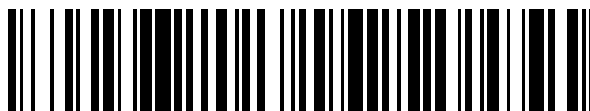


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 575 224**

51 Int. Cl.:

C07K 17/14 (2006.01)

C07K 17/10 (2006.01)

C12N 11/00 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.07.2011 E 11745945 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.03.2016 EP 2598884**

54 Título: **Inmovilización covalente de moléculas que comprenden un grupo amino**

30 Prioridad:

27.07.2010 US 368076 P
27.07.2010 SE 1050833

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.06.2016

73 Titular/es:

LAB-ON-A-BEAD AB (100.0%)
Toftebergsvägen 7
442 75 Lycke, SE

72 Inventor/es:

OSCARSSON, SVEN;
ERIKSSON, KRISTOFER y
NYHOLM, LEIF

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 575 224 T3

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

Descripción

Inmovilización covalente de moléculas que comprenden un grupo amino

Campo técnico

5 La presente invención se refiere en general a la inmovilización covalente de moléculas que comprenden al menos un grupo amino.

Antecedentes

10 Las técnicas para la inmovilización covalente de moléculas sobre superficies son de importancia crucial en la ciencia de las superficies. Por ejemplo enzimas inmovilizadas poseen muchas ventajas que incluyen que ninguna o sólo una cantidad extremadamente pequeña de enzima inmovilizada se disuelve en la reacción. Al finalizar, las mezclas de reacción típicamente contienen sólo el disolvente y los productos de reacción. La enzima inmovilizada se elimina fácilmente de la reacción facilitando el reciclado.

15 Los ejemplos incluyen pero no se limitan a áreas tales como la catálisis, los biosensores, la impresión por microcontacto, la cromatografía, y los dispositivos analíticos. Hoy en día se encuentran disponibles varias técnicas de inmovilización, por ejemplo basadas en la química de silanol, química clic, y un método utilizado comúnmente para la inmovilización de biomoléculas, el llamado método de NHS (N-hidroxisuccinimida). Los inconvenientes para todas esas técnicas incluyen enlaces inestables entre las moléculas inmovilizadas y la superficie, productos químicos tóxicos costosos o un requisito previo para disolventes orgánicos durante la introducción de estructuras reactivas sobre las superficies.

20 La técnica más utilizada hoy en día es la llamada técnica de acoplamiento NHS (N-hidroxisuccinimida). Una de las varias desventajas con esta técnica ha sido descrita por ejemplo por Wilchek. De acuerdo con este último autor, se sabe que este método produce enlaces inestables especialmente para moléculas ancladas en un solo punto. Se ha informado, p. ej., de que 50% de la alanina inmovilizada por este método se puede perder en 40 días (Cuatrecasas et al. en Biochemistry, vol. 11, pág. 2291,1972). De acuerdo con Wilchek et al. en Biochemistry, vol. 26, pág. 2155, 1987 el procedimiento convencional para preparar ésteres de NHS (es decir, N-hidroxisuccinimida y carbodiimidias) conduce a la formación de compuestos inmovilizados inestables sobre polímeros que contienen también grupos hidroxilo. Este fenómeno es debido a la formación de un derivado de p-alanina que se une al polímero que contiene hidroxilo, dando como resultado un enlace inestable.

30 Otras desventajas de la técnica NHS incluyen que el enlace éster que se utiliza para la inmovilización covalente de moléculas tales como alanina o IgG competirá con la hidrólisis del éster en medios acuosos y que se deben utilizar condiciones anhidras en algunas etapas para la preparación de este último enlace éster que implica el uso de dioxano. La etapa 1 de este procedimiento es la inmovilización de una diamina (3',3-diaminodipropilcarbodiimida) a la matriz, seguida en la etapa 2, por un intenso lavado con dioxano para ser capaz de crear condiciones anhidras para la siguiente etapa 3. En la etapa 3, se añade N-hidroxisuccinimida, junto con la matriz y la 3',3-diaminodipropilamina que reacciona con el grupo amino introducido sobre la superficie en dioxano.

35 Existen alternativas al método NHS, pero las condiciones de reacción implican el uso de disolventes orgánicos y productos químicos costosos.

