



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 310 969**

② Número de solicitud: 200701850

⑤ Int. Cl.:

C07F 7/08 (2006.01)

C07D 495/04 (2006.01)

B01J 20/289 (2006.01)

B01D 15/38 (2006.01)

G01N 30/60 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **02.07.2007**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **16.01.2009**

Fecha de la concesión: **16.12.2009**

⑭ Fecha de anuncio de la concesión: **12.01.2010**

⑮ Fecha de publicación del folleto de la patente:
12.01.2010

⑰ Titular/es: **Universidad de Granada
Hospital Real - Cuesta del Hospicio, s/n
18071 Granada, ES**

⑱ Inventor/es: **Santoyo González, Francisco;
Hernández Mateo, Fernando;
Ortega Muñoz, Mariano;
Salto González, Rafael;
Girón González, María Dolores y
Sevillano Tripero, Natalia**

⑲ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑳ Título: **Biotina-soporte poroso, métodos de obtención y usos.**

㉑ Resumen:

Biotina-soporte poroso, métodos de obtención y usos.
Compuesto que comprende biotina unida a un soporte po-
roso mediante un "linker" (grupo de unión o enlazante)
que contiene el grupo 1,2,3-triazol. La invención también
se refiere al método de obtención del compuesto y a sus
usos para la purificación de avidina y proteínas biotinila-
das, así como para el marcaje fluorescente de avidina.

ES 2 310 969 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Biotina-soporte poroso, métodos de obtención y usos.

5 La presente invención se refiere a un compuesto que comprende biotina unida a un soporte poroso inorgánico mediante un “linker” (grupo de unión) que contiene el grupo 1,2,3-triazol. Más particularmente, el soporte poroso inorgánico es sílice. Además, se refiere a su método de obtención y sus usos para la purificación de avidina y proteínas biotiniladas, así como para el marcaje fluorescente de avidina.

10 **Estado de la técnica anterior**

La biotina es una vitamina esencial en el metabolismo que constituye el grupo prostético de un conjunto de enzimas denominado carboxilasas que participan en reacciones clave del metabolismo intermediario. El déficit de biotina, o defectos genéticos que impiden su unión covalente a las carboxilasas, conduce a graves enfermedades metabólicas, que normalmente producen situaciones de acidosis y coma.

Una posible situación de deficiencia de biotina se produce por una ingesta excesiva de huevos crudos. En la clara de huevo existe una proteína denominada avidina (Cf. DeLange, R.J., 1969, *J. Biol. Chem.*, vol. 245, pp. 907-916), que presenta la capacidad de unir fuertemente biotina y secuestrarla. De hecho, la constante de unión entre la biotina y la avidina es de aproximadamente 10^{-15} M, lo que constituye probablemente la mayor afinidad por un ligando descrita para cualquier sistema biológico.

Esta alta afinidad, así como la relativa facilidad de obtener avidina, ha determinado que exista un alto interés en el estudio y desarrollo de sistemas de afinidad que se basen en la fuerte interacción entre estas dos moléculas. Así se han desarrollado sistemas de marcaje de proteínas, ácidos nucleicos, diversos constituyentes celulares e incluso células completas, para posteriormente ser reconocidos por moléculas de avidina, bien inmovilizada (creando sistemas de cromatografía de afinidad) o bien marcada por la unión a fluoróforos o enzimas (creando sistemas de detección, usualmente en fase sólida).

Las técnicas descritas en el párrafo anterior han sido utilizadas clásicamente en inmunología para la detección de antígenos o anticuerpos previamente biotinilados. Actualmente, esta tecnología está en un proceso de expansión, extendiéndose su uso a la proteómica y genómica, en el marcaje, separación y/o inmovilización de proteínas o ácidos nucleicos.

La interacción de la avidina con la biotina ocurre en condiciones fisiológicas de pH y fuerza iónica. Existen numerosos reactivos para la biotinización de proteínas y existe comercialmente avidina (o una proteína análoga suya de origen bacteriano, la estreptavidina) ya sea sola, marcada con diferentes fluoróforos o inmovilizada sobre agarosa.

Un problema importante, y sólo parcialmente resuelto, de esta tecnología es, paradójicamente, la elevada afinidad de la avidina por la biotina. Esta elevada afinidad hace que sea necesario utilizar condiciones extremas para romper la interacción de ambas moléculas. Estas condiciones extremas implican usualmente el empleo de agentes desnaturantes como SDS o clorhidrato de guanidinio junto con pHs inferiores a 2.

En técnicas cromatográficas basadas en la interacción de la avidina con la biotina, ya sea para la purificación de la propia avidina o para la cromatografía de afinidad de moléculas marcadas con biotina, el uso de estas condiciones extremas de elución y la consiguiente desnaturación de las proteínas dificulta las aplicaciones posteriores de las mismas.

Para soslayar este problema, se ha propuesto el uso de iminobiotina, con una menor afinidad por la avidina, como ligando. No obstante, el uso de iminobiotina es mucho más caro que el de biotina en el marcaje de ligandos y además no puede ser aplicado a las proteínas biotiniladas de manera natural. Otra alternativa ha sido el uso de columnas de afinidad que emplean avidina monomérica.

La purificación inicial de avidina por cromatografía de afinidad se realizó en 1968 (Cf. Cuatrecasas, P. *et al.*, 1968, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 33, pp. 235-239) utilizando una columna de biocitina-sefarosa. La elusión de la avidina de esta columna implicaba el uso de cloruro de guanidinio 6 M a pH 1.5. Posteriormente, en 1980 (Cf. Hofmann *et al.*, 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 77, pp. 4666-4668), fue descrito el uso de columna de iminobiotina para la purificación de estreptavidina utilizando condiciones de elución más suaves. La unión de avidina o estreptavidina a este tipo de columnas implica el uso de un elevado pH (en torno a 11) ya que a este pH se produce la unión efectiva de la iminobiotina a la avidina puesto que la base libre de la iminobiotina es la que es reconocida por la avidina (Cf. Green, N. M., 1966, *Biochem. J.*, vol 101, pp. 774-780). La elución en este tipo de columnas se produce a pH 4.

Otras estrategias propuestas han sido el uso de otros derivados de biotina como la destiobiotina, cuya menor afinidad por la unión a avidina permite su desplazamiento por biotina sin modificar (Cf. Hirsch, J. D. *et al.*, 2002, *Anal. Biochem.*, vol 308, pp. 343-357). De cualquier manera, clásicamente en la purificación de avidina siguen empleándose columnas de iminobiotina y el rendimiento típico de las mismas es de aproximadamente un 90% con una capacidad de unión de aproximadamente 0.75 mg de avidina por mL de resina empleada (Cf. Heney, G. *et al.*, 1981, *Anal. Biochem.*,

ES 2 310 969 B1

vol. 114, pp. 92-96). En muchas ocasiones, aunque la purificación se basa fundamentalmente en una etapa de afinidad se incorporan etapas adicionales como una precipitación previa con sulfato amónico o un intercambio iónico posterior a la cromatografía de afinidad.

