



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 374 236**

21 Número de solicitud: 201030392

51 Int. Cl.:
G01N 33/68 (2006.01)
C07K 17/14 (2006.01)
C12N 11/14 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **17.03.2010**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **15.02.2012**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
15.02.2012

71 Solicitante/s: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)**
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES

72 Inventor/es: **Guisán Seijas, José Manuel;**
Mateo González, César;
Fernández Lorente, Gloria;
Pessela Joao, Benevides y
Bolívar Bolívar, Juan Manuel

74 Agente: **Pons Ariño, Ángel**

54 Título: **Soportes heterofuncionales activados y su uso para la inmovilización de proteínas.**

57 Resumen:

Soportes heterofuncionales activados y su uso para la inmovilización de proteínas.

La presente invención se refiere a soportes heterofuncionales activados con grupos capaces de adsorber proteínas a pH neutro vía diferentes mecanismos y grupos aldehído muy reactivos capaces de inmovilizar las enzimas previamente adsorbidas de modo covalente multipuntual. El uso de este tipo de soportes permite la inmovilización y rigidificación de enzimas a través de diferentes regiones de su superficie. Mediante la inmovilización de diferentes proteínas de interés industrial sobre diferentes soportes glioxil heterofuncionales se obtuvieron derivados con diferentes actividades, estabildades y selectividades.

ES 2 374 236 A1

DESCRIPCIÓN

Soportes heterofuncionales activados y su uso para la inmovilización de proteínas.

5 **Estado de la técnica anterior**

La mayor aplicación de la inmovilización de enzimas a nivel industrial es la posibilidad de rehusar las enzimas durante numerosos ciclos de reacción (Cao L. Immobilised enzymes: science or art? *Curr Opin Chem Biol.* 2005; 9:217-26). Además para que esto sea rentable a nivel industrial estos procesos de inmovilización deberían ir unidos al incremento de la estabilidad de los derivados inmovilizados obtenidos. El desarrollo de nuevos protocolos de inmovilización y estabilización de enzimas que sean muy sencillos es uno de los logros más excitantes dentro del campo de la biotecnología. La inmovilización de enzimas por unión covalente multipuntual es una de las técnicas más interesantes para inmovilizar y estabilizar enzimas. Mediante la inmovilización utilizando estos métodos se han obtenido en el pasado preparaciones inmovilizadas con grandes factores de estabilización (entre 100-1000000 tal como han sido descritos) (Mateo, C.; Palomo, J.M.; Fernández-Lorente, G.; Guisan, J.M.; Fernández-Lafuente, R. (2007). Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques” *Enzyme Microb. Technol.* 40, 1451-63). Teóricamente una molécula de enzima unida a un soporte rígido a través de muchos puntos, vía brazos espaciadores cortos, debe ser altamente estabilizada debido a que los residuos de aminoácido involucrados en estos procesos de inmovilización deben guardar inalteradas sus posiciones relativas durante los cambios conformacionales inducidos por diferentes agentes inactivantes (calor, disolventes, etc). De este modo los cambios conformacionales deben de ser muy atenuados (Pedroche *et al.* Effect of the support and experimental conditions in the intensity of the multipoint covalent attachment of proteins on glyoxyl-agarose supports. Correlation between enzyme-support linkages and thermal stability. *Enzyme Microb. Technol.* 40, 1160-1166; 2007).

Para conseguir este tipo de inmovilizaciones los soportes glioxil podrían ser muy adecuados debido a que tienen muy alta reactividad con grupos aminos no ionizados de las proteínas, presentan muy bajos impedimentos estéricos en la reacción de los grupos amino de la proteína con los glioxil del soporte, los grupos glioxil son muy estables lo que permite tiempos de contacto enzima-soporte así como almacenamientos prolongados de los mismos y además la reducción final de las iminas formadas utilizando borohidruro de sodio produce aminos secundarios muy estables y los grupos aldehído remanentes son transformados en grupos hidroxilo inertes.

Sin embargo, los soportes glioxil en general no son capaces de inmovilizar proteínas a pH neutro debido a que el equilibrio de la reacción de formación de un solo enlace imina (bases de Schiff) entre la enzima y el soporte estaría desplazado hacia la forma disociada de la misma. La única excepción a esto es el caso de proteínas multiméricas que tengan expuestos en el mismo plano varios grupos amino con un pK bajo (aminos terminales) que a pH neutro estarían desprotonados y por tanto se podrían formar varias bases de Schiff simultáneamente. Este hecho que podría parecer aparentemente un problema, convierte a estos soportes en muy adecuados para inmovilizar enzimas a pH 10 debido a que la inmovilización debe ser producida simultáneamente a través de varios grupos amino de la enzima con lo que la enzima se inmoviliza a través de la zona más rica en lisinas produciéndose en general derivados inmovilizados muy estabilizados respecto a la enzima soluble (Grazu V, Betancor L, Montés T, López-Gallego F, Guisan JM, Fernández-Lafuente R. Glyoxyl agarose as a new chromatographic matrix. *Enzyme Microb Technol* 2006; 38:960-6).

Sin embargo, sería deseable tener soportes donde la unión pueda venir producida no sólo por la región de la proteína donde se puedan formar más enlaces (p.e. la región más rica en lisinas) sino por otras regiones que pudieran ser mucho más sensibles a agentes inactivantes u otras que fueran muy interesantes como aquellas cercanas al centro activo.

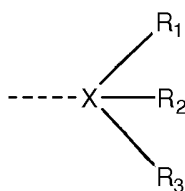
Por otro lado la inmovilización de enzimas sobre soportes glioxil implica en general la necesidad de incubar la enzima soluble con el soporte a pH alcalino, lo cual no siempre es posible debido a la baja estabilidad de muchas enzimas a estos pHs. Dentro de este contexto, la preparación de soportes que contengan grupos capaces de adsorber enzimas a pH neutro y vía diferentes mecanismos o grupos funcionales, conteniendo también una elevada densidad de grupos glioxil permitiría solucionar los problemas anteriormente expuestos.

Descripción de la invención

La presente invención proporciona soportes heterofuncionales que comprenden un soporte orgánico o inorgánico de base al que se le activan los grupos OH libres, silanoles, etc, para en un primer paso convertirlos en grupos epóxido que posteriormente se pueden convertir en grupos glioxil y grupos aniónicos, catiónicos o hidrofóbicos capaces de interactuar en condiciones suaves de pH con distintos grupos o regiones de proteínas, particularmente enzimas, y así conseguir complejos soporte-proteína muy estables.

En un primer aspecto, la presente invención describe un soporte que contiene grupos activados que interactúan con grupos presentes en las proteínas, donde dichos grupos activados son grupos glioxil y grupos de fórmula (I)

65



Fórmula (I)

donde

X se selecciona entre N o S,

R₁, R₂ y R₃ se seleccionan independientemente entre hidrógeno, alquilo C₁-C₁₅ sustituido o no sustituido o arilo sustituido o no sustituido,

R₂ y R₃ pueden estar ausentes.

El término “alquilo” se refiere en la presente invención a cadenas alifáticas, lineales o ramificadas, que tienen de 1 a 15 átomos de carbono, por ejemplo, metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, tert-butilo, sec-butilo, n-pentilo, etc. Preferiblemente el grupo alquilo tiene entre 1 y 4 átomos de carbono. Los radicales alquilo pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes tales como halógeno, hidroxilo, azida, ácido carboxílico o un grupo sustituido o no sustituido seleccionado de entre amino, amido, éster carboxílico, éter, tiol, acilamino o carboxamido, alcóxido, tiol, amino, acilamino, ciano, carboxilato, carboxamida, carboxiéster, arilo o heteroarilo o combinaciones de estos grupos.

