-12 carbonos.

A la vista de los documentos del estado de la técnica discutidos en los párrafos anteriores, sería interesante disponer de una tecnología que permita rebajar los costes requeridos para poder transportar y mantener biomoléculas y que sea capaz de mantenerlas estables por más tiempo en condiciones de preservación inadecuadas. Su utilización debería extenderse a cualquier aplicación que emplee biomoléculas relativamente inestables para su utilización en condiciones adversas de laboratorio o industria, de utilización en análisis de campo o en lugares inhóspitos o con reducida infraestructura y condiciones lejanas a las ideales para su preservación.

10

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Constituye el objeto de la presente invención un procedimiento para la estabilización de biomoléculas caracterizado porque dicha estabilización se consigue manteniendo la viscosidad del medio en el cual se encuentran dichas biomoléculas.

15

En una realización preferente del objeto de la presente invención, el medio en el cual se encuentran las biomoléculas es acuoso y el mantenimiento de la viscosidad se lleva a cabo añadiendo modificadores de la viscosidad seleccionados entre etilenglicol, ectoína, polisacáridos tales como almidón o ficoll, azúcares tales como sacarosa, maltosa o trehalosa, proteínas tales como gelatina, albúmina, caseína o enzimas tales como lisozima. Esta relación de modificadores de la viscosidad se aporta con carácter indicativo, no limitativo.

20

Más específicamente, se emplea etilenglicol a una concentración comprendida entre 20% y el 70% dependiendo del grado de estabilidad que se desee alcanzar.

25

Las biomoléculas a estabilizar se seleccionan entre, ARN, ATP, NAD, NADH, NADP, otros factores enzimáticos, enzimas y proteínas. La referida relación de biomoléculas se aporta con carácter indicativo, no limitativo.

30

En una realización particular de la presente invención, la biomolécula estabilizada es adenosín trifosfato (ATP), empleándose para ello una solución acuosa de etilenglicol, concretamente una disolución al 50% en tampón fosfato al 0,1 M y pH = 7,3. En esas condiciones, la molécula de ATP es mucho más estable en dicho medio en un intervalo de temperaturas comprendido entre 25 y 90°C.

35

En otra realización particular de la presente invención, la biomolécula estabilizada es NADH (nicotinamida adenín nucleótido), empleándose para ello una solución acuosa de etilenglicol, específicamente una disolución al 50% en tampón fosfato al 0,1 M y pH = 7,3.

5

En otra realización de la invención, el medio utilizado para la estabilización del NADH es una solución acuosa de ectoína, específicamente una disolución a una concentración de 0,45 g/ml.

10 En ambos casos se consigue incrementar considerablemente el tiempo en el que la molécula de NADH permanece estable en solución.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1A: Resultados del experimento para determinar la estabilidad del ATP a distinta viscosidad en presencia y ausencia de etilenglicol a 25°C y 80°C.

15

Figura 1B: Detalle de los resultados de la figura 1A a 80°C.

Figura 2: Resultados del experimento realizado para determinar el aumento de la estabilidad del NADH en presencia y ausencia de etilenglicol.

Figura 3: Resultados de la variación de la tasa de degradación de NADH frente a la viscosidad en presencia de etilen glicol

20

Figura 4: Resultados del experimento realizado para determinar el aumento de la estabilidad del NADH en presencia y ausencia de ectoína.

DESCRIPCIÓN DETALLADA Y MODO DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION

25 La presente tecnología que se propone sería válida para la generalidad de biomoléculas y específicamente adecuado para pequeñas biomoléculas como ATP, NAD, NADH y NADP, muy comunes en reacciones enzimáticas o ensayos enzimáticos utilizados en analítica.

En un intento de disminuir la interacción entre las moléculas en suspensión, se propone el empleo de soluciones con viscosidad elevada con objeto de reducir la fricción entre biomoléculas y facilitar así su mantenimiento o estabilidad. Al aumentar la temperatura, la viscosidad de los líquidos acuosos disminuye drásticamente lo que resulta en una mayor inestabilidad de las moléculas por su constante vibración. Por tanto, sería necesaria la utilización de sustancias que aumenten la viscosidad de las soluciones donde se encuentran las biomoléculas para poder aumentar su estabilidad. Por ejemplo, el agua a

35

20°C posee una viscosidad de aproximadamente 1.0 mPa.s mientras que a 90°C su viscosidad se reduce a 0.3 mPa.s, unas 3.2 veces inferior.

