

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 384 604**

51 Int. Cl.:

B01D 11/04

(2006.01)

C07C 39/17

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **09754069 .4**

96 Fecha de presentación: **28.05.2009**

97 Número de publicación de la solicitud: **2307116**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **13.04.2011**

54 Título: **Método de extracción selectiva de proteínas de membrana con calixarenos**

30 Prioridad:
28.05.2008 FR 0802894

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
09.07.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
09.07.2012

73 Titular/es:
**Centre National de la Recherche Scientifique -
CNRS
3, rue Michel Ange
75794 Paris Cedex 6, FR y
Universite Claude Bernard de Lyon 1**

72 Inventor/es:
**COLEMAN, Anthony William;
MBEMBA, Cyrille;
FALSON, Pierre;
MATAR, Rima y
HUCHÉ, Frédéric**

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

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

ES 2 384 604 T3

DESCRIPCIÓN

Método de extracción selectiva de proteínas de membrana con calixarenos

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un método para extraer selectivamente proteínas de membrana con al menos un calixareno.

El uso de calixarenos en el método de acuerdo con la invención permite la solubilización selectiva de las proteínas de membrana, a la vez que se conserva su estructura tridimensional que es esencial para su actividad enzimática.

En la descripción que sigue, las referencias que figuran entre corchetes [] se refieren a la lista de referencias que figura al final del texto.

10 **Estado de la técnica**

La extracción de las proteínas de membrana es una etapa requerida previamente para su estudio en solución, en particular su caracterización estructural por cristalografía de rayos X, que implica mantenerlas en solución en un estado topológico idéntico al que adoptan en las membranas.

15 En general, esta etapa se efectúa con ayuda de detergentes o tensioactivos que, por un lado, hacen posible la extracción de estas proteínas de su medio membranar, desestructurando la bicapa de la membrana compitiendo con las cadenas alifáticas de los lípidos que la constituyen y, por otro lado, mantienen la proteína de la membrana en solución debido a su componente hidrófilo. Sin embargo, estos detergentes no muestran las mismas características físico-químicas que los lípidos y, por lo tanto, tienden a desestabilizar la estructura de los dominios de la membrana, lo que es una fuente de heterogeneidad estructural.

20 A pesar de que son los más eficaces para solubilizar las proteínas de membrana, los detergentes o los tensioactivos aniónicos, como por ejemplo, dodecil sulfato sódico (SDS) o desoxicolato de sodio, son generalmente desestructurantes. Además, la eficacia de la fase de desestructuración de la bicapa lipídica es una función de la longitud de la cadena alifática del detergente o del agente tensioactivo, un parámetro que varía en función del origen de las membranas y de las proteínas que se insertan en ella.

25 Además, se conocen diversos estudios sobre las interacciones de diversos calixarenos con proteínas, pero no permiten la extracción de las proteínas de membrana de su medio membranar, y en particular, sin una desnaturalización de las mismas.

El documento de Oshima F. y col. (LANGMUIR, vol. 21, páginas 7280-782, 2005) describe el uso de un calix[6]areno específico para la extracción selectiva del citocromo c.

30 El documento de patente WO 89/08092 describe que ciertos calix[4-8]arenos son aptos para extraer hidrocarburos.

En el contexto de la presente invención, los términos "agente tensioactivo", "tensioactivo" y "detergente" se utilizan indistintamente para designar moléculas que tienen propiedades particulares debido a su estructura anfífilica. Una molécula se dice que es anfífilica cuando posee simultáneamente un grupo polar e hidrófilo y un grupo apolar e hidrófobo.

35 La expresión "extracción selectiva" en la presente invención, significa un método que permite extraer las proteínas de membrana, selectivamente unas respecto a las otras, desde un medio de membrana mediante solubilización de las membranas lipídicas en las que estas proteínas están insertadas, sean naturales o artificiales, y la disolución de dichas proteínas.

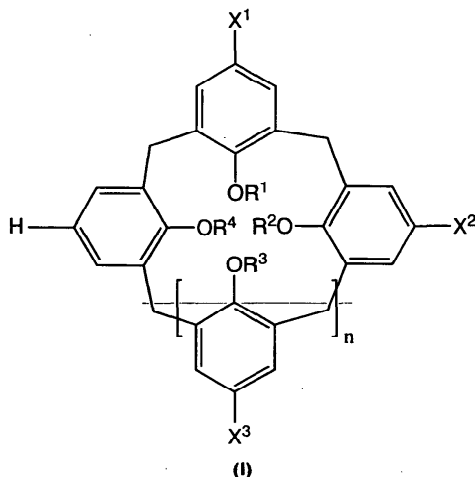
40 En el sentido de la presente invención, la "solubilización" o "puesta en solución" de proteínas de la membrana, significa el paso de la proteína de membrana desde el medio membranar, es decir, desde un medio esencialmente lipídico, a un medio acuoso. En el medio acuoso, las proteínas "solubilizadas" pueden estar en suspensión, en dispersión o en forma de moléculas que no están libres en la solución acuosa. Dichas proteínas se pueden asociar o ligar eventualmente con tensioactivos o detergentes.

45 En la actualidad, existen muy pocos detergentes polianiónicos no desnaturalizantes para las proteínas de membrana que permitan su extracción selectiva.

50 Por lo tanto, existe una necesidad real de un método de extracción que mitigue los defectos, las limitaciones y las desventajas y obstáculos de la técnica anterior, en particular de un método que emplee moléculas aniónicas que tengan propiedades detergentes que permitan extraer selectivamente las proteínas de la membrana sin desnaturalizarlas, es decir, sin desestructurar o sin modificar su conformación tridimensional normal que les permite cumplir su función.

Descripción de la invención

El objeto de la presente invención es precisamente responder a esta necesidad, proporcionando un método para extraer selectivamente las proteínas de membrana, que comprende una etapa que consiste en poner en contacto una solución acuosa de la proteína de membrana que se va a extraer, con al menos un calixareno de fórmula (I):



en donde:

■ n es un número entero igual a 1, 3, 5 o 6;

■ R^1 , R^2 , R^3 y R^4 independientemente uno de otro, representan un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo (C_{1-12}) (por ejemplo alquilo (C_{3-12}), por ejemplo alquilo (C_{9-12})), lineal o ramificado, eventualmente sustituido con uno o varios heteroátomos seleccionados entre el grupo de átomos O, S, N y P; un grupo alquilo (C_{1-12}) (por ejemplo alquilo (C_{3-12}), por ejemplo alquilo (C_{9-12})), lineal o ramificado, eventualmente sustituido con un grupo $-COOR$ en donde R es un grupo alquilo (C_{1-4}) lineal o ramificado; o un grupo arilo que comprende de 6 a 20 átomos de carbono;

■ X^1 , X^2 y X^3 independientemente uno de otro, representan un grupo $-(CH_2)_m-COOR'$ en donde

- m es un número entero de 0 a 10,

- R' representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo (C_{1-4}) lineal o ramificado;

o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

De acuerdo con una realización particular de la invención, el método para la extracción selectiva de la proteína de membrana se puede llevar a cabo utilizando al menos un calixareno de fórmula (I) en la que:

■ n es un número entero igual a 1;

■ R^1 , R^2 , R^3 y R^4 independientemente uno de otro, representan un átomo de hidrógeno; un grupo alquilo (C_{1-12}) lineal o ramificado;

■ X^1 , X^2 y X^3 independientemente uno de otro, representan un grupo $-(CH_2)_m-COOR'$ en el que

- m es un número entero de 0 a 10,

- R' representa un átomo de hidrógeno;

o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

En el sentido de la presente invención, "alquilo" significa un radical que contiene carbono, lineal, ramificado o cíclico, saturado o insaturado, eventualmente sustituido, que comprende de 1 a 12 átomos de carbono. A título indicativo, se pueden citar los radicales metilo, etilo, propilo, butilo, isobutilo, pentilo, hexilo, octilo, nonilo, decilo, undecilo, dodecanilo y sus isómeros ramificados. El grupo alquilo puede estar eventualmente sustituido con uno o varios heteroátomos seleccionados entre el grupo de átomos O, S, N, P.

El término "arilo" designa de manera general un sustituyente aromático cíclico que contiene de 6 a 20 átomos de carbono. En el contexto de la invención, el grupo arilo puede ser mono o policíclico y estar eventualmente sustituido. Como tales, se pueden citar el bencilo y el fenilo.

En el contexto de la presente invención, la expresión "sales farmacéuticamente aceptables" abarca las sales prepa-

radas con ácidos o bases no tóxicas, dependiendo de los sustituyentes presentes en los compuestos. Cuando los compuestos de la invención contienen funciones ácidas, las sales correspondientes pueden obtenerse mediante la adición de una base orgánica o inorgánica en el compuesto en forma neutralizada, eventualmente en presencia de un disolvente preferentemente inerte. Ejemplos de sales de adición de una base pueden ser las sales de sodio, potasio, calcio, amonio, amino (orgánico) o magnesio. Cuando los compuestos de la invención contienen funciones básicas, las sales correspondientes se pueden obtener por adición de un ácido orgánico o inorgánico, eventualmente en un disolvente preferentemente inerte. Ejemplos de sales de adición de ácido inorgánico, pueden ser clorhidrato, bromohidrato, nitrato, carbonato, monohidrogenocarbonato, fosfato, monohidrogenofosfato, dihidrogenofosfato, sulfato, sulfato, monohidrogenosulfato, yodohidrato. Ejemplos de sales de adición de ácido orgánico pueden ser acetato, propionato, isobutirato, maleato, malonato, benzoato, succinato, suberato, fumarato, lactato, mandelato, ftalato, bencenosulfonato, p-tolilsulfonato, citrato, tartrato, metanosulfonato.

En el sentido de la presente invención, "proteína de membrana" significa una proteína asociada a las membranas biológicas, es decir, anclada o integrada, y que no está libre para la difusión en medios acuosos y es inestable en esos medios. Entre las proteínas de membrana, se pueden citar por ejemplo, las proteínas de las membranas plasmáticas y las proteínas de las membranas intracelulares (como por ejemplo, las proteínas de las membranas mitocondriales, nucleares, lisosomales, etc.).

Las proteínas de membrana se clasifican frecuentemente basándose en las estructuras que les permiten interactuar con las membranas y según la manera en que estas estructuras encajan entre sí. Las proteínas de membrana pueden ser proteínas politópicas o proteínas monotópicas, por ejemplo, proteínas politópicas.

"Proteínas politópicas" significa proteínas que atraviesan la membrana una o varias veces.

"Proteínas monotópicas" significa proteínas que interactúan solo con un lado de la membrana.

Las proteínas de membrana también se pueden clasificar en función de la dificultad para extraerlas de las membranas. Pueden ser integrales o periféricas, por ejemplo, integrales.

"Proteínas integrales" significa proteínas monotópicas o politópicas que interactúan fuertemente con la membrana, en particular con interacciones hidrófobas. Estas proteínas se llaman también "proteínas intrínsecas".

"Proteínas periféricas" significa proteínas monotópicas que interactúan débilmente con la membrana, es decir, ya sea por enlaces electrostáticos, o por la implicación de otras proteínas de membrana. Estas proteínas se llaman también "proteínas extrínsecas".

En el sentido de la presente invención, una "solución acuosa de la proteína de membrana" significa una solución acuosa que comprende una o varias proteínas de membrana. Se puede tratar, por ejemplo, de una suspensión o una dispersión, en donde las proteínas pueden estar en forma no disuelta o no difusa o se pueden combinar, por ejemplo, con una fracción de membrana biológica.

Los calixarenos de fórmula (I) son moléculas aniónicas que tienen propiedades detergentes. Poseen una cara hidrófila compuesta de varias funciones carboxílicas y una cara hidrófoba formada por grupos alquilo. La multiplicidad de cargas negativas favorece por un lado la interacción iónica de la molécula detergente con la superficie hidrófila de la proteína y por otro lado impide su penetración (desestructurante) en el núcleo (hidrófobo) de las proteínas.

Concretamente, en razón de su fórmula química, los calixarenos de fórmula (I) tienen una geometría molecular en forma de cono o cono truncado, en el que la región acampanada es hidrófila, mientras que la cola es hidrófoba (figura 1). Esta forma particular de las calixarenos de fórmula (I) permite la formación de micelas, que por un lado favorecen el paso de las proteínas desde un medio de membrana hacia un medio acuoso, y por otro lado permiten la conservación de su estructura tridimensional y, por lo tanto, de su actividad.

Así, el uso de los calixarenos de fórmula (I) en el método de acuerdo con la invención, permite extraer selectivamente las proteínas de membrana, mediante la solubilización selectiva de las mismas (es decir, permitiendo su paso desde el medio de membrana al medio acuoso), conservando su estructura tridimensional que es esencial para su actividad, por ejemplo, enzimática. Así, después de su reconstitución en lípidos naturales o sintéticos, las proteínas de membrana recuperan su actividad.

Además, el método de la invención permite la extracción de una proteína dada, de manera selectiva en relación con otras proteínas de membrana, en particular modulando la longitud de la cola hidrófoba del calixareno. El método de la invención permite así la extracción y la separación de fracciones de proteínas de membrana (fracciones solubilizadas y fracciones no solubilizadas). De hecho, dependiendo de los sustituyentes presentes, en particular de la longitud de los grupos alquilo en R^1 , R^2 , R^3 y/o R^4 , los calixarenos de fórmula (I) se pueden ajustar a los tipos de membranas y proteínas, y se puede realizar una extracción y una solubilización selectivas y eficaces.

De acuerdo con una realización particular de la invención, el método de la invención puede comprender dos o varias etapas sucesivas de puesta en contacto con diferentes calixarenos de fórmula (I), lo que permite la extracción y el aislamiento de proteínas de membrana entre sí.

Además, a causa de su estructura, en particular, la naturaleza de los sustituyentes X^1 , X^2 y/o X^3 , los calixarenos de acuerdo con la invención pueden formar micelas cuya existencia es modulable dependiendo del pH. Esta característica es particularmente útil para favorecer o, al contrario, evitar la formación de micelas y mantener de este modo una proteína de membrana en solución con detergentes, con diferentes grados de organización. De hecho, la ausencia de micelas favorece el establecimiento de contactos proteína-proteína que facilitan la formación de cristales en solución.

El método de la invención permite extraer cualquier proteína de membrana, y ventajosamente cualquier proteína de membrana presente en una fracción de membrana biológica obtenida a partir de un organismo procariota o eucariota, sano o alterado. Por ejemplo, en el método de acuerdo con la invención, la proteína de membrana que se va a extraer puede estar en una fracción de membrana plasmática obtenida a partir de un organismo procariota o eucariota, sano o alterado. Por ejemplo, el método de la invención permite extraer cualquier proteína de membrana polipéptica. Por ejemplo, el método de la invención permite extraer cualquier proteína integral de la membrana.

De acuerdo con un modo de realización de la invención, la proteína de membrana se puede seleccionar entre el grupo que comprende las proteínas de transporte. En el sentido de la presente invención, "proteína de transporte" significa una proteína de membrana cuya función es el transporte de diversas sustancias (iones, esteroides, macromoléculas, etc.) desde ambos lados de la membrana. Por ejemplo, se pueden citar los transportadores ABC ("ATP-binding cassette" en inglés, o proteína con dominio de unión a ATP), los receptores, los intercambiadores, los canales, etc.

