

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 378 936**

21 Número de solicitud: 200931092

51 Int. Cl.:
G01N 33/543 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **01.12.2009**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **19.04.2012**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
19.04.2012

71 Solicitante/s: **Universidad de Zaragoza** (Titular al 34 %)
Campus Plaza San Francisco
Edif. Interfacultades
c/ Pedro Cerbuna, 12
50009 Zaragoza, ES
Fundación Agencia Aragonesa para la
Investigación y el Desarrollo (ARAID) (Titular al 33 %) **y**
Centre National de la Recherche Scientifique
(CNRS) (Titular al 33 %)

72 Inventor/es: **Grazú Bonavia, María Valeria;**
Martínez de la Fuente, Jesús y
Feracci, Helene

74 Agente/Representante:
Pons Ariño, Ángel

54 Título: **Soportes biofuncionalizados covalentemente.**

57 Resumen:

Soportes biofuncionalizados covalentemente.

La presente invención se refiere a un proceso para la funcionalización orientada y covalente de un soporte con una proteína (PROT) mediante enlaces de residuos de histidina con un grupo quelante de metales con grupos, y a los soportes funcionalizados obtenidos por tal proceso.

DESCRIPCIÓN

Soportes biofuncionalizados covalentemente.

La presente invención se refiere a un proceso para la funcionalización orientada y covalente de un soporte con una proteína (PROT), y a los soportes funcionalizados obtenidos. Por lo tanto pertenece al campo de la biomedicina.

Estado de la técnica anterior

Las superficies biofuncionales son ampliamente empleadas en terapia y diagnóstico mediante ensayos celulares (Geiger *et al.*, 2009), ingeniería tisular (Curtis & Riehle, 2001), desarrollo de biosensores (Wong *et al.*, 2009), bioelectrónica y de manera más general para el desarrollo de dispositivos médicos (Bettinger *et al.*, 2009; Jonkheijm *et al.* 2008). La superficie biofuncional ideal debe de ser fácil de preparar, caracterizar, sencilla de diseñar, biocompatible y eficaz. En este sentido, la incorporación de biomoléculas relevantes se ha publicado con anterioridad tanto para proteínas (Thery *et al.*, 2005), péptidos (Perret *et al.*, 2002a), carbohidratos (Fuss *et al.*, 2008; Schatz *et al.*, 2009), oligonucleótidos (Weisbrod & Marx, 2008) y otros (de la Fuente *et al.* 2006; Song *et al.*, 2009). Varias estrategias se han seguido para la modificación química de estos biomateriales. Estas aproximaciones a la hora de funcionalizar biomateriales pueden implicar uniones covalentes o no-covalentes. Ambas aproximaciones tienen aspectos positivos y negativos. La unión covalente asegura una unión fuerte y estable entre la biomolécula y la superficie, sin embargo requiere la modificación superficial y no garantiza generalmente una correcta orientación de la biomolécula, sobre todo cuando se trata de moléculas complejas tales como las proteínas. Cuando se inmovilizan proteínas no modificadas por esta estrategia suelen quedar unidas a la superficie de forma aleatoria. Por otro lado, las uniones inespecíficas constituyen una estrategia sencilla para la biofuncionalización de superficies, pero son uniones reversibles cuya estabilidad es muy dependiente de las condiciones del medio (pH, fuerza iónica, temperatura, etc.). Además, estas interacciones no controladas conducen con frecuencia a una pérdida de actividad de la proteína.

El estudio de los fenómenos de adhesión celular a biomateriales es un tema de gran interés desde un punto de vista de ingeniería tisular. Las interacciones de estas células con los materiales son capaces de modular la respuesta celular a los implantes artificiales o a soportes de cultivo celular (Chen *et al.*, 1998; Stevens & George, 2005). Es por ello que el control de la adhesión celular sobre un material polimérico es clave para el desarrollo de nuevos biomateriales con estos fines. Datos bioquímicos resaltan la necesidad de funcionalizar estos materiales con proteínas de la matriz extracelular (ECM) para promocionar la adhesión celular a través de interacciones específicas. Las células, vía integrinas, son capaces de unirse a la secuencia específica RGD presente en proteínas del ECM tales como la fibronectina, vitronectina, y trombospondina. Estas proteínas generan una red de uniones que controlan la adhesión y el crecimiento celular *in vivo*. Además de estas proteínas, otra familia de proteínas, las caderinas, están implicadas en estos eventos de adhesión célula-célula. Las caderinas clásicas son unas glicoproteínas transmembrana implicadas en el control de la especificidad, organización y dinámica de la adhesión celular, la cual es crucial para el desarrollo y mantenimiento de la arquitectura y función de los tejidos (Hartsock & Nelson, 2008; Larue *et al.*, 1996; Nishimura & Takeichi, 2009). Las caderinas interaccionan con otras caderinas presentes en la superficie de células vecinas a través de subdominios extracelulares repetitivos (EC1-EC5) (Patel *et al.*, 2003; Perret *et al.*, 2002b; Perret *et al.*, 2004). Estas uniones adhesivas inician las señales intracelulares que controlan la organización del citoesqueleto, la polaridad celular, proliferación y apoptosis, siempre a través de mecanismos de comunicación vía caderinas-citoesqueleto (Charrase *et al.*, 2002; van Roy & Berx, 2008). Aun no se conoce bien el papel que estas fuerzas de adhesión tienen en los procesos de señalización celular, debido sobre todo a la dificultad existente en la interpretación de respuestas biológicas que implican organizaciones multimoleculares complejas y dinámicas (Thiery *et al.*, 2003).

En las superficies de los biomateriales *in vitro*, se puede aplicar el mismo mecanismo. Cuando materiales extraños entran en contacto con un fluido biológico o con medio de cultivo celular, la respuesta inicial, es la adsorción de proteínas a la superficie del material. Una vez esto ocurre, el material interacciona con las células a través de la capa de proteínas previamente adsorbida. Además la composición y estructura de esta capa de proteínas juega un papel crítico en los subsiguientes desarrollos celulares (Arulanandam *et al.*, 2009; Dupin *et al.*, 2009; Ganz *et al.*, 2006; Ostuni *et al.*, 2009).

Descripción de la invención

La presente invención se refiere a un proceso para la biofuncionalización de la superficie de soportes que es fácil de llevar a cabo, eficientemente y produciendo materiales biocompatibles. Además también se refiere a los soportes biofuncionalizados. En la presente invención se presenta una estrategia sencilla para la modificación de superficies, por ejemplo de vidrio, usando una tecnología ya establecidas, pero cumpliendo con importantes requisitos, una correcta orientación de la biomolécula y una unión estable covalente con la superficie a funcionalizar. Además esta metodología se puede extender a un amplio abanico de materiales distintos. El procedimiento de la presente invención es eficaz, sencillo y directo para la preparación de superficies, nanopartículas o soportes funcionalizados con proteínas unidas covalentemente a la superficie y además garantizando la correcta orientación de estas proteínas sobre estos materiales. El proceso de la presente invención se podría emplear con cualquier proteína (enzimas, anticuerpos, lectinas, abzymas) o péptidos siempre que estén modificados con una cola de polihistidinas, o que presenten una zona de su superficie rica en residuo de histidinas muy expuesta al medio (en su secuencia peptídica nativa o generada por técnicas de biología molecular).

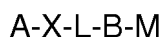
El proceso de la presente invención permite la obtención de soportes funcionalizados donde la proteína se une de forma orientada y covalente. Este proceso consiste en una unión en dos etapas: i) unión reversible y selectiva por afinidad a través de la cola de polihistidinas o zona rica en residuos de histidinas por los quelatos metálicos anclados al soporte, ii) posterior reacción covalente entre grupos nucleófilos (aminos, tioles, etc.), sólo de la zona de la superficie proteica por donde ha ocurrido la adsorción, y grupos carboxilos del agente quelante (anclados al soporte) activados previamente por el agente activante.

Al ser el mismo grupo quelante el que luego establece la unión covalente, esta estrategia presenta ventajas sobre las que utilizan dos grupos funcionales: i) grupos quelantes para unir por afinidad y ii) grupos reactivos (epóxido, aldehído, etc.) capaces de establecer una unión covalente con la proteína adsorbida (Mateo *et al*, 2007). La principal ventaja de esta nueva estrategia es que no se pierde capacidad de carga de la proteína a inmovilizar. Sin embargo, en el caso de soportes bifuncionales es necesario sacrificar la cantidad de grupos quelantes para introducir grupos capaces de unir covalentemente a la proteína.

Si bien la unión de la proteína se establece en dos etapas, al ser el grupo capaz de establecer uniones covalentes (grupo carboxilo del quelante activado con EDC y NHS) muy reactivo, la unión covalente es muy rápida después de la adsorción de la proteína por afinidad. Esto es una ventaja frente a soportes bifuncionales que contienen epóxido como grupos reactivos, dado que necesitan largas incubaciones a pH alcalinos, después de la unión de la proteína por afinidad, para que se establezca la unión covalente.

Por lo tanto un primer objeto de la presente invención es un proceso para la funcionalización orientada de un soporte con una proteína (PROT), que comprende acoplar covalentemente:

- a) una proteína (PROT) la cual tiene una zona rica en residuos de histidina (Hp);
- b) con un soporte biofuncionalizable cuya superficie se le ha unido de forma covalente un complejo quelante y este se ha cargado con un catión metálico, siendo la fórmula general:



Siendo:

A el soporte;

X es un átomo de oxígeno, nitrógeno o azufre;

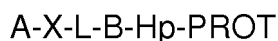
L es un grupo puente opcional entre el átomo X y el grupo B;

B un grupo quelante de metales con grupos carboxílicos;

M es un catión metálico, preferiblemente con valencia 2 ó superior;

c) en presencia de al menos un agente activante a un pH entre 4 y 10;

para la obtención de un soporte funcionalizado de fórmula:



Otro objeto de la presente invención son un soporte funcionalizado de fórmula A-X-L-B-Hp-PROT, siendo A, X, L, B, Hp y PROT como se definen en el aspecto primero y en cada una de sus realizaciones, caracterizado porque todos los grupos están unidos por enlaces covalentes.

El tercer aspecto hace referencia a un conjunto que comprende al menos:

- a) una proteína (PROT) la cual tiene una zona rica en residuos de histidina (Hp);
- b) un soporte biofuncionalizable cuya superficie se le ha unido de forma covalente un complejo quelante y éste se ha cargado con un catión metálico, siendo la fórmula general:



Siendo:

A el soporte;

X es un átomo de oxígeno, nitrógeno o azufre;

L es un grupo puente opcional entre el átomo de oxígeno del soporte y el grupo B;

B un grupo quelante de metales con grupos carboxílicos;

M es un catión metálico, preferiblemente con valencia 2 ó superior;

c) agente activante;

siendo la definición de los grupos la misma que para el aspecto primero y en cada una de sus realizaciones.

El último aspecto de la presente invención sería el uso del conjunto del aspecto tercero para la inmovilización de proteínas *in situ*.

Descripción detallada de la invención

En una realización preferida del primer aspecto después del acoplamiento con el agente activante el soporte funcionalizado se lava con un agente acoplante de metales, preferiblemente EDTA y/o imidazol, con lo que se consigue eliminar cualquier proteína no unida de forma covalente al soporte de manera sencilla.