Una disminución de la viscosidad da lugar a una mayor inestabilidad de las moléculas y por tanto aumenta la degradación y desnaturalización de las biomoléculas o moléculas orgánicas clave para el mantenimiento de la vida de las células. El procedimiento objeto de la presente invención propone que aumentando la viscosidad se puede conseguir una estabilización de las biomoléculas bajo condiciones extremas (por ejemplo, de temperatura) de modo que se obtengan tiempos de vida equiparables o superiores a los que presentan esas biomoléculas en condiciones idóneas de mantenimiento o funcionamiento.

Para ello se propone el empleo de moléculas que proporcionen un aumento de viscosidad incluso a temperaturas elevadas. Un ejemplo sencillo es el etilenglicol, otros ejemplos pueden ser gelatinas o almidón, como proteínas o polisacáridos, respectivamente, entre otras muchas moléculas. Concentraciones elevadas de moléculas orgánicas también suelen resultar en aumentos de viscosidad en la solución. Ejemplos, pueden ser aminoácidos o azúcares, entre otros.

Ejemplo 1:

Para aumentar la viscosidad de las soluciones con biomoléculas y como modelo para comprobar la tecnología se empleó etilenglicol. El etilenglicol al 50% en agua y a 80°C presenta una viscosidad equivalente a la viscosidad del agua a 25°C (o temperatura ambiente). La biomolécula inestable utilizada como modelo en este estudio fue el ATP (adenosin trifosfato o trifosfato de adenosina) que es la molécula energética por excelencia en todas las células vivas. La presencia de etilenglicol al 50% en agua no presentaba ningún efecto en la estabilidad del ATP ni en la reacción de la luciferasa (Enliten, kit comercial para la cuantificación de ATP, Promega). Se comparó la degradación del ATP a 25°C y 80°C en solución acuosa (tampón fosfato 0.1 M y pH 7.3) con y sin etilenglicol de forma que se pudo ver como se degrada el ATP a lo largo del tiempo de incubación a esas temperaturas. A 80°C, en presencia de etilenglicol la viscosidad era aproximadamente 1 mPa.s (equivalente a la viscosidad del agua a 25°C) mientras que en solución acuosa sin la adición de etilenglicol la viscosidad era de aproximadamente 0.3 mPa.s. (Nota: mPa.s = miliPascales segundo; unidades recomendadas de viscosidad).

Los resultados a 25°C demostraban que la presencia de etilenglicol no afectaba la estabilidad del ATP (Figura 1 A). De los resultados a 80°C se observa una mayor estabilidad del ATP en la solución más viscosa (con etilenglicol) (Figura 1 B) la cual permitió la detección de niveles elevados de ATP durante toda la duración del experimento mientras que a la viscosidad baja el ATP dejaba de ser detectable a las 7 horas (Figura 1 B). En la Figura 1 B se presenta un detalle de los resultados a 80°C.

Ejemplo 2:

De forma similar se han hecho experimentos para determinar si un aumento de la viscosidad aumenta la estabilidad del NADH (nicotinamida adenín dinucleotido). Se realizaron dos experimentos, uno en presencia y ausencia de etilenglicol y otro en presencia y ausencia de ectoina. Etilenglicol y ectoina son dos compuestos que se utilizan para elevar la viscosidad de la solución. El etilenglicol se utilizó al 50% en agua como en el caso descrito anteriormente. La ectoina se empleó a una concentración de 0.45 g/ml que daba lugar a un aumento de la viscosidad con respecto al agua (1.6 mPa.s a 80°C; 7.7 mPa.s a 20°C) similar al descrito para el caso del etilenglicol. Los experimentos se realizaron con una concentración final de NADH de 1 mM. Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 2 y 3 (para el NADH con etilenglicol) y 4 (para el NADH con ectoina). En ambos casos (figuras 2 y 4) se observó que al aumentar la temperatura, las soluciones con mayor viscosidad conferían una mayor estabilidad a las biomoléculas (NADH en este ejemplo).

