



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 994 176**

⑮ Int. Cl.:

**B01J 20/289** (2006.01)  
**B01J 20/30** (2006.01)  
**B01D 15/08** (2006.01)  
**C07K 1/16** (2006.01)

⑫

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2019 E 22194180 (0)**

⑯ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.10.2024 EP 4134157**

⑭ Título: **Uso de un sustrato con conectores de ligandos para la purificación**

⑯ Prioridad:

**17.12.2018 EP 18213244**

⑯ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**20.01.2025**

⑯ Titular/es:

**CHRETO APS (100.00%)  
Slotsmarken 18  
2970 Hørsholm, DK**

⑯ Inventor/es:

**KYHSE-ANDERSEN, JAN;  
WINther, LARS y  
RASMUSSEN, JERALD**

⑯ Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 994 176 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Uso de un sustrato con conectores de ligandos para la purificación

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a la cinética de receptor-ligando, a unas tasas de unión más elevadas y a una mayor capacidad de unión dinámica del receptor de interés a un sustrato funcionalizado, a sustratos funcionalizados,

10 a métodos para preparar dichos sustratos funcionalizados con conectores de ligandos y a la optimización de la longitud del conector de los mismos. Más específicamente, los sustratos funcionalizados con conectores de ligandos incluyen un sustrato sólido, que se ha modificado para proporcionar grupos de ligandos de unión unidos covalentemente a través de una longitud de conector, que se utilizan para aumentar la tasa de unión y la capacidad de unión dinámica del compuesto receptor de interés al sustrato.

15 **Antecedentes de la invención**

El aislamiento y la purificación de moléculas diana, tales como biomacromoléculas, son importantes para fines terapéuticos y en la investigación biomédica. El proceso general de purificación industrial con frecuencia incluye varias 20 procedimientos en unidades, tales como extracción, filtración, precipitación, así como cromatografía de intercambio aniónico y catiónico y purificación por afinidad.

La mayoría de las cromatografías de captura o purificación por afinidad actuales se realizan mediante técnicas de 25 columna convencionales basadas en resinas. Las resinas de cromatografía de esferas porosas tienen una alta proporción entre superficie y masa que portan grupos de ligandos de afinidad interactivos y, por lo tanto, se han utilizado en procesos de purificación por afinidad de proteínas. Estas técnicas consumen mucho tiempo y generan graves problemas de cuellos de botella en la purificación posterior, debido a tasas de unión que dependen del transporte masivo por difusión. Esto también limita la aplicabilidad de las técnicas de cromatografía en el cribado de alto rendimiento y para el procesamiento posterior rápido.

30 Las tecnologías basadas en filtros, membranas, nanofibras y nanopartículas, en especial en formato desechable, son cada vez más importantes en los procesos de fabricación de vacunas y biofármacos. Las membranas se han utilizado en la separación pasiva, basada en el tamaño molecular, y en la filtración activa.

35 Las membranas funcionalizadas que tienen propiedades de flujo de proceso mejoradas (incluidas las membranas funcionales que portan polímeros) generalmente han presentado unas capacidades de unión a biomateriales relativamente bajas, debido a la baja proporción entre superficie y masa, que, en general, han limitado su uso en determinados procesos de purificación a gran escala.

40 No obstante, las membranas y los filtros tienen un alto potencial de productividad (masa/volumen/tiempo del producto) debido a las posibles altas velocidades de flujo del proceso y al eficiente transporte de masa por convección. Hoy en día, las membranas y los filtros se utilizan principalmente en procesos de pulido para eliminar impurezas a niveles muy bajos en los flujos de productos. Estos materiales, membranas, filtros y resinas de esferas porosas podrían mejorarse aún más. Además, los materiales a base de esferas de resina podrían ser más económicos al optimizar la cinética de 45 unión dinámica entre el ligando y los receptores. Los procesos de membranas, filtros o esferas resultantes serán aún más rápidos y eficientes y permitirán conseguir procedimientos en unidades de purificación posteriores con una huella más pequeña, mayor capacidad, y proporcionar menos agua residual y menor consumo de líquidos tamponantes del proceso.

50 Se emplean ampliamente sustratos funcionalizados con ligandos convencionales, tales como membranas funcionalizadas con ligandos, para la separación y la purificación por afinidad de diversas moléculas diana. Por ejemplo, se pueden usar membranas funcionalizadas con ligandos para purificar o separar una molécula diana basándose en una interacción de afinidad o basándose en la formación de un enlace covalente.

55 El documento US 5 451 453 divulga sustratos que tienen superficies funcionalizadas con azlactona, sustratos de aductos y métodos de preparación de ambos.

El documento US 9 616 394 B2 divulga polímeros funcionalizados con ligandos de guanidinilo, métodos para fabricar los mismos, y sustratos que llevan un recubrimiento injertado con los polímeros funcionalizados con ligandos.

60 El documento US 9 650 470 B2 divulga sustratos funcionalizados con ligandos, métodos para preparar sustratos funcionalizados con ligandos, y métodos para usar sustratos funcionalizados.

El documento US 9 958 364 B2 divulga sustratos funcionalizados con ligandos con capacidad de unión mejorada.

65 El documento US 9 758 547 B2 divulga sustratos funcionalizados con ligandos, métodos para preparar sustratos

funcionalizados con ligandos, y métodos para usar sustratos funcionalizados.

El documento EP 2220107 B1 divulga un proceso para la purificación de una biomolécula diana, que comprende las etapas de: (a) poner en contacto (i) una biomolécula diana, (ii) un polipéptido de doble afinidad ("dual affinity polypeptide", DAP), y (iii) un sustrato sólido que comprende un ligando de captura; y (b) recuperar la biomolécula diana mediante elución, en donde la biomolécula diana y el polipéptido de doble afinidad se ponen en contacto en solución antes de que la mezcla entre en contacto con el sustrato sólido.

El documento WO 2010/128033 A2 divulga un proceso para la purificación de una molécula diana, que comprende las etapas de: (a) poner en contacto una molécula diana y una población de polipéptidos de unión a la diana ("target binding polypeptides", TBP) en solución durante un tiempo suficiente para permitir la formación de un complejo; y (b) aislar la diana del complejo de (a) mediante etapas de purificación posteriores, en donde (i) los polipéptidos de unión a la diana tienen al menos dos funcionalidades de unión; una primera funcionalidad de unión hacia la diana y una segunda funcionalidad de unión hacia un ligando de captura comprendido en un sustrato sólido; y (ii) la primera funcionalidad de unión comprende al menos dos sitios de unión para la diana, y la diana comprende al menos dos sitios de unión para el TBP.

Wang Y. et al., *Biotechnology Progress*, vol. 18, n.º 3, 7 de junio de 2002, divulga ligandos de afinidad para la purificación de proteínas.

El polipéptido de doble afinidad (DAP) descrito en el documento EP 2220107 B1 tiene la misma funcionalidad que los polipéptidos de unión a la diana (TBP) descritos en el documento WO 2010/128033 A2, y los dos términos DAP y TBP se usan en el presente documento indistintamente para describir el mismo compuesto.

Si bien existen varios sustratos funcionalizados con ligandos, existe una necesidad en la técnica de sustratos funcionalizados con conectores de ligandos mejores que puedan actuar a una alta tasa de unión y con una alta capacidad de unión dinámica para proporcionar un alto rendimiento del producto y, por lo tanto, una alta productividad para reducir la inversión en equipos de fabricación, los costes de funcionamiento y la huella ambiental.

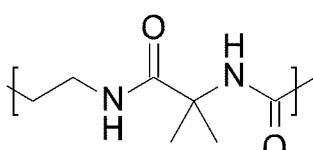
### 30 **Objeto de la invención**

Un objeto de las realizaciones de la invención es proporcionar un uso de un sustrato funcionalizado con conectores de ligandos para la purificación de una biomolécula diana que permita una velocidad de unión rápida al receptor (compuesto de interés) sin comprometer una alta capacidad de unión dinámica.

Los presentes inventores han descubierto que, al proporcionar un sustrato funcionalizado con ligandos en el que el ligando está unido al sustrato mediante un conector de una longitud específica y preferentemente una estructura no flexible, se puede obtener una capacidad de unión dinámica considerablemente mayor, así como una tasa de unión entre el ligando y un receptor de interés.

La invención se refiere a un uso como se define en las reivindicaciones.

De acuerdo con la invención, el conector comprende uno, dos o tres de los grupos definidos por:



### 50 **Leyendas de las figuras**

La figura 1 ilustra la estructura y la nomenclatura de los ligandos de afinidad de biotina conectora "largo", "intermedio" y "más corto" con amino terminal -NH2 (serie A), biotina-C10-NH2, biotina-C17-NH2 y Biotina-C24-NH2, y con -eno terminal (serie B), biotina-C10-eno, biotina-C17-eno, biotina-C24-ene.

La figura 2 ilustra la determinación de las diferentes longitudes de los conectores.

La figura 3 ilustra la composición del conector de biotina (etilendiamina EDA, alfa-metil alanina y beta-alanina).

La figura 4 ilustra la síntesis del biotina-C10-eno.

La figura 5 ilustra la síntesis de biotina-C10-NH2.

5 La figura 6 ilustra la vía de síntesis alternativa para la biotina-C10-NH2.

La figura 7 ilustra la síntesis de biotina-C17-eno.

La figura 8 ilustra la síntesis de biotina-C17-NH2.

10 10 La figura 9 ilustra la síntesis de biotina-C24-eno.

La figura 10 ilustra la síntesis de biotina-C24-NH2.

15 15 Figura 11. Medición de la capacidad de unión dinámica mediante el diagrama de Hanes (forma linealizada de la isoterma de Langmuir) para un sustrato sólido funcionalizado con biotina-C17. La ecuación de la línea de tendencia es  $y = 13,08x + 3,2307$ . La pendiente de la línea de tendencia es igual a la capacidad máxima de unión y es 13,08 mg DAP/TBP en 0,25 ml de sustrato sólido. Esto corresponde a un DBC de 52,3 mg/ml.

## 20 Divulgación detallada de la invención

### Definiciones

25 25 En el contexto actual, la longitud del conector se define por medio del número de enlaces, en donde los enlaces son enlaces C-C, C-N, C-N(H), C-C(O) y/o C-O. La figura 2 ilustra además cómo se determina el número de enlaces conectores. Cabe señalar que la biotina contiene, de forma natural, un conector lipófilo. El conector utilizado de acuerdo con la presente invención contiene grupos amida y parcialmente estéricamente impedidos, lo que impide que el conector sea completamente flexible.

30 30 Debe entenderse que un conector se refiere a una cadena de al menos 6 átomos de N, C, S u O que conectan el sustrato y el grupo funcional de ligando de la invención. Normalmente, el conector es una secuencia lineal de al menos 6 átomos de N, O o C, en donde la longitud del conector se define por medio de la cantidad total de enlaces en la secuencia lineal de átomos (véase la figura 2). Los enlaces pueden incluir C-C, C-N, C-N(H), C-C(O) y/o C-O.

35 35 Debe entenderse que la longitud práctica del conector depende de las longitudes reales de los enlaces químicos individuales, las funcionalidades circundantes, los ángulos, la flexibilidad rotacional y la conformación en el disolvente. Por ejemplo, los enlaces C-C, C-O y C(O)-N(H) promedio tienen aproximadamente 1,5, 1,4 y 1,3 Å, respectivamente. El enlace C-O puede girar parcialmente, mientras que el enlace amida no tiene tanta libertad para rotar.

