



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 319 063**

② Número de solicitud: 200702542

⑤ Int. Cl.:
B01J 20/10 (2006.01)
C07F 7/08 (2006.01)
C12N 11/14 (2006.01)
C12Q 1/00 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **28.09.2007**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.05.2009**

Fecha de la concesión: **27.01.2010**

⑭ Fecha de anuncio de la concesión: **12.02.2010**

⑮ Fecha de publicación del folleto de la patente:
12.02.2010

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

⑱ Inventor/es: **Santoyo González, Francisco;
Hernández Mateo, Fernando;
López Jaramillo, Javier;
Ortega Muñoz, Mariano y
Morales Sanfrutos, Julia**

⑲ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑳ Título: **Compuesto de sílica-vinilsulfona, síntesis y usos del mismo.**

㉑ Resumen:

Compuesto de sílica-vinilsulfona, síntesis y usos del mismo.

Compuesto que comprende un soporte de sílica funcionalizada con grupos vinilsulfona. Además, se refiere a su procedimiento de obtención y sus usos como inmovilizador de biomoléculas, y más concretamente de enzimas tales como invertasa, lactasa, peroxidasa o tiorredoxina h1, y de otras biomoléculas tales como glutatión, nitrosoglutatión o biotina.

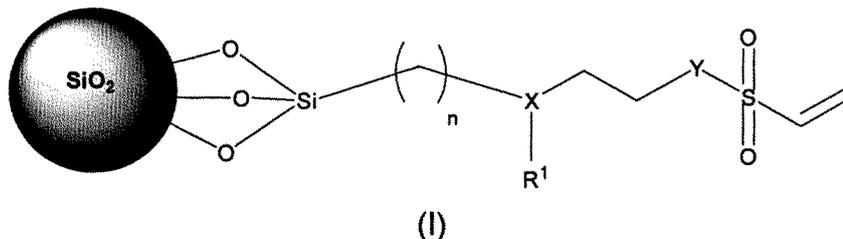
ES 2 319 063 B1

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

DESCRIPCIÓN

Compuesto de sílica-vinilsulfona, síntesis y usos del mismo.

La presente invención se refiere a un compuesto de sílica conteniendo grupos vinilsulfona de fórmula general (I), a su procedimiento de obtención y a sus usos. Más particularmente, el uso de los compuestos de sílica en aplicaciones biotecnológicas.



Estado de la técnica anterior

La inmovilización de macromoléculas a soportes sólidos se remonta a comienzos del siglo XX con los trabajos de Nelson y Griffin (cfr. Nelson, J.M. *et al.*, 1916 *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 38, pp. 1109-1115) sobre inmovilización de invertasa. El interés inicial por los enzimas inmovilizados y su actividad catalítica se ha ido extendiendo a otras macromoléculas. En la actualidad, la inmovilización de macromoléculas sobre un soporte sólido y el concepto de afinidad entre moléculas juegan un papel central en lo que se ha dado en denominar la era de las “omics” (cfr. Sheldon, R. A., 2007, *Adv. Synth. Catal.*, vol. 349, pp.1289-1307). En este contexto se han descrito numerosas aproximaciones para inmovilizar macromoléculas a soportes con el objetivo de fabricación de microarrays (cfr. Sun, H. *et al.*, 2006, *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 386, pp. 416-426; Sun, X-L, Stabler, C.L., Cazalis, C.S., Chaikif, E.L., 2006, *Bioconjugate Chem.* vol. 17, pp. 52-57).

A pesar de los avances, aún persiste la necesidad de efectuar una “activación” para promover dicha inmovilización. Básicamente, existen dos métodos para llevar a cabo la mencionada activación: (a) activación de la macromolécula a inmovilizar; o (b) activación del soporte.

La primera de las metodologías (activación de la macromolécula a inmovilizar) ha tenido una amplia difusión y uso. En este sentido, mediante técnicas de Biología Molecular las proteínas pueden ser “activadas” vía fusión a colas o péptidos/dominios proteicos que le confieren afinidad por el soporte. Esta estrategia ha dado lugar al desarrollo de distintos sistemas comerciales entre los que se encuentran: (a) Colas de histidina (“His-Tag”) (cfr. Hengen, P., 1995, *Trends Biochem Sci.* vol. 20, pp. 285-286.) en combinación con soportes conteniendo Ni (Quiagen, IBA, Amersham-Bioscience, Clontech); (b) Fragmento de la haloalcano deshalogenasa (“Halo-Tag”) en combinación con soportes con haloalcano (Promega); (c) SNAP: O6-alquilguanina- ADN alquiltransferasa (cfr. Keppler, A. *et al.* 2004 *Methods* vol. 32, pp. 337-344) en combinación con soportes conteniendo O6-bencilguanina (Covalys); (d) Colas conteniendo péptidos con afinidad por estreptavidina (“Strep-tag”) (cfr. Schmidt, TGM, *et al.*, 1996 *J. Mol. Biol.* vol. 255, pp. 753-766) en combinación con soportes conteniendo estreptavidina (Novagen, IBA, Quiagen, Stratagene); (e) Glutación transferasa en combinación con soportes conteniendo glutatión (Novagen, Clontech o Amersham-Biosciences); (f) Proteína de unión a maltosa en combinación con soportes con maltosa, (New England Biolab); (g) Péptido de unión a calmodulina en combinación con soportes conteniendo calmodulina (Stratagene); (h) Dominio de unión a celulosa en combinación con soportes conteniendo celulosa (Novagen); (i) Péptido biotinilado *in vivo* (cfr. Cronan, J.E., 1990, *J. Biol. Chem.* vol. 265, pp. 10327-10333) en combinación con soportes conteniendo avidina (Promega); (j) IMPACT Inteina en combinación con soportes conteniendo quitina (New England Biolabs). Esta aproximación está limitada a proteínas recombinantes y generalmente conduce a una inmovilización no covalente de la macromolécula, hecho que determina su aplicación en purificación de proteínas mediante cromatografía de afinidad.

Otra opción para la activación de la macromolécula a inmovilizar es la introducción en su estructura de grupos químicos que le confieran reactividad o sobre los que se pueda llevar a cabo posteriores transformaciones químicas. Para proteínas, el grupo de elección es el grupo tiol (-SH) y la aproximación experimental usada es la mutagénesis dirigida o la fusión a una inteina (cfr. Girish, A., *et al.*, 2005 *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 15, pp. 2447-2451).

La segunda de las metodologías (“activación” de los soportes) supone la preparación de soportes sólidos conteniendo grupos funcionales reactivos para que reaccionen y formen un enlace covalente con las macromoléculas a inmovilizar. Los soportes que tradicionalmente se vienen empleando son la agarosa y el poliestireno. Los procedimientos clásicos de activación del soporte son: (a) el método de aminación reductiva (Pierce: agarosa y poliestireno

funcionalizados con grupos tosil, tresil, epoxi, alquilamina, aldehído, hidrazida); (b) el método de cabonildiimidazol (Quiagen: poliestireno activado para reaccionar con SH, carboxi para ser activado con grupos succinimida o carbodiimida); (c) el método de la N-hidroxisuccinimida éster (Hispanagar: agarosa funcionalizada con grupos glicoxal o aminoetil); (d) el método de la maleimida (Polygenetics: poliestireno funcionalizado con grupos amina ó CN); (e) el método de la hidrazida (Bangs Laboratories: poliestireno funcionalizado con grupos carboxi para ser activado con carbodiimida o grupos amino). Los grupos diana de la macromolécula son las aminas para los métodos (a), (b) y (c), los grupos tiol para el método (d) y los grupos aldehído, obtenidos por oxidación de carbohidratos, para el método (e).