El término “arilo” se refiere en la presente invención a una cadena carbocíclica aromática, que tiene de 6 a 12 átomos de carbono, pudiendo ser de anillo único ó múltiple, en este último caso con anillos separados y/o condensados. Un ejemplo, no limitante, de arilo es un grupo fenilo.

En una realización preferida, el soporte se selecciona entre agarosa, resinas acrílicas o zeolitas. En la presente invención se entiende como soporte base un sólido de naturaleza orgánica o inorgánica que posee grupos susceptibles de ser modificados químicamente y aumentar así su capacidad de interaccionar mediante fuerzas de Van der Waals, enlaces iónicos o covalentes con grupos presentes en aminoácidos, tales como Lys, Arg etc. Otros ejemplos de posibles soportes base son nanopartículas magnéticas.

En una realización preferida, X es N.

En otra realización preferida, R₁, R₂ y R₃ son independientemente grupos alquilo C₁-C₆, más preferiblemente R₁, R₂ y R₃ son independientemente grupos alquilo C₁-C₆ lineales no sustituidos y aún más preferiblemente R₁, R₂ y R₃ son etilo.

En otra realización preferida, R₁ es hidrógeno y R₂ y R₃ son alquilo C₁-C₆ sustituido con un grupo COOH en el carbono terminal. Más preferiblemente, R₂ y R₃ son un grupo acetato.

En una realización aún más preferida, los grupos -COOH están unidos a un átomo metálico con capacidad quelante, preferiblemente Cu o Ni.

En otra realización preferida, R₁ es un grupo arilo sustituido o no sustituido y R₂ y R₃ son H. Más preferiblemente R₁ es un grupo fenil boronato.

En otra realización preferida, X es S.

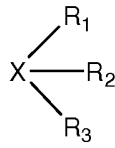
En otra realización preferida, R₁ es un alquilo C₁-C₁₅ sustituido o sin sustituir. Más preferiblemente, R₁ es undecanol.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de un soporte descrito anteriormente que comprende las siguientes etapas:

a) Reacción del soporte base con un epóxido en medio reductor,

ES 2 374 236 A1

b) Modificación del soporte obtenido en la etapa (a) con un grupo de fórmula (II)



Fórmula (II)

donde X, R₁, R₂ y R₃ se definen como anteriormente,

c) oxidación del soporte modificado obtenido en la etapa (b).

En una realización preferida, la reacción de la etapa (a) se lleva a cabo con un epóxido halogenado bifuncional, preferiblemente epiclorhidrina o epibromhidrina.

El medio reductor empleado en la etapa a puede ser cualquiera de los conocidos en el estado de la técnica como por ejemplo, pero sin limitarse a borhidruro sódico en hidróxido sódico.

En otra realización preferida, la oxidación de la etapa (c) se lleva a cabo con periodato de sodio.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de un soporte según descrito anteriormente para la inmovilización de proteínas, preferiblemente enzimas.

Otro aspecto adicional de la presente invención se refiere a un procedimiento de inmovilización de proteínas que comprende:

- a) una primera incubación a pH neutro del soporte según descrito anteriormente y la proteína a inmovilizar.
- b) una segunda incubación a pH alcalino.

Preferiblemente, este procedimiento se lleva a cabo a un pH comprendido entre 5 y 8 y a una temperatura entre los 5 y 25°C.

En una realización preferida, el procedimiento descrito además comprende una etapa final de reducción del soporte con las proteínas inmovilizadas.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un complejo que comprende el soporte según descrito anteriormente con una proteína inmovilizada y al uso de dicho complejo como catalizador.

Los soportes descritos en la presente invención inmovilizan las proteínas vía un mecanismo en dos etapas: en una primera se produciría la adsorción de la enzima sobre los soportes a pH neutro y en condiciones de reacción muy suaves y en una segunda etapa se produciría la incubación a pH alcalino de manera que se produzca la reacción entre los grupos aldehído del soporte y las lisinas de la enzima de interés.

Los soportes de la presente invención presentan la ventaja de, por un lado, no necesitar la incubación a pH alcalino para promover el proceso de inmovilización y por otro lado permitir dirigir la unión proteína-soporte a través de diferentes regiones de su superficie y no sólo la región más rica en lisinas. Posteriormente y en un segundo paso, estos soportes permitirían que mediante la incubación a pH alcalino de la proteína previamente adsorbida sobre los soportes, promover la unión covalente multipuntual más o menos intensa entre los grupos aldehído del soporte y las lisinas de la región de la proteína involucrada en el proceso de adsorción.

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.

Descripción de las figuras

Figura 1: Esquema de obtención de diferentes soportes glioxil multifuncionales según la presente invención.

5 Figura 2: Muestra la inmovilización de BTL en diferentes soportes glioxil heterofuncionales. Los experimentos se hicieron a pH 7 tal y como se ha descrito en métodos. (◆) Glioxil-Cu agarosa; (■) boronato glioxil agarosa; (▲) amino-glioxil agarosa; (□) carboxi-glioxil agarosa; (●) monofuncional glioxil agarosa; (○) amino-glioxil agarosa en presencia de 1 M NaCl.

10 Figura 3: Muestra la estabilidad de los diferentes derivados inmovilizados de BTL. Los derivados fueron incubados a 70°C. (■) BTL inmovilizada en soportes amino con los grupos glioxil previamente reducidos; (▲) BTL inmovilizada sobre soportes amino-glioxil a pH 8 durante 12 horas; (◆) BTL inmovilizada en soportes amino-glioxil a pH 8 e incubados durante 3 horas a pH 10.

15 Figura 4: Muestra la estabilidad de diferentes derivados de tanasa. A) La inactivación se hizo en fosfato de sodio 25 mM a pH 7 y 55°C. B) La inactivación se hizo a 25°C en fosfato de sodio 25 mM y 30% de metanol a pH 7. (◆) Derivados inmovilizados sobre CNBr; (▲) derivados inmovilizados en soportes glioxil-monofuncionales; (■) derivados inmovilizados en amino-glioxil soportes.

20 Figura 5: Muestra la estabilidad de diferentes derivados inmovilizados de quimotripsina. La inactivación se realizó incubando los diferentes derivados en fosfato de sodio 25 mM a pH 7 y 70°C. (◆) agarosa glioxil-Cu; (■) agarosa boronato-glioxil; (▲) agarosa amino-glioxil; (●) agarosa glioxil monofuncional; (○) enzima soluble.

25 Ejemplos

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la especificidad y efectividad del soporte descrito en la presente invención.

30

1. Materiales y métodos**Materiales**

35 α -quimotripsina tipo II de páncreas bovino fue comprada a Sigma Chem. Co., lipase de *Bacillus thermocatenolatus* (BTL2) fue expresada en *E. coli* y producida como está descrito (Palomo *et al.*, 2003); tanasa de extracto de *L. plantarum* CECT 748T (ATCC 14917, DSMZ 20174) aislado de encurtido de repollo fue obtenido de la colección de cultivos Española. Este extracto fue seleccionado basándose en la alta actividad tanasa previamente descrita. (Nishitani and Osawa, 2003; Nishitani *et al.*, 2004; Vaquero *et al.*, 2004). Agarosa 10BCL fue comprada a Agarose Bead Technologies; epiclorigidrina, ácido iminodiacético, ácido *p*-aminofenilborónico, trietilamina, mercaptoetanol y periodado de sodio fueron comprados en Sigma Chem. Co. El resto de reactivos fueron siempre de grado analítico.