40 40 La longitud del conector se define como el número de enlaces químicos en el conector, es decir, desde el grupo funcional de ligando, tal como biotina, al sustrato. Cabe señalar que también se cuenta el enlace terminal al sustrato. En consecuencia, cuando se cuenta la longitud de un conector, tal como se muestra en el presente documento, que tenga un terminal -eno, también se debe contar el enlace desde el átomo de carbono terminal al sustrato. Si el conector, tal como se muestra en este documento, tiene grupos amino terminales (-NH2), el enlace a estos grupos amino se contará como el último enlace. Hay que saber que la biotina tiene un conector C5 natural entre la estructura del anillo, los grupos ureido y tetrahidrotiifeno, y el grupo carboxilo.

45 45 El dominio de unión a biotina en las moléculas de avidina/estreptavidina está enterrado aproximadamente 9 Å por debajo de la superficie de la proteína. La presencia de grupos voluminosos en las proximidades del bolsillo de unión a biotina puede crear impedimentos estéricos y reducir la eficiencia de unión.

Debe entenderse que la funcionalidad y la longitud del conector están asociadas con la capacidad de unión dinámica y las velocidades de unión de las moléculas de DAP/TBP a la superficie.

55 55 Tal como se usa en el presente documento, un "polipéptido de doble afinidad" o "DAP" usado indistintamente con "polipéptidos de unión a la diana" o "TBP", se refiere a una proteína recombinante que comprende al menos un dominio de unión capaz de unirse a la biomolécula diana con la especificidad de unión deseada como se describe en el presente documento, así como a al menos un dominio de unión capaz de unirse al sustrato funcionalizado con ligandos según la invención. Las moléculas de DAP adecuadas se describen en el documento WO2009062942 y las moléculas de

60 60 TBP adecuadas se describen en el documento WO 2010/128033 A2. Incluyen, en una realización preferida, un monómero de estreptavidina fusionado en una proteína de fusión a cuatro dominios de unión a proteína A.

### Realizaciones específicas de la invención

65 65 La presente invención se refiere al uso de un sustrato funcionalizado con ligandos, comprendiendo dicho sustrato funcionalizado con ligandos: a) Un sustrato que tiene grupos carboxílico (-COOH), hidroxi (-OH), tio (-SH), amino (-

- NH<sub>2</sub>), dobles enlaces C-C (-eno) o triples enlaces C-C (-ino) en la superficie del mismo; b) Unido covalentemente a dichos grupos carboxílico (-COOH), hidroxi (-OH), tio (-SH), amino (-NH<sub>2</sub>), dobles enlaces C-C (-eno) o triples enlaces C-C (-ino) de dicho sustrato, un conector que tiene una longitud de conector de 10-25, tal como 17 -22 enlaces, en donde los enlaces son enlaces C-C, C-N, C-N(H), C-C(O) y/o C-O; y c) Un grupo funcional de ligando unido a la superficie del sustrato a través de dicho conector.
- En una realización del sustrato funcionalizado con ligandos según la invención, el sustrato es un sustrato sólido, tal como en forma de láminas, membranas, esferas, sillas de montar o granulados, tanto con superficies lisas como con grandes superficies interiores debido a la porosidad.
- Opcionalmente, en el sustrato funcionalizado con ligando de acuerdo con la invención, el sustrato es un sustrato sólido que puede recibir injertos mediante polimerización vinílica iniciada por radicales.
- En una realización del sustrato funcionalizado con ligandos según la invención, el sustrato se selecciona del grupo que consiste en agarosa, diatomita, gel de sílice, celulosa, éteres de celulosa, carboximetcelulosa, celulosa degenerada, agarosa o membranas a base de papel, nitrocelulosa, ésteres mixtos de nitrocelulosa, sílices y vidrios de porosidad controlada, poliamidas, polisulfona éter, poli(alcoholes vinílicos), policarbonato, poliuretano, poliéster sulfona, polisulfona, poli(tereftalato de etileno), poli(fluoruro de vinilideno), poliestireno o polipropileno, polietileno y copolímeros en bloque, mezclas y combinaciones de los mismos. En una realización, el sustrato está en forma de partículas, películas, telas tejidas o no tejidas, esponjas, fibras, láminas, esferas, filtros o una membrana. El sustrato utilizado según la invención suele ser poroso para aumentar la superficie y las propiedades óptimas de flujo de líquido y puede ser tanto orgánico como inorgánico, y también polimérico.
- Los métodos de síntesis de péptidos de alargamiento paso a paso mediante el acoplamiento paso a paso de aminoácidos protegidos u otros elementos básicos multifuncionales están bien descritos, por ejemplo, en la síntesis clásica de péptidos en fase sólida de Merrifield o en solución. Los diversos grupos de protección químoselectiva y ortogonal incluyen Boc, Fmoc, bencilo o t-but, entre otros. La formación de amida se realiza utilizando, por ejemplo, carbodiimidas, éster activo eficiente, HATU/HOAt o reacciones similares. Se puede consultar un resumen de los reactivos y métodos de SPPS, por ejemplo, en Merrifield, R. B. en *Peptides: "Synthesis, Structures and Applications"* (Gutte, B., ed.), Academic Press: San Diego, CA, 1995, págs. 93-168; o en Fernando Albericio (ed.), "Solid-Phase Synthesis: A Practical Guide", CRC Press 2000, y, más en general, para conjugación y entrecruzamiento en Shan S. Wong, "Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking", CRC Press, 1991.
- Además, es bien conocido el uso de 2-vinil-4,4-dimetilazlactona (VDMA) y derivados para alargar e injertar conectores. Por ejemplo, se describe en Jamie M. Messman *et al.*, *Macromolecules*, 2009, 42, 3933-3941, el documento US2016231208 y otras referencias citadas en el presente documento.
- De acuerdo con la invención, en el sustrato funcionalizado con ligandos, el grupo funcional de ligando es biotina.
- Los presentes inventores han descubierto sorprendentemente que la longitud y la naturaleza del conector tiene una clara influencia tanto en la capacidad de unión dinámica ("dynamic binding capacity", DBC) como en la velocidad de unión del uso resultante del mismo para unir una molécula receptora como, por ejemplo, un polipéptido de doble afinidad (DAP) o una proteína de unión a la diana (TBP) y retirarlo de modo eficiente de la solución, que es un requisito para la purificación de una biomolécula diana. El conector debe ser preferentemente semiflexible en agua a pH 4 para permitir una configuración estirada y, por lo tanto, una mayor eficiencia de unión. El conector entre el sustrato y el grupo funcional de ligando, tal como biotina, debe extenderse en agua, pero no ser completamente flexible ni tener libertad para girar o doblarse en todas direcciones.
- Además, los inventores han descubierto que la longitud óptima para llegar a un grupo funcional de ligando, que es un bolsillo de unión a biotina, requiere orientación para lograr la eficiencia de unión dinámica óptima. Las diversas optimizaciones de conectores descritas en la técnica anterior se suelen basar en el equilibrio en estado estacionario, en condiciones de unión estáticas o procedentes de experimentos con moléculas pequeñas o de cromatografía de intercambio aniónico y catiónico.
- El uso según la invención es para la purificación de una biomolécula diana, que comprende las etapas de: a) poner en contacto (i) una biomolécula diana, (ii) un polipéptido de doble afinidad (DAP), y (iii) un sustrato funcionalizado con ligandos según la invención, y (b) recuperar la biomolécula diana mediante elución, en donde que la biomolécula diana y el polipéptido de doble afinidad se ponen en contacto en solución antes de que la mezcla se ponga en contacto con el sustrato funcionalizado con ligandos.
- En algunas realizaciones, el método comprende una etapa de eliminación por lavado de impurezas, tales como proteínas de la célula hospedadora ("host cell proteins", HCP), ADN, virus, inmovilizar o retirar selectivamente el polipéptido de doble afinidad de la solución del producto diana.
- En una realización del mismo, la biomolécula diana es un anticuerpo.

Debe entenderse que el término anticuerpo, tal como se usa en el presente documento, puede referirse a cualquier molécula de inmunoglobulina, tal como una molécula de inmunoglobulina con afinidad de unión a la proteína A, tal como cualquier molécula de inmunoglobulina que comprenda una región Fc o una región Fab, tal como procedente de IgG de la familia de genes VH3 humanos.

5

### Ejemplos

Los siguientes ejemplos ilustran la presente invención. En resumen, se prepararon varios conectores según la invención y se midieron las capacidades de unión dinámica y las velocidades de unión.

10

Con más detalle, la biotina se funcionalizó con una amina. Mediante síntesis paso a paso utilizando VDMA, los conectores se construyeron con un grupo terminal acrílico o amina. Se utilizó el mismo método para sintetizar versiones más largas del conector. En una vía de síntesis alternativa, se sintetizaron conectores de diferentes longitudes utilizando acoplamientos de amida paso a paso, similares a los métodos SPPS.

15

Los diversos conectores se acoplaron o injertaron a los sustratos y se ensayaron para determinar la capacidad de unión dinámica y las tasas de unión. La capacidad dinámica y las tasas medidas dependieron de las longitudes de los conectores.

20

### Métodos analíticos

La cromatografía en columna rápida se realizó en un Teledyne ISCO, Combi Flash Rf+ Lumen utilizando columnas de alúmina básica RediSepRf o columnas de sílice SiliCycle SiliaSep.

25

La HPLC-MS analítica se realizó usando un cromatógrafo de líquidos/detector selectivo de masas ("Mass Selective Detector", DSM) Agilent Serie 1100 (cuadrupolo simple) equipado con una interfaz de electronebulización y un detector de matriz de diodos UV. Los análisis se realizaron con métodos que utilizan una columna ACE 3 C8 (3,0 x 50 mm) con un gradiente de acetonitrilo en TFA acuoso al 0,1 % durante 3 minutos y un flujo de 1 ml/min, o una columna Xbridge C18 (3,0 x 50 mm) con un gradiente de acetonitrilo en bicarbonato de amonio 10 mM durante 3 min y un flujo de 1 ml/min.

30

Los espectros de RMN intermedios se registraron en un Nanalysis NMReady 60e a 25 °C. Los espectros de RMN finales se registraron en un instrumento Bruker de 400 MHz a 25 °C utilizando D6-DMSO como disolvente y TMS como referencia. Se utilizaron nombres comerciales o nombres triviales para materiales y reactivos comerciales.

35

### EJEMPLO 1

#### Síntesis de biotina-C10-eno

40 A: Síntesis de biotina aminada: N-(2-aminoetil)-5-(2-oxo-1,3,3a,4,6,6a-hexahidrotieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanamida.

La biotina se sometió a reflujo (5 gramos, Aldrich) en metanol (100 ml) y TsOH (5 mg, Aldrich) durante la noche, luego se redujo el volumen de reacción mediante destilación suave al vacío en un evaporador rotatorio para producir un aceite transparente del éster metílico de biotina. Luego se añadieron 5 ml de 1,2-diaminoetano (Aldrich) en etanol (25 ml), la mezcla se agitó durante la noche y después se redujo mediante destilación suave al vacío en un evaporador rotatorio para producir un aceite semicristalino de color amarillo claro. La biotina aminada era pura según RMN-H, LC-MS y cromatografía en capa fina ("thin layer chromatography", TLC) y se usó sin más purificación para la adición de VDMA (2-vinil-4,4-dimetilazlactona, CAS n.º 29513-26-6) en agua en la siguiente etapa.

50

Véase la figura 3 que ilustra la posición del conector de biotina (etilendiamina EDA, alfa-metilalanina y beta-alanina).

B: A una solución de N-(2-aminoetil)-5-(2-oxo-1,3,3a,4,6,6a-hexahidrotieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanamida (1,0 g, 3,5 mmol) en agua (20 ml) se le añadió VDMA, 534 mg, 3,8 mmol). La reacción se agitó durante 5 min y luego se liofilizó.