5 Actualmente existen en el mercado diferentes soportes biotinilados siendo los más extendidos los basados en agarosa y sefarosa. De forma análoga, la biotina y compuestos relacionados han sido unidos covalentemente a una variedad de superficies, fundamentalmente de vidrio, óxido de silicio, polímeros y oro. La unión covalente de biotina a estos sólidos o superficies es llevada a cabo usando derivados activos de la biotina y soportes o superficies funcionalizadas complementariamente tanto a través de métodos químicos como fotoquímicos. La mayoría de los derivados activados de biotina usan la cadena lateral del ácido valérico para incorporar distintos grupos que no interfieren en la unión con la avidina y sus homólogos. Entre los más usados se encuentran esteres activados derivados de N-hidroxisuccinimida, maleimida derivado, el iodoacetil derivado, el piridil disulfuro derivado, el hidrazido derivado y otros derivados conteniendo grupos fotoactivables que son anclados a los soportes o superficies a través de uniones de tipo amida, tioeter, disulfuro o hidrazona fundamentalmente (cf. Smith, C. L., *et al.*, **2006**, *Top. Curr. Chem.* Vol 261, pp. 63-90).

15 La cicloadición de alquinos y azidas (Reacción de Huisgen) (Cf. R. Huisgen, In *1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry* (Ed.: A. Padwa), Wiley, New York, **1984**, pp. 1-176) se ha establecido recientemente como una importante herramienta sintética dentro del concepto de “click-chemistry” (cf. Kolb H. C. *et al.* **2001**, *Angew Chem Int Ed*, vol. 40, pp. 2005) especialmente desde el descubrimiento de su catálisis regioselectiva y a temperatura ambiente mediante Cu(I) (cf. Rostovtsev, V. V. *et al.* **2002**, *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 41, pp. 2596; Tornøe, C. W. *et al.* **2002**, *J. Org. Chem.*, vol. 67, pp. 3057-3064; WO03101972 A1). Las principales ventajas de esta reacción son la fácil introducción de grupos azido y alquino en los sustratos y la estabilidad de ambas funciones que toleran agua y oxígeno, y que permiten el ensamblaje modular de diferentes moléculas. La formación de los triazoles resultante de la fusión de ambas funciones es irreversible y normalmente transcurre con muy altos rendimientos. Debido a estas notables características, se han desarrollado una gran cantidad de aplicaciones en ciencia biomédica, síntesis orgánica y ciencia de los materiales mediante el uso de la “click-chemistry” (cf. Wang, Q. *et al.* **2005**, *Lett. Org. Chem.*, vol. 2, pp. 293-301; Kolb, H. C. *et al.* **2003**, *Drug Discov. Today*, vol. 8, pp. 1128-1137; Bock, V. D., *et al.* **2005**, *Eur. J. Org. Chem.*, pp. 51-68; Lutz, J.F. **2007**, *Angew. Chem. Int. Ed.* vol. 46, pp.1018-1023). En particular, la funcionalización de soportes basados en gel de sílice (cf. Lummerstorfer, T. *et al.* **2004**, *J. Phys. Chem. B*, vol. 108, pp. 3963-3966) y agarosa (cf. Punna, S. *et al.*, **2005**, *Bioconjugate Chem.*, vol. 16, pp. 1536-1541) se ha realizado usando esta metodología.

Explicación de la invención

35 En la presente invención se proporciona un compuesto nuevo que comprende biotina unida a un soporte poroso mediante un grupo enlazante (o “linker”). Además de proporcionar su método de obtención y sus usos.

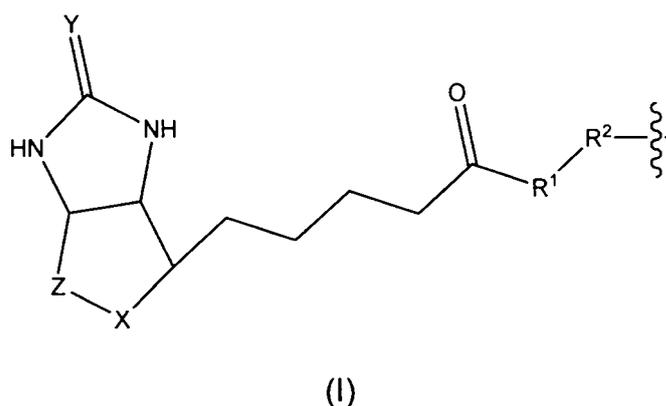
Mediante el uso del compuesto de la invención se proporciona un sistema apropiado para:

- 40
- o La purificación de avidina. Este sistema es más económico que usando iminobiotina; con facilidad de elución de la avidina unida; y con posibilidad de escalarlo en sistemas de microfiltros y centrifugación.
 - o El marcaje fluorescente en columna de avidina con las siguientes ventajas: facilidad operatoria del marcaje; y posibilidad de realizar el marcaje sin afectar a uno de los sitios de unión de la avidina a la biotina que permanece protegido por la unión al soporte poroso a través de la biotina.
 - o La purificación de proteínas biotiniladas *in vitro* y en general ligandos biotinilados. En función del pH de elución empleado es posible seleccionar específicamente la unión biotina-avidina a liberar: la unión con la biotina soportada o la unión con la biotina del ligando. Además, los ligandos purificados pueden ser fácilmente caracterizados por espectrometría MALDI-TOF.
- 50

Un primer aspecto de la presente invención se refiere al compuesto, en adelante compuesto de la invención, que comprende:

- 55
- a. biotina o cualquiera de sus derivados de fórmula general (I);
 - b. un “linker” o enlazante que comprende un grupo triazol, más concretamente un grupo 1,2,3-triazol; y
 - c. un soporte poroso.
- 60

65



donde:

20 X es S ó SO₂, preferiblemente X es S;

Y es O ó NH, preferiblemente Y es O;

25 Z es CH₂ ó CH₃ cuando X no existe; preferiblemente Z es CH₂.

R¹ es O ó NH, preferiblemente R¹ es NH; y

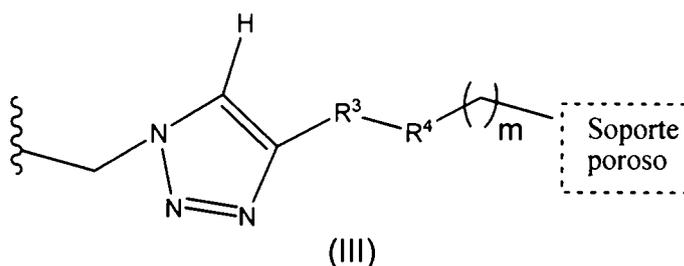
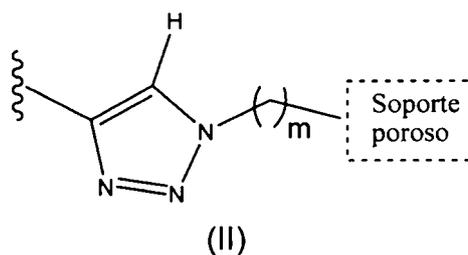
30 R² es un grupo seleccionado de entre un alquilo (C₁-C₁₀); (CH₂CH₂O)_nCH₂, donde n tiene un valor de 0 a 10; ó un (CH₂)₄CH(NH₂)COOCH₂.

Preferiblemente R² es un metileno.

35 El símbolo indica el punto de unión de la biotina o cualquiera de sus derivados con el "linker".

Entendemos por "derivados de biotina" a los compuestos que tienen una estructura análoga a la biotina y cuya función biológica es similar, como por ejemplo biocitina, iminobitina, destiobitina, etc..