De acuerdo con un modo de realización particular de la invención, la proteína de transporte puede ser un transportador ABC seleccionado entre el grupo que comprende la glicoproteína P (Pgp/ABCB1) [1], MRP1/ABCC1 (proteína de resistencia a múltiples fármacos, transportador ABC humano, polipéptico e integral) [2], BCRP/ABCG2 (proteína de resistencia al cáncer de mama, transportador ABC humano, polipéptico e integral) [3], BmrA (ATP bacteriano de resistencia a múltiples fármacos, transportador ABC procariótico, polipéptico e integral) [4].

Preferiblemente, la proteína de membrana es una proteína seleccionada entre el grupo que comprende, como proteínas de transporte, la glicoproteína P (Pgp/ABCB1), MRP1/ABCC1, BCRP/ABCG2, y todas las proteínas de esta clase. Más particularmente, la proteína de transporte puede ser un transportador ABC seleccionada entre el grupo que comprende BmrA.

La etapa de puesta en contacto una solución acuosa que comprende la proteína de membrana que se va a extraer, con al menos un calixareno de fórmula (I), se puede efectuar a un pH que varía de 5,5 a 10, preferiblemente de 6 a 9.

El método de extracción puede efectuarse a una temperatura que varía de 0 a 100°C, preferiblemente de 4 a 25°C.

El método de extracción utiliza una concentración de calixareno de fórmula (I) que varía desde 10^{-6} a 10^{-2} M.

El método de extracción de acuerdo con la invención puede efectuarse con calixarenos en solución o con calixarenos en agregados coloidales debido a su propiedad de tensioactivo.

En el sentido de la presente invención, por agregado coloidal se entienden grupos que tienen desde unas pocas hasta algunos cientos de moléculas de calixareno que se organizan en función de las fuerzas de repulsión hacia el disolvente. Dada su naturaleza, los calixarenos de fórmula (I) son capaces de formar agregados en un medio apropiado tal como, por ejemplo, en agua, en una solución acuosa, en un medio isotónico o en un medio biológico.

El agregado se puede seleccionar entre el grupo que comprende micelas, liposomas y nanopartículas lipídicas. Preferiblemente, los calixarenos están en forma de micelas.

El término micela designa un agregado esferoidal de moléculas de calixareno de fórmula (I) que se organiza en función del disolvente utilizado. Por ejemplo, en agua o en un disolvente acuoso, los extremos lipófilos están dirigidos hacia el interior de la micela, mientras que los extremos hidrófilos forman la interfaz de la micela con el disolvente. En un disolvente orgánico, por ejemplo aceite, la disposición se invierte.

El término liposoma designa pequeñas vesículas preparadas artificialmente, constituidas en particular por láminas delgadas de fosfolípidos, separadas entre sí por compartimentos acuosos. Pueden tener una estructura muy parecida a la de las membranas celulares.

En el contexto de la presente invención, el término nanopartícula significa un conjunto desde unos pocos cientos a varios miles de moléculas de calixareno de fórmula (I), que dan como resultado un objeto en el que al menos una de sus dimensiones es de tamaño nanométrico, por ejemplo, entre 1 y 300 nm. En el método de la invención, la etapa de puesta en contacto de una suspensión acuosa que comprende la proteína de membrana que se va a extraer con el calixareno de fórmula (I), se puede realizar eventualmente en presencia de al menos un cosoluto seleccionado entre el grupo que comprende,

i) sales orgánicas e inorgánicas seleccionadas entre el grupo que comprende sales farmacéuticamente

aceptables;

ii) pequeñas moléculas bioactivas seleccionadas entre el grupo de los aminoácidos, vitaminas, lípidos, esteroides, carbohidratos o metabolitos;

5 iii) moléculas bioactivas oligómeras seleccionadas entre el grupo de los péptidos, oligonucleótidos u oligosacáridos;

iv) moléculas biológicas polímeras seleccionadas entre el grupo de las proteínas, polinucleótidos y polisacáridos.

De acuerdo con un modo de realización de la invención, la etapa de puesta en contacto puede estar precedida por una etapa en la cual:

- 10 - la proteína de membrana que se va a extraer o la fracción de membrana que la contiene se disuelve en una solución tampón, y
- el calixareno de fórmula (I) se añade de acuerdo con las condiciones de temperatura, pH y concentración previamente descritas.

15 De acuerdo con un modo de realización de la invención, la etapa de puesta en contacto puede estar seguida por una etapa de centrifugación, lo que hace posible separar las proteínas de membrana que forman complejos con los calixarenos de fórmula (I), de las proteínas de membrana que no forman complejos.

Las proteínas de membrana que forman complejo con los calixarenos de fórmula (I) y las proteínas de membrana que no forman complejos, se pueden separar por centrifugación, por ejemplo durante 1 h, a 4°C y a una velocidad de 100.000 x g. Las condiciones de centrifugación dependerán de la naturaleza de la proteína. El experto en la técnica sabrá seleccionar las condiciones óptimas de centrifugación, por ejemplo las descritas en [6].

20

Otras ventajas se pondrán de manifiesto para el experto en la técnica con la lectura de los siguientes ejemplos, ilustrados por las figuras adjuntas, que se ofrecen a título ilustrativo.

Breve descripción de las figuras

25 - La figura 1 representa la geometría en forma de cono de los calixarenos utilizados en el método de la invención. El grupo polar en la parte superior se muestra oscuro y la cadena alifática hidrófoba está situada en la parte inferior de la figura. Esta geometría especial hace posible la formación de micelas. En la figura 1, la región A corresponde a la región cargada hidrófila, la región B corresponde a la plataforma del calix[4]areno y la región C corresponde a una cola alifática en C_nH_{2n+1} .

30 - La figura 2 representa las propiedades tensioactivas de las moléculas $p(COOH)_3-Ar4-o(C_nH_{2n+1})$, $n=1-12$. El efecto de los derivados del calix[4]areno que contiene cadenas de alquilo con 1 a 12 átomos de carbono, sobre la tensión superficial del agua se estudió como una función de la concentración de dichos derivados (en molar M o mol/l) a pH 6,0 (no expuesto) y 8,0 (expuesto). Las propiedades tensioactivas de DDM (β -D-dodecil maltopiranosido) también se muestran en esta figura. Cada punto se corresponde a la media de tres valores.

35 - La figura 3 representa el potencial tensioactivo de las moléculas $p(COOH)_3-Ar4-o(C_nH_{2n+1})$ en función de la longitud de las cadenas de alquilo (n = número de átomos de carbono = 1-12) y el pH. El efecto de las moléculas que contienen una cadena de alquilo que tiene de 1 a 12 grupos metileno (n , eje X en la figura 3) sobre la tensión superficial del agua, se midió a una concentración de 10^{-2} M, a pH 6,0 (triángulos) y a pH 8,0 (cuadrados). Cada punto se corresponde a la media de tres valores.

40 - La figura 4 representa la concentración micelar crítica (CMC) de la serie $p(COOH)_3-Ar4-o(C_nH_{2n+1})$, $n=1-12$, en función del pH y de la longitud de las cadenas de alquilo. El efecto de las moléculas que tienen una cadena de alquilo con 1 a 12 grupos metileno (n , eje X en la figura) sobre la CMC, se mide a una concentración de 10^{-2} M, a pH 6,0 (círculos negros) y 8,0 (círculos blancos). Cada punto se corresponde a la media de tres valores, estimados a partir de los datos de la figura 2.

45 - La figura 5 representa la modulación del potencial tensioactivo del compuesto $p(COOH)_3-Ar4-o(C_7H_{15})$ con los aminoácidos (aa). El compuesto $p(COOH)_3-Ar4-o(C_7H_{15})$ está presente con una concentración de 10^{-2} M, mientras que la de los aminoácidos varía como se indica. La tensión superficial se mide a pH 8,0. Los aminoácidos se indican con su código de tres letras: Glu = ácido glutámico, Trp = triptófano, Asn = asparagina, Gly = glicina, Ala = alanina, Ser = serina, Phe = fenilalanina, Leu = leucina, Pro = prolina, Lys = lisina, His = histidina, Arg = arginina. Cada punto se corresponde a la media de tres valores.

50 - La figura 6 representa el esquema topológico de BmrA expresada en una bacteria e insertada en su membrana plasmática. BmrA es una proteína homodímera, estando constituido cada monómero por un dominio transmembrana (TMD) unido a un dominio de unión a nucleótido (en inglés, "nucleotide-binding domain" (NBD)) [4, 5].

- La figura 7 representa los ensayos de solubilización de membranas enriquecidas en BmrA con las moléculas $p(\text{COOH})_3\text{-Ar4-}o(\text{C}_n\text{H}_{2n+1})$ y otros detergentes conocidos. Las fracciones de membrana se preparan tal y como se indica en el ejemplo 11 y se analizan después de la incubación, ya sea con moléculas $p(\text{COOH})_3\text{-Ar4-}o(\text{C}_n\text{H}_{2n+1})$, $n = 1$ a 12 tal y como se indica en la figura 7, o con detergentes conocidos (FC12, Foscolina 12: n-dodecilsulfocolina, detergente zwitteriónico; SDS: dodecilsulfato de sodio, detergente aniónico fuerte; DDM: n-dodecil- β -D-maltopiranosido, detergente sin carga), o con un tampón (No Det). Después de la separación de la proteína solubilizada (S, material sobrenadante) y no solubilizada (P, sedimento o coágulo) por centrifugación a $100.000 \times g$, 1 h, 4°C , el contenido proteico se analiza por SDS-PAGE. Las líneas de puntos grises y negras y la línea negra sirven como una escala de la eficacia de las moléculas que se van a solubilizar. Las líneas "no det" significan "sin detergente".

- La figura 8 representa el efecto de la concentración de las moléculas $p(\text{COOH})_3\text{-Ar4-}o(\text{C}_n\text{H}_{2n+1})$ sobre la solubilización de BmrA. Las condiciones experimentales son las de la figura 7, con la excepción de las concentraciones de las moléculas butilo, heptilo y dodecilo que son tal y como se indican en la figura, para las que la correspondencia g/L $\leftrightarrow$ M se indica en la tabla 2. Las líneas "no det" significan "sin detergente".

- La figura 9 representa el efecto de la solubilización con series de $p(\text{COOH})_3\text{-Ar4-}o(\text{C}_n\text{H}_{2n+1})$ sobre la actividad ATPasa de BmrA. Los ensayos de solubilización tener lugar como en la figura 8 y los ensayos de la actividad ATPasa se describen en el ejemplo 11. Las líneas de puntos verticales representan la CMC de cada compuesto. Los rombos negros corresponden a una prueba en la que BmrA se solubiliza con $p(\text{COOH})_3\text{-Ar4-}o(\text{C}_7\text{H}_{15})$ y luego se reconstituye en lípidos después de la eliminación del detergente con Bio-Beads (Bio-Rad), de acuerdo con el procedimiento descrito en Lenoir y col. [6]. El eje de ordenadas representa la actividad específica en %, 100% de actividad se corresponde a $0,25 \mu\text{mol}$ de Pi producido/mg de proteína/min.

- La figura 10 representa la extracción de la proteína BCRP (a definir) a partir de: i) células de insecto Sf9 (en la parte superior de la figura) e ii) células humanas HEK293 (en la parte inferior de la figura). Esta muestra la capacidad de los calixarenos utilizados para extraer las proteínas de membrana de líneas celulares diferentes.

- La figura 11 representa la actividad de la proteína BmrA después de la extracción con diferentes detergentes, incluyendo β -D-dodecil-malto-piranosido (DDM), Foscolina 12 (FC12) y calix[4]aren-O-heptiloxi (C4C7). El porcentaje de actividad ATPasa específica sensible al vanadato (% de SA o % de actividad ATPasa específica sensible a VO_4) se evalúa para los diferentes casos siguientes:

- BmrA Mb: actividad de BmrA en las membranas naturales,
- DDM sup./DDM: actividad de BmrA en el extracto de DDM,
- DDM sup./Lip.: Actividad de BmrA del extracto de DDM y reconstituida en liposomas,
- FC12 sup./FC12: Actividad de BmrA en el extracto de Foscolina 12,
- FC12 sup./Lip.: Actividad de BmrA del extracto Foscolina 12 y reconstituida en liposomas,
- C4C7 sup./FC12: Actividad de BmrA en el extracto de calixareno C4C7 (es decir, calix[4]aren-O-heptiloxi),
- C4C7 sup./Lip.: Actividad de BmrA del extracto de calixareno C4C7 y reconstituida en liposomas.

- La figura 12 resume los resultados de una extracción utilizando sucesivamente los calixarenos C4C3, después C4C7 (figura 12A), seguida de una purificación por cromatografía de filtración en gel (figuras 12B-E). La figura 12A muestra el SDS-PAGE (electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida) de las fracciones solubilizadas (S, material sobrenadante) y las fracciones no solubilizadas (P, sedimento) después de extracciones sucesivas con calixarenos C4C3 y luego C4C7, representando M la parte delantera de la migración. La figura 12C muestra la cromatografía de afinidad a níquel después de la extracción con el calixareno C4C7, en función del volumen de elución V_e en mililitros. La figura 12D muestra la cromatografía de filtración en gel en presencia de FC12 después de la extracción con calixareno C4C7, en función del volumen de elución V_e en mililitros. La figura 12E muestra la actividad ATPasa específica (sensible a vanadato) para la fracción a ("S200 pool FC12" o fracción de BmrA sometida a cromatografía de filtración en gel en presencia de foscolina 12) y la fracción b ("S200 pool Lip.", la misma fracción de BmrA sometida a filtración en gel, reconstituida posteriormente en presencia de liposomas).

- La figura 13 representa diferentes calix[4]arenos (Figura 13A) y ejemplos de organización supramolecular de estas moléculas en micelas o agrupaciones supramoleculares (Figura 13B).

En la figura 13A, los calix[4]arenos representados están formados por una corona de 4 fenoles (anillo, definido por el número "1" en la figura) que son portadores en una cara de los grupos carboxilato (guión pequeño en un círculo, definido por el número "2") y en la otra cara una cadena alifática $\text{C}_n\text{H}_{2n+1}$, con $n = 1, 3, 7, 10$ y 12 (pequeñas varillas, que se definen por el número "3").

En la figura 13B, las micelas (representada por la zona "a") formadas por estos calixarenos, exponen las funciones cargadas (guión pequeño en un círculo) en la superficie con una cohesión mantenida por los grupos hidrófobos (pequeñas varillas) agrupados en el interior de la agrupación.

Ejemplos

Métodos generales

Disolventes y reactivos

- 5 El diclorometano (CH_2Cl_2) y el tolueno se destilan bajo una atmósfera de nitrógeno sobre CaH_2 , y el tetrahidrofurano (THF) se destila bajo una atmósfera de nitrógeno sobre sodio y benzofenona. El éter dietílico se destila bajo una atmósfera de nitrógeno sobre CaH_2 y se almacena a $0-4^\circ\text{C}$ bajo una atmósfera de nitrógeno sobre un tamiz molecular de 4 Å. Los otros disolventes usados se obtienen del proveedor Carlo-Erba.

Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

- 10 Los espectros de ^1H y ^{13}C se realizan en un aparato Bruker AV500. Los desplazamientos químicos (δ) de los espectros de RMN ^1H se calibran de acuerdo con la referencia de tetrametilsilano (TMS) que tiene un valor δ de 0,00 ppm. Los δ de los espectros de RMN ^{13}C se calibran de acuerdo con el valor de referencia del disolvente. Las mediciones se realizan a 25°C en tubos de 5 mm de diámetro. Los espectros se realizan en disolventes deuterados obtenidos del proveedor Aldrich o SDS.