55 El producto bruto (1,56 g) se purificó mediante cromatografía en columna de sílice (80 g de sílice, inyección líquida en metanol, DCM/MeOH, al 5 % 2 CV, del 5 al 20 % en 4 CV, del 20 al 60 % en 2 CV, al 60 % para 8 CV). Las fracciones reunidas se concentraron. El residuo se disolvió en agua y se liofilizó para producir **biotina-C10-eno** en forma de un sólido blanco (1,2 g, 2,8 mmol, rendimiento: 80 %). Espectro de masas [M+H] + 426 Da.

60

Véase la figura 4 que ilustra la síntesis de **biotina-C10-eno**.

El **biotina-C10-eno** se usó para el experimento de coinjerto iniciado por radicales sobre soportes sólidos, tales como membranas, mediante copolimerización con una acrilamida, y podría usarse para acoplar el biotina-C-10-eno a sustratos aminados mediante la adición de Michael al enlace vinílico terminal.

65

### EJEMPLO 2

**Síntesis de biotina-C10-NH<sub>2</sub>**

- 5 Al biotina-C10-eno (1,0 g, 2,3 mmol) se le añadió una solución 12 N de amoníaco en agua (12 M, 23 ml, 282 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 80 °C durante 3 h en un recipiente cerrado resistente a la presión. La solución se liofilizó para obtener 1,0 g de biotina-C10-NH<sub>2</sub>. El compuesto se caracterizó completamente por RMN-H, RMN-C y LCMS.

10 Véase la figura 5 que ilustra la síntesis de biotina-C10-NH<sub>2</sub>.

**EJEMPLO 3****Síntesis de biotina-C17-eno**

- 15 Se añadieron 415 mg (3,0 mmol) de VMDA a una solución de biotina-C10-NH<sub>2</sub>, sintetizada como en el ejemplo 2 (1,3 g, 2,9 mmol) en agua (20 ml). La reacción se agitó durante 5 min y luego se liofilizó. La solución bruta (1,61 g) se purificó mediante cromatografía en columna de sílice (columna de sílice de 80 g, inyección líquida en metanol, DCM/MeOH al 5 % 2 CV, del 5 al 20 % en 3 CV, del 20 al 60 % en 3 CV, al 60 % 8 VC). Las fracciones que contenían el producto y el VDMA hidrolizado se reunieron y se concentraron mediante destilación suave al vacío en un evaporador rotatorio. El material se purificó aún más mediante una cromatografía en columna de alúmina básica (columna básica de alúmina de 8 g, inyección de líquido en metanol, DCM/MeOH del 0 al 5 % en 8 CV). Las fracciones reunidas se concentraron mediante destilación suave al vacío en un evaporador rotatorio. El residuo se disolvió en agua y se liofilizó para producir biotina-C17-eno en forma de un sólido blanco (425 mg, 0,73 mmol, rendimiento: 32 %). Espectr. de masas [M+H]<sup>+</sup> 582 Da.

25 Véase la figura 7 que ilustra la síntesis de **biotina-C17-eno**.

30 El **biotina-C17-eno** se usó para el experimento de coinjerto iniciado por radicales sobre membranas mediante copolimerización con una acrilamida y se usó para el acoplamiento de biotina-C-17-eno a sustratos aminados mediante la adición de Michael al doble enlace vinílico terminal del biotina-C17-eno.

El conector también se usó en un ejemplo diferente para una extensión adicional con otra unidad VDMA, creando un derivado de conector aún más largo.

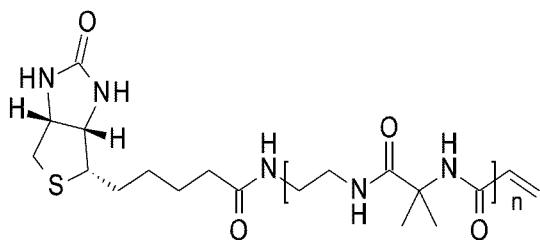
**EJEMPLO 4**

35 Este ejemplo ilustra la vía de síntesis de los conectores de biotina de diferentes longitudes (C-10, C-17 y C-24). Dos tipos de ligandos de afinidad (serie A: terminal NH<sub>2</sub> amino, y serie B: vinil -eno terminal) con diferente longitud de conector (C10, C17 y C24) se sintetizaron utilizando reacciones de acoplamiento de péptidos mediante HATU/DIPEA, y desprotección N-terminal de Fmoc y Boc con piperidina y HCl 2 M. Las etapas finales son el acoplamiento N-terminal de biotina como éster de N-hidroxisuccinimida (NHS) activo a las moléculas de conector peptídico y la desprotección final de N-Boc para la síntesis de las moléculas de conectores de biotina con amino N-terminal biotina-C10-NH<sub>2</sub>, biotina-C17-NH<sub>2</sub> y biotina-C-24-NH<sub>2</sub> (serie A).

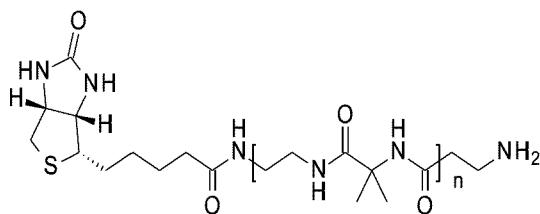
40 45 Las moléculas de conector de biotina biotina-C10-eno, biotina-C17-eno, biotina-C24-eno con grupos -eno terminales (serie B) se sintetizaron mediante el acoplamiento de 2-vinil-4,4-dimetilazlactona VDMA al grupo amino terminal de la biotina-EDA-NH<sub>2</sub>, biotina-C10-NH<sub>2</sub> y biotina-C17-NH<sub>2</sub> en agua para lograr una molécula de conector alargada C7.

50 55 El primer tipo, llamado biotina-C10-NH<sub>2</sub>, biotina-C17-NH<sub>2</sub> y biotina-C24-NH<sub>2</sub>, tienen un grupo amino terminal (serie A). El segundo tipo, llamado biotina-C10-eno, biotina-C17-eno y biotina-C24-eno, tienen un grupo vinil -eno terminal (serie B).

Para cada tipo a continuación, se requirieron tres compuestos con, respectivamente, n = 1, 2 y 3.

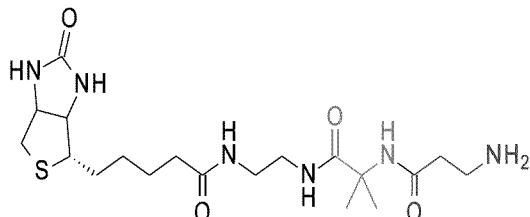


Biotina-C10-eno, biotina-C17-eno, biotina-C24-eno.



*Biotina-C10-NH<sub>2</sub>, biotina-C17-NH<sub>2</sub> y biotina-C24-NH<sub>2</sub>.*

- 5 El enfoque utilizó reacciones de acoplamiento de péptidos. La cadena del conector se compone de tres componentes diferentes: etilendiamina EDA y los dos aminoácidos:  $\alpha$ -metilalanina y  $\beta$ -alanina.



- 10 *La cadena del conector compuesta por etilendiamina EDA,  $\alpha$ -metilalanina  $\alpha$ -MeAla y  $\beta$ -alanina  $\beta$ -Ala.*

Como ejemplo, para la síntesis de la serie B, la figura 7 muestra la adición de 2-vinil-4,4-dimetilazlactona VDMA a biotina-C10-NH<sub>2</sub> para obtener el ligando de afinidad biotina-C17-eno alargado C7

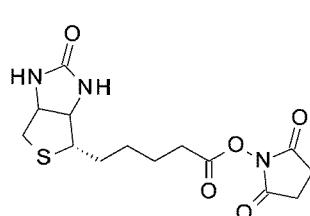
- 15 **Síntesis de la serie A con NH<sub>2</sub> terminal (biotina-C10-NH<sub>2</sub>, biotina-C17-NH<sub>2</sub> y biotina-C24-NH<sub>2</sub>)**

**Síntesis de los diferentes elementos básicos utilizados en la síntesis de conectores de serie A y serie B.**

**Fmoc-EDA-HCl**

- 20 A una solución de Fmoc-Cl (16,1 g, 62,4 mmol) en diclorometano (300 ml) enfriada con un baño de hielo se le añadió gota a gota una solución de N-(2-aminoethyl)carbamato de *terc*-butilo (Boc-EDA) (10,0 g, 62,4 mmol) en 20 ml de DCM. La reacción se agitó a temperatura ambiente. Después de 30 min, se formó un precipitado de color blanco. Se añadieron 10 ml de MeOH y la solución se volvió homogénea. La mezcla se lavó con agua (2 x 100 ml). La fase orgánica se secó sobre sulfato sódico, se filtró y se concentró. El sólido se lavó con éter dietílico y se secó al vacío para producir Fmoc-EDA-Boc (16,9 g, 44,2 mmol, rendimiento: 70,8 %). A una solución de Fmoc-EDA-Boc (4,00 g, 10,5 mmol) en 1,4-dioxano (50,0 ml) se le añadió una solución 4 M de HCl en 1,4-dioxano (4,00 M, 55 ml, 220 mmol). Se agitó la mezcla de reacción durante 1 hora. El sólido se filtró y se lavó con éter dietílico para producir Fmoc-EDA-HCl (3,5 g, 11,0 mmol, rendimiento: cuantitativo) en forma de un sólido blanco.

30 **Biotina-NHS**



- 35 A una solución de carbonato de N,N'-disuccinimidilo (12,7 g, 49,5 mmol) y biotina (11,0 g, 45,0 mmol) en N,N-dimetilformamida (50,0 ml) se le añadió trietilamina TEA (31,4 ml, 0,225 mol). La mezcla de reacción se agitó durante 16 horas. El sólido se filtró, se lavó con éter dietílico y se secó al vacío para producir biotina-NHS (11,2 g, 0,0328 mol, rendimiento: 72,9 %) en forma de un sólido blanco y se utilizó sin más purificación.

40 **Fmoc-EDA-MeAla-NH<sub>2</sub>-HCl y Fmoc-EDA-NH<sub>2</sub>-HCl**

A Fmoc-EDA-MeAla-NHBoc o Fmoc-EDA-NHBoc en 1,4-dioxano se le añadió una solución 4 M de HCl en 1,4-dioxano

(20 eq.). La mezcla de reacción se agitó durante 1 hora y después se concentró. El material bruto se usó sin más purificación.

**Procedimiento para el acoplamiento de Boc- $\alpha$ -metilalanina**

- 5 A una solución de Boc- $\alpha$ -metilalanina (1,2 eq.) y HATU (1,1 eq.) en acetonitrilo (concentración aproximadamente 0,15 M) se le añadió DIPEA (5 eq.). La mezcla se agitó durante 10 min. A esta mezcla se le añadieron los compuestos con amino N-terminal (1 eq.) y la solución resultante se agitó durante 30 min. Cuando el producto precipitó, el sólido se filtró, se lavó con éter dietílico y se secó al vacío. Por otra parte, la solución se diluyó con acetato de etilo, se lavó dos veces con una solución 0,5 M de HCl en agua, se lavó dos veces con agua y una vez con salmuera. Luego se secó la fase orgánica sobre sulfato de magnesio, se filtró y se concentró.
- 10

**Procedimiento para el acoplamiento de Boc- $\beta$ -alanina**

- 15 A una solución de Boc- $\beta$ -alanina (1,2 eq.) y HATU (1,1 eq.) en acetonitrilo (concentración aproximadamente 0,15 M) se le añadió DIPEA (5 eq.). La mezcla se agitó durante 10 min. A esta mezcla se le añadió el compuesto con amino N-terminal (1 eq.) y la solución resultante se agitó durante 30 min. Cuando el producto precipitó, el sólido se filtró, se lavó con éter dietílico y se secó al vacío. Por otra parte, la solución se diluyó con acetato de etilo, se lavó dos veces con una solución 0,5 M de HCl en agua, se lavó dos veces con agua y una vez con salmuera. Luego se secó la fase orgánica sobre sulfato de magnesio, se filtró y se concentró. En ambos casos, el material bruto se usó sin más purificación.
- 20

**NH<sub>2</sub>-EDA-NHBoc**

- 25 A Fmoc-etilendiamina-NHBoc se le añadió una solución al 20 % de piperidina en acetonitrilo. La mezcla de reacción se agitó durante 30 minutos y después se concentró. La solución se concentró y el producto bruto se secó durante 24 horas al vacío. El sólido se trituró tres veces con éter dietílico. El sólido se filtró, se lavó con éter dietílico y se secó al vacío. El material bruto se usó sin más purificación.

