

Nº SOLICITUD 201331394
Nº PUBLICACIÓN ES2502691
TITULAR/ES
SANI-RED, S.L.

FECHA EXPEDICIÓN 10/11/2015

CERTIFICADO-TÍTULO DE PATENTE DE INVENCIÓN

Cumplidos los requisitos previstos en la vigente Ley 11/1986, de 20 de Marzo, de Patentes, se expide el presente CERTIFICADO-TÍTULO, acreditativo de la concesión de la Patente de Invención. Ha sido tramitada y concedida con realización del Informe sobre el Estado de la Técnica y sin examen previo de los requisitos sustantivos de patentabilidad.

Se otorga al titular un derecho de exclusiva en todo el territorio nacional, bajo las condiciones y con las limitaciones previstas en la Ley de Patentes. La duración de la patente será de **veinte años** contados a partir del 25/09/2013.

La patente se concede sin perjuicio de tercero y sin garantía del Estado en cuanto a la validez y a la utilidad del objeto sobre el que recae.

Para mantener en vigor la patente concedida, deberán abonarse las tasas anuales establecidas, que se pagarán por años adelantados. Asimismo, deberá explotarse el objeto de la invención, bien por su titular o por medio de persona autorizada de acuerdo con el sistema de licencias previsto legalmente, dentro del plazo de cuatro años a partir de la fecha de solicitud de la patente, o de tres años desde la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial.



Fdo.: Ana María Redondo Mínguez
El Director del Departamento de Patentes e Información Tecnológica
P.D. El Jefe/a de Servicio de Actuaciones Administrativas

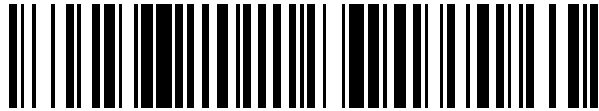


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 502 691**

21 Número de solicitud: 201331394

51 Int. Cl.:

C07K 1/02 (2006.01)

A61K 47/44 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

25.09.2013

43 Fecha de publicación de la solicitud:

03.10.2014

Fecha de la concesión:

30.06.2015

45 Fecha de publicación de la concesión:

07.07.2015

73 Titular/es:

**SANI-RED, S.L. (100.0%)
C/ Valencia, 544
08013 Barcelona (Barcelona) ES**

72 Inventor/es:

MAYAYO FALO, Teodoro

74 Agente/Representante:

DÍAZ NUÑEZ, Joaquín

54 Título: **Método de conservación y estabilización de proteínas, aplicable para desarrollos industriales de formulaciones de productos sanitarios, farmacéuticos y cosméticos**

57 Resumen:

Método de conservación y estabilización de proteínas, aplicable para desarrollos industriales de formulaciones de productos sanitarios, farmacéuticos y cosméticos, particularmente factores de crecimiento celulares y/o proteínas como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento fibroblástico (bFGF), que comprende una fase de dispersión, en condiciones normales de presión y temperatura, donde se realiza la incorporación de las proteínas en un medio anhidro constituido por componentes de carácter oleoso que presentan restos hidrófilos y garantizan las interacciones con las proteínas manteniendo su conformación en el estado nativo, siendo tales componentes aceite de pepita de uva, una base de varios componentes y butilhidroxitoluen.

ES 2 502 691 B1

DESCRIPCIÓN

Método de conservación y estabilización de proteínas, aplicable para desarrollos industriales de formulaciones de productos sanitarios, farmacéuticos y cosméticos

5

OBJETO DE LA INVENCIÓN

La invención, tal como expresa el enunciado de la presente memoria descriptiva, se refiere a un método de conservación y estabilización de proteínas, aplicable para desarrollos industriales de formulaciones de productos sanitarios, farmacéuticos y cosméticos.