Pavlovic et al. utilizaron la impresión por electrocontacto para inmovilizar proteínas en los patrones sobre una superficie plana de silicio tiolado, por oxidación selectiva del sitio de tioles a tiolsulfatos (Nanoletters vol. 3, Núm. 6, 779-781, 2003).

40 El documento WO 2009/074692 describe un método para derivatizar parcialmente una superficie curva que comprende la electro-oxidación.

Compendio

45 Un objeto de la presente invención consiste en aliviar al menos algunos de los inconvenientes de la técnica anterior y proporcionar un método mejorado para la inmovilización de moléculas que comprenden al menos un grupo amino y proporcionar objetos que comprenden tales moléculas inmovilizadas.

En un primer aspecto, se proporciona un método para la inmovilización covalente de al menos una molécula que comprende al menos un grupo amino, comprendiendo dicho método las etapas sucesivas de:

- a. proporcionar una superficie que comprende grupos -SH,
- b. oxidar la superficie que comprende los grupos -SH por medio de reacciones rédox en presencia de al menos un ion de metal noble, para obtener agrupaciones de iones de metales nobles reactivos con azufre,

c. poner en contacto la superficie con al menos una molécula que comprende al menos un grupo amino para obtener la unión covalente de al menos una molécula a la superficie, en donde dicho al menos un grupo amino está involucrado en la obtención de dicho enlace covalente con la agrupación de iones de metales nobles-azufre.

5 En un segundo aspecto, se proporciona un objeto que comprende al menos una superficie, en donde al menos una molécula que comprende al menos un grupo amino se une covalentemente a la superficie, en donde al menos una molécula se inmoviliza sobre la superficie por medio del método anterior.

Los autores de la presente invención han llevado a cabo una amplia investigación y han encontrado que los grupos que se forman por reacciones redox que implican grupos tiol sobre una superficie en presencia de iones de metales nobles tales como iones Au o iones Pt dan como resultado la formación de agrupaciones de azufre-Au o agrupaciones azufre-Pt que son reactivas en la siguiente etapa con los tioles y los grupos amino de las moléculas.

10 Las ventajas de la invención incluyen el hecho de que es una técnica más versátil para la inmovilización de moléculas puesto que la etapa adicional de introducir grupos tiol en la molécula se puede eliminar y todas las etapas de reacción se puede llevar a cabo en solución acuosa.

15 Una ventaja adicional es que todas las etapas se pueden llevar a cabo a la temperatura ambiente (aproximadamente 20-25°C).

Otra ventaja es que los enlaces covalentes formados durante las reacciones redox que afectan a los grupos de la superficie y los grupos amino son estables, incluso para moléculas ancladas en un solo punto.

20 Otra ventaja más es que el método se puede llevar a cabo con muy pocas etapas. Si los grupos tiol están disponibles sobre la superficie desde el principio, el procedimiento es un procedimiento de una única etapa. El método es más fácil de realizar en comparación con los métodos de acuerdo con la técnica anterior.

Sin embargo, una ventaja adicional es que los productos químicos utilizados son menos costosos y menos tóxicos en comparación con los de la técnica anterior.

El procedimiento redox es rápido, lo que lleva a la formación de nano-agrupaciones en cuestión de segundos.

25 **Breve descripción de los dibujos**

La invención se describe con referencia a los siguientes dibujos en los que:

La Figura 1 muestra una realización en la que las moléculas que contienen -SH sobre una superficie son electro-oxidadas.

30 La figura 2 muestra una configuración utilizada en una realización para la electro-oxidación de cuentas magnéticas. Las cuentas magnéticas son atraídas por el electrodo de trabajo (W) mediante el uso de un imán permanente montado debajo del electrodo. Se aplica un potencial entre el electrodo de trabajo y el electrodo de referencia (R) empleando un potencióstato, que también mide la corriente entre el electrodo de trabajo y el contraelectrodo (C).