30 **Biotina-EDA-NHBoc**

- A una solución de NH<sub>2</sub>-etilendiamina-NHBoc en acetonitrilo y agua (concentración aproximadamente 0,1 M) se le añadió biotina-NHS (2 eq.). La mezcla de reacción se agitó durante 30 min y se controló por LCMS. Si fue necesario, se añadieron 0,5 eq. adicionales de biotina-NHS y la mezcla se agitó durante 1 hora. La mezcla se concentró en un rotavapor y se purificó mediante cromatografía en sílice (inyección de líquido en metanol; DCM 2 CV, DCM/MeOH del 0 al 60 % en 14 CV).
- 35

**Biotina-EDA-NH<sub>2</sub>-HCl**

- 40 A biotina-etilendiamina-NHBoc se le añadió una solución 2 M de HCl en agua. La mezcla de reacción se agitó durante toda la noche y se concentró. El material bruto se volvió a disolver en metanol y se concentró. El sólido se secó al vacío.

**Síntesis de la serie A con NH<sub>2</sub> terminal (biotina-C10-NH<sub>2</sub>, biotina-C17-NH<sub>2</sub> y biotina-C24-NH<sub>2</sub>)**

45 **Biotina-C10-NH<sub>2</sub>**

- Se sintetizó biotina-C10-NH<sub>2</sub> (Figura 5) mediante una serie de reacciones de acoplamiento de péptidos comenzando a partir del acoplamiento con HATU de Boc-MeAla y etilendiamina protegida con N-Fmoc Fmoc-EDA en acetonitrilo para formar FmocNH-EDA-MeAla-NHBoc. El grupo protector N-Boc terminal se retiró con HCl 2 M para obtener el grupo amino N-terminal Fmoc-EDA-MeAla-NH<sub>2</sub>. El Fmoc-EDA-MeAla-NH<sub>2</sub> se acopló a BocNH- $\beta$ -alanina para formar Fmoc-EDA-MeAla- $\beta$ -Ala-NHBoc. El grupo Fmoc terminal se retiró con piperidina al 20 % en acetonitrilo para formar el grupo amino terminal. Luego se acopló la biotina-NHS al NH<sub>2</sub>-EDA-MeAla- $\beta$ -Ala-NHBoc en acetonitrilo-agua a temperatura ambiente y, por último, el grupo NHBoc se retiró con HCl 2 M a temperatura ambiente para sintetizar biotina-C10-NH<sub>2</sub> con un grupo amino terminal. La vía de síntesis se describe en la figura 7. El compuesto biotina-C10-NH<sub>2</sub> se caracterizó completamente por RMN-H, RMN-C y LC-MS. El peso de la fórmula es 479,04, y la masa medida fue 478,21.
- 55

**Biotina-C17-NH<sub>2</sub>**

- 60 La síntesis de biotina-C17-NH<sub>2</sub> (figura 8) siguió las mismas reacciones de acoplamiento de péptidos con HATU/DIPEA, desprotección de Boc con HCl 2 M, desprotección de Fmoc con piperidina y biotinilación con biotina-NHS, tal como se describe para biotina-C10-NH<sub>2</sub>.

- 65 El grupo protector Boc de Fmoc-EDA-MeAla- $\beta$ -Ala-NHBoc (conector C-10) se retiró mediante tratamiento con HCl 2 M para formar Fmoc-EDA-MeAla- $\beta$ -Ala-NH<sub>2</sub>. Luego se acopló el grupo amino terminal a Boc-MeAla mediante

HATU/DIPEA en acetonitrilo. El grupo protector Boc terminal se retiró con HCl 2 M y luego se acopló a  $\beta$ -Ala-NHBoc mediante acoplamiento con HATU/DIPEA. Luego se retiró el grupo Fmoc con piperidina al 20 % en acetonitrilo. La biotina se acopló al grupo NH2 terminal en forma de éster activo de NHS y, por último, el grupo Boc terminal se retiró con HCl 2 M para formar la molécula conectora por afinidad biotina-C17-NH2. Por último, después de la desprotección de biotina-C17-NH2, se obtuvieron 1,5 g de producto con un rendimiento global del 31 % (10 etapas). El compuesto se caracterizó completamente por RMN-H, RMN-C y LC-MS. El peso de la fórmula es 635,22, y la masa medida fue 634,31.

#### **Biotina-C24-NH<sub>2</sub>**

La síntesis de biotina-C24-NH<sub>2</sub> (figura 10) siguió las mismas reacciones de acoplamiento de péptidos con HATU/DIPEA, desprotección de Boc con HCl 2 M, desprotección de Fmoc con piperidina y biotinilación con biotina-NHS, tal como se describe para biotina-C10-NH<sub>2</sub> y biotina-C17-NH<sub>2</sub>.

El grupo protector Boc de Fmoc-EDA-MeAla- $\beta$ -Ala-MeAla- $\beta$ -Ala-NHBoc (conector C-17) se retiró en primer lugar mediante tratamiento con HCl 2 M para formar Fmoc-EDA-MeAla- $\beta$ -Ala-MeAla- $\beta$ -Ala-NH<sub>2</sub>. A continuación, el grupo amino terminal se volvió a acoplar a Boc-MeAla mediante HATU/DIPEA en acetonitrilo. El grupo protector Boc terminal se retiró nuevamente con HCl 2 M y luego se acopló a  $\beta$ -Ala-NHBoc mediante acoplamiento con HATU/DIPEA. Luego se retiró el grupo Fmoc con piperidina al 20 % en acetonitrilo. La biotina se acopló al grupo NH2 terminal en forma de éster activo de NHS y, por último, el grupo Boc terminal se retiró con HCl 2 M para formar la molécula conectora por afinidad biotina-C24-NH<sub>2</sub>. Con la experiencia de la síntesis de biotina-C10-NH<sub>2</sub> y biotina-C17-NH<sub>2</sub>, esta síntesis de biotina-C24-NH<sub>2</sub> produjo 2 g de material con un rendimiento global del 30 % (14 etapas). El compuesto se caracterizó completamente por RMN-H, RMN-C y LC-MS. El peso de la fórmula es 791,40, y la masa medida fue 790,39.

#### **25 Síntesis de la serie B con vinil-eno terminal (biotina-C10-eno, biotina-C17-eno y biotina-C24-eno)**

A una solución de biotina-EDA-NH<sub>2</sub>, biotina-C10-NH<sub>2</sub> o biotina-C17-NH<sub>2</sub> en agua se le añadió una solución 1 M de bicarbonato de sodio en agua hasta pH 8. A esa solución se le añadió VDMA. La mezcla se concentró y se sometió a cromatografía en sílice (inyección líquida en metanol, DCM 2 CV, DCM/MeOH del 0 al 20 % en 5 CV, del 20 al 40 % en 3 CV, del 40 al 60 % en 1 CV y al 60 % para 3 CV). Las fracciones reunidas se concentraron. Los productos se disolvieron en metanol, se concentraron y se secaron al vacío para producir biotina-C10-eno, biotina-C17-eno y biotina-C24-eno, respectivamente.

#### **Biotina-C10-eno**

Se sintetizó biotina-C10-eno (figura 4) con un grupo vinilo terminal mediante la adición de 2-vinil-4,4-dimetilazlactona VDMA al grupo amino terminal de biotina-EDA-NH<sub>2</sub> en agua. Por último, se purificó biotina-C10-eno mediante cromatografía en sílice y se caracterizó completamente por RMN-H, RMN-C y LC-MS. El peso de la fórmula es 425,55, y la masa medida fue 425,21.

#### **Biotina-C17-eno**

En consecuencia, se sintetizó biotina-C17-eno (figura 7) con un grupo vinilo terminal mediante la adición de 2-vinil-4,4-dimetilazlactona VDMA al grupo amino terminal de biotina-C10-NH<sub>2</sub> en agua. Por último, se purificó el biotina-C17-eno mediante cromatografía en sílice y se caracterizó completamente mediante RMN-H, RMN-C y LC-MS. El peso de la fórmula es 581,73, y la masa medida fue 581,31.

#### **Biotina-C24-eno**

La biotina-C24-eno (figura 9) con un grupo vinilo terminal puede sintetizarse siguiendo la misma estrategia: La adición de 2-Vinil-4,4-dimetilazlactona VDMA al grupo amino terminal de biotina-C17-NH<sub>2</sub> en agua da como resultado la formación del ligando de afinidad biotina-C24-eno C7 alargado casi cuantitativamente. Por último, se purificó el biotina-C24-eno mediante cromatografía en sílice y se caracterizó completamente por RMN-H, RMN-C y LC-MS. El peso de la fórmula es 737,91, y la masa medida fue 737,39.

#### **55 EJEMPLO 5**

#### **Aminación del sustrato de esferas**

Se trataron WorkBeads 40/10 000 ACT (Bio-Works AB) que contenían grupos bromohidrina reactivos con 1,2-diaminoetano (al 5 % en agua) a temperatura ambiente durante la noche. Las esferas se lavaron con agua y un tampón de trietilamina (50 mM). Las esferas funcionalizadas con amina primaria resultantes se usaron para acoplar los conectores de longitud intermedia y larga con biotina.

#### **65 EJEMPLO 6**

**Acoplamiento de biotina-C10-eno o biotina-C17-eno al sustrato aminado:**

El sustrato aminado (ejemplo 5) se mezcló con biotina-C10-eno o biotina-C17-eno sintetizados como se describe en los ejemplos 1 y 3, respectivamente (soporte aminado 50 nmol/ml) en trietilamina 50 mM (soporte aminado 2 ml/ml) durante 6 horas. La reacción se detuvo lavándola abundantemente con agua para evitar fugas.

Los dos tipos de esferas resultantes, con **biotina-C10** o **biotina-C17**, puede usarse para la purificación, por ejemplo, de un anticuerpo mediante la captura de moléculas de polipéptido de doble afinidad (DAP) o polipéptidos de unión a la diana objetivo (TBP) según métodos de purificación de anticuerpos descritos previamente, tales como los procesos de purificación divulgados en el documento EP 2220107 B1 o en el documento WO 2010/128033 A2.

**EJEMPLO 7****Acoplamiento de biotina-C10-NH<sub>2</sub>, biotina-C17-NH<sub>2</sub> y biotina-C24-NH<sub>2</sub> sobre resina de agarosa con activación de bromohidrina**

- Se transfirieron BioWorks Work Beads 40/10 000 ACT (4 ml, 150 µmol/ml, activadas con bromohidrina, suspensión al 50 % en etanol al 20 %/agua) a un filtro de vidrio, se enjuaga el etanol al 20 %/agua y se lavó varias veces con agua y se seca por succión durante 5 min.
- Se disolvieron cada uno de biotina-C10 (8,8 mg, 20 µmol), biotina-C17 (12,0 mg, 20 µmol) y biotina-C24 (15,1 mg, 20 µmol) en 4 ml de tampón Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M, pH = 9,3. A continuación, se añade la solución de biotina-C10-NH<sub>2</sub>, biotina-C17-NH<sub>2</sub> y biotina-C24-NH<sub>2</sub> (4 ml) a la resina Work Beads (4 ml) en un vial de plástico de 10 ml, respectivamente.
- Luego se sitúa la solución en un mezclador rotatorio y se agita durante 16 h a temperatura ambiente.
- Luego las resinas se transfieren a un filtro de vidrio, y se enjuagan las soluciones de biotina-C10-NH<sub>2</sub>, biotina-C17-NH<sub>2</sub> y biotina-C24-NH<sub>2</sub>. A continuación, las WorkBeads biotiniladas enjuagadas se lavan con agua (10x) y se incuban con 5 ml de solución de etanolamina 1 M para inactivar los grupos bromohidrina activadores remanente sobre la agarosa. A continuación, se agitan las resinas en el mezclador rotatorio durante 8 h.
- Por último, las resinas se transfieren a un filtro de vidrio, se enjuaga el reactivo bloqueante etanolamina 1 M, se lavan con agua (10 x), con HCl 0,1 M (5 x) y con agua (10 x), etanol al 20 % (5x) y se secan por succión.
- Las preparaciones de resina biotinilada se almacenan en etanol al 20 % como una suspensión al 50 %.