El uso de la sílica/vidrio como soporte para la inmovilización de macromoléculas ha cobrado recientemente interés. En la actualidad existen en el mercado (a) sílica con Concanavalina A (Biotech Support Group) que interacciona con carbohidratos, (b) sílica con ácidos grasos (Nimbus Biotechnology) para incorporación de proteínas de membrana y (c) sílica con albúmina sérica humana (Nimbus Biotechnology). Las estrategias de inmovilización para este soporte sólido son las mismas que las indicadas para los otros soportes: (a) fusión de la proteína a inmovilizar con colas de Histidina (HisLink Resin de Promega en combinación con sílica con Ni de Biotech Support Group), con GST (sílica con glutatión de Biotech Support Group) con péptidos que interaccionan con estreptavidina (sílicas con estreptavidina de Bangs Laboratories y de Polysciences), con péptidos que interacciona directamente con la sílica (Arg-Tag14, Si-Tag15) b) empleo de soportes funcionalizados que permitan su fácil activación y reacción con la macromolécula.

Por otro lado, las sulfonas α,β -insaturadas (vinil sulfonas) son reconocidas como intermediarios sintéticos de gran utilidad debido fundamentalmente a su capacidad para participar en reacciones de adición 1,4 (aceptores de Michael) y en reacciones de cicloadición (como donores 2π). Adicionalmente, las vinilsulfonas son fáciles de preparar, a través de una amplia variedad de procesos sintéticos, y de manipular (Simpkins, N. S., 1990, *Tetrahedron* vol. 282, pp. 6951-6984; Meadows, D. C., *et al.*, 2006, *Med. Res. Rev.* vol. 26(&) pp. 793-814). Estas características han encontrado recientemente utilidad en el diseño de fármacos y en química médica cuando se demostró su capacidad para inhibir de forma potente y reversible una variedad de procesos enzimáticos, fundamentalmente aquellos en los que están implicados cistein proteasas a las que se unen a través de reacciones de adición con el grupo tiol presente en el residuo de cisteína del sitio activo de estas enzimas. (cfr. Simpkins, N. S., 1990, *Tetrahedron* vol. 282, pp. 6951-6984; Meadows, D. C., *et al.*, 2006 *Med. Res. Rev.* vol. 26(6), pp. 793-814).

La alta reactividad del grupo vinilsulfona ha sido explotada previamente en la preparación de distintos materiales conteniendo esta funcionalización: (i) poliestireno (comercializados por Aldrich) (ii) agarosa (comercializada por Gen-taur) y (iii) sefarosa (comercializada por Affiland). Estos materiales han sido utilizados para el acoplamiento covalente con compuestos conteniendo grupos amina, tioles e hidroxilo habiendo encontrado aplicabilidad en la inmovilización de biomoléculas portadoras de estos grupos funcionales.

Además, el grupo vinilsulfona se usa en la preparación de intermedios de síntesis para la posterior obtención de materiales más elaborados, que contienen soportes de sílica. Estos materiales se suelen denominar resinas tiofílicas o "T-Gel" (cfr. Schwarz A. *et al.*, 1994, *Reactive Polymers* vol. 22, pp. 256-266; GB 2 230 003 A; US 4,696,980; DE 10330204 A1). En este tipo de materiales el concepto clave es el de adsorción tiofílica descrito por Porath (cfr. Porath *et al.*, 1984, *Physical Chemistry of Colloids and Macromolecules*, pp 137-142; Porath J. *et al.*, 1985, *FEBS* vol. 185 (2), pp. 306-310). La adsorción tiofílica se basa en la afinidad de macromoléculas por resinas del tipo SOPORTE-O-CH₂-CH₂-SO₂-CH₂-CH₂-S-R (R= un residuo alifático pequeño) y en la actualidad es usada como una técnica alternativa para la inmovilización no covalente y purificación de moléculas biológicas (cfr. Hutchens T.W. *et al.*, 1987, *Biochemistry* vol. 26, pp. 7199-7204). Para la preparación de estas resinas tiofílicas la estrategia utilizada supone la reacción de divinilsulfona, como reactivo difuncional, con un compuesto de sílica conteniendo grupos hidroxilo, sílica recubierta con dextrano o grupos tiol obteniéndose así un material activado que se hace reaccionar normalmente *in situ* con tiol derivados sencillos.

Explicación de la invención

En la presente invención se proporciona un nuevo compuesto que comprende sílica funcionalizada con grupos vinilsulfona a través de una cadena conteniendo un grupo funcional del tipo tiol o amina. Además de proporcionar el procedimiento de obtención de los mismos y sus usos, en particular en la inmovilización de biomoléculas dentro del campo de la biotecnología.

El nuevo compuesto proporciona una técnica de inmovilización que no requiere ninguna estrategia de activación y que combina las propiedades de la sílica como soporte con la reactividad de la vinilsulfona con grupos presentes de forma natural en las biomoléculas en condiciones de reacción suaves compatibles con su naturaleza biológica.

El uso de sílica como material para soportar grupos vinilsulfona supone una serie de importantes ventajas con respecto a otros materiales poliméricos como, por ejemplo, polisacáridos o poliestireno:

- Estabilidad mecánica. El material puede ser sometido a agitación mecánica sin sufrir alteraciones en su tamaño lo que permite llevar a cabo procesos en "batch". Otro aspecto importante es la estabilidad a alta presión de la sílica lo que permite su uso en HPLC.

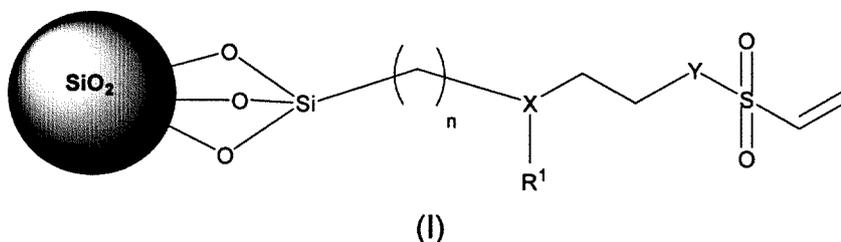
ES 2 319 063 B1

- Estabilidad química y biológica. El material no es susceptible de sufrir degradaciones por la acción de microorganismos y agentes químicos (por ejemplo ácidos).
- Estabilidad térmica. Es posible utilizar un amplio rango de temperaturas sin que el material sufra descomposiciones térmicas. El material es también susceptible de ser usado en procesos asistidos con microondas.
- Independencia del disolvente. El material no sufre ni encogimiento ni hinchado como consecuencia de la acción de los disolventes. Además, no es soluble en ningún disolvente lo que facilita la operatividad.
- Facilidad de uso en lo que respecta, fundamentalmente, al manejo y pesado. No se requieren lavados extensos. El material no se pega ni al vidrio ni al plástico. Por estas razones, el material es susceptible de ser usado en procesos automatizados.
- Flexibilidad de formatos. Es posible preparar fácilmente sílicas funcionalizadas con un amplio rango de tamaños de partícula. Al no sufrir hinchamiento en contacto con disolventes estos materiales pueden ser empaquetados en una variedad de flujos a través de formatos tales como columnas de HPLC, cartuchos flash.
- Reproducibilidad. Permiten cargas de material exactas incrementando el grado de reproducibilidad en sus aplicaciones.
- Optimización de los recursos de partida: sílica, silanoles y divinilsulfona (DVS) que son productos de partida baratos. Optimización de las condiciones de reacción: temperatura ambiente, disolventes baratos y tiempo de reacción. Ambos factores permiten obtener un producto competitivo en el mercado.

Los materiales que se describen en el estado de la técnica, denominadas resinas tiofílicas o "T-Gel", han sido utilizados como soportes de cromatografía de afinidad explotándose las interacciones tiofílicas reversibles de este tipo de materiales con biomoléculas. La función vinilsulfona, en estos materiales, es utilizada para posibilitar la formación de grupos éter o tioeter en la construcción de las cadenas de tipo $O-CH_2-CH_2-SO_2-CH_2-CH_2-S-R$ unidas a los soportes. Sin embargo, en estas resinas tiofílicas, la función vinilsulfona ha sido utilizada para que los materiales que la contienen puedan llevar a cabo la unión no covalente en la inmovilización de biomoléculas. Mientras que en la invención se produce unión covalente en la inmovilización de biomoléculas con el uso del compuesto de sílica-vinilsulfona.