10

El objeto de la invención se centra en un método que contempla la creación de un sistema disperso como medio de conservación, estabilización y almacenamiento de proteínas en una fase de carácter oleoso en condiciones normales de presión y temperatura. Particularmente el método que la invención propone se basa en la incorporación de proteínas, como factores de crecimiento celulares, tales como el factor de crecimiento epidérmico *Epidermal Growth Factor* (EGF) y el factor de crecimiento fibroblástico *Fibroblast Growth Factor* (bFGF), aunque sin limitarse a ellos, en un medio constituido por componentes, como el aceite de pepita de uva, una base compuesta por diversos compuestos que se concretarán más adelante en la presente descripción, y butilhidroxitolueno (BHT), que constituyen la citada fase oleosa. En concreto, el método preconizado aprovecha que algunos grupos químicos de los componentes de la fase oleosa promueven ciertas interacciones fisicoquímicas con los restos de las proteínas que potencian durante más tiempo el mantenimiento de la estructura molecular nativa de las proteínas, consiguiendo que dicho método sea sencillo, económico y de general aplicación, con potencial capacidad para sustituir técnicas complejas de conservación y/o medios acuosos habitualmente utilizados para la conservación de proteínas.

15

20

25

CAMPO DE APLICACIÓN DE LA INVENCIÓN

30

El campo de aplicación de la presente invención se enmarca dentro del sector industrial químico, centrándose particularmente en el ámbito de la industria dedicada a la fabricación de productos farmacéuticos y cosméticos, en particular los destinados a conservar factores de crecimiento.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

En la actualidad, la estabilidad de proteínas ha suscitado un gran interés en el sector químico, farmacéutico y cosmético. Las proteínas son utilizadas como sustancias activas de
5 numerosos tratamientos en enfermedades tales como la diabetes, el cáncer, la hemofilia, el infarto de miocardio, por citar algunas patologías [Krishnamurthy y Manning, 2002]. Destacar que la utilización de estructuras proteicas como los factores de crecimiento, p.ej., el *EGF*, ha suscitado un gran interés en la industria cosmética en los últimos años. De manera que, si una proteína no se puede estabilizar adecuadamente, puede perder su estructura nativa con
10 la consiguiente pérdida de su actividad biológica [Krishnamurthy y Manning, 2002].

El problema es que la estabilización de proteínas es particularmente difícil debido a que son muy susceptibles de sufrir fenómenos de degradación: físicos, químicos y enzimáticos. La degradación química está relacionada con procesos de desaminación, oxidación, reducción,
15 hidrólisis e interacciones químicas como las interacciones de enlace por puentes disulfuro. La degradación física incluye procesos de adsorción en superficie, agregación, disociación, desnaturalización y fotólisis. Además, existen factores que influyen en la agregación de las proteínas relacionados con las propiedades del medio de dispersión, tales como, temperatura (relacionada con la termodinámica y cinética de transformación de la
20 conformación estructural proteica), pH (relacionada con interacciones de cargas positivas o negativas con los restos proteicos), fuerza iónica (relacionado con las sales y su concentración para interactuar con grupos cargados) y agentes tensioactivos (relacionados con la estabilidad termodinámica conformacional) [Chi y cols., 2003].

Existen procesos tecnológicos para conseguir que las proteínas permanezcan durante más tiempo con su conformación nativa, dichos procesos se pueden llevar a cabo por procesos físico, tales como la congelación (por debajo de -10 °C) o la liofilización (para la eliminación de la humedad presente en una solución acuosa de proteína), no obstante hasta los productos obtenidos por estos métodos sufren degradación; o bien, pueden llevarse a cabo
30 procesos químicos, a través de la adición de co-disolventes [Chang y Pikal, 2009].

El EGF, fue el primer polipéptido aislado y caracterizado como factor de crecimiento. Presenta una actividad biológica relacionada con su estructura nativa, capaz de estimular la proliferación de queratinocitos y fibroblastos (con la consiguiente formación de colágeno),

induce la angiogénesis (formación de vasos nuevos) y realiza la posterior vascularización de la zona donde se aplica. Estas propiedades favorecen la aparición de piel nueva con un grosor considerable, devolviéndole su elasticidad y firmeza, disminuyendo de esta manera, los efectos no deseados de oxidación celular y dando lugar por tanto a la eliminación de arrugas [Tang y cols., 1994]. Dicho factor de crecimiento, se ha comenzado a utilizar recientemente en formulaciones tópicas, donde se han obtenido muy buenos resultados relacionados con la regeneración tisular, la aceleración en la cicatrización de quemaduras, tratamiento de queloides, acné y estrías, incluso mejorar resultados de tratamientos de tipo quirúrgicos, favorecer la consolidación de injertos de piel, así como la aplicación post-peeling. No obstante, dichas proteínas son cada vez más utilizadas en la industria farmacéutica y cosmética, pero no se han utilizado masivamente debido a sus elevados precios y su difícil estabilización.[Schouest y cols., 2012].