Estas resinas de agarosa biotiniladas con los conectores de biotina-C10-NH<sub>2</sub>, biotina-C17-NH<sub>2</sub> y biotina-C24-NH<sub>2</sub> se ensayan para determinar la capacidad de unión dinámica y los estudios de tasa de unión con DAP.

**EJEMPLO 8****Medición de la capacidad de unión dinámica (DBC)**

Para determinar la DBC de DAP o TBP al conector de biotina acoplado a la superficie de soporte sólido, se aplica la isoterma de adsorción de Langmuir. Esto se basa en los supuestos que se enumeran a continuación:

- La superficie es homogénea.
- La adsorción no puede producirse más allá de la cobertura monocapa.
- Todos los sitios de adsorción son equivalentes y la unión es independiente entre sí.
- No hay interacciones entre las moléculas adsorbidas y las moléculas en la solución y no hay interacciones entre el disolvente y la superficie.

La isoterma de adsorción de Langmuir se basa en el equilibrio entre el DAP y la biotina unida al soporte sólido. Por consiguiente, es obligatorio que DAP supere la capacidad máxima de unión para que cada análisis pueda alcanzar el equilibrio.

Al utilizar la isoterma de Langmuir, la unión de DAP a la superficie de biotina se puede describir como:

$$q^* = \frac{DBC \ kC^*}{1 + kC^*}$$

Que se puede reorganizar en:

$$C^* = DBC \ C^*/q^* - 1/k$$

en donde q\* es la masa de DAP unido expresada como mg de DAP unido por ml de esferas o membrana de resina de biotina, C\* es la concentración de equilibrio de DAP en solución, DBC es la capacidad máxima de unión y k es la constante de equilibrio de adsorción (ref: Beier *et al.*, Adsorption of Amylase Enzyme on Ultrafiltration Membranes,

*Langmuir* (2007), volumen 23, págs. 9341-9651).

La DBC se puede determinar representando gráficamente  $C^*$  frente a  $C^*/q^*$ . La pendiente es igual a la DBC. Se analizó la capacidad de unión dinámica de sustratos sólidos funcionalizados preparados como se describe en los ejemplos anteriores incubando una cantidad conocida de sustrato sólido con cuatro cantidades diferentes de DAP en solución.

El sustrato sólido (0,25 ml) se situó en una columna Omnifit (6,6 mm/100 mm) (Diba Industries Inc., Danbury, CT, EE. UU.) y se equilibró con citrato 0,3 M, pH 3,5, Tween 20 al 0,1 %. Se usó Akta Pure (GE Healthcare, Chicago, IL, EE.UU.) para cargar 10 ml de solución de DAP en concentraciones de 1,8, 1,4, 1,1 y 0,9 mg/ml, respectivamente, a la columna Omnifit que contenía el sustrato sólido funcionalizado. La velocidad de flujo de la bomba se fijó en 1,0 ml por minuto, lo que corresponde a un tiempo de residencia en la columna de 15 segundos. Después de lavar el DAP no unido y de recoger la fracción de la corriente, se analizó el contenido de DAP utilizando un espectrómetro Nanodrop (ThermoFisher, Waltham, MA, EE.UU.). Coeficiente de extinción para DAP:  $\epsilon_{DAP} = 1,12 \text{ cm}^2/\text{mg}$  y  $PM = 42\,758 \text{ kDa}$

La concentración de equilibrio en el líquido a granel ( $C^*$ , mg/ml) se calculó determinando el contenido total de DAP en solución después de la incubación con el sustrato sólido. La concentración de equilibrio ( $q^*$ , mg/ml) sobre el sustrato sólido se calculó restando el contenido de DAP en la solución de la corriente del contenido de DAP inicial en la solución. Los datos recopilados de los experimentos se utilizaron representando gráficamente  $C^*$  (y) como una función lineal de  $C^*/q^*$  (x) como se muestra en la figura 11. La pendiente de la línea de tendencia lineal proporciona la capacidad de unión máxima para la cantidad de sustrato sólido utilizado en el experimento de unión. En este análisis se ensayaron 0,25 ml de sustrato sólido, y la capacidad de unión dinámica (DBC) en mg/ml se obtiene multiplicando la pendiente por cuatro.

En la tabla 1 se resumen los resultados de DBC del análisis de sustratos sólidos funcionalizados con biotina-C10, biotina-C17 y biotina-C24. De la tabla se desprende claramente que el sustrato sólido funcionalizado con biotina-C17 conduce a la DBC más alta.

Compuesto	Densidad de acoplamiento	Número de átomos espaciadores	DBC (mg/ml)
Biotina-C10	5 $\mu\text{mol}/\text{ml}$	C10	35,9
Biotina-C17	5 $\mu\text{mol}/\text{ml}$	C17	52,3
Biotina-C24	5 $\mu\text{mol}/\text{ml}$	C24	33,1
Ninguno	0 $\mu\text{mol}/\text{ml}$	Nulo	9,7

Tabla 1. Resumen de la capacidad de unión dinámica determinada ("DBC", mg/ml) del sustrato sólido funcionalizado con biotina-C10, biotina-C17 y biotina-C24 a una velocidad de flujo de 1,0 ml/minuto, que corresponde a un tiempo de residencia de 15 segundos. Se incluyó como control un sustrato sólido no funcionalizado.

#### EJEMPLO 9

##### 35 Tasa de unión (tiempo de residencia)

Los sustratos sólidos funcionalizados preparados como se describe en los ejemplos anteriores se analizaron más detalladamente para comprender si el tiempo de residencia afectará a la DBC. Para cada velocidad de bomba se determinó la DBC como anteriormente en el ejemplo 8. Se varió la velocidad del flujo de la bomba para lograr diferentes tiempos de residencia del DAP en contacto con el sustrato sólido, es decir, 0,5, 1,0 y 2,0 ml por minuto, lo que corresponde a tiempos de residencia de 30, 15 y 7,5 segundos, respectivamente. La capacidad de unión dinámica se determinó como se describe en el EJEMPLO 9 anterior para los sustratos sólidos funcionalizados con biotina-C10, biotina-C17 y biotina-C24 y los resultados se resumen en la tabla 2.

45 El sustrato sólido funcionalizado con Biotina-C17 proporciona una DBC máxima en comparación con otros conectores de biotina. También se observa que la DBC de la biotina-C17 es casi constante (menos del 4 %), lo que significa que la tasa de unión es mucho más rápida para la biotina-C17 en comparación con el otro conector ensayado. La biotina-C10 y la biotina-C24 tienen una reducción de DBC del 20 % y el 10 %, respectivamente, en la gama de tiempos de residencia medida.

50

Compuesto	Densidad de acoplamiento	Número de átomos espaciadores	Tiempo de residencia (s)	DBC (mg/ml)
Biotina-C10	5 $\mu\text{mol}/\text{ml}$	C10	30	45,2
Biotina-C10	5 $\mu\text{mol}/\text{ml}$	C10	15	43,3
Biotina-C10	5 $\mu\text{mol}/\text{ml}$	C10	7,5	36,8
Biotina-C17	5 $\mu\text{mol}/\text{ml}$	C17	30	50,0
Biotina-C17	5 $\mu\text{mol}/\text{ml}$	C17	15	49,1

(continuación)

Compuesto	Densidad de acoplamiento	Número de átomos espaciadores	Tiempo de residencia (s)	DBC (mg/ml)
Biotina-C17	5 µmol/ml	C17	7,5	47,9
Biotina-C24	5 µmol/ml	C24	30	38,6
Biotina-C24	5 µmol/ml	C24	15	34,6
Biotina-C24	5 µmol/ml	C24	7,5	34,6

Tabla 2. Resumen de la capacidad de unión dinámica medida ("DBC", mg/ml) del sustrato sólido funcionalizado con biotina-C10, biotina-C17 y biotina-C24 a velocidades de flujo de 0,5, 1,0 y 2,0 ml/minuto, que corresponden a un tiempo de residencia de 30, 15 y 7,5 segundos, respectivamente. El sustrato sólido funcionalizado con biotina-C17 conduce a una DBC más alta en todos los tiempos de residencia medidos y se ve afectado sólo en menor medida por la disminución del tiempo de residencia.

#### EJEMPLO 10

##### **Injerto de biotina-C10-eno, biotina-C17-eno o biotina-C24-eno sobre membranas**

Coinjerto iniciado por radicales de tres conectores de diferentes longitudes: *Biotina-C10-eno*, *biotina-C17-eno* o *biotina-C24-eno*, respectivamente, con N,N-dimetilacrilamida a láminas de membrana de polisulfona éter (3M).

La membrana se cortó en trozos redondos (10 cm de diámetro) y se lavó con agua, seguida de dioxano. La membrana se empapó en N,N-dimetilacrilamida al 10 % (Fluka) en dioxano seco y sin oxígeno y 0,1 % de biotina-C10-eno, biotina-C17-eno y biotina-C24-eno, respectivamente, y con benzoequinona (Fluka, 25 ppm) como iniciador de radicales. Las membranas se irradiaron con una lámpara UV durante 10 minutos en una atmósfera neutra (nitrógeno seco). Las membranas se lavaron con dioxano.

Se recogió el homopolímero lavado y se usó para acercarse a la longitud del polímero injertado mediante SEC. La distribución del homopolímero fue amplia en aproximadamente 500 a 25000 Da en peso molecular, en comparación con un patrón de PM.

Las tres membranas diferentes resultantes con poliacrilamida injertada y **biotina-C10, biotina-C17 y biotina-C24** se lavaron abundantemente con agua caliente (60 °C) para retirar cualquier homopolímero y evitar fugas posteriores.

Las membranas resultantes estaban físicamente intactas, aunque con un color ligeramente amarillento, y tenían un copolímero de injerto que constaba de un esqueleto de poliacrilamida y ramificaciones semirrígidas de diferentes longitudes. Las ramificaciones (Comb) son diferentes del esqueleto.

Las diferentes membranas con injertos de poliacrilamida con conectores de diferentes longitudes desde los puntos de ramificación (Comb) se ensayaron en una configuración similar al ejemplo 8. Las membranas se cortaron en trozos pequeños (aproximadamente 2 x 2 mm) y se cargaron en la columna Omnifit.

El experimento se repitió varias veces debido a problemas con el plegado de las membranas en la columna. La capacidad de unión fue mejor para C17 (10-25 mg/mg de membrana), entre aproximadamente un +15-25 % mejor que las preparaciones de C10 y C24, que tenía casi la misma capacidad.