40

Métodos

45

a) Activación de los soportes: (esquema 1)

50 **Activación de la agarosa con grupos epóxido:** para ello 10 g de agarosa 10 BCL fueron suspendidos en 44 ml de agua, 16 mL de acetona, 3.28 g de NaOH, 0.2 g de NaBH₄ y 11 mL de epiclorigidrina. Finalmente la suspensión se dejó agitando suavemente durante 16 horas tras las cuales se lavó con abundante agua.

50

Modificación de los soportes de agarosa con diferentes grupos reactivos: los soportes epóxido agarosa fueron modificados con diferentes compuestos durante 24 horas. En todos los casos la razón reactivo/soporte fue (1/10) (P/V).

55

- Soportes catiónicos: agarosa-epóxido fue modificada con 1 M trietilamina en 50% agua/acetona a pH 12 y 25°C.
- Soportes aniónicos: la agarosa-epóxido fue tratada con 0.5 M de ácido iminodiacético a pH 11 y 25°C.
- Soportes quelato metálicos: para ello los soportes aniónicos fueron tratados con una solución de diferentes metales (30 mg/mL en agua de sales de diferentes metales. Ej. Sulfato de cobre) durante 1 hora.
- Soportes boronato: en este caso la agarosa fue modificada con 5% de ácido *p*-aminofenil borónico disuelto en 20% de dioxanos a pH 11 y 25°C.
- Soportes monofuncionales: los soportes agarosa-epóxido fueron bloqueados con 5% mercaptoetanol a pH 8.7 durante 16 horas.

60

65

ES 2 374 236 A1

- Soportes hidrofóbicos: 10 g de los soportes agarosa-epóxido fueron tratados con 1 g de mercapto-undecanol previamente disuelto en 20 mL de bicarbonato 100 mM y 30 mL de dioxanos a pH 9.5 y 25°C.

Las características de los soportes preparados se describen en la siguiente tabla:

TABLA 1

Tipo de soporte	pH de inmovilización	Posible orientación de la enzima
Glioxil monofuncional	10.0	Región mas rica en lisinas
Glioxil monofuncional + tioles	7.0-8.0	Región con el amino más reactivo
Amino ionizado-glioxil	7.0	Región con carga neta más negativa
Quelato -glioxil	7.0	Región más rica en histidinas
Carboxilo-glioxil	7.0	Región con carga neta mas positiva
Boronato-glioxil	7.0	Región con mayor afinidad al boronato
Hidrofóbico-glioxil	7.0	Región más rica en aminoácidos hidrofóbicos

Finalmente los soportes fueron oxidados con periodato de sodio según está descrito (Guisan, 1988). Una vez lavados los soportes los grupos aldehído fueron valorados usando ioduro de potasio como fue descrito (Nevel, 1963).

b) Ensayos enzimáticos

Actividad de la BTL. el ensayo se hace midiendo el incremento de absorbancia a 348 nm provocado por la producción de *p*-nitrofenol en la hidrólisis de 0.4 mM *p*NPB en 25 mM de fosfato de sodio a pH 7 y 25°C. Para ello se utilizó un espectro termostatzado con agitación magnética. Para iniciar la reacción, 0.05 mL de lipasa soluble o inmovilizada fue adicionada a 2.5 mL de una solución del sustrato. La cantidad de enzima utilizada para los ensayos dio un incremento máximo de absorbancia por minuto de 0.15. Una unidad internacional de actividad *p*NPB es definida como la cantidad necesaria de enzima para hidrolizar 1 μ mol de *p*NPB/min (IU) en las condiciones descritas anteriormente.

TABLA 2

Estudio de la inmovilización de BTL en soportes amino-glioxi

	30 min, pH 7.0	2 h, pH 7.0	12 h, pH 8.0
Porcentaje Inmovilizado	80	100	100
Porcentaje del inmovilizado desorbido 1 M NaCl	80	50	10

Test de actividad tanasa: la actividad esterase de la tanasa fue determinada usando el ensayo de la rodamina específico para ácido gálico (Inoue and Hagerman, 1988). La rodamina reacciona solamente con ácido gálico y no con ésteres del mismo o con otros fenoles. Así pues, los galotaninos fueron medidos por la cantidad de ácido gálico producido tras la hidrólisis de taninos. El análisis de ácido gálico de las reacciones fue hecho utilizando el siguiente ensayo. Se extrajeron alícuotas de 100 μ l que fueron incubadas en 100 μ l de metal galato 25 mM en tampon fosfato (50

ES 2 374 236 A1

mM, pH 6.5) durante 10 min a 37°C. Tras esta incubación, 150 μ l de una solución de rodamina en metanol (0.667% P/V rhodamine en 100% metanol) fue añadida a la mezcla. Después de 5 min de incubación a 30°C, 100 μ l de 500 mM KOH fueron añadidos y la mezcla se diluyó hasta 900 μ l con agua destilada. Tras una incubación adicional de 5-10 min, se midió la absorbancia a 520 nm utilizando un espectrofotómetro. Para cuantificar se prepare una curva patrón utilizando diferentes concentraciones de ácido gálico (de 0.125 a 1 mM). Una unidad de actividad TANASA es definida como la cantidad de enzima necesaria para producir 1 μ mol de ácido gálico por minuto en las condiciones de reacciones descritas anteriormente.

Ensayo de quimotripsina: la actividad fue medida valorando a 405 nm y 25°C el incremento de absorbancia causado por la producción de p-nitrofenol causada durante la hidrólisis promovida durante la reacción enzimática de 0.3 mM de *N*-Benzoil-*L*-tirosina *p*-nitroanilida (BTNA) disuelta en fosfato 50 mM en presencia de 40% de etanol, a pH 7. Una unidad internacional de actividad BTNA es definida como la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar 1 μ mol de BTNA/min (IU) en las condiciones descritas anteriormente.

15

c) Inmovilización de las enzimas

1 g de soporte (iónico, boronato o quelato metálico) fue suspendido en 10 mL de soluciones de las diferentes enzimas (la máxima actividad enzimática fue de 1 IU/mL) en fosfato de sodio a pH 7, utilizando diferentes concentraciones de tampón (desde 5 mM para los soportes iónicos, 50 mM cuando se inmovilizó sobre soportes boronato o metal quelato y 1 M cuando se inmovilizó sobre soportes hidrofóbicos a 20°C. Periódicamente, se tomaron alícuotas de los sobrenadantes y de las suspensiones, valorándose la actividad enzimática. Tras finalizar los procesos de inmovilización los derivados fueron secados a vacío y resuspendidos en 10 mL de bicarbonato de sodio (5 mM para los soportes iónicos, 50 mM para los otros soportes y 1 M para los hidrofóbicos) a pH 10 durante 3 horas (cuando se utilizaron soportes no oxidados con periodato no se hizo este tratamiento a pH alcalino), finalmente los derivados fueron reducidos mediante la adición de 10 mg de borohidruro de sodio. Estas suspensiones se dejaron en agitación suave durante 30 minutos tras los cuales se lavaron con agua.