Además, se ha comprobado, en la presente invención, que la incorporación de la función vinilsulfona a la sílica se puede realizar en más de una etapa usando bisvinilsulfonas a partir de sílica comercial. Se requiere el uso de un compuesto de sílica funcionalizada con grupos que tengan un carácter nucleófilo, preferentemente grupos tioles o aminos, con capacidad para reaccionar fácilmente con bisvinilsulfonas. Estos grupos tioles o aminos pueden estar unidos al soporte inorgánico a través de un espaciador de longitud y naturaleza variable. Sin embargo, la utilización de sílicas funcionalizadas conteniendo aminas primarias no es factible dado que en la reacción de estos compuestos con bisvinilsulfonas se produce una segunda ciclación intramolecular con formación de compuestos cíclicos. La solución a este inconveniente supone la preparación de un compuesto de sílica conteniendo aminas secundarias que en la reacción con bisvinilsulfonas permiten la obtención de los compuestos de sílica de la invención.

Así, un primer aspecto de la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula general (I):



Donde:

n representa la unión entre el Si y X mediante un grupo alquilo, sustituido o no sustituido, donde el número de carbonos dependerá del valor de n.

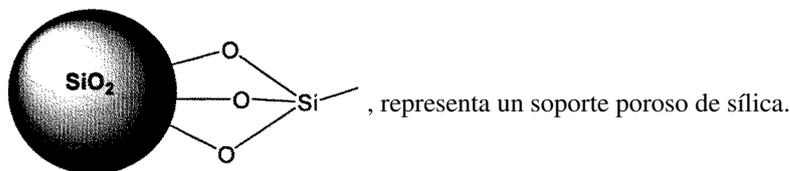
n tiene valores comprendidos entre 0 y 15, preferiblemente 2, 3 ó 11 y más preferiblemente 3.

ES 2 319 063 B1

X es un átomo de azufre (S) o de nitrógeno (N). Cuando X es S, el grupo R¹ no existe.

R¹ es un grupo seleccionado de entre un alquilo(C₁-C₁₀), sustituido o no sustituido, o un alquenilo(C₁-C₁₀), sustituido o no sustituido. Preferiblemente R¹ es un grupo metilo.

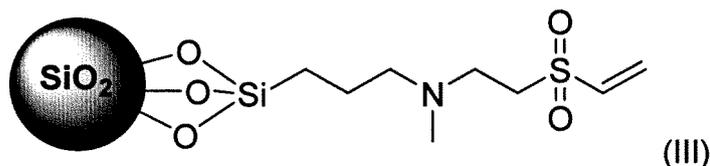
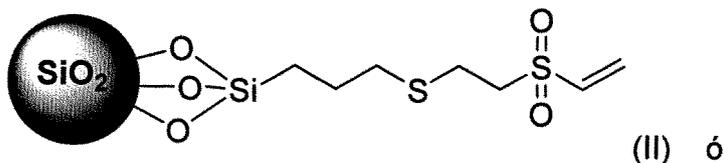
Y puede ser un grupo -SO₂R², donde R² es un alquilo(C₁-C₁₀) o un dialquilarilo ((C₁-C₁₀)Ar(C₁-C₁₀)). En una realización preferida del compuesto de sílica de la presente invención, Y no existe.



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.

Por “alquenilo” se refiere en la presente invención a un radical alquilo que tiene entre 1 y 10 átomo de carbono y que tiene uno o más enlaces insaturados. Los radicales alquenilo pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes tales como un arilo, halógeno, hidroxilo, alcoxilo, carboxilo, ciano, carbonilo, acilo, alcóxicarbonilo, amino, nitro, mercapto, etc.

En una realización preferida, el compuesto de la invención puede ser:



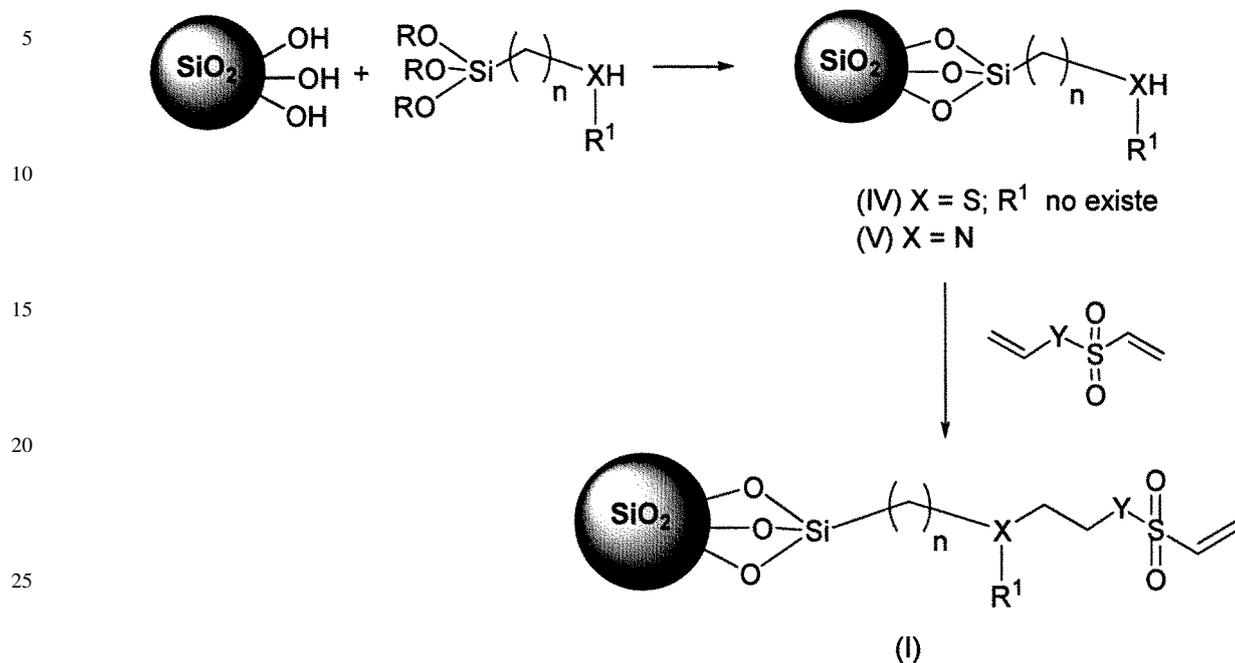
Otro aspecto de la presente invención se refiere al procedimiento de obtención del compuesto de fórmula general (I) que comprende:

- Obtención de sílica funcionalizada con grupos tiol o amina.
- Reacción del compuesto de sílica obtenido en el paso (a) con divinilsulfona en presencia de una base orgánica.

Una realización preferida del procedimiento de la invención comprende una amina terciaria como base orgánica que se puede seleccionar del grupo que comprende, sin limitarse a, trietilamina o diisopropiletilamina.

Otra realización más preferida del procedimiento de la invención, comprende en la reacción del paso (b) el uso de disolventes que se pueden seleccionar entre mezclas de THF con un alcohol como, por ejemplo isopropanol o terc-butanol, preferiblemente isopropanol.

A continuación se describe esquemáticamente el procedimiento de la invención:



30 n, X, R¹ e Y están descritos anteriormente.

Otro aspecto más de la presente invención, se refiere al compuesto N-alquil o alquenil-aminopropil-sílica (V), obtenido en el paso (a) del procedimiento de obtención del compuesto de sílica de la invención y cuya fórmula es:



45 donde n y R¹ están descritos anteriormente, preferentemente n=3 y/o R¹ es metilo(Me).

