

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 993 561**

51 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

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.12.2019** **PCT/EP2019/085711**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.06.2020** **WO20127311**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2019** **E 19818147 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.10.2024** **EP 3897972**

54 Título: **Sustrato de ligando-enlazador**

30 Prioridad:

17.12.2018 EP 18213244

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.01.2025

73 Titular/es:

CHRETO APS (50.00%)
Slotsmarken 18
2970 Hørsholm, DK y
3M INNOVATIVE PROPERTIES COMPANY
(50.00%)

72 Inventor/es:

KYHSE-ANDERSEN, JAN;
WINTHER, LARS y
RASMUSSEN, JERALD

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 993 561 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

Sustrato de ligando-enlazador

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a la cinética de ligando-receptor, mayores tasas de unión y mayor capacidad de unión dinámica del receptor de interés a un sustrato funcionalizado.

- 10 Los sustratos funcionalizados, los métodos para preparar dichos sustratos funcionalizados con ligando-enlazador y la optimización de la longitud del enlazador de los mismos. Más específicamente, los sustratos funcionalizados con ligando-enlazador incluyen un sustrato sólido, que se ha modificado para proporcionar grupos ligando de unión unidos covalentemente a través de una longitud de enlazador, usados 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 de purificación industrial general a menudo incluye una serie de operaciones unitarias, como extracción, filtración, precipitación, así como cromatografía de intercambio aniónico y catiónico, y purificación por afinidad.

- La mayoría de las cromatografías de captura o de purificación por afinidad actuales se realizan mediante técnicas de columna a base de resinas convencionales. Las resinas para cromatografía de perlas porosas tienen una alta relación de área superficial con respecto a la masa que lleva grupos de ligando de afinidad interactivos y, por lo tanto, se han usado en procesos de purificación por afinidad de proteínas. Estas técnicas requieren mucho tiempo y generan graves problemas de cuellos de botella en la purificación posterior, debido a que las tasas de unión dependen del transporte de masa por difusión. Esto también limita la aplicabilidad de las técnicas de cromatografía en el cribado de alto rendimiento y para el procesamiento posterior rápido.

- Las tecnologías basadas en filtros, membranas, nanofibras y nanopartículas, especialmente en formato desechable, están adquiriendo cada vez más importancia en los procesos de fabricación de productos biofarmacéuticos y vacunas. Las membranas se han usado en la separación pasiva basada en el tamaño molecular y en la filtración activa.

- Las membranas funcionalizadas que tienen propiedades de flujo de proceso mejoradas (incluidas las membranas funcionales que contienen polímeros) han sufrido típicamente capacidades de unión de biomateriales relativamente bajas debido a la baja relación de área superficial con respecto a la masa, lo que en general ha limitado su uso en determinados procesos de purificación a gran escala.

- Sin embargo, las membranas y los filtros tienen un alto potencial de productividad (masa de producto/volumen/tiempo) debido a las posibles altas velocidades de la corriente de proceso y al eficiente transporte de masa por convección. Hoy en día, las membranas y los filtros se usan principalmente en procesos de pulido para eliminar impurezas a niveles muy bajos en corrientes de producto. Estos materiales, membranas, filtros y resinas de perlas porosas, podrían mejorarse aún más. Además, los materiales a base de resina de perlas podrían ser más económicos y aplicables optimizando la cinética de unión dinámica entre el ligando y los receptores. Los procesos de membrana, filtro o perlas resultantes serán incluso más rápidos y eficientes y harán posible tener operaciones unitarias de purificación posteriores con una menor huella, mayor capacidad y proporcionarán menos agua residual y consumo de fluidos tampón de proceso.

- Los sustratos funcionalizados con ligando estándar, tales como las membranas funcionalizadas con ligando, se usan ampliamente para la separación y purificación por afinidad de varias moléculas diana. Por ejemplo, las membranas funcionalizadas con ligando se pueden usar para purificar o separar una molécula diana en función de una interacción de afinidad o en función de la formación de un enlace covalente.

- El documento US 5.451.453 divulga sustratos que tienen superficies funcionales con azlactona, sustratos de aductos y métodos para preparar ambos.

- El documento US 9.616.394 B2 divulga polímeros funcionalizados con ligando de guanidinio, métodos para fabricar los mismos y sustratos que llevan un recubrimiento injertado de los polímeros funcionales con ligando.

- El documento US 9.650.470 B2 divulga sustratos funcionalizados con ligando, métodos para fabricar sustratos funcionalizados con ligando y métodos para usar sustratos funcionalizados.

- El documento US 9.958.364 B2 divulga sustratos funcionalizados con ligando con capacidad de unión mejorada.

- El documento US 9.758.547 B2 divulga sustratos funcionalizados con ligando, métodos para fabricar sustratos

funcionalizados con ligando 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: (a) poner en contacto (i) una biomolécula diana, (ii) un polipéptido de doble afinidad (DAP, por sus siglas en inglés) y (iii) un sustrato sólido que comprende un ligando de captura; y (b) recuperar la biomolécula diana por 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: (a) poner en contacto una molécula diana y una población de polipéptidos de unión a diana (TBP, por sus siglas en inglés), en solución durante un tiempo suficiente para permitir la formación de complejo; y (b) aislar la diana del complejo de (a) mediante etapas de purificación posteriores, en donde (i) los polipéptidos de unión a 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.

El polipéptido de doble afinidad (DAP) descrito en el documento EP 2220107 B1 tiene la misma funcionalidad que los polipéptidos de unión a 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. Wang Y. *et al.*: "Identification of Affinity Ligands for Protein Purification from Synthetic Chemical Combinatorial Libraries", *Biotechnology Progress*, vol. 18, n.º 3, 7 de junio de 2002 (07-06-2002), páginas 524-529, DOI: 10.1021/bp020033d describe un sustrato funcionalizado con ligando que comprende un soporte de resina Ultralink al que se acopla un grupo de biotina a través de un enlazador.

Si bien existe una cantidad de sustratos funcionalizados con ligando, existe la necesidad en la técnica de sustratos funcionalizados con ligando-enlazador más óptimos que puedan funcionar 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, el coste operativo y la huella ambiental.

Objeto de la invención

Un objeto de las realizaciones de la invención es proporcionar un sustrato funcionalizado con ligando-enlazador que permita una rápida tasa de unión al receptor (compuesto de interés) sin comprometer una alta capacidad de unión dinámica.

Sumario de la invención

Los presentes inventores han encontrado que al proporcionar un sustrato funcionalizado con ligando en donde el ligando está unido al sustrato a través de un enlazador de una longitud específica y preferentemente una estructura no flexible, se puede obtener una capacidad de unión dinámica considerablemente aumentada, así como una tasa de unión entre el ligando y un receptor de interés.

Por lo tanto, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a un sustrato funcionalizado con ligando como se define en la reivindicación 1 que comprende:

- a. Un sustrato que tiene grupos carboxílicos (-COOH), hidroxilo (-OH), tio (-SH), amino (-NH₂), dobles enlaces C-C (-eno) o triples enlaces C-C (-ino) en la superficie del mismo;
- b. Unido covalentemente a dichos grupos carboxílicos (-COOH), hidroxilo (-OH), tio (-SH), amino (-NH₂), dobles enlaces C-C (-eno) o triples enlaces C-C (-ino) de dicho sustrato, un enlazador, tal como un enlazador semiflexible, que tiene una longitud de enlazador de 10-25, tal como 17-22 enlaces, en donde los enlaces son 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 enlazador.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un método para la preparación del sustrato funcionalizado con ligando de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende (a) activar el sustrato químicamente o introduciendo un radical, y (b) acoplar el ligando al sustrato directamente a través del enlazador o mediante copolimerización por radicales usando dos o más monómeros acrílicos, de los cuales al menos uno contiene un ligando.

En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a un uso de un sustrato funcionalizado con ligando de acuerdo con la invención para capturar o inmovilizar un receptor de interés.

Leyendas de las figuras

La figura 1 ilustra la estructura y nomenclatura de los ligandos de afinidad de biotina de enlazador "más cortos", "medio" y "largos" con amino terminal-NH₂ (serie A), Biotina-C10-NH₂, Biotina-C17-NH₂ y Biotina-C24-NH₂ y Biotina-C24-NH₂ y -eno terminal (serie B) Biotina-C10-eno, Biotina-C17-eno, Biotina-C24-eno.

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

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

La figura 4 ilustra la síntesis de biotina-C10-eno

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

La figura 6 ilustra la ruta de síntesis alternativa para Biotina-C10-NH₂

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

La figura 8 ilustra la síntesis de Biotina-C17-NH₂

La figura 9 ilustra la síntesis de Biotina-C24-eno

La figura 10 ilustra la síntesis de Biotina-C24-NH₂

Figura 11. Medición de la capacidad de unión dinámica usando el diagrama de Hanes (forma linealizada de la isoterma de Langmuir) para el 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 de unión máxima y es 13,08 mg de DAP/TBP en 0,25 ml de sustrato sólido. Esto corresponde a una DBC de 52,3 mg/ml.

Divulgación detallada de la invención

Definiciones

En el presente contexto, la longitud del enlazador se define por el 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 del enlazador. Se observa que la biotina contiene por naturaleza un enlazador lipófilo. El enlazador usado de acuerdo con la presente invención contiene grupos amida y parcialmente impedidos estéricamente, lo que impide que el enlazador sea completamente flexible.

Se debe entender que un enlazador se refiere a una cadena de al menos 6 átomos de N, C, S u O que unen el sustrato y el grupo funcional de ligando de la invención. Típicamente, el enlazador es una secuencia lineal de al menos 6 átomos de N, O o C, en donde la longitud del enlazador se define por 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.

Se debe entender que la longitud práctica del enlazador 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 promedio C-C, C-O y C(O)-N(H) son aproximadamente 1,5, 1,4 y 1,3 Å, respectivamente. El enlace C-O puede rotar parcialmente, mientras que el enlace amida no es tan libre de rotar.

La longitud del enlazador se define como el número de enlaces químicos en el enlazador. Es decir, desde el grupo funcional de ligando, tal como una biotina, hasta el sustrato. Se observa que el enlace terminal al sustrato también se cuenta. Por consiguiente, al contar la longitud de un enlazador como se muestra en el presente documento que tiene un -eno terminal, también se debe contar el enlace desde el átomo de carbono terminal al sustrato. Si el enlazador como se muestra en el presente documento tiene grupos amino terminales (-NH₂), el enlace a estos grupos amino se contará como el último enlace. Se debe tener en cuenta que la biotina tiene de manera natural un enlazador C5 entre la estructura anular, los grupos ureido y tetrahidrotiofeno y el grupo carboxilo.

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 y, por lo tanto, la presencia de grupos voluminosos en la proximidad del bolsillo de unión de biotina puede crear impedimentos estéricos y reducir la eficiencia de unión.