Cuando se utilizaron soportes monofuncionales la inmovilización se realizó en bicarbonato de sodio 50 mM a pH 10 durante un mínimo de 3 horas y finalmente fueron reducidos utilizando 1 mg/mL de borohidruro de sodio.

30

TABLA 3

Inmovilización de BTL en diferentes soportes glioxil

35

Soporte	BTL inmovilizada, %	Actividad, %	Actividad después de la incubación a pH 10, %
Cu-CHO	94	21	11
Amina-CHO	100	90	90
Monofuncional CHO	100	20	20
Boronato-CHO	95	71	67

40

45

50

d) Enantioselectividad

55

La asimetría de diferentes derivados de la enzima BTL fue medida utilizando butirato de mandélico como sustrato (Palomo *et al*, 2003). Para ello 0.5 g de los diferentes derivados inmovilizados fueron añadidos a 3 ml de 1 mM del sustrato disuelto en fosfato de sodio 25 mM a pH 7 y 25°C y entonces la suspensión se dejó en agitación suave. Durante la reacción, el valor de pH fue mantenido constante mediante titración automática utilizando un pH-estato. Se realizaron experimentos de control utilizando suspensiones de los diferentes soportes sin enzima.

60

El grado de hidrólisis fue seguida por HPLC de fase reversa (Spectra Physics SP 100 acoplado con un detector UV de Spectra Physics SP 8450). Se utilizó una columna Kromasil C18 (25 cm \times 0.4 cm). Esta columna fue suministrada por la empresa Análisis Vínicos (España). Los experimentos se realizaron por triplicado y el error experimental estuvo por debajo del 3%. La elución se hizo utilizando una fase móvil compuesta de acetonitrilo (35%) y 10 mM de fosfato de amonio (65%) a pH 2.95 y con un flujo de 1.5 ml/min. La elución fue monitorizada midiendo la absorbancia a 225 nm. El tiempo de retención del ácido fue de 3.7 min y el del éster fue de 23 min.

65

ES 2 374 236 A1

A diferentes conversiones se midió el exceso enantiomérico (ee) del ácido producido. Esto fue medido por HPLC quiral en fase reversa. La columna utilizada fue una Chiracel OD-R y la fase móvil fue una mezcla isocrática de 5% de acetonitrilo y 95% de 0.5 M de NaClO₄/HClO₄ a pH 2.3. El análisis fue hecho con un flujo de 0.5 ml/min y se midió la absorbancia a 225 nm. Los tiempos de retención para el isómero S fue de 39 min, mientras que el tiempo de retención del isómero R fue de 42 min. Un interés especial presentó el ee al 50% de hidrólisis (correspondiente al rendimiento máximo), el valor con más relevancia práctica. La asimetría fue medida como la relación de la velocidad de hidrólisis entre ambos enantiómeros.

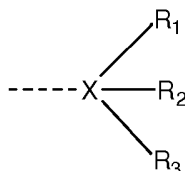
TABLA 4

Estudio de la enantioselectividad de los diferentes derivados de BTL. El estudio se realizó usando butirato de mandélico como sustrato tal y como está descrito en métodos

Preparación del inmovilizado	Actividad (UI/min)	Asimetría
Q-CHO BTL	0.0017	8
CHO-BTLmonofuncional	0.00075	2.5

REIVINDICACIONES

1. Soporte orgánico o inorgánico que comprende grupos activados que interaccionan con grupos presentes en las proteínas, donde dichos grupos activados son grupos glioxil y grupos de fórmula (I)



Fórmula (I)

donde

X se selecciona entre N o S,

R₁, R₂ y R₃ se seleccionan independientemente entre hidrógeno, alquilo C₁-C₁₅ sustituido o no sustituido o arilo sustituido o no sustituido,

R₂ y R₃ pueden estar ausentes.

2. Soporte según la reivindicación 1 que se selecciona entre agarosa, resinas acrílicas o zeolitas.

3. Soporte según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 donde X es N.

4. Soporte según la reivindicación 3 donde R₁, R₂ y R₃ son independientemente grupos alquilo C₁-C₆.

5. Soporte según la reivindicación 4 donde R₁, R₂ y R₃ son independientemente grupos alquilo C₁-C₆ lineales no sustituidos.

6. Soporte según la reivindicación 5 donde R₁, R₂ y R₃ son etilo.

7. Soporte según la reivindicación 3 donde R₁ es hidrógeno y R₂ y R₃ son alquilo C₁-C₆ sustituido con un grupo COOH en el carbono terminal.

8. Soporte según la reivindicación 7 donde R₂ y R₃ son un grupo acetato.

9. Soporte según cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8 donde los grupos -COOH están unidos a un átomo metálico.

10. Soporte según la reivindicación 9 donde el metal es Cu, Ni, Co o Zn.

11. Soporte según la reivindicación 3 donde R₁ es un grupo arilo sustituido o no sustituido y R₂ y R₃ son H.

12. Soporte según la reivindicación 11 donde R₁ es un grupo fenil boronato.

13. Soporte según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 donde X es S.

14. Soporte según la reivindicación 13 donde R₁ es un alquilo C₁-C₁₅ sustituido o sin sustituir.

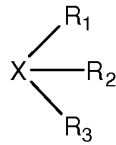
15. Soporte según la reivindicación 14 donde R₁ es undecanol.

16. Procedimiento de obtención de un soporte según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 que comprende las siguientes etapas:

a) Reacción del soporte base con un epóxido bifuncional en medio reductor,

ES 2 374 236 A1

b) Modificación del soporte obtenido en la etapa (a) con un grupo de fórmula (II)



Fórmula (II)

donde X, R₁, R₂ y R₃ se definen como en la reivindicación 1.

c) oxidación del soporte modificado obtenido en la etapa (b).

15 17. Procedimiento según la reivindicación 16 donde la reacción de la etapa (a) se lleva a cabo con un epóxido halogenado.

20 18. Procedimiento según la reivindicación 17 donde el epóxido halogenado es epiclorhidrina o epibromhidrina.

19. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18 donde la oxidación de la etapa (c) se lleva a cabo con periodato de sodio.

25 20. Uso de un soporte según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 para la inmovilización de proteínas.

21. Uso según la reivindicación 20 donde la proteína es una enzima.

22. Procedimiento de inmovilización de proteínas que comprende:

30 a) una primera incubación a pH neutro del soporte según las reivindicaciones 1 a 15 y la proteína a inmovilizar.

35 b) una segunda incubación a pH alcalino.

23. Procedimiento según la reivindicación 22 que se lleva a cabo a un pH comprendido entre 5 y 8.

40 24. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 22 ó 23 que se lleva a cabo a una temperatura entre los 5 y 25°C.

25. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 24 que además comprende una etapa final de reducción del soporte con las proteínas inmovilizadas.

45 26. Complejo que comprende el soporte según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 y una proteína inmovilizada.