Descripción detallada

35 Antes de dar a conocer y describir la invención en detalle, se debe entender que esta invención no se limita a los compuestos, configuraciones, etapas del método, sustratos, y materiales concretos descritos en la presente memoria ya que tales compuestos, configuraciones, etapas del método, sustratos, y materiales pueden variar algo. Se debe entender también que la terminología empleada en la presente memoria se utiliza con el propósito de describir realizaciones concretas y no se pretende que sea limitante ya que el alcance de la presente invención está limitado sólo por las reivindicaciones adjuntas.

Hay que señalar que, como se utiliza en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "uno", "una" y "el" y "la" incluyen los referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

45 Si no se define nada más, los términos y terminología científicos utilizados en la presente memoria están destinados a tener los significados comúnmente entendidos por los expertos en la técnica a la que pertenece esta invención.

El término "aproximadamente" según se utiliza en relación con un valor numérico a lo largo de la descripción y las reivindicaciones, indica un intervalo de precisión, conocido y aceptado por un experto en la técnica. Dicho intervalo es de $\pm 10\%$.

50 Según se utiliza a lo largo de las reivindicaciones y de la descripción, el término "inmovilización" en relación con las moléculas indica la unión a un material. La presente invención tiene que ver con la unión covalente de las moléculas a un material base.

Según se utiliza a lo largo de las reivindicaciones y de la descripción, el término "electro-oxidación" se refiere a la oxidación por un potencial eléctrico o corriente aplicados externos.

5 Se proporciona un método para la inmovilización de al menos una molécula que comprende al menos un grupo amino, comprendiendo dicho método las etapas sucesivas de: a) proporcionar una superficie que comprende grupos -SH, b) oxidar la superficie que comprende los grupos -SH en presencia de iones de metales nobles tales como iones Au o iones Pt a una superficie que comprenden grupos SH y c) poner en contacto la superficie con al menos una molécula que comprende al menos un grupo amino para obtener una unión covalente de la al menos una molécula a la superficie, en donde dicho al menos un grupo amino está involucrado en la obtención de dicho enlace covalente.

10 En una realización, se utiliza una superficie que comprende grupos -SH como punto de partida y en una realización alternativa los grupos -SH se introducen sobre la superficie.

En una realización, la oxidación comprende electro-oxidación.

15 Después de la oxidación, la superficie se pone en contacto con al menos una molécula que comprende al menos un grupo amino. De esta manera el grupo amino de la al menos una molécula reacciona y forma un enlace covalente con la superficie de modo que la al menos una molécula se une covalentemente a la superficie.

20 En una segunda realización, se utiliza una superficie que comprende grupos -SH como punto de partida y en una realización alternativa se introducen grupos -SH sobre la superficie. La superficie se somete a continuación al tratamiento con electro-oxidación. Después de la electro-oxidación la superficie se pone en contacto con al menos una molécula que comprende al menos un grupo amino. De esta manera el grupo amino de al menos una molécula reacciona y forma un enlace covalente con la superficie de modo que la al menos una molécula se une covalentemente a la superficie.

Sin desear estar ligado a ninguna teoría científica particular, los autores de la presente invención creen que las reacciones redox en presencia de iones de metales nobles, tales como iones de oro o de platino oxidan los tioles a disulfuros sobre la superficie durante la formación de, p. ej., nanoagrupaciones de Au-azufre.

25 En una realización, al menos una fracción de los grupos -SH se hace reaccionar entre sí antes de la etapa de oxidación de la superficie. En una realización, al menos una fracción de los grupos -SH se hace reaccionar para producir enlaces -S-S-.

30 En una realización, esencialmente todos los grupos -SH se hacen reaccionar entre sí antes de la etapa de oxidación de la superficie. Por esencialmente todo se entiende que se hace reaccionar al menos 99% del número de moléculas, preferiblemente más de 99,9%.

35 En una realización que no forma parte de la invención la al menos una molécula que comprende al menos un grupo amino es al menos una molécula seleccionada del grupo que consiste en moléculas que comprenden al menos un átomo de carbono, un aminoácido, un péptido, una proteína, un anticuerpo, un aptámero, un virus, un fragmento de virus, una bacteria, un fragmento bacteriano, una célula, y un fragmento de célula. En una realización, la al menos una molécula que comprende al menos un grupo amino es al menos una molécula seleccionada del grupo que consiste en una proteína, y un anticuerpo.