Cromatografía

- 15 Las cromatografías en capa fina (TLC) se realizan sobre placas de aluminio de Merck "TLC Silica gel 60F₂₅₄". Los compuestos se revelan con una lámpara UV (ultravioleta) y/o se sumergen en el líquido revelador que contiene ácido fosfomolibdico en ácido sulfúrico y etanol, seguido por calentamiento con un decapador térmico.

Las columnas cromatográficas se realizan con un gel de sílice de Merck (gel de sílice 60 (40 a 63 μm)).

Espectrometría de masas

- 20 Masa ESI: las muestras se analizan en un espectrómetro Perkin Elmer Sciex API 300, en disolventes de calidad "para Análisis".

Medición de la tensión superficial

- 25 Las propiedades tensioactivas de los calixarenos de fórmula (I) se evalúan por difusión de vapor por gota pesada (en inglés, "sitting drop") de 1 ml con ayuda de un aparato Kibron con microdepresión y empleando una jeringa de acero inoxidable y una balanza de Wilhelmy. Las curvas obtenidas se procesan con el programa v11 de SigmaPlot.

Ejemplo 1: Síntesis de 25-butiloxicalix[4]areno

- 30 A una suspensión de calix[4]areno (20 g, 0,47 mol) en DMF anhidro (943 ml) se añaden soluciones de CsF (8,49 g, 1,2 equivalentes) y yodobutano (35,47 ml, 10 equivalentes). La mezcla de reacción se agita a 40°C durante 96 horas. El progreso de la reacción se sigue por CCF o TLC (Cromatografía en Capa Fina o "Thin Layer Chromatography"). Una vez terminada la reacción, se detiene por adición de ácido clorhídrico 1 M (250 ml). El medio de reacción se extrae con CH_2Cl_2 (2 x 200 ml). Las fases orgánicas se combinan, se lavan con agua (2 x 250 ml) y se secan sobre MgSO_4 . Después de la evaporación del disolvente, el producto bruto restante se recoge con una mezcla $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1:1). La solución se filtra a continuación para eliminar el calix[4]areno que no ha reaccionado y se purifica por cromatografía en columna ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{hexano}$ 1:1).

- 35 Se obtiene un sólido blanco con un rendimiento del 68% por el procedimiento. P.f. = 239°C ;

^1H RMN (CDCl_3) δ 1,14 (t, 3H, $^2J_{\text{H-H}} = 7,1$ Hz, $\text{Ar-OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1,74 (m, 2H, $\text{Ar-O}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 2,18 (m, 2H, $\text{Ar-OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3,48 (d, 4H, $^2J_{\text{H-H}} = 13,3$ Hz, $\text{Ar-CH}_2\text{-Ar}$), 4,17 (t, 2H, $^2J_{\text{H-H}} = 7,0$ Hz, $\text{Ar-OCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$), 4,30 (d, 2H, $^2J_{\text{H-H}} = 13,6$ Hz, $\text{Ar-CH}_2\text{-Ar}$), 4,37 (d, 2H, $^2J_{\text{H-H}} = 12,9$ Hz, $\text{Ar-CH}_2\text{-Ar}$), 6,69-7,07 (m, 12H, Ar-H), 9,46 (s, 2H, Ar-OH), 9,77 (s, 1H, Ar-OH).

- 40 ^{13}C RMN (CDCl_3) δ 14,2 ($\text{Ar-O}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$), 19,2 ($\text{Ar-O}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 19,7 ($\text{Ar-OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 31,4 y 32,3 ($\text{Ar-CH}_2\text{-Ar}$), 77,1 ($\text{Ar-OCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$), 120,8; 121,8; 121,7; 126,1; 128,3; 128,7; 129,3 (Ar), 149,1 y 150,6 (Ar-C-OH), 151,5 ($\text{ArC-O}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$).

Espectro de masas ES (CHCl_3) m/z: 481,2 [$\text{M}+\text{H}$]⁺, 503,3 [$\text{M}+\text{Na}$]⁺, 519,2 [$\text{M}+\text{K}$]⁺.

Ejemplo 2: Síntesis de 25-dodeciloxicalix[4]areno

- 45 A una suspensión de calix[4]areno (20 g, 0,47 mol) en DMF anhidro (943 ml) se añaden soluciones de CsF (8,49 g, 1,2 equivalentes) y yodododecano (35,47 ml, 10 equivalentes). La mezcla de reacción se agita a 40°C durante 96 horas. El progreso de la reacción se sigue por TLC. Una vez terminada la reacción, se detiene por adición de ácido clorhídrico 1 M (250 ml). El medio de reacción se extrae con CH_2Cl_2 (2 x 200 ml). Las fases orgánicas se combinan, se lavan con agua (2 x 250 ml) y se secan sobre MgSO_4 . Después de la evaporación del disolvente, el producto bruto restante se recoge en una mezcla $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1:1). A continuación, la solución se filtra para eliminar el ca-
- 50

lix[4]areno que no ha reaccionado y se purifica por cromatografía en columna (CH_2Cl_2 /hexano 1:1).

Se obtiene un sólido blanco con un rendimiento del 48%, p.f. = 235°C; $^1\text{H RMN}$ (CDCl_3) δ 1,01 (t, 3H, $^3J_{\text{H-H}} = 7,0$ Hz, $\text{Ar-O}(\text{CH}_2)_{11}\text{CH}_3$), 1,42 (m, 4H, $\text{Ar-O}(\text{CH}_2)_8\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1,49 (m, 4H, $\text{Ar-O}(\text{CH}_2)_7\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$), 1,53 (m, 4H, $\text{Ar-O}(\text{CH}_2)_5\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$), 1,62 (m, 4H, $\text{Ar-O}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3$), 1,80 (m, 2H, $\text{Ar-O}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_8\text{CH}_3$), 2,29 (m, 2H, $\text{Ar-OCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_9\text{CH}_3$), 3,57 (d, 4H, $^2J_{\text{H-H}} = 13,3$ Hz, $\text{Ar-CH}_2\text{-Ar}$), 4,26 (t, 2H, $^2J_{\text{H-H}} = 6,8$ Hz, $\text{Ar-OCH}_2(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3$), 4,39 (d, 2H, $^2J_{\text{H-H}} = 13,1$ Hz, $\text{Ar-CH}_2\text{-Ar}$), 4,48 (d, 2H, $^2J_{\text{H-H}} = 13,1$ Hz, $\text{Ar-CH}_2\text{-Ar}$), 6,77-7,18 (m, 12H, Ar-H), 9,57 (s, 2H, Ar-OH), 9,88 (s, 1H, Ar-OH).

$^{13}\text{C RMN}$ (CDCl_3) δ 14,3 ($\text{Ar-O}(\text{CH}_2)_{11}\text{CH}_3$), 22,9 ($\text{Ar-O}(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2\text{CH}_3$), 26,1 ($\text{Ar-O}(\text{CH}_2)_9\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 29,6 ($\text{Ar-O}(\text{CH}_2)_8\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$), 29,7 ($\text{Ar-O}(\text{CH}_2)_7\text{CH}_2(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$), 29,8 ($\text{Ar-O}(\text{CH}_2)_7\text{CH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$), 29,8 ($\text{Ar-O}(\text{CH}_2)_5\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 29,9 ($\text{Ar-O}(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3$), 30,1 ($\text{Ar-O}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$), 31,6 ($\text{Ar-O}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_8\text{CH}_3$), 31,8 ($\text{Ar-OCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_8\text{CH}_3$), 32,1 y 32,2 ($\text{Ar-CH}_2\text{-Ar}$), 77,7 ($\text{Ar-OCH}_2(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3$), 121,1; 122,1; 122,4; 126,2; 128,4; 128,6; 128,9; 129,1; 129,5; 134,4 (Ar), 149,4 y 151,0 (ArC-OH), 151,6 ($\text{ArC-O}(\text{CH}_2)_{11}\text{CH}_3$).

ES espectro de masas (CHCl_3) m/z: 593,2 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$, 615,2 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$, 631,3 [$\text{M}+\text{K}$] $^+$.

15 Ejemplo 3: Síntesis de 5,11,17 tris-[(carboxilato)metil]25-mono-metiloxi 26,27,28 tris-hidroxicalix[4]areno - compuesto 5a

Se colocan en un matraz 5 g de tris-[(ciano)metil] monometiloxi 26,27,28 tris-hidroxicalix[4]areno en 50 ml de EtOH. Se añaden 50 ml de KOH 3 M. La mezcla de reacción se calienta a reflujo durante 72 horas. La solución se enfría, se trata con 500 ml de agua helada, y se acidifica con una solución de HCl 12 N. El producto amarillo se recupera por filtración y a continuación se lleva a reflujo durante 72 horas en 50 ml de MeOH y 4,5 g de NaOH en 50 ml de agua. La solución se enfría a continuación, se trata con 250 ml de agua helada, se acidifica con HCl, se filtra, se lava con agua para dar el 5,11,17 tris-[(carboxi)metil]25-monometiloxicalix[4]areno en forma de un polvo de color blanquecino a amarillo con un rendimiento del 72%. P.f. = 221°C.

$^1\text{H RMN}$ (DMSO) δ 3,24 (s, 2H, $\text{Ar-CH}_2\text{COOH}$), 3,31 (s, 4H, $\text{Ar-CH}_2\text{COOH}$), 3,39 (d, 2H, $^2J_{\text{H-H}} = \text{Hz}$, $\text{Ar-CH}_2\text{-Ar}$), 3,48 (d, 2H, $^2J_{\text{H-H}} = 13,2$ Hz, $\text{Ar-CH}_2\text{-Ar}$), 4,01 (s, 3H, Ar-OCH_3), 4,18 (d, 2H, $^2J_{\text{H-H}} = 13,2$ Hz, $\text{Ar-CH}_2\text{-Ar}$), 4,25 (d, 2H, $^2J_{\text{H-H}} = 13,2$ Hz, $\text{Ar-CH}_2\text{-Ar}$), 6,89-7,16 (m, 9H, Ar-H), 8,79 (s, 2H, Ar-OH), 9,50 (s, 1H, Ar-OH), 12,07 (s, 3H, $\text{Ar-CH}_2\text{-COOH}$).

$^{13}\text{C RMN}$ (DMSO) δ 21,1 ($\text{Ar-CH}_2\text{-COOH}$), 29,1 y 30,9 ($\text{Ar-CH}_2\text{-Ar}$), 66,1 (Ar-OCH_3), 142,7; 143,1; 147,4; 148,4 (Ar), 150,3 y 153,5 (ArC-OH), 154,1 (ArC-OCH_3), 168,4 y 169,3 ($\text{Ar-CH}_2\text{-COOH}$).

ES espectro de masas (DMSO) m/z: 613,1 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$, 635,1 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$, 611,3 [MH] $^-$.

30 Ejemplo 4: Síntesis de 5,11,17 tris-[(carboxilato)metil]25-mono-butiloxi 26,27,28 tris-hidroxicalix[4]areno - compuesto 5b

Se colocan en un matraz 5 g de tris-[(ciano)metil]monobutiloxi 26,27,28 tris-hidroxicalix[4]areno en 50 ml de EtOH. Se añaden 50 ml de KOH 3 M. La mezcla de reacción se calienta a reflujo durante 72 horas. La solución se enfría, se trata con 500 ml de agua helada, y se acidifica con una solución de HCl 12 N. El producto amarillo se recupera por filtración, a continuación se lleva a reflujo durante 72 horas en 50 ml de MeOH y 4,5 g de NaOH en 50 ml de agua. La solución se enfría, se trata con 250 ml de agua helada, se acidifica con HCl, se filtra y se lava con agua para proporcionar el 5,11,17 tris-[(carboxi)metil]25-monobutiloxicalix[4]areno en forma de un polvo de color blanquecino a amarillo con un rendimiento del 75%. P.f. = 223°C.

$^1\text{H RMN}$ (DMSO) δ 1,07 (t, 3H, $^2J_{\text{H-H}} = 6,9$ Hz, $\text{Ar-O}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$), 1,69 (m, 2H, $\text{Ar-O}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 2,01 (m, 2H, $\text{Ar-OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3,17 (s, 2H, $\text{Ar-CH}_2\text{COOH}$), 3,31 (s, 4H, $\text{Ar-CH}_2\text{COOH}$), 3,38 (d, 2H, $^2J_{\text{H-H}} = 13,1$ Hz, $\text{Ar-CH}_2\text{-Ar}$), 3,48 (d, 2H, $^2J_{\text{H-H}} = 13,1$ Hz, $\text{Ar-CH}_2\text{-Ar}$), 3,57 (t, 2H, $^2J_{\text{H-H}} = \text{Hz}$, $\text{Ar-OCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$), 4,11 (d, 2H, $^2J_{\text{H-H}} = 13,1$ Hz, $\text{Ar-CH}_2\text{-Ar}$), 4,20 (d, 2H, $^2J_{\text{H-H}} = 13,1$ Hz, $\text{Ar-CH}_2\text{-Ar}$), 6,82-7,12 (m, 9H, Ar-H), 8,87 (s, 2H, Ar-OH), 9,56 (s, 1H, Ar-OH).

$^{13}\text{C RMN}$ (DMSO) δ 13,8 ($\text{Ar-O}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$), 18,6 ($\text{Ar-O}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 22,1 ($\text{Ar-CH}_2\text{-COOH}$), 30,3 ($\text{Ar-OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 30,6 y 31,4 ($\text{Ar-CH}_2\text{-Ar}$), 76,6 ($\text{Ar-OCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$), 125,7; 127,6; 128,7; 130,1; 134,0 (Ar), 147,8 y 150,0 (ArC-OH), 151,9 ($\text{ArC-O}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$), 172,9 ($\text{Ar-CH}_2\text{-COOH}$).

ES espectro de masas (DMSO) m/z: 677,1 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$, 653,3 [MH] $^-$.

50 Ejemplo 5: Síntesis de 5,11,17 tris-[(carboxilato)metil] 25-mono-hexiloxi 26,27,28 tris-hidroxicalix[4]areno - compuesto 5c

En un matraz se colocan 5 g de tris-[(ciano)metil]monohexiloxi 26,27,28 tris-hidroxicalix[4]areno en 50 ml de EtOH. Se añaden 50 ml de KOH 3 M. La mezcla de reacción se calienta a reflujo durante 72 horas. La solución se enfría, se trata con 500 ml de agua helada y se acidifica con una solución de HCl 12 M.