En la figura 3 se representa la velocidad de degradación frente a la viscosidad. Corresponde a NADH en etilenglicol y las distintas viscosidades se han conseguido aumentando la concentración de etilenglicol desde 10 hasta 60%.

Es decir, en presencia de etilenglicol o ectoina se obtenía una mayor viscosidad y a temperaturas elevadas se observó mayor estabilidad o persistencia del compuesto lábil ensayado (NADH en estos ejemplos) que en soluciones con viscosidad más baja (en ausencia de esos compuestos).

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la estabilización de biomoléculas caracterizado porque dicha estabilización se consigue manteniendo la viscosidad del medio en el cual se encuentran
5 dichas biomoléculas.
2. Procedimiento para la estabilización de biomoléculas según la reivindicación 1, caracterizado porque el medio en el cual se encuentran las biomoléculas es acuoso.
- 10 3. Procedimiento para la estabilización de biomoléculas según las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado porque el mantenimiento de la viscosidad del medio acuoso en el cual se encuentran las biomoléculas se lleva a cabo añadiendo modificadores de la viscosidad seleccionados entre, etilenglicol, ectoína, almidón, ficoll, sacarosa, maltosa, trehalosa, gelatina, albúmina, caseína o lisozima.
15
4. Procedimiento para la estabilización de biomoléculas según la reivindicación 3, caracterizado porque el modificador de la viscosidad es etilenglicol.
5. Procedimiento para la estabilización de biomoléculas según la reivindicación 4,
20 caracterizado porque el etilenglicol se añade al medio acuoso a una concentración comprendida entre el 20% y el 70%, preferentemente al 50%.
6. Procedimiento para la estabilización de biomoléculas según las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque las biomoléculas a estabilizar se seleccionan entre, ARN, ATP, NAD,
25 NADH, NADP, otros factores enzimáticos y enzimas.
7. Procedimiento para la estabilización de biomoléculas según la reivindicación 6, caracterizado porque la biomolécula estabilizada es adenosintrifosfato (ATP).
- 30 8. Procedimiento para la estabilización de biomoléculas según la reivindicación 7, caracterizado porque el medio utilizado para la estabilización del ATP es una solución acuosa de etilenglicol.

9. Procedimiento para la estabilización de biomoléculas según la reivindicación 8, caracterizado porque la solución acuosa de etilenglicol es una disolución al 50% en tampón fosfato al 0,1 M y pH = 7,3.
- 5 10. Procedimiento para la estabilización de biomoléculas según la reivindicaciones 8 y 9, caracterizado porque la molécula de ATP se estabiliza en dicho medio en un intervalo de temperaturas comprendido entre 25 y 90°C.
- 10 11. Procedimiento para la estabilización de biomoléculas según la reivindicación 6, caracterizado porque la biomolécula estabilizada es nicotinamida adenín dinucleotido (NADH).
- 15 12. Procedimiento para la estabilización de biomoléculas según la reivindicación 11, caracterizado porque el medio utilizado para la estabilización del NADH es una solución acuosa de etilenglicol.
- 20 13. Procedimiento para la estabilización de biomoléculas según la reivindicación 12, caracterizado porque la solución acuosa de etilenglicol es una disolución al 50% en tampón fosfato al 0,1 M y pH = 7,3.
- 25 14. Procedimiento para la estabilización de biomoléculas según la reivindicación 11, caracterizado porque el medio utilizado para la estabilización del NADH es una solución acuosa de ectoína
15. Procedimiento para la estabilización de biomoléculas según la reivindicación 14, caracterizado porque la solución acuosa de ectoína es una disolución a una concentración de 0,45 g/ml.