Normalmente la etapa de acoplamiento se hace en presencia de un disolvente. La temperatura de trabajo en la reacción de acoplamiento depende de varios factores, como la estabilidad de los productos, pero suele estar entre 5 y 70°C.

En una realización preferida se hace reaccionar entre 0,001 y 50 mg de proteína por cm² de soporte biofuncionalizable, y más preferiblemente entre 0,1 y 2 mg de proteína por cm². Se pueden utilizar entre 0,1 y 10000 equivalentes de agente activante por mol de proteína y preferiblemente entre 1 y 100 equivalentes de agente activante por mol de proteína.

El pH de la reacción de acoplamiento debe de estar en 4 y 10, pero se obtienen mejores resultados en los intervalos más cercanos a la neutralidad, por ejemplo a un pH entre 6 y 9, más preferiblemente entre 6,5 y 8, y aun más preferiblemente de un tampón acuoso principalmente Hepes (pH 7).

Los soportes deben constar de grupos funcionales capaces de ser derivatizados. Estos grupos son conocidos en la técnica y pueden estar ya presentes en el material de partida o introducirse mediante reacciones de derivatización. Normalmente el soporte biofuncionalizable comprende grupos en la superficie tales como -OH, -NH₂, -SH y -N₃, preferiblemente -OH. Este -OH puede estar en forma de Si-OH, CH₂OH o -COOH. Los soportes útiles para la invención son vidrio, silicio, sílica, oro, plata, carbono, soportes orgánicos, micropartículas, nanopartículas magnéticas, nanopartículas de oro, nanopartículas de sílica, nanopartículas poliméricas, dendrímeros, quantum dots, nanotubos de carbono, polisacáridos, nanopartículas de paladio, nanopartículas de platino, poliestireno, poliláctico, poliácridamida, polimetacrilato, poliuretano, polivinilalcohol, resinas epoxiacrílicas o cualquiera de sus combinaciones. Más preferidos son vidrio, sílica, oro, plata, carbono, soportes orgánicos, micropartículas, nanopartículas magnéticas, nanopartículas de oro, nanopartículas de sílica, nanopartículas poliméricas, dendrímeros, quantum dots, nanotubos de carbono o cualquiera de sus combinaciones. Todavía más preferidos son vidrio, silicio o sílica. El oro también es un soporte interesante, así como las nanopartículas de oro. Otras nanopartículas de interés para la aplicación del presente proceso de biofuncionalización son las nanopartículas magnéticas, como las de magnetita. Los quantum dots son otro grupo de soportes preferidos. En el caso de que sea un polisacárido, preferiblemente este es agarosa.

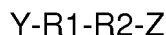
La zona rica en residuos de histidina puede ser de diferente naturaleza. Por ejemplo ésta puede estar en la proteína (PROT) en forma de una cola de entre 2 y 14 histidinas (Hp), y preferiblemente entre 4 y 10, por su extremo carboxilo terminal o en su región oligosacáridica. Otra alternativa es por modificación de varios residuos aminoácidos de su superficie por técnicas de biología molecular, por ejemplo mutagénesis dirigida.

La proteína puede ser una caderina, un péptido, una lectina, una enzima, un anticuerpo, un minianticuerpo, una abzima, un receptor proteico o cualquiera de sus combinaciones. Entre los anticuerpos, éste puede ser antiperoxidasa. Enzimas útiles son glucosidasas, peroxidasas, lacasas, amilasas, lipasas o cualquiera de sus combinaciones. Concavalina A es un ejemplo preferido de lectinas. Cuando se usa una caderina, preferiblemente ésta es caderina E.

Un experto en la materia claramente puede identificar los complejos quelatantes útiles para la presente invención. El artículo Angew. Chem. Int. Ed. 2008, 47, páginas 9618 a 9647, describe diferentes grupos quelantes útiles para la presente invención. Adicionalmente el contenido total de dicho artículo, y en especial los grupos quelante y puentes, es introducido en la presente memoria por referencia. Ejemplos específicos de grupos quelantes son ácido nitrilotriacé-

tico (NTA), ácido iminodiacético (IDA), ácido aspártico carboximetilado (CM-Asp), tris(carboximetil)etilenodiamina (TED) o cualquiera de sus combinaciones. Entre los preferidos esta el ácido nitriloacético (NTA).

El grupo puente L, es opcional, por lo que en una realización particular agente quelante está directamente unido a la superficie de soporte. En el caso de que exista tal grupo L, estos son conocidos en la técnica. Preferiblemente estos son los descritos en Angew. Chem. Int. Ed. 2008, 47, páginas 9618 a 9647. Otros grupos puentes pueden ser los de la siguiente fórmula:



donde:

Y es seleccionada entre Si, C(=O), -C(OH)H- y -CH₂-;

Z es seleccionada entre S, O, C(=O), -C(OH)H-, -C(OH)CH₂- y -CH₂-;

R1 y R2 pueden ser independientemente seleccionados entre: (CH₂)_a siendo "a" un numero entero entre 0 y 30, preferentemente entre 1 y 16; y (OCH₂CH₂)_b siendo "b" un número entero entro a 0 y 100, preferentemente entre 1 y 40. En una realización particular Y es -C(OH)H- y en otra Z es -C(OH)CH₂-. Los silanos, y en especial cuando el átomo de Si está directamente unido a la superficie del soporte son muy utilizados en la técnica debido a facilidad de introducción y estabilidad. Evidentemente el grupo L debe de ser al menos bifuncional, y antes de introducirse debe de tener grupos reactivos capaces de reaccionar con el soporte y el agente quelante directamente o con la ayuda de otro reactivo. Por ejemplo estos grupos precursores para la formación de Y pueden ser SH, OH, Si(OH)₃, Si(OMe)₃, Si(OEt)₃, COOH, epóxido, N₃, NH₂ o etilino. Por ejemplo estos grupos precursores para la formación de Z pueden ser SH, OH, COOH, epóxido, N₃, NH₂ o etilino.

El catión metálico se puede seleccionar entre Ni²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, Co²⁺, Mn²⁺, Mg²⁺, Ag⁺, Ga³⁺, Fe³⁺, Al³⁺, Zr⁴⁺, Ca²⁺, Be²⁺, Mg²⁺, Ba²⁺, Ti⁴⁺, V³⁺, Cr²⁺, Cr³⁺ y cualquiera de sus combinaciones. Preferiblemente este es Ni²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, Co²⁺, Mn²⁺, Mg²⁺, Ag⁺, Ga³⁺, Fe³⁺, Al³⁺, Zr⁴⁺ o cualquiera de sus combinaciones. Los más preferidos son el Ni²⁺, Cu²⁺, Co²⁺ o cualquiera de sus combinaciones.

El agente de acoplamiento, o activante, en una realización preferida es Sulpho- NHS, NHS, EDC, HATU, CDI, DCC o cualquiera de sus combinaciones, preferiblemente se utiliza la combinación NHS y EDC.

En un caso particular, se han empleado superficies silanizadas a las que se ha incorporado un complejo (ácido nitrilotriacético (NTA)) capaz de quelar metales. En primera instancia tiene lugar la quelación de las colas de polihistidinas a los residuos del agente quelatante empleando cationes metálicos. Esta primera unión garantiza una alta afinidad y asegura la correcta orientación de las proteínas en las superficies. Sin embargo, la estabilidad de esta unión polihistidina-NTA es muy dependiente de cambios de pH, fuerza iónica etc. (Crowe *et al*, 1994; Schmitt *et al*, 1993). Para garantizar una unión estable a la superficie, se lleva a cabo la segunda etapa de unir covalente en forma de amida los grupos aminos de las cadenas de histidinas y los grupos carboxilados presentes, como por ejemplo en el NTA. Las superficies biofuncionales preparadas así han sido caracterizadas por microscopía de fluorescencia, medidas de ángulos de contacto y XPS. Además en estudios de AFM se ha confirmado la estabilidad de la unión proteína-biomaterial. Estas superficies han sido también probadas como una excelente plataforma de unión adhesiva para células que presentan caderinas en su superficie, confirmando así el gran potencial que poseen como sistemas modelo para el estudio de interacciones caderina-caderina, así como para promover la adhesión celular en implantes artificiales. Además se ha conseguido un total control en la orientación de las proteínas inmovilizadas sobre estos materiales sin afectar su conformación, función, y garantizar la plena accesibilidad del sitio activo de la proteína. Al mismo tiempo debido a que estas colas de polihistidinas constituyen una de las modificaciones más utilizadas para la purificación de proteínas recombinantes, este método proporciona las bases para el desarrollo de un gran número de aplicaciones para el estudio de problemas a nivel de moléculas individuales así como para nanobiotecnología. También se consiguió una unión covalente y estable de la proteína sobre la superficie del material, sin que sea dependiente de condiciones externas, y asegurando la perfecta orientación de la proteína. Esta funcionalización en los materiales les confieren un gran potencial en el desarrollo de nuevos biomateriales.

En una de las realizaciones de preferidas del segundo aspecto el soporte funcionalizado es obtenible por cualquiera de los procesos como se definen en el aspecto primero y en cada una de sus realizaciones.

Los soportes una vez biofuncionalizados puede tener diferentes usos finales. Por ejemplo estos pueden ser un biochip, un implante, un scaffold 3D, un biosensor basados en superficies, nanopartículas o nanotubos de carbono biofuncionalizados, sistemas de separación basados en partículas magnéticas, sistemas de separación basados en partículas de metales nobles, columnas de purificación, microarrays, biorreactor, sistemas de liberación de fármacos (basados en partículas y dendrímeros) y agentes de contraste basados en nanopartículas magnéticas. Los más preferidos es cuando el soporte biofuncionalizado es un biochip, un implante, biosensores basados en superficies, nanopartículas o nanotu-

bos de carbono biofuncionalizados, sistemas de separación basados en partículas magnéticas, microarrays y sistemas de liberación de fármacos (basados en partículas y dendrímeros).

Definiciones

Por soporte biofuncionalizable en el contexto de la presente invención se refiere a un material que comprende grupos capaces de ser funcionalizados en la superficie. Estos grupos funcionalizables pueden estar ya en el soporte en sí, o haber sido introducidos por derivatización del soporte. Ejemplos preferidos de estos grupos funcionalizables son -OH, -CO₂H, -NH₂, -SH y -N₃, preferentemente -OH (como el SiOH, -CH₂OH o el -CO₂H). Este material incluye pero no está limitado a vidrio, silicio, sílica, oro, plata, carbono, soportes orgánicos, micropartículas, nanopartículas magnéticas, nanopartículas de oro, nanopartículas de sílica, nanopartículas poliméricas, dendrímeros, quantum dots, nanotubos de carbono y polisacáridos.

Grupos puente L se entiende todo grupo bifuncional que sea introducido mediante un derivado de L capaz de reaccionar en uno de sus extremos con la superficie, y por su otro extremo con un grupo quelante.

Grupo quelante B se entiende a un compuesto químico capaz de unirse al grupo puente L y quelar cationes metálicos.

Las polihistidinas útiles para la presente invención son oligopéptidos de histidina, y comprenden, pero no están limitadas a, entre 2 y 14 histidinas, y preferiblemente entre 4 y 10.