En una realización la reacción redox se lleva a cabo en una solución acuosa. En una realización, la electro-oxidación se lleva a cabo en una mezcla de disolventes.

40 En una realización la etapa de poner en contacto la superficie con al menos una molécula que comprende al menos un grupo amino se realiza en una solución acuosa. En una realización la etapa de poner en contacto la superficie con al menos una molécula que comprende al menos un grupo amino se lleva a cabo en una mezcla de disolventes.

45 En una realización el método se lleva a cabo a una temperatura de 15°C a 30°C. En una realización alternativa, el método se lleva a cabo a una temperatura ambiente de aproximadamente 20°C a 25°C. En otra realización más, el método se lleva a cabo a una temperatura de 5°C a 45°C. En una realización alternativa que no comprende biomoléculas sensibles a la temperatura, el método se lleva a cabo a una temperatura de hasta varios cientos de grados. En una realización el método se lleva a cabo a una temperatura de 15°C a 300°C.

50 En una realización en la que se utiliza la electro-oxidación, la electro-oxidación se lleva a cabo utilizando un potencial de 0,5 a 3 V en relación con un electrodo de platino convencional como electrodo de referencia. En una realización, la electro-oxidación se lleva a cabo utilizando un potencial de 0,1 a 5 V. En una realización, la electro-oxidación se lleva a cabo utilizando un potencial de 0,5 a 2 V. En otra realización, la electro-oxidación se lleva a cabo utilizando un potencial de 0,5 a 1,5 V. En una realización, la electro-oxidación se lleva a cabo durante un período de tiempo de 1 segundo a 10 minutos. En una realización alternativa, la electro-oxidación se lleva a cabo durante un período de tiempo de 0,1 segundos a 10 horas.

En una realización en la que se utiliza la electro-oxidación, la configuración de electro-oxidación comprende un

- electrodo de trabajo y un contraelectrodo. Opcionalmente, la configuración comprende adicionalmente un electrodo de referencia adaptado para medir el potencial eléctrico del electrodo de trabajo. En una realización, al menos uno de los electrodos está recubierto con oro. En una realización, al menos uno de los electrodos está adaptado para girar en la solución durante la electro-oxidación. En una realización, se construye una celda de fluido para obtener una gran área de superficie del electrodo de trabajo, en la que se lleva a cabo la electro-oxidación.
- 5 En una realización la puesta en contacto de la superficie con al menos una molécula que comprende al menos un grupo amino se lleva a cabo durante un período de tiempo de 10 minutos a 10 horas. En una realización alternativa, la electro-oxidación se lleva a cabo durante un período de tiempo de 0,1 segundos a 72 horas.
- 10 En una realización, la superficie se somete a derivatización para obtener grupos funcionales sobre la superficie, los grupos funcionales que finalmente se obtienen sobre la superficie después de la derivatización se seleccionan entre grupos -SH y grupos -SS-. Preferiblemente, la superficie se somete a derivatización antes de la electro-oxidación.
- En una realización se utiliza un tampón de acetato de Na con un pH de 4-5.
- 15 En un segundo aspecto, se proporciona un objeto que comprende al menos una superficie, en donde al menos una molécula que comprende al menos un grupo amino se une covalentemente a la superficie, en donde la al menos una molécula se inmoviliza sobre la superficie por medio del método descrito anteriormente.
- En una realización el objeto es una partícula. En una realización el objeto es un sensor. En una realización el objeto es un medio de separación cromatográfica. En una realización el objeto es un biomaterial. En una realización el objeto es un material de reparación para un diente. En una realización el objeto es un objeto adecuado para fines de diagnóstico.
- 20 En una realización en la que el objeto es un material de reparación para un diente, una superficie comprende tioles y es localmente electro-oxidada, mientras que la otra superficie comprende grupos amino.
- En una realización, el método se utiliza como un pegamento para unir una superficie que comprende tioles que están oxidados y una superficie que comprende grupos amino. En una realización el objeto comprende al menos una superficie que comprende grupos tiol oxidados unida con al menos una superficie que comprende grupos amino.
- 25 En una realización se utiliza el método para la impresión por micro-contacto y la fabricación de microchips para matrices de proteínas.
- También se proporciona el uso de una reacción redox para modificar una superficie que comprende grupos -SH en presencia de iones de metales nobles para la posterior unión covalente de al menos una molécula que comprende al menos un grupo amino.
- 30 Se proporciona adicionalmente la utilización de al menos una superficie unida a una agrupación de Au-S elaborada por medio de una reacción redox en presencia de iones de metales nobles para inmovilizar una molécula que comprende al menos un grupo amino.