El producto amarillo se recupera por filtración, a continuación se lleva a reflujo durante 72 horas en 50 ml de MeOH y 4,5 g de NaOH en 50 ml de agua. La solución se enfría, se trata con 250 ml de agua helada, se acidifica con HCl, se filtra y se lava con agua para dar el 5,11,17 tris-[(carboxi)metil]25-mono-hexiloxicalix[4]areno en forma de un sólido de color amarillo con un rendimiento del 69%. P.f. = 222°C

5 ¹H RMN (DMSO) δ 0,95 (t, 3H, ²J_{H-H} = 7,1 Hz, Ar-O(CH₂)₅CH₃), 1,42 (m, 4H, Ar-O(CH₂)₃CH₂CH₂CH₃), 1,67 (m, 2H, Ar-O(CH₂)₂CH₂(CH₂)₂CH₃), 2,02 (m, 2H, Ar-CH₂CH₂(CH₂)₃CH₃), 3,16 (s, 2H, Ar-CH₂-COOH), 3,31 (s, 4H, Ar-CH₂-COOH), 3,38 (d, 2H, ²J_{H-H} = 12,9 Hz, Ar-CH₂-Ar), 3,50 (d, 2H, ²J_{H-H} = 12,9 Hz, Ar-CH₂-Ar), 4,04 (t, 2H, ²J_{H-H} = 7,2 Hz, Ar-OCH₂(CH₂)₄CH₃), 4,15 (d, 2H, ²J_{H-H} = 12,9 Hz, Ar-CH₂-Ar), 4,20 (d, 2H, ²J_{H-H} = 12,9 Hz, Ar-CH₂-Ar), 6,85-7,18 (m, 9H, Ar-H), 8,89 (s, 2H, Ar-OH), 9,53 (s, 1H, Ar-OH),

10 ¹³C RMN (DMSO) δ 14,0 (Ar-O(CH₂)₅CH₃), 22,3 (Ar-CH₂-COOH), 24,8 (Ar-O(CH₂)₄CH₂CH₃), 29,3 (Ar-O(CH₂)₃CH₂CH₂CH₃), 29,7 (Ar-O(CH₂)₂CH₂(CH₂)₂CH₃), 30,3 (Ar-OCH₂CH₂(CH₂)₃CH₃), 30,6 y 31,7 (Ar-CH₂-Ar), 77,2 (Ar-OCH₂(CH₂)₄CH₃), 123,2; 124,2; 125,4; 126,9; 127,9; 129,6; 134,0 (Ar), 147,8 y 150,0 (ArC-OH), 151,9 (ArC-O(CH₂)₅CH₃).

ES espectro de masas m/z: 683,1 [M+H]⁺, 681,5 [MH]⁻.

15 **Ejemplo 6: Síntesis de 5,11,17 tris-[(carboxilato)metil]25-monododecil 26,27,28 tris-hidroxicalix[4]areno - compuesto 5d**

En un matraz se colocan 5 g de tris-[(ciano)metil] monododeciloxi 26,27,28 tris-hidroxicalix[4]areno en 50 ml de EtOH. Se añaden 50 ml de KOH 3 M. La mezcla de reacción se calienta a reflujo durante 72 horas. La solución se enfría, se trata con 500 ml de agua helada y se acidifica con una solución de HCl 12 M.

20 El producto amarillo se recupera por filtración, a continuación se lleva a reflujo durante 72 horas en 50 ml de MeOH y 4,5 g de NaOH en 50 ml de agua. La solución se enfría, se trata con 250 ml de agua helada, se acidifica con HCl, se filtra y se lava con agua para dar el 5,11,17 tris-[(carboxi)metil]25-mono-dodeciloicalix[4]areno en forma de un sólido de color amarillo con un rendimiento del 71%. P.f. = 210°C

25 ¹H RMN (DMSO) δ 0,81 (t, 3H, ²J_{H-H} = 7,0 Hz, Ar-O(CH₂)₁₁CH₃), 1,01 (m, 4H, Ar-O(CH₂)₉CH₂CH₂CH₃), 1,03 (m, 4H, Ar-O(CH₂)₇CH₂CH₂(CH₂)₂CH₃), 1,10 (m, 4H, Ar-O(CH₂)₅CH₂CH₂(CH₂)₄CH₃), 1,25 (m, 2H, Ar-O(CH₂)₄CH₂(CH₂)₅CH₃), 1,44 (m, 2H, Ar-O(CH₂)₃CH₂(CH₂)₆CH₃), 1,67 (m, 2H, Ar-O(CH₂)₂CH₂(CH₂)₇CH₃), 2,01 (m, 2H, Ar-OCH₂CH₂(CH₂)₈CH₃), 3,18 (s, 2H, Ar-CH₂-COOH), 3,30 (s, 4H, Ar-CH₂-COOH), 3,35 (d, 2H, ²J_{H-H} = 13,2 Hz, Ar-CH₂-Ar), 3,47 (d, 2H, ²J_{H-H} = 13,2 Hz, Ar-CH₂-Ar), 4,01 (t, 2H, ²J_{H-H} = 7,1 Hz, Ar-OCH₂(CH₂)₁₀CH₃), 4,13 (d, 2H, ²J_{H-H} = 13,2 Hz, Ar-CH₂-Ar), 4,17 (d, 2H, ²J_{H-H} = 13,2 Hz, Ar-CH₂-Ar), 6,83-7,12 (m, 9H, Ar-H), 8,91 (s, 2H, Ar-OH), 9,53 (s, 1H, Ar-OH),

30 ¹³C RMN (DMSO) δ 13,8 (Ar-O(CH₂)₁₁CH₃), 21,2 (Ar-CH₂-COOH), 24,6 (Ar-O(CH₂)₁₀CH₂CH₃), 24,8 (Ar-O(CH₂)₉CH₂CH₂CH₃), 28,7 (Ar-O(CH₂)₈CH₂(CH₂)₂CH₃), 28,8 (Ar-O(CH₂)₇CH₂(CH₂)₃CH₃), 29,1 (Ar-O(CH₂)₆CH₂(CH₂)₄CH₃), 29,4 (Ar-O(CH₂)₅CH₂(CH₂)₅CH₃), 29,6 (Ar-O(CH₂)₄CH₂(CH₂)₆CH₃), 29,8 (Ar-O(CH₂)₃CH₂(CH₂)₇CH₃), 29,9 (Ar-O(CH₂)₂CH₂(CH₂)₈CH₃), 30,2 (Ar-OCH₂CH₂(CH₂)₉CH₃), 30,5 y 31,6 (Ar-CH₂-Ar), 77,8 (Ar-OCH₂(CH₂)₁₀CH₃), 123,1; 124,3; 124,6; 127,2; 128,4; 129,7; 134,1 (Ar), 147,1 y 150,3 (ArC-OH), 151,4 (ArC-O(CH₂)₁₁CH₃), 170,3 (Ar-CH₂-COOH).

ES espectro de masas m/z: 767,2 [M+H]⁺, 765,1 [MH]⁻.

Ejemplo 7: Propiedades de tensioactivo - 1

40 La figura 2 muestra el efecto tensioactivo de las moléculas p(COOH)₃-Ar4-o(C_nH_{2n+1}), n = 1-12 átomos de carbono. Como se muestra, la capacidad de disminuir la tensión superficial del agua, un efecto típico de un tensioactivo, aumenta con el número de átomos de carbono en la cadena alifática. Las moléculas de calixareno que tienen una cadena alifática más corta modifican poco la tensión superficial del agua, lo que significa que sus propiedades detergentes son limitadas. Por otro lado, las moléculas que contienen una cadena de alquilo más larga (n = 3 a 12) se comportan como detergentes.

45 Como se esperaba, el potencial del tensioactivo aumenta con la longitud de la cadena de alquilo, y la molécula p(COOH)₃-Ar4-o(C₁₂H₂₅) muestra propiedades tensioactivas cercanas a las de DDM (β-D-dodecil malto-piranósido), un detergente no iónico, utilizado típicamente para disolver la membrana de las proteínas.

Este ejemplo ilustra la primera propiedad de los compuestos calixarenos de la invención, a saber, que las moléculas de calixarenos p(COOH)₃-Ar4-o(C_nH_{2n+1}), n = 3-12 se comportan como tensioactivos.

50 Como se muestra en la figura 3, el pH modula el potencial de las moléculas sobre la tensión superficial. A pH 6 y 8, la tensión superficial aumenta regularmente con la longitud de las cadenas de alquilo que alcanzan una meseta que corresponde a la mitad de la tensión superficial inicial (n = 12 a pH 8,0).

Estos efectos ilustran una propiedad de la invención, que es que simplemente cambiando el pH se puede modular la tensión superficial del medio, en presencia de los calixarenos de la invención. Este efecto se puede reducir o ampliar

en función de la longitud de la cadena de alquilo de los calixarenos de la invención.

Ejemplo 8: Propiedades de tensioactivo - 2

Como se muestra en la figura 4, los calixarenos $p(\text{COOH})_3\text{-Ar4-}o(\text{C}_n\text{H}_{2n+1})$, $n = 1\text{-}12$ se comportan como detergentes con una concentración micelar crítica (CMC) que puede variar desde 0,15 hasta 1,5 mM. Por concentración micelar crítica (CMC), se entiende la concentración más allá de la cual, la concentración de las moléculas detergentes no aumenta más, ya que dichas moléculas están implicadas en las micelas (figura 13). Las moléculas que contienen una cadena de alquilo con un número de grupos metileno menor que 8, muestran una CMC del orden mM que no depende del pH. A la inversa, cuando las cadenas de alquilo incluyen más de 8 grupos metileno, la CMC resultante disminuye apreciablemente a 0,15 mM cuando el pH aumenta de 6 a 8.

Este ejemplo ilustra una propiedad importante de los calixarenos de la serie $p(\text{COOH})_3\text{-Ar4-}o(\text{C}_n\text{H}_{2n+1})$, $n = 1\text{-}12$ cuya sensibilidad al pH depende de la longitud de la cadena de alquilo. Esta propiedad es particularmente importante para los calixarenos $p(\text{COOH})_3\text{-Ar4-}o(\text{C}_n\text{H}_{2n+1})$, $n = 9\text{-}12$ que se pueden utilizar ya sea con un pH ácido o con un pH básico, para favorecer o evitar la formación de micelas. Esta propiedad es típicamente para facilitar la eliminación del detergente sin aumentar la concentración durante la etapa de concentración de la membrana de la proteína solubilizada.

Ejemplo 9: Interacción de $p(\text{COOH})_3\text{-Ar4-}o(\text{C}_n\text{H}_{2n+1})$ con aminoácidos

La figura 5 ilustra la propiedad única de los calixarenos de la serie $p(\text{COOH})_3\text{-Ar4-}o(\text{C}_n\text{H}_{2n+1})$, ejemplificada con $n = 7$, de formar complejos con aminoácidos, modulando la tensión superficial del medio. No se observa ningún efecto con aminoácidos tales como el ácido glutámico o su derivado aminado, la asparagina. Un efecto moderado se observa con la glicina. Este efecto se amplifica con la hidrofobicidad (alanina, fenilalanina, leucina) y se vuelve muy pronunciado con los aminoácidos cargados positivamente, tales como histidina, lisina y arginina.

Este ejemplo ilustra una propiedad importante de la molécula de $p(\text{COOH})_3\text{-Ar4-}o(\text{C}_7\text{H}_{15})$ (y otras), en donde se puede aumentar fácilmente el potencial tensioactivo mediante la adición de aminoácidos cargados positivamente. Los complejos resultantes son próximos a los compuestos zwitteriónicos.

Ejemplo 10: Tamaño de los agregados

La Tabla 1 muestra el estado de agregación de las moléculas $p(\text{COOH})_3\text{-Ar4-}o(\text{C}_n\text{H}_{2n+1})$.

Tabla 1. Estado de agregación de las moléculas $p(\text{COOH})_3\text{-Ar4-}o(\text{C}_n\text{H}_{2n+1})$				
Diámetro aparente (nm)				
Compuesto	pH 2	pH 4	pH 6	pH 8
5a	950	340	22	270
			260	
5b	500	550		270
		90	145	25
5c	850	210	400	210
		890		6
5d	880	100	190	730
		40		8

Tal y como se ilustra en la tabla 1, todos los sistemas observado forman agregados de tipo micelar.

Efectos biológicos de las moléculas $p(\text{COOH})_3\text{-Ar4-}o(\text{C}_n\text{H}_{2n+1})$

Las series $p(\text{COOH})_3\text{-Ar4-}o(\text{C}_n\text{H}_{2n+1})$ se someten a ensayos para la solubilización de BmrA, una proteína de membrana que pertenece a los transportadores ABC y que protege las células contra el flujo de salida y la fuga de xenobióticos hacia el exterior de la célula [Chami 2002 JMB 315 1075; Orelle 2003 JBC 278-47 47002].

Como se muestra esquemáticamente en la figura 6, BmrA es una proteína homodímera insertada en la membrana plasmática de la bacteria. Esta proteína expulsa xenobióticos a través de la hidrólisis de ATP, una actividad enzimática que depende del plegamiento correcto del transportador y que requiere lípidos [7]. Tal actividad se utiliza para verificar la integridad funcional de la proteína en el curso del procedimiento de solubilización.

Ejemplo 11: Capacidad de solubilizar las membranas biológicas de los calixarenos de la invención

Las bacterias competentes C41 BL21 (DE3) de *E. coli* (*Escherichia coli*) se transforman con el plásmido pET15b-BMRA que es portador del gen que codifica BmrA y se colocan bajo el control de un promotor inducible y un gen que codifica la proteína que confiere resistencia a la ampicilina. Un clon positivo se cultiva en un medio líquido a 37°C y 200 rpm en presencia de ampicilina, hasta una fase de crecimiento semiexponencial. La expresión de BmrA se induce mediante la adición de isopropil tio-β-galactósido 1 mM y continúa a 25°C durante 4 horas. Las bacterias se recogen por centrifugación, se rompen en una prensa francesa ("French press"), y la fracción de membrana se aísla por una serie de etapas de centrifugación a velocidades bajas y altas. El contenido en proteína se evalúa por colorimetría [8] y se fija en 20 mg/ml (Tris-Cl 20 mM, pH 8,0, 200 ml de NaCl, sacarosa 300 mM) antes de la congelación y el almacenamiento en nitrógeno líquido. Antes del uso, la fracción de membrana se descongela a continuación rápidamente en agua y se mantiene a 4°C en hielo.

La solubilización se efectúa a 4°C (o a temperatura ambiente -23°C-, cuando se indica, mediante la dilución de la fracción de membrana en el mismo tampón hasta una concentración final de 2 mg/ml de proteínas, a continuación, se añaden los detergentes y las moléculas sometidas a ensayo hasta 10 mg/ml (1%) o menos cuando se indica, seguido por una incubación de 2 horas a 4°C. Las fracciones de proteínas solubilizadas o no solubilizadas se separan por una etapa de centrifugación a 200.000 x g durante 1 hora a 10°C. Cada sedimento de la centrifugación se suspende en el volumen inicial y se carga, junto con el material sobrenadante en una electroforesis de tipo Laemmli en gel de poliácridamida (SDS-PAGE) [9], y como se describe, por ejemplo en [7], para analizar su contenido en proteínas. Bajo tales condiciones, BmrA migra a aproximadamente 70.000 Dalton.

La actividad ATPasa se mide evaluando el contenido en fosfato inorgánico (Pi) después de 5 minutos de incubación a 37°C. La fracción de Pi producida por otras actividades ATPasa se deduce midiendo la misma actividad en presencia de orto vanadato 1 mM que inhibe la actividad ATPasa de BmrA (por ejemplo, tal y como se describe en [10]).

Tal y como se muestra en la figura 7, BmrA se encuentra cada vez más en el material sobrenadante, en función de la longitud de la cadena de alquilo de las moléculas $p(\text{COOH})_3\text{-Ar4-}\alpha(\text{C}_n\text{H}_{2n+1})$. No se lleva a cabo ninguna solubilización con las moléculas más cortas ($n = 1$ o 2), dando un esquema comparable al obtenido sin detergente (líneas "no det"). La solubilización aumenta progresivamente con $n = 3$ o 4 , y es más pronunciada con $n = 5$ y 6 que conduce al mismo esquema que el obtenido con DDM. La solubilización parece completa para $n \geq 7$, tal y como se obtiene con FC12 o SDS. En consecuencia, estas moléculas solubilizan eficientemente las proteínas de la membrana.