Por proteína (PROT) capaz de ser unida a estos soportes biofuncionalizados se entiende una proteína con una zona rica en residuos de histidina (al menos 2 residuos de histidina). Una forma de generar esta zona rica en residuos de histidina es introducir una cola de polihistidinas (Hp) por el extremo carboxilo terminal de la secuencia peptídica (por técnicas de biología molecular) o en su región oligosacáridica (por modificación química). También puede ocurrir que esta zona rica en residuos de histidina exista naturalmente en la estructura primaria de la proteína (IgG, proteínas de fusión de virus envueltos, histatinas, proteínas knob, glicoproteínas, proteínas de membrana, proteínas priónicas) o ser introducida por modificación de varios residuos aminoacídicos de su superficie por técnicas de biología molecular (mutagénesis dirigida, etc.).

Caderinas son las glicoproteínas transmembranales de monopaso de uniones homofílicas responsables de las uniones célula-célula para mantener la integridad de los tejidos animales. Es una molécula de unos 700-750 aminoácidos, y son específicas de tipo celular. Crean uniones homofílicas dependientes de Ca²⁺. Hay diferentes tipos de caderinas.

1° Caderinas clásicas o tradicionales: Existen varios tipos de caderinas y siendo las más representativas:

- * Caderina-E (ivomorulina). Presente en hígado, en los epitelios y en el embrión de mamíferos antes de su nidación en el útero.
- * Caderina-N. En células nerviosas, corazón, músculo esquelético, fibroblastos y en células del cristalino.
- * Caderina-P. Epidérmica, placentaria y en algunos organismos en tejidos embrionarios.
- * Caderina-V. Presente en células epiteliales que revisten los vasos sanguíneos.

2° Caderinas no clásicas o no tradicionales:

- * Demogleína y desmocolina. Aparecen en células epiteliales de la piel (en desmosomas).
- * Caderina-T. Aparece en neuronas y en células musculares.
- * Protocaderina. Aparecen en neuronas.

Descripción de las figuras

Figura 1a: Activación del soporte de vidrio con epoxisilano y posterior funcionalización con NTA.

Figura 1b: Unión covalente y orientada de fragmentos de caderinas con colas de histidinas sobre superficies con NTA. Los fragmentos de caderinas con las colas de hexahistidinas fueron primero inmovilizadas mediante la conocida tecnología de Ni-NTA de una manera orientada. Entonces las proteínas fueron unidas de manera covalente a los grupos carboxilo de los grupos NTA mediante EDC/NHS.

Figura 2: Inmunodetección de los fragmentos de caderinas unidos covalentemente a las superficies con NTA. La microscopía confocal de los soportes de vidrio covalentemente (a) o no-covalentemente (b) funcionalizadas con los fragmentos de caderinas con hexa-histidinas. Ambos tipos de superficies fueron tratados con imidazol/EDTA para eliminar las proteínas unidas de manera no covalente. Finalmente, los soportes de cristal cubiertos la mitad con (+) y la otra mitad sin (-) indican el marcaje específico (c). Barra de escala = 50 μm.

Figura 3: Análisis de microscopía de fuerzas atómicas dinámica de superficies, (a) La cobertura de la proteína unida covalentemente es de alrededor del 80%, con un altura de la cobertura de una molécula individual (9 nm), como se muestra en el perfil. La cobertura de la proteína unida no-covalentemente (b) es cerca del 15%, con una altura correspondiente a una molécula individual. Aumentando poco a poco la fuerza de interacción entre la punta y la muestra de la muestra con proteína unida de manera no-covalente, la proteína se elimina fácilmente, como se puede observar en la figura d. La figura c muestra la superficie control de la muestra NTA+Ni. La muestra presenta un perfil plano con pocos Å de altura.

Figura 4: La dinámica de la adhesión celular depende de la biofuncionalización de la superficie. Las células HC11 fueron incubadas durante diferentes tiempos de incubación sobre las superficies de vidrio cubiertas con NTA y decoradas covalentemente o no con fragmentos de caderinas, como se indica en las imágenes. Los contactos adhesivos se observan claramente mediante las imágenes del microscopio electrónico de barrido.

Figura 5: Se permitió a las células HC11 adherirse a superficies cubiertas con NTA (d, e, f) o E-caderinas (a, b, c) durante 1 h 30 en ausencia de suero. Las células fueron entonces fijadas, permeabilizadas, marcadas para caderinas (a, d), actina (b, e) y DNA (c, f) y observadas por microscopía confocal. En las superficies de caderinas, muchas células están bien extendidas y presentan un gran número de prolongaciones de membrana implicando contactos de caderinas. Las fibras de actinas muestran una organización radial típica debida a las uniones de caderinas. Se observan muy pocos contactos en las superficies de NTA (d, e, f). Las secciones ortogonales en los ejes x-z e y-z muestran diferencias claras sobre la adhesión y altura de las células en las diferentes superficies. Las células redondeadas y las extendidas tienen entre 13-15 y 6-8 μm de altura respectivamente. Barra de escala 15 μm .

Ejemplos

Materiales

El agua empleada en las reacciones y para las etapas de lavado se ha obtenido a través de un sistema de purificación de agua MILLI-Q A10 de Millipore.

Para la activación de los soportes de vidrio, se ha empleado ácido sulfúrico (ACS, 95-98%) y peróxido de hidrógeno (30%) de Sigma-Aldrich.

Para la funcionalización de los soportes de vidrio se ha empleado NTA-NH₂, (3-glycidiloxipropil)trimetoxisilano (>98%), ácido N-(5-amino-1-carboxypentil)iminodiacético (>97%, TLC), tolueno seco (99,8%), carbonato de sodio (>99%) y bicarbonato sódico (99,7%) fueron dispensados por Sigma-Aldrich.

Para la inmovilización de proteínas, se empleó cloruro de níquel II hexahidrato, Hepes (>99,5%), hidrocloreto de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida cristalino, imidazol (ACS, >99%) de Sigma-Aldrich. N-hidroxisuccinimida (>97%) fue obtenido de Fluka. Cloruro sódico (ultrapuro, 5 M) de Gibco. Etilendiaminotetraacético (EDTA, >99%) fue obtenido de Panreac.

Para la microscopía electrónica de barrido, se empleó glutaraldehído (25% en agua) y hexametildisilazano (HDMS, >99%) suministrado por Sigma-Aldrich. Cacodilato sódico y tetróxido de osmio fueron suministrados por Agar Scientific. Ácido tánico ha sido distribuido por Fluka. Metano (Spectranal, >99%) se obtuvo de Riedel-de Haën. Acetato de uranilo se obtuvo de Eloïse SARL.

Para la inmunoquímica, se empleó formaldehído, Tritón X-100 y seroalbúmina de vaca (BSA) suministrada por Sigma-Aldrich. Los anticuerpos monoclonales anti-E-caderina fueron suministrados por BD Biosciences. El anti-beta-catenina de ratón se suministró por Interchim.

Todos los reactivos se han usado tal como llegaron.

Activación de los soportes de vidrio

Los soportes de vidrio fueron lavados con solución piraña (H₂SO₄ y 30% H₂O₂ 3:1) durante 30 min. a temperatura ambiente (RT). Los vidrios fueron lavados varias veces con agua milli-Q y secados bajo una corriente de nitrógeno.

Funcionalización de los soportes de vidrio con ácido N-(5-amino-1-carboxipentil)iminoacético (NTA-NH₂)

Una disolución al 2% de 3-(2,3-epoxipropoxi)propiltrimetoxisilano en tolueno seco fue añadida a temperatura ambiente solo los soportes previamente activados y se dejó reaccionar durante una noche. Después de lavar abundantemente con tolueno y con una disolución 10 mM de tampón carbonato pH 10,8, los soportes de vidrio se incubaron durante una noche a temperatura ambiente con una disolución 25 mM de NTA-NH₂ en tampón carbonato a pH 10,8. Los soportes se lavaron y secaron después.

Expresión y purificación de los fragmentos de caderinas (E/EC12) marcadas con hexahistidina

El fragmento extracelular de E-caderina de ratón (MIERG-E/EC12) correspondiente a los dos módulos más externos de la caderina han sido modificadas en su extremo C-terminal con una etiqueta de hexahistidinas siguiente protocolos previamente descritos (Courjean *et al*, 2008). Brevemente, la secuencia IEGR se ha introducido en el plásmido del fragmento de caderina, para obtener la correcta unión del fragmento de caderina en el término N-ter. Para la producción de la proteína quimera, 500 mL de Terrific Broth suplementado con 50 ug/mL de kanamicina fue inoculado con una colonia transformada y síntesis de proteínas inducida por IPTG. Las células se resuspendieron después en buffer de lisis (4 M urea, 50 mM Na₂HPO₄ (pH 7,8), 20 mM imidazol, y 20 mM beta-mercaptoetanol). El lisado resultante fue lavado por centrifugación y el sobrenadante fue incubado durante 2 h con Ni-NTA Superflow resinas de agarosa (Qiagen). Esta resina fue ampliamente lavada y dializada frente a PBS. La digestión de la proteasa de factor Xa (Qiagen) de MIEGR-E/EC12 fue obtenido durante 60 h a 16°C. Para finalizar este proceso se eliminó al enzima de la disolución con Xa Removal Resin (Qiagen). Finalmente los fragmentos E/EC12 resultantes fueron dializados frente a 20 mM Hepes y 150 mM NaCl (pH 7) para eliminar los iones Ca²⁺ y el péptido. La pureza de la proteína fue comprobada por SDS-PAGE, Western blotting y espectrometría de masas.

Inmovilización de proteínas

Las superficies de NTA fueron entonces incubadas con una disolución acuosa de NiCl₂ para formar el medio de complejación para los grupos hexahistidinas. El fragmento de caderina (0,1 mg/mL) fue incubado a temperatura ambiente durante 1 h y las superficies fueron lavadas con 150 mM NaCl, 20 mM Hepes (pH 7,0).

Los fragmentos de caderinas fueron conjugados a los soportes de cristal mediante la reacción covalente entre los grupos carboxílicos del NTA con los grupos amino de las proteínas, empleando 50 mM EDC, 75 mM NHS, 20 mM Hepes (pH 7) durante 45 min a temperatura ambiente.

Las proteínas no unidas covalentemente se han eliminado empleando 1 M imidazol, 10 mM EDTA en 150 mM NaCl Hepes 20 mM (pH 7,5). Las muestras se lavaron abundantemente con 150 mM NaCl, 20 mM Hepes (pH 7).

Medidas de ángulos de contacto

Las medidas de ángulos de contacto se llevaron a cabo usando un equipo de gota comercial (Krüss, Alemania). Agua MilliQ (3 µL) se ha añadido sobre cada superficie usando una jeringa Hamilton a 25°C. Se han realizado tres medidas por muestras y el ángulo de contacto se calculó empleando el Sessile Drop Fitting Method.

X-ray Photoelectro Spectroscopy (XPS)

Las medidas de XPS se han realizado empleando un ESCALAB 220-iXL (Thermo-Electron, VG Company). La fotoemisión fue estimulada por una radiación monocromatizada Al K α (1486,6 eV). Un área de cerca de 150 µm de diámetro fue analizada para cada muestra.