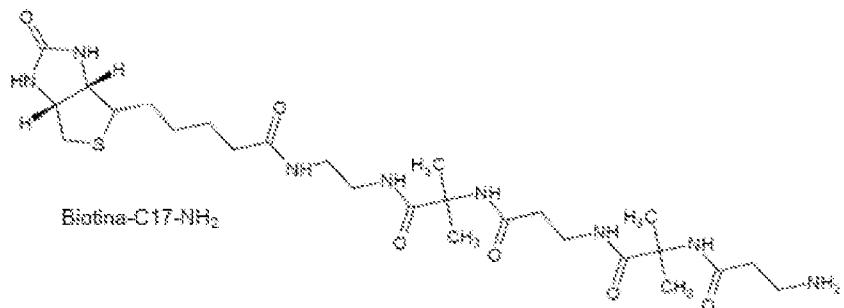
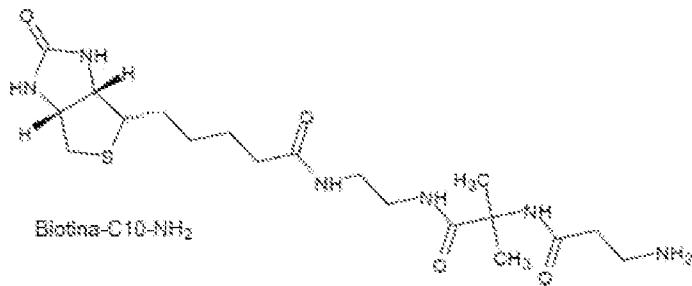
## REIVINDICACIONES

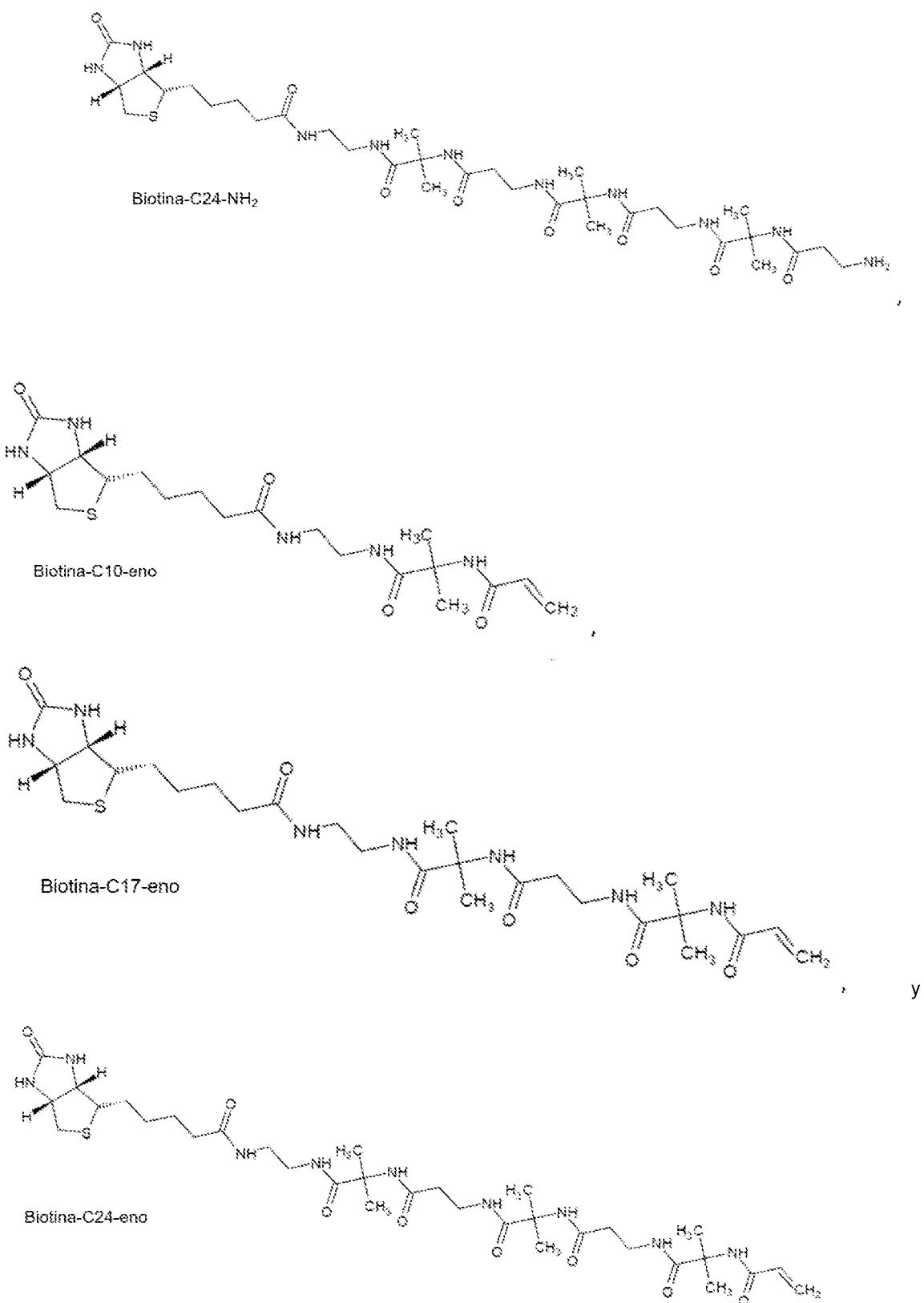
1. Un uso de un sustrato funcionalizado con ligandos para la purificación de una biomolécula diana, en donde el sustrato funcionalizado con ligandos comprende:
- 5 a. Un sustrato que tiene grupos carboxílico (-COOH), hidroxi (-OH), tio (-SH), amino (-NH2), dobles enlaces C-C (-eno) o triples enlaces C-C (-ino) en su superficie;
- b. Unido covalentemente a dichos grupos carboxílico (-COOH), hidroxi (-OH), tio (-SH), amino (-NH2), dobles enlaces C-C (-eno) o triples enlaces C-C (-ino) de dicho sustrato, un conector que tiene una longitud de conector de 10-25, tal como 17-22 enlaces, en donde los enlaces son enlaces C-C, C-N, C-N(H), C-C(O) y/o C-O; y
- 10 c. Un grupo funcional de ligando unido a la superficie del sustrato a través de dicho conector;

comprendiendo la purificación las etapas de:

- (a) poner en contacto (i) una biomolécula diana, (ii) un polipéptido de doble afinidad, y (iii) el sustrato funcionalizado con ligandos, y
- 15 (b) recuperar la biomolécula diana mediante elución, en donde la biomolécula diana y el polipéptido de doble afinidad se ponen en contacto en solución antes de que la mezcla se ponga en contacto con el sustrato funcionalizado con ligandos, y opcionalmente
- (c) eliminar las impurezas y/o retirar el polipéptido de doble afinidad,

- 20 en donde dicho grupo funcional de ligando y dicho conector se seleccionan del grupo que consiste en:





5 2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el sustrato es un sustrato sólido.

3. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde el sustrato se selecciona del grupo que consiste en agarosa, tal como en forma de resina o esferas, diatomita, gel de sílice, celulosa, éteres de celulosa,

carboximetilcelulosa, celulosa degenerada, agarosa o membranas a base de papel, nitrocelulosa, ésteres mixtos de nitrocelulosa, sílices y vidrios de porosidad controlada, poliamidas, polisulfona éter, poli(alcoholes vinílicos), policarbonato, poliuretano, poliéster sulfona, polisulfona, poli(tereftalato de etileno), polí(fluoruro de vinilideno), poliestireno o polipropileno, polietileno y copolímeros en bloque, mezclas y combinaciones de los mismos.

- 5 4. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el sustrato funcionalizado con ligandos se prepara mediante un método que comprende (a) activar el sustrato químicamente o introduciendo un radical, y (b) acoplar el ligando al sustrato directamente a través del conector o mediante copolimerización por radicales usando dos o más monómeros acrílicos, de los cuales al menos uno contiene un ligando.
- 10 5. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la biomolécula diana es un anticuerpo.

Figura 1

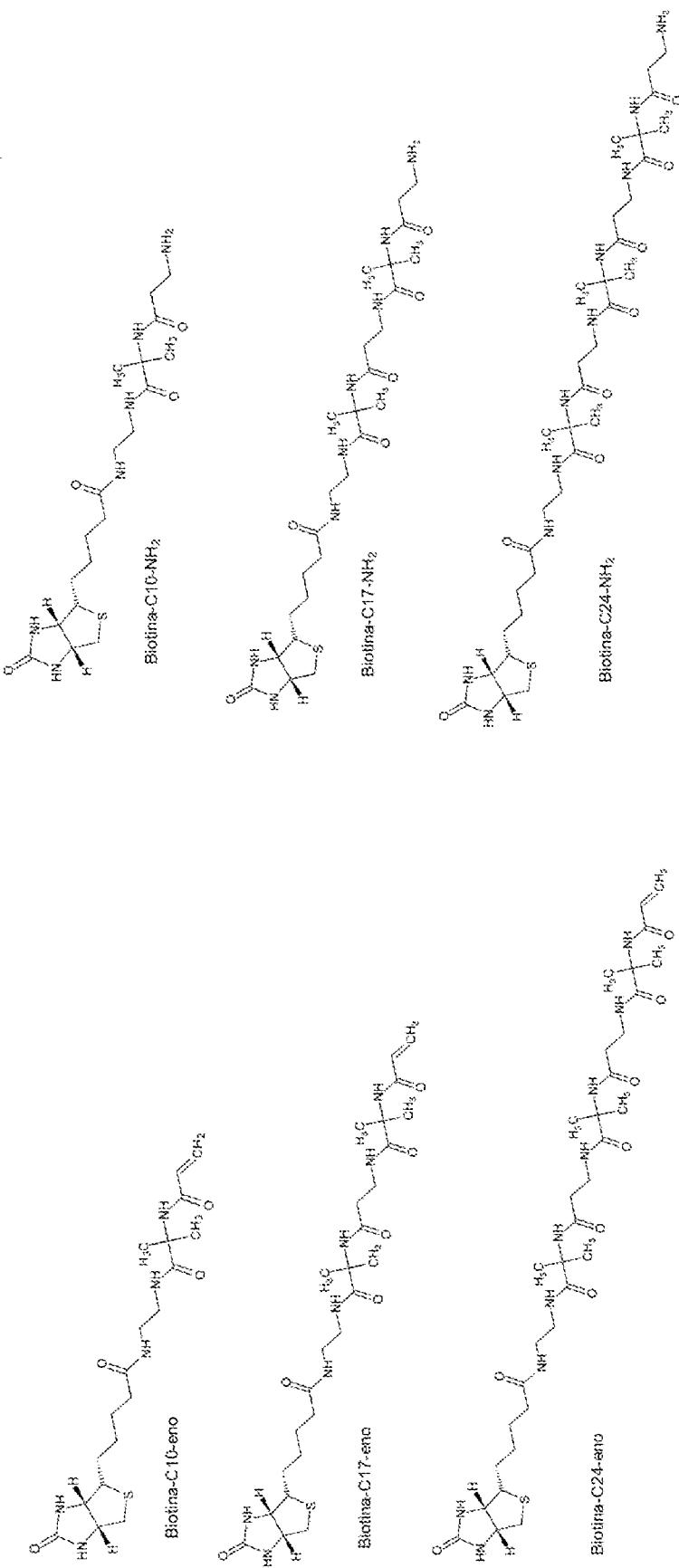
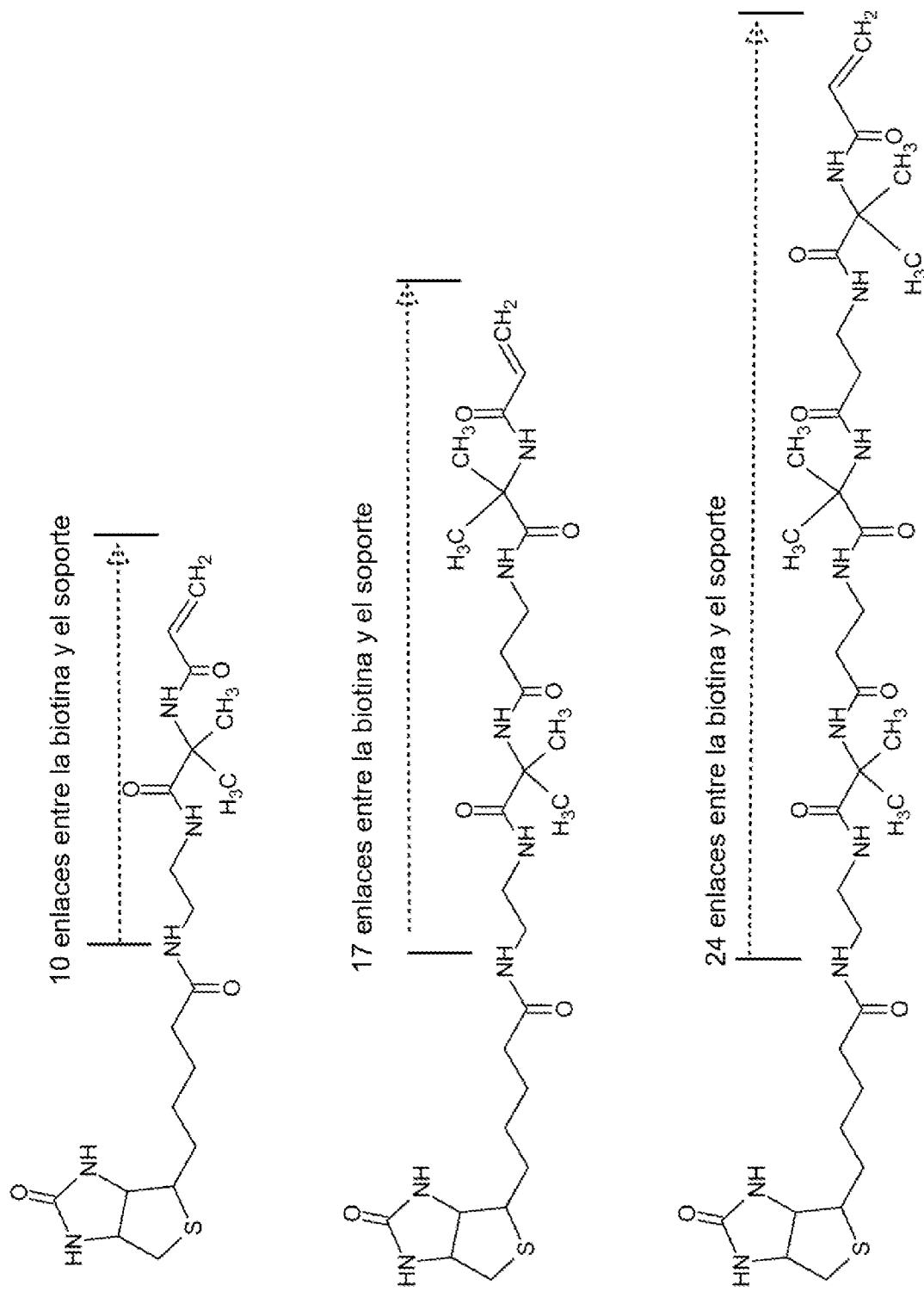