Ejemplos

Ejemplo 1

35 Micromer -M PEG -NH₂

- En estas investigaciones se utilizaron partículas Micromer® -M (Micromod Partikeltechnologie GmbH) monodispersas disponibles en el mercado. Cada partícula consiste en un núcleo de nanopartículas de maghemita (γ -Fe₂O₃) incluido en una matriz copolimérica de estireno-ácido maleico con un recubrimiento de superficie que consiste en poli(metacrilato-ácido co-metacrílico) entrecruzado modificado con polietilenglicol bifuncional con funcionalidad amino (-NH-(CH₂-O-CH₂)₂₀₀-NH₂). Las cuentas tenían un diámetro medio de 4,9 μ m con una desviación típica de 0,2 μ m. Estas se dispersaron en agua con una concentración de 7 x 10⁸ partículas/ml y con un contenido de material magnético de 50 mg/ml. El grado de sustitución fue de 5-6 nmoles de grupos NH₂ por mg o 2,2 x 10⁸ grupos NH₂ por partícula, de acuerdo con el fabricante.
- 40

Introducción de SS-piridilo en Micromer -M PEG-NH₂

- 45 Se lavó tres veces Micromer® -M PEG-NH₂ (100 μ L, 7 x 10⁸ partículas/mL) en 1000 μ L de PBS (fosfato 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 10 mM, pH 7,4) y se resuspendió en 1000 μ L de PBS. Se añadió 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP) (25 μ L, 20 mM en DMSO) a la suspensión de cuentas y se hizo reaccionar durante 90 minutos. Las cuentas se lavaron cinco veces con 1000 μ L de PBS, se resuspendieron en 1000 μ L de PBS y se mantuvieron a 4°C.

50 Determinación de la razón de SS-piridilo/partícula

Se mezcló Micromer -M PEG-SS-piridilo (100 μ L, 7 x 10⁷ partículas) con 1000 μ L de ditiotreitól (DTT) en PBS que

5 contenía 2% p/v de DTT y se incubó a la temperatura ambiente durante 20 min. Las partículas se recogieron con un imán y el sobrenadante se utilizó adicionalmente en los análisis espectrofotométricos del contenido de SS-piridilo (Fig. 2) determinados por medio de espectrofotometría, utilizando un espectrofotómetro Shimadzu (Kyoto, Japón) UV-2101 PC y cubetas de cuarzo, a una longitud de onda de 343 nm ($\epsilon = 8080 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Se anclaron a cada partícula aproximadamente $1,0 \times 10^8$ grupos SS-piridilo.

Preparación de Micromer -M PEG-SH

10 Inmediatamente antes de la electro-oxidación, se recogieron las partículas de Micromer -M PEG-SS-piridilo en 1000 μL de suspensión (7×10^7 partículas/ml) con un imán externo y el tampón se cambió a 1000 μL de ditioneitol (DTT) en tampón de acetato (pH 4,5, DTT al 2% p/v) y se incubó a la temperatura ambiente durante 20 min. Las cuentas se lavaron cinco veces con PBS (fosfato 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4), se resuspendieron en 80 ml de PBS a una concentración final de $8,75 \times 10^6$ partículas/ml y se mantuvieron a la temperatura ambiente.