27. Uso del complejo según la reivindicación 26 como catalizador.

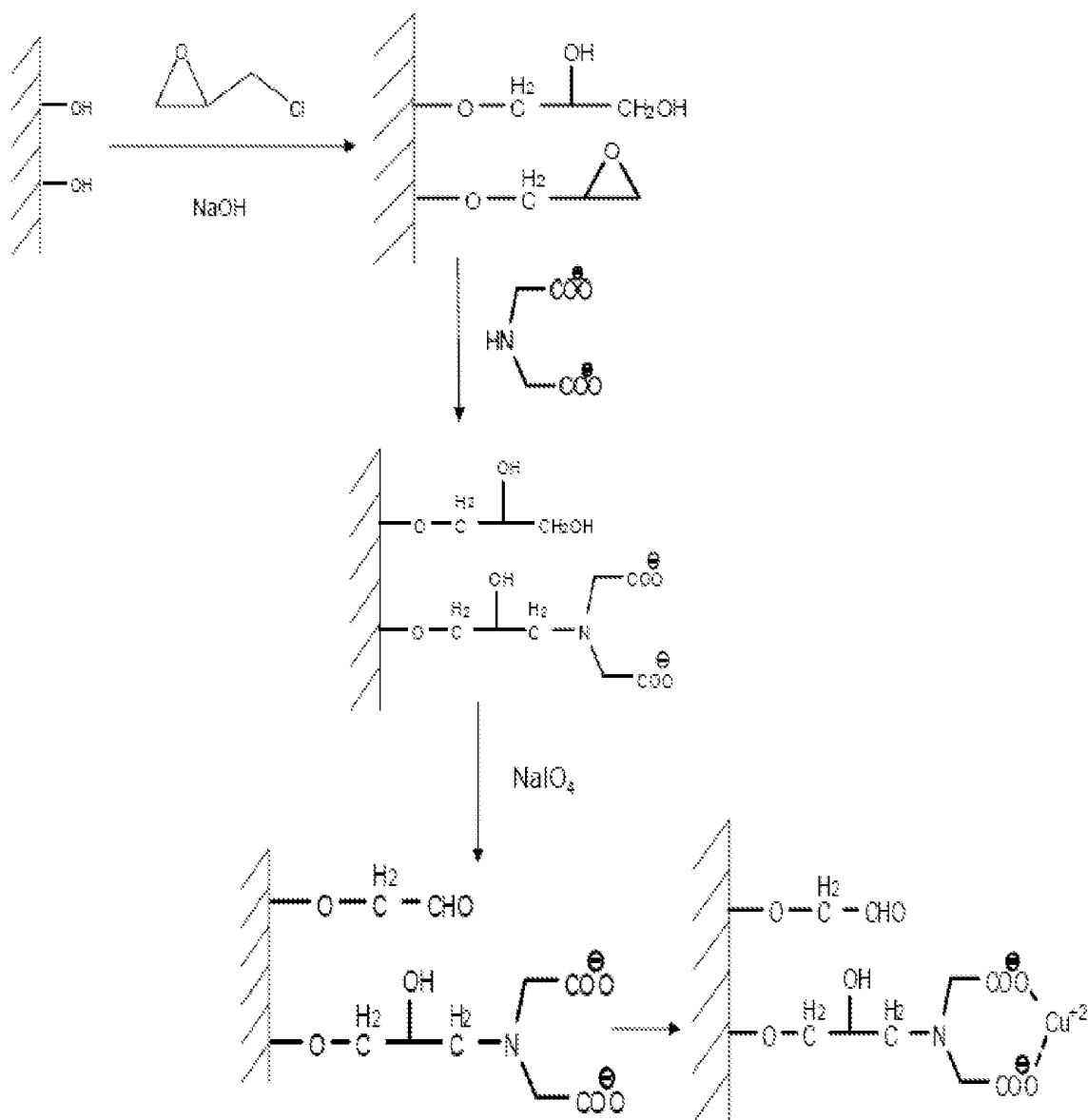


FIG. 1A

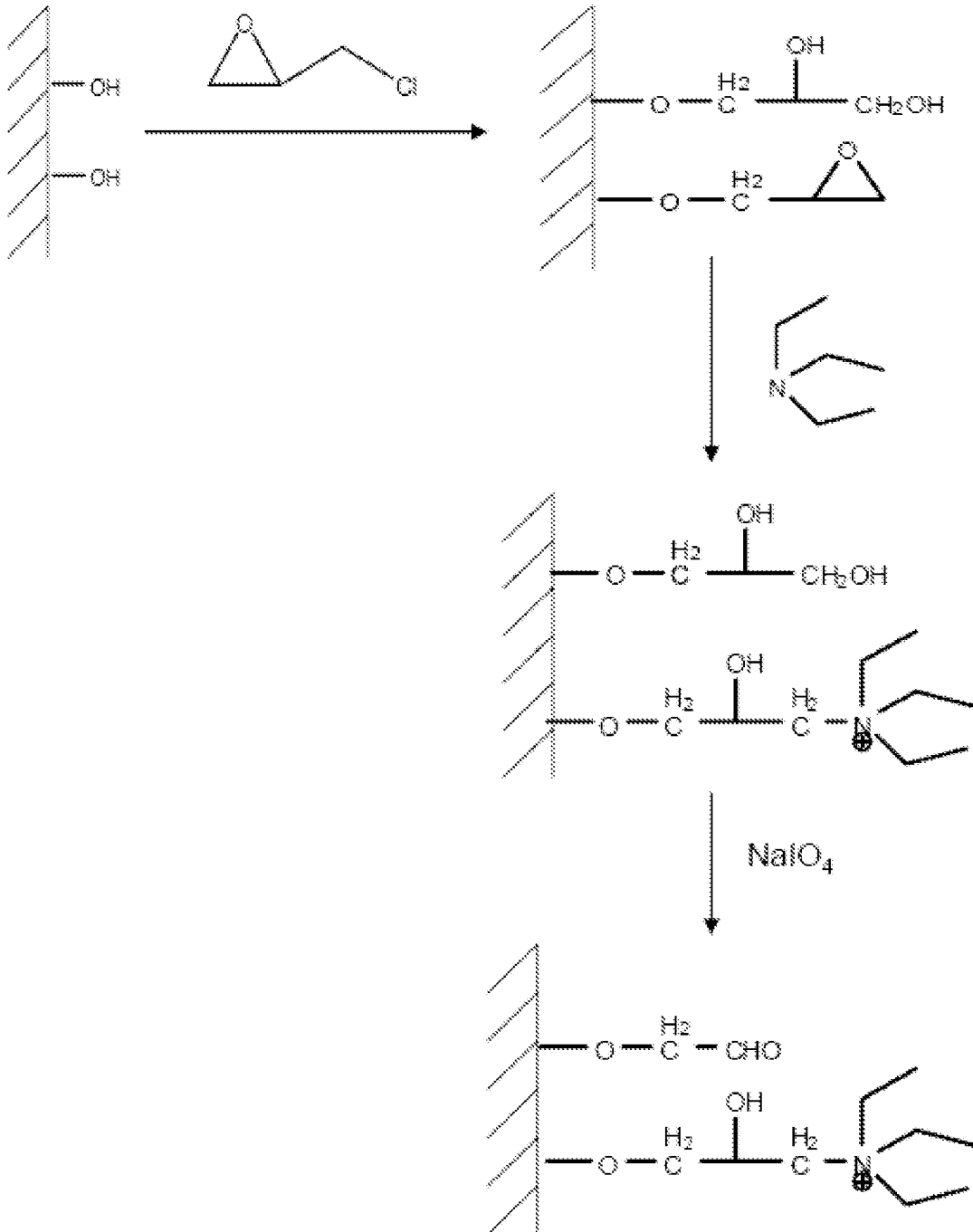


FIG. 1B

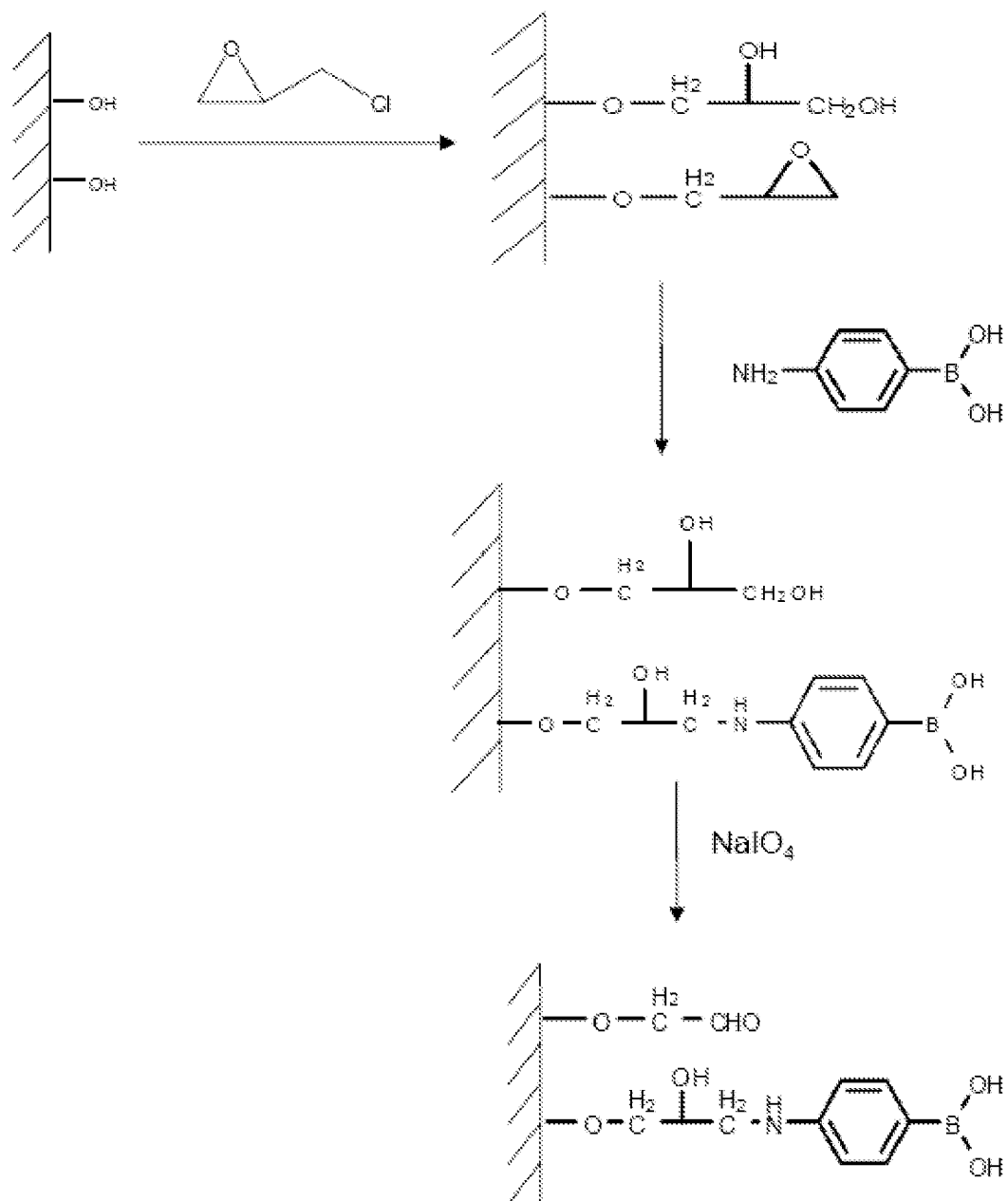


FIG. 1C

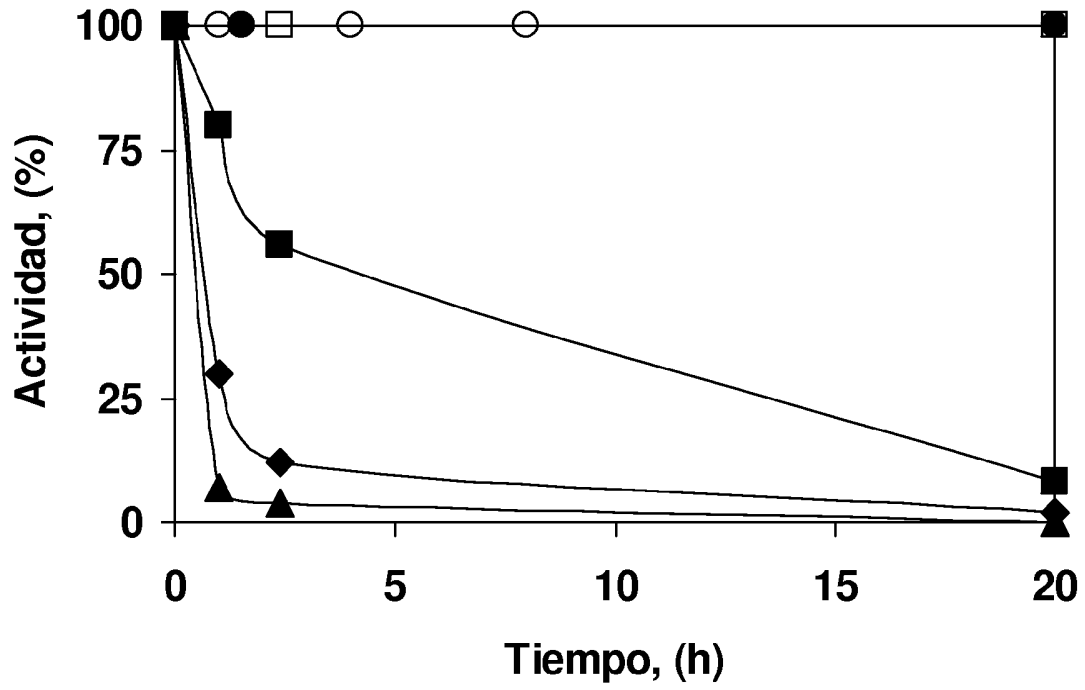


Fig. 2

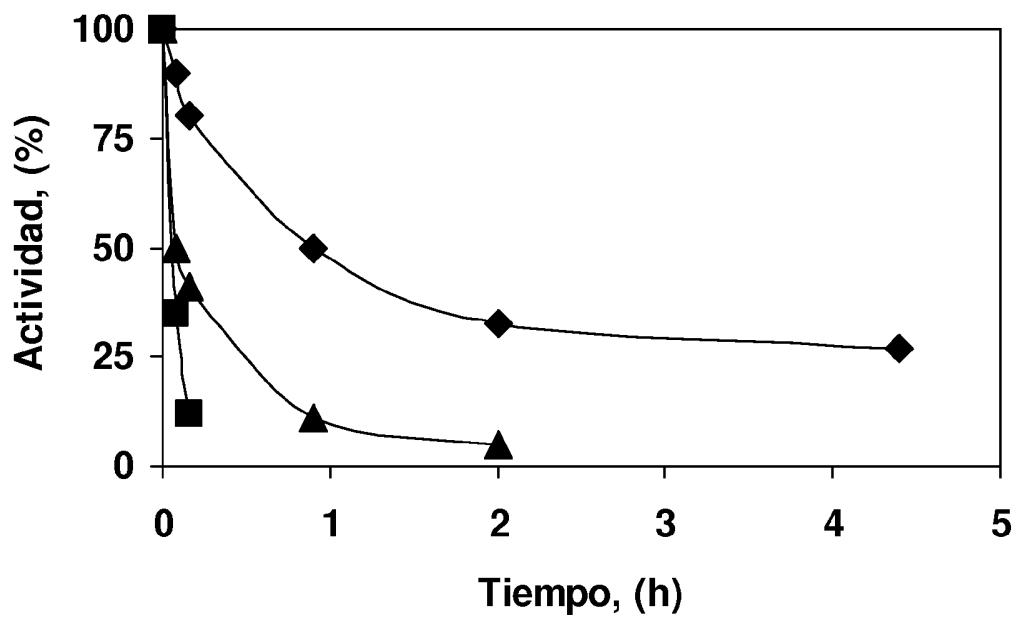


Fig. 3

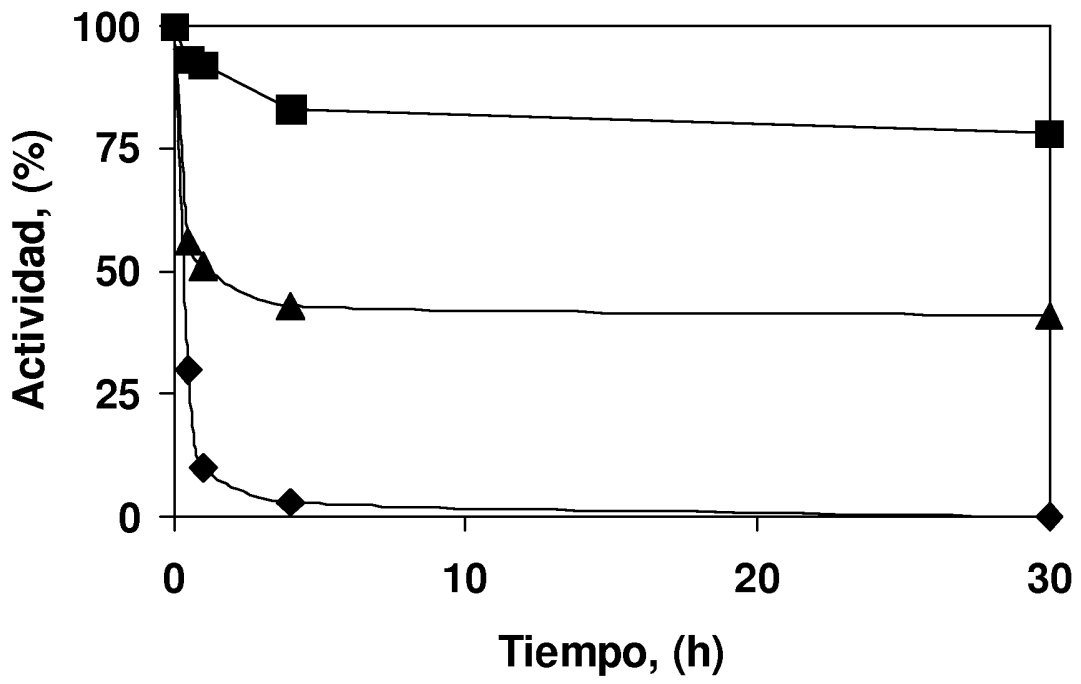


Fig. 4A

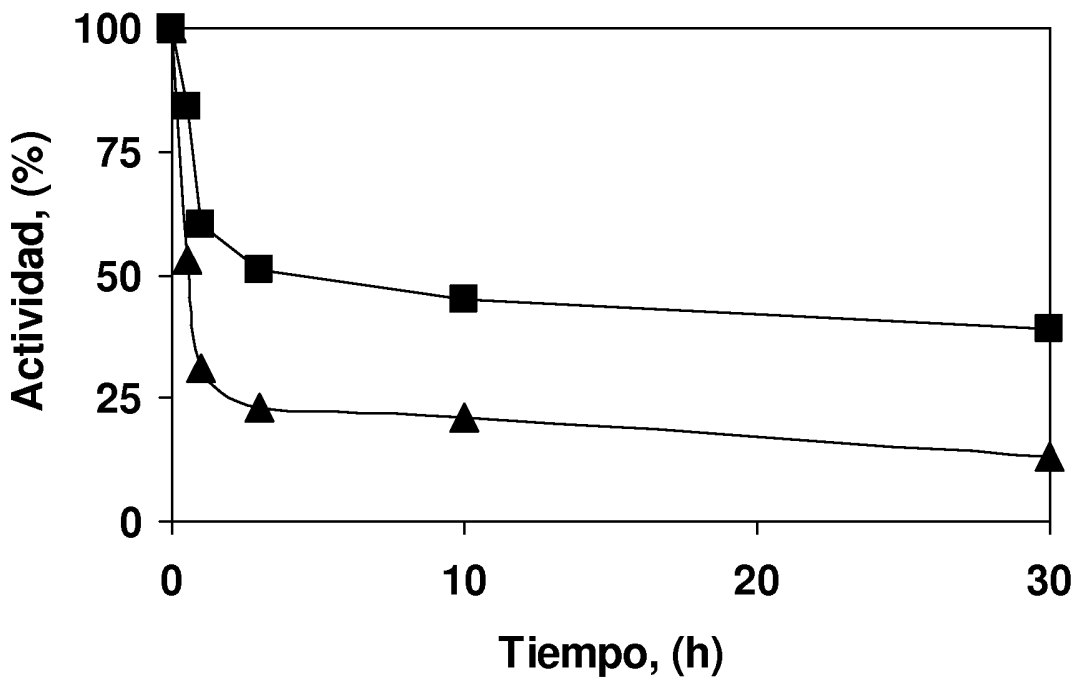


Fig. 4B

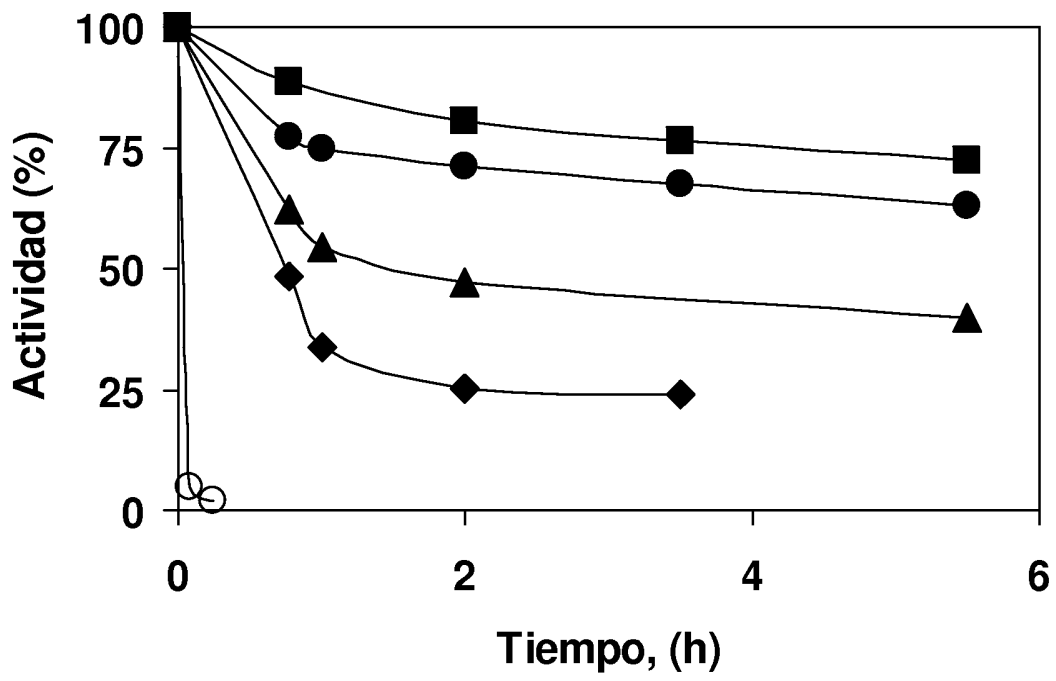


Fig. 5



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

21 N.º solicitud: 201030392

22 Fecha de presentación de la solicitud: 17.03.2010

32 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

5 Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	56 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	MATEO C et al. "Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques". Enzyme and Microbial Technology. 2007. Vol. 40, páginas 1451-1463, página 1451, resumen; página 1454, columna 1.	1-27
A	MATEO C et al. "Some special features of glyoxyl supports to immobilize proteins". Enzyme and Microbial Technology. 2005. Vol. 37, páginas 456-462, página 456, resumen.	1-27
A	MANRICH A et al. "Immobilization and Stabilization of Xylanase by Multipoint Covalent Attachment on Agarose and on Chitosan Supports". Appl. Biochem Biotechnol. 30.01.2010. Vol. 161, páginas 455-467, página 455, resumen; página 457, párrafo 1.	1-27
A	GRAZU V et al. "Glyoxyl agarose as a new chromatographic Matrix". Enzyme and Microbial Technology. 2006. Vol 38, páginas 960-966, página 960, resumen; página 965, columna 1.	1-27

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
27.01.2012

Examinador
M. D. García Grávalos

Página
1/5

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

G01N33/68 (2006.01)

C07K17/14 (2006.01)

C12N11/14 (2006.01)

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

G01N, C07K, C12N