Caracterización por AFM

Los análisis de microscopía de fuerzas atómicas se han desarrollado usando un instrumento comercial (www.nanotec.es) trabajando en modo dinámico en líquidos (PBS+Ca²⁺ o agua milli-Q). Para caracterizar las muestras con unión covalente de caderinas se ha empleado una micropalanca con una constante de fuerzas nominal de 2,8 N/m (www.nanosensors.com). Para obtener las imágenes de las superficies funcionalizadas con caderinas no unidas covalentemente, se han empleado micropalancas más suaves con constantes de fuerza de 0,03 N/m (BioLevers, www.olympus.com).

Cultivo celular

Las células epiteliales mamarias de ratón HC11 han sido previamente descritas (Wojcik *et al*, 2006) y han sido suministradas por Dr. L. Raptis (Kingston, ON Canada). Estas células han sido empleadas para los ensayos de unión de las células sobre las superficies cubiertas con caderinas. Las células crecieron en RPMI (Gibco) suplementado con 10% FCS, 100 U/mL penicilina G, y 100 mg/mL de estreptomycin, insulina, EGF. El cultivo celular se mantuvo a 37°C en una atmósfera húmeda y al 5% de CO₂.

Para los ensayos de adhesión celular, las muestras cubiertas con caderinas fueron cultivadas en un plato de cultivo de 24 pocillos. Las células fueron sembradas sobre las superficies funcionalizadas a la densidad de 1,2x10⁶ células/mL y cultivadas durante 2 h 30 min. Para cada periodo de cultivo (0,5, 1, 1,5 y 2,5 h), las muestras fueron retiradas y colocadas en un nuevo plato de cultivo.

Microscopía electrónica de barrido

Las células cultivadas sobre los cristales tratados e incubados con células, fueron lavados previamente con tampón cacodilato y las células fueron fijadas con 2,5% glutaraldehído (Sigma) en 0,1 M de cacodilato pH 7,4 durante 90 min a 4°C. Las muestras fueron tratadas con 1% de tetróxido de osmio, 1% ácido tánico y después deshidratadas con

una serie de baños en agua/metanol, marcados con 2% de acetato de uranilo en un 70% metanol antes del lavado crítico con HMDS. Las muestras fueron después cubiertas con oro y observadas en un Jeol JSM 6700F Field Emission Microscopio electrónico de barrido trabajando a 5 kV.

5 Inmunoquímica

Las células HC11 fueron sembradas sobre cubres a una densidad subconfluente e incubadas durante diferentes periodos de tiempo. Las células se fijaron entonces en 4% formaldehído en PBS durante 20 min, permeabilizadas con 0,2% Tritón X-100 en PBS durante 5 min, lavadas en PBS, bloqueadas durante 10 min en PBS conteniendo 0,2% BSA, y marcadas con los anticuerpos apropiados. Las células fueron entonces incubadas durante 1 h con anticuerpos primeros, lavados e incubados con anticuerpos secundarios durante 1 h. Anticuerpos monoclonales anti-E-cadherina (BD Biosciences) y anti-b-catenina de ratón (clon 14, Transduction Laboratories, Interchim) se han empleado a la dilución de 1:25 y 1:100 respectivamente en PBS conteniendo 0,2% BSA. Las imágenes obtenidas con el microscopio confocal (Leica DMR TCS SP2 AOBS9).

15 Soportes de vidrio modificados con ácido nitriloacético (NTA)

El vidrio ha sido utilizado como material modelo muy ampliamente para su uso en cultivo celular. El primer paso de esta funcionalización es eliminar los residuos orgánicos presentes sobre la superficie del vidrio, en orden de que la superficie quede completamente cubierta de grupos epoxisilanos, como se ha descrito en la parte experimental. Como se muestra en el Figura 1a, hemos empleado un método en dos pasos: i) primero, cubierta del soporte de vidrio con 3-(2,3-epoxipropoxi)-propiltrimetoxisilano; ii) unión, a través de grupos epóxidos del ácido (S)-N-(5-amino-1-carboxipentil)iminodiacético (NTA-NH₂). La incorporación de los epoxisilanos se desarrolló empleando tolueno seco para evitar la polimerización de los silanos. Los grupos epóxidos sobre la superficie garantizan una reacción eficaz con el grupo amino del NTA a pH básico (pH 10,8). A este pH, el amino del NTA fácilmente abre los grupos epoxi. Finalmente, las muestras fueron incubadas con una disolución 100 mM NiCl₂ para quelar los iones metálicos sobre el grupo NTA.

Las medidas de ángulos de contacto se han llevado a cabo para monitorizar la funcionalización. Estos datos pueden proporcionar información muy útil sobre la estructura y composición de la superficie. Después de lavar las muestras de vidrio con solución piranha, el ángulo de contacto cambió de 62° a cerca de 0° debido a la aparición de grupos hidroxilos sobre la superficie del cristal usando estas condiciones oxidativas. Después de la etapa de silanización usando 3-(2,3-epoxipropoxi)propiltrimetoxisilano, el ángulo de contacto cambia a 54°. Finalmente, la incorporación de los grupos NTA originó una disminución del ángulo de contacto a 36° debido a la aparición de los grupos carboxílicos sobre la superficie del cristal y por lo tanto al aumento de la hidroficidad de la superficie.

35 Inmovilización de las proteínas derivatizadas con grupos hexahistidinas

Una manera muy común de purificar proteínas recombinantes es empleando un grupo polihistidinas, e inmovilizarlas a soportes derivatizados con los grupos Ni-NTA. Nosotros hemos empleado esta estrategia para unir fragmentos de caderinas recombinantes con el grupo 6xHis a las superficies de vidrio (figura 1b). La orientación de las proteínas sobre el soporte vendrá dado por la posición de las histidinas en la secuencia de las proteínas. Los grupos amino de las colas de polihistidinas o de las caderinas en las proximidades de la superficie, son después unidas covalentemente con los grupos carboxilos de los NTA mediante EDC/NHS, dando lugar a un método sencillo y novedoso para unir proteína derivatizadas con 6xHis de una manera orientada y covalente. Se empleó una mezcla de EDTA/imidazol para eliminar los iones Ni²⁺, y por lo tanto eliminar las proteínas unidas de manera no-covalente (figura 2a, b).

Para evaluar la eficacia en la unión de caderinas, hemos tapado la mitad de un soporte de vidrio con un trozo de PDMS limpio y fresco. Los fragmentos de caderinas fueron incubados en la zona no tapada, y tratadas para asegurar una unión covalente, tal y como se ha descrito previamente. La proteína presente en la superficie se visualizó mediante inmunofluorescencia usando un anticuerpo anti-caderina marcado fluorescentemente y un microscopio confocal. Como se muestra en la Figura 2c, los fragmentos de caderinas se detectaron solo en la correspondiente mitad del soporte de vidrio.

El análisis de XPS se desarrolló para determinar la composición elemental para cada paso de modificación empleado en este estudio. El análisis confirmó el acoplamiento del NTA a la superficie del cristal (aumento de C y N) y la incorporación de caderina (aumento de C y N) (tabla 1).

Microscopía de fuerzas atómicas (AFM) ha confirmado la formación de uniones covalentes usando esta estrategia, evaluando la fuerza de unión, a nivel de molécula individual, a la superficie del soporte. La figura 3a muestra una imagen de la superficie con caderinas covalentemente unidas a las superficies. La cubierta de la superficie con proteínas es alta (en torno al 80% del área superficial) y muestra la altura esperada con respecto a las superficies solo funcionalizadas con NTA-Ni²⁺ (8-9 nm) como se muestra en el perfil. Además, cuando se intentó visualizar las muestras funcionalizadas con proteínas unidas no de forma covalente, la micropalanca terminaba por retirar a las proteínas de la superficie incluso realizando una mínima fuerza. De hecho no se consiguió visualizar a las proteínas en estas muestras (Figura 3b) hasta que no se empleó una micropalanca 100 veces más blanda que la usada para las muestras covalentes. En esta muestra, con unión no covalente, se ha observado una menor cubierta (alrededor del 15%) y con la altura de la proteína esperada (8-9 nm).

Adhesión de células a soportes de vidrio biofuncionalizados

Las caderinas son proteínas que participan en las uniones célula-célula, especialmente en los mecanismos específicos de adhesión celular mediado por las interacciones homofílicas que establecen y las cuales definen la selectividad célula-célula. Nosotros elegimos el fragmento de E-caderina E/EC12 para cubrir nuestra superficie porque promueve la adhesión de las células HC11, las cuales también expresan E-caderinas.

Con este propósito, sembramos células HC11, una línea celular mamaria de ratón, sobre las superficies de vidrio modificadas o no con nuestros fragmentos de E-caderinas de ratón y seguimos sus cinéticas de unión desde 30 min hasta 2 h 30 min. Mediante observación con un microscopio de contraste de fase después de 30 min, las células parecen que se adhieren ampliamente a las superficies. La densidad de células fue baja en este punto y se observó como creció con el tiempo.

Después se investigó la influencia de la superficie de caderinas sobre el desarrollo celular. Se observó que las células depositadas sobre las muestras con caderinas, redondeadas al principio, fueron desarrollando extensiones de membrana con el tiempo. Estas extensiones son mucho menos numerosas en la muestra control solo con NTA. Para obtener más información sobre estos contactos células-superficies, se estudió la morfología celular empleando un microscopio electrónico de barrido (SEM). Después de distintos tiempos de incubación, las células fueron fijadas con glutaraldehído y tratadas con agentes de contraste. Como se muestra en la figura 4, los análisis a altos aumentos revelan que después de 30 min sobre las superficies funcionalizadas con caderinas, las células comienzan a establecer contactos con numerosas extensiones de membrana. Después de 1 hora de incubación, aunque la mayoría de las células fueron aún redondas, nosotros pudimos también observar que alguna se adhirieron de manera más fuerte a las superficies.

Después de 1 h 30 y 2 h 30, muchas células estaban bien adheridas de manera fuerte a las superficies. Como se muestra en la Figura 4, las células respondieron a nuestras superficies decoradas con caderinas con grandes extensiones de membranas, visible después de 2 h 30, indicando que las células interaccionan fuertemente con el sustrato. Las células en los soportes control sin caderinas se comportaron de manera muy diferente. Después de 2 h 30, se encontraron muy pocas células adheridas, y la mayoría de ellas tenían forma circular. Un zoom de estas células mostró que no había presentes extensiones de membranas en estos casos.

Se empleó también un microscopio confocal para obtener mayor información. Se compararon la distribución de E-caderinas y actinas en las células adheridas HC11 sobre las superficies con caderinas unidas covalentemente (figura 5). Observamos que después de 1 h 30 una topografía similar a la obtenida por SEM: cuando las células se cultivan sobre superficies con caderinas, muchas células HC11 estaban bien adheridas y muy pocas adoptan formas circulares. Sobre estas células adheridas, la distribución de actina del citoesqueleto fue más densa en la periferia celular mientras que las caderinas fue más uniformemente distribuida sobre la superficie de las células. Sobre las pocas células adheridas con forma esférica encontradas sobre las superficies con caderinas (figura 5b), el marcaje fluorescente mostró que las fibras de actina formaban una red circular de filamentos rodeando el núcleo celular, junto con fibras radiales conectadas directamente con los extremos celulares, tal y como había sido descrito previamente (Gavard *et al*, 2004). En el plano X-Z y Y-Z, las caderinas fueron distribuidas sobre las áreas de contacto sobre las células adheridas, y formando clusters sobre las células redondeadas.