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

Como se usa en el presente documento, un "polipéptido de doble afinidad" o "DAP" usado indistintamente con "polipéptidos de unión a 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 al menos un dominio de unión capaz de unirse al sustrato funcionalizado con ligando de acuerdo con la invención. Las moléculas de DAP adecuadas se describen en el documento WO2009062942 y las moléculas de TBP adecuadas se describen en el documento WO 2010/128033 A2, que incluye en una realización preferida un monómero de estreptavidina condensado en una proteína de fusión a cuatro dominios de unión a la

proteína A.

Realizaciones específicas de la invención

- 5 La presente invención se refiere en un aspecto amplio a un sustrato funcionalizado con ligando que comprende: a) Un sustrato que tiene grupos carboxílicos (-COOH), hidroxilo (-OH), tio (-SH), amino (-NH₂), dobles enlaces C-C (-eno) o triples enlaces C-C (-ino) en la superficie del mismo; b) Unido covalentemente a dichos grupos carboxílicos (-COOH), hidroxilo (-OH), tio (-SH), amino (-NH₂), dobles enlaces C-C (-eno) o triples enlaces C-C (-ino) de dicho sustrato, un enlazador que tiene una longitud de enlazador de 10-25, tal como 17-22 enlaces, en donde los enlaces son 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 enlazador.

De acuerdo con la invención, el sustrato funcionalizado con ligando de acuerdo con la invención es un sustrato sólido, tal como en forma de láminas, membranas, perlas, monturas o granulados. Con superficies tanto lisas como grandes superficies internas debido a la porosidad.

En una realización del sustrato funcionalizado con ligando de acuerdo con la invención, el sustrato es un sustrato sólido que se injerta mediante polimerización de vinilo iniciada por radicales.

En una realización del sustrato funcionalizado con ligando de acuerdo con la invención, el sustrato se selecciona del grupo que consiste en agarosa, tierra de diatomeas, gel de sílice, celulosa, éteres de celulosa, carboximetilcelulosa, celulosa degenerada, membranas a base de agarosa o papel, nitrocelulosa, ésteres mixtos de nitrocelulosa, sílices y vidrios de poro controlado, poliamidas, éter de polisulfona, alcoholes polivinílicos, policarbonato, poliuretano, polietersulfona, polisulfona, tereftalato de polietileno, fluoruro de polivinilideno, poliestireno o polipropileno, polietileno y copolímeros de bloque, mezclas y combinaciones de los mismos. En una realización, el sustrato está en forma de partículas, películas, bandas tejidas o no tejidas, esponjas, fibras, láminas, perlas, filtros o una membrana. El sustrato usado de acuerdo con la invención es habitualmente poroso para aumentar el área superficial y obtener propiedades óptimas de flujo de líquido y puede ser tanto orgánico como inorgánico, incluyendo polimérico.

Los métodos de síntesis de péptidos de elongación gradual mediante el acoplamiento gradual de aminoácidos protegidos u otros componentes básicos multifuncionales se describen bien a partir de, por ejemplo, la síntesis clásica de péptidos en fase sólida de Merrifield o en solución. Los diversos grupos de protección quimioselectivos y ortogonales incluyen Boc, Fmoc, bencilo o t-But, entre otros. La formación de amida se realiza usando, por ejemplo, carbodiimidas, éster activo eficiente, HATU/HOAt o reacciones similares. Se puede encontrar un resumen de reactivos y métodos SPPS en, por ejemplo, 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 de forma más general para la conjugación y la reticulación en Shan S. Wong, *"Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking"*, CRC Press, 1991.

Además, se conoce bien el uso de 2-vinil-4,4-dimetil azlactona (VDMA) y derivados para alargar e injertar enlazadores. 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.

En el sustrato funcionalizado con ligando de acuerdo con la invención, el grupo funcional del ligando es biotina.

Los presentes inventores han encontrado sorprendentemente que la longitud y la naturaleza del enlazador tienen una influencia distintiva tanto en la capacidad de unión dinámica (DBC) como en la tasa de unión del uso resultante de los mismos para unir una molécula receptora como, por ejemplo, un polipéptido de doble afinidad (DAP) o una proteína de unión a diana (TBP) y eliminarla de manera eficiente de la solución, lo que es un requisito para la purificación de una biomolécula diana. El enlazador debe ser preferentemente semiflexible en agua a pH 4, para permitir una configuración estirada y, por lo tanto, una mayor eficiencia de unión. El enlazador entre el sustrato y el grupo funcional de ligando, tal como biotina, debe extenderse en agua, pero no debe ser completamente flexible o libre para girar, o doblarse en todas las direcciones.

Además, los inventores han encontrado que la longitud óptima para llegar a un grupo funcional de ligando que es un bolsillo de unión de biotina requiere una guía para la eficiencia de unión dinámica óptima. Las diversas optimizaciones de los enlazadores descritas en la técnica anterior se basan típicamente en el equilibrio en estado estacionario, en condiciones de unión estática o en experimentos con moléculas pequeñas o en cromatografía de intercambio aniónico y catiónico.

En una realización del uso de acuerdo con la invención, el uso es para la purificación de una biomolécula diana, que comprende las etapas:

- a) poner en contacto (i) una biomolécula diana, (ii) un polipéptido de doble afinidad (DAP) y (iii) un sustrato

funcionalizado con ligando de acuerdo con la invención, y (b) recuperar la biomolécula diana por 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 funcionalizado con ligando.

- 5 En una realización del uso de acuerdo con la invención, el uso es para la purificación de una biomolécula diana, que comprende las etapas:

- 10 a) poner en contacto una molécula diana y una población de polipéptidos de unión a diana (TBP) o un polipéptido de doble afinidad (DAP), en solución durante un tiempo suficiente para permitir la formación de complejo; y (b) aislar la diana del complejo de (a) mediante etapas de purificación posteriores, en donde (i) los polipéptidos de unión a 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/DAP.

- 15 En algunas realizaciones, el método comprende una etapa de lavado de impurezas, tales como proteínas de células hospedadoras (HCP, por sus siglas en inglés), ADN, virus, inmovilizando selectivamente o eliminando el polipéptido de doble afinidad de la solución de producto diana.

- 20 En una realización del mismo, la biomolécula objetivo es un anticuerpo.

- Se debe entender que el término anticuerpo, 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 de IgG de la familia de genes VH3 humanos.

Ejemplos

- 30 Los siguientes ejemplos ilustran la presente invención. En resumen, se preparó una serie de enlazadores de acuerdo con la invención y se midieron las capacidades de unión dinámica y las tasas de unión.

- Con más detalle, la biotina se funcionalizó con una amina. Mediante síntesis gradual usando VDMA, los enlazadores se construyeron con un grupo terminal acrílico o amino. Se usó el mismo método para sintetizar versiones más largas del enlazador. En una ruta de síntesis alternativa, los enlazadores de diversas longitudes se sintetizaron usando acoplamiento de amida graduales, de manera similar a los métodos SPPS.

- Los diversos enlazadores se acoplaron o se 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 dependían de las longitudes del enlazador.

Métodos analíticos

- Se realizó un análisis por cromatografía en columna ultrarrápida en un Teledyne ISCO, Combi Flash Rf+ Lumen usando columnas básicas de alúmina RediSepRf o de sílice SiliCycle SiliaSep.

- Se realizó un análisis por HPLC-MS analítica usando un cromatógrafo de líquidos/detector selectivo de masas (MSD) 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 usaban una columna ACE 3 C8 (3,0 x 50 mm) con un gradiente de acetonitrilo en TFA acuoso al 0,1 % durante 3 min 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.

- 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 usando D6-DMSO como disolvente y TMS como referencia. Se usaron nombres comerciales o nombres triviales para los materiales y reactivos comerciales.

EJEMPLO 1

Síntesis de Biotina-C10-eno

- 60 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 calentó a reflujo (5 gramos, Aldrich) en metanol (100 ml) y TsOH (5 mg, Aldrich) durante una noche, a continuación, el volumen de reacción se redujo mediante una destilación suave al vacío en un evaporador rotatorio para producir un aceite transparente del éster metílico de biotina. A continuación, se añadieron 5 ml de 1,2 diaminoetano (Aldrich) en etanol (25 ml), la mezcla se agitó durante una noche y, a continuación, 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 de acuerdo con la H RMN, la LC-MS y la cromatografía de capa fina (TLC) y se usó sin purificación adicional para la adición de VDMA (2-vinil-4,4-dimetil azlactona, n.º de CAS 29513-26-6) en agua en la siguiente etapa.

Véase la figura 3 que ilustra la posición del enlazador de biotina (etilendiamina EDA, alfa-metil alanina 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 a continuación se liofilizó. El producto en bruto (1,56 g) se purificó mediante cromatografía en columna sobre sílice (80 g de sílice, inyección líquida en metanol, DCM/MeOH, 2 VC al 5 %, del 5 al 20 % en 4 VC, del 20 al 60 % en 2 VC, 60 % para 8 VC). Las fracciones combinadas se concentraron. El residuo se disolvió en agua y se liofilizó para producir **Biotina-C10-eno** en forma de un sólido de color blanco (1,2 g, 2,8 mmol, rendimiento: 80 %). Espec. de masas [M + H]⁺ 426 Da.

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

Se usó **Biotina-C10-eno** para el experimento de injerto conjunto iniciado por radicales sobre soportes sólidos como membranas mediante copolimerización con una acrilamida y se podría usar para el acoplamiento de Biotina-C-10-eno a sustratos aminados mediante la adición de Michael al enlace de vinilo terminal.

EJEMPLO 2

Síntesis de Biotina-C10-NH₂

A 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 resistente a la presión cerrado. La solución se liofilizó para obtener 1,0 g de Biotina-C10-NH₂. El compuesto se caracterizó completamente por H RMN, C RMN y LCMS

Véase la figura 5 que ilustra la síntesis de Biotina-C10-NH₂.

EJEMPLO 3

Síntesis de Biotina-C17-eno

Se añadieron 415 mg (3,0 mmol) de VMDA a una solución de Biotina-C10-NH₂, sintetizada como en el ejemplo 2, (1,3 g, 2,9 mmol) en agua (20 ml). La reacción se agitó durante 5 min y a continuación se liofilizó. La solución en bruto (1,61 g) se purificó por cromatografía en columna sobre sílice (columna de sílice de 80 g, inyección de líquido en metanol, DCM/MeOH al 5 % para 2 VC, del 5 al 20 % en 3 VC, del 20 al 60 % en 3 VC, 60 % para 8 VC). Las fracciones que contenían el producto y la VDMA hidrolizada se combinaron y se concentraron mediante una destilación suave al vacío en un evaporador rotatorio. El material se purificó adicionalmente por 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 VC). Las fracciones combinadas se concentraron mediante una 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 de color blanco (425 mg, 0,73 mmol, rendimiento: 32 %). Espec. de masas [M + H]⁺ 582 Da.