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, NPL, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, USPTO PATENT DATABASE, JPO PATENT DATABASE, PUBMED, GOOGLE PATENTS, GOOGLE SCHOLAR.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 27.01.2012

Declaración**Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)**

Reivindicaciones 1-27
Reivindicaciones

SI
NO

Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)

Reivindicaciones 1-27
Reivindicaciones

SI
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	MATEO C et al. Enzyme and Microbial Technology. 2007. Vol. 40, páginas 1451-1463.	2007
D02	MATEO C et al. Enzyme and Microbial Technology. 2005. Vol. 37, páginas 456-462.	2005
D03	MANRICH A et al. Appl. Biochem Biotechnol. 30.01.2010. Vol. 161, páginas 455-467.	30.01.2010
D04	GRAZU V et al. Enzyme and Microbial Technology. 2006. Vol. 38, páginas 960-966.	2006

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

La presente solicitud divulga un soporte, orgánico o inorgánico, heterofuncional con grupos activados que interaccionan con grupos presentes en las proteínas para su inmovilización, mediante un mecanismo en dos etapas: la primera de adsorción de la enzima sobre los soportes a pH neutro en condiciones suaves de reacción; y la segunda etapa de incubación a pH alcalino reaccionando los grupos aldehído del soporte y las lisinas de la enzima de interés. La invención también se refiere a un procedimiento para la obtención de dicho soporte, a su uso para la inmovilización de proteínas, al complejo que comprende el soporte y la proteína inmovilizada y al uso de dicho complejo como catalizador (reivindicaciones 1-27).

El documento D01 se refiere a estrategias para mejorar las propiedades de las enzimas durante su inmovilización antes de su implementación a escala industrial. Para ello, selecciona las condiciones más adecuadas para la inmovilización de la enzima, y maximizar la unión covalente multipuntual. Se refiere al valor del pH