Como se observó por SEM, las células no se adhirieron a sustratos sin caderinas. Casi todas las células estaban redondeadas con una distribución de caderinas uniforme (figura 5d, e, f). Las fibras de actina, no formaron patrones de citoesqueleto típicos controlados por caderinas (figura 5b). Finalmente las secciones X-Z y Y-Z mostraron que las caderinas con tienen una localización preferencial y que la distribución de actina es uniforme alrededor de las células, delimitando sus perfiles.

	C	O	N
Vidrio	12,4	60,3	0,4
vidrio- NTA-NH2	18,9	52,95	1,9
vidrio-NTA-EC12	36,9	36,95	4,85
unión covalente			

Tabla 1: Resultados de XPS. Las muestras limpias, silanizadas y cubiertas con NTA. Estas superficies fueron entonces funcionalizadas con los fragmentos de caderinas E/EC12 con colas de hexahistidinas, covalente o no covalentemente unidas. Tras la incubación las superficies fueron lavadas con [imidazol 1 M/EDTA 10 mM], para eliminar las proteínas unidas no-covalentemente de las superficies.

Referencias

Geiger B, Spatz JP, Bershadsky AD (2009) Environmental sensing through focal adhesions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10(1): 21-33.

Curtis A, Riehle M (2001) Tissue engineering: the biophysical background. *Phys Med Biol* 46(4): R47-65.

Wong LS, Khan F, Micklefield J (2009) Selective covalent immobilization: strategies and applications. *Chem Rev* 109(9): 4025-4053.

Bettinger CJ, Langer R, Borenstein JT (2009) Engineering substrate topography at the micro and nanoscale to control cell function. *Angew Chem Int Ed Engl* 48(30): 5406-5415.

Jonkheijm P, Weinrich D, Schroder H, Niemeyer CM, Waldmann H (2008) Chemical strategies for generating protein biochips. *Angew Chem Int Ed Engl* 47(50): 9618-9647.

Thery M, Racine V, Pepin A, Piel M, Chen Y, Sibarita JB, Bornens M (2005) The extracellular matrix guides the orientation of the cell division axis. *Nat Cell Biol* 7(10): 947-953.

Perret E, Leung A, Morel A, Feracci H, Nassoy P (2002a) Versatile decoration of glass surfaces to probe individual proteins-Protein interactions and cellular adhesion. *Langmuir* 18(3): 846-854.

Fuss M, Luna M, Alcantara D, Fuente JM, Penades S, Briones F (2008) Supramolecular self-assembled arrangements of maltose glyconanoparticles. *Langmuir* 24(9): 5124-5128.

Schatz C, Louguet S, Le Meins JF, Lecommandoux S (2009) Polysaccharide-block-polypeptide copolymer vesicles: towards synthetic viral capsids. *Angew Chem Int Ed Engl* 48(14): 2572-2575.

Weisbrod SH, Marx A (2008) Novel strategies for the site-specific covalent labelling of nucleic acids. *Chem Commun (Camb)* 44:5675-5685.

de la Fuente JM, Andar A, Gadegaard N, Berry CC, Kingshott P, Riehle MO (2006) Fluorescent aromatic platforms for cell patterning. *Langmuir* 22(13): 5528-5532.

Song YF, McMillan N, Long DL, Kane S, Malm J, Riehle MO, Pradeep CP, Gadegaard N, Cronin L (2009) Micropatterned surfaces with covalently grafted unsymmetrical polyoxometalate-hybrid clusters lead to selective cell adhesion. *J Am Chem Soc* 131 (4): 1340-1341.

Chen CS, Mrksich M, Huang S, Whitesides GM, Ingber DE (1998) Micropatterned surfaces for control of cell shape, position, and function. *Biotechnol Prog* 14(3): 356-363.

Stevens MM, George JH (2005) Exploring and engineering the cell surface interface. *Science* 310(5751): 1135-1138.

Hartsock A, Nelson WJ (2008) Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta* 1778(3): 660-669.

Larue L, Antos C, Butz S, Huber O, Delmas V, Dominis M, Kemler R (1996) A role for cadherins in tissue formation. *Development* 112(10): 3185-3194.

Nishimura T, Takeichi M (2009) Remodeling of the adherens junctions during morphogenesis. *Curr Top Dev Biol* 89: 33-54.

Patel SD, Chen CP, Bahna F, Honig B, Shapiro L (2003) Cadherin-mediated cell-cell adhesion: sticking together as a family. *Curr Opin Struct Biol* 13(6): 690-698.

Perret E, Benoliel AM, Nassoy P, Pierres A, Delmas V, Thiery JP, Bongrand P, Feracci H (2002b) Fast dissociation kinetics between individual E-cadherin fragments revealed by flow chamber analysis. *EMBO J* 21 (11): 2537-2546.

Perret E, Leung A, Feracci H, Evans E (2004) Trans-bonded pairs of E-cadherin exhibit a remarkable hierarchy of mechanical strengths. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(47): 16472-16477.

Charrase S, Meriane M, Comunale F, Blangy A, Gauthier-Rouviere C (2002) N-cadherin-dependent cell-cell contact regulates Rho GTPases and beta-catenin localization in mouse C2C12 myoblasts. *J Cell Biol* 158(5): 953-965.

van Roy F, Berx G (2008) The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cell Mol Life Sci* 65(23): 3756-3788.

Thiery JP (2003) Cell adhesion in development: a complex signaling network. *Curr Opin Genet Dev* 13(4): 365-371.

Arulanandam R, Vultur A, Cao J, Carefoot E, Elliott BE, Truesdell PF, Larue L, Feracci H, Raptis L (2009) Cadherin-cadherin engagement promotes cell survival via Rac1/Cdc42 and signal transducer and activator of transcription-3. *Mol Cancer Res* 7(8): 1310-1327.

Dupin I, Camand E, Etienne-Manneville S (2009) Classical cadherins control nucleus and centrosome position and cell polarity. *J Cell Biol* 185(5): 779-786.

Ganz A, Lambert M, Saez A, Silberzan P, Buguin A, Mege RM, Ladoux B (2006) Traction forces exerted through N-cadherin contacts. *Biol Cell* 98(12): 721-730.

Ostuni E, Whitesides GM, Ingber DE, Chen CS (2009) Using self-assembled monolayers to pattern ECM proteins and cells on substrates. *Methods Mol Biol* 522: 183-194.

Crowe J, Dobeli H, Gentz R, Hochuli E, Stuber D, Henco K (1994) 6xHis-Ni-NTA chromatography as a superior technique in recombinant protein expression/purification. *Methods Mol Biol* 31: 371-387.

Schmitt J, Hess H, Stunnenberg HG (1993) Affinity purification of histidine-tagged proteins. *Mol Biol Rep* 18(3): 223-230.

Mateo C, Grazú V, Palomo JMP, Lopez-Gallego F, Fernandez-Lafuente R, Guisan JM (2007) Immobilization of Enzymes on Heterofunctional Epoxy Support. *Nature Protocols* 2(5): 1022-1033.

Courjean O, Chevreux G, Perret E, Morel A, Sanglier S, Potier N, Engel J, van Dorsselaer A, Feracci H (2008) Modulation of E-cadherin monomer folding by cooperative binding of calcium ions. *Biochemistry* 47(8): 2339-2349.

Wojcik EJ, Sharifpoor S, Miller NA, Wright TG, Watering R, Tremblay EA, Swan K, Mueller CR, Elliott BE (2006) A novel activating function of c-Src and Stat3 on HGF transcription in mammary carcinoma cells. *Oncogene* 25(19): 2773-2784.

Gavard J, Lambert M, Grosheva I, Martiens V, Irinopolou T, Riou JF, Bershadsky A, Mege EM (2004) Lamellipodium extension and cadherin adhesion: two cell responses to cadherin activation relying on distinct signalling pathways. *J Cell Sci* 117(Pt 2): 257-270.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para la funcionalización orientada de un soporte con una proteína (PROT), que comprende acoplar covalentemente:

a) una proteína (PROT) la cual tiene una zona rica en residuos de histidina (Hp);

b) con un soporte biofuncionalizable cuya superficie se le ha unido de forma covalente un complejo quelante y este se ha cargado con un catión metálico, siendo la fórmula general:



Siendo:

A el soporte;

X es un átomo de oxígeno, nitrógeno o azufre;

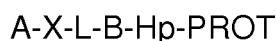
L es un grupo puente opcional entre el átomo X y el grupo B;

B un grupo quelante de metales con grupos carboxílicos;

M es un catión metálico, preferiblemente con valencia 2 ó superior;

c) en presencia de al menos un agente activante a un pH entre 4 y 10;

para la obtención de un soporte funcionalizado de fórmula:



2. El proceso según la reivindicación 1, **caracterizado** porque después del acoplamiento con el agente activante el soporte funcionalizado se lava con un agente acoplante de metales, preferiblemente EDTA y/o imidazol.

3. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque la etapa de acoplamiento se hace en presencia de un disolvente.

4. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque la etapa de acoplamiento se lleva a cabo a una temperatura entre 5 y 70°C.

5. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque se hace reaccionar entre 0,001 y 50 mg de proteína por cm² de soporte biofuncionalizable, preferiblemente entre 0,1 y 2 mg de proteína por cm².

6. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque comprende entre 0,1 y 10000 equivalentes de agente activante por mol de proteína, preferiblemente entre 1 y 100 equivalentes de agente activante por mol de proteína.

7. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque la etapa de acoplamiento se lleva a cabo a un pH entre 6 y 9, preferiblemente entre 6,5 y 8, más preferiblemente de un tampón acuoso principalmente Hepes (pH 7).

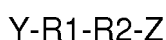
8. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque el soporte biofuncionalizable comprende grupos en la superficie tales como -OH, CHO, epóxidos, -NH₂, -SH y -N₃, preferentemente -OH.

9. El proceso según la reivindicación anterior, **caracterizado** porque el soporte biofuncionalizable es vidrio, silicio, sílica, oro, plata, carbono, soportes orgánicos, micropartículas, nanopartículas magnéticas, nanopartículas de oro, nanopartículas de sílica, nanopartículas poliméricas, dendrímeros, quantum dots, nanotubos de carbono, polisacáridos, nanopartículas de paladio, nanopartículas de platino, poliestireno, poliláctico, poliácridamida, polimetacrilato, poliuretano, polivinilalcohol, resinas epoxiacrílicas o cualquiera de sus combinaciones.

10. El proceso según cualquiera de las dos reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque el soporte biofuncionalizable es vidrio, sílica, oro, plata, carbono, soportes orgánicos, micropartículas, nanopartículas magnéticas, nanopartículas de oro, nanopartículas de sílica, nanopartículas poliméricas, polisacáridos, dendrímeros, quantum dots, nanotubos de carbono o cualquiera de sus combinaciones.