Esto se confirma con los datos de la figura 8, que muestran que la solubilización se lleva a cabo a una concentración de moléculas $\geq$ CMC, aproximadamente 1,5 mM para el compuesto heptilo (1 g/L = 1,6 mg/ml), mientras que este no es el caso para el compuesto dodecilo, dado que con una CMC de 0,15 mM (correspondiente a 0,1 g/l), no se lleva a cabo ninguna solubilización, probablemente debido a una relación detergente/proteína demasiado baja.

La tabla 2 indica la correspondencia g/l en M para las moléculas sometidas a ensayo.

$p(\text{COOH})_3\text{-Ar4}$	[compuestos], M						
	PM	CMC, M	10 g/L	1 g/L	0,1 g/L	0,01 g/L	0,001 g/L
$\alpha(\text{C}_1\text{H}_3)$	612	>1,5E-03	1,6E-02	1,6E-03	1,6E-04	1,6E-05	1,6E-06
$\alpha(\text{C}_3\text{H}_7)$	640	~1,5E-03	1,6E-02	1,6E-03	1,6E-04	1,6E-05	1,6E-06
$\alpha(\text{C}_7\text{H}_{15})$	696	~1,5E-03	1,4E-02	1,4E-03	1,4E-04	1,4E-05	1,4E-06
$\alpha(\text{C}_{12}\text{H}_{25})$	766	~1,5E-04	1,3E-02	1,3E-03	1,3E-04	1,3E-05	1,3E-06

Ejemplo 12: Efecto de la solubilización con la serie $p(\text{COOH})_3\text{-Ar4-}\alpha(\text{C}_n\text{H}_{2n+1})$ sobre la actividad ATPasa de BmrA

El efecto de la solubilización con la serie $p(\text{COOH})_3\text{-Ar4-}\alpha(\text{C}_n\text{H}_{2n+1})$ sobre la actividad ATPasa de BmrA se analizó bajo las mismas condiciones que en la figura 8.

La figura 9 muestra el efecto de los detergentes utilizados (calixarenos que contienen una cadena alifática metilo, butilo, heptilo o dodecilo) y detergentes testigos (FC12 y C12E8, un detergente sin carga) sobre la actividad ATPasa, antes, durante y después de la solubilización de BmrA. Como se observa típicamente, la actividad ATPasa disminuye con la solubilización tal y como se observa para FC12 y C₁₂E₈.

Cabe destacar que la comparación entre las figuras 8 y 9 muestra que la molécula heptilo, a 1 mg/ml, solubiliza BmrA más eficazmente, mientras que esta concentración, ligeramente inferior a la CMC, no conduce a la inactivación. Esto es igualmente cierto para el compuesto dodecilo, a la misma concentración, 1 mg/ml, 1/10 de CMC.

Los experimentos de reconstitución de BmrA en bicapas lipídicas después de la eliminación del detergente, muestran una actividad ATPasa totalmente recuperada (rombo negro en la figura 9) lo que indica que las moléculas de la invención conservan la topología de BmrA en un estado funcional.

Ejemplo 13: Extracción de la proteína BCRP de origen humano de acuerdo con el método de la invención

5 La proteína BCRP, derivada de un gen humano, se expresó en células HEK293 humanas o en células Sf9 de insecto en las que se había transfectado el gen correspondiente. Esta proteína se ha solubilizado igualmente de forma eficaz con los derivados de calixarenos de fórmula (I) que contienen cadenas de heptilo o más largas, tal y como se muestra en la figura 10.

10 Estos experimentos muestran que el método de acuerdo con la invención que emplea calix[4]arenos trianiónicos es un método eficaz para la extracción de una proteína de membrana dada, dependiendo de la elección de calixareno de la serie homóloga que, o bien enriquece el material sobrenadante, o deja la proteína en el sedimento. Esta extracción puede estar seguida eventualmente por una etapa de purificación.

Ejemplo 14: Efecto de la solubilización con los calixarenos de acuerdo con la invención, sobre la actividad enzimática de los transportadores ABC

15 Las proteínas de la familia de transportadores ABC son muy sensibles a la solubilización, alterando esta etapa frecuentemente su actividad ATPasa, al menos de forma reversible. Esta alteración da como resultado la falta de acoplamiento entre los dominios NBDs (dominio de unión al nucleótido o "nucleotide-binding domain") y TMDs (dominio transmembrana).

20 Los efectos de la solubilización sobre la actividad de la proteína BmrA se han evaluado con diversos calixarenos C4Cn, es decir, los calixarenos $p(\text{COOH})_3\text{-Ar4-o}(\text{C}_n\text{H}_{2n+1})$, y también con los detergentes testigos, tales como Foscolina 12 (FC12) y β -D-dodecil malto-piranosido (DDM), a continuación, los extractos obtenidos (fracciones de sobrenadante) se dializan en presencia de liposomas con el fin de restaurar un medio de membrana, lo que permite la recuperación de la actividad de la proteína.

25 Los resultados representados en la figura 11, muestran que una vez solubilizada en presencia de DDM o FC12, la proteína BmrA ha perdido respectivamente 95 y 99% de su actividad ATPasa (columnas "DDM Sup./ DDM" y "FC12 Sup./ FC12", respectivamente), en relación con la actividad BmrA que se puede medir en las membranas naturales ("BmrA Mb"). Sin embargo, esta actividad ATPasa se recupera después de la eliminación de los detergentes y la reconstitución en los liposomas (fig. 11, columnas "DDM Sup./ Lip" y "FC12 Sup./ Lip").

30 Cuando los derivados calixarenos C4C3 y C4C7 se utilizan sucesivamente (ver ejemplo 15), se conserva aproximadamente el 50% de la actividad ATPasa, lo que demuestra que estos detergentes calixarenos permiten mantener la proteína de membrana en solución de una manera más rígida, a diferencia de los detergentes DDM y FC12. De hecho, la estructura rígida de cono de los calixarenos de fórmula (I) permite la formación de micelas rígidas que para las proteínas constituyen un medio comparable al medio de la membrana, lo que permite una mejor conservación de su estructura tridimensional y, por lo tanto, de su actividad.

Ejemplo 15: Extracción y purificación de proteínas de la familia de transportadores ABC, con calixarenos de fórmula (I)

La ventaja de la extracción diferencial de la proteína BmrA utilizando sucesivamente los calixarenos C4C3 y luego C4C7, ha permitido enriquecer la fracción del material sobrenadante (tal y como se muestra en la fig. 12A), antes de una purificación posterior mediante cromatografía (figuras 12B-E).

40 El material sobrenadante de C4C7 (muestra "C4C7 S" en la figura 12A) se ha sometido a una cromatografía de afinidad a níquel (figuras 12B y 12C), siendo portadora la proteína BmrA de un marcador de hexahistidina en su extremo N-terminal. La proteína se asocia de este modo a la resina y se eluye con imidazol en presencia de NaCl 0,3 M, por lo que es posible evitar la quelación del níquel a través del calixareno trianiónico.

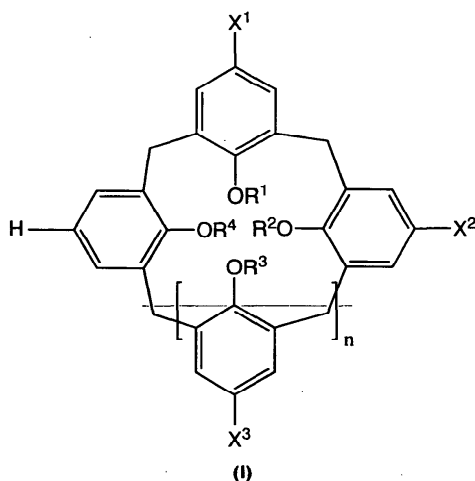
45 El mismo material sobrenadante también se ha sometido a una cromatografía de filtración en gel, en presencia de Foscolina 12 (figura 12D), con el fin de verificar el estado de oligomerización del transportador. BmrA se eluye con un volumen de 12 ml, que corresponde a un peso molecular aparente de 200.000 Da, que es un valor compatible con una forma dimérica de BmrA (2 x 65000 Da) y una micela de FC12 (70.000 Da). Durante esta etapa, el calixareno C4C7 se ha intercambiado con FC12 y se ha eluido entre 15 y 25 ml, de acuerdo con la detección con UV (DO a 280 nm en miliunidades de absorción mAU) y con SDS-PAGE (recuadro en la figura 12D). La fracción de BmrA (representada por una estrella en la figura 12D) está activa (fracción a de la figura 12E), a pesar de la presencia de FC12, lo que sugiere que una estructura funcional de BmrA se conserva después de solubilización con C4C7, y/o trazas de C4C7 permanecen unidas a la proteína. Una actividad ATPasa elevada se recupera después de la reconstitución de BmrA en los liposomas (fracción b en la figura 12E). Estos resultados muestran claramente que una proteína de membrana se puede purificar mediante el uso de una pareja de calixarenos de fórmula (I) y las etapas de cromatografía, conservando en cada una de estas etapas la integridad funcional de la proteína.

Listado de Referencias

- [1]. Juliano, R. L. y Ling, V. (1976) A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants, *Biochim Biophys Acta* 455, 152-162.
- 5 [2]. Cole, S. P., Bhardwaj, G., Gerlach, J. H., Mackie, J. E., Grant, C. E., Almquist, K. C., Stewart, A. J., Kurz, E. U., Duncan, A. M. y Deeley, R. G. (1992) Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line, *Science* 258, 1650-1654.
- [3]. Litman, T., Brangi, M., Hudson, E., Fetsch, P., Abati, A., Ross, D. D., Miyake, K., Resau, J. H. y Bâtes, S. E. (2000) The multidrug-resistant phenotype associated with overexpression of the new ABC half-transporter, MXR (ABCG2), *J Cell Sci* 113 (Pt 11), 2011-2021.
- 10 [4]. Chami, M., Steinfels, E., Orelle, C., Jault, J. M., Di Pietro, A., Rigaud, J. L. y Marco, S. (2002) Three-dimensional structure by cryo-electron microscopy of YvcC, an homodimeric ATP-binding cassette transporter from *Bacillus subtilis*, *J Mol Biol* 315, 1075- 1085.
- 15 [5]. Orelle, C., Dalmas, O., Gros, P., Di Pietro, A. y Jault, J. M. (2003) The conserved glutamate residue adjacent to the Walker-B motif is the catalytic base for ATP hydrolysis in the ATP-binding cassette transporter BmrA, *J. Biol. Chem.* 278, 47002-47008.
- [6]. Lenoir, G., Menguy, T., Corre, F., Montigny, C., Pedersen, P. A., Thinès, D., le Maire, M. y Falson, P. (2002) Overproduction in yeast and rapid and efficient purification of the rabbit SERCA1a Ca^{2+} -ATPase, *Biochim. Biophys. Acta* 1560, 67-83.
- 20 [7]. Steinfels, E., Orelle, C., Fantino, J. R., Dalmas, O., Rigaud, J. L., Denizot, F., Di Pietro, A. y Jault, J. M. (2004) Characterization of YvcC (BmrA), a multidrug ABC transporter constitutively expressed in *Bacillus subtilis*, *Biochemistry* 43, 7491-7502.
- [8]. Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. y Klenk, D. C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Anal. Biochem.* 150, 76-85.
- 25 [9]. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227, 680-685.
- [10]. Decottignies, A., Grant, A. M., Nichols, J. W., de Wet, H., McIntosh, D. B. y Goffeau, A. (1998) ATPase and multidrug transport activities of the overexpressed yeast ABC protein Yor1 p, *J. Biol. Chem.* 273, 12612-12622.

REIVINDICACIONES

1. Método para extraer selectivamente proteínas de membrana, es decir, proteínas asociadas a membranas biológicas, que comprende una etapa que consiste en poner en contacto una solución acuosa que comprende una o varias proteínas de membrana de la proteína de membrana que se va a extraer con al menos un calixareno, caracterizado porque el calixareno es un calixareno de fórmula (I):



en donde:

- n es un número entero igual a 1, 3, 5 o 6;
 - R¹, R², R³, R⁴ independientemente uno de otro, representan un átomo de hidrógeno; un grupo alquilo (C₁₋₁₂) lineal o ramificado, eventualmente sustituido con uno o varios heteroátomos seleccionados entre el grupo de átomos O, S, N y P; un grupo alquilo (C₁₋₁₂) lineal o ramificado, eventualmente sustituido con un grupo -COOR en donde R es un grupo alquilo (C₁₋₄) lineal o ramificado; un grupo arilo que comprende de 6 a 20 átomos de carbono;
 - X¹, X² y X³ independientemente uno de otro representan un grupo -(CH₂)_m-COOR' en donde
 - m es un número entero de 0 a 10,
 - R' representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo (C₁₋₄) lineal o ramificado;
- o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.
2. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la extracción selectiva de la proteína de membrana se lleva a cabo utilizando al menos un calixareno de fórmula (I) en la que:
- n es un número entero igual a 1;
 - R¹, R², R³, R⁴ independientemente uno de otro, representan un átomo de hidrógeno; un grupo alquilo (C₁₋₁₂) lineal o ramificado;
 - X¹, X² y X³ independientemente uno de otro, representan un grupo -(CH₂)_m-COOR' en donde
 - m es un número entero de 0 a 10,
 - R' representa un átomo de hidrógeno;
- o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.
3. Método de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la proteína de membrana que se va a extraer está presente en una fracción de membrana biológica derivada de un organismo procariota o eucariota, sano o alterado.
4. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la proteína de membrana es una proteína seleccionada entre el grupo que comprende las proteínas de transporte.
5. Método de acuerdo con la reivindicación 4, en donde la proteína de transporte es un transportador ABC, seleccionado entre el grupo que comprende las glicoproteínas P (Pgp/ABCB1), MRP1/ABCC1, BCRP/ABCG2 y BmrA.
6. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la etapa de puesta en con-

tacto de una solución acuosa que comprende la proteína de membrana que se va a extraer con al menos un calixareno de fórmula (I) se efectúa a un pH que varía de 5,5 hasta 10.

- 5 7. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la etapa de puesta en contacto de una solución acuosa que comprende la proteína de membrana que se va a extraer con al menos un calixareno de fórmula (I) se efectúa a una temperatura que varía de 0 a 100°C.
8. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la etapa de puesta en contacto de una solución acuosa que comprende la proteína de membrana que se va a extraer con al menos un calixareno de fórmula (I) se efectúa a una concentración de calixareno que oscila entre 10^{-6} a 10^{-2} M.
- 10 9. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la etapa de puesta en contacto de una solución acuosa que comprende la proteína de membrana que se va a extraer con al menos un calixareno de fórmula (I) se efectúa con calixarenos en solución o con calixarenos en agregados coloidales.
10. Método de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el agregado coloidal se selecciona entre el grupo que comprende micelas, liposomas y nanopartículas lipídicas.
- 15 11. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde la etapa de puesta en contacto de una solución acuosa que comprende la proteína de membrana que se va a extraer con al menos un calixareno de fórmula (I) se efectúa eventualmente en presencia de al menos un cosoluto seleccionado entre el grupo que comprende:
 - i) sales orgánicas e inorgánicas seleccionadas entre el grupo que comprende sales farmacéuticamente aceptables;
 - 20 ii) pequeñas moléculas bioactivas seleccionadas entre el grupo de los aminoácidos, vitaminas, lípidos, esteroides, carbohidratos o metabolitos;
 - iii) moléculas bioactivas oligómeras seleccionadas entre el grupo de los péptidos, oligonucleótidos, oligosacáridos;
 - 25 iv) moléculas biológicas polímeras seleccionadas entre el grupo de las proteínas, polinucleótidos y polisacáridos.
12. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde la etapa de puesta en contacto está precedida por una etapa en la cual:
 - la proteína de membrana que se va a extraer o la fracción de membrana que la contiene se disuelve en una solución tampón, y
 - 30 - el calixareno de fórmula (I) se añade de acuerdo con las condiciones descritas en las reivindicaciones 6 a 11.
13. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde las proteínas que forman un complejo con los calixarenos de fórmula (I) y las proteínas que no forman un complejo se separan por centrifugación.
- 35 14. Proteína de membrana que forma un complejo con al menos un calixareno de fórmula (I) tal y como se define en la reivindicación 1, obteniéndose dicha proteína de membrana que forma un complejo por un método de extracción de acuerdo con la reivindicación 13.