como variable crítica, indicando que aunque en muchos casos la inmovilización se puede llevar a cabo a pH neutro, es conveniente la incubación a valores pH alcalinos donde la reactividad de grupos nucleófilos de la proteína (generalmente lisina) puede mejorar, para alcanzar una elevada reacción enzima-soporte (ver página 1451, resumen; página 1454, columna 1).

El documento D02 se refiere a un mecanismo único para los soportes glioxil agarosa para la inmovilización de proteínas mediante un enlace muy estable vía bases de Schiff reversibles. Los resultados obtenidos sugieren que cada enlace individual amino-glioxil es muy débil, por lo tanto la primera inmovilización de las proteínas en el soporte activado con grupos glioxil, en ausencia de reactivos reductores, necesita el establecimiento simultáneo de al menos dos uniones entre la proteína y el soporte. Este mecanismo promueve que las proteínas se inmovilicen por las áreas donde existe mayor densidad de restos de lisina explicando la alta estabilización de enzimas que tiene lugar utilizando este mecanismo de inmovilización. Dicha inmovilización tiene lugar únicamente a valores alcalinos de pH produciéndose caídas significantes de inmovilización al disminuir el valor del pH (ver página 456, resumen).

El documento D03 se refiere a la valoración de diferentes soportes (agarosa y quitosan) y agentes activantes (glicidol, glutaraldehído, epiclorhidrina y etilendiamina) en la inmovilización de xilanasas. La baja concentración de grupos lisina en la molécula de la enzima explica el bajo rendimiento en la inmovilización y estabilización obtenidas. Cuando la proteína es modificada químicamente con etilendiamina e inmovilizada en glioxil-agarosa, el nuevo derivado enzimático resulta 40 veces más estable con un rendimiento de inmovilización del 100%. Debido a que el pK del resto de Lisina es 10.5, la inmovilización tiene lugar a pH alcalino por lo que sólo las enzimas que pueden tolerar estos valores de pH pueden aprovechar ser inmovilizadas en glioxil agarosa (ver página 455, resumen; página 457, párrafo 1).