ES 2 378 936 A1

11. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, **caracterizado** porque el soporte biofuncionalizable es vidrio, silicio o sílica.
12. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, **caracterizado** porque el soporte biofuncionalizable es oro.
13. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, **caracterizado** porque el soporte biofuncionalizable es nanopartículas de oro.
14. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, **caracterizado** porque el soporte biofuncionalizable es nanopartículas magnéticas.
15. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, **caracterizado** porque el soporte biofuncionalizable es quantum dots.
16. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, **caracterizado** porque el soporte biofuncionalizable es agarosa.
17. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque la zona rica en residuos de histidina de la proteína (PROT) ha sido introducida en forma de una cola de entre 4 y 10 histidinas (Hp) por su extremo carboxilo terminal o en su región oligosacárida.
18. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores **caracterizado** porque la zona rica en residuos de histidina de la proteína (PROT) ha sido introducida por modificación de varios residuos aminoácidos de su superficie por técnicas de biología molecular, por ejemplo mutagénesis dirigida.
19. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, **caracterizado** porque la proteína es una caderina, un péptido, una lectina, una enzima, un anticuerpo, un minianticuerpo, una abzima, un receptor proteico o cualquiera de sus combinaciones.
20. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, **caracterizado** porque el anticuerpo es antiperoxidasa.
21. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, **caracterizado** porque la enzima es glucosidasa, peroxidada, lacasa, amilasa, lipasa o cualquiera de sus combinaciones.
22. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, **caracterizado** porque la lectina es concanavalina A.
23. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, **caracterizado** porque la proteína es una caderina, preferiblemente caderina E.
24. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque el complejo quelante es ácido nitriloacético (NTA), ácido iminodiacético (IDA), ácido aspártico carboximetilado (CM-Asp), tris(carboximetil) etilendiamina (TED) o cualquiera de sus combinaciones.
25. El proceso según la reivindicación anterior, **caracterizado** porque el complejo quelante es ácido nitriloacético (NTA).
26. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque el agente quelatante está directamente unido a la superficie de soporte.
27. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25, **caracterizado** porque hay un grupo puente L.
28. El proceso según la reivindicación anterior, **caracterizado** porque L es un grupo de fórmula:



donde:

Y es seleccionada entre Si, C(=O), -C(OH)H- y -CH₂-;

Z es seleccionada entre S, O, C(=O), -C(OH)H-, -C(OH)CH₂- y -CH₂-;

R1 y R2 pueden ser independientemente seleccionados entre: (CH₂)_a siendo "a" un número entero entre 0 y 30, preferentemente entre 1 y 16; y (OCH₂CH₂)_b siendo "b" un número entero entre 0 y 100, preferentemente entre 1 y 40.

29. El proceso según la reivindicación 28, **caracterizado** porque Y es $-\text{C}(\text{OH})\text{H}-$,

30. El proceso según la reivindicación 28, **caracterizado** porque Z es $-\text{C}(\text{OH})\text{CH}_2-$.

31. El proceso según la reivindicación 28, **caracterizado** porque L comprende un silano y el átomo de Si está directamente unido a la superficie del soporte.

32. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque el catión metálico es Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ag^+ , Ga^{3+} , Fe^{3+} , Al^{3+} , Zr^{4+} , Ca^{2+} , Be^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} , Ti^{4+} , V^{3+} , Cr^{2+} , Cr^{3+} o cualquiera de sus combinaciones.

33. El proceso según la reivindicación anterior, **caracterizado** porque el catión metálico es Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ag^+ , Ga^{3+} , Fe^{3+} , Al^{3+} , Zr^{4+} o cualquiera de sus combinaciones.

34. El proceso según la reivindicación anterior, **caracterizado** porque el catión metálico es Ni^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} o cualquiera de sus combinaciones.

35. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque el agente activante es Sulpho-NHS, NHS, EDC, HATU, CDI, DCC o cualquiera de sus combinaciones, preferiblemente NHS y EDC.

36. Un soporte funcionalizado de fórmula A-X-L-B-Hp-PROT, siendo A, X, L, B, Hp y PROT como se definen en las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque todos los grupos están unidos por enlaces covalentes.

37. El soporte funcionalizado según la reivindicación anterior, obtenible por cualquiera de los procesos como se definen en las reivindicaciones 1 a 35.

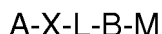
38. El soporte según cualquiera de las dos reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque el soporte es un biochip, un implante, un scaffold 3D, un biosensor basados en superficies, nanopartículas o nanotubos de carbono biofuncionalizados, sistemas de separación basados en partículas magnéticas, sistemas de separación basados en partículas de metales nobles, columnas de purificación, biorreactor, microarrays, sistemas de liberación de fármacos (basados en partículas y dendrímeros) y agentes de contraste basados en nanopartículas magnéticas.

39. El soporte según cualquiera de la reivindicación anterior, **caracterizado** por que el soporte es un biochip, un implante, un biosensores basados en superficies, nanopartículas o nanotubos de carbono biofuncionalizados, sistemas de separación basados en partículas magnéticas, microarrays y sistemas de liberación de fármacos (basados en partículas y dendrímeros)

40. Un conjunto que comprende al menos:

a) una proteína (PROT) la cual tiene una zona rica en residuos de histidina (Hp);

b) un soporte biofuncionalizable cuya superficie se le ha unido de forma covalente un complejo quelante y este se ha cargado con un catión metálico, siendo la fórmula general;



Siendo:

A el soporte;

X es un átomo de oxígeno, nitrógeno o azufre;

L es un grupo puente opcional entre el átomo de oxígeno del soporte y el grupo B;

B un grupo quelante de metales con grupos carboxílicos;

M es un catión metálico, preferiblemente con valencia 2 ó superior;

c) agente activante;

siendo la definición de los grupos la misma que para las reivindicaciones anteriores.