Figura 2



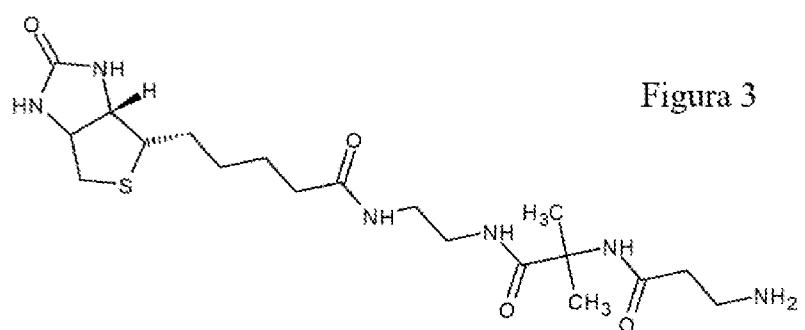


Figura 3

Figura 4

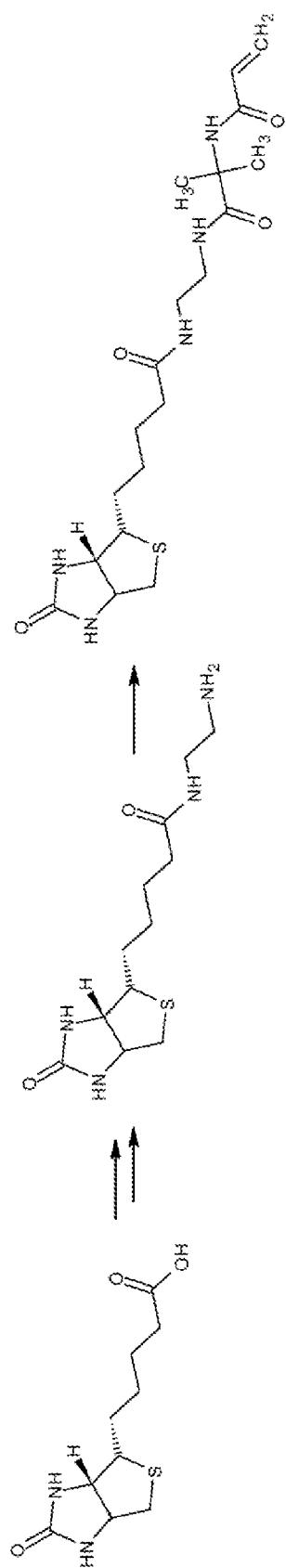
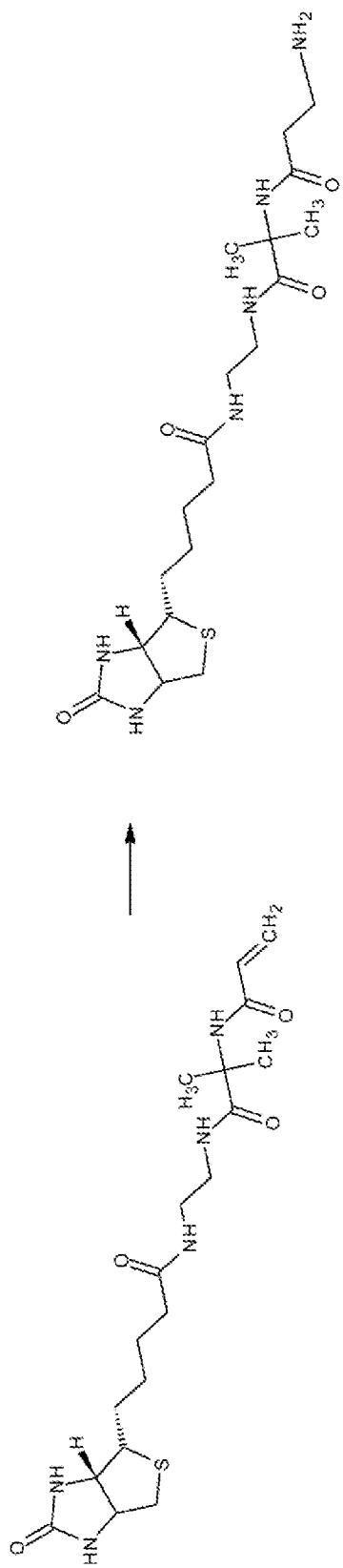