Más preferiblemente, el compuesto puede tener la fórmula (VI)



60 Aún otro aspecto de la presente invención se refiere al uso del compuesto de fórmula general (I) para inmovilizar biomoléculas. Esta inmovilización se produce mediante la unión covalente entre la biomolécula y el grupo vinilsulfona presente en el compuesto de la invención. Este método de inmovilización covalente se lleva a cabo en condiciones de reacción suaves que son compatibles con la naturaleza biológica de las biomoléculas a través de grupos funcionales ya presentes en las mismas macromoléculas en un número considerable y accesible, por lo que no hay que realizar modificaciones químicas o mutagénesis dirigida para funcionalizarlas. La alta reactividad de la función vinilsulfona, en el compuesto de la invención, permite inmovilizar una amplia variedad de biomoléculas. Se describen varios casos en los que se pone de manifiesto la capacidad de inmovilización covalente de diferentes biomoléculas en términos

65

de peso molecular, punto isoelectrico y función. Los ejemplos se refieren, pero sin limitarse, a la posibilidad de unir el compuesto de la invención a enzimas (invertasa, lactasa y peroxidasa), para poner de manifiesto que tras la inmovilización mantienen la actividad catalítica, y a péptidos/proteínas (glutación, nitroso glutación y tiorredoxina h del guisante), para demostrar que la inmovilización transforma la sílica-vinilsulfona en un soporte de cromatografía de afinidad apto para la purificación y experimentos de “pull-down”.

Además, el compuesto de fórmula general (I) puede inmovilizar cualquier biomolécula que tenga grupos amina y/o tioles y usarse como soportes cromatográficos para cromatografía de afinidad según la necesidad en cada momento. Los resultados son extrapolables a lípidos y carbohidratos y otros sistemas que reaccionen con la vinilsulfona.

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.

Breve descripción de las Figuras

Fig 1. Muestra la variación de la concentración de invertasa en solución (no inmovilizada) en función del tiempo de reacción con el compuesto de sílica-vinilsulfona a dos temperaturas.

Fig 2. Muestra la actividad enzimática de la invertasa inmovilizada. Variación del poder rotatorio (producto de la actividad catalítica del enzima inmovilizada) de una solución de sacarosa en contacto con la invertasa inmovilizada a dos temperaturas.

Fig 3. Muestra un estudio de la viabilidad de inmovilizar la lactasa sobre columnas de compuesto de sílica-vinilsulfona previamente empacadas. Poder rotatorio específico (alfa) de la muestra a distintos intervalos de tiempo. La hidrólisis de la lactosa en glucosa y galactosa origina un incremento de alfa.

Fig 4. Muestra un cromatograma del experimento de “pull-down” con nitrosoglutación inmovilizado.

Fig 5. Muestra la electroforesis bidimensional de las fracciones recogidas en el experimento de “pull-down” llevadas a cabo con tiorredoxina h-1 del guisante, inmovilizada sobre el compuesto de sílica-vinilsulfona.

Exposición detallada de modos de realización

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

Ejemplo 1

Preparación del compuesto de sílica-vinilsulfona de fórmula (II)

Primeramente, se transformó sílica en el derivado mercaptopropil-sílica (IV). Este derivado es un compuesto conocido (cfr. Howard, A.G *et al.*, (1987), *Analyst* vol. 112, pp. 159) que se obtiene por reacción de sílica con 3-mercaptopropiltrimetoxisilano y que también se puede obtener comercialmente (Silicycle).

El compuesto de fórmula (II) se obtuvo por reacción del compuesto (IV) con divinilsulfona según el siguiente procedimiento: La mercaptopropil-sílica (1 g) se suspendió en una mezcla de THF-isopropanol (1:2, 10 mL) que se burbujea con argón para posteriormente añadir DVS (0.515 mL, 5 eq) y trietilamina (0.028 mL, 0.2 eq). La mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente durante 16 h. Tras ese tiempo, se filtró el compuesto resultante de fórmula (II) que fue lavado con acetona y secado en una estufa de vacío a 50°C.

Ejemplo 2

Preparación del compuesto de sílica-vinilsulfona de fórmula (III)

El compuesto de fórmula (III) se obtuvo en un procedimiento de dos etapas:

- a) Primero se obtuvo el compuesto 3-(metilamino)-propil-sílica, de fórmula (V) ($X=N$ $R^1=Me$), por silanización de sílica: Se suspendió sílica (5 g) activada previamente por tratamiento térmico (120°C a vacío durante 24 h) en tolueno (25 mL) y se adicionó 3-(metilamino)-propil-trimetoxisilano (1,250 g), calentándose a reflujo durante 2 h. Se evaporó un 20% del disolvente (5 mL) y se volvió a poner a reflujo durante 1 h adicional. El compuesto resultante de fórmula (V) se filtra y seca.

ES 2 319 063 B1

- b) Reacción del compuesto 3-(metilamino)-propil-sílica (V, X=N R¹=Me) con DVS: 1.53 g del compuesto de fórmula (V) fueron suspendidos en una mezcla de THF-isopropanol (1:2, 10 mL) y se le añadió DVS (0.640 mL, 5 eq). La mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente durante 16 h. Tras ese tiempo, el compuesto resultante de fórmula (III) se filtró y lavó sucesivamente con metanol y cloruro de metileno, secándose posteriormente en una estufa de vacío a 50°C.

Ejemplo 3

10 *Protocolo general de inmovilización en discontinuo ("batch")*

A una suspensión de sílica-vinilsulfona de fórmula (II) ó (III) (0.5 g) en un tampón que no contenga aminos libres, como por ejemplo fosfato o HEPES, de fuerza iónica moderada (50 - 200 mM) y pH básico (7,5 -8,7) (10 mL) se adicionó la molécula a inmovilizar (0.6 micromoles) y se dejaron reaccionar durante tiempo suficiente (entre 6 horas y 10 horas) con agitación. Posteriormente se adicionó mercaptoetanol (8 micromoles) y se agitó durante 1 hora. Los excesos de reactivos se eliminaron mediante sucesivos lavados con una solución de NaCl 2M y la resina (proteína inmovilizada en la sílica-vinilsulfona) se equilibró con el tampón en el que se realizaron los experimentos posteriores.

20 Ejemplo 4

Protocolo general de inmovilización en columna

La inmovilización de una biomolécula puede ser llevada a cabo directamente sobre sílica-vinilsulfona empacada en una columna haciendo recircular una solución de la biomolécula de interés en un tampón que no contenga aminos libres, como por ejemplo fosfato o HEPES, de fuerza iónica moderada (50 - 200 mM) y pH básico (7,5 -8,7) durante un tiempo suficiente (en función del flujo de la columna y del volumen de la solución de macromolécula. A modo de ejemplo, para 49 ml de solución de macromolécula y un flujo de de 0.5 ml/min, el tiempo de reacción fue de 14 horas). El empacado se llevó a cabo suspendiendo la sílica vinyl-sulfona en el tampón anteriormente mencionado y de forma general se utilizaron 3 g de sílica vinyl sulfona/micromol de biomolécula. Para bloquear los grupos vinilsulfona que no hayan reaccionado se trató el material con una disolución de β -mercaptoetanol (16 micromoles por gramo de vinyl-sílica empacada) durante tiempo suficiente (en función del flujo de la columna y del volumen de la solución) a temperatura ambiente. Este protocolo permite la transformación directa de vinyl-sílica previamente empacada en una columna cromatográfica y/o reactor enzimático basado en la macromolécula que se inmoviliza.

Ejemplo 5

40 *Inmovilización de la invertasa*

La invertasa (beta-fructofuranosidasa [EC3.2.1.26]), enzima que cataliza la hidrólisis de sacarosa en fructosa y glucosa, es elegida como enzima modelo teniendo en cuenta que (a) la proteína es comercial, (b) el sustrato es barato, (c) la actividad puede ser fácilmente medida en el laboratorio y (d) tiene aplicación industrial en el sector alimentario, donde se prefiere la fructosa sobre la glucosa por ser más dulce y no cristalizar tan fácilmente.