El documento D04 se refiere a un soporte glioxil agarosa utilizado como matriz cromatográfica basándose en la reversibilidad de cada enlace individual. Así mismo, describe una elevada selectividad y la posibilidad de eluir totalmente la proteína del soporte lo que hace que esta técnica sea viable para la purificación de proteínas (ver página 960, resumen; página 965, columna 1).

1. NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 6.1 y 8.1 LP 11/1986)

El objeto técnico de la invención es un soporte orgánico o inorgánico que comprende grupos activados que interaccionan con grupos presentes en las proteínas; su procedimiento de obtención; su uso para la inmovilización de proteínas; un procedimiento para la inmovilización de proteínas; un complejo que comprende dicho soporte y una proteína inmovilizada; y el uso de este complejo como catalizador.

1.1. REIVINDICACIONES 1-27

La inmovilización de proteínas para su uso a nivel industrial es conocida en el estado de la técnica, así como diversos tipos de soporte que se utilizan para conseguir esta inmovilización. Los documentos D01-D04 se refieren a diferentes soportes y métodos adecuados a este fin, sin embargo, el soporte heterofuncional reivindicado en la presente invención, difiere de los anteriores en la presencia de grupos activados que interaccionan con grupos de las proteínas para su inmovilización, mediante un mecanismo en dos etapas, adsorción de la enzima sobre los soportes a pH neutro en condiciones suaves de reacción, e incubación a pH alcalino reaccionando los grupos aldehído del soporte con las lisinas de la enzima de interés.

En consecuencia, según lo divulgado en los documentos D01-D04, las reivindicaciones 1-27 cumplen los requisitos de novedad y actividad inventiva (Art. 6.1 y Art. 8.1 LP 11/1986).