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

Se usó **Biotina-C17-eno** para el experimento de iniciado conjunto 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 de vinilo terminal de Biotina-C17-eno

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

EJEMPLO 4

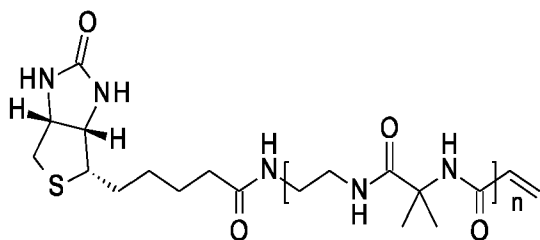
Este ejemplo ilustra la ruta de síntesis para los enlazadores de Biotina de diferentes longitudes (C-10, C-17 y C-24). Dos tipos de ligandos de afinidad (serie A: amino NH₂ terminal y serie B: vinil -eno terminal) con diferente longitud de enlazador (C10, C17 y C24) se sintetizaron usando reacciones de acoplamiento peptídico por HATU/DIPEA y desprotección ortogonal en el extremo N de Fmoc y Boc por piperidina y HCl 2 M. Las etapas finales son el acoplamiento en el extremo N de la biotina como éster de N-hidroxi succinimida (NHS) activo a las moléculas de enlazador peptídico y la desprotección final de N-Boc para la síntesis de las moléculas de enlazador de biotina amino en el extremo N Biotina-C10-NH₂, Biotina-C17-NH₂ y Biotina-C-24-NH₂ (serie A).

Las moléculas de enlazador de biotina, Biotina-C10-eno, Biotina-C17-eno, Biotina-C24-eno con grupo -eno terminales

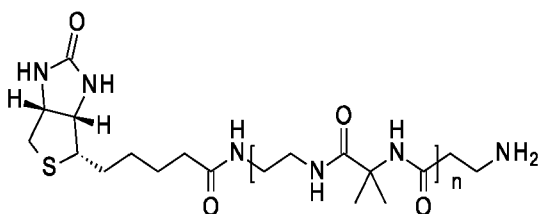
(serie B) se han sintetizado mediante acoplamiento de 2-vinil-4,4-dimetil azlactona VDMA sobre el grupo amino terminal de Biotina-EDA-NH₂, Biotina-C10-NH₂ y Biotina-C17-NH₂ en agua para lograr una molécula de enlazador alargado en C7.

- 5 El primer tipo, denominado Biotina-C10-NH₂, Biotina-C17-NH₂ Biotina-C24-NH₂, tiene un grupo amino terminal (serie A). El segundo tipo, denominado Biotina-C10-eno, Biotina-C17-eno Biotina-C24-eno, tiene un grupo vinil-eno terminal (serie B).

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

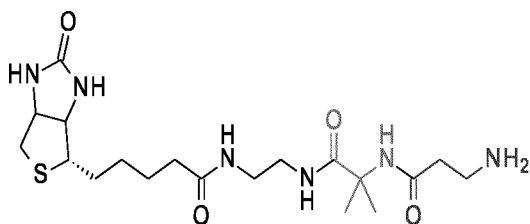


Biotina-C10-eno, Biotina-C17-eno, Biotina-C24-eno.



Biotina-C10-NH₂, Biotina-C17-NH₂ y Biotina-C24-NH₂.

El enfoque usó reacciones de acoplamiento peptídico. La cadena del enlazador está compuesta por tres componentes diferentes: etilendiamina EDA y los dos aminoácidos: α -metil alanina y β -alanina.



La cadena del enlazador está compuesta por etilendiamina EDA, α -metil alanina α -MeAla y β -alanina β -Ala.

A modo de ejemplo, para la síntesis de la serie B, la figura 7 muestra que la adición de 2-vinil-4,4-dimetil azlactona VDMA a Biotina-C10-NH₂ dará el ligando de afinidad Biotina-C17-eno alargado en C7

Síntesis de la serie A con NH₂ terminal (Biotina-C10-NH₂, Biotina-C17-NH₂ y Biotina-C24-NH₂)

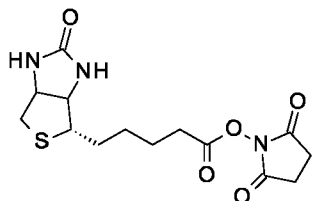
Síntesis de los diferentes componentes básicos usados en la síntesis de los enlazadores de la serie A y la serie B.

Fmoc-EDA-HCl

A una solución de Fmoc-Cl (16,1 g, 62,4 mmol) en diclorometano (300 ml) enfriado con un baño de hielo, se le añadió gota a gota una solución de N-(2-aminoetil)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 de magnesio, 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). La mezcla de reacción se agitó 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 de color blanco.

5 Biotina-NHS



10 A una solución de carbonato de N,N'-disuccinimidilo (12,7 g, 49,5 mmol) y biotina (11,0 g, 45,0 mmol) in 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 de color blanco y se usó sin purificación adicional.

15 Fmoc-EDA-MeAla-NH₂-HCl y Fmoc-EDA-NH₂-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 equiv.). La mezcla de reacción se agitó durante 1 hora y a continuación se concentró. El material en bruto se usó sin purificación adicional.

20 Procedimiento para el acoplamiento de Boc- α -metilalanina

A una solución de Boc- α -metilalanina (1,2 equiv.) y HATU (1,1 equiv.) en acetonitrilo (concentración de aprox. 0,15 M) se le añadió DIPEA (5 equiv.). La mezcla se agitó durante 10 min. A esta mezcla se le añadieron los compuestos amino del extremo N (1 equiv.) 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. De lo contrario, 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 se lavó una vez con salmuera. A continuación, la fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se concentró.

30 Procedimiento para el acoplamiento de Boc- β -alanina

A una solución de Boc- β -alanina (1,2 equiv.) y HATU (1,1 equiv.) en acetonitrilo (concentración de aprox. 0,15 M) se le añadió DIPEA (5 equiv.). La mezcla se agitó durante 10 min. A esta mezcla se le añadió el compuesto amino del extremo N (1 equiv.) 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. De lo contrario, 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 se lavó una vez con salmuera. A continuación, la fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se concentró. En ambos casos, el material en bruto se usó sin purificación adicional.

40 NH₂-EDA-NHBoc

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 a continuación se concentró. La solución se concentró y el producto en 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 en bruto se usó sin purificación adicional.

45 Biotina-EDA-NHBoc

A una solución de NH₂-etilendiamina-NHBoc en acetonitrilo y agua (concentración de aprox. 0,1 M) se le añadió Biotina-NHS (2 equiv.). La mezcla de reacción se agitó durante 30 min y se verificó mediante LCMS. De ser necesario, se añadieron 0,5 equiv. adicionales de Biotina-NHS y la mezcla se agitó durante 1 hora. La mezcla se concentró en un evaporador rotatorio y se purificó mediante cromatografía sobre sílice (inyección de líquido en metanol; DCM en 2 VC, DCM/MeOH del 0 al 60 % en 14 VC).

55 Biotina-EDA-NH₂-HCl

A Biotina-Etilendiamina-NHBoc se le añadió una solución 2 M de HCl en agua. La mezcla de reacción se agitó durante una noche y se concentró. El material en bruto se disolvió de nuevo en metanol y se concentró. El sólido se secó al vacío.

Síntesis de la serie A con NH₂ terminal (Biotina-C10-NH₂, Biotina-C17-NH₂ y Biotina-C24-NH₂)**Biotina-C10-NH₂**

5 Biotina-C10-NH₂ (figura 5) se ha sintetizado mediante una serie de reacciones de acoplamiento peptídico que comienzan con el acoplamiento HATU de Boc-MeAla y la etilendiamina protegida con N-Fmoc, Fmoc-EDA, en acetonitrilo para formar FmocNH-EDA-MeAla-NHBoc. El grupo protector N-Boc terminal se eliminó con HCl 2 M para formar el grupo amino en el extremo N Fmoc-EDA-MeAla-NH₂. Fmoc-EDA-MeAla-NH₂ se acopló a BocNH-β-alanina para formar Fmoc-EDA-MeAla-β-Ala-NHBoc. El grupo terminal Fmoc se eliminó con piperidina al 20 % en acetonitrilo para formar el grupo amino terminal. A continuación, biotina-NHS se acopló a NH₂-EDA-MeAla-β-Ala-NHBoc en acetonitrilo-agua a temperatura ambiente y, finalmente, el grupo NHBoc se eliminó con HCl 2 M a temperatura ambiente para sintetizar Biotina-C10-NH₂ con el grupo amino terminal. La ruta de síntesis se describe en la figura 7. El compuesto Biotina-C10-NH₂ se caracterizó completamente por H RMN, C RMN y LC-MS. El peso de la fórmula es 479,04, la masa medida es 478,21.

Biotina-C17-NH₂

La síntesis de Biotina-C17-NH₂ (figure 8) siguió las mismas reacciones de acoplamiento peptídico por HATU/DIPEA, desprotección de Boc con HCl 2 M, desprotección de Fmoc con piperidina y biotilación con Biotina-NHS como se describe para Biotina-C10-NH₂

El grupo protector Boc de Fmoc-EDA-MeAla-β-Ala-NHBoc (enlazador C-10) se eliminó mediante tratamiento con HCl 2 M para formar Fmoc-EDA-MeAla-β-Ala-NH₂. A continuación, el grupo amino terminal se acopló a Boc-MeAla por HATU/DIPEA en acetonitrilo. El grupo protector Boc terminal se eliminó con HCl 2 M y a continuación se acopló a β-Ala-NHBoc por acoplamiento por HATU/DIPEA. A continuación, el grupo Fmoc se eliminó con piperidina al 20 % en acetonitrilo, la biotina se acopló al grupo NH₂ terminal como éster activo de NHS y, finalmente, el grupo Boc terminal se eliminó con HCl 2 M para formar la molécula de enlazador de afinidad Biotina-C17-NH₂. Por último, después de la desprotección de Biotina-C17-NHBoc, se obtuvieron 1,5 g de producto con un rendimiento general del 31 % (10 etapas). El compuesto se caracterizó completamente por H RMN, C RMN y LC-MS. El peso de la fórmula es 635,22, la masa medida es 634,31.

Biotina-C24-NH₂

La síntesis de Biotina-C24-NH₂ (figure 10) siguió las mismas reacciones de acoplamiento peptídico por HATU/DIPEA, desprotección de Boc con HCl 2 M, desprotección de Fmoc con piperidina y biotilación con Biotina-NHS como se describe para Biotina-C10-NH₂ y Biotina-C17-NH₂.