41. Uso del conjunto definido en la reivindicación anterior para la inmovilización de proteínas *in situ*.

FIG. 1A

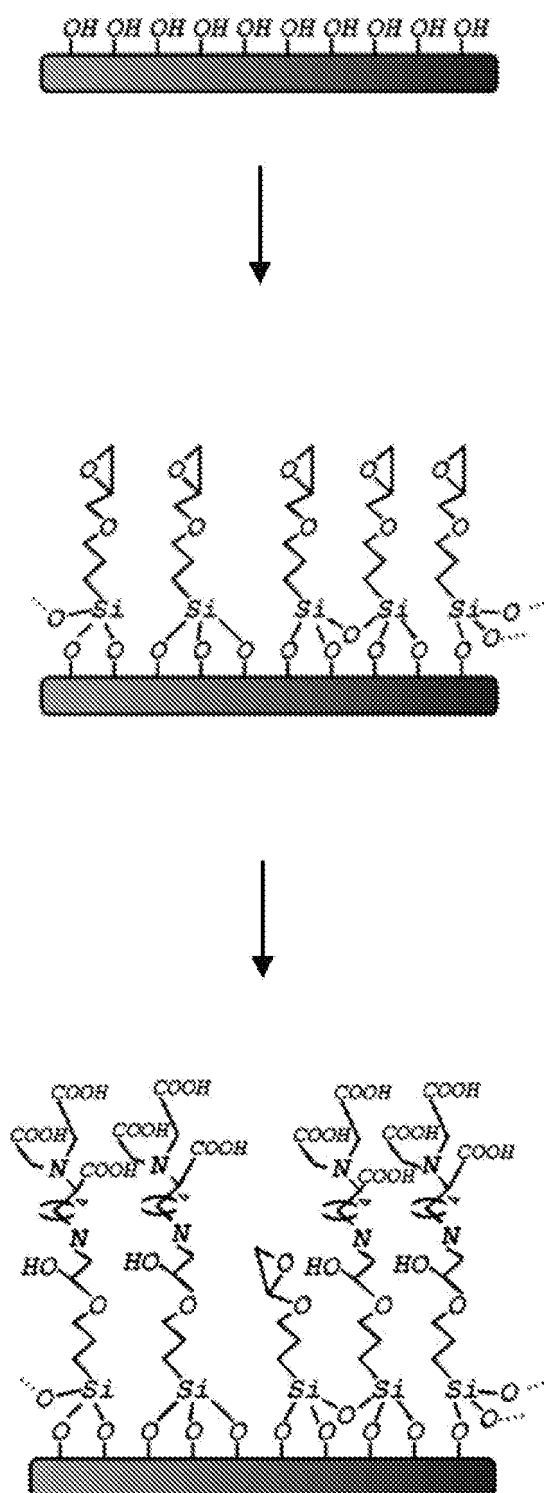


FIG. 1B

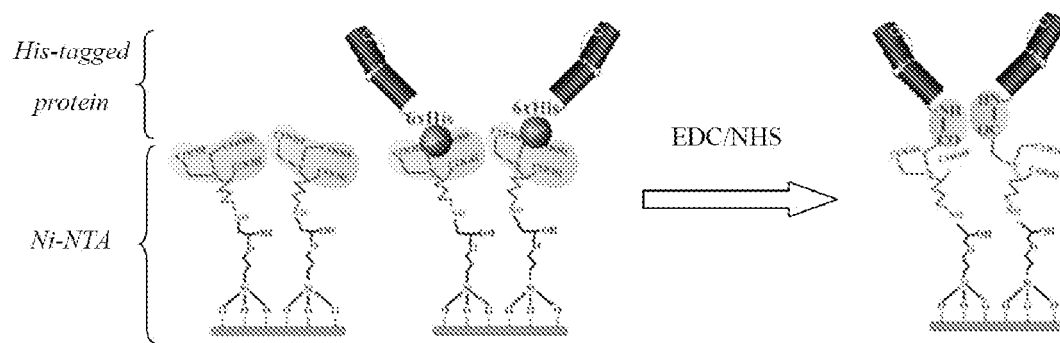


FIG. 2

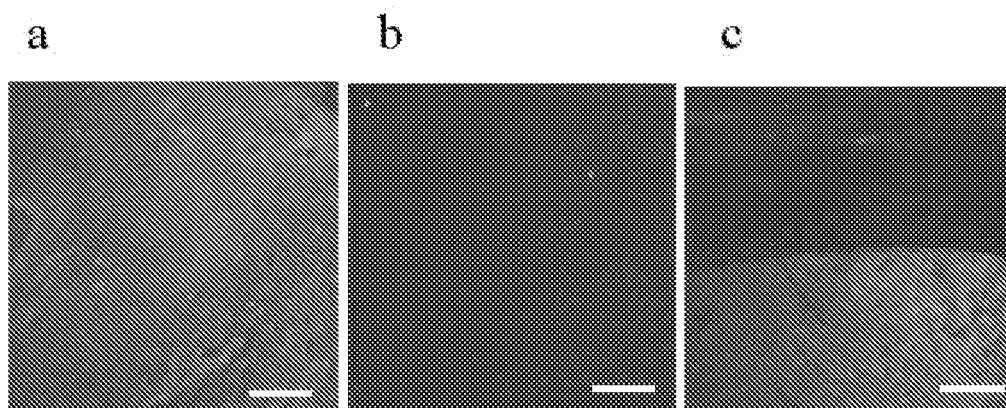


FIG. 3

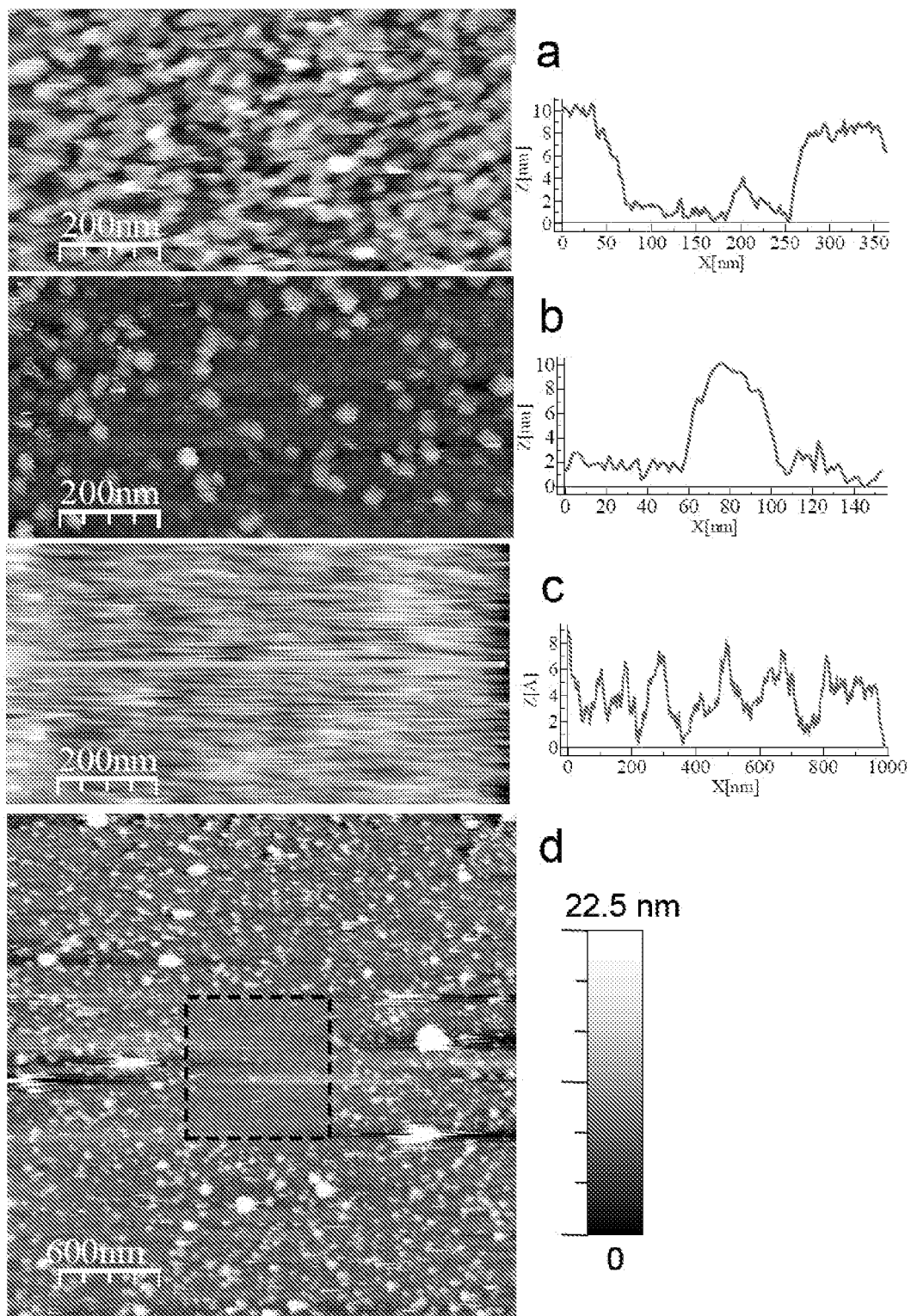


FIG. 4

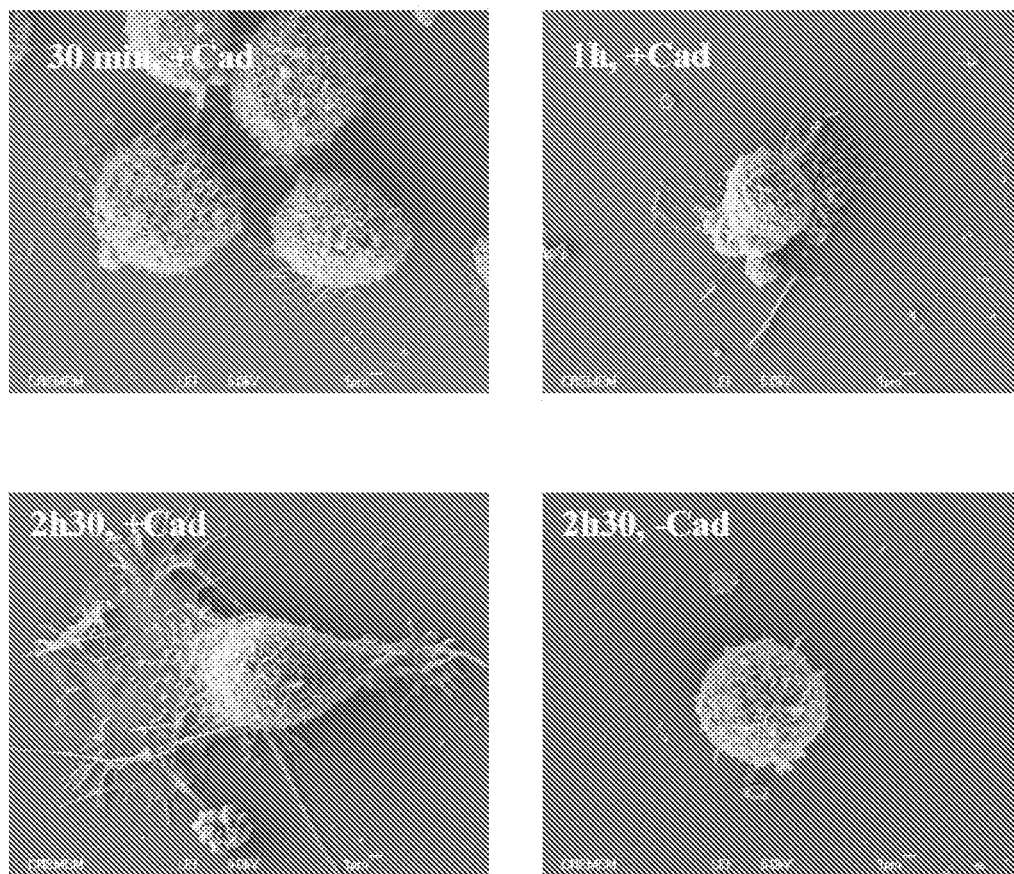
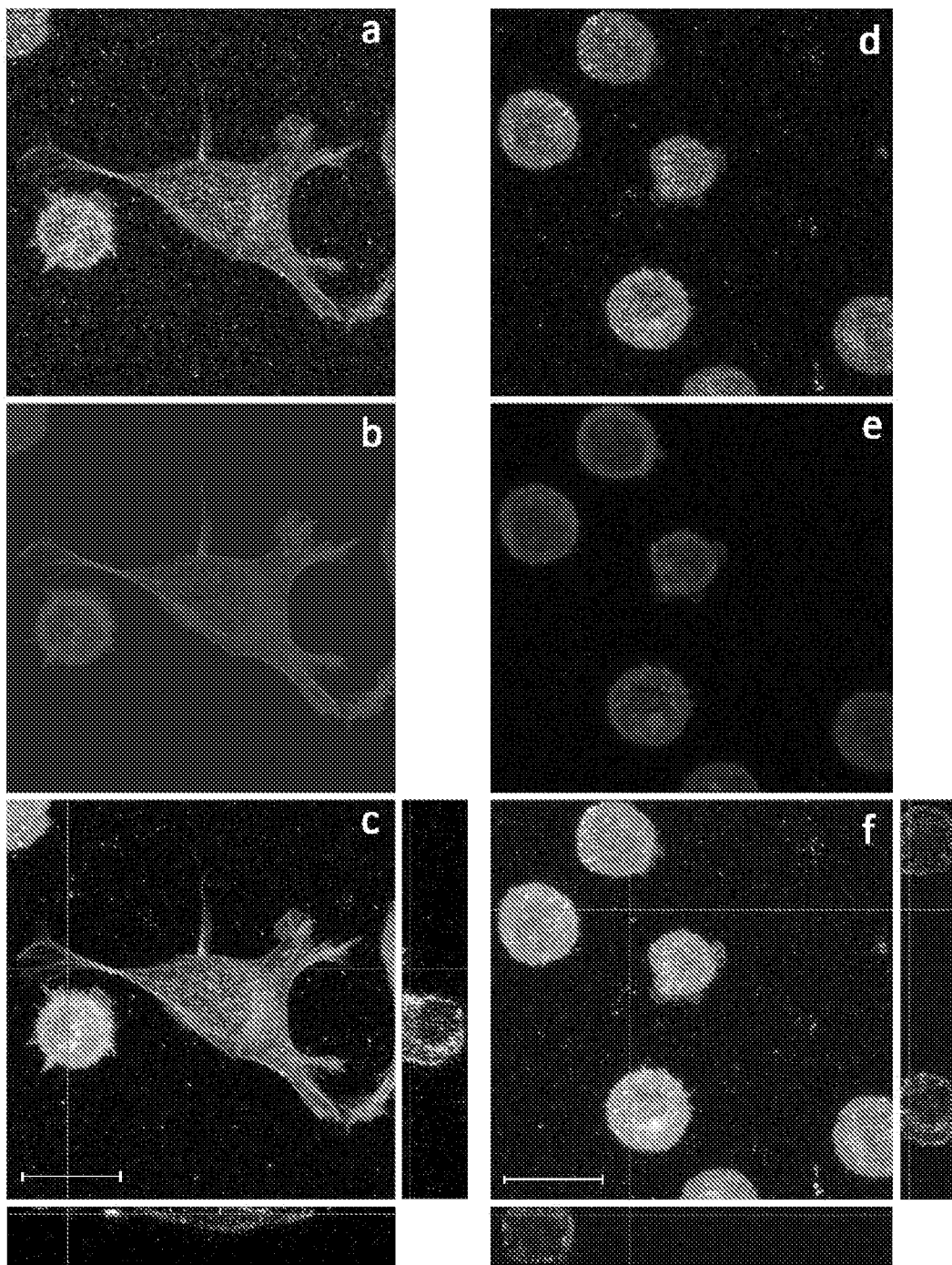


FIG. 5





OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 200931092

②② Fecha de presentación de la solicitud: 01.12.2009

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **G01N33/543** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 2004046724 A1 (BIACORE AB, REVERSE PROTEOMICS RES INST CO) 03.06.2004, ejemplos prácticos 1-13.	1-41
X	US 2009098568 A1 (YAMADA TSUYOSHI et al.) 16. 04.2009, ejemplos 1-3; párrafo 96.	1-41
A	FICK, J., WOLFRAM, T., BELZ, F., et al. Surface-Specific Interaction of the Extracellular Domain of Protein L1 with Nitrilotriacetic Acid-Terminated Self-Assembled Monolayers. Langmuir, 9.10.2009 (publicación on line), Vol 26, Nº 2, Introducción y figura 1b.	17,23