La inmovilización de invertasa de levadura comercial (10 mg, Sigma I-4504) se realizó según el protocolo general mediante una reacción en discontinuo ("batch"). El estudio de la influencia de la temperatura sobre la reacción (Fig. 1) muestra que a las 10 horas la reacción es completa, independientemente de la temperatura utilizada (temperatura ambiente ó 4°C). El análisis de la funcionalidad de la invertasa inmovilizada (Fig. 2) demuestra que el enzima mantiene su actividad.

Ejemplo 6

55 *Inmovilización de la lactasa*

La lactasa (glicosidasa hidrolasa [EC3.2.1.23]), enzima que cataliza la hidrólisis de lactosa en glucosa y galactosa, es elegida como enzima a inmovilizar teniendo en cuenta el alto interés que ello tiene tanto en la industria alimentaria, dado que la lactosa es poco soluble y su capacidad edulcorante es insuficiente, como en medicina, debido a la intolerancia a este disacárido.

La inmovilización de lactasa de *Kluyveromyces lactis* (Sigma G-3665) se llevó a cabo en columna, siguiendo el protocolo general arriba indicado, empacando la sílica-vinil sulfona (2.5 g) y haciendo recircular una solución de lactasa (49 mL) a temperatura ambiente a un flujo de 0.5 mL/min.

Para estudiar la actividad de la enzima inmovilizada se midió el poder rotatorio específico de la muestra de lactosa a distintos intervalos de tiempo sobre la base de que la hidrólisis de la lactosa en glucosa y galactosa origina un

ES 2 319 063 B1

incremento del poder rotatorio (Fig. 3). El estudio muestra que la inmovilización de lactasa sobre sílica-vinilsulfona previamente empacada es factible y que el material así obtenido mantiene la actividad del enzima.

5 Ejemplo 7

Inmovilización de peroxidasa

10 Las peroxidasa [EC1.11.1.x] son enzimas que catalizan la reducción de peróxido de hidrógeno con la ayuda de un sustrato que pierde dos átomos de hidrógeno. Los enzimas con capacidad redox son capaces de provocar la polimerización de compuestos fenólicos en presencia de peróxido de hidrógeno. Estos polímeros fenólicos son inocuos o menos tóxicos e insolubles en agua, facilitando su eliminación. En este contexto la inmovilización de peroxidasa es interesante. Además, al tratarse de una glicoproteína es un buen modelo para demostrar la capacidad de la sílica vinil-sulfona en la inmovilización de este tipo de biomoléculas. En concreto se seleccionaron las peroxidasa de rabano
15 picante y alcachofa.

La inmovilización de las peroxidasa (10.9 mg) fue llevada a cabo usando el protocolo general mediante una reacción en discontinuo (“batch”).

20 Para demostrar que la inmovilización de peroxidasa de alcachofa ha tenido lugar se midió la actividad enzimática. El enzima inmovilizado es activo.

Ejemplo 8

25

Inmovilización de glutatión

El glutatión es un tripéptido de interés en biotecnología como elemento presente en resinas comerciales de uso en purificación de proteínas de fusión con glutatión-S- transferasa (GST) basadas en la afinidad de la GST por el glutatión inmovilizado (cfr Smith, D.B. and Johnson, K.S.,1988, *Gene* vol. 67, pp. 31-40). Las proteínas diana se purifican casi a homogeneidad en un solo paso y las condiciones de elución con glutatión reducido son suaves, evitando desnaturalización de la proteína.

30 La inmovilización de glutatión comercial (2.4 mg Sigma G4251) se realizó según el protocolo general mediante una reacción en “batch” usando 1 g de sílica-vinil-sulfona. Los grupos vinilsulfona que no han reaccionado se bloquean con β -mercaptoetanol (563 μ L).

40 La sílica-glutatión fue empacada en una columna y empleada para purificar una proteína de fusión con GSH. Un lisado de un cultivo de bacterias que expresaron la proteína de fusión se pasó a través de la columna de sílica-glutatión. Se lavó la columna con 200 ml de HEPES 100 mM pH 7,5 y NaCl 200 mM. La elución se realizó con 50 mM de glutatión en 50 mM Tris-HCl pH 7,5.

Ejemplo 9

45

Inmovilización de nitrosoglutatión

El S-nitrosoglutatión (GSNO) es un tripéptido que transfiere NO a proteínas con grupos tiol. Dada la importancia del óxido nítrico como molécula implicada en aspectos claves de la regulación de los sistemas inmune, cardiovascular y nervioso, la inmovilización de GSNO se llevó a cabo para poder obtener un soporte de afinidad cromatográfica basado en este péptido y poder realizar experimentos de “pull-down” para identificar proteínas susceptibles de ser nitrosadas (proteínas diana).

La preparación de este material se llevó a cabo en un proceso en tres etapas:

55

- a) Inmovilización de L-glutatión oxidado (GSSG) comercial (2.5 mg Sigma G4501). Se lleva a cabo según el protocolo general en “batch” usando 1 g de resina. Los grupos vinilsulfona que no han reaccionado se bloquean por tratamiento con β -mercaptoetanol (563 μ L).
- 60 b) Reducción del GSSG y desprotección del grupo -SH del L-glutatión (GSH) inmovilizado. Se lleva a cabo por tratamiento del material obtenido en la anterior etapa con DTT (14 mg) durante 2 h. a 20°C.
- c) Nitrosación del GSH inmovilizado y obtención de sílica-GSNO. Se lleva a cabo según el procedimiento de Lamas y col. (Biochem J. 2000, 349, 567) por tratamiento con HCl 10 mM y NaNO₂ 10 mM (10 mL) durante 1 h a 20°C. Se filtra y repite el tratamiento durante 30 min. Se filtra y lava con HEPES 40 mM pH 7.5 y NaCl 50 mM.
- 65

ES 2 319 063 B1

Para comprobar la eficacia de la inmovilización y la aplicabilidad de la sílica-GSNO, se procedió a realizar un experimento de “pull-down” a partir de un extracto de girasol según el procedimiento que se indica: la sílica-GSNO se empacó usando 250 ml de HEPES 50 mM pH 7.5 y NaCl 50 mM. Se cargó un extracto de girasol (150 ml), se lavó con NaCl 200 mM para despegar las proteínas unidas a la columna mediante interacciones no específicas y se eluyó selectivamente con fuerza iónica (1.5 M NaCl) y con poder reductor (10 mM DTT en 1.5 M NaCl). El cromatograma obtenido (Fig. 4) muestra que los picos de proteína eluida (Absorbancia a 280) presentaban la señal característica del enlace S-NO (Absorbancia a 340), es decir, que las proteínas retenidas por la resina son y/o se han nitrosado, por lo que constituyen potenciales dianas del GSNO.

10 Ejemplo 10

Inmovilización de tiorredoxina h1

15 Las tiorredoxinas, enzimas redox que actúan como interruptores que modulan la actividad de numerosas proteínas vía el intercambio de puentes disulfuro, han sido elegidas como proteínas de interés para demostrar la eficacia de la sílica vinil-sulfona para la inmovilización de proteínas. La inmovilización de la tiorredoxina h1 de guisante no es conocida y experimentos de “pull-down” son una estrategia viable para identificarla.

20 La inmovilización de la tiorredoxina h1 de guisante recombinante con cola de His expresada en *E. coli* (6.08 mg) fue llevada a cabo usando el protocolo general mediante una reacción en “batch” y la alta reactividad de los restos de histidinas presentes en la cola de esa proteína hacia los grupos vinil-sulfona es aprovechada para favorecer la orientación de la molécula (la molécula reaccionará preferentemente con la cola de polihistidina, que está en la cara opuesta al centro activo, por lo que éste queda accesible).