40 En una realización preferida del compuesto de la presente invención, el "linker" tiene la estructura que se representa por las fórmulas generales (II) ó (III):



ES 2 310 969 B1

donde:

R^3 es un grupo seleccionado de entre un alquilo (C_1-C_{10}); ó $(CH_2CH_2O)_nCH_2$, donde n tiene un valor de 0 a 10. Preferiblemente R^3 es un metileno.

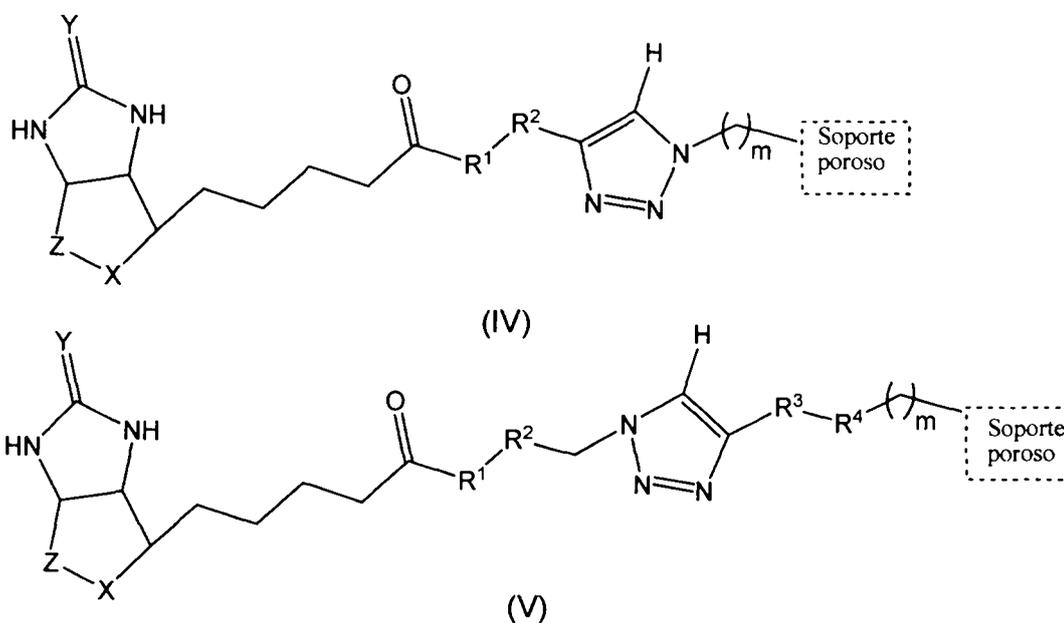
R^4 se selecciona del grupo que comprende O, $C(O)R^1$, $R^1C(O)R^1$ ó $R^1C(S)R^1$ (donde R^1 es O ó NH); y

m tiene el valor de 1 a 11. Preferiblemente m es 1, 2 ó 3.

El símbolo  indica, en estas estructuras, el punto de unión del "linker" con la biotina o cualquiera de sus derivados.

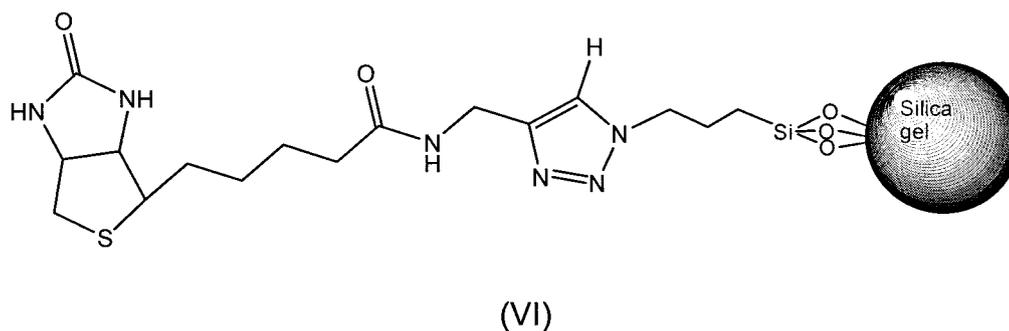
Por "alquilo" se refiere en la presente invención a cadenas alifáticas, lineales o ramificadas, que tienen de 1 a 10 átomos de carbonos, por ejemplo, metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, t-butilo, n-pentilo, etc.

Dependiendo de la estructura del "linker", los compuestos de la invención estarán representados por las siguientes fórmulas generales (IV) ó (V):



Como "soporte sólido poroso" entendemos aquí un soporte poroso inorgánico, como por ejemplo pero sin limitarse a sílice, alúmina, tierra silíceas, zeolita, o un soporte poroso orgánico seleccionado del grupo que comprende celulosas ó resinas, como por ejemplo pero sin limitarse a poliamina ó resina de Merrifield. Preferiblemente el soporte es un material inorgánico, y más preferiblemente el soporte es sílice.

Una realización preferida de la invención comprende un compuesto de fórmula (VI), denominado también en esta descripción, "biotina-silica":