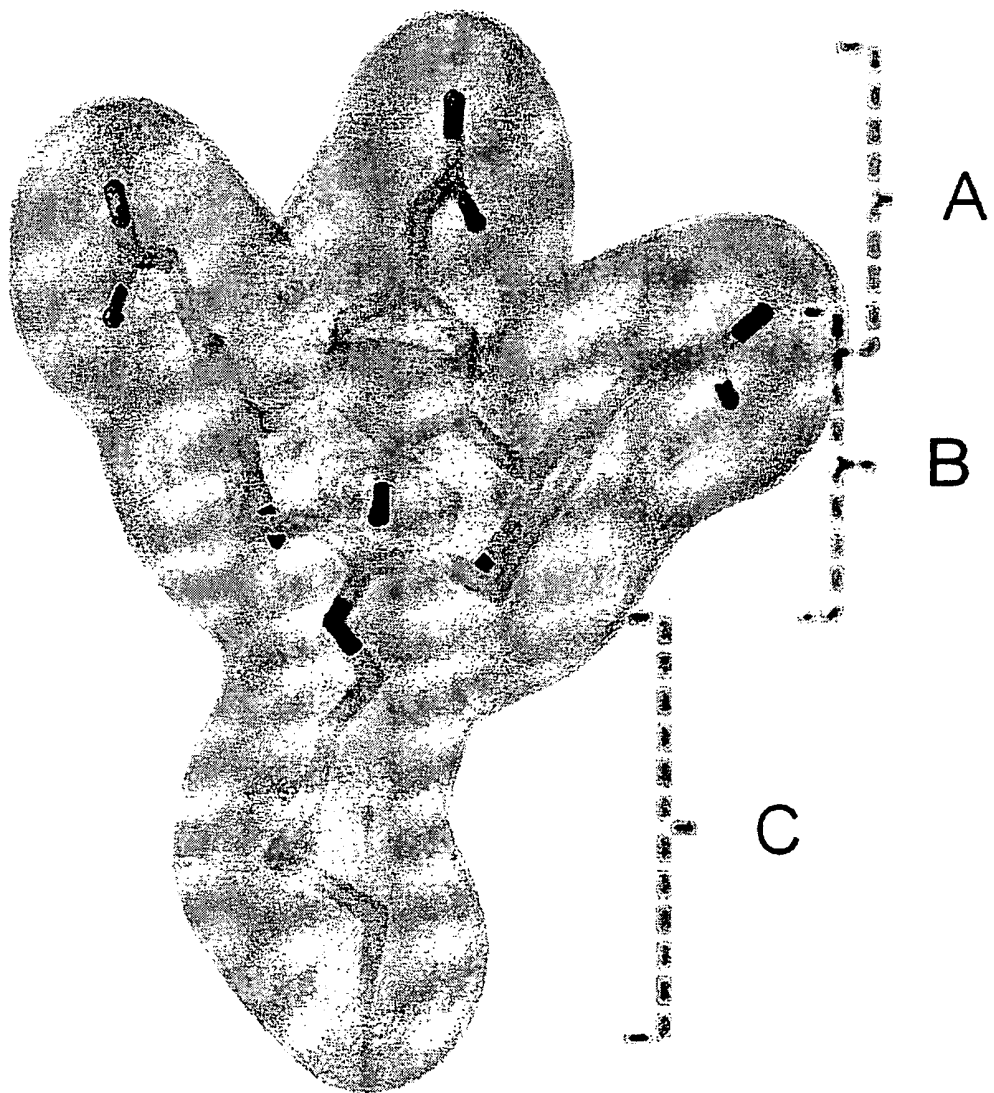


Figura 1

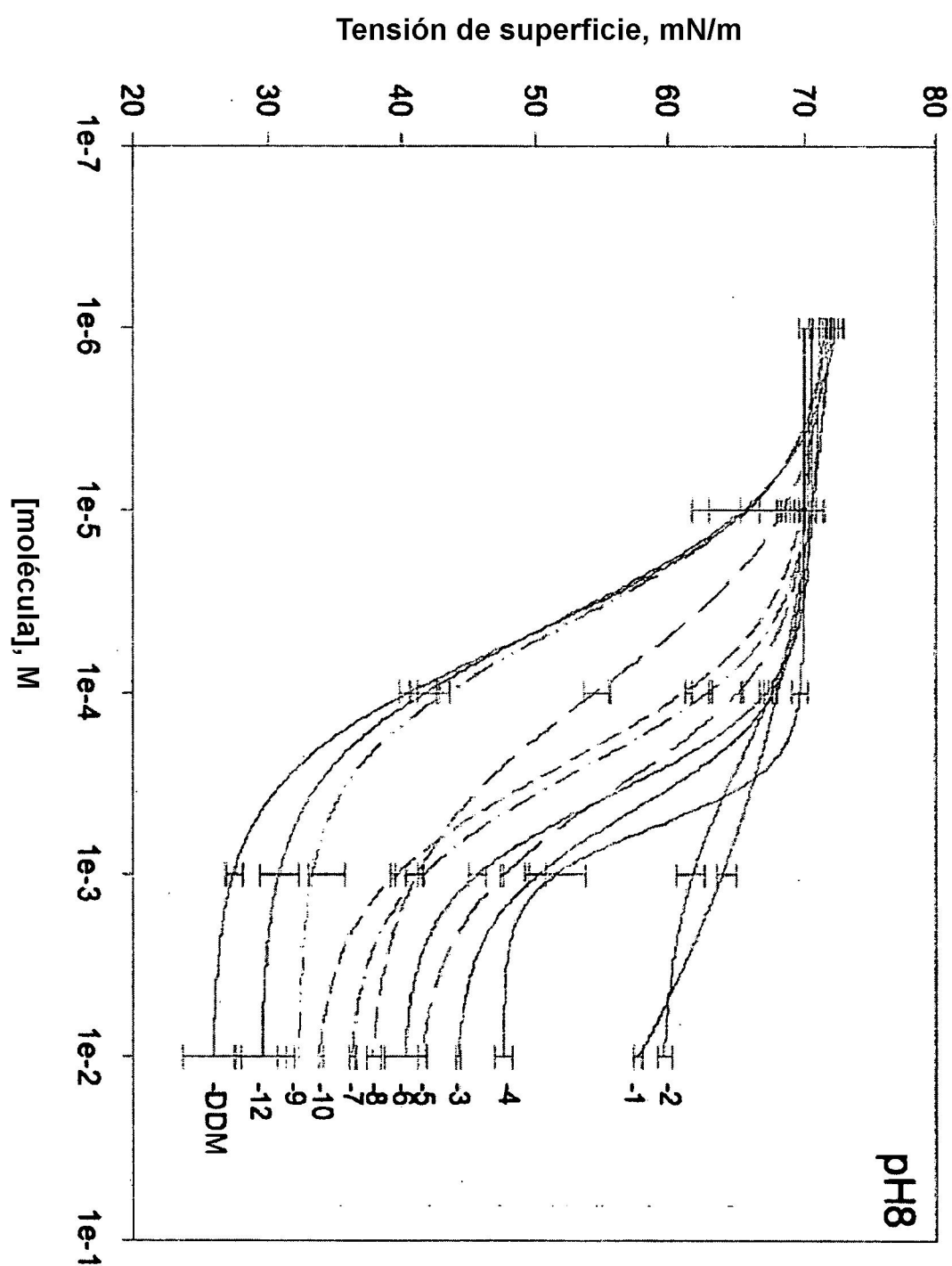


Figura 2

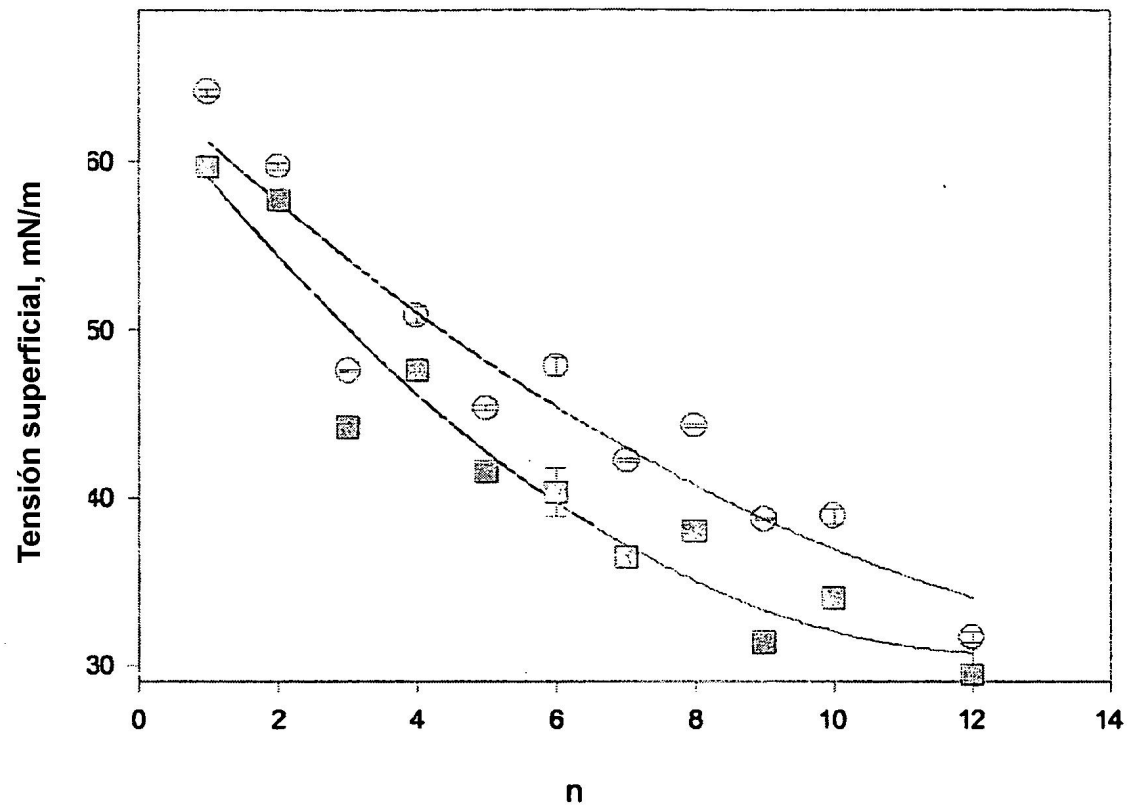


Figura 3

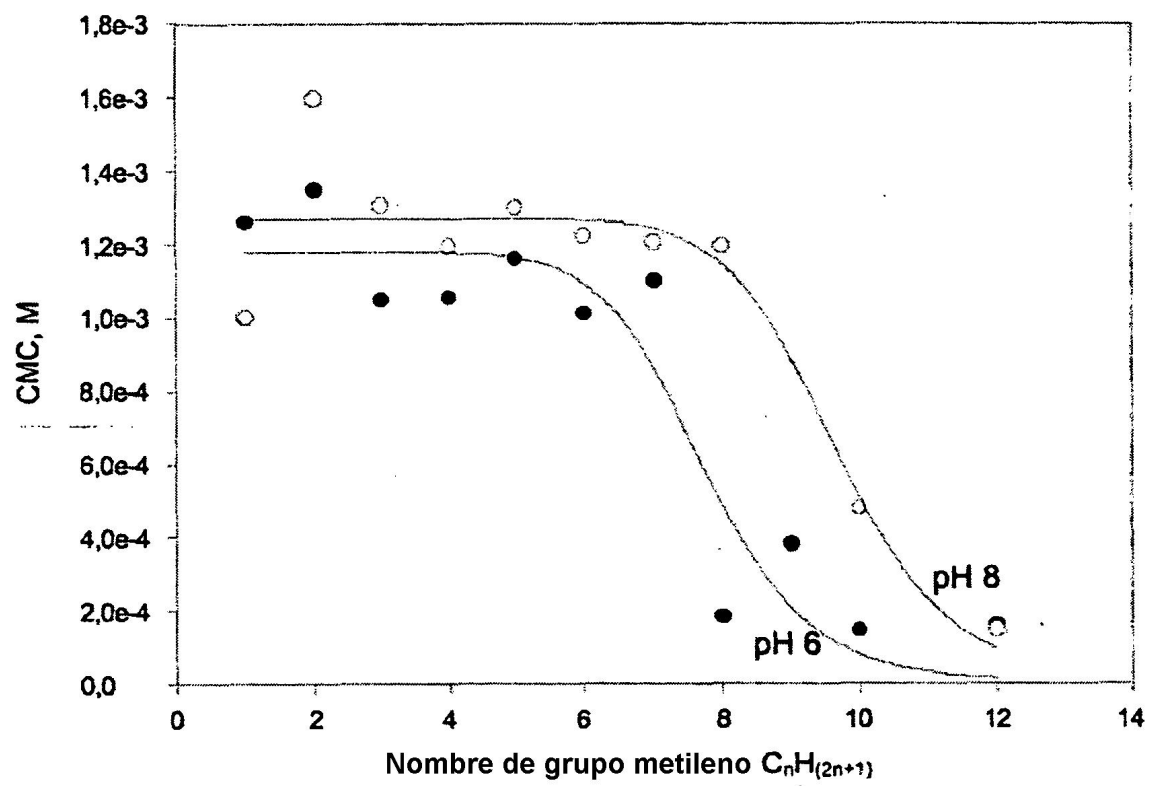


Figura 4

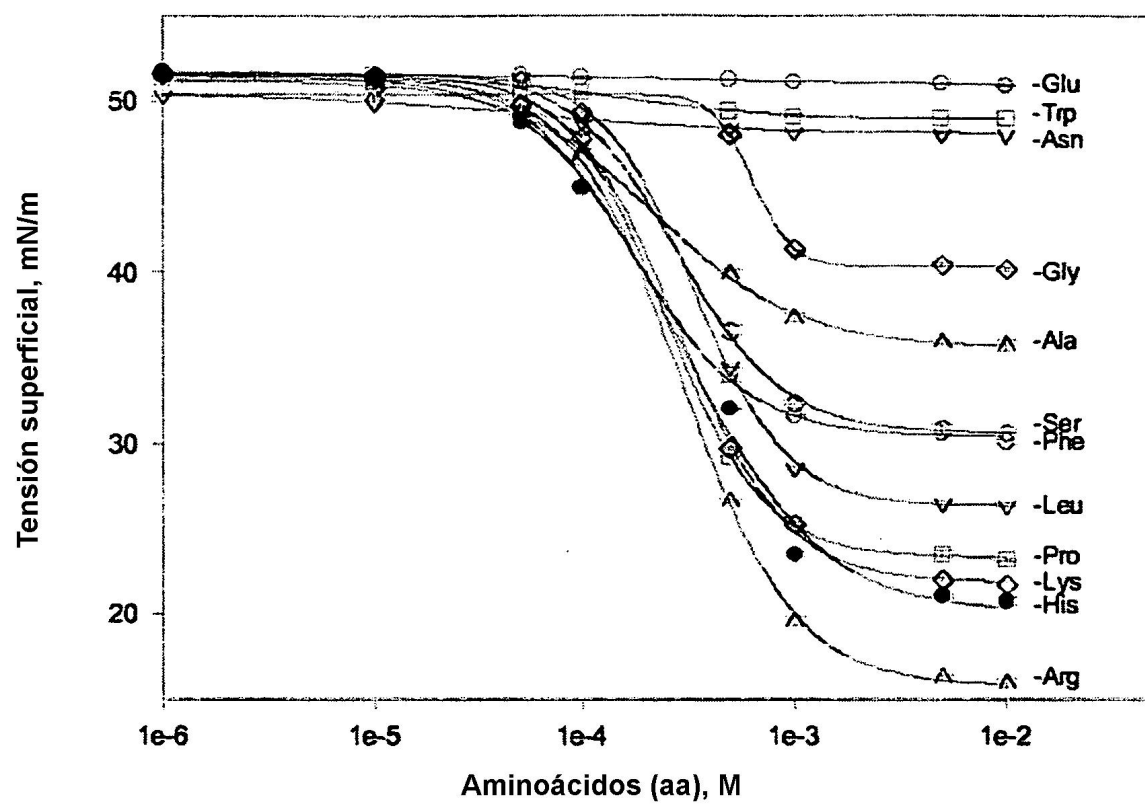


Figura 5