25 Para demostrar la inmovilización de la tiorredoxina h1 y la aplicabilidad del material obtenido se llevaron a cabo experimentos de “pull-down” siguiendo el esquema de elución expuesto en el ejemplo anterior: se pasa el extracto, se lava la columna con 200 mM NaCl para despegar las proteínas unidas a la columna mediante interacciones no específicas y se eluye selectivamente con fuerza iónica (1.5 M NaCl) y con poder reductor (10 mM DTT en 1.5 M NaCl). Una electroforesis bidimensional (Fig. 5) de las fracciones recogidas en el experimento revela que sólo unas pocas proteínas han sido retenidas por la columna, lo cual apoya la especificidad de la interacción y la viabilidad de la sílica-vinilsulfona como resina sobre la que llevar a cabo experimentos de “pull-down”.

35 Ejemplo 11

Inmovilización de biotina

40 La inmovilización de aminobiotina comercial (0.1 g de biotina Merck) se llevó a cabo usando el protocolo general mediante una reacción en “batch” con las siguientes modificaciones: 1.25 g de resina, una mezcla de THF-isopropanol (2:1, 10 ml) como disolvente y trietil amina (38 mg) como base. Tras un periodo de reacción de 14 h, se filtró y lavó con cloruro de metileno:metanol (1:1).

45 Para demostrar que la inmovilización de biotina ha tenido lugar se llevó a cabo una cromatografía de afinidad para el aislamiento y purificación de avidina.

50

55

60

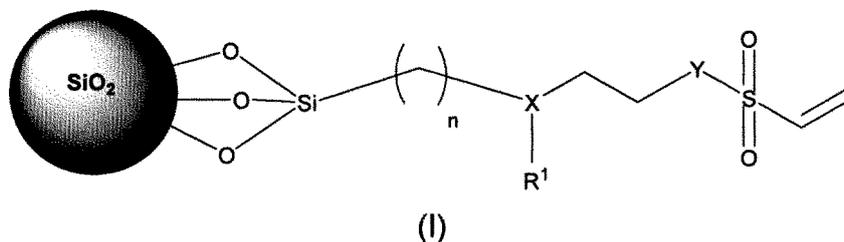
65

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula general (I):

5

10



15

donde:

n tiene valores comprendidos entre 0 y 15.

20

X es S ó N.

R¹ es un grupo seleccionado de entre un alquilo (C₁-C₁₀), sustituido o no sustituido, o un grupo alquenoilo (C₁-C₁₀), sustituido o no sustituido.

25

Y no existe o es el grupo -SO₂R², donde R² es un grupo alquilo (C₁-C₁₀) o un dialquilarilo ((C₁-C₁₀)Ar(C₁-C₁₀)).

2. Compuesto según la reivindicación 1, donde n tiene un valor de 3.

30

3. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, donde X es S.

4. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, donde X es N.

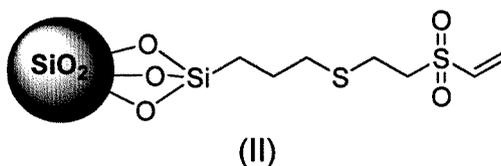
5. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 ó 4, donde R¹ es metilo.

35

6. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde Y no existe.

7. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 ó 6, de fórmula (II)

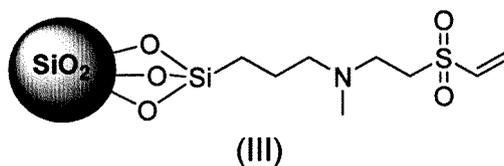
40



45

8. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 ó 4 a 6, de fórmula (III)

50



55

9. Método de obtención de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende:

60

a. obtención de sílica funcionalizada con grupos tiol o amina;

b. reacción del compuesto de sílica obtenida en el paso (a) con divinilsulfona en presencia de una base orgánica.

10. Método según la reivindicación 9, donde la base orgánica usada en el paso (b) es trietilamina.

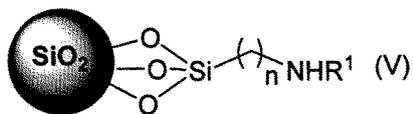
65

11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 9 ó 10, que además comprende el uso de THF-isopropanol como disolvente de la reacción del paso (b).

ES 2 319 063 B1

12. Compuesto de fórmula general (V):

5



donde n y R^1 están descritos en la reivindicación 1.

10

13. Compuesto según la reivindicación 12, donde n es 3.

14. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 12 ó 13, donde R^1 es metilo.

15

15. Uso de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 como inmovilizador de biomoléculas.

16. Uso del compuesto según la reivindicación 15, donde las biomoléculas son enzimas, glutatión, nitrosoglutatión o biotina.

20

17. Uso del compuesto según la reivindicación 16, donde los enzimas se seleccionan de entre invertasa, lactasa, peroxidasa o tioredoxina h1.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