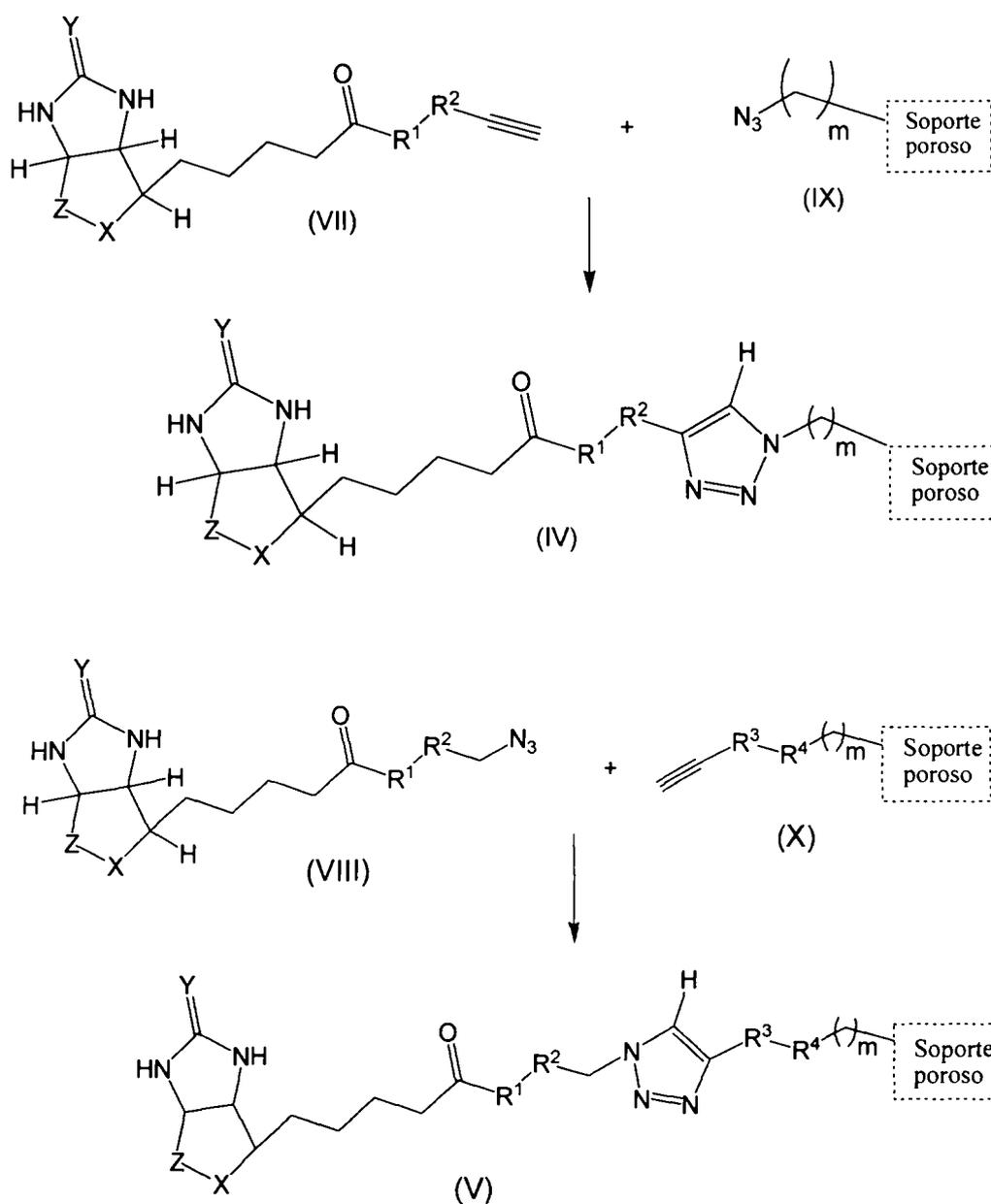


ES 2 310 969 B1

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de los compuestos de la invención, que comprende los siguientes pasos:

- a) funcionalización del soporte poroso usando un compuesto que comprende un grupo terminal azido (N_3) ó alquino ($C\equiv CH$).
- b) funcionalización de biotina o cualquiera de sus derivados con un grupo terminal alquino ($C\equiv CH$) ó azido (N_3);
- c) reacción del soporte funcionalizado del paso (a) con la biotina o cualquiera de sus derivados funcionalizados complementariamente del paso (b) por reacción de cicloadición 1,3-dipolar ("click-chemistry").

Este procedimiento se puede describir mediante los siguientes esquema de reacción, donde el compuesto (VII) y (VIII) serían los compuesto derivados de biotina obtenido en el paso (b) y el compuesto (IX) y (X) sería el soporte poroso funcionalizado con un grupo azido o alquino obtenido en el paso (a) dando lugar al compuesto de fórmula general (IV) o (V), obtenido en el paso (c), que comprende biotina, o cualquiera de sus derivados, unida a un soporte poroso mediante un "linker" (grupo de unión) que comprende el grupo 1,2,3-triazol:



donde X, Y, Z, R^1 , R^2 , R^3 , R^4 y m están descritos anteriormente.

ES 2 310 969 B1

La reacción que se produce entre los grupos alquino y azido para dar anillos de 1,2,3- triazoles es una cicloadición 1,3-dipolar que, para el caso particular de estos grupos funcionales, es conocida en el estado de la técnica como reacción de “click-chemistry”.

5 La reacción de la presente invención se puede llevar a cabo mediante las mismas condiciones que otras reacciones de “click-chemistry” descritas en el estado de la técnica, temperatura, tiempo de reacción, etc. incluyendo el uso de catalizadores ya descritos. En una realización preferida de la presente invención, el catalizador utilizado en el procedimiento de obtención del compuesto (I) o (II) es el complejo $(EtO)_3P.Cu(I)$ (Et=etilo).

10 En una realización preferida de la invención, la reacción de cicloadición se produce entre un grupo azido del soporte poroso funcionalizado y un grupo alquino de la biotina funcionalizada.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de los compuestos de la invención para la purificación de avidina.

15 Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de los compuestos descritos en la presente invención para la inmovilización de avidina.

20 Al inmovilizarse la avidina en el compuesto de la invención se forma un complejo que posteriormente se puede utilizar para la purificación de ligandos biotinados o para el marcaje de avidina.

Por lo tanto, otro aspecto de la presente invención se refiere a este complejo avidina-compuesto de la invención.

25 La purificación de ligandos biotinilados es una de las principales aplicaciones que se persigue con el uso de esta tecnología basada en la interacción de la avidina con la biotina, que es la identificación y aislamiento de proteínas biotiniladas *in vitro*. Con el actual desarrollo de la proteómica, la capacidad de identificación y purificación de las proteínas así modificadas, utilizando unas condiciones suaves que permitan su posterior análisis mediante electroforesis bidimensional y espectrometría de masas, es una necesidad acuciante.

30 La purificación de avidina y/o de los ligandos biotinilados usando el complejo avidina-compuesto de la invención se puede llevar a cabo mediante la adecuada selección del pH. Así por ejemplo, el complejo avidina-ligando biotinilado puede eluir a $pH < 2.5$, mientras que a $pH 4$ eluye sólo el ligando biotinilado.

35 Otro aspecto más de la presente invención se refiere al uso del compuesto de la invención para el marcaje fluorescente de avidina una vez que esta ha sido previamente inmovilizada al mencionado compuesto de la invención. Esta operatoria permite la salvaguarda en el marcaje del centro activo de la avidina a través del cual la avidina se ha unido al compuesto de la invención manteniéndose de esta forma su funcionalidad una vez que sea eluido del soporte.

40 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. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

45 Breve descripción de las figuras

Fig. 1.- Muestra la cromatografía de afinidad de la avidina utilizando el compuesto de fórmula (VI) (también llamado biotina-silica). A.- Cromatograma de la purificación de avidina a partir de un extracto crudo de huevo B.- Electroforesis en SDS-PAGE de las fracciones cargadas y eluidas en la columna.

50 Fig. 2.- Muestra un gel de SDS-PAGE de las fracciones eluidas para el compuesto biotina-silica.

Fig. 3.- Muestra el marcaje de avidina con el compuesto 7(2-hidroxi-etoxi)-4-nitro-2,1,3-benzooxadiazol (NBD-OCH₂CH₂OH). A.- Cromatograma de la elución del compuesto biotina-silica. B.- Electroforesis en SDS-PAGE de las fracciones eluidas. Donde “L” corresponde al lavado de la columna previa a la elución. C.- Espectro de emisión de fracciones correspondientes al lavado y los dos picos eluidos. La excitación se ha realizado a 460 nm.

60 Fig. 4.- Muestra la purificación de peroxidasa de rábano picante biotinilada *in vitro* A.- Cromatograma de la elución en la resina. La absorbancia a 440 nm es un índice de la actividad enzimática de la POD eluida. B.- Electroforesis en SDS-PAGE de las fracciones eluidas. Se ha incluido POD y avidina como estándares de la electroforesis.

Exposición detallada de modos de realización

65 A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la especificidad y efectividad de los compuestos de la invención.

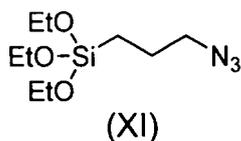
Ejemplo 1

Preparación del compuesto biotina-silica

5 La síntesis de biotina-silica se llevó a cabo en varios pasos:

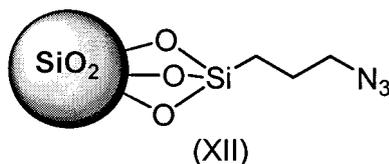
a) Preparación de 3-azidopropil-trietoxisilano (XI)

10 A una solución de 3-cloropropil-trietoxisilano (2.31 g, 9.6 mmol) y yoduro de tetrabutilamonio (0.02 g, 0.05 mmol) en butanona (25 mL) se le añadió azida sódica (3.120 g, 48 mmol) y se calentó la mezcla de reacción a reflujo durante 50 horas. Pasado este tiempo, se filtró sobre celita y se evaporó el disolvente a vacío. El crudo de reacción se disolvió en diclorometano (150 mL) y se lavó con agua (2 x 20 mL). La capa orgánica se secó (Na_2SO_4) y se evaporó para dar el compuesto de fórmula (XI) (1.9 g) como una sustancia siruposa que fue directamente usada sin otro proceso de purificación.