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
30.03.2012

Examinador
A. Barrios de la Fuente

Página
1/6

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

G01N

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, BIOSIS, EMBASE, NPL, XPESP

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 30.03.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 4-6, 11-18,20,22,23,27-31	SI
	Reivindicaciones 1-3, 7-10, 19, 21, 24-26, 32-41	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 4-6, 11-18, 20, 22, 23, 27-31	NO

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

Base de la Opinión.-

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

1. Documentos considerados.-

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO 2004046724 A1 (BIACORE AB, REVERSE PROTEOMICS RES INST CO) 03.06.2004, ejemplos prácticos 1-13.	03.06.2004
D02	US 2009098568 A1 (YAMADA TSUYOSHI et al.) 16.04.2009, ejemplos 1-3; párrafo 96.	16.04.2009
D03	FICK, J., WOLFRAM, T., BELZ, F., et al. Surface-Specific Interaction of the Extracellular Domain of Protein L1 with Nitrilotriacetic Acid-Terminated Self-Assembled Monolayers. Langmuir, 9.10.2009 (publicación on line), Vol 26, Nº 2, Introducción y figura 1b.	9.10.2009

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 tiene por objeto un proceso para la funcionalización orientada de un soporte con una proteína, que comprende acoplar covalentemente una proteína la cual tiene una zona rica en residuos de histidina, con un soporte biofuncionalizable en presencia de al menos un agente activante, a un PH entre 4 y 10. Sobre la superficie del soporte se une covalentemente un complejo quelante y esté se carga con un catión metálico, siendo la fórmula general A-X-L-B-M, donde A es el soporte, X es un átomo de oxígeno, nitrógeno o azufre, L es un grupo puente opcional, B un grupo quelante de metales con grupos carboxílicos y M un catión metálico (Reivindicaciones 1 y siguientes hasta 35).

También es objeto de la presente solicitud el soporte funcionalizado que responde a la fórmula A-X-L-B-Hp-PROT, siendo Hp-PROT una proteína con una zona rica en residuos de histidina (Reivindicaciones 36-39), así como el conjunto que comprende al menos una proteína rica en residuos de histidina, un soporte biofuncionalizable de fórmula general A-X-L-B-M y un agente activante (Reivindicación 40) y el uso de dicho conjunto para la inmovilización de proteínas in situ (Reivindicación 41).

El documento D01 divulga un proceso para la funcionalización orientada de un soporte con una proteína que presenta una zona rica en residuos de histidina en forma de cola.

El documento D02 divulga un proceso para la funcionalización orientada de un soporte con una proteína que presenta una cola con dos partes diferenciadas, una primera parte que se utiliza para purificar la proteína en cuestión y una segunda parte, que corresponde a una zona rica en residuos de histidina por la que se fija la proteína al soporte.

El documento D03 divulga un estudio relativo a la interacción del dominio extracelular de la proteína N-caderina con un soporte. La interacción con el soporte tiene lugar por medio de un complejo quelante NTA que se carga con Ni^{2+} . Se trata de un soporte metálico con una monocapa autoensamblada (SAM). La cola de histidinas se encuentra situada en el extremo carboxilo terminal de la proteína.

NOVEDAD (Art. 6 Ley 11/86)

El documento D01 divulga un proceso para la funcionalización orientada de un soporte con una proteína, que comprende acoplar covalentemente una proteína con una zona rica en residuos de histidina a un soporte (ver ejemplos). Para este proceso se utiliza un soporte comercial de carboximetil dextrano al que se encuentra unido de forma covalente un complejo quelante -NTA-. Este quelante se carga con un catión metálico, Ni^{2+} (ver ejemplos prácticos). El soporte de carboximetil dextrano presenta grupos carboxilo en la superficie. El proceso de funcionalización se ha llevado a cabo en presencia de un agente activante (combinación de NHS y EDC) a un pH próximo a 7,4. La etapa de acoplamiento se lleva a cabo en presencia de un disolvente. Entre las proteínas que se unen al soporte se encuentran distintas enzimas, entre ellas por ejemplo, la cicloxigenasa 2, enzima que presenta actividad peroxidasa (ver ejemplo práctico 2). El soporte funcionalizado es un biochip, también denominado "sensor chip".

Por lo tanto y sobre la base de lo divulgado en D01 se considera que el objeto de las reivindicaciones 1, 3, 7- 10, 19, 21, 24- 26, 32- 41 no es nuevo en el sentido del artículo 6 de la ley de Patentes 11/86.

El documento D02 divulga un proceso para la funcionalización orientada de un soporte con una proteína, que comprende acoplar covalentemente una proteína con una zona rica en residuos de histidina a un soporte (ver ejemplos prácticos 1-3). Para este proceso se utiliza un soporte comercial de carboximetil dextrano al que se encuentra unido de forma covalente un complejo quelante -NTA-. Este quelante se carga con un catión metálico, Ni^{2+} . El soporte de carboximetil dextrano presenta grupos carboxilo en la superficie. El proceso de funcionalización se ha llevado a cabo en presencia de un agente activante (combinación de NHS y EDC) a un pH próximo a 7,4. La etapa de acoplamiento se lleva a cabo en presencia de un disolvente. Tras la reacción de acoplamiento de la proteína el soporte se lava con un agente acoplante de metales, concretamente imidazol (ver ejemplo práctico 3). Entre las proteínas que se unen al soporte se encuentran distintas enzimas, entre ellas por ejemplo, ciclofilina A. El soporte funcionalizado es un biochip, también denominado "sensor chip".

Por lo tanto y sobre la base de lo divulgado en D02, se considera que el objeto de las reivindicaciones 1- 3, 7- 10, 19, 24- 26, 32- 41 no es nuevo en el sentido del artículo 6 de la ley de Patentes 11/86.

ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 8 de la Ley 11/86)

Reivindicación 2

La reivindicación 2 hace referencia al lavado con un agente acoplante de metales tras la utilización del agente activante en la fase de acoplamiento.

En D01 no se divulga el uso de EDTA o imidazol como agentes acoplantes de metales, sin embargo, el uso de estos agentes en este tipo de procedimientos es rutinario en el estado de la técnica, tal y como por ejemplo se anticipa en D02 (ver ejemplo práctico 3).

Reivindicación 4

En lo que respecta a la reivindicación 4, no se hace referencia en D01 y D02 a la temperatura a la que se lleva a cabo la etapa de acoplamiento, sin embargo, el rango de temperaturas señalado en la reivindicación 4 resulta muy amplio (de 5 a 70 °C) e incluye temperaturas de trabajo habituales entre las que se encuentra por ejemplo, la temperatura ambiente o fisiológica, por lo que se considera que el objeto de la reivindicación 4, no implicaría actividad inventiva para un experto en la materia.

Reivindicación 5-6

El establecimiento de la cantidad de proteína que se hace reaccionar por cm^2 de soporte biofuncionalizable (Reiv.5) y de los equivalentes de agente activante por mol de proteína, se considera que constituye una optimización del procedimiento de obtención del soporte biofuncionalizado, rutinario para un experto en la materia. Por lo que se considera que el objeto de las reivindicaciones 5 y 6 no implicaría actividad inventiva para un experto en la materia.

Reivindicaciones 11-16

A lo largo de las reivindicaciones de la 11-16, se van especificando los distintos materiales de los que puede estar formado el soporte. El tipo de soportes a los que se hace referencia, vidrio, oro, etc, son ampliamente conocidos y de uso rutinario en el estado de la técnica, por lo que se considera que el objeto de las reivindicaciones 11-16 no implica actividad inventiva para un experto en la materia.

Reivindicaciones 17-18

La reivindicación 17 concreta que la zona rica en residuos de histidina de la proteína se ha introducido en forma de cola de entre 4 y 10 histidinas en su extremo carboxilo terminal o en su región oligosacárida.

En D01 se señala que la cola de histidinas contendría, por ejemplo, entre 5-6 residuos, (Página 10, línea 14), y en D02 la cola de histinas presentaría igualmente 6 residuos (ver ejemplos). En los ejemplos divulgados en D01 y D02 la cola de histidinas se encuentra colocada en el extremo N-terminal. No obstante, el que esta se encuentre por ejemplo en el extremo C-terminal en lugar de en el N-terminal, corresponde simplemente a una de las posibles alternativas. Alternativa que ya aparece divulgada por ejemplo en D03 (ver figura 1) y que ya se señala de hecho en D02 (ver párrafo 34).

Con respecto a la reivindicación 18, se considera que la utilización de técnicas de biología molecular, como por ejemplo, la mutagénesis dirigida, representan una de las alternativas conocidas que el experto en la materia utilizaría para introducir una zona rica en residuos de histidina en la proteína.

Por lo tanto, se considera que el objeto de las reivindicaciones 17 y 18 no implicaría actividad inventiva para un experto en la materia

Reivindicaciones 20, 22-23

En D01 y D02 se divulgan procesos de funcionalización orientada de un soporte con proteínas con una zona rica en residuos de histidina. Entre las proteínas que se unen al soporte en D01, se encuentran diversas enzimas, motivo por el cual, como ya se indicó anteriormente, se encuentran afectadas por novedad las reivindicaciones 19 y 21.

En lo que se refiere a las reivindicaciones 20, 22 y 23 se indican diferentes proteínas que se pueden unir al soporte, concretamente anticuerpos antiperoxidasa (Reiv. 20), concavalina A (Reiv. 22) y Caderina (Reiv. 23). No obstante, aunque estas opciones no se encuentran expresamente divulgadas en D01 y D02, se considera que a priori, sería factible unir diferentes proteínas de distinta naturaleza, en la medida que la unión al soporte se lleva a cabo por ejemplo, a partir de una cola de polihistidinas. De hecho, existen ya numerosos ejemplos en los que se fijan sobre este tipo de soportes proteínas no enzimáticas, como por ejemplo, caderinas, tal y como se divulga en D03.

Por tantos, sobre la base de lo expuesto se considera que el objeto de las reivindicaciones 20, 22 y 23 no implicaría actividad inventiva para un experto en la materia.

Reivindicaciones 27-31

En lo que respecta a la reivindicación 27, y a la existencia de un grupo puente entre el soporte y el complejo quelante, el uso de este tipo de grupos puente en este tipo de soportes, es ya conocido en el estado de la técnica.

Resultaría evidente para un experto en la materia utilizar un grupo puente que presente en los extremos grupos funcionales, como por ejemplo los que se indican a lo largo de las reivindicaciones 28 a 31, capaces de interaccionar por un lado con el soporte y por otro con el complejo quelante, y separar estos grupos funcionales por ejemplo, por una cadena hidrocarbonada de longitud variable.

Por tanto, y sobre la base de lo expuesto, y teniendo en cuenta que no se desprende de la descripción que se derive ninguna ventaja técnica del uso de los grupos puente L reivindicados, se considera que el objeto de las reivindicaciones 27 a 31 no implicaría tampoco actividad inventiva para un experto en la materia.

En conclusión, se considera que el objeto de las reivindicaciones 2, 4-6, 11-19, 20, 22, 23, 27-31 no implica actividad inventiva para un experto en la materia, en el sentido del artículo 8 de la Ley de patentes 11/ 86.