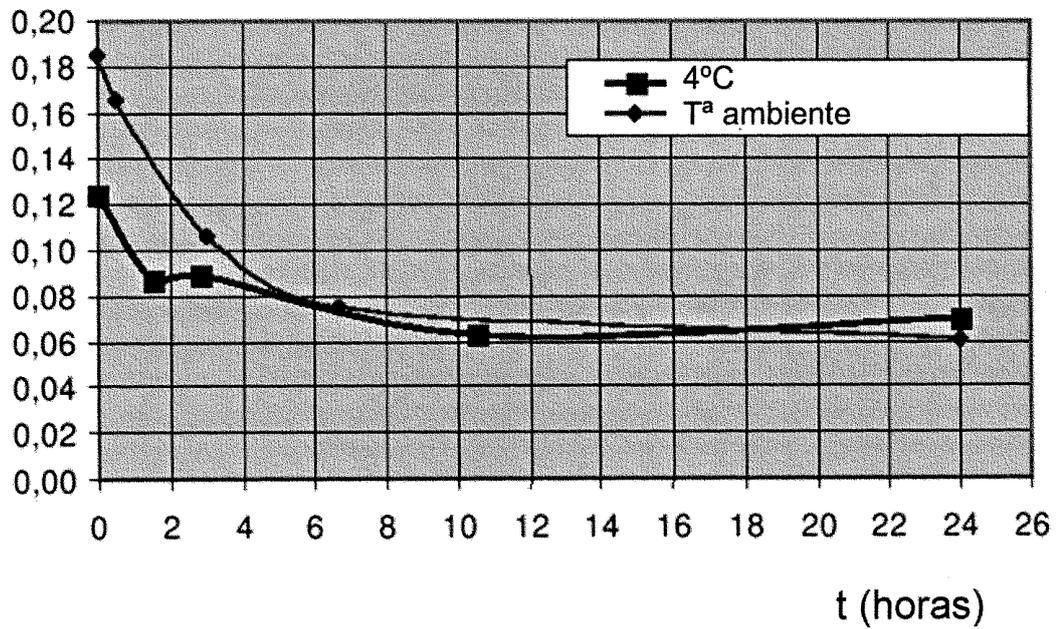


FIG. 1

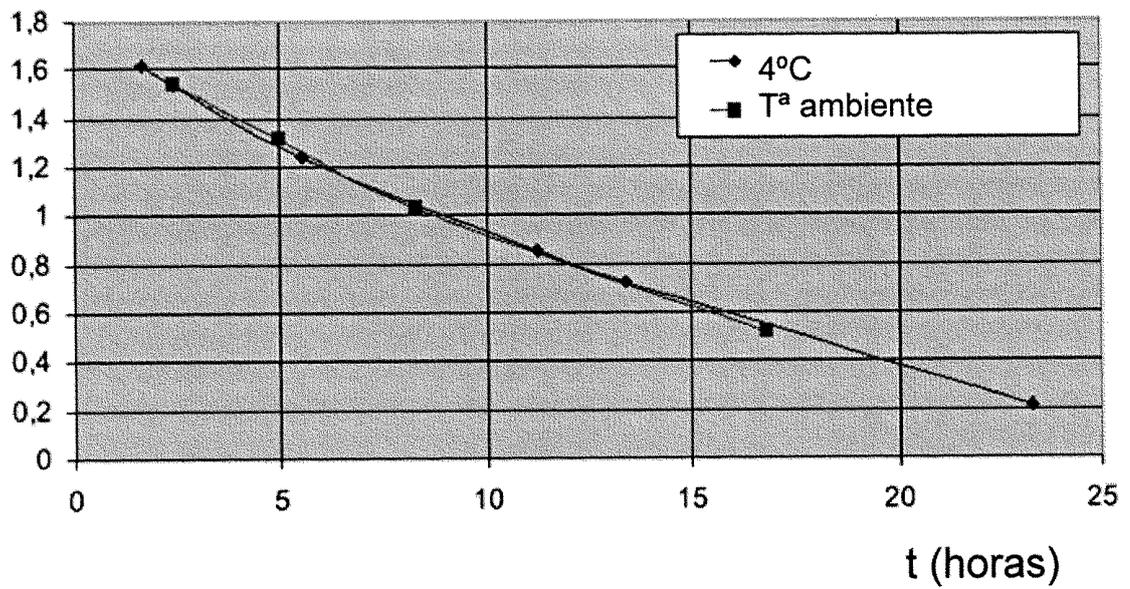


FIG. 2

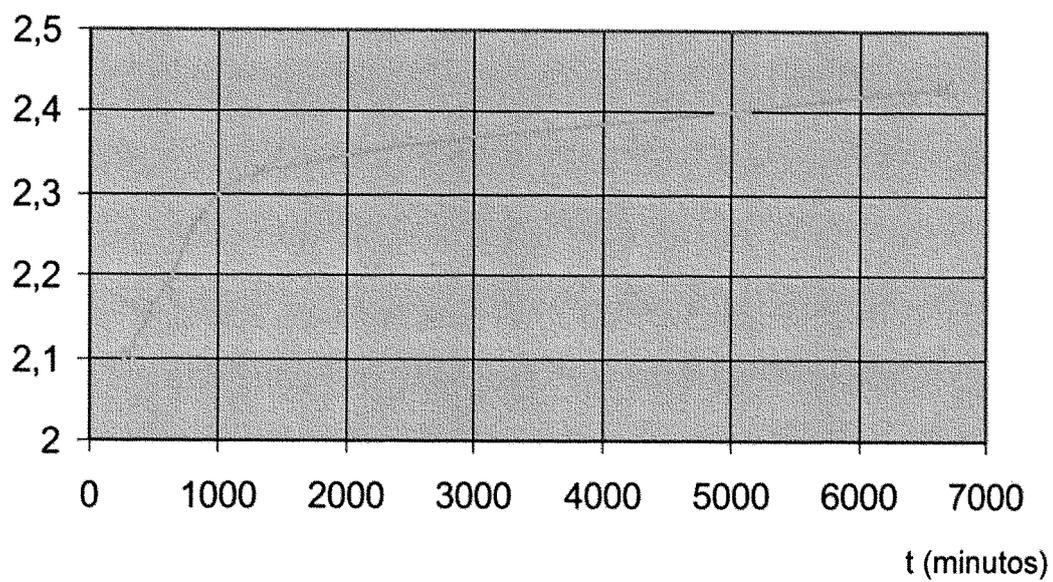


FIG. 3

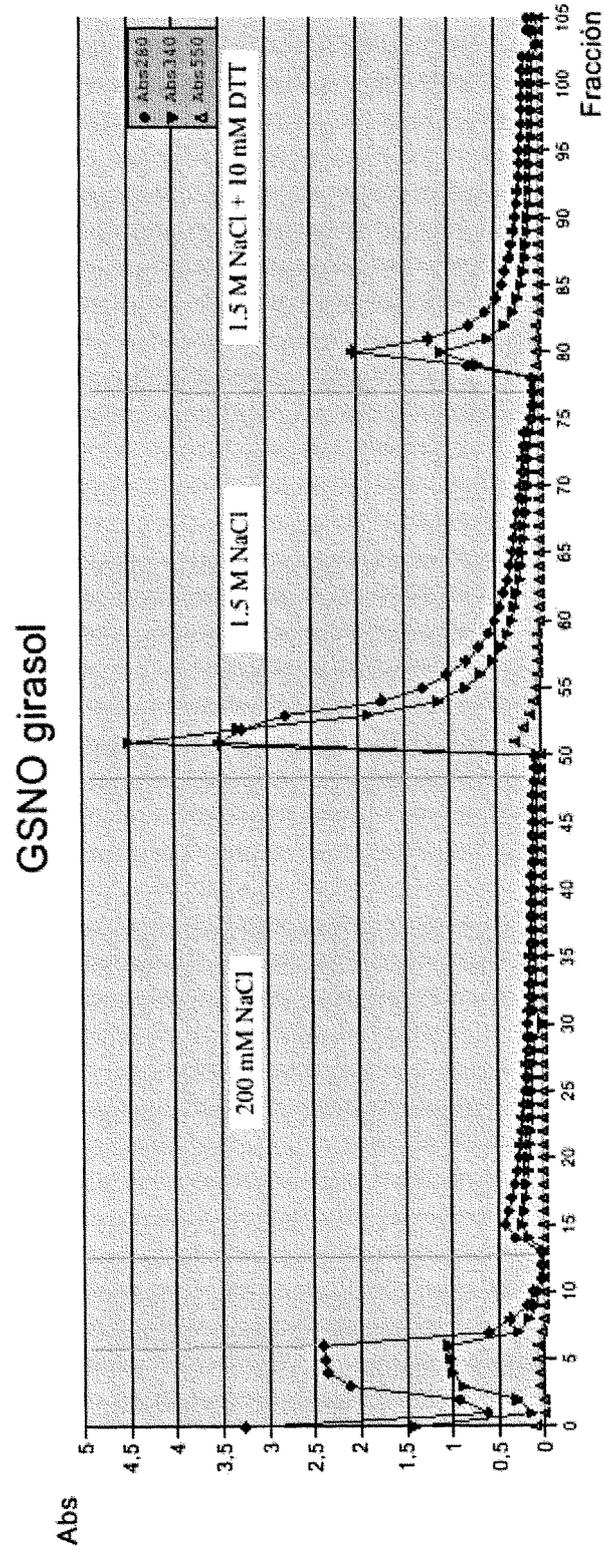


FIG. 4

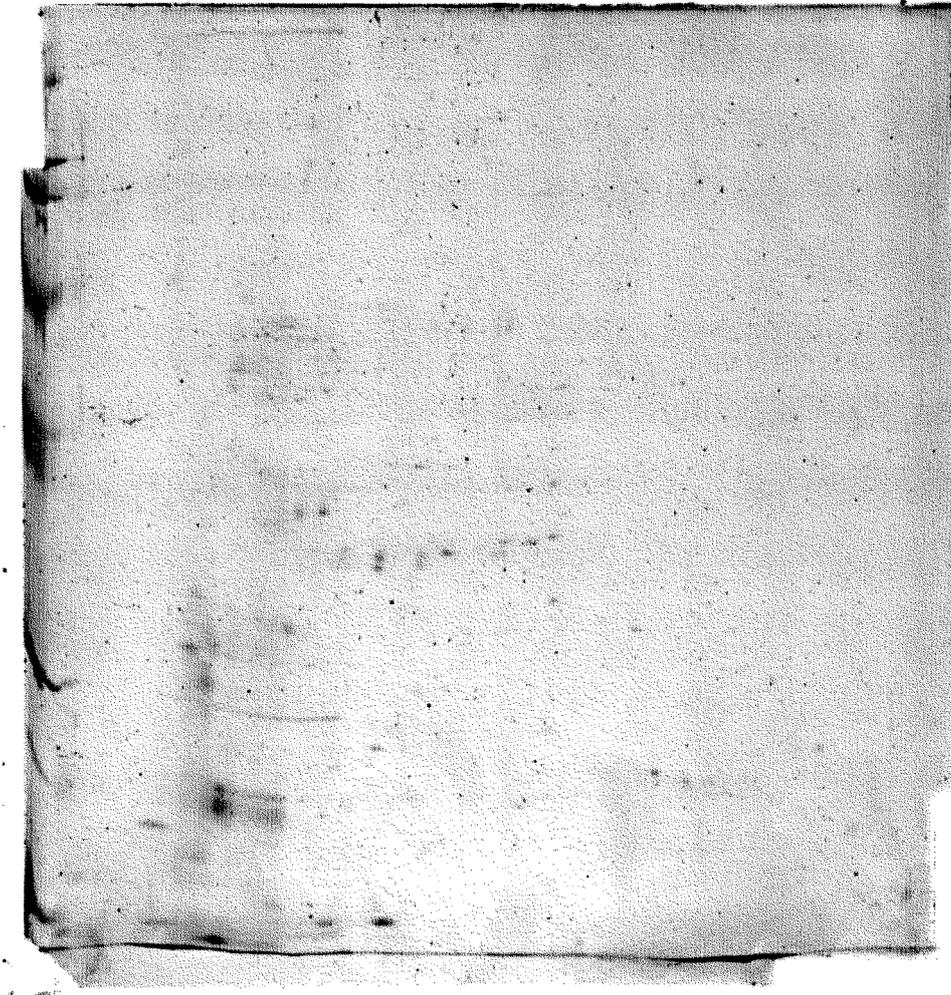


FIG. 5



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 319 063

② N° de solicitud: 200702542

③ Fecha de presentación de la solicitud: **28.09.2007**

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
X	WO 2005002722 A1 (UNIVERSITÄT TÜBINGEN) 13.01.2005, página 5, líneas 14-18; página 6, líneas 2-26; página 7, líneas 23-29.	1-17
X	EP 0490416 A1 (AGFA-GEAVERT) 17.06.1992, página 4, líneas 39-55; página 6, línea 47 - página 7, línea 18; compuesto 4.	1-17
X	EP 1607743 A1 (INTERUNIVERSITAIR MICROELEKTRONICA CENTRUM) 21.12.2005, página 5, párrafos [0017]-[0020]; página 44, figura 10; página 12, párrafo [0070]; página 11, líneas 6-57.	1-17
A	WO 2003015915 A1 (W.R. GRACE & CO.) 27.02.2003, página 32, ejemplo 9; página 10, párrafos [0040]-[0050].	1-17
A	SCHWARZ, A. et al. "Novel sulfone-based thiophilic ligands for the high-performance liquid chromatographic purification of antibodies". Reactive Polymers, 1994, Volumen 22, páginas 259-266. Ver página 263, figura 1.	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

06.03.2009

Examinador

G. Esteban García

Página

1/5

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

B01J 20/10 (2006.01)

C07F 7/08 (2006.01)

C12N 11/14 (2006.01)

C12Q 1/00 (2006.01)

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

B01J, C07F, C12N, C12Q

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

INVENES, WPI, EPODOC, TXTE, BIOSIS, MEDLINE, NPL, EMBASE, XPESP, REGISTRY, HCAPLUS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 06.03.2009

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-17	SÍ
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	SÍ
	Reivindicaciones 1-17	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 ha sido publicada.

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 2005/002722 A1	13.01.2005
D02	EP 0490416 A1	17.06.1992
D03	EP 1607743 A1	21.12.2005

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

El objeto de la invención es un compuesto general de fórmula I con estructura de trialcoxisiloxano y una vinilsulfona terminal soportado sobre sílice, un método de obtención del mismo, el compuesto intermedio de fórmula general V y el uso de I como inmovilizador de biomoléculas.

El documento D01 divulga partículas de gel de sílice no poroso con superficies modificadas útiles para la inmovilización de diversas biomoléculas y un procedimiento para su obtención a partir de un sol de gel de sílice por reacción con un aminoalquilalcoxisilano, como puede ser 3-aminopropiltrióxosilano (página 5, líneas 14-18), y reacción del grupo amino introducido en la superficie con un espaciador conocido en el estado de la técnica, como es una cadena alquílica o una divinilsulfona (página 6, líneas 2-8), capaz de formar una unión covalente con la biomolécula que va a ser inmovilizada, que puede ser un péptido o proteína, un ácido nucleico, un carbohidrato o cualquier otro metabolito (página 6, líneas 19-26; página 7, líneas 23-29). En el caso concreto de que el espaciador que se une a la sílice funcionalizada con 3-aminopropiltrióxosilano sea una cadena alquílica, el producto obtenido, aunque no esté explícitamente recogido, se corresponderá inequívocamente con la estructura de fórmula V de la solicitud, donde R1 es un grupo alquilo y n es 3. Por otro lado, cuando el espaciador es divinilsulfona, se obtendrá un producto de estructura similar al del compuesto I de la invención, con n igual a 3, diferenciándose solamente en que R1 sería H, en lugar de alquilo o alqueno.