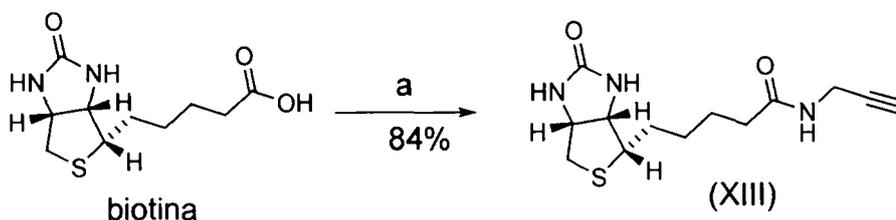
b) Preparación de azido-silica (XII)

25 Se suspendió gel de sílice (4 g) en tolueno (20 mL) y se añadió 3-azidopropil-trietoxisilano (XI) (1 g). La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 2 h; se evaporó aproximadamente la mitad del volumen para eliminar el etanol formado, se añadió el volumen eliminado de tolueno y se calentó a reflujo durante 1 h. Se filtró la mezcla de reacción, se lavó con diclorometano (4 x 50 mL) y se secó a vacío (1 mm Hg) a 50°C durante 16 h.



c) Preparación de propargilamida-biotina (5-[4R]-2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il]-N-prop-2-ynil-pentanamida) (XIII)

40 Se disolvió biotina (370 mg) en cloruro de tionilo destilado (5 mL) y se agitó durante 30 min. Se evaporó a vacío el cloruro de tionilo y se coevaporó con tolueno anhidro. El cloruro de ácido de biotina se disolvió en Cl_2CH_2 anhidro (5 mL) y se adicionó un exceso de propargil amina (207 μL , 3 equiv.). La mezcla de reacción se agitó en atmósfera de argón durante 30 min. y pasado este tiempo se evaporó el disolvente y se purificó por cromatografía en columna ($\text{Cl}_2\text{CH}_2:\text{MeOH}$, 9:1) obteniéndose un sólido blanco que corresponde a (XIII) (359 mg, 84%).



“a” representa: i) Cl_2SO (5mL), t. amb., 30 min ii) $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$, CH_2Cl_2 .

d) Unión de propargilamida-biotina (XIII) a azido-silica (XIV)

65 En una solución del alquino derivado de biotina (XIII) (300 mg, 1.06 mmol) en DMF seca (10 mL) se suspendió la azido-silica (XII) (3 g) y se añadió el catalizador $(\text{EtO})_3\text{P-CuI}$ (10% en mmol, 37 mg). La reacción se irradió a 800W y 80°C durante 1 h en un Milestone Star Microwave Labstation hasta que el espectro de IR o la cromatografía en placa fina mostraron la total desaparición de la biotina. Se filtró la biotina-silica (VI) resultante y se lavó con MeOH (2 x 30 mL), EDTA sal disódica (50 mM, 2 x 30 mL), agua (2 x 30 mL), acetona (2 x 30 mL) y CH_2Cl_2 (2 x 30 mL). La biotina-silica (VI) se secó después a vacío (1 mm Hg) a 50°C durante 16 h obteniéndose 3.240 g.

ES 2 310 969 B1

Ejemplo 2

Purificación de avidina de clara de huevo

5 Se ensayó la capacidad de unión de avidina a biotina-silica (VI) a partir de muestras de clara de huevo. Para ello, se emplearon sistemas de cromatografía en columna así como sistemas de centrifugación rápida en microfiltros. Este último sistema permitió el manejo sencillo de numerosas muestras de pequeño volumen en un tiempo reducido ya que requiere pequeños tiempos de centrifugación de aproximadamente 30 segundos. En ambos casos, la avidina fue purificada a partir de clara de huevo previamente sonicada utilizando métodos ampliamente descrito previamente (Cf. Hofmann *et al.*, 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 77, pp. 4666-4668; Airene *et al.*, 1997, *Protein expresión and purification*, vol. 9, pp. 100-108; Hytönen *et al.*, 2003, *Biochem. J.*, vol 372, pp. 219-225).

15 En la Fig. 1 se muestran los resultados de una cromatografía de afinidad sobre una columna de biotina-silica (VI). En dicha columna se cargó una muestra diluida 1:1 de clara de huevo previamente sonicada a pH 11. Se realizó un lavado con un tampón a pH 11 y posteriormente dos eluciones secuenciales con un tampón carbonato a pH 4 y glicocola 0.1 M (pH = 2.5). Se monitorizó el pH así como la absorbancia a 280 nm y se realizó una electroforesis en SDS-PAGE al 15% de las fracciones eluidas. Durante todo el proceso la temperatura se mantuvo a 4°C. Pudo observarse que la columna retiene de forma eficiente un elevado porcentaje del contenido de avidina del extracto crudo, que posteriormente fue eluido de una forma casi cuantitativa a pH 2.5. Por el contrario, la elución a pH 4 no fue capaz de romper la unión de la avidina a la matriz. El rendimiento aproximado del proceso es de 0.1 mg de avidina por gramo de resina.

20 En otros experimentos se utilizaron 200 mg de silica funcionalizada que fueron incubados a 4°C durante una hora con un mL de extracto crudo de huevo a pH 11. Posteriormente la suspensión de resina y extracto crudo se dispuso en un microfiltro y se centrifugó durante 30 segundos. La resina se lavó con tampón a pH 11 y posteriormente se eluyó con tampones conteniendo biotina (10 mM) de pH 4 y de pH 2.5. Una electroforesis en SDS-PAGE de las fracciones eluidas se muestra en la Fig. 2. Pudo observarse como utilizando esta técnica es posible unir avidina a la columna que es eluida específicamente a pH 2.5.

30 Los datos obtenidos indican que con la biotina-silica (VI) se obtiene un resultado inesperado y con una alta aplicabilidad: la elución de la avidina unida a la columna en condiciones relativamente suaves, evitando el uso de agentes caotrópicos o detergentes,. Esto permite el desarrollo de columnas de biotina basadas en esta matriz en lugar de las clásicas columnas de iminobiotina lo que se traduce en una considerable reducción del coste de esta tecnología. Adicionalmente, cabe señalarse que de los resultados de la electroforesis de las fracciones purificadas se obtuvo un elevado grado de pureza (>96% medido mediante electroforesis de proteínas), lo que permite realizar la purificación en un único paso.

35 Además, de forma alternativa la avidina puede ser cargada a pH 7.5 e igualmente la avidina puede ser eluida en una solución 0.2 N de HCl que posteriormente puede ser neutralizada utilizando tampones volátiles (por ejemplo tampón carbonato/bicarbonato) lo que permite obtener la proteína en condiciones de fuerza iónica muy baja.