Preparación de partículas de agarosa - SH

15 Se lavó Sefarosa 6B con agua destilada sobre un filtro de vidrio y se secó por succión. Se suspendieron 3 g de partículas secas de gel en 2,4 ml de solución de hidróxido sódico 1 M y se añadió epíclorhidrina 0,45 ml gota a gota con agitación a la temperatura ambiente. La temperatura se aumentó a 60°C y se mantuvo durante 2 horas. El gel de sefarosa se lavó con agua destilada hasta la neutralidad sobre un filtro de vidrio. Adicionalmente, el gel activado con epóxido (3 g) se lavó sobre el filtro de vidrio con 50 ml de tampón de fosfato 0,5 M pH 6,3 y se secó por succión. El gel se resuspendió en tampón de fosfato (6 ml). Se añadieron 3 ml de tiosulfato de sodio 2 M y la mezcla se sacudió durante 6 horas a la temperatura ambiente. El tiosulfato de sodio en exceso se lavó fuera del gel de éster de tiosulfato con agua destilada. Con el fin de preparar un gel tiolado se redujo el gel de éster de tiosulfato con ditioneitol (DTT). Se lavó 1 g del gel de éster de tiosulfato sobre un filtro de vidrio y se suspendió en 3 ml de solución de bicarbonato de sodio 0,1 M. Se añadieron 0,1 g de DTT en 2 ml de EDTA (1 mM) y el gel de éster se redujo durante 30 minutos. El gel reducido se lavó con 30 ml de solución de bicarbonato de sodio 0,1 M (cloruro de sodio 1 M y EDTA 1 mM) y finalmente con 100 ml de solución de EDTA 1 mM. Las partículas de Sefarosa 6B tioladas se suspendieron en tampón de fosfato de sodio 10 mM.

Ajuste experimental para la electro-oxidación

30 La celda de reacción utilizada para la electro-oxidación de las partículas consistió en un cilindro de teflón montado sobre la parte superior de una placa de oro. Se aplicó un campo magnético vertical mediante el uso de un imán permanente montado debajo de la placa de oro (350 mT en la superficie interior de la placa de oro). Los contraelectrodos y los electrodos de referencia se montaron dentro de la celda de reacción y la placa de oro que actuaba como electrodo de trabajo se conectó fuera de la celda de reacción (véase la Fig. 2)

Electro-oxidación de tioles sobre las partículas

35 Antes de los experimentos, la celda de reacción y el electrodo de trabajo se limpiaron en una mezcla de 7,5 ml de peróxido de hidrógeno al 30% (p/v) de (Merck Inc., calidad P.A.) y 15 ml de ácido sulfúrico (calidad P.A.), seguido de aclarado con agua. A continuación se añadieron partículas tioladas, partículas magnéticas 0,75 mg o 0,25 mg o 2-6 mg de partículas de agarosa, en 3 ml de PBS a la celda de reacción. Se permitió que las partículas se distribuyeran sobre la superficie de oro por las fuerzas de gravedad (partículas de agarosa) y el campo magnético (partículas magnéticas) durante 5 min. Se aplicaron potenciales que abarcaban de 0,45 a 0,90 V frente al electrodo de referencia de Ag/AgCl durante 1 s. Entre las diferentes oxidaciones de cuentas tioladas los contraelectrodos de trabajo y los electrodos de referencia se lavaron con PBS. Después de eso las partículas se resuspendieron y se redujo el volumen a 200 μL mediante la recogida de partículas magnéticas con un imán permanente y de las partículas de agarosa por medio de centrifugación. Antes de las mediciones, se registró un voltamograma cíclico (-0,2 a +1,5 V, 50 mV/s) en la solución de PBS en ausencia de partículas para verificar que el electrodo de trabajo de oro estaba funcionando correctamente.

45 Conjugación de biomoléculas a partículas electro-oxidadas

50 La suspensión de partículas procedentes de los experimentos de electro-oxidación se mezcló con 100 μL de biomoléculas (IgG, β -alanina, α -lactoalbúmina, α -lactoalbúmina (FITC) y proteína A) (2 mg/ml en PBS) y se incubó durante 40 minutos. Las biomoléculas no unidas se eliminaron por lavado de las partículas en aproximadamente 10 ml de PBS. Las reacciones se evaluaron con respecto al grado de fluorescencia de la superficie de la partícula y con el análisis de aminoácidos. La fluorescencia se evaluó con un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse equipado con una cámara Nikon Coolpix. El filtro de fluorescencia se sintonizó para proporcionar una longitud de onda de excitación de 494 nm y una longitud de onda de emisión de 520 nm. Los análisis de aminoácidos se llevaron a cabo de acuerdo con una versión mejorada del método clásico desarrollado por Spackman, Stein y Moore, por medio del cual la eliminación de