El factor de crecimiento de fibroblastos (bFGF, fibroblast growth factor) es un factor de crecimiento que actúa aumentando el índice de actividad mitótica y la síntesis de ADN, facilitando la proliferación de varias células precursoras, como el condroblasto, colagenoblasto, osteoblasto, etc. que forman el tejido fibroso, de unión y soporte del cuerpo. Contribuye a la cicatrización de heridas, la hematopoyesis, la angiogénesis o el desarrollo embrionario. Para ello, realizan funciones muy variadas: a) contribuyen a la reepitelización de los tejidos dañados durante la cicatrización; b) tienen una actividad inductora de formación de vasos sanguíneos; c) intervienen en procesos de diferenciación de las líneas de células sanguíneas; y, d) participan en la diferenciación del músculo esquelético y cardíaco, en la maduración de los pulmones y en la especificación de los hepatocitos a partir de las células del endodermo.

El objetivo de la presente invención es, pues, el desarrollo de un nuevo método de conservación y estabilización de proteínas, aplicable para desarrollos industriales de formulaciones de productos sanitarios, farmacéuticos y cosméticos que, a diferencia de los métodos convencionales, se lleva a cabo en fase oleosa consiguiendo que sea más sencillo y económico, debiendo señalarse que, al menos por parte del solicitante, se desconoce la existencia de ningún documento o invención que divulgue un método de conservación y estabilización de proteínas o invención similar que presente unas características técnicas semejantes a las del que aquí se preconiza.

EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

Ha sido desarrollado un medio de dispersión de proteínas cuyos componentes dotan al medio de un carácter oleoso. Así el EGF, el bFGF y otros factores de crecimiento celulares y/o proteínas, como se ha señalado, son macromoléculas con difícil estabilización, debido a que, en la actualidad, la mayoría de los medios de dispersión son de carácter acuoso y consiguen la estabilización en un periodo de tiempo corto, a través de la utilización de sistemas dispersos como las emulsiones, o bien, de métodos caros y muy específicos que tampoco aseguran una mayor duración de la estructura nativa de la proteína, tal como la liofilización.

Con la presente invención, se ha llevado a cabo el desarrollo del EGF y otros factores de crecimiento y/o proteínas en medio oleoso como producto intermedio para ser utilizado en procesos industriales específicos, promoviendo la estabilidad de las proteínas con respecto a los métodos existentes en la actualidad, para lograr así una acción más eficaz al no desnaturalizarse las proteínas en dicho medio.

De manera más concreta, según el método de la presente invención, en la formulación los factores de crecimiento quedan rodeados de un medio anhidro constituido por otros componentes que actúan como coadyuvantes interaccionando con los restos de las proteínas, siendo tales componentes: aceite de pepita de uva, que crea un medio que reduce las interacciones electrostáticas con los restos proteicos manteniendo su conformación en el estado nativo; base compuesta por: Caprylic/Capric triglyceride; PEG-18 castor oil dideate; Propylene glicol; Pentaerythcetyl tetra Di-T-Bencyl hidroxy hydrocinnamate; tocopherol, Trisisopropanolamina que favorece las interacciones por fuerzas intermoleculares con los dominios de las proteínas haciendo la estructura termodinámicamente más estable; y butilhidroxitolueno (BHT), el cual actúa como antioxidante evitando en gran medida fenómenos de degradación química por oxidación en las proteínas.

Cabe destacar que el proceso de interposición de la proteína con los componentes de la fase oleosa se realiza con una calidad apropiada, tal proceso es llevado a cabo, preferentemente, en salas blancas, bajo condiciones de flujo laminar, donde se garantizan controles de calidad ambiental, así como, controles microbiológicos para asegurar la

esterilidad del producto.