El documento D02 divulga macrosiloxanos obtenidos por reacción de un compuesto que porta un grupo siloxano con sílice coloidal hidratada (página 6, línea 47-página 7, línea 18). Los siloxanos de partida son compuestos derivados de trialcoxisilano que contienen un grupo funcional terminal reactivo frente a los grupos amino o hidroxilo presentes en materiales proteínicos tales como gelatina o caseína, que puede ser un grupo etilénico beta-insaturado, como la vinilsulfona $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{SO}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{SO}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-$ (página 4, líneas 41-página 5, línea 36), que se encuentra en el compuesto 4 (página 6), un derivado de trióxosilano que presenta una cadena N-alquilpropilamina con una vinilsulfona en posición terminal, además de un segundo grupo sulfona y una funcionalidad éter. La reacción de este compuesto con un sustrato de sílice dará lugar a un producto de estructura similar al compuesto I de la invención, en el que n es 3, e Y es $\text{SO}_2(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_2$, y que, por tanto, se diferencia de éste tan sólo en la presencia de un O en la cadena alquílica y en que R1 sería hidrógeno en lugar de alquilo o alqueno.

El documento D03 divulga derivados de silano de fórmula general (1) $\text{A}-(\text{CH}_2)_n-(\text{O}[\text{CH}_2]_t)_m-(\text{CH}_2)_v-\text{Y}$ capaces de formar monocapas cuando se depositan sobre un sustrato y que son útiles en biosensores y microarrays (página 5, líneas 13-31; página 44, figura 10), al unirse covalentemente a moléculas biológicas como enzimas, hormonas y ácidos nucleicos, entre otras (página 12, párrafo [0070]). El grupo A es una funcionalidad capaz de unirse covalentemente a un sustrato, como es la sílice, y a su vez unida a una cadena alquílica que puede estar interrumpida por heteroátomos y opcionalmente seguida por una serie de unidades de alquilénglico y un espaciador alquílico con un grupo terminal reactivo Y que puede unirse a moléculas biológicas, y que puede ser una vinilsulfona (página 11, líneas 6-57).

Aunque ninguno de los documentos citados divulga explícitamente los compuestos I, II, III y V de la invención, y por tanto, éstos son nuevos, se considera que carecen de actividad inventiva, ya que resultarían de una serie de selecciones arbitrarias entre las distintas alternativas posibles en cuanto a los grupos funcionales presentes en los mismos teniendo en cuenta lo divulgado en cada uno de los documentos D01-D03 considerados por separado, en los que se recogen las características técnicas esenciales de los compuestos de la invención que los hace útiles para la inmovilización de biomoléculas, es decir, compuestos derivados de trialcoxisilanos con una vinilsulfona terminal capaz de unirse covalentemente a biomoléculas y soportados sobre gel de sílice.

Hoja adicional

En relación con las reivindicaciones 9-11, que se refieren al método de obtención de los productos de la invención, se considera igualmente que carecen de actividad inventiva, ya que se trata de un método convencional utilizando las condiciones de reacción habituales en este tipo de procesos.

Por lo tanto, se considera que el conjunto de la invención recogida en las reivindicaciones 1-17 no presenta actividad inventiva respecto a lo divulgado en cada uno de los documentos D01-D03 por separado (Artículo 8.1 de la Ley de Patentes).