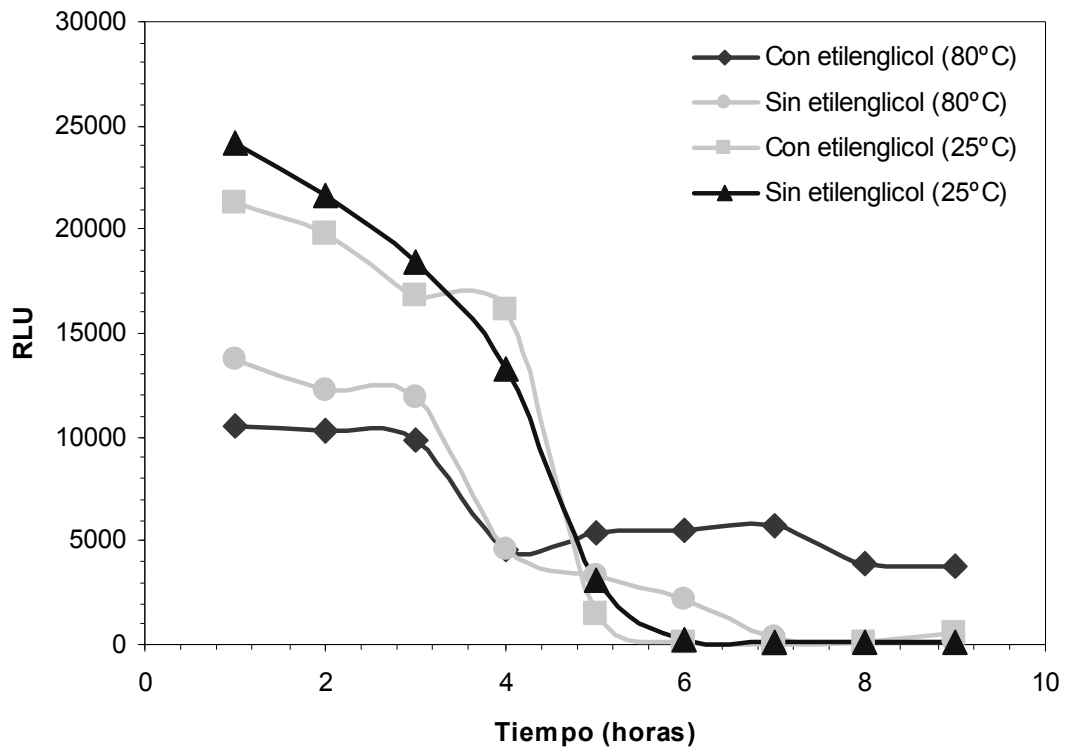


FIG. 1A

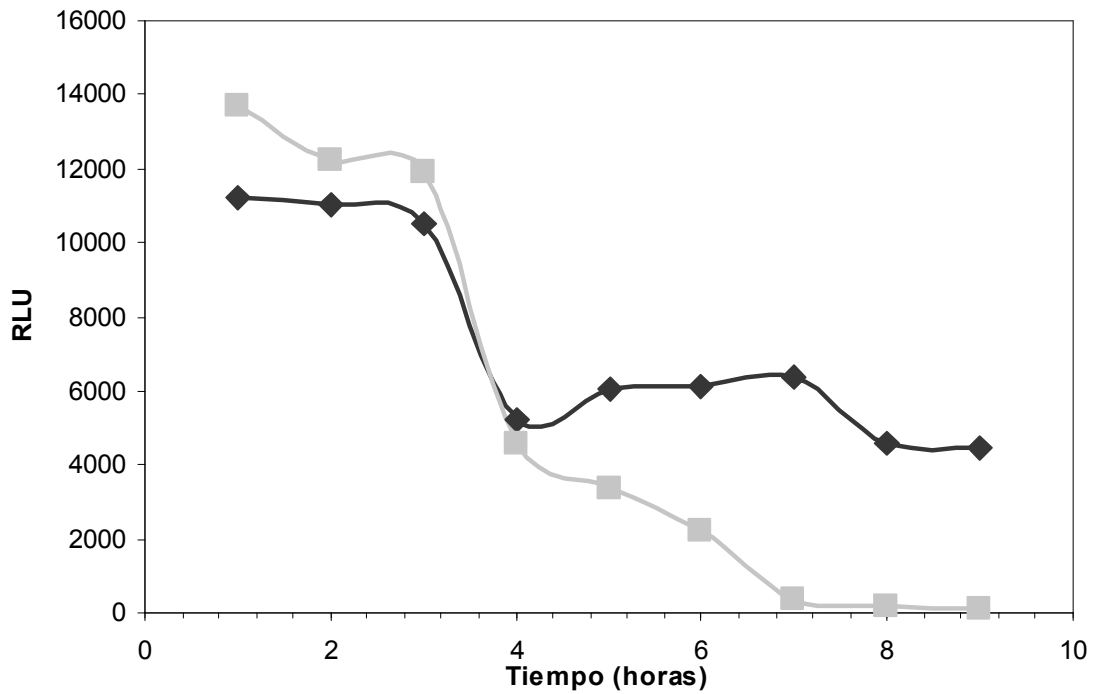


FIG. 1B

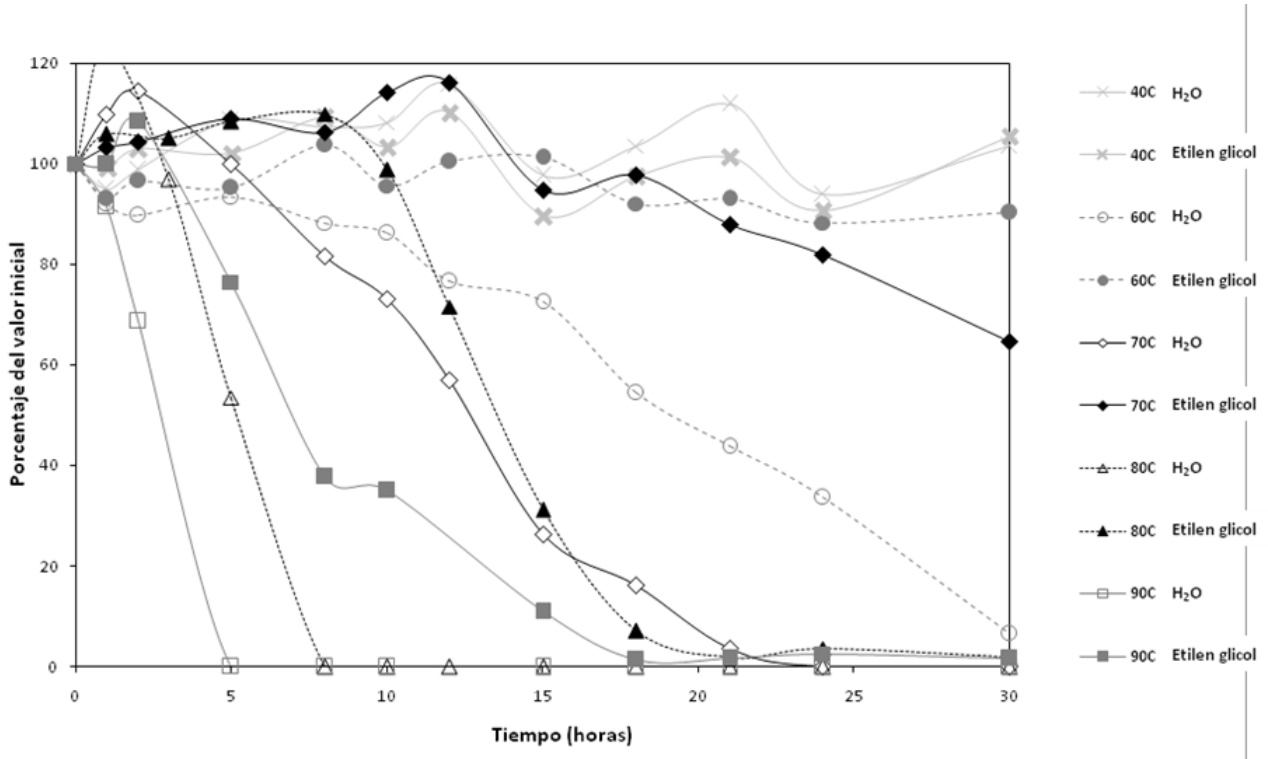


FIG. 2

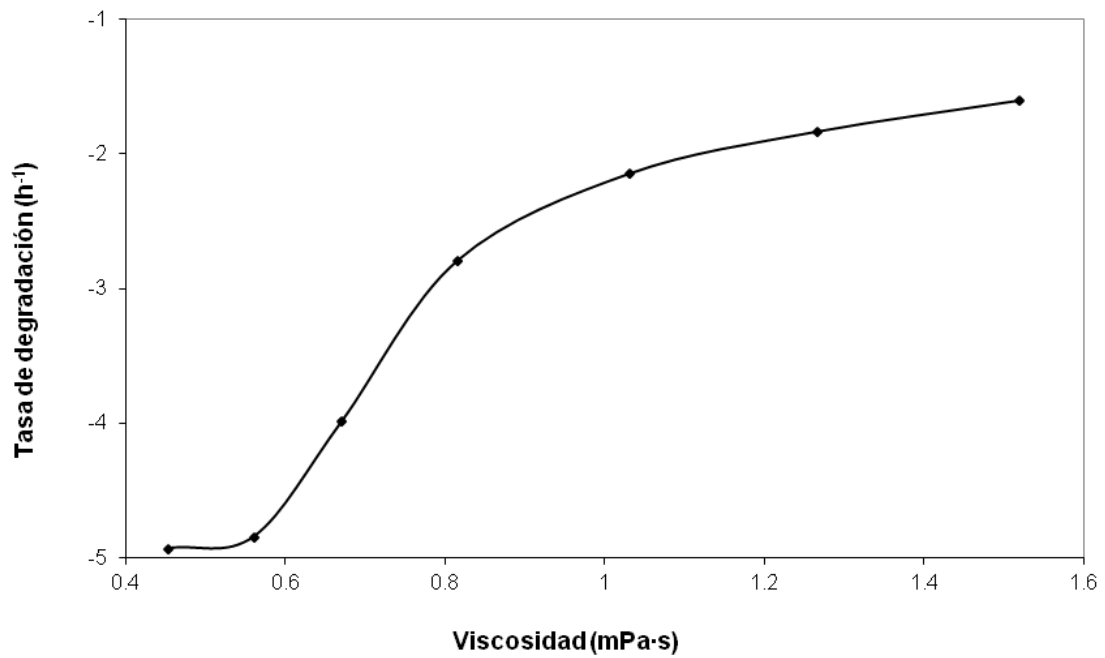


FIG. 3

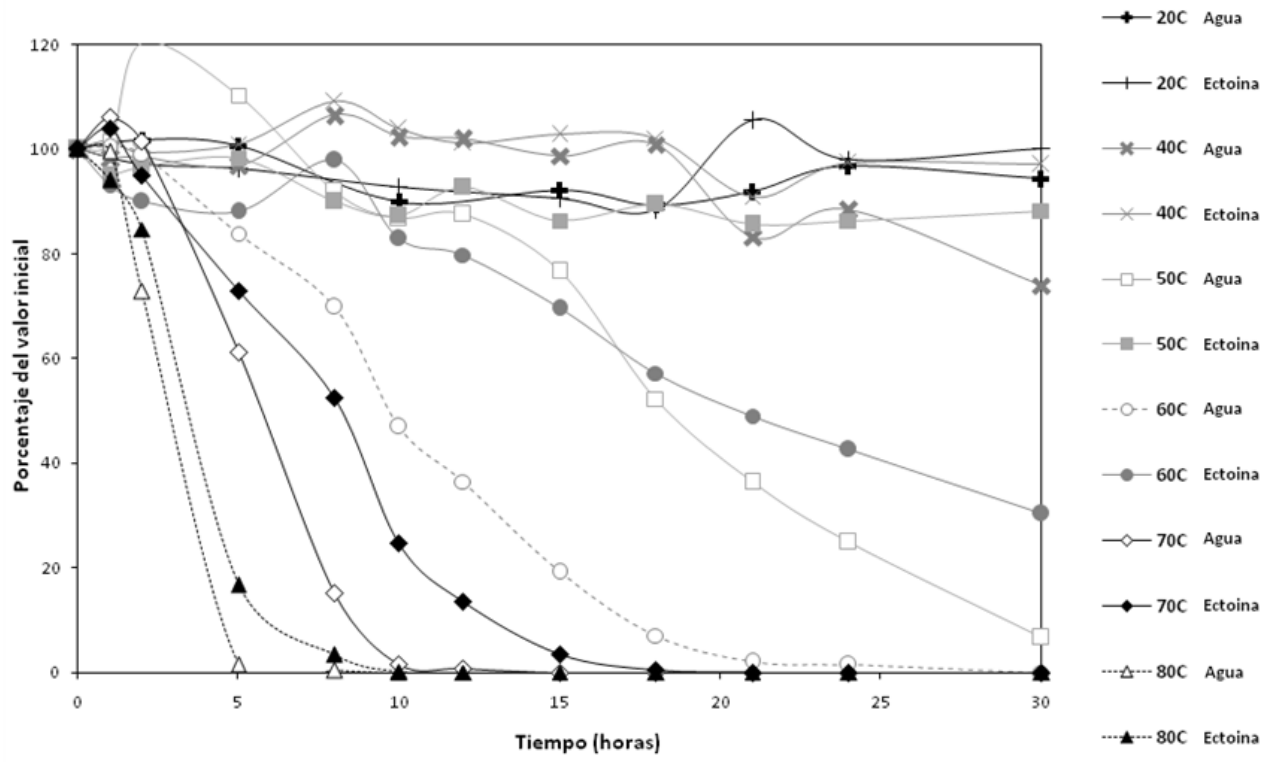


FIG. 4



- ②¹ N.º solicitud: 201330466
 ②² Fecha de presentación de la solicitud: 02.04.2013
 ③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤¹ Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ ⁶ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 2010112576 A1 (LEUKOCARE AG et al.) 07.10.2010, reivindicaciones.	1-4,6-8
X	US 2007172490 A1 (SCHOLZ MARTIN) 26.07.2007	1-13