Figura 5



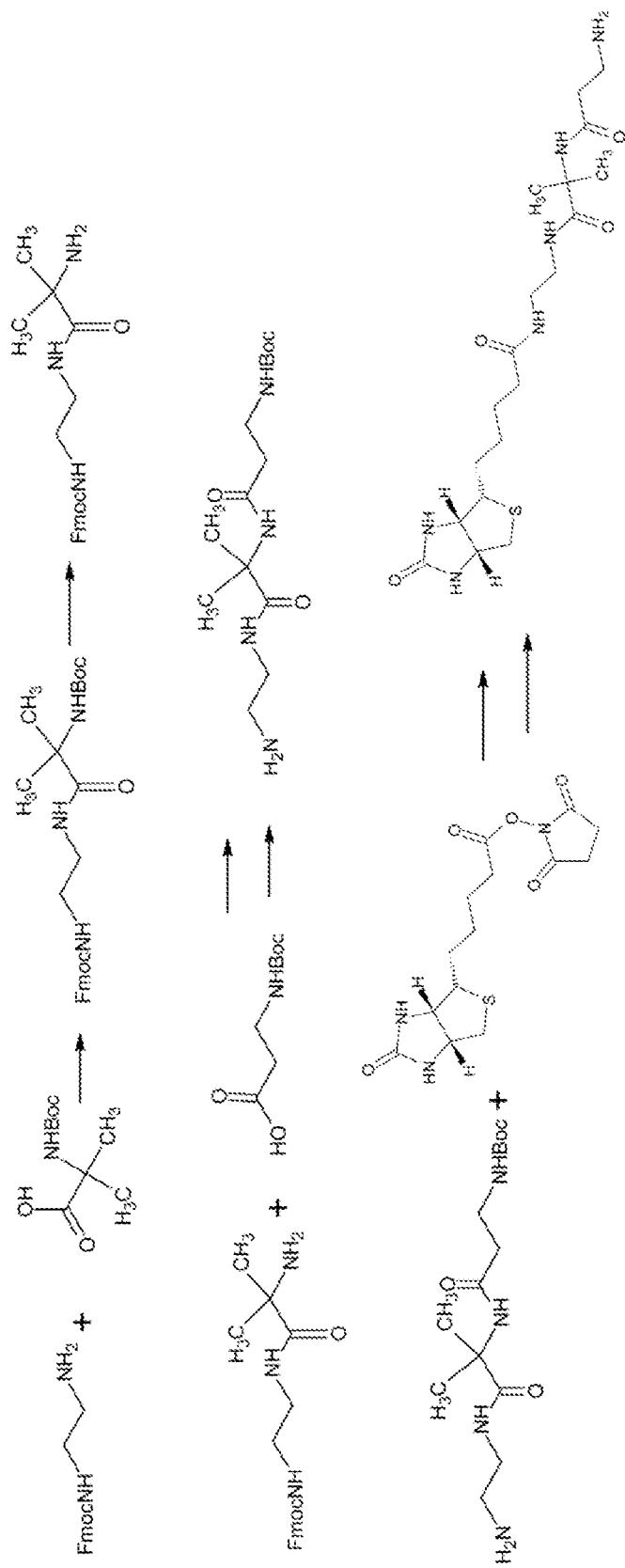


Figura 6

Figura 7

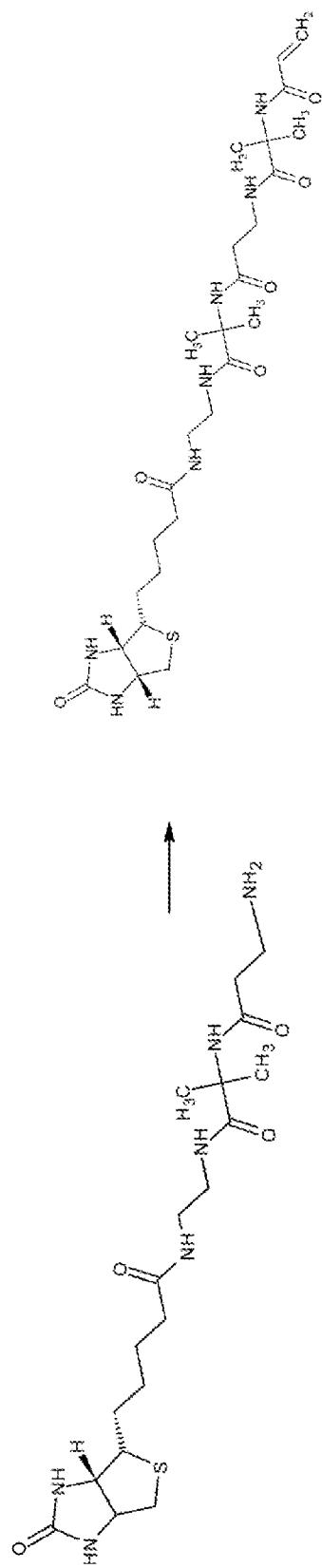
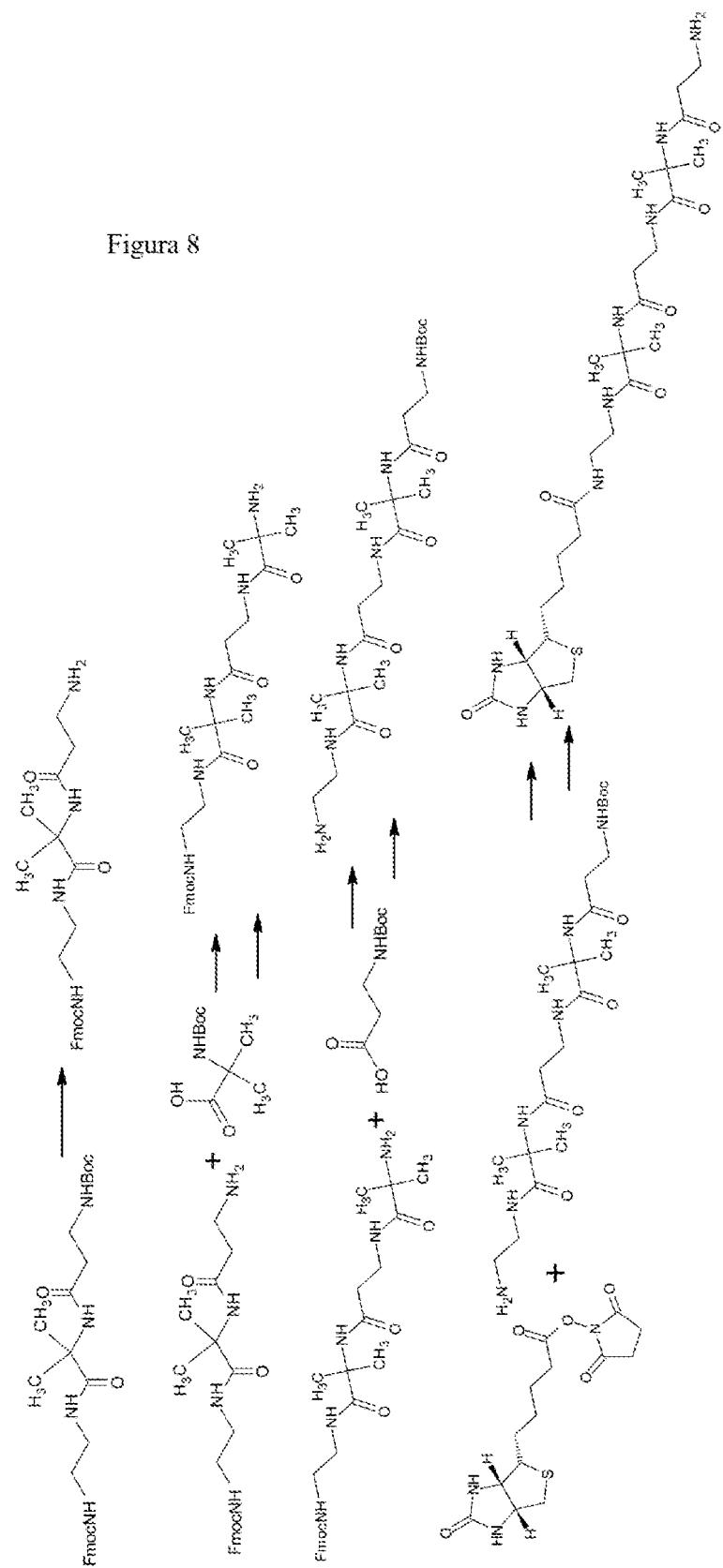


Figura 8



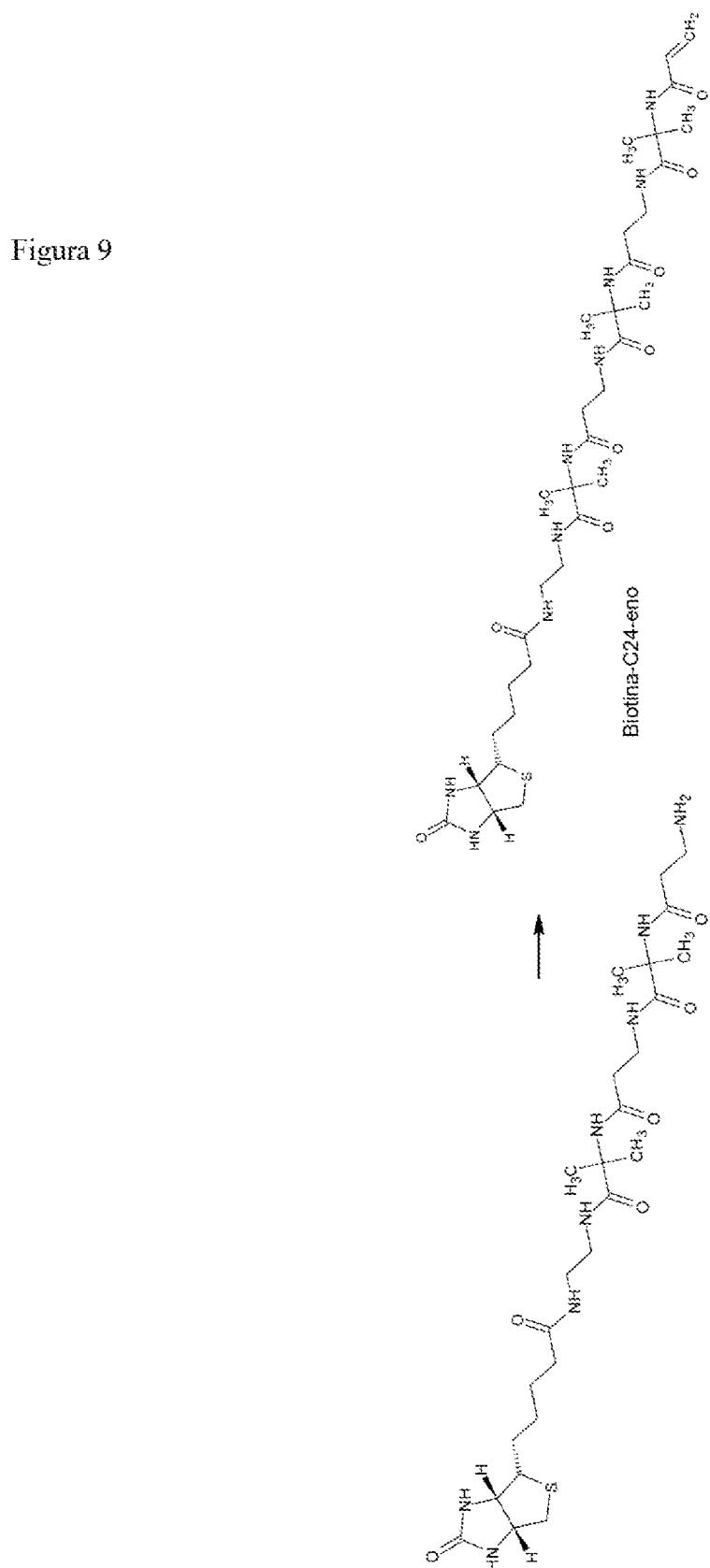


Figura 10

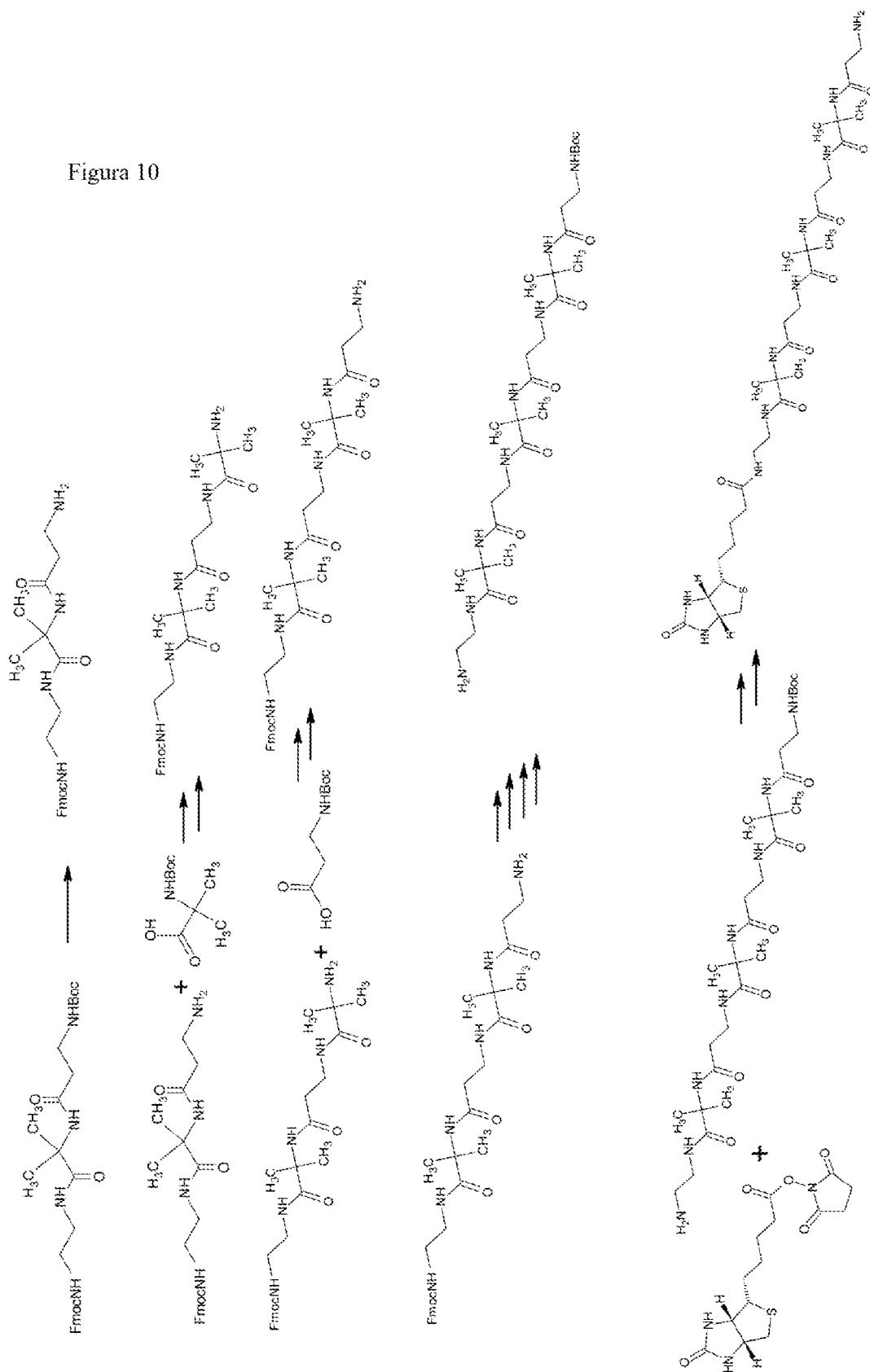


Figura 11