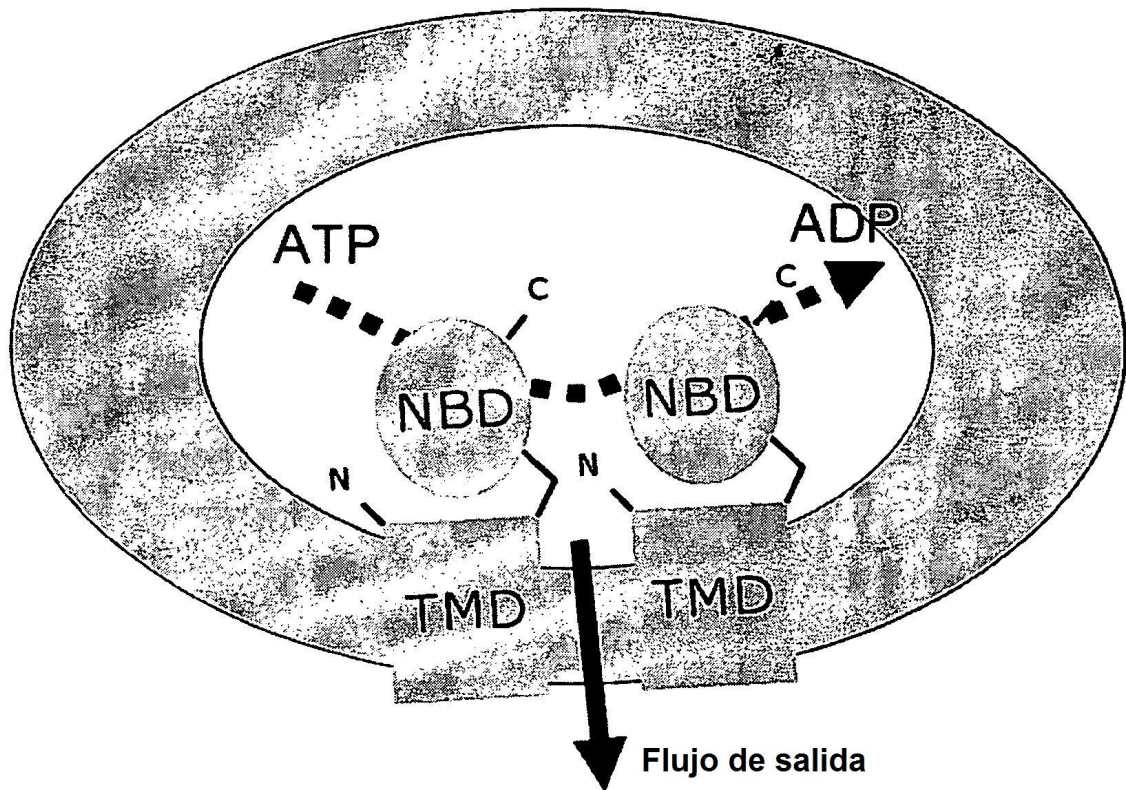


Figura 6

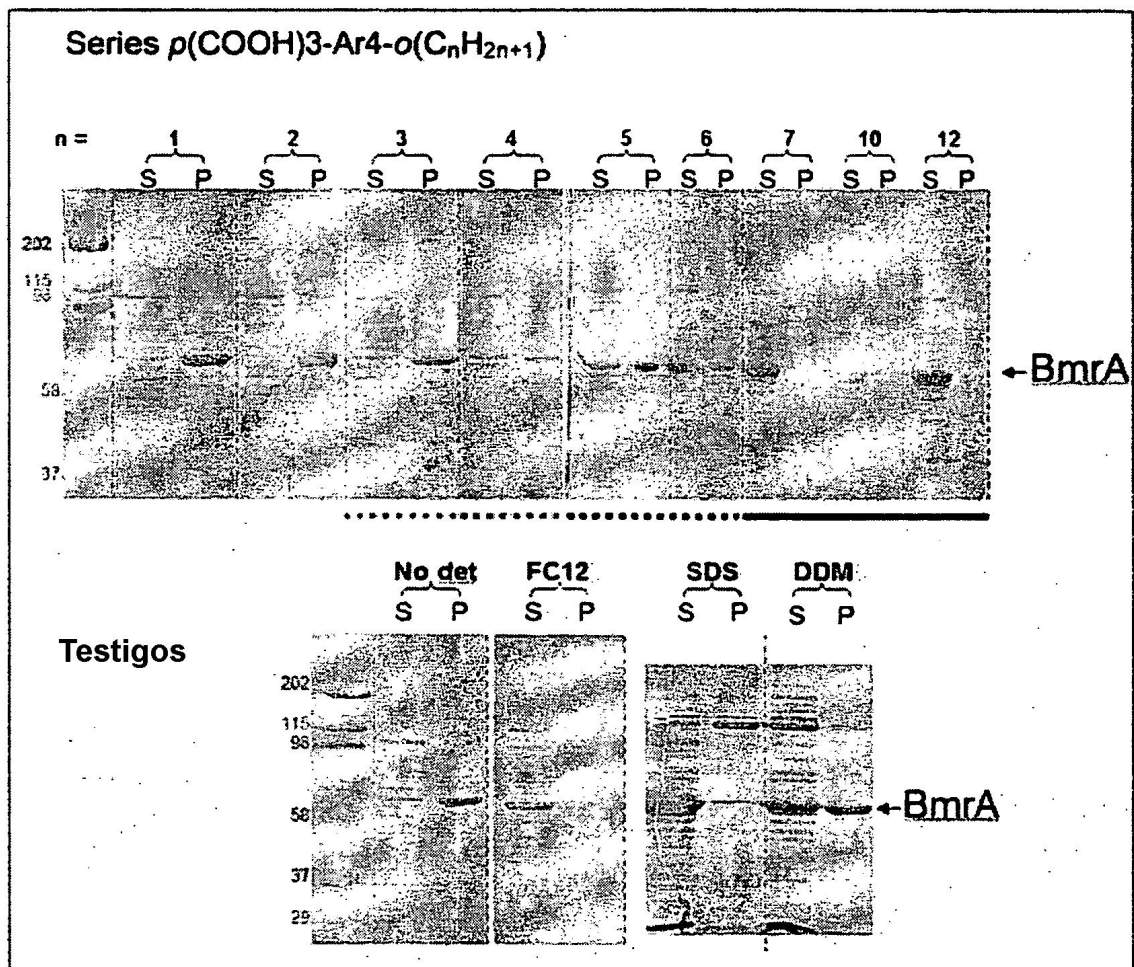


Figura 7

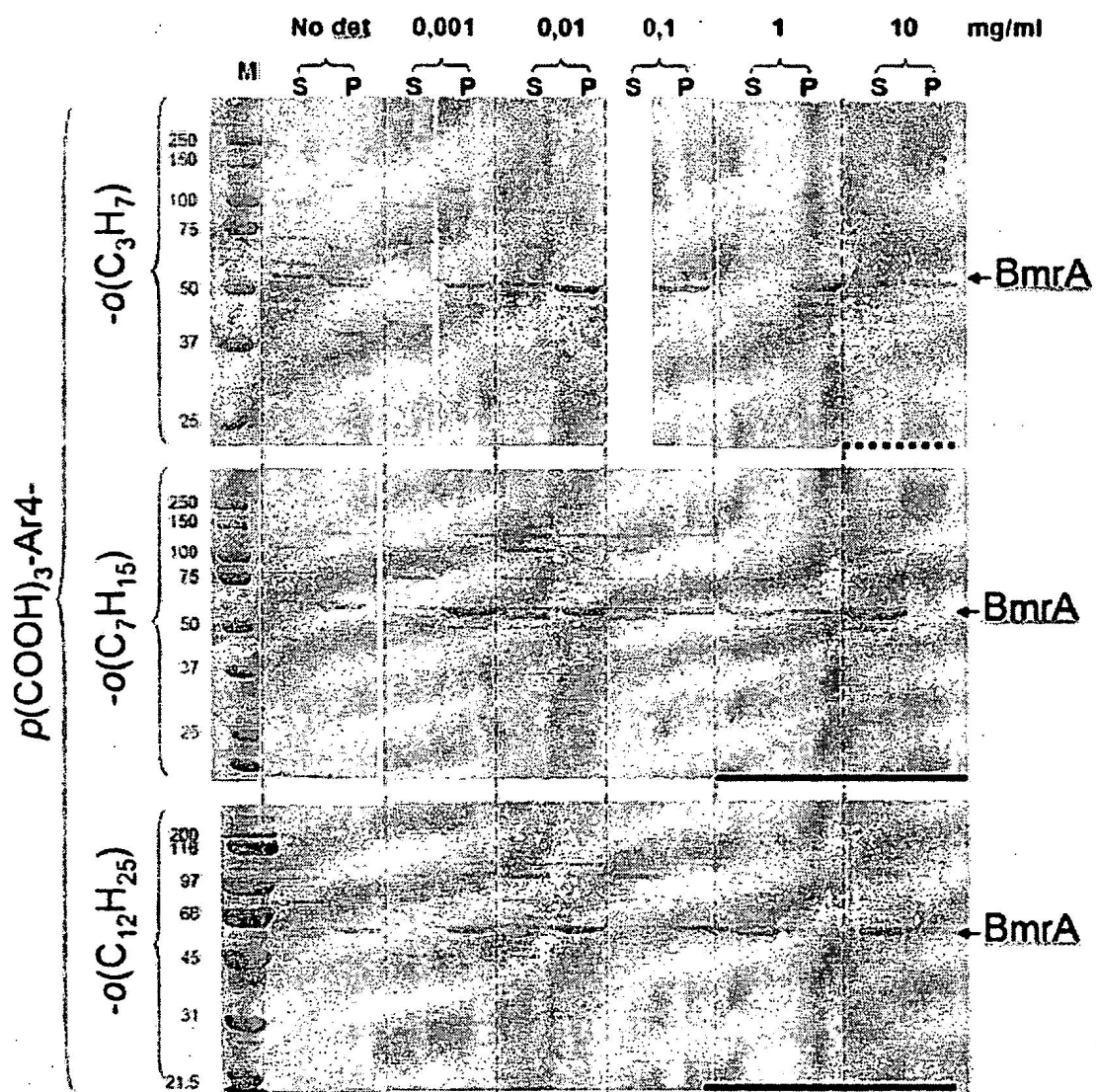


Figura 8

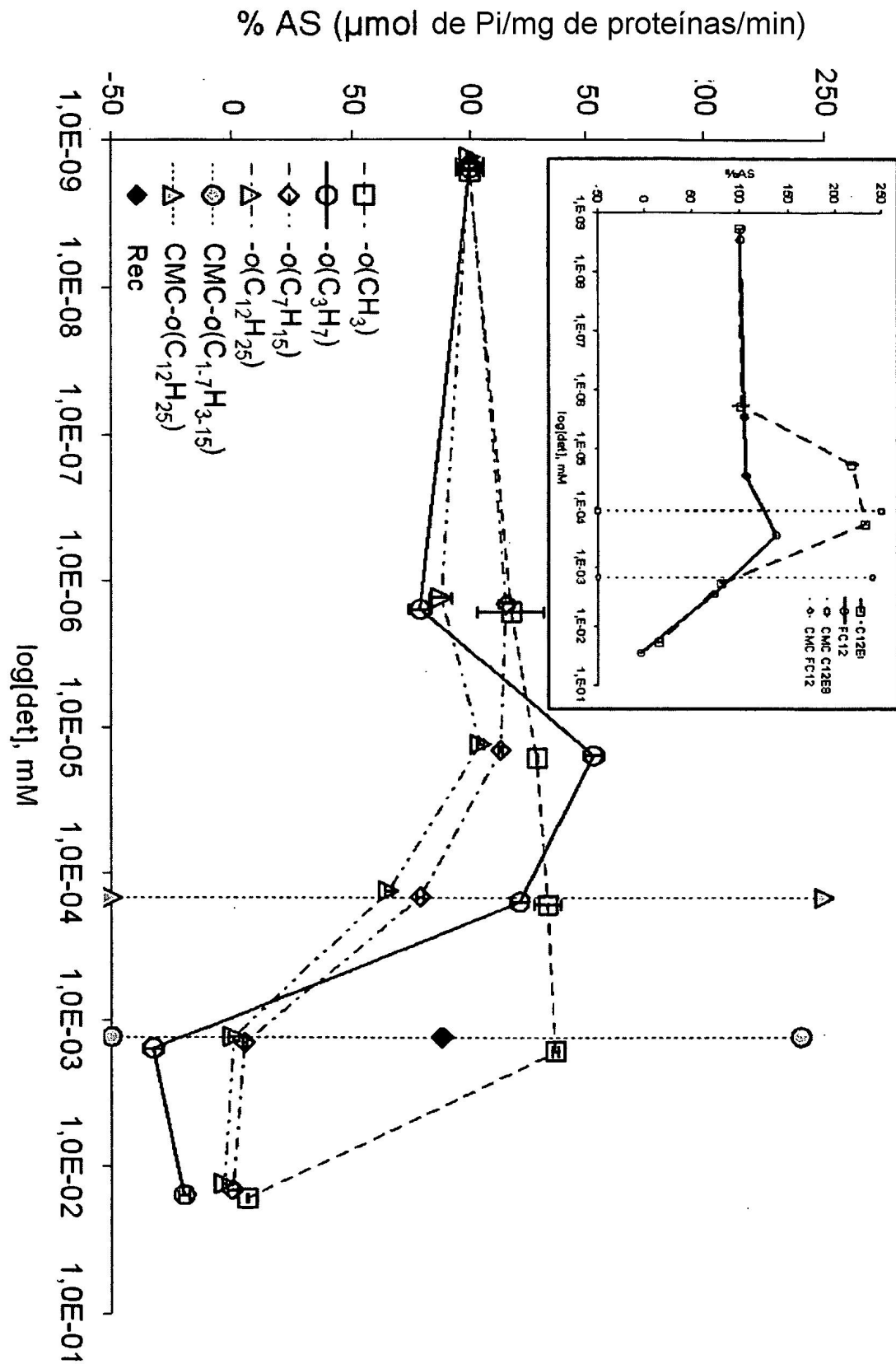


Figura 9

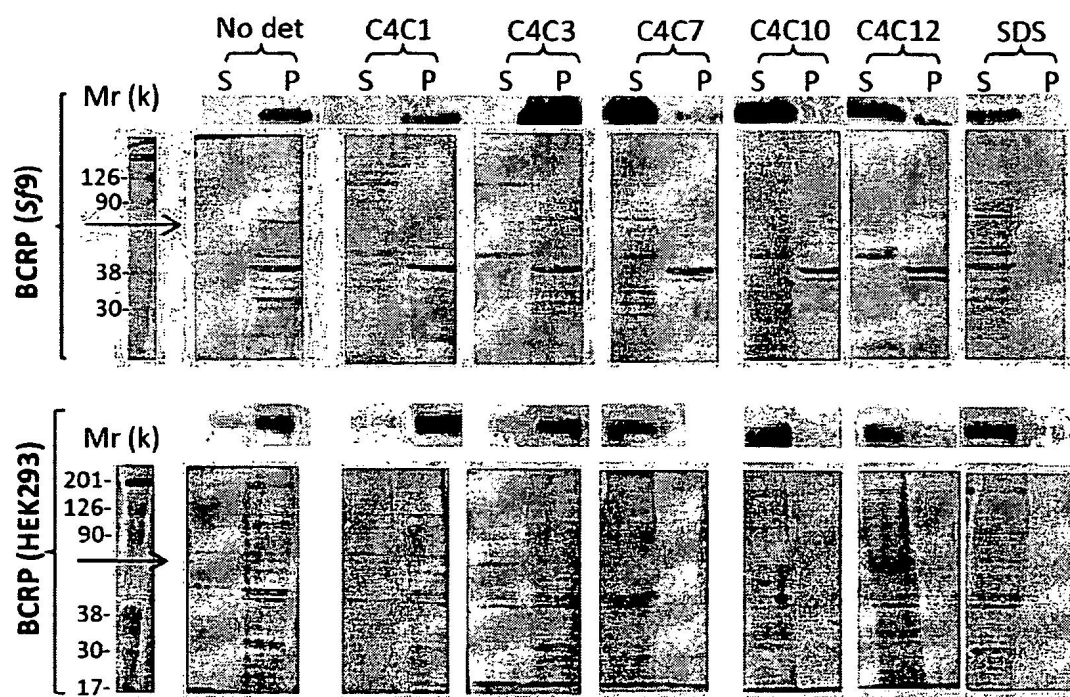


Figura 10

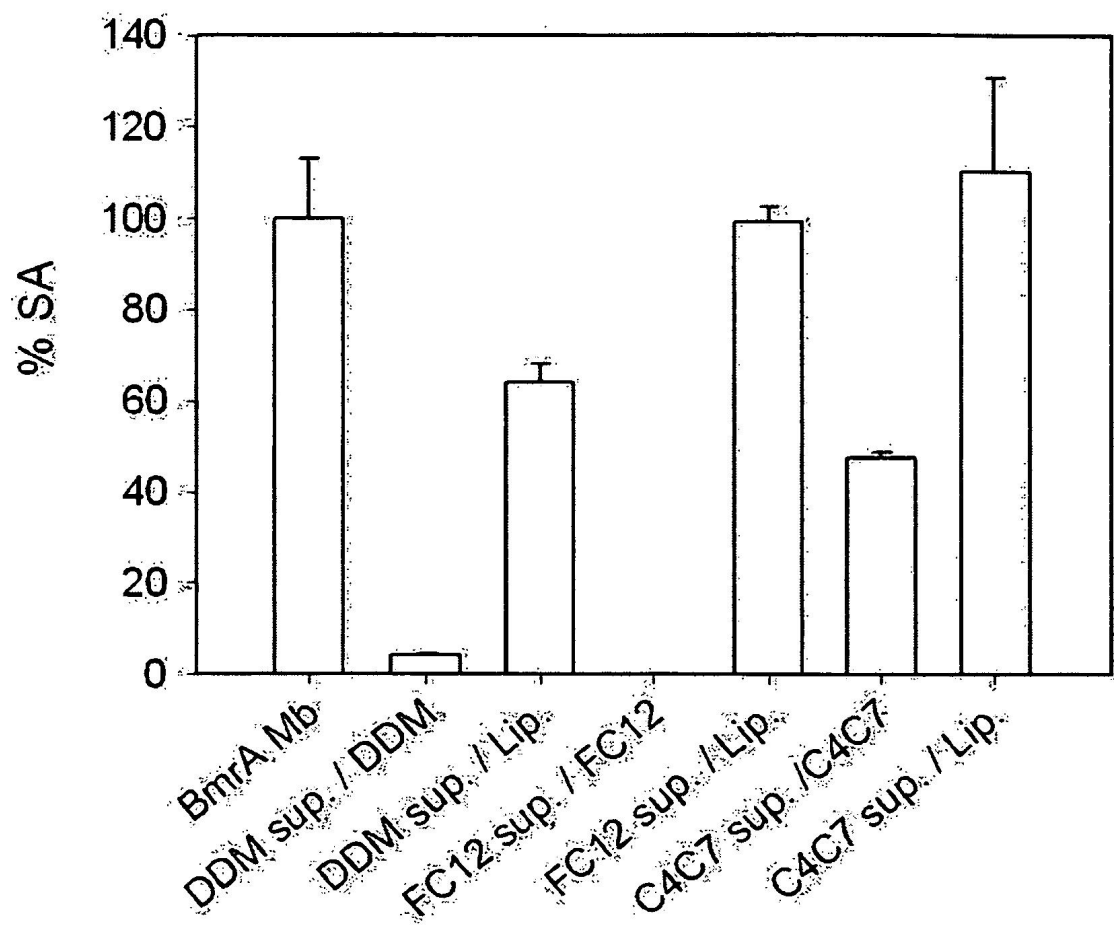