X	LIN CHIEN-CHI et al. PEG Hydrogels for the Controlled Release of Biomolecules in Regenerative Medicine. Pharmaceutical Research (Dordrecht) MAR 2009 03.2009 VOL: 26 No: 3 Págs: 631-643 ISSN 0724-8741 Doi: doi:10.1007/s11095-008-9801-2.	1-15
X	TAE G et al. Sustained release of human growth hormone from in situ forming hydrogels using self-assembly of fluoroalkyl-ended poly(ethylene glycol). BIOMATERIALS, 20050901 ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV., BARKING, GB 01.09.2005 VOL: 26 No: 25 Págs: 5259-5266 ISSN 0142-9612.	1-15

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:

<p>Fecha de realización del informe 29.05.2014</p>	<p>Examinador J. Manso Tomico</p>	<p>Página 1/4</p>
---	--	------------------------------

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12Q1/26 (2006.01)
A61K31/70 (2006.01)
A61K47/06 (2006.01)

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

C12Q, A61K

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, EMBASE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 29.05.2014

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 9, 10, 13, 14, 15	SI
	Reivindicaciones 1-8, 11, 12	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-15	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	WO 2010112576 A1 (LEUKOCARE AG et al.)	07.10.2010
D02	US 2007172490 A1 (SCHOLZ MARTIN)	26.07.2007
D03	LIN CHIEN-CHI et al. PEG Hydrogels for the Controlled Release of Biomolecules in Regenerative Medicine. Pharmaceutical Research (Dordrecht) MAR 2009 03.2009 VOL: 26 No: 3 Págs: 631-643 ISSN 0724-8741 Doi: doi:10.1007/s11095-008-9801-2.	28.02.2009
D04	TAE G et al. Sustained release of human growth hormone from in situ forming hydrogels using self-assembly of fluoroalkyl-ended poly(ethylene glycol). BIOMATERIALS, 20050901 ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV., BARKING, GB 01.09.2005 VOL: 26 No: 25 Págs: 5259-5266 ISSN 0142-9612.	01.09.2005

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud divulga un procedimiento de estabilización de biomoléculas basado en el uso de agentes modificadores de la viscosidad.