El grupo protector Boc de Fmoc-EDA-MeAla-β-Ala-MeAla-β-Ala-NHBoc (enlazador C-17) se eliminó primero mediante tratamiento con HCl 2 M para formar Fmoc-EDA-MeAla-β-Ala-MeAla-β-Ala-NH₂. A continuación, el grupo amino terminal se acopló de nuevo a Boc-MeAla por HATU/DIPEA en acetonitrilo. El grupo protector Boc terminal se eliminó de nuevo con HCl 2 M y a continuación se acopló a β-Ala-NHBoc por acoplamiento por HATU/DIPEA. A continuación, el grupo Fmoc se eliminó con piperidina al 20 % en acetonitrilo, la biotina se acopló al grupo NH₂ terminal como éster activo de NHS y, finalmente, el grupo Boc terminal se eliminó con HCl 2 M para formar la molécula de enlazador de afinidad Biotina-C24-NH₂. Con la experiencia de la síntesis de Biotina-C10-NH₂ y Biotina-C17-NH₂, esta síntesis de Biotina-C24-NH₂ dio como resultado 2 g de material que se obtuvieron con un rendimiento general del 30 % (14 etapas). El compuesto se caracterizó completamente por H RMN, C RMN y LC-MS. El peso de la fórmula es 791,40, la masa medida es 790,39.

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-NH₂, Biotina-C10-NH₂ o Biotina-C17-NH₂ 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 sobre sílice (inyección de líquido en metanol, DCM en 2 VC, DCM/MeOH del 0 al 20 % en 5 VC, del 20 al 40 % en 3 VC, del 40 al 60 % en 1 VC y el 60 % para 3 VC). Las fracciones combinadas 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-dimetil azlactona VDMA al grupo amino terminal de biotina-EDA-NH₂ en agua. Biotina-C10-eno se purificó finalmente mediante cromatografía sobre sílice y se caracterizó completamente por H RMN, C RMN y LC-MS. El peso de la fórmula es 425,55, la masa medida es 425,21.

Biotina-C17-eno

Por consiguiente, se sintetizó Biotina-C17-eno (figura 7) con un grupo vinilo terminal mediante la adición de 2-vinil-4,4-dimetil azlactona VDMA al grupo amino terminal de biotina-C10-NH₂ en agua. Biotina-C17-eno se purificó finalmente mediante cromatografía sobre sílice y se caracterizó completamente por H RMN, C RMN y LC-MS. El peso de la fórmula es 581,73, la masa medida es 581,31

5 Biotina-C24-eno

Se pudo sintetizar Biotina-C24-eno (figura 9) con un grupo vinilo terminal siguiendo la misma estrategia: La adición de 2-vinil-4,4-dimetil azlactona VDMA al grupo amino terminal de Biotina-C17-NH₂ en agua dio como resultado la formación del ligando de afinidad de Biotina-C24-eno alargado en C7 casi cuantitativamente. Biotina-C24-eno se purificó finalmente mediante cromatografía sobre sílice y se caracterizó completamente por H RMN, C RMN y LC-MS. El peso de la fórmula es 737,91, la masa medida es 737,39

15 EJEMPLO 5

25 Aminación del sustrato de perlas

Las perlas WorkBeads 40/10.000 ACT (Bio-Works AB) que contenían grupos de bromohidrina reactivos se trataron con 1,2-diamino etano (5 % en agua) a temperatura ambiente durante una noche. Las perlas se lavaron con agua y un tampón de trietilamina (50 mM). Las perlas funcionalizadas con amina primaria resultantes se usaron para acoplar el medio y los enlazadores de longitud larga con biotina.

25 EJEMPLO 6

25 Acoplamiento de Biotina-C10-eno o Biotina-C17-eno a sustrato aminado:

El sustrato aminado (ejemplo 5) se mezcló con Biotina-C10-eno o Biotina-C17-eno sintetizadas como se describe en el ejemplo 1 y 3, respectivamente (50 nmol/ml de soporte aminado) en trietilamina 50 mM (2 ml/ml de soporte aminado) durante 6 horas. La reacción se detuvo mediante un lavado con agua abundante para evitar cualquier fuga.

Los dos tipos resultantes de perlas con **Biotina-C10** o **Biotina-C17** pueden usarse para la purificación de, por ejemplo, un anticuerpo mediante la captura de moléculas de polipéptido de doble afinidad (DAP) o polipéptido de unión a diana (TBP) de acuerdo con 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.

35 EJEMPLO 7

40 Acoplamiento de Biotina-C10-NH₂, Biotina-C17-NH₂ y Biotina-C24-NH₂ sobre resina de agarosa con activación con bromohidrina

- Se transfirieron perlas BioWorks Work Beads 40/10.000 ACT (4 ml, 150 µmol/ml activados con bromohidrina, suspensión al 50 % en etanol/agua al 20 %) a un filtro de vidrio, se drenaron para etanol al 20 %/agua, se lavaron varias veces con agua y se secaron por succión durante 5 min.
- Biotina-C10 (8,8 mg, 20 µmol), Biotina-C17 (12,0 mg, 20 µmol) y Biotina-C24 (15,1 mg, 20 µmol) se disolvieron cada una en 4 ml de tampón 0,1 M de Na₂CO₃/NaHCO₃, pH = 9,3. A continuación, se añadió la solución de Biotina-C10-NH₂, Biotina-C17-NH₂ y Biotina-C24-NH₂ (4 ml) a la resina Work Beads (4 ml) en un vial de plástico de 10 ml, respectivamente.
- A continuación, la solución se colocó en un mezclador rotatorio y se agitó durante 16 h a temperatura ambiente.
- A continuación, las resinas se transfirieron a un filtro de vidrio y se drenaron para las soluciones de Biotina-C10-NH₂, Biotina-C17-NH₂ y Biotina-C24-NH₂. A continuación, las WorkBeads biotiniladas drenadas se lavan con agua (10x) y se incuban con 5 ml de solución de etanolamina 1 M para inactivar los grupos activadores de bromohidrina restantes en la agarosa. A continuación, las resinas se agitan en el mezclador rotatorio durante 8 h.
- Finalmente, las resinas se transfieren a un filtro de vidrio, se drenan para el reactivo de protección etanolamina 1 M, se lavan con agua (10 x), con HCl 0,1 M (5 x) y con agua (10x), etanol al 20 % (5x) y se secan por succión.
- Las preparaciones de resina biotinilada se almacenaron en etanol al 20 % como suspensión al 50 %.

Estas resinas de agarosa biotiniladas con el enlazador Biotina-C10-NH-, Biotina-C17-NH- y Biotina-C24-NH se ensayan para determinar los estudios de capacidad de unión dinámica y de tasa de unión con DAP.

60 EJEMPLO 8

Medición de la capacidad de unión dinámica (DBC)

Para determinar la DBC de DAP o TBP al enlazador de biotina acoplado a la superficie del 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 ocurrir más allá de la cobertura de la 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 solvente y la superficie.

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

Usando la isoterma de Langmuir, la unión del DAP a la superficie de la biotina se puede describir como:

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

Que se puede reorganizar en:

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

Donde q^* es la masa de DAP unido expresada como mg de DAP unido por ml de perlas de resina de biotina o membrana, C^* es la concentración de equilibrio de DAP en solución, DBC es la capacidad de unión máxima y k es la constante de equilibrio de adsorción. (ref: Beier *et al.*, Adsorption of Amylase Enzyme on Ultrafiltration Membranes, *Langmuir* (2007), vol. 23, págs. 9341-51)

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

El sustrato sólido (0,25 ml) se puso en una columna Omnifit (6,6 mm/100 mm) (Diba Industries Inc., Danbury, CT, EE. UU.) y se equilibró con citrato 0,3 M a pH 3,5, Tween 20 al 0,1 %. Se usó un Äkta Pure (GE Healthcare, Chicago, IL, EE. UU.) para cargar 10 ml de solución de DAP a concentraciones de 1,8, 1,4, 1,1 y 0,9 mg/ml, respectivamente, en la columna Omnifit que contenía el sustrato sólido funcionalizado. El caudal de la bomba se estableció en 1,0 ml por minuto, lo que corresponde a un tiempo de residencia t en la columna de 15 segundos. Después de lavar el DAP no unido y recoger la fracción de flujo continuo, se analizó el contenido de DAP usando 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) en el sustrato sólido se calculó restando el contenido de DAP en la solución de flujo continuo del contenido de DAP inicial en solución. Los datos recopilados de los experimentos se usaron 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 usado 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 a partir del análisis de los sustratos sólidos funcionalizados con Biotina-C10, Biotina-C17 y Biotina-C24. A partir de la tabla se desprende claramente que el sustrato sólido funcionalizado con Biotina-C17 produce la DBC más alta.

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

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

EJEMPLO 9

Tasa de unión (tiempo de residencia)

Los sustratos sólidos funcionalizados preparados como se ha descrito en los Ejemplos anteriores se analizaron más a fondo para comprender si el tiempo de residencia afectará a la DBC. Para cada velocidad de la bomba, se determinó la DBC como se ha indicado anteriormente en el ejemplo 8. El caudal de la bomba se varió 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 ha descrito 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.

El sustrato sólido funcionalizado con Biotina-C17 proporciona una DBC máxima en comparación con los demás enlazadores de biotina.

También se observa que la DBC para Biotina-C17 es casi constante (menos del 4 % de reducción), lo que significa que la tasa de unión es mucho más rápida para Biotina-C17 en comparación con el otro enlazador ensayado. Biotina-C10 y Biotina-C24 tienen una reducción de DBC del 20 % y el 10 %, respectivamente, en el intervalo medido de tiempos de residencia.

Compuesto	Densidad de acoplamiento	Número de átomos espaciadores	Tiempo de residencia (s)	DBC (mg/ml)
Biotina-C10	5 μ mol/ml	C10	30	45,2
Biotina-C10	5 μ mol/ml	C10	15	43,3
Biotina-C10	5 μ mol/ml	C10	7,5	36,8
Biotina-C17	5 μ mol/ml	C17	30	50,0
Biotina-C17	5 μ mol/ml	C17	15	49,1
Biotina-C17	5 μ mol/ml	C17	7,5	47,9
Biotina-C24	5 μ mol/ml	C24	30	38,6
Biotina-C24	5 μ mol/ml	C24	15	34,6
Biotina-C24	5 μ mol/ml	C24	7,5	34,6

Tabla 2. Resumen de la capacidad de unión dinámica ("DBC", mg/ml) medida del sustrato sólido funcionalizado con Biotina-C10, Biotina-C17 y Biotina-C24 a caudales de 0,5, 1,0 y 2,0 ml/minuto, lo que corresponde a un tiempo de residencia de 30, 15 y 7,5 segundos, respectivamente. El sustrato sólido funcionalizado con Biotina-C17 produce una DBC más alta en todos los tiempos de residencia medidos y se ve afectado solo 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**

Injerto conjunto iniciado por radicales de tres enlazadores de longitudes diferentes: *Biotina-C10-eno*, *Biotina-C17-eno* o *Biotina-C24-eno*, respectivamente, con N,N-dimetilacrilamida sobre láminas de membrana de éter de polisulfona (3M).

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

El homopolímero lavado se recogió y se usó para aproximar la longitud del polímero injertado mediante SEC. La distribución del homopolímero fue amplia, con un peso molecular aproximado de 500 a 25000 Da, en comparación con un estándar de PM.

Las tres membranas diferentes resultantes con poli(acrilamida) extraída y **Biotina-C10**, **Biotina-C17** y **Biotina-C24** se lavaron exhaustivamente con agua caliente (60 °C) para eliminar cualquier homopolímero y evitar fugas posteriores.

Las membranas resultantes estaban físicamente intactas, aunque ligeramente amarillentas, y tenían un copolímero injertado que consistía en una cadena principal de poli(acrilamida) y ramificaciones semirrígidas de diferentes longitudes. Las ramificaciones (peine) eran diferentes de la cadena principal.

Las diferentes membranas con injertos de poli(acrilamida) con enlazadores de diferentes longitudes desde los puntos de ramificación (peine) se ensayaron en una configuración similar al ejemplo 8. Las membranas se cortaron en trozos pequeños (aprox. 2 x 2 mm) y se empaquetaron en la columna Omnitrit.

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

REIVINDICACIONES

1. Un sustrato funcionalizado con ligando que comprende:

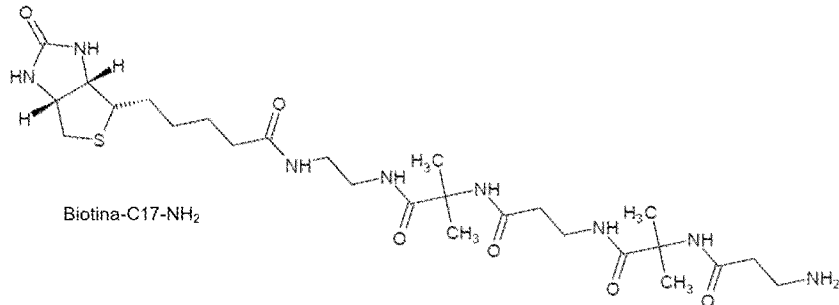
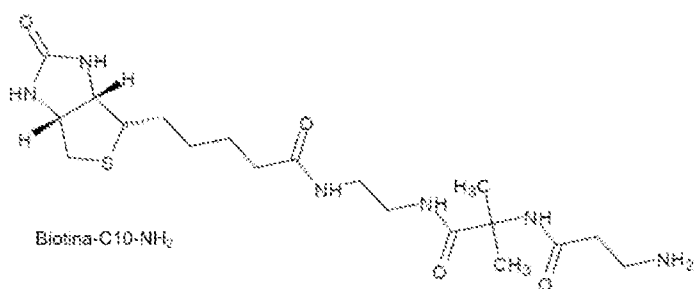
- 5 a. Un sustrato que tiene grupos carboxílicos (-COOH), hidroxi (-OH), tio (-SH), amino (-NH₂), dobles enlaces C-C (-eno) o triples enlaces C-C (-ino) en la superficie del mismo, en donde el sustrato es un sustrato sólido;
- b. Unido covalentemente a dichos grupos carboxílicos (-COOH), hidroxi (-OH), tio (-SH), amino (-NH₂), dobles enlaces C-C (-eno), triples enlaces C-C (-ino) de dicho sustrato, un enlazador

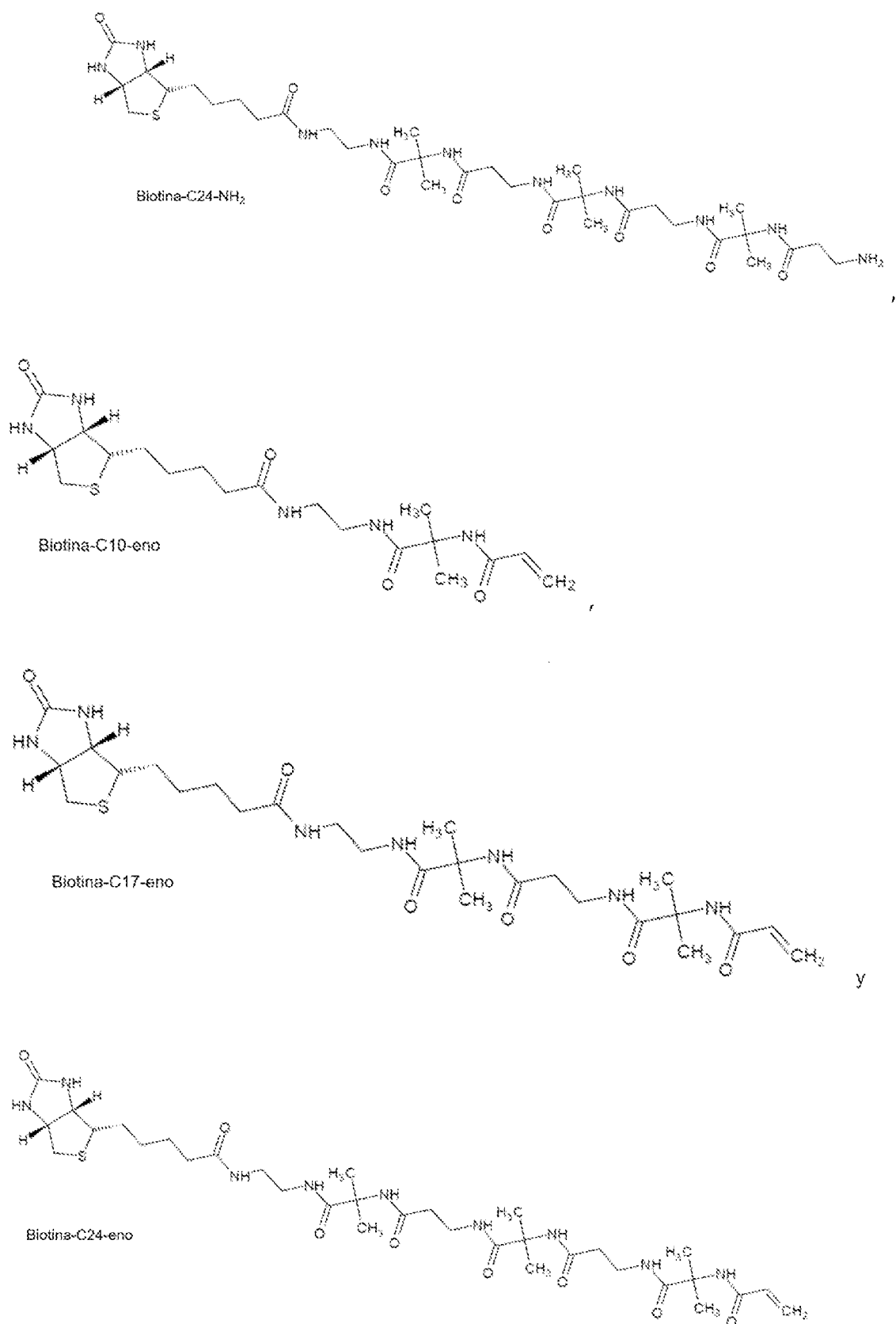
10 y

c. Un grupo funcional de ligando

en donde dicho grupo funcional de ligando y dicho enlazador se seleccionan del grupo que consiste en:

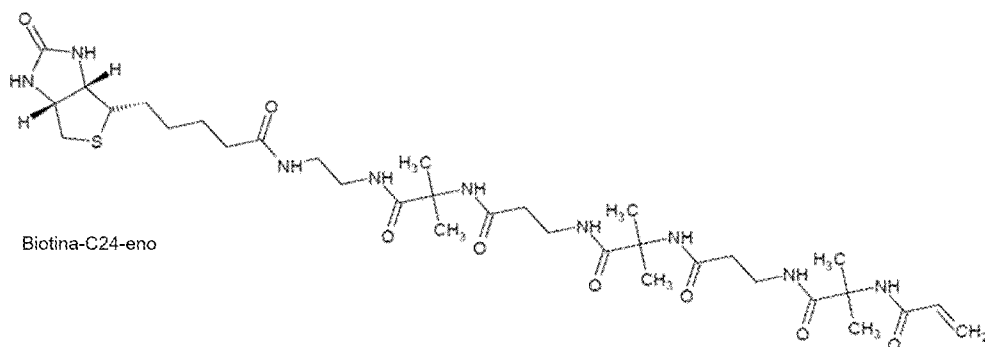
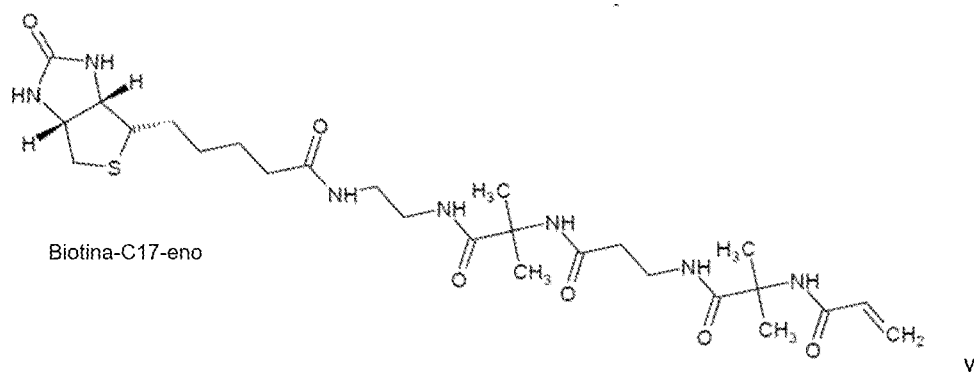
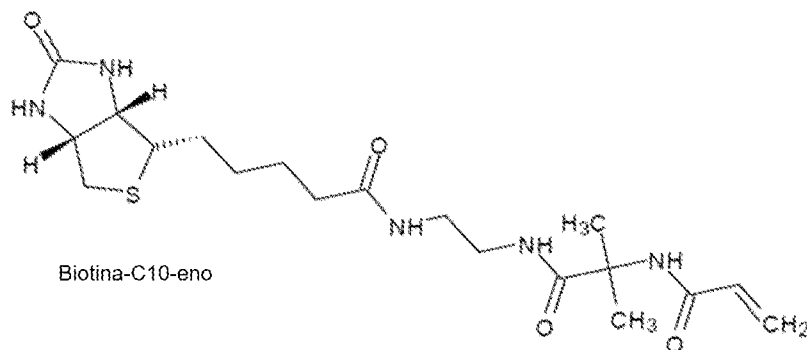
15





2. El sustrato funcionalizado con ligando de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el sustrato está injertado mediante polimerización de vinilo iniciada por radicales.

3. El sustrato funcionalizado con ligando de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el sustrato se selecciona del grupo que consiste en agarosa, tal como en forma de resina o perlas, tierra de diatomeas, gel de sílice, celulosa, éteres de celulosa, carboximetilcelulosa, celulosa degenerada, membranas a base de agarosa o papel, nitrocelulosa, ésteres mixtos de nitrocelulosa, sílices y vidrios de poro controlado, poliamidas, éter de polisulfona, alcoholes polivinílicos, policarbonato, poliuretano, polietersulfona, polisulfona, tereftalato de polietileno, fluoruro de polivinilideno, poliestireno o polipropileno, polietileno y copolímeros de bloque, mezclas y combinaciones de los mismos.
- 5
4. El sustrato funcionalizado con ligando de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho grupo funcional de ligando y dicho enlazador se seleccionan del grupo que consiste en:
- 10

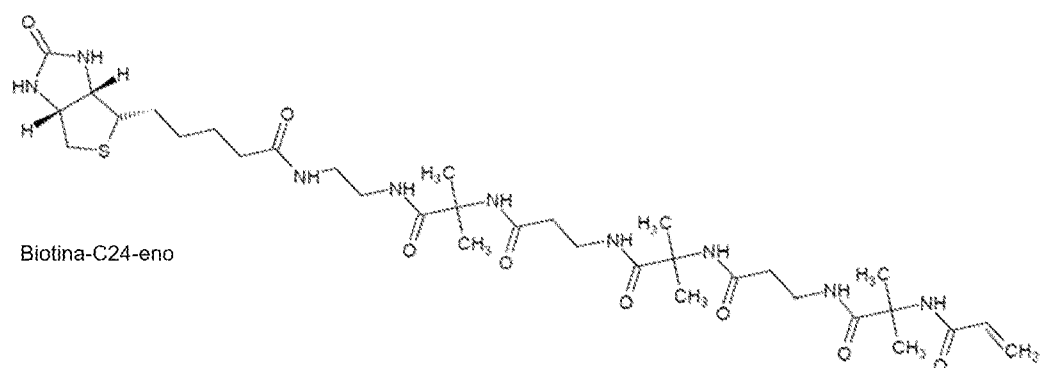
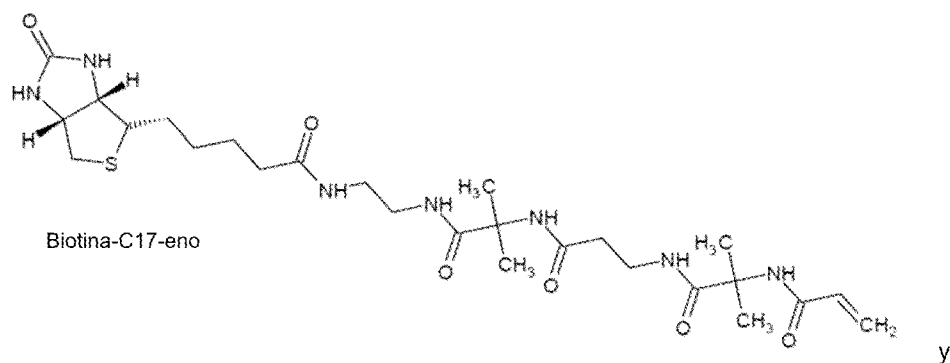
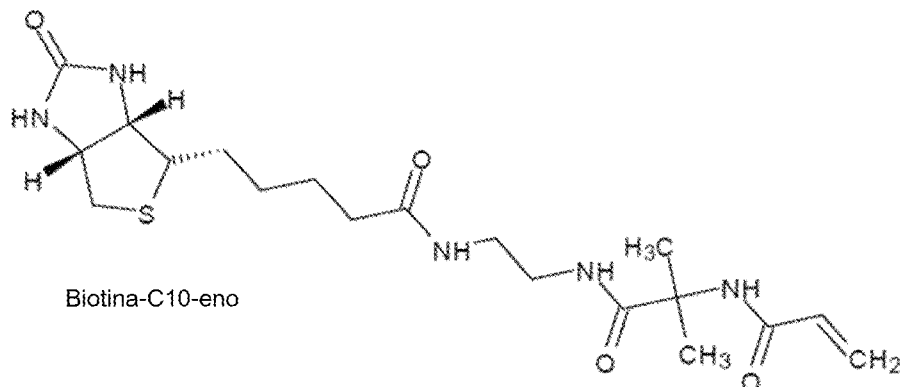


- 15
5. El sustrato funcionalizado con ligando de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el sustrato está injertado mediante polimerización de vinilo iniciada por radicales.
- 20
6. El sustrato funcionalizado con ligando de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el sustrato es éter de polisulfona.
7. Un método para la preparación del sustrato funcionalizado con ligando como se define en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende (a) activar el sustrato químicamente o introduciendo un radical, y (b)

acoplar el ligando al sustrato directamente a través del enlazador o mediante copolimerización por radicales usando dos o más monómeros acrílicos, de los cuales al menos uno contiene un ligando,

en donde el monómero acrílico que contiene un ligando se selecciona del grupo que consiste en:

5



- 10 8. Un uso de un sustrato funcionalizado con ligando de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para capturar o inmovilizar un compuesto de interés.

Figura 1

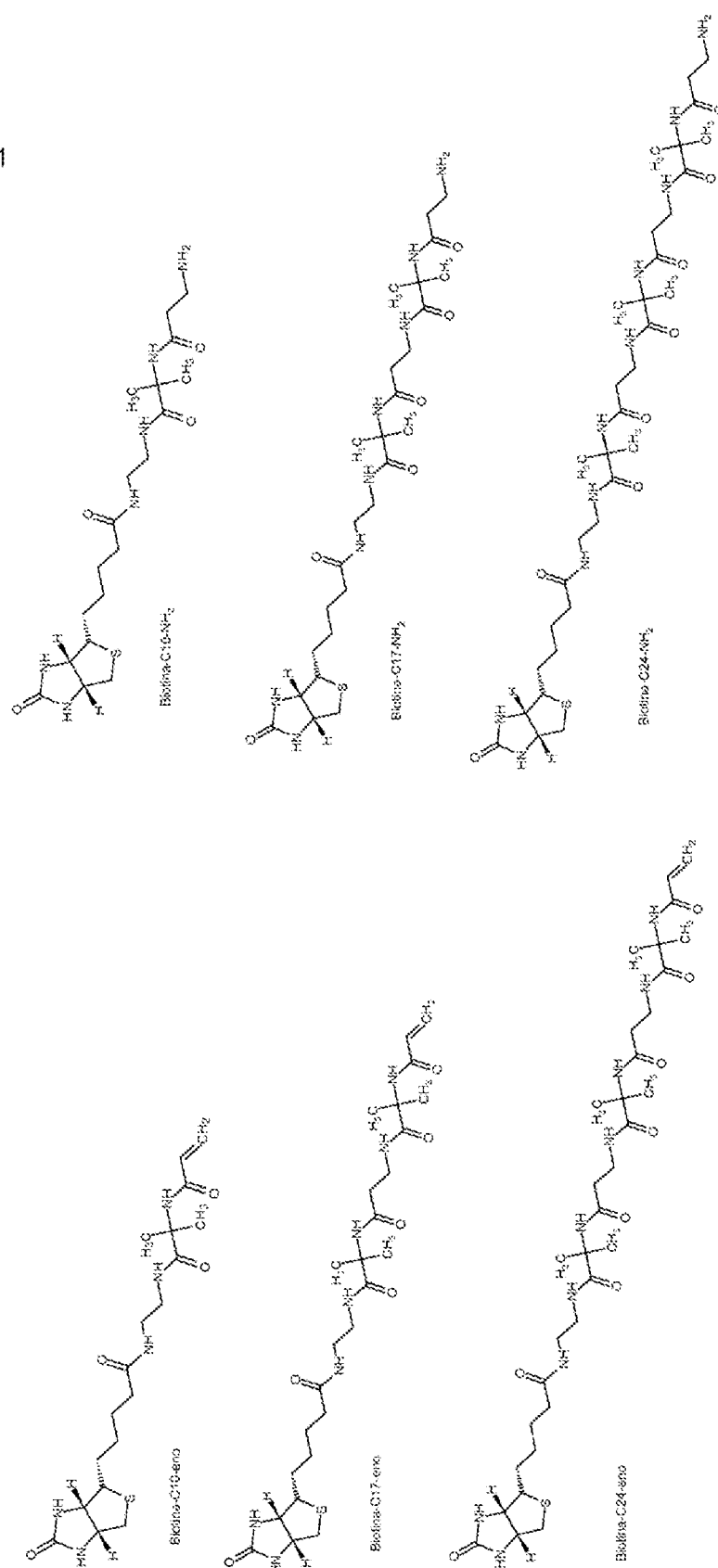
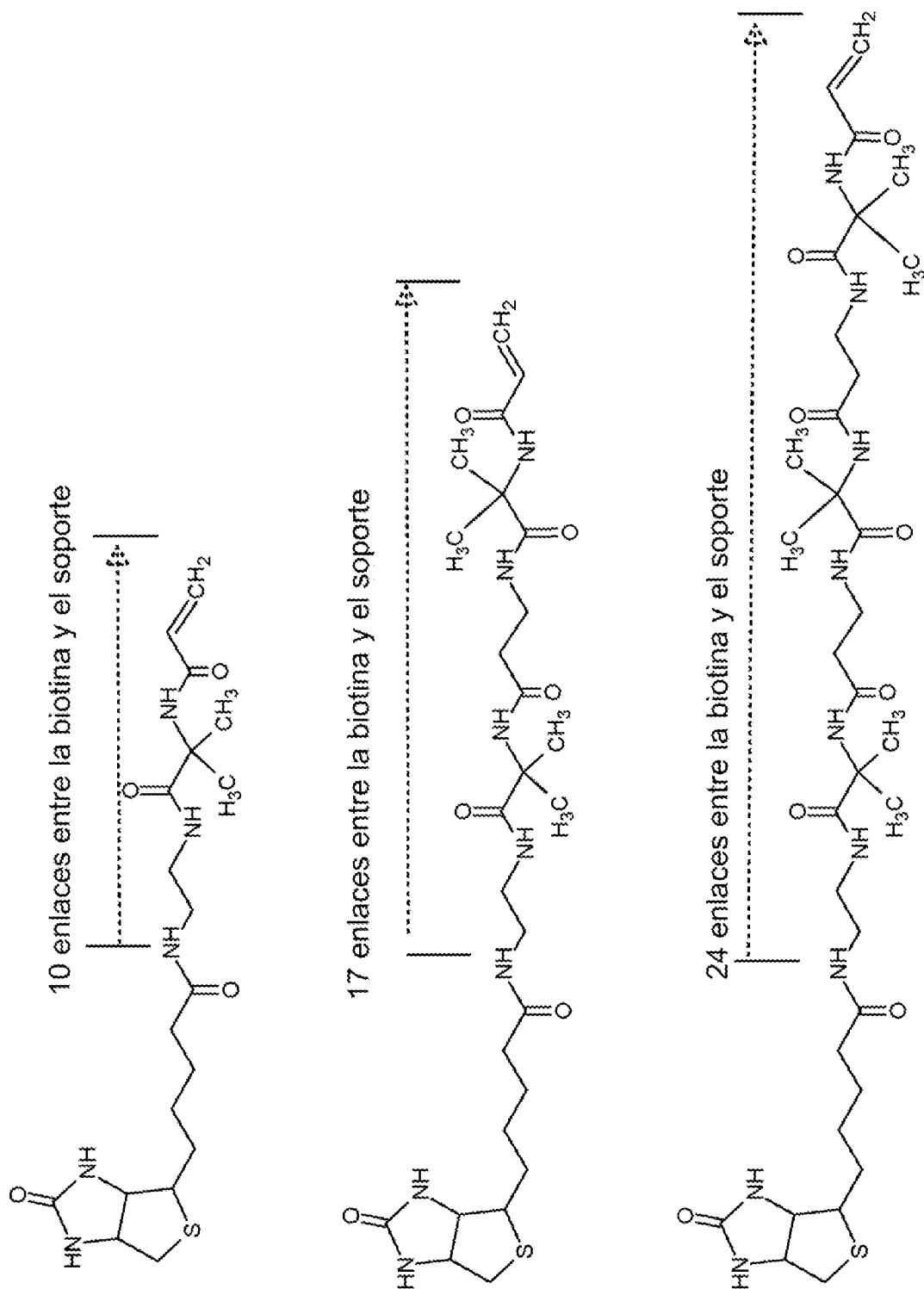
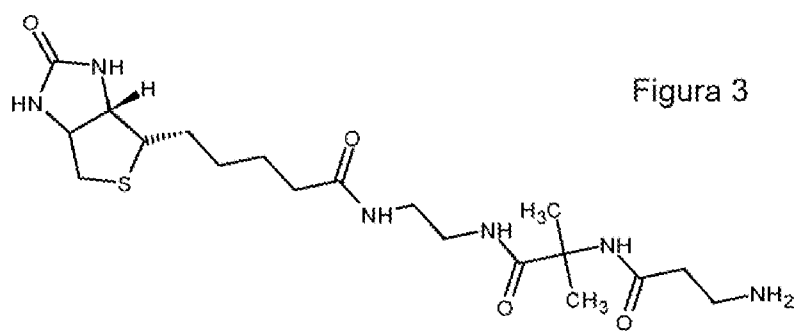


Figura 2





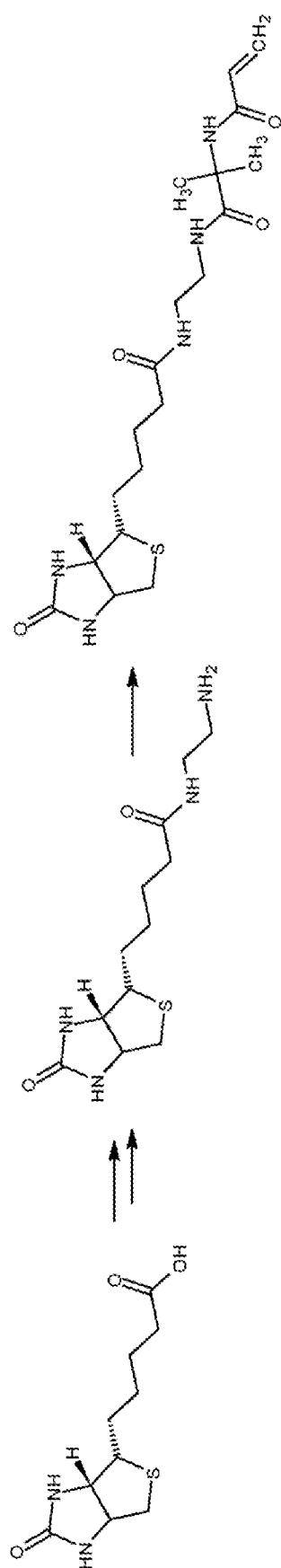


Figura 4

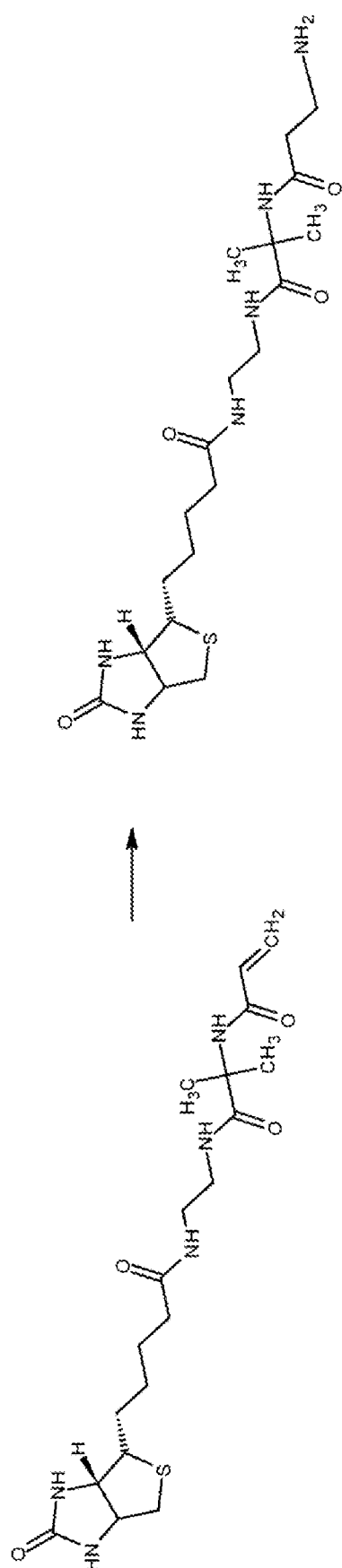


Figura 5

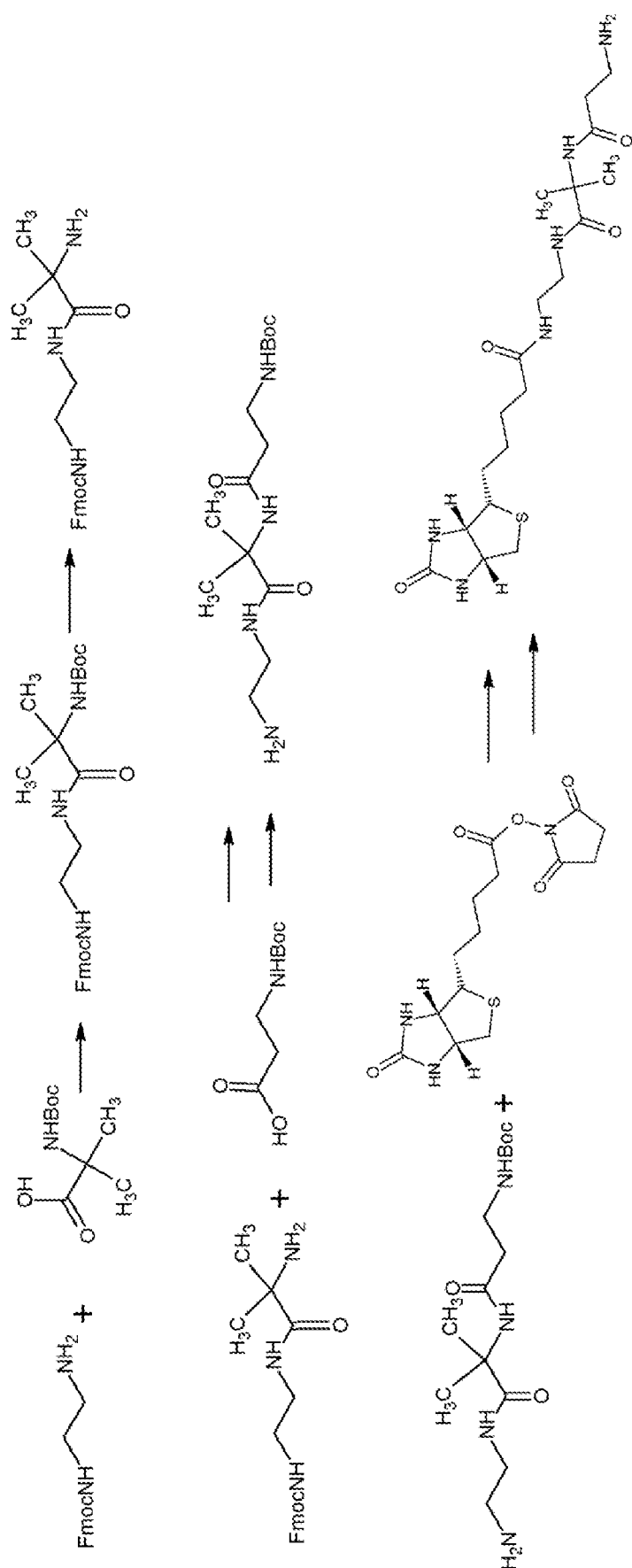


Figura 6

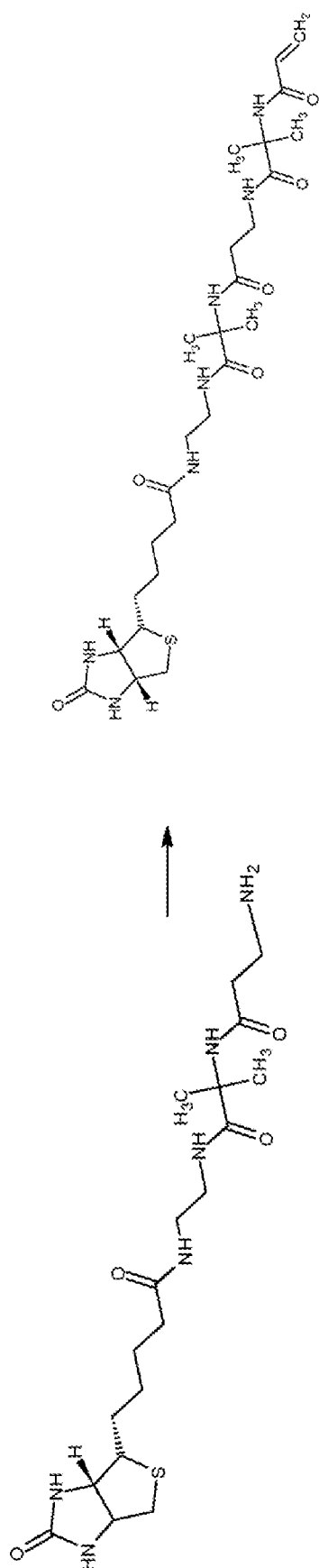


Figura 7

Figura 8

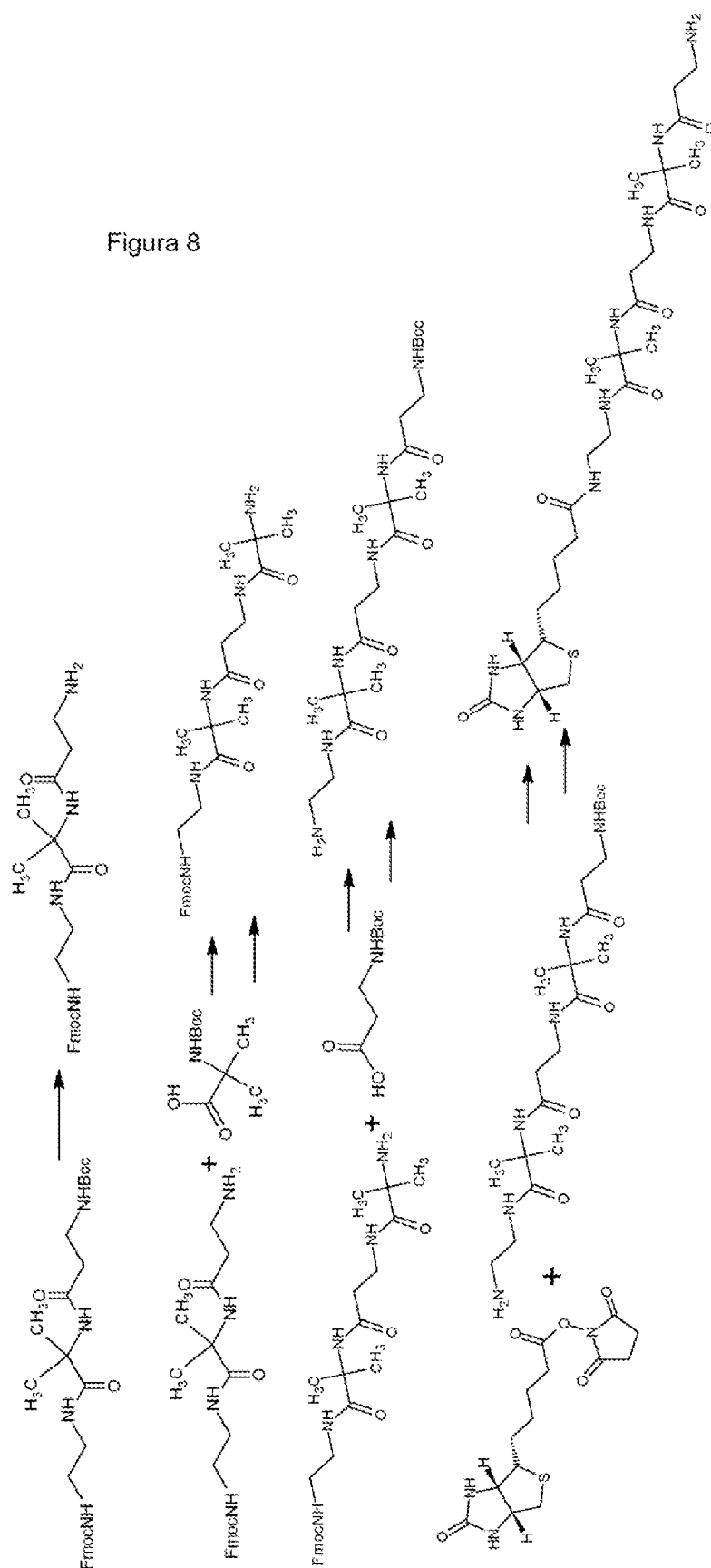


Figura 9

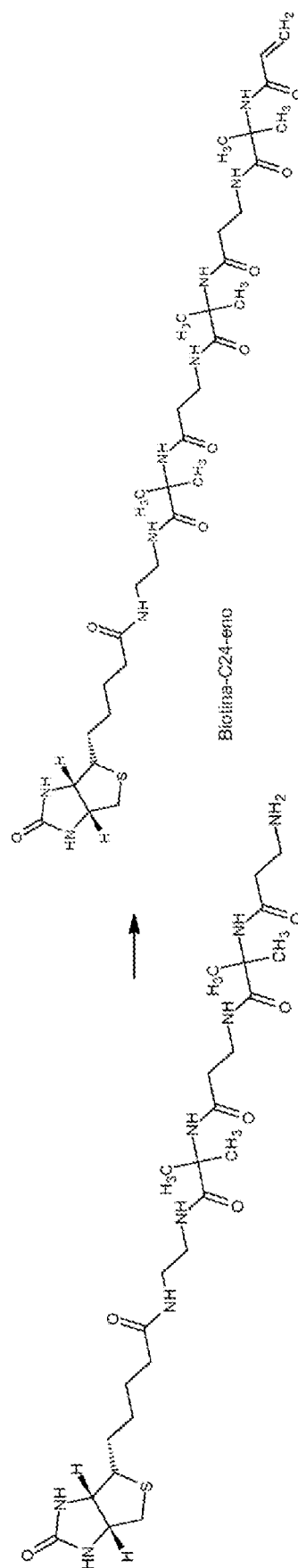


Figura 10

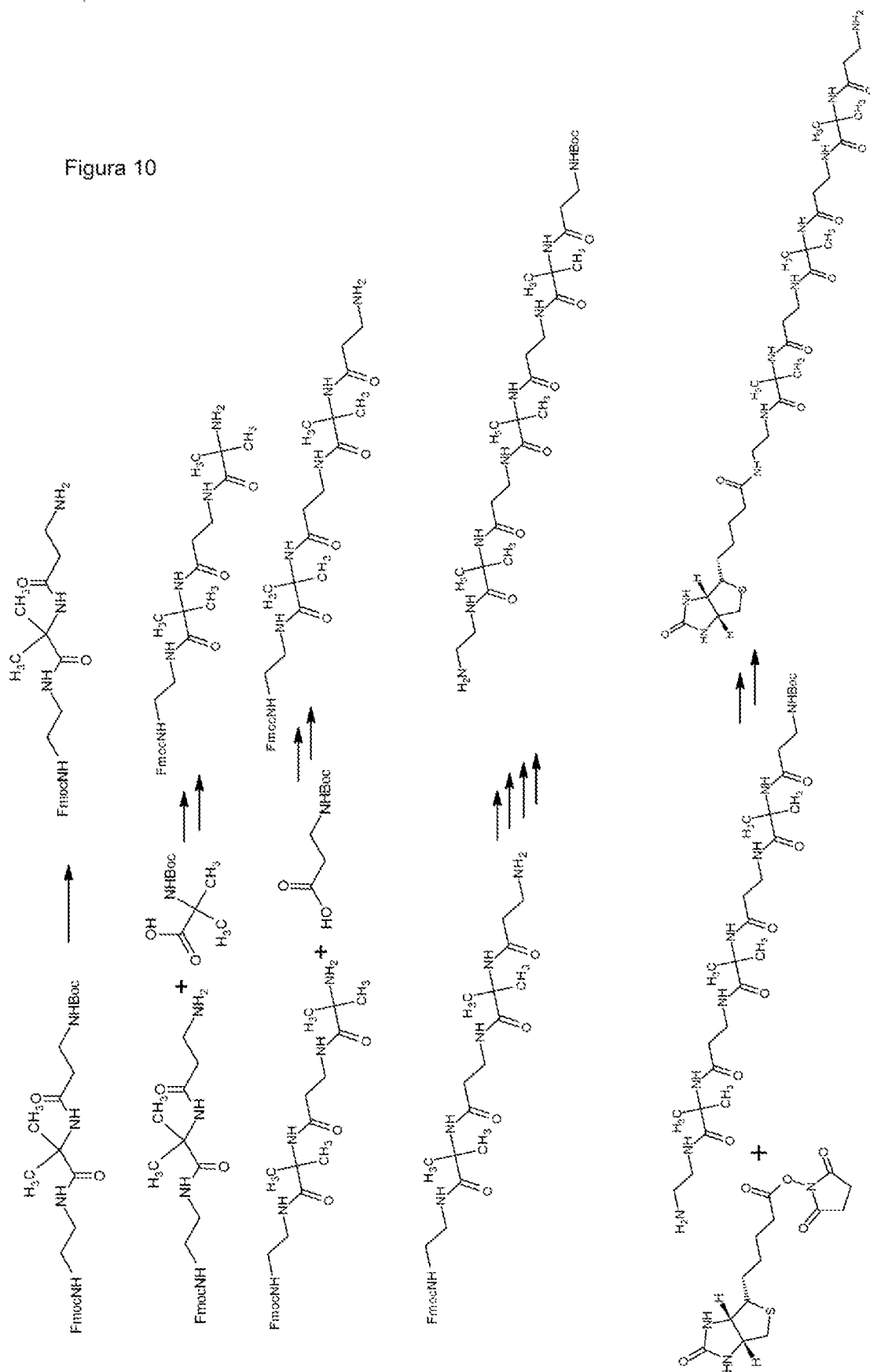
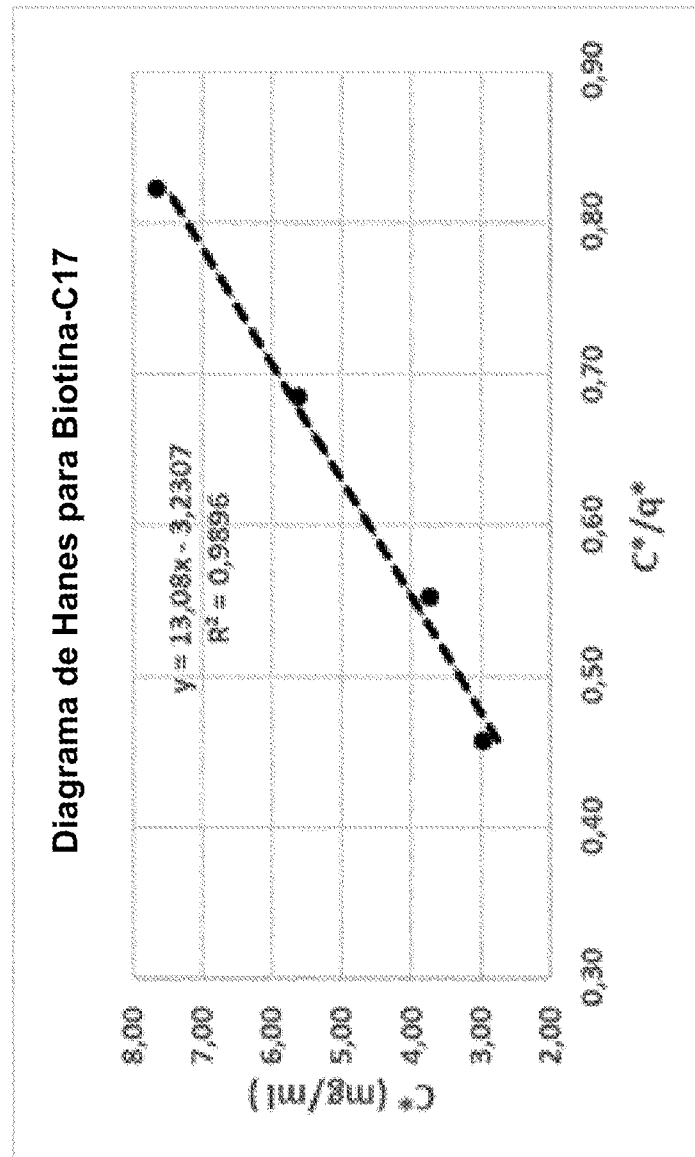


Figura 11



5

10

15