Ejemplo 3

Marcaje fluorescente de avidina de clara de huevo unida a la resina biotina-silica (VI)

45 Puesto que la resina biotina-silica permitió la purificación de avidina en condiciones relativamente suaves, se procedió a ensayar el marcaje en columna de la avidina unida a la resina con un fluoróforo. Para ello se utilizó el compuesto 7(2-hidroxi-etoxi)-4-nitro-2,1,3-benzooxadiazol (NBD-OCH₂CH₂OH).

50 Para el marcaje de la avidina se utilizó la resina biotina-silica (2 g) que se incubaron con 15 mL de un extracto crudo de huevo sonicado y diluido 1:1. El pH se fijó a 11 y tras una hora de incubación, la suspensión de la resina se compactó en una columna. Tras lavarla se adicionaron 2 mL de una solución 2 mM de NBD-OCH₂CH₂OH a pH 11 (en todos los casos esta solución de lavado a pH 11 está formada por 50 mM Na₂CO₃, 1 M NaCl pH 11) y la solución se recirculó durante 16 h a través de la resina a temperatura ambiente. Seguidamente se lavó la columna con tampón a pH 11 y la avidina unida se eluyó con una solución 0.2 N de HCl. Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 3 y demuestran que es posible realizar el marcaje de la avidina unida a la biotina-silica con el mencionado reactivo NBD-OCH₂CH₂OH. El marcaje de la avidina con este reactivo hizo que la elución de la columna a pH 1 fuera más rápida originando dos picos. Un primer pico de elución con una mayor relación fluorescencia proteína y un segundo pico con una relación de marcaje inferior y mayor retención en la columna. Esta relación de marcaje fue confirmada mediante MALDI-TOF. Una prueba adicional de marcaje se obtuvo observando el espectro de fluorescencia de la avidina marcada y comparándolo al del compuesto libre. Como se esperaba se produjo un ligero desplazamiento del máximo de emisión que fue debido a la unión a la proteína.

65

ES 2 310 969 B1

Ejemplo 4

Purificación de proteínas biotiniladas in vitro mediante avidina unida a la resina biotina-silica (VI)

5 Para valorar la capacidad de la resina biotina-silica para la purificación y caracterización de proteínas biotiniladas *in vitro* se realizaron dos experimentos.

10 1° Se marcó con biotina una proteína fluorescente verde (Green Fluorescent Protein, GFP) utilizando el succinil éster del ácido 6-biotinil hexanoico. Posteriormente, se purificó mediante su unión a avidina que había sido previamente inmovilizada sobre la biotina-silica utilizando para ello el sistema de microfiltro con sólo 100 mg de resina silica-biotina. La elución se realizó con HCl 0.2 N y el eluato, tras ser liofilizado se analizó mediante MALDI-TOF. Se observaron pesos moleculares correspondientes con el monómero de avidina, así como con el de una molécula de GFP modificada con 4 biotinas. Se demostró, así, que esta técnica es idónea para la purificación y caracterización de proteínas biotiniladas.

15 2° Se procedió a marcar peroxidasa de rábano picante con el succinil éster del ácido 6-biotinil hexanoico. La peroxidasa marcada fue separada del agente biotinilante mediante cromatografía sobre sephadex G-50 y se empleó posteriormente para comprobar la capacidad de inmovilización sobre la resina biotina-silica. Esta resina, previamente cargada con avidina, fue eluida después de la unión de la biotina-peroxidasa a pH 4 y pH 2. La elución de la peroxidasa unida a la columna se monitorizó enzimáticamente usando el reactivo de Trinder. Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 4. Pudo observarse que la peroxidasa biotinilada fue reconocida por la avidina unida a la columna y puede ser eluida de una manera selectiva a pH 4 (la elución de la peroxidasa precede una fracción al cambio del pH en la cromatografía). Esta elución se produjo sin liberar la avidina unida a la columna (véase la electroforesis en SDS-PAGE fracción 5) que sólo se eluye a pH 2 (Fracción 11 en la electroforesis en SDS-PAGE).

20 Por tanto, este sistema tiene la ventaja de permitir la elución del complejo avidina-ligando biotinilado si se escoge como sistema de elución un tampón HCl a pH 1-2.5 o bien la elución específica del ligando biotinilado si se escoge como sistema de elución un tampón a pH 4.

30

35

40

45

50

55

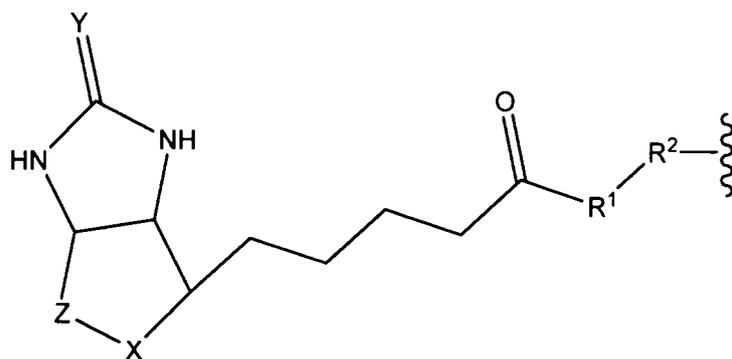
60

65

REIVINDICACIONES

1. Compuesto que comprende:

- a. biotina o cualquiera de sus derivados de fórmula general (I);
- b. un "linker" o enlazante que comprende el grupo 1,2,3-triazol; y
- c. un soporte poroso.



(I)

donde:

X es S, el grupo SO₂ ó no existe;

Y es O ó NH;

Z es CH₂ ó CH₃ cuando X no existe.

R¹ es O ó NH; y

R² es un grupo seleccionado de entre un alquilo C₁-C₁₀, (CH₂CH₂O)_nCH₂, donde n tiene un valor de 0 a 10, ó (CH₂)₄CH(NH₂)COOCH₂.

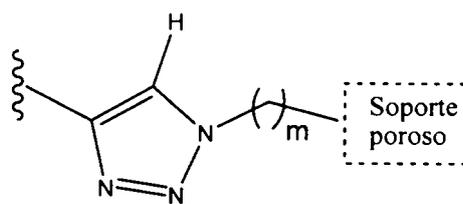
2. Compuesto según la reivindicación 1, donde X es S.

3. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, donde Y es O.

4. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde R¹ es NH.

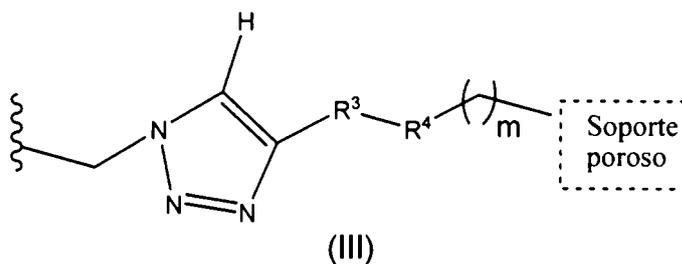
5. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde R² es CH₂.

6. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el enlazante tiene la fórmula general (II) ó (III):



(II)

ES 2 310 969 B1



donde:

15 R^3 es un alquilo C_1-C_{10} ó un grupo seleccionado de entre $(CH_2CH_2O)_nCH_2$, donde n tiene un valor de 0 a 10, o $(CH_2)_4CH(NH_2)COOCH_2$;

R^4 se selecciona del grupo que comprende O, $C(O)R^1$, $R^1C(O)R^1$ o $R^1C(S)R^1$ (donde R^1 es O ó NH); y

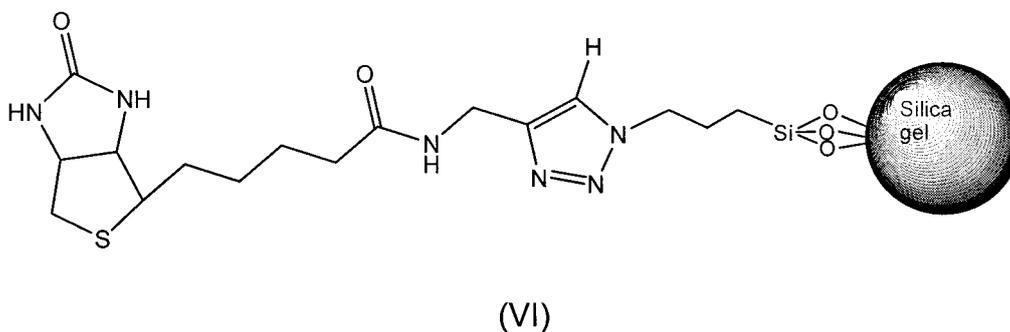
20 m tiene el valor de 1 a 11.

7. Compuesto según la reivindicación 6, donde m tiene el valor de 1 a 3.

8. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 6 ó 7, donde R^3 es CH_2 .

25 9. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde el soporte poroso es sílice.

10. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, de fórmula (VI):



45 11. Procedimiento de obtención de un compuesto descrito en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende los siguientes pasos:

- 50 a) funcionalización del soporte poroso usando un compuesto que comprende un grupo terminal azido (N_3) ó alquino ($C\equiv CH$).
- 55 b) funcionalización de biotina o cualquiera de sus derivados con un grupo terminal alquino ($C\equiv CH$) ó azido (N_3);
- c) reacción del soporte funcionalizado del paso (a) con la biotina funcionalizada o cualquiera de sus derivados funcionalizados del paso (b) por reacción de cicloadición 1,3-dipolar ("click-chemistry").

12. Procedimiento según la reivindicación 11, donde la reacción de cicloadición se produce entre un grupo azido del soporte poroso funcionalizado y un grupo alquino de la biotina funcionalizada.

60 13. Uso de un compuesto descrito en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para la purificación de avidina.

14. Uso de un compuesto descrito en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para la inmovilización de avidina.

15. Complejo que comprende un compuesto descrito en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 y avidina.

65 16. Uso del complejo descrito en la reivindicación 15, para la purificación de ligandos biotinilados.