En definitiva y de manera sucinta, la presente invención propone el desarrollo de un método de conservación, almacenamiento y estabilización de proteínas que contempla una fase de dispersión anhidra (es decir, en ausencia de agua) con calidad ambiental y microbiológica, mediante la aplicación de sustancias oleosas que presentan restos hidrófilos que garantizan las interacciones con las proteínas que mantienen su conformación en el estado nativo, constituyendo un método económico, reproducible y sencillo con respecto a otros métodos que requieren la utilización de dispositivos, métodos complejos y personal cualificado.

Descrita suficientemente la naturaleza de la presente invención, así como la manera de ponerla en práctica, no se considera necesario hacer más extensa su explicación para que cualquier experto en la materia comprenda su alcance y las ventajas que de ella se derivan, haciéndose constar que, dentro de su esencialidad, podrá ser llevada a la práctica en otras formas de realización que difieran en detalle de la indicada a título de ejemplo, y a las cuales alcanzará igualmente la protección que se recaba siempre que no se altere, cambie o modifique su principio fundamental.

BIBLIOGRAFÍA

Chang LL, Pikal MJ. Mechanisms of Protein Stabilization in the Solid State. *J. Pharm. Sci.* 98; 2009: 2886-2908.

Chi EY, Krishnan S, Randolph TW, Carpenter JF. Physical stability of proteins in aqueous solution: mechanism and driving forces in nonnative protein aggregation. *Pharm Res.* 2003; 20: 1325-36.

Krishnamurthy R, Manning MC. The stability factor: importance in formulation development. *Curr Pharm Biotechnol.* 2002; 3: 361-71.

Schouest JM, Lun TK, Moy RL. Improved texture and appearance of barley produced, synthetic, human-like epidermal growth factor (EGF) serum. *J. Drugs Dermatol.* 2012; 11 (5): 613-620.

Tang Z, Zhang Z, Zheng Y et al. Cell aging of human diploid fibroblasts is associated with changes in responsiveness to epidermal growth factor and changes in HER-2 expression. *Mechanisms of Ageing and Development* 1994; 73 (1): 57-67

REIVINDICACIONES

1.- MÉTODO DE CONSERVACIÓN Y ESTABILIZACIÓN DE PROTEÍNAS, APLICABLE PARA DESARROLLOS INDUSTRIALES DE FORMULACIONES DE PRODUCTOS SANITARIOS, FARMACÉUTICOS Y COSMÉTICOS, particularmente factores de crecimiento celulares y/o proteínas, tales como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento fibroblástico (bFGF), **caracterizado** porque comprende una fase de dispersión, en condiciones normales de presión y temperatura, donde se realiza la incorporación de las proteínas en un medio anhidro constituido por componentes de carácter oleoso que presentan restos hidrófilos y garantizan las interacciones con las proteínas manteniendo su conformación en el estado nativo.

2.- MÉTODO DE CONSERVACIÓN Y ESTABILIZACIÓN DE PROTEÍNAS, APLICABLE PARA DESARROLLOS INDUSTRIALES DE FORMULACIONES DE PRODUCTOS SANITARIOS, FARMACÉUTICOS Y COSMÉTICOS, según la reivindicación 1, **caracterizado** porque los componentes de la fase oleosa comprenden el aceite de pepita de uva.

3.- MÉTODO DE CONSERVACIÓN Y ESTABILIZACIÓN DE PROTEÍNAS, APLICABLE PARA DESARROLLOS INDUSTRIALES DE FORMULACIONES DE PRODUCTOS SANITARIOS, FARMACÉUTICOS Y COSMÉTICOS, según la reivindicación 1 ó 2, **caracterizado** porque los componentes de la fase oleosa comprenden una base compuesta por Caprylic/Capric triglyceride; PEG-18 castor oil dideate; Propylene glicol; Pentaerythcetyl tetra Di-T-Bencyl hidroxy hydrocinnamate; tocopherol, Trisisopropanolamina.