Las reivindicaciones 1-4 hacen referencia al medio y al agente utilizado para conseguir el medio viscoso apropiado, y en el que el agente estabilizador se corresponde con el etilenglicol. Las reivindicaciones 14 y 15 hacen referencia a la ectoína como agente estabilizador.

D01 divulga un recipiente estéril que comprende un soporte, al menos una biomolécula reversiblemente unido al portador, al menos un estabilizante que cubre parcial o totalmente las biomoléculas unidas; y opcionalmente una tapa, donde se selecciona el estabilizador de (poli) péptidos, aminoácidos, hidratos de carbono, polialcoholes, polietilenglicoles, líquidos iónicos, solutos compatibles, y / o saponinas.

D02 se refiere a una matriz de estimulación de leucocitos que tiene los siguientes componentes:

a) al menos un vehículo, b) una matriz soluble para la incorporación de al menos un componente para generar una estimulación de leucocitos y / o la inducción de una tolerancia inmunológica, c) al menos un componente incorporado en la matriz soluble, en el que la matriz soluble está hecho de compuestos de azúcar de cadena larga seleccionados del grupo que consiste en almidón, celulosa, y el glucógeno o polietilenglicol, y en el que los porcentajes de polietilenglicol, basado en el total de compuesto de azúcar de cadena larga y polietilenglicol, es de un 10-50%.

D03 divulga hidrogeles de polietilenglicol (PEG) que se utilizan en una variedad de aplicaciones biomédicas, incluyendo matrices para liberación controlada de biomoléculas y andamios para la medicina regenerativa. Se describen los diferentes mecanismos de polimerización de hidrogeles a base de PEG y la importancia de estos hidrogeles biocompatibles en las aplicaciones de la medicina regenerativa. Además, también se discuten los criterios de diseño que son importantes en el mantenimiento de la disponibilidad y la estabilidad de las biomoléculas, así como los mecanismos para la carga de biomoléculas dentro de hidrogeles de PEG.

D04 divulga un procedimiento donde el polietilenglicol es modificado con grupos terminales de fluorocarbono que le confiere la capacidad de producir una transición in situ a partir de un líquido inyectable a un hidrogel viscoelástico por la interacción hidrofóbica de los grupos terminales; esta clase de materiales es útil para una variedad de aplicaciones biomédicas, incluyendo la liberación sostenida de proteínas. El estado de hidrogel puede ser transformado en un estado inyectable por la adición de un disolvente orgánico toxicológicamente aceptable, tal como N-metil pirrolidona.

Todos los documentos del estado de la técnica anteriorizan el uso del etilenglicol como agente estabilizador de biomoléculas, por lo que las reivindicaciones 1-4, 6-8, 11, 12 carecerían de novedad tal y como se menciona en el art. 6 de la ley 11/1986. D02 divulga un hidrogel que contiene polietilenglicol en proporción del 10-50%. Así pues, la reivindicación 5 carecería también de novedad. Ninguno de los documentos del estado de la técnica divulga las condiciones de concentración, pH y temperatura de la solución estabilizada, tal y como se caracteriza en las reivindicaciones 9, 10, 13, 14, 15, ni tampoco se divulga la ectoína como estabilizador de la disolución, por lo que tales reivindicaciones sí que cumplirían con el requisito de novedad tal y como se menciona en el art. 6 de la ley. Sin embargo, dado que parece que esas diferencias no traen consigo un efecto técnico más allá del de proporcionar moléculas de estabilización de matrices o soluciones para la dispensación de biomoléculas, las reivindicaciones 9, 10, 13, 14, 15 se considerarían alternativas de realización obvia carentes de actividad inventiva, tal y como se menciona en el art. 8 de la ley 11/1986