17. Uso del complejo descrito en la reivindicación 15, para el marcaje fluorescente de avidina.

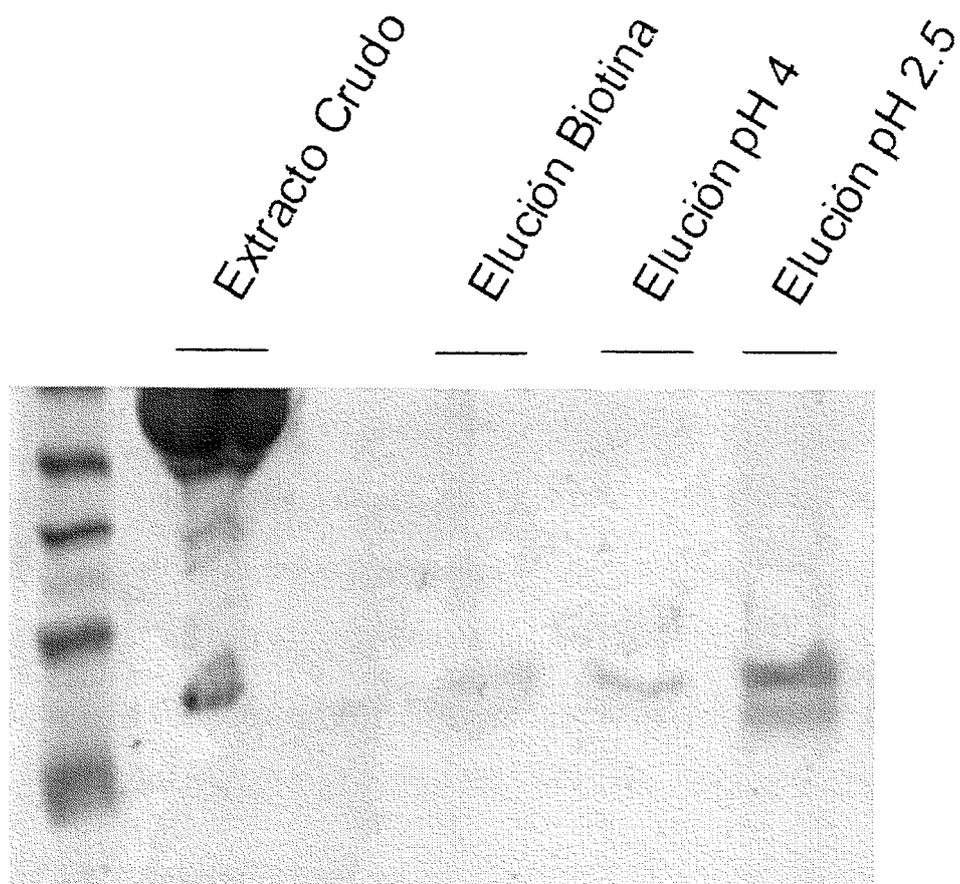


FIG. 2

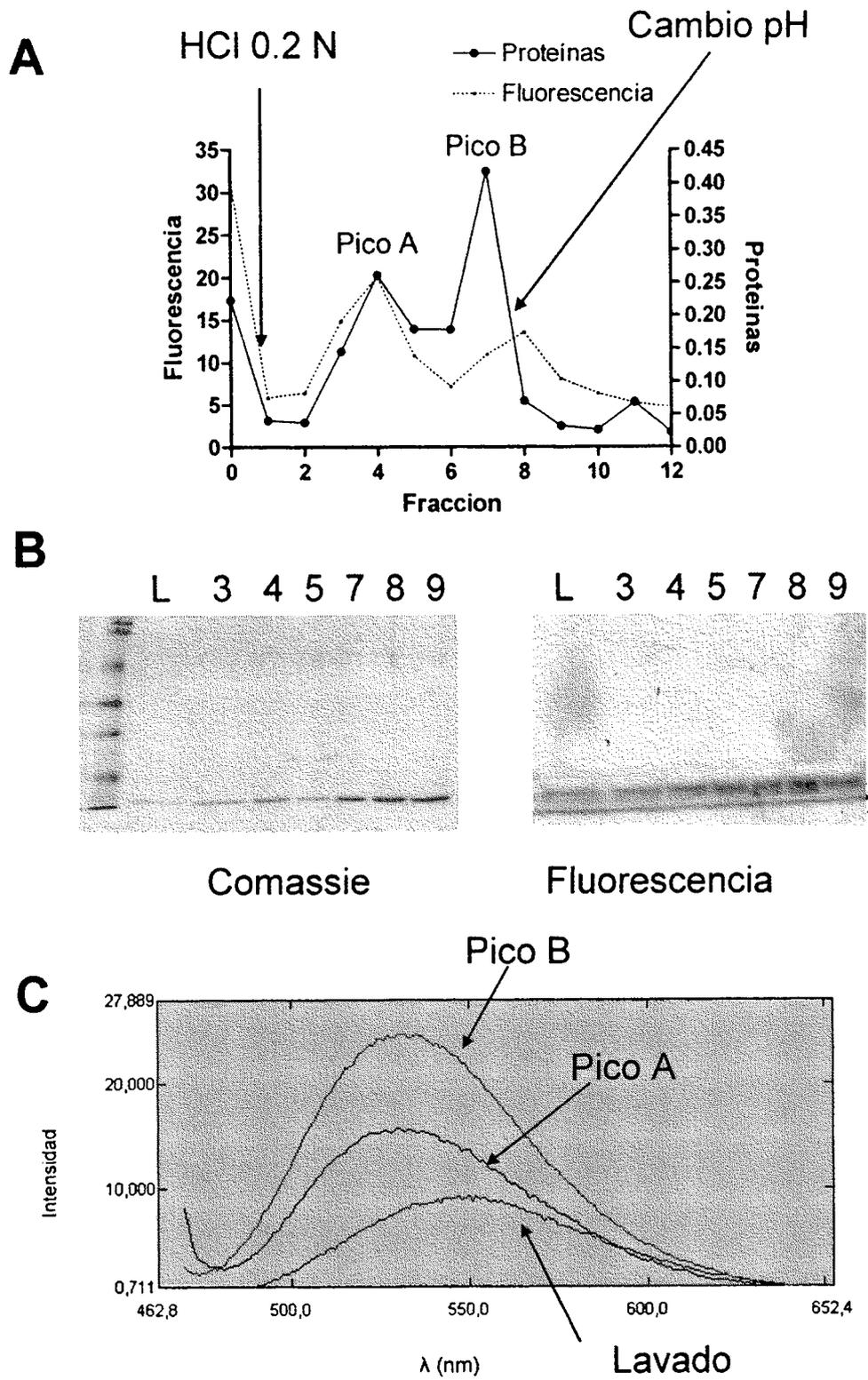


FIG. 3

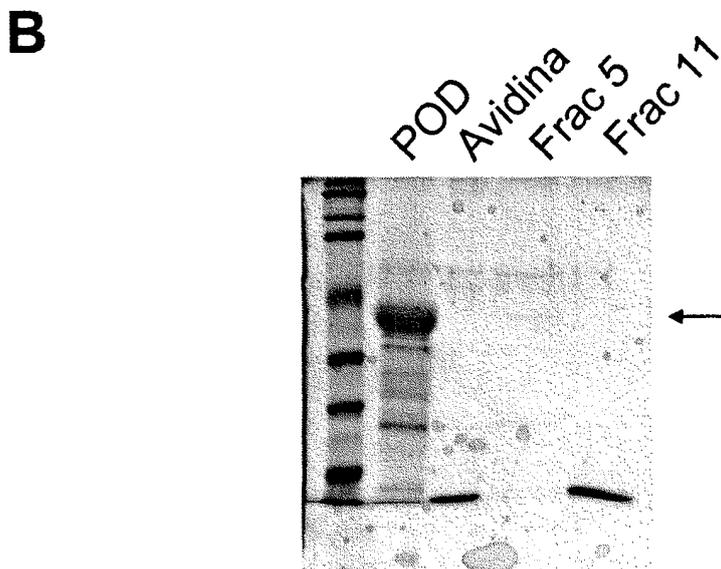
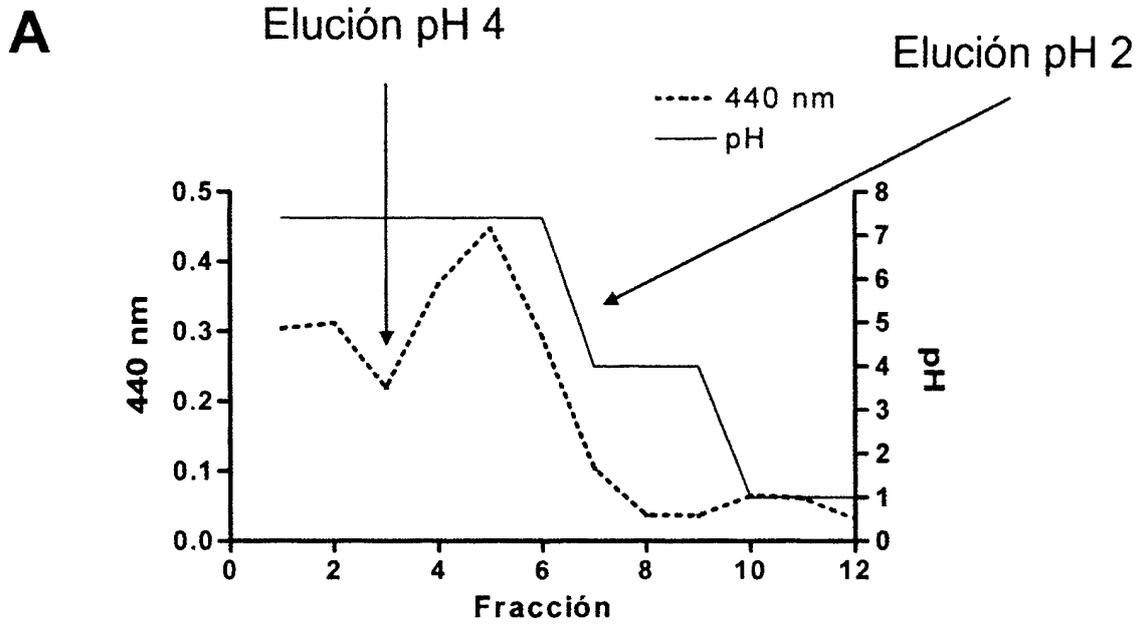


FIG. 4



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 310 969

② Nº de solicitud: 200701850

③ Fecha de presentación de la solicitud: **02.07.2007**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ **Int. Cl.:** Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	ZHAO, XUE ZHI, y col. Biotinylated biphenyl ketone-containing 2,4-dioxobutanoic acids designed as HIV-1 integrase photoaffinity ligands. <i>Bioorganic & Medicinal Chemistry</i> . 2006, Vol. 14, Nº 23, páginas 7816-7825, ISSN 0968-0896. Página 7817 figura 2; página 7818, esquema 3.	1-17
A	SMITH, C.L.y col. Immobilization of nucleic acids usind biotin-stept(avidin) systems. <i>Topics in Current Chemistry</i> . Volume Editor C.Wittmann. Immobilisation of DNA on chips II. Vol. 261, páginas 63-90, ISSN 0340-1022. Página 77, párrafo 3.2 "Biotin Derivatives"; página 79 párrafo 4 "Biotin-Strep(avidin) surfaces"; página 80, figura 6.	1-17
A	ROZKIEWICZ DORATA, I. y col. "Click" chemistry by microcontact. <i>Angeandte Chemie, International Edition</i> . 2006, Vol. 45, Nº 32, páginas 5292-5296, ISSN 1433-7851. Todo el documento.	1-17
A	ORTEGA-MUÑOZ, M. y col. Synthesis of glyco-silicas by Cu(I)-catalyzed "click-chemistry" and their applications in affinity chromatography. <i>Advanced Synthesis & Catalysis</i> . 2006, Vol. 348 (16+17), páginas 2410-2420. Todo el documento.	1-17

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

23.10.2008

Examinador

E. Albarrán Gómez

Página

1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C07F 7/08 (2006.01)

C07D 495/04 (2006.01)

B01J 20/289 (2006.01)

B01D 15/38 (2006.01)

G01N 30/60 (2006.01)