4.- MÉTODO DE CONSERVACIÓN Y ESTABILIZACIÓN DE PROTEÍNAS, APLICABLE PARA DESARROLLOS INDUSTRIALES DE FORMULACIONES DE PRODUCTOS SANITARIOS, FARMACÉUTICOS Y COSMÉTICOS, según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, **caracterizado** porque los componentes de la fase oleosa comprenden butilhidroxitolueno.

5.- MÉTODO DE CONSERVACIÓN Y ESTABILIZACIÓN DE PROTEÍNAS, APLICABLE PARA DESARROLLOS INDUSTRIALES DE FORMULACIONES DE PRODUCTOS SANITARIOS, FARMACÉUTICOS Y COSMÉTICOS, según la reivindicación 1,

caracterizado porque los componentes de la fase oleosa son aceite de pepita de uva, butilhidroxitolueno y una base compuesta por: Caprylic/Capric triglyceride; PEG-18 castor oil dideate; Propylene glicol; Pentaerythcetyl tetra Di-T-Bencyl hidroxy hydrocinnamate; tocopherol, Trisisopropanolamina.



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201331394

②② Fecha de presentación de la solicitud: 25.09.2013

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C07K1/02** (2006.01)
A61K47/44 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	EP 2196471 A1 (BIOMEDAL S L) 16.06.2010, todo el documento.	1-5
A	WO 8705300 A2 (BIOCOMPATIBLES LTD et al.) 11.09.1987, todo el documento.	1-5
A	US 2011020519 A1 (BOWMAN ROBERT G et al.) 27.01.2011, todo el documento.	1-5
A	US 4806343 A (CARPENTER JOHN F et al.) 21.02.1989, todo el documento.	1-5

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
12.09.2014

Examinador
M. Á. García Coca

Página
1/4

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

C07K, 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, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE/Elsevier, XPESP y bases de datos de texto completo TXT

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 12.09.2014

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-5	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-5	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	EP 2196471 A1 (BIOMEDAL S L)	16.06.2010
D02	WO 8705300 A2 (BIOCOMPATIBLES LTD et al.)	11.09.1987
D03	US 2011020519 A1 (BOWMAN ROBERT G et al.)	27.01.2011
D04	US 4806343 A (CARPENTER JOHN F et al.)	21.02.1989

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

El objeto de la invención, tal y como se recoge en las reivindicaciones 1-5, es un método de conservación y estabilización de proteínas, basado en la incorporación de las proteínas en un medio anhidro constituido por componentes de carácter oleoso. Esta fase oleosa está compuesta por aceite de semilla de uva, una base y butilhidroxitolueno.

Novedad (art. 6.1 de la Ley 11/1986 de Patentes) y Actividad Inventiva (art. 8.1 de la Ley 11/1986 de Patentes).

El documento D01 divulga un método para preservar péptidos o proteínas durante largos periodos de tiempo. El método se basa en el uso de matrices sólidas o semi-sólidas derivatizadas con compuestos que tienen afinidad por secuencias específicas o etiquetas (tags) presentes en los péptidos o proteínas a conservar.

El documento D02 divulga un proceso para preservar proteínas (sobretudo proteínas solubles), basado en ponerlas en contacto con una solución acuosa de un compuesto polihidroxi (azúcares como glucosa, galactosa o trealosa), y posteriormente eliminar el agua.

El documento D03 divulga un método para la protección de material oxidable e inestable (por ejemplo proteínas) basado en la encapsulación de dicho material.

El documento D04 divulga un método para la protección de proteínas solubles, de forma que no se vea alterada su actividad biológica durante los procesos de conservación de las mismas.

Ninguno de los documentos del estado de la técnica anterior a la solicitud, tomados solos o en combinación revelan la invención definida en las reivindicaciones 1-5. Además, en los documentos citados no hay sugerencias que dirijan al experto en la materia hacia la invención definida en dichas reivindicaciones. Así, la invención contenida en las reivindicaciones 1-5 es con referencia a los documentos D01-D03 nueva y se considera que implica actividad inventiva (art. 6.1 y 8.1 Ley 11/1986 de Patentes).