Figura 11

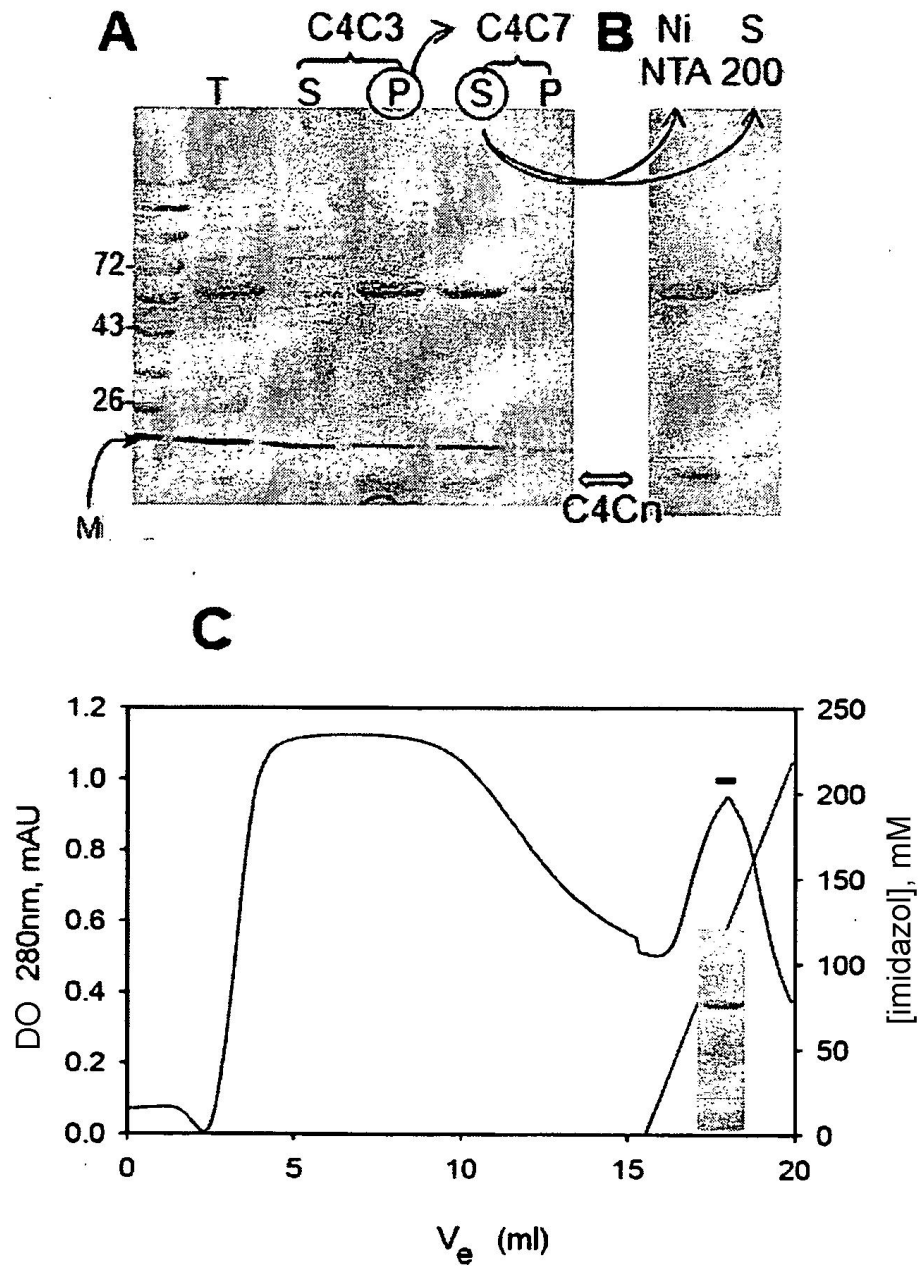


Figura 12

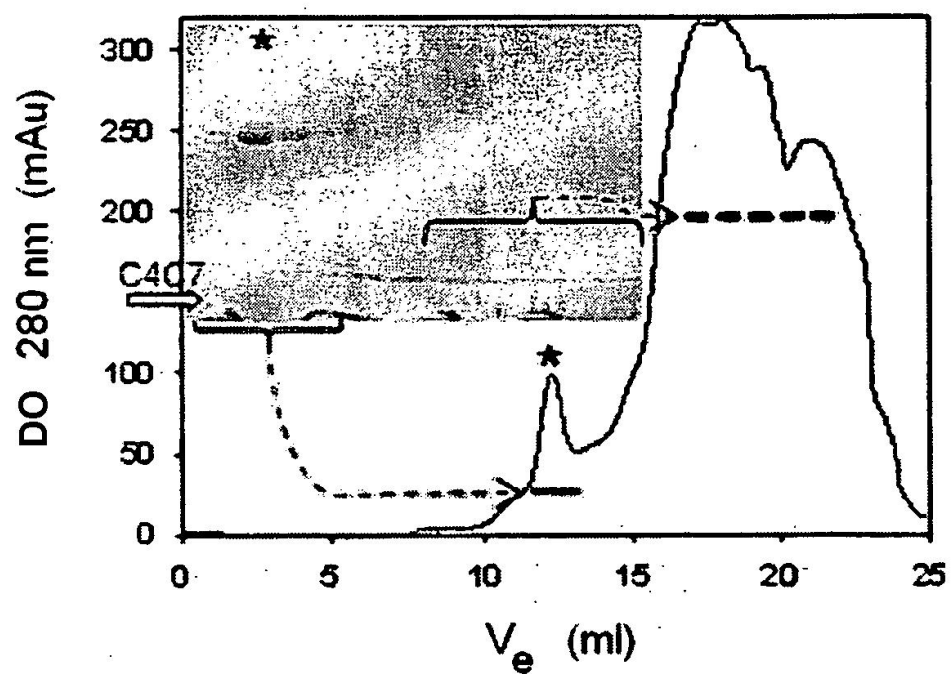
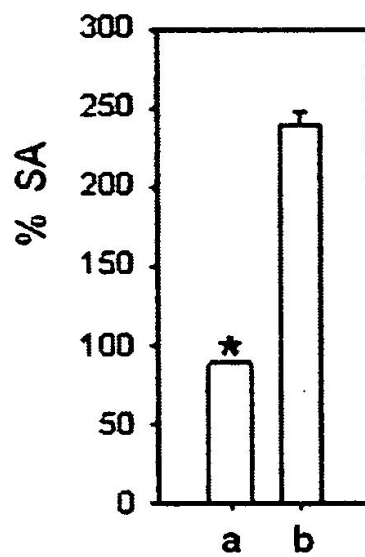
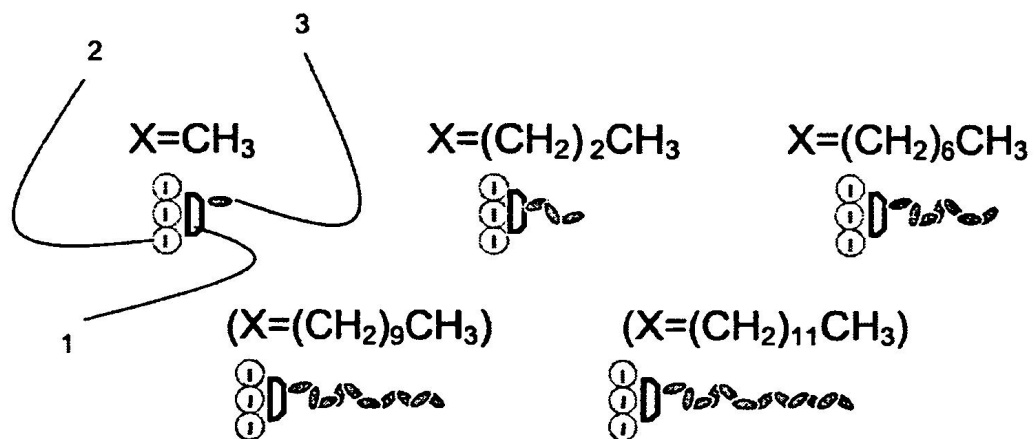
D**E**

Figura 12

A



B

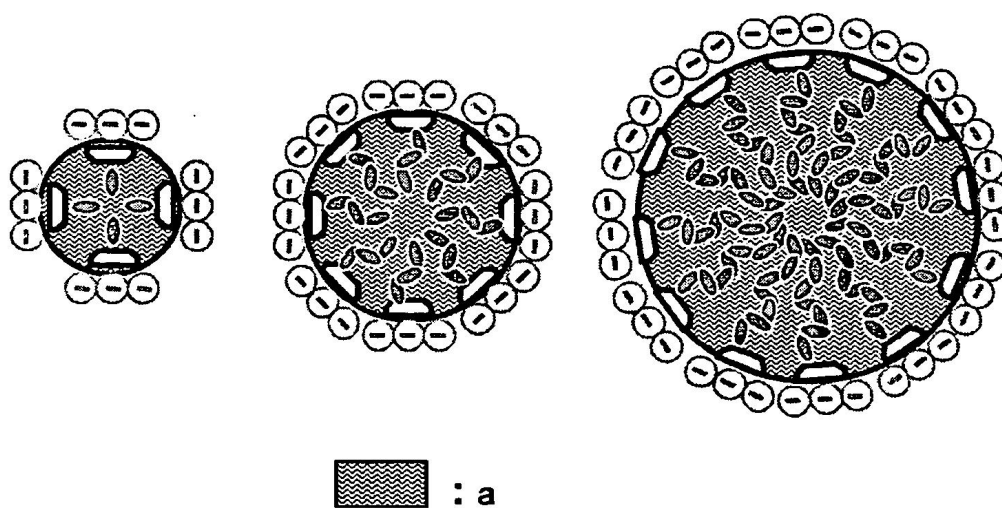


Figura 13