



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 352 779**

② Número de solicitud: 200930242

⑤ Int. Cl.:
C12N 11/08 (2006.01)

C12N 11/10 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **01.06.2009**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **23.02.2011**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
23.02.2011

⑰ Solicitante/s: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)**
Serrano, 117
28006 Madrid, ES

⑱ Inventor/es: **Palomo Carmona, José Miguel;**
Batalla Bosquet, Pilar;
Mateo González, César;
López Gallego, Fernando;
Bilibar Bolívar, Juan Manuel;
Maciello, Marzia;
Guisán Seijas, José Manuel y
Fernández Lorente, Gloria

⑳ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑳ Título: **Complejos covalentes de lipasas con proteínas, sondas de ADN, cofactores u otras biomoléculas.**

㉑ Resumen:

Complejos covalentes de lipasas con proteínas, sondas de ADN, cofactores u otras biomoléculas.

Complejos que comprenden lipasas unidas covalentemente, a través de regiones no involucradas en su centro activo, a biomoléculas de interés (proteínas, como enzimas, anticuerpos o proteínas A o G, cofactores o sondas de ADN). Los complejos se pueden inmovilizar a través del centro activo intacto de las lipasas sobre todo tipo de soportes hidrofóbicos sin necesidad de realizar modificaciones o activaciones en los mismos. La unión de la lipasa a los soportes hidrofóbicos es reversible, lo que permite la inmovilización reversible de los complejos. La invención proporciona dos métodos, químico y biológico, de preparación de estos complejos y un método de inmovilización de los mismos. Estos complejos inmovilizados pueden tener aplicaciones en la industria, en el laboratorio o en diagnóstico, debido a su uso potencial como biocatalizadores o como biosensores. El método químico comprende la adsorción de la lipasa a un soporte hidrofóbico poroso, la conjugación de la lipasa así adsorbida con la biomolécula y desorber este complejo del soporte mediante el uso de detergentes. El método biológico comprende la inserción del gen de la biomolécula en un plásmido conteniendo el gen de la lipasa, en un microorganismo, para que éste exprese la lipasa fusionada a la biomolécula. #La inmovilización reversible de los complejos creados a partir de cualquiera de los dos métodos se puede realizar en soportes hidrofóbicos no porosos.

ES 2 352 779 A1

DESCRIPCIÓN

Complejos covalentes de lipasas con proteínas, sondas de ADN, cofactores u otras biomoléculas.

5 La presente invención se encuadra en el campo de la bioquímica y la biología molecular y se refiere a unos complejos que comprenden lipasas unidas covalentemente, a través de regiones no involucradas en su centro activo, a biomoléculas de interés (proteínas u otras biomoléculas). Los complejos se pueden inmovilizar posteriormente a través del centro activo intacto de las lipasas sobre todo tipo de soportes hidrofóbicos. También se refiere a dos métodos, químico y biológico, de preparación de estos complejos y a un método de inmovilización de los mismos.
10 Estos complejos inmovilizados pueden tener aplicaciones en la industria, en el laboratorio o en diagnóstico, debido a su uso potencial como biocatalizadores o como biosensores.

Estado de la técnica anterior

15 La inmovilización de biomoléculas de interés industrial o biomédico es, en muchos casos, una etapa necesaria en el desarrollo de biocatalizadores y de biosensores. La mayoría de los soportes disponibles para tal fin son de naturaleza hidrofóbica, como por ejemplo, la mayoría de las partículas magnéticas comerciales (como los núcleos de ferrita recubiertos de poliestireno), los nanotubos de carbono, las placas multipocillo, algunas placas para preparar arrays, etc. Sin embargo, la inmovilización de proteínas y otras biomoléculas sobre estas superficies hidrofóbicas genera una serie de problemas, como la inactivación de la biomacromolécula (Mateo, C., *et al.*, 2002, *Biotechnology Progress*, 18:3, 629-634). Además, este tipo de soportes podrían adsorber de forma inespecífica analitos, lo que dificulta su empleo como biosensores. Algunas de estas nanoestructuras se derivatizan con dificultad, incluso una vez derivatizadas no se pueden manipular fácilmente. Es el caso de las nanopartículas magnéticas, que pueden agregar en presencia de codisolventes, alta fuerza iónica, reactivos polifuncionales, etc. Solucionar estos inconvenientes supondría la posibilidad de aplicar, en la industria o en diagnóstico, estas biomacromoléculas inmovilizadas.

Por otro lado, el desarrollo de técnicas de inmovilización reversibles aportaría una serie de ventajas en la inmovilización de biomoléculas. Por ejemplo, cuando el soporte es muy caro o el reactor muy complejo, la posibilidad de reutilización sería interesante (You, C., *et al.*, 2009, *Talanta*, 78:3, 705-710).

30 Se han desarrollado métodos de inmovilización covalente de biomoléculas sobre *carriers* y membranas en presencia de His-Tag, cuyos residuos de aminoácidos están directamente implicados en la unión covalente. Para aumentar la probabilidad de inmovilización se puede incrementar la hidrofobicidad de la membrana (EP0991944 A1).

35 Por otro lado, la unión no específica de las biomoléculas a los nanotubos de carbono se puede superar mediante la unión de las proteínas diana a cadenas de óxido de polietileno presentes en los nanotubos (Robert J. Chen, 2003, *PNAS*, 100:9, 4984-4989).

Otra aproximación es el recubrimiento de las nanopartículas con sílice para la unión de biomoléculas activas, como anticuerpos, enzimas o nucleótidos, para marcar células, detectar y/o aislar moléculas de ácidos nucleicos que tienen secuencias nucleotídicas específicas, etc. (WO03089906 A2).

45 La regeneración de cofactores como NAD, NADP, NADPH, ATP, UDP, etc., es un problema en el diseño de multitud de biotransformaciones. Una solución pasa por la inmovilización del cofactor en nanopartículas no porosas, usando las enzimas implicadas en el proceso también en este tipo de soporte (Liu, W., *et al.*, 2009, *Journal of Biotechnology*, 139:1, 102-107). No obstante, sería necesario disponer de cofactores inmovilizados en partículas de forma reversible, de manera que se simplifiquen los sistemas de reciclado de estas moléculas.

50 En el caso de las enzimas, en aquellas que deben actuar sobre sustratos insolubles (como celulasas o proteasas), sería interesante el uso de nanopartículas no porosas para inmovilizar grandes cantidades de estas enzimas en la superficie del soporte y poder realizar este tipo de reacciones. Sin embargo, su pequeño tamaño hace que su manejo sea complicado. El uso de partículas magnéticas sería una simplificación, pero dado su elevado precio es un sistema de difícil uso a corto plazo. Además, la mayoría de las nanopartículas que son estables son hidrofóbicas, lo que provoca su agregación y la posible inactivación de las biomacromoléculas inmovilizadas sobre ellas.

55 Las lipasas presentan una gran afinidad por las superficies hidrofóbicas (Bastida, A., *et al.*, 1998, *Biotechnology and Bioengineering*, 58:5, 486-493) y existen en la naturaleza en dos conformaciones. Tienen su centro activo en un bolsillo extremadamente hidrofóbico y realizan sus funciones en la interfase de las gotas de sus sustratos (gotas de aceite). En medios acuosos homogéneos, la forma mayoritaria de las lipasas es aquella en la que el centro activo se encuentra aislado del medio por una cadena polipeptídica llamada "lid", siendo considerada inactiva. En presencia de superficies hidrofóbicas, las lipasas sufren un cambio conformacional, adsorbiéndose a ellas a través de la cara interna del lid (que es hidrofóbica) y de las zonas hidrofóbicas que rodean al centro activo, lo que conduce a una fuerte adsorción. Un ejemplo de ello es que las lipasas pueden exponerse a concentraciones del 30-40% de codisolventes orgánicos sin que sean liberadas al medio. Sin embargo, a pesar de esta gran afinidad por los soportes hidrofóbicos, éstos pueden ser fácilmente recuperados sin necesidad de inducir en ellos modificaciones, sino simplemente lavándolos con altas concentraciones de detergentes, que son capaces de liberar las lipasas (Bastida, A., *et al.*, 1998, *Biotechnology and Bioengineering*, 58:5, 486-493).

El desarrollo de métodos sencillos de inmovilización de biomoléculas sobre nanoestructuras y otros soportes hidrofóbicos es fundamental para poder llevar a cabo las aplicaciones de las mismas. Estos métodos deben permitir la unión selectiva de la biomolécula de interés, es decir, sin que existan interacciones inespecíficas con otras moléculas, ya que de otra manera sus aplicaciones como biocatalizadores o como biosensores se encontrarían muy limitadas. Además, en algunos casos sería interesante que estos métodos permitieran la reutilización del soporte una vez que ha sido utilizado.

Descripción de la invención

La presente invención proporciona unos complejos que comprenden lipasas unidas covalentemente, a través de regiones no involucradas en su centro activo, a biomoléculas de interés (proteínas u otras biomoléculas). Los complejos se pueden inmovilizar posteriormente a través del centro activo intacto de las lipasas sobre todo tipo de soportes hidrofóbicos. También se refiere a dos métodos, químico y biológico, de preparación de estos complejos y a un método de inmovilización de los mismos. Estos complejos inmovilizados pueden tener aplicaciones en la industria, en el laboratorio o en diagnóstico, debido a su uso potencial como biocatalizadores o como biosensores.

La lipasa actúa como proteína transportadora y se inmoviliza por activación interfacial sobre partículas magnéticas hidrofóbicas u otros soportes hidrofóbicos sin necesidad de realizar ningún tipo de modificación o activación previa de los soportes. De manera que, una vez unida la biomolécula a la lipasa, se puede llevar a cabo la inmovilización de este complejo sobre un soporte hidrofóbico evitando la inactivación de la biomolécula, al ser la lipasa la que se adsorbe por interacción interfacial sobre la nanopartícula hidrofóbica. La inmovilización de la lipasa es rápida, intensa, reversible y se puede realizar en condiciones experimentales suaves. Una vez utilizadas las nanoestructuras o soportes hidrofóbicos, se pueden recuperar desorbiendo los complejos con altas concentraciones de detergente, permitiendo así la reutilización de los soportes para la adsorción de nuevos complejos.

Los complejos son sencillos de preparar, tanto por métodos químicos como biológicos. Además, esta inmovilización de las biomoléculas sobre las superficies, incluso cuando éstas son pequeñas, se puede cuantificar siguiendo la actividad catalítica de la lipasa transportadora. El hecho de que la proteína transportadora, es decir, la lipasa, posea una alta actividad catalítica hacia substratos sintéticos facilita la cuantificación de cantidades muy pequeñas de biomoléculas (del orden de microgramos) que se inmovilizan sobre las superficies de las nanoestructuras.

La inmovilización de biomoléculas sobre soportes hidrofóbicos mediante el método proporcionado por la presente invención reduce las interacciones inespecíficas indeseadas e incluso podría permitir la estabilización, por unión covalente multipuntual, de las enzimas sobre las lipasas rígidas transportadoras.

Por tanto, un primer aspecto de la invención se refiere a un complejo, de ahora en adelante “complejo de la invención”, que comprende una lipasa unida covalentemente a una biomolécula.

En la presente descripción se entiende por “lipasa” la enzima presente en los lisosomas y liberada por el páncreas, encargada de la descomposición de las grasas o lípidos en ácidos grasos. Una “biomolécula” es cualquier molécula orgánica constituyente de los seres vivos, como por ejemplo, pero sin limitarnos, glúcidos, lípidos, proteínas, cofactores o ácidos nucleicos; en la presente descripción también se incluyen dentro de las biomoléculas las sondas de ácidos nucleicos.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, la lipasa procede de un microorganismo termófilo, y en una realización más preferida el microorganismo termófilo es *Bacillus thermocatenulatus* o *Thermus thermophilus*.

Aunque cualquier lipasa capaz de adsorberse fuertemente a superficies hidrofóbicas podría ser utilizada en la presente invención, cuanto más estable sea la lipasa mayor será el rango de condiciones en las que ésta podrá utilizarse y más variedad de modificaciones químicas se podrán realizar sobre la misma para optimizar la inmovilización de la biocromolécula. Además, cuanto mayor sea la rigidez de la molécula de lipasa, mayor será la posibilidad de estabilizar la biomolécula a la que se una por unión covalente multipuntual. Por ello, las lipasas de la presente invención preferiblemente proceden de microorganismos termófilos, que se definen como aquellos microorganismos que viven y se desarrollan bajo condiciones de temperatura extremas, es decir, superiores a 45°C, cuya temperatura óptima se encuentra entre los 50 y 75°C y su temperatura máxima entre 80 y 113°C. Ejemplos de microorganismos termófilos podrían ser, pero sin limitarnos, *Pyrococcus furiosus*, *Thermus aquaticus*, *Thermus thermophilus*, *Chloroflexus aurantiacus*, *Thermococcus litorales*, *Pyrodictium abyssi* (archaea), *Bacillus stearothermophilus*, *Rhodothermus obamensis*, *Marinithermus hydrothermalis*, *Deferribacter desulfuricans*, *Thermodesulfobacterium hydrogeniphilum* o *Bacillus thermocatenulatus*.

Se entiende por “unión covalente” el enlace en el que los átomos de dos elementos no metálicos se mantienen unidos gracias a que comparten dos electrones. En la presente invención, las uniones covalentes entre las lipasas y las biomoléculas se realizan a través de regiones no involucradas en el centro activo de la lipasa, así se mantiene el centro activo intacto para posteriormente inmovilizar el complejo sobre un soporte hidrofóbico.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la biomolécula del complejo de la invención es una proteína. En una realización más preferida la proteína es un anticuerpo. En otra realización preferida la proteína es: proteína A o proteína G. En otra realización preferida la proteína es una enzima.

ES 2 352 779 A1

Se entiende por “proteína o péptido” cualquier macromolécula formada por cadenas lineales de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, ya tenga función estructural, reguladora, catalizadora o enzimática, transportadora, defensiva o contráctil. Se incluyen dentro de esta definición tanto las proteínas simples (constituidas únicamente por aminoácidos) como las conjugadas (constituidas por aminoácidos y grupos prostéticos). Ejemplos de proteínas son, pero sin limitarnos, las hormonas, los anticuerpos, las enzimas, los receptores, etc.

En esta descripción se entiende por “anticuerpos o inmunoglobulinas” aquellas glucoproteínas producidas por los linfocitos B en respuesta a un antígeno. El anticuerpo típico está constituido por unidades estructurales básicas, cada una de ellas con dos grandes cadenas pesadas y dos cadenas ligeras de menor tamaño. Aunque la estructura general de todos los anticuerpos es muy semejante, una pequeña región es extremadamente variable, lo cual permite la existencia de millones de anticuerpos, cada uno con un extremo ligeramente distinto. Esta parte de la proteína, llamada región hipervariable, es la que confiere al anticuerpo la especificidad de unión a su antígeno.

La unión de la lipasa a un anticuerpo se puede realizar a través de su cadena glicosílica (tras su oxidación con perdiódato), por reacción con los grupos amino de las lisinas de la lipasa. Esta inmovilización mantiene la capacidad del anticuerpo para reconocer su antígeno.

La proteína A es un polipéptido de 42.000 daltons constituyente habitual de la pared celular de *Staphylococcus aureus*, tiene cuatro lugares de unión a los anticuerpos, sin embargo, sólo se puede usar uno a la vez. La proteína A es bifuncional, permitiendo la formación de complejos multiméricos. Cualquier anticuerpo tiene al menos dos lugares de unión a la proteína A. Debido a estas propiedades, la proteína A es capaz de reconocer anticuerpos de diferentes especies, como humanos, burro, conejo, perro, cerdo o cobaya, y con una menor afinidad, pero aún útil, por anticuerpos de ratón, vaca o caballo, entre otros, por lo que se ha empleado en muchos métodos inmunohistoquímicos. La proteína A se purifica tanto de fuentes naturales (*S. aureus*) como a partir de sistemas de sobreexpresión de proteínas recombinantes. La proteína G es un polipéptido de entre 30.000 y 35.000 daltons aislado de la pared celular del estreptococo beta-hemolítico de las cepas C o G. Tiene una afinidad por los anticuerpos diferente a la de la proteína A por lo que se complementa con ella, siendo asimismo útil para los métodos inmunohistoquímicos. Las proteínas A y G unidas a una lipasa e inmovilizadas sobre partículas magnéticas o nanotubos hidrofóbicos, o en general sobre cualquier soporte hidrofóbico, son útiles tanto para la purificación de anticuerpos (utilizándose en mezclas conteniendo incluso sólidos en suspensión) como para la inmovilización orientada de anticuerpos y su uso como biosensores.

Las “enzimas” son las sustancias de naturaleza proteica que catalizan reacciones químicas, cuando es termodinámicamente posible, disminuyendo el nivel de la “energía de activación” propia de las reacciones. Estas enzimas pueden ser, pero sin limitarnos, oxidorreductasas, transferasas, hidrolasas, isomerasas, Nadas o ligasas. Ejemplos de enzimas podrían ser, pero sin limitarnos, deshidrogenasas, quinasas, glucosidasas, descarboxilasas, sintetasas, etc. Existen enzimas que actúan sobre sustratos o cofactores insolubles, ejemplos de ellos son, sin limitarnos, celulasas o proteasas. Las enzimas que forman parte del complejo de la invención son, preferiblemente, enzimas que actúan sobre sustratos o cofactores insolubles.

En otra realización preferida la biomolécula del complejo de la invención es un cofactor. En una realización más preferida el cofactor se selecciona de la lista que comprende: NAD(P)⁺, NAD(P)H, ATP, ADP o FAD. En otra realización preferida la biomolécula es una sonda de ADN.

Se entiende por “cofactor” cualquier componente no proteico, termoestable y de bajo peso molecular, necesario para la acción de una enzima, ya sean iones metálicos o moléculas orgánicas o coenzimas. Ejemplos de cofactores son, pero sin limitarnos, Fe²⁺, Cu²⁺, K⁺, Mn²⁺, Mg²⁺, vitaminas, NAD(P)⁺, NAD(P)H, ATP, ADP o FAD.

Se entiende por “sonda de ADN” cualquier fragmento de ADN marcado con fluorescencia.

En otra realización preferida, el complejo de la invención además comprende un polímero activable entre la lipasa y la biomolécula. En una realización más preferida el polímero activable es dextrano.

Se entiende por “polímero activable” cualquier polímero que al ser modificado con algún grupo químico facilite la unión entre una lipasa y otra biomolécula. Un ejemplo de polímero activable es, sin limitarnos, el dextrano. Se entiende por “dextrano” un polisacárido complejo y ramificado formado por muchas moléculas de glucosa unidas en cadenas de longitud variable (de 10 a 150 kilodaltons), que es usado como antitrombótico porque reduce la viscosidad de la sangre. La cadena consiste en uniones glucosídicas α 1-6, mientras que las ramificaciones empiezan en uniones α 1-4 (en algunos casos también en uniones α 1-2 y α 1-3). El dextrano es sintetizado a partir de la sacarosa por ciertas bacterias ácido-lácticas, de las cuales las más conocidas son, pero sin limitarnos, *Leuconostoc mesenteroides* y *Streptococcus mutans*. Si se modifica una lipasa con dextrano y éste a su vez se une a un cofactor, sería posible disponer de partículas magnéticas, o en general de cualquier soporte hidrofóbico, con el cofactor inmovilizado de forma reversible, simplificando en gran medida los sistemas de reciclado de estas moléculas. De la misma manera, la unión de la lipasa a dextrano y éste a una sonda de ADN permite obtener la sonda inmovilizada de forma reversible sobre partículas magnéticas, o en general sobre cualquier soporte hidrofóbico. Por ello, el polímero activable, preferiblemente dextrano, se encuentra entre la lipasa y la biomolécula, preferiblemente cuando la biomolécula es un cofactor o una sonda de ADN.

ES 2 352 779 A1

En otra realización preferida, el complejo de la invención se encuentra inmovilizado en un soporte hidrofóbico no poroso. En una realización más preferida el soporte hidrofóbico se selecciona de la lista que comprende: nanotubo de carbono, array hidrofóbico, array hidrofobizado, placa multipocillo, nanopartícula magnética hidrofóbica o nanopartícula no magnética hidrofóbica. En una realización aún más preferida, la nanopartícula magnética hidrofóbica es un núcleo de ferrita recubierto de poliestireno.

Se entiende como “soporte hidrofóbico no poroso” cualquier soporte, incluyendo nanoestructuras, que es repelido por el agua y que carece de poros. Ejemplos de soportes hidrofóbicos no porosos son, sin limitarnos, nanotubo de carbono, array hidrofóbico, array hidrofobizado, placa multipocillo, nanopartícula magnética hidrofóbica o nanopartícula no magnética hidrofóbica. Un ejemplo de nanopartícula magnética hidrofóbica es, sin limitarnos, un núcleo de ferrita recubierto de poliestireno. Se entiende como “núcleo de ferrita” aquel que está formado por polvo de hierro combinado con otros elementos que le dan muy buenas propiedades magnéticas. Se entiende como “poliestireno” el polímero termoplástico que se obtiene de la polimerización del estireno.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método de preparación química del complejo de la invención, de ahora en adelante “primer método de la invención”, que comprende:

- a. adsorber una lipasa a un soporte sólido hidrofóbico, poroso e inerte,
- b. conjugar la lipasa del paso (a) con una biomolécula, y
- c. desorber el complejo obtenido en el paso (b) del soporte.

En una realización preferida de este segundo aspecto de la invención, el soporte sólido hidrofóbico del paso (a) es: octil-agarosa o vidrio recubierto de grupos alquilo de entre C_4 - C_{18} . En otra realización preferida, el soporte sólido hidrofóbico del paso (a) tiene una superficie hidrofílica recubierta de nanoestructuras hidrofóbicas. En una realización más preferida, las nanoestructuras hidrofóbicas se seleccionan de la lista que comprende: proteínas hidrofóbicas, moléculas de proteínas hidrofóbicas, proteínas hidrofílicas modificadas con reactivos hidrofóbicos, polímeros hidrofóbicos o polímeros hidrofílicos modificados con reactivos hidrofóbicos.

En la presente descripción se entiende por “soporte sólido hidrofóbico, poroso e inerte” cualquier soporte, incluyendo nanoestructuras, que es repelido por el agua y que presenta poros. Ejemplos de soportes hidrofóbicos de este tipo son, pero sin limitarnos, octil-agarosa o vidrio recubierto de grupos alquilo. Se entiende por “grupos alquilo” los grupos funcionales orgánicos formados por la eliminación de un átomo de hidrógeno de un hidrocarburo que siempre se encuentran unidos a otro átomo o grupo. El soporte hidrofóbico empleado en el paso (a) del primer método de la invención también puede tener una superficie hidrofílica, entendiéndose como tal cualquier superficie que presente afinidad por el agua, modificada mediante el recubrimiento con nanoestructuras hidrofóbicas. En la presente descripción se entiende por “nanoestructura” una estructura con un tamaño intermedio entre las estructuras moleculares y microscópicas, de tamaño micrométrico. Ejemplos de nanoestructuras hidrofóbicas podrían ser, pero sin limitarnos, proteínas hidrofóbicas, moléculas de proteínas hidrofóbicas, proteínas hidrofílicas modificadas con reactivos hidrofóbicos, polímeros hidrofóbicos o polímeros hidrofílicos modificados con reactivos hidrofóbicos. Un ejemplo de proteínas hidrofóbicas podría ser, pero sin limitarnos, las hidrofobinas.

El complejo de la invención se sintetiza en fase sólida, en una etapa previa, en un soporte hidrofóbico poroso donde las interacciones intermoleculares entre las biomoléculas adsorbidas son imposibles, lo que evita su agregación. Esto puede realizarse gracias a la posibilidad de inmovilizar las lipasas de forma reversible sobre soportes hidrofóbicos. La lipasa inmovilizada en el soporte sólido hidrofóbico poroso se conjuga con la biomolécula de interés, como se muestra en los ejemplos de la presente invención. De manera que al final de esta etapa del proceso se obtiene la lipasa unida al soporte sólido hidrofóbico poroso y a la biomolécula de interés. Posteriormente, se separa el complejo del soporte poroso mediante detergentes, tal y como muestran los ejemplos de la presente invención, para obtener el complejo formado por la lipasa y la biomolécula en su forma soluble.

En otra realización preferida, la lipasa del paso (a) se modifica con dienofilos, con grupos amino ionizados recubiertos de grupos epóxidos o de grupos glutaraldehído o con polímeros activados para conjugarse químicamente con biomoléculas. En una realización más preferida, los polímeros activados contienen grupos carboxilo, grupos epóxido o grupos amino.

Se entiende por “dienofilos” cualquier sustancia que sea atraída por los dienos. Los “grupos amino” son grupos funcionales derivados del amoníaco o alguno de sus derivados alquilados por eliminación de uno de sus átomos de hidrógeno. Se entiende por “ionización” el proceso químico o físico mediante el cual se producen iones. Se entiende por “grupo epóxido” el radical formado por un átomo de oxígeno unido a dos átomos de carbono, que a su vez están unidos entre sí mediante un solo enlace covalente. Se entiende por “glutaraldehído” una molécula simple de cinco carbonos con grupos de aldehídos en cada extremo, de fórmula química $OCH-CH_2-CH_2-CH_2-CHO$. Ejemplos de polímeros activados para conjugarse con biomoléculas con los que se podría llevar a cabo la modificación de la lipasa son, sin limitarnos, dextrano o polietilenglicol. Se entiende por “grupo carboxilo” un grupo de fórmula orgánica $COOH$ unido a un resto orgánico, representado como R.

ES 2 352 779 A1

En los casos en los que la estabilidad de la biomolécula es mucho menor que la de la lipasa, la quimera química a través de la unión covalente multipuntual tendría ventajas. Para ello, se pueden transformar todos los grupos carboxilo de la lipasa en grupos amino por modificación con etilendiamina. A continuación, esos grupos pueden ser modificados con 1,4 butanediol diglicidil éter, para generar grupos epóxido, o con glutaraldehído. Incluso la biomolécula de interés podría ser adsorbida por intercambio iónico sobre la lipasa aminada y posteriormente tratarla con glutaraldehído. Todas estas técnicas, permiten una gran activación de la lipasa, lo que podría permitir una unión covalente multipuntual muy intensa de la biomolécula con la lipasa, aumentando su estabilidad.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método de preparación biológica del complejo de la invención, de ahora en adelante “segundo método de la invención”, que comprende insertar el gen de la biomolécula en un plásmido conteniendo el gen de la lipasa.

Preferiblemente, el segundo método de la invención se lleva a cabo cuando la biomolécula del complejo de la invención es una proteína. Se entiende por “plásmido” el fragmento extracromosómico de ácido nucleico que se encuentra en el citoplasma de algunos procariotas, de tamaño variable aunque menores que el cromosoma principal, con estructura linear, circular o superenrollada. A los microorganismos termófilos conteniendo el gen de la lipasa en un plásmido, se les puede insertar, mediante técnicas de ingeniería genética conocidas por cualquier experto en la materia, por ejemplo pero sin limitarnos, mediante el empleo de enzimas de restricción, el gen de la biomolécula de interés, por ejemplo pero sin limitarnos, una proteína. Mediante el corte, con la misma enzima de restricción, del gen de la lipasa y del gen de la biomolécula de interés, se generan extremos compatibles para el ligamiento de ambos genes en fase de lectura mediante, por ejemplo, pero sin limitarnos, una ligasa. El microorganismo que porta el plásmido conteniendo esta construcción genética expresa la proteína de fusión lipasa-biomolécula. De esta manera se obtiene el complejo de la invención listo para ser inmovilizado en un soporte.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso del complejo de la invención para la inmovilización de biomoléculas en soportes hidrofóbicos.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método de obtención del complejo de la invención inmovilizado en un soporte hidrofóbico no poroso, de ahora en adelante “tercer método de la invención”, que comprende los pasos del primer método de la invención o del segundo método de la invención, y además:

d. adsorber el complejo de la invención a un soporte hidrofóbico no poroso.

Una vez desorbido el complejo del soporte sólido hidrofóbico poroso donde se realiza la conjugación con la biomolécula de interés, u obtenido el complejo mediante la fusión recombinante de la lipasa con la biomolécula, el siguiente paso es absorberlo a un soporte o nanoestructura hidrofóbica no porosa sin ningún tipo de activación o modificación, mediante el procedimiento descrito en los ejemplos de la presente invención. De manera que, tras este paso, se obtiene el complejo formado por la lipasa unida a la biomolécula inmovilizado sobre un soporte hidrofóbico, útil para ser utilizado en la industria, en el laboratorio o en diagnóstico.

En una realización preferida, el tercer método de la invención además comprende:

e. recubrir el soporte hidrofóbico no poroso con otras lipasas anteriormente a la adsorción del paso (d).

Se puede recubrir el soporte hidrofóbico no poroso con otras lipasas no modificadas y de bajo peso molecular, para cubrir totalmente la superficie del soporte con estructuras proteicas hidrofílicas e inertes. Con ello, se obtiene una superficie más inerte, de forma que apenas quede superficie hidrofóbica del soporte expuesta al medio.

Una vez utilizadas, las nanoestructuras o soportes hidrofóbicos no porosos del paso (d) conteniendo los complejos, se pueden recuperar desorbiendo los complejos con altas concentraciones de detergentes, y así se pueden volver a utilizar como soportes de nuevos complejos para inmovilizar biomoléculas. Además, el empleo de detergentes permite obtener los complejos en su forma soluble. De manera que la inmovilización de los complejos de la invención es reversible, gracias a la capacidad de las lipasas de ser desorbidas de los soportes mediante el uso de detergentes.

Por tanto, en otra realización preferida, el tercer método de la invención además comprende desorber el complejo del soporte hidrofóbico no poroso del paso (d) mediante el empleo de un detergente. En una realización más preferida, el detergente es laurato de sucrosa.

En esta descripción se entiende por “detergente” cualquier sustancia capaz de romper la barrera lipídica solubilizando las proteínas e interrumpiendo la interacción lípido-lípido, lípido-proteína y proteína-proteína.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso del complejo de la invención como biocatalizador.

En esta descripción se entiende por “biocatalizador” cualquier catalizador de las reacciones bioquímicas de los seres vivos, que reduce la energía de activación de una reacción química, haciendo que ésta sea más rápida. Mediante la inmovilización de los complejos de la invención formados por lipasas y, por ejemplo pero sin limitarnos, proteínas,

preferiblemente enzimas, o cofactores, se puede llevar a cabo la biocatálisis de macromoléculas o, en general, de cualquier reacción bioquímica. Por tanto, las biomoléculas que forman parte del complejo de la invención cuando éste es usado como biocatalizador son, preferiblemente, enzimas o cofactores.

5 Otro aspecto de la invención se refiere al uso del complejo de la invención como biosensor.

En la presente descripción se entiende por “biosensor” un sistema para la medición (cuantitativa o cualitativa) de parámetros biológicos o químicos, que suele combinar dos componentes de naturaleza biológica o un componente de naturaleza biológica y otro de naturaleza físico-química.

10

Las biomoléculas del complejo de la invención que pueden ser empleadas como biosensores, pueden ser, sin limitarnos, cofactores, sondas de ADN o proteínas, preferiblemente enzimas, anticuerpos o proteínas A o G. Las proteínas tienen capacidad de unión a otras proteínas, como pueden ser los anticuerpos, por lo que disponer de proteínas inmovilizadas en un soporte posibilita la unión con anticuerpos de interés para su aplicación, por ejemplo, pero sin limitarnos, en diagnóstico. Por ello, en una realización preferida, la biomolécula unida a la lipasa en el complejo de la invención que es usado como biosensor es una proteína, para su uso en la inmovilización reversible de anticuerpos, y más preferiblemente la proteína es proteína A o proteína G. En otra realización preferida, la biomolécula unida a la lipasa en el complejo de la invención que es usado como biosensor es un anticuerpo para la detección de antígenos.

15

20 Las sondas de ADN pueden hibridar, por complementariedad, con fragmentos de ácidos nucleicos. Por ello, en otra realización preferida, la biomolécula unida a la lipasa en el complejo de la invención que es usado como biosensor es una sonda de ADN, para su uso en la detección de fragmentos de ADN.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso del complejo de la invención para la regeneración de cofactores inmovilizados. Debido a la capacidad de los complejos de la invención inmovilizados de ser desorbidos de sus soportes mediante el uso de detergentes, como se ha explicado anteriormente, es posible reciclar tanto las biomoléculas como los soportes una vez que son utilizados. Cuando la biomolécula es un cofactor, el complejo inmovilizado puede usarse para, por ejemplo, pero sin limitarnos, catalizar procesos redox, procesos de fosforilación, etc. Tras lo cual, gracias a que la unión de la lipasa al soporte es reversible, se puede desorber el complejo lipasa-cofactor y así ser reutilizado el cofactor para un futuro uso.

25

30

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

35

Descripción de las figuras

40 Fig. 1. Representa el curso de inmovilización de la quimera BTL-DH sobre nanopartículas magnéticas sin modificar. (○) Actividad enzimática de BTL en el sobrenadante; (◆) Actividad de BTL en suspensión; (●) Actividad de BTL en el complejo soluble.

45 Fig. 2. Muestra los complejos de lipasas con biomoléculas que es posible preparar mediante los métodos de la invención.

Fig. 3. Muestra los complejos de lipasas con biomoléculas inmovilizados sobre nanopartículas magnéticas hidrofóbicas.

50

Ejemplos

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto la efectividad de los complejos que comprenden lipasas unidas a biomoléculas, así como de los métodos de preparación e inmovilización de los mismos. Estos ejemplos específicos que se proporcionan sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención y se incluyen solamente con fines ilustrativos, por lo que no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

55

Ejemplo 1

Complejo de lipasa con enzima

60 Preparación e inmovilización del complejo lipasa-deshidrogenasa

65

Se utiliza como lipasa transportadora una lipasa termoestable de *Bacillus thermocatenulatus* (BTL) y como biomolécula de interés industrial, la enzima Formiato deshidrogenasa de *Pseudomonas sp.* (DH).

ES 2 352 779 A1

Se adsorben 2 mg de BTL por 1 g de agarosa-octil mediante adsorción hidrofóbica a 25°C en fosfato de sodio 10 mM a pH 7. La BTL adsorbida se enriquece en grupos amino mediante el tratamiento con 1 M de etilendiamina a pH 4,75 y 25°C durante 1,5 h mediante la adición de 10 mM de carbodimida. Esta aminación transforma todos los grupos carboxilo de la lipasa en grupos amino, estos grupos se pueden modificar con 1,4 butanediol diglicidil éter para generar grupos epóxido, o con glutaraldehído. Incluso, la enzima puede ser adsorbida por intercambio iónico sobre la lipasa aminada y posteriormente tratarla con glutaraldehído. Esta modificación de la lipasa se lleva a cabo para establecer una unión covalente multipuntual en los casos en los que la estabilidad de la enzima es mucho menor que la de la lipasa. Posteriormente, la BTL aminada en fase sólida se incuba durante 16 h a 25°C en una disolución de butanodiol diglicidil éter: 16% (v/v) en bicarbonato de sodio 100 mM a pH 9 y 10% (v/v) de acetona. A cada gramo de BTL inmovilizada y enriquecida en grupos aminos ionizados recubiertos por grupos epóxido se le ofrecen 0,9 mg de deshidrogenasa (DH) en 9 mL de tampón fosfato de sodio 10 mM a pH 7. De este modo 0,5 mg de DH se inmovilizan sobre 1 mg de BTL (el 100% de la DH ofrecida y el 25% del máximo posible). Posteriormente, el complejo BTL-DH se incuba 16 h a 25°C y entonces toda la DH queda unida covalentemente a la BTL. A continuación, cada gramo de derivado DH-BTL-agarosa-octil se incuba en 10 mL en una disolución de fosfato de sodio 10 mM a pH 7 con 0,5% (v/v) lauril sucrosa. Se consigue desorber así más del 60% de la quimera BTL-DH. Posteriormente, el detergente es eliminado mediante hidrólisis catalizada por un derivado inmovilizado covalentemente de la lipasa de *Candida antártica* B.

Para la inmovilización del complejo BTL-DH sobre una partícula magnética hidrofóbica, se ofrece a una suspensión de 100 mg de nanopartículas magnéticas, una disolución de la quimera BTL-DH disuelta en 25 mM de fosfato de sodio pH 7 a 25°C y se sigue la inmovilización viendo que tanto la actividad de la lipasa como la actividad de la DH desaparecen del sobrenadante y se incorporan al soporte (véase Figura 1). De este modo se inmovilizan 67 mg de quimera por 1 g de nanopartícula.

Ejemplo 2

Complejo de lipasa con sonda de ADN

Las sondas de ADN inmovilizadas sobre distintos soportes constituyen una herramienta para el desarrollo de biosensores, sobre todo en el campo del diagnóstico. Uniendo las sondas de ADN, conteniendo un grupo tiol o disulfuro introducido en los extremos 3' ó 5', a lipasas conteniendo grupos epóxido o grupos disulfuro muy reactivos, se pueden recubrir las lipasas de varias moléculas de la sonda. Esto permite la inmovilización de sondas de ADN sobre todo tipo de superficies hidrofóbicas. Si además la lipasa es muy estable y la unión lipasa-superficie es estable a altas temperaturas, se puede incluso realizar una PCR de la muestra de ADN hibridada con la sonda complementaria inmovilizada. En presencia de altas concentraciones de detergente, el ADN hibridado unido a la lipasa se puede desorber y el soporte puede ser reutilizado, con la ventaja económica que ello conlleva.

Ejemplo 3

Complejo de lipasa con cofactor

Preparación e inmovilización del complejo lipasa cofactor

Se utiliza como lipasa transportadora una lipasa termoestable de *Bacillus thermocatenulatus* (BTL) y como cofactor el NAD⁺ (nicotin adenin difosfato) que es un cofactor clave para procesos enzimáticos de oxidación y reducción.

Se adsorben 8 mg de BTL por 1 g de agarosa-octil mediante adsorción hidrofóbica a 25°C en fosfato de sodio 10 mM a pH 7. Se amina parcialmente la BTL adsorbida mediante el tratamiento con 1 M de etilendiamina a pH 4,75 y 25°C durante 1,5 h mediante la adición de 1 mM de carbodimida.

La lipasa BTL, parcialmente aminada se recubre con dextrano mediante la aplicación del siguiente protocolo: se prepara dextrano aldehído oxidado al 100% de peso molecular 6.000 daltons. Se ofrece a 1 g de agarosa-octil-BTL-amino 9 mL de dextrano-aldehído 33 mg/mL a pH 7,5, y la suspensión se deja agitando suavemente a 25°C durante 1,5 h. Finalmente el derivado se filtra, se lava con agua destilada y se utiliza inmediatamente para la obtención de agarosa-octil-BTL-dextrano-carboxilo. Este derivado agarosa-octil-BTL-dextrano sin reducir se incuba en una disolución de aspartato de sodio: así 1 g de agarosa-octil-BTL-dextrano-aldehído se incuba en 9 mL de aspartato de sodio 3 M a pH 8,5 en 150 mM de trimetil amino borano. La suspensión se somete a agitación suave a 25°C durante 16 h. Después de este tiempo se reduce con borohidruro mediante la suspensión en 90 mL de bicarbonato de sodio 100 mM a pH 10 conteniendo el volumen total 1 mg/mL de borohidruro de sodio durante 2 h. Finalmente, el derivado se filtra y se lava con fosfato de sodio 100 mM a pH 7 y agua destilada abundante.

Se incuban 2 g de agarosa-octil-BTL-dextrano-carboxilo o de agarosa-octil-BTL-carboxilo en una disolución acuosa en un volumen total de 10 mL que contiene 100 mM de NAD⁺ a pH 4,75. El acoplamiento carboxilo-amino se activa mediante la adición de 1-etil-3-(3-dimetilamino-propil) carbodiimida (EDCI) hasta una concentración total de 100 mM cada 1,5 h durante 6 h totales de reacción. La mezcla de reacción se somete a una agitación suave a 25°C. Finalmente, se lava abundantemente con una disolución saturada de cloruro de sodio, fosfato de sodio 500 mM pH 7 y con fosfato de sodio 10 mM pH 7. El resultado es una modificación con 0,05 μ mol NAD⁺/mg de BTL. Pudiéndose desorber el

ES 2 352 779 A1

50% de la BTL-dextrano-NAD⁺ mediante la incubación de 1 g de derivado en 10 mL de volumen total a 0,5% tritón en 25 mM de fosfato de sodio a 25°C.

5 Para inmovilizar el complejo BTL-NAD⁺ sobre nanopartículas magnéticas, se ofrece un exceso de BTL sobre la capacidad máxima de carga de las nanopartículas, de tal forma que se desorbe la cantidad de BTL-amino-epoxidada presente en 5 g de agarosa-octil activada con 1,5 mg/g de BTL con 0,5% de tritón en fosfato de sodio 25 mM a pH 7, el sobrenadante de la desorción se ofrece a 50 mg de nanopartículas, a 25°C diluyendo el volumen de inmovilización con fosfato de sodio 10 mM a pH 7 hasta la que la concentración de tritón sea del 0,005%, obteniéndose una cinética de inmovilización semejante a la anterior, inmovilizándose un 75% de la cantidad ofrecida, que consiste en una modificación de hasta 7,5 mg de BTL por 100 mg de nanopartículas (equivalente, por tanto a 0,35 μ moles de NAD⁺ por 10 cada 100 mg de nanopartículas).

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 352 779 A1

REIVINDICACIONES

1. Complejo que comprende una lipasa unida covalentemente a una biomolécula.
- 5 2. Complejo según la reivindicación 1 donde la lipasa procede de un microorganismo termófilo.
3. Complejo según la reivindicación 2 donde el microorganismo termófilo es: *Bacillus thermocatenulatus* o *Thermus thermophilus*.
- 10 4. Complejo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 donde la biomolécula es una proteína.
5. Complejo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 donde la proteína es un anticuerpo.
- 15 6. Complejo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 donde la proteína es: proteína A o proteína G.
7. Complejo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 donde la proteína es una enzima.
8. Complejo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 donde la biomolécula es un cofactor.
- 20 9. Complejo según la reivindicación 8 donde el cofactor se selecciona de la lista que comprende: NAD(P)⁺, NAD(P)H, ATP, ADP o FAD.
10. Complejo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 donde la biomolécula es una sonda de ADN.
- 25 11. Complejo según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10 que, además, comprende un polímero activable entre la lipasa y la biomolécula.
12. Complejo según la reivindicación 11 donde el polímero activable es dextrano.
- 30 13. Complejo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 que, además, se encuentra inmovilizado en un soporte hidrofóbico no poroso.
14. Complejo según la reivindicación 13 donde el soporte hidrofóbico se selecciona de la lista que comprende: nanotubo de carbono, array hidrofóbico, array hidrofobizado, placa multipocillo, nanopartícula magnética hidrofóbica o nanopartícula no magnética hidrofóbica.
- 35 15. Complejo según la reivindicación 14 donde la nanopartícula magnética hidrofóbica es un núcleo de ferrita recubierto de poliestireno.
- 40 16. Método de preparación química del complejo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, que comprende:
 - a. adsorber una lipasa a un soporte sólido hidrofóbico, poroso e inerte,
 - 45 b. conjugar la lipasa del paso (a) con una biomolécula,
 - c. desorber el complejo obtenido en el paso (b) del soporte.
- 50 17. Método de preparación química del complejo según la reivindicación 16, donde el soporte sólido hidrofóbico del paso (a) es: octil-agarosa o vidrio recubierto de grupos alquilo de entre C₄-C₁₈.
18. Método de preparación química del complejo según la reivindicación 16, donde el soporte sólido hidrofóbico del paso (a) tiene una superficie hidrofílica recubierta de nanoestructuras hidrofóbicas.
- 55 19. Método de preparación química del complejo según la reivindicación 18, donde las nanoestructuras hidrofóbicas se seleccionan de la lista que comprende: proteínas hidrofóbicas, moléculas de proteínas hidrofóbicas, proteínas hidrofílicas modificadas con reactivos hidrofóbicos, polímeros hidrofóbicos o polímeros hidrofílicos modificados con reactivos hidrofóbicos.
- 60 20. Método de preparación química del complejo según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19 donde la lipasa del paso (a) se modifica con dienofilos, con grupos amino ionizados recubiertos de grupos epóxidos o de grupos glutaraldehído o con polímeros activados para conjugarse químicamente con biomoléculas.
- 65 21. Método de preparación química del complejo según la reivindicación 20, donde los polímeros activados contienen grupos carboxilo, grupos epóxido o grupos amino.

ES 2 352 779 A1

22. Método de preparación biológica del complejo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 que comprende insertar el gen de la biomolécula en un plásmido conteniendo el gen de la lipasa.

5 23. Uso del complejo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 para la inmovilización de biomoléculas en soportes hidrofóbicos.

24. Método de obtención del complejo según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, que comprende los pasos del método según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 21 o del método según la reivindicación 22, y además:

10 d. adsorber el complejo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 a un soporte hidrofóbico no poroso.

25. Método de obtención del complejo según la reivindicación 24 que, además, comprende:

15 e. recubrir el soporte hidrofóbico no poroso con otras lipasas anteriormente a la adsorción del paso (d).

26. Uso del complejo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, 7 a 9 u 11 a 15 como biocatalizador.

20 27. Uso del complejo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 como biosensor.

28. Uso del complejo según cualquiera de las reivindicaciones 8 ó 9 u 11 a 15 para la regeneración de cofactores inmovilizados.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

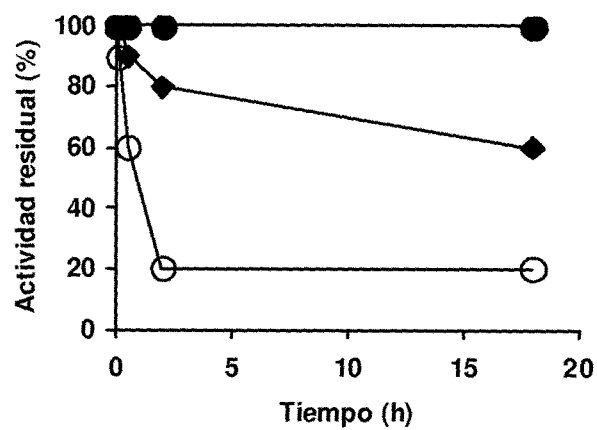


Fig. 1

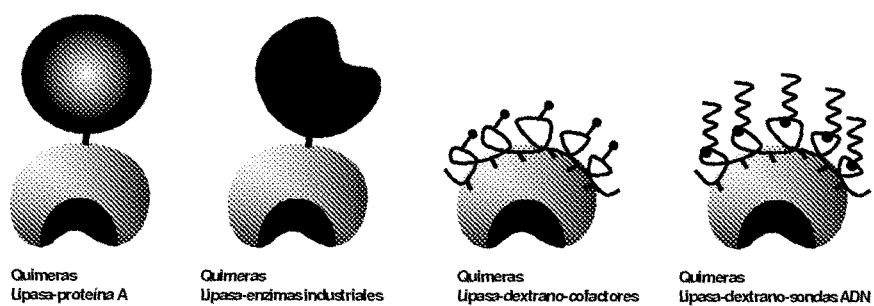


Fig. 2

INMOVILIZACION DE QUIMERAS SOBRE NANOPARTICULAS MAGNETICAS HIDROFOBICA

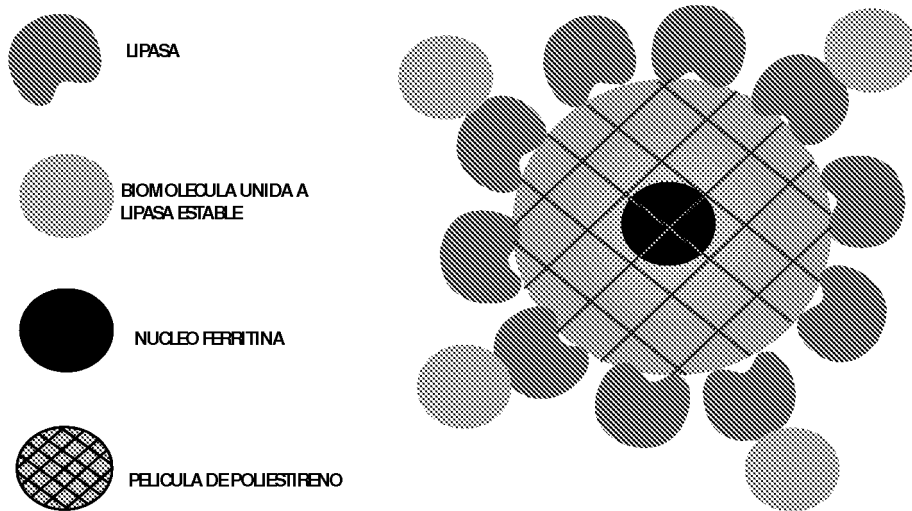


Fig. 3



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① N.º solicitud: 200930242

② Fecha de presentación de la solicitud: **01.06.2009**

③ Fecha de prioridad: **00-00-0000**
00-00-0000
00-00-0000

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.: **C12N 11/08** (2006.01)
C12N 11/10 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X		PALOMO J. M. et al. "Use of immobilized lipases for lipase purification via specific lipase-lipase interactions". Journal of Chromatography A. 04.06.2004. Vol. 1038. Nº. 1-2. Páginas 267-273.	1-4,7, 11-19, 23-28
A			8-10,20, 21
X		PALOMO J. M. et al. "Evaluation of the lipase from Bacillus thermocatenulatus as an enantioselective biocatalyst". Tetrahedron Asymmetry. 28.11.2003. Vol. 14. Nº. 23, páginas 3679-3687.	1-4,11, 16-19, 23-28
A		MATEO C. et al. "Advances in the design of new epoxy supports for enzyme immobilization-stabilization". Biochemical Society transactions. Dic. 2007. Vol. 35. Nº. Pt 6. Páginas 1593-1601.	1-4,7-21, 23-28
A		WO 2005056808 A2 (GENENCOR INT.) 23.06.2005, todo el documento.	1-4,7-21, 23-28
A		ES 2145702 A1 (VITA INVEST SA) 01.07.2000	1-4,7-21, 23-28

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
15.09.2010

Examinador
J. Manso Tomico

Página
1/5

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

C12N

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

INVENES, EPODOC, WPI, EMBASE, MEDLINE, BIOSIS,NPL

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 15.09.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 8-10, 20, 21	SÍ
	Reivindicaciones 1-4, 7, 11- 19, 23-28	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 8-10, 20, 21	SÍ
	Reivindicaciones 1-4, 7, 11- 19, 23-28	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	Palomo J M. et al. "Use of immobilized lipases for lipase purification via specific lipase- lipase interactions". Journal of Chromatography A. 04.06.2004. Vol. 1038. Nº. 1-2. Páginas 267-273.	04.06.2004
D02	Palomo J. M. et al. "Evaluation of the lipase from Bacillus thermocatenulatus as an enantioselective biocatalyst". Tetrahedron Asymmetry. 28.11.2003. Vol. 14. Nº. 23, páginas 3679-3687	28.11.2003
D03	Mateo C . et al. "Advances in the design of new epoxy supports for enzyme immobilization- stabilization". Biochemical Society transactions. Dic. 2007. Vol. 35. Nº. Pt 6. Páginas 1593 - 1601.	2007
D04	WO 2005056808 A2	23.06.2005
D05	ES 2145702 A1	01.07.2000

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

La presente solicitud se relaciona con la preparación de complejos entre la lipasa inmovilizada de Bacillus thermocatenulatus o Thermus thermophilus (BTL2) sobre soportes de octil-agarosa, y diversas biomoléculas para ser utilizadas como biocatalizadores o biosensores.

La lipasa se inmoviliza mediante absorción hidrofóbica. Después es enriquecida en grupos amino que se pueden modificar para generar grupos epóxido. Esta modificación se lleva a cabo para establecer una unión covalente multipuntual con la biomolécula a la que se va a unir la lipasa inmovilizada. Una vez formado el complejo se puede desorber del soporte con un detergente. De esta manera el complejo desorbido puede ser inmovilizado en un nuevo soporte, tal como una nanopartícula. Por tanto, el propósito de la invención sería la generación de complejos químicos con fines catalíticos o analíticos haciendo uso de lipasas inmovilizadas en soportes orgánicos.

D01 describe complejos lipasa-lipasa inmovilizados en soportes de glioxil agarosa (figura 3, página 269) utilizados para la purificación de lipasas objeto de análisis. En este caso, la lipasa inmovilizada procede de Pseudomonas fluorescens (PFL) y es fijada sobre soportes de glyoxil agarosa mediante uniones covalentes multipuntuales. La PFL inmovilizada presenta la capacidad de adsorber otras lipasas como la de Bacillus Thermocatenulatus (BTL2) permitiendo una sencilla forma de purificación enzimática. Se obtuvieron resultados similares con otras lipasas de distintas procedencias; en todos los casos las enzimas pueden ser fácilmente desorbidas con Triton X-100.

D02 divulga un biocatalizador formado por la lipasa de Bacillus thermocatenulatus (BTL2) inmovilizada en distintos soportes (tablas 1-5) utilizado para la resolución de diferentes substratos quirales en condiciones hidrolíticas. Se muestra que dependiendo de las estrategias utilizadas en la inmovilización se consigue mejorar las propiedades catalíticas del biocatalizador (Esquema 7, página 3686).

D03 divulga distintos procesos de inmovilización de proteínas en soportes activados con grupos epoxi, de manera que los grupos amino de la proteína, al reaccionar con los epoxi del soporte, establezcan una unión covalente que refuerza el anclaje covalente multipuntual de enzimas para usos industriales de estos catalizadores.

D04 describe un sistema de inmovilización de ADN junto con un marcador biocatalítico, tal como una enzima, para ser utilizado en estudios de criminología o ciencias medioambientales

Hoja adicional

Así pues, las reivindicaciones que hacen referencia a los complejos serían nuevas en la medida que se refieran a los complejos descritos en los ejemplos 1-3 de la solicitud, es decir se limitasen a las reivindicaciones 8- 10. Las reivindicaciones 1-4,7,11-15 carecerían de novedad según el art. 6 de la LP, puesto que D01 divulga complejos lipasa-lipasa. Las reivindicaciones 16-19, 24, 25, tal y como están reivindicadas, carecen de novedad puesto que D01 describe un procedimiento de inmovilización de lipasas de *Bacillus thermocatenulus* (BTL2) sobre soportes de agarosa que comprende la adsorción de la lipasa sobre un soporte, la conjugación de la lipasa con una biomolécula y la desorción del complejo con un detergente. Por tanto, tales reivindicaciones carecen de novedad. Las reivindicaciones 20-21 sí que son nuevas puesto que ninguno de los documentos del estado de la técnica describen las etapas de modificación de residuos carboxílicos de la lipasa. Los usos de las reivindicaciones 23, 26-28, sólo serían nuevos en la medida que se refieran a los complejos de los ejemplos 1-3, obtenidos por los métodos de las reivindicaciones 20-21.

Tomando en consideración D01 como el estado de la técnica más cercano, la diferencia entre este y el objeto de la solicitud sería la transformación de los grupos carboxilos de la lipasa inmovilizada en grupos amino, que a su vez, puedan ser transformados en grupos epoxi. El efecto técnico de esa modificación de grupos carboxilos en grupos amino sería el establecimiento de uniones covalentes multipuntuales, aparentemente con la deshidrogenasa con la que forma el complejo. El problema técnico sería la provisión de un método para la unión covalente entre una lipasa inmovilizada sobre un soporte de agarosa y la biomolécula que une esta lipasa. La solución dada por la solicitud, en la medida que se refiera a los compuestos de las reivindicaciones 8-10, respondería al problema propuesto. A partir de lo divulgado en D01 no se puede deducir de manera obvia que la elección de modificaciones en los grupos carboxilo de la lipasa BTL2, tal y como se reflejan en las reivindicaciones 20, 21, contribuya a la generación de uniones covalentes multipuntuales entre la lipasa inmovilizada en el soporte de agarosa y el enzima deshidrogenasa, o los cofactores del ejemplo 3. Así pues, los complejos de las reivindicaciones 8-10 obtenidos por el método de las reivindicaciones 20, 21, sí que tendrían actividad inventiva, según lo mencionado en el artículo 8 de la LP. Aquellas reivindicaciones (1-4, 7,11-19, 23-28), cuyo contenido excede el alcance de lo divulgado en la descripción carecen de actividad inventiva, puesto que no todas las posibles soluciones comprendidas en las mismas supondrían una contribución sobre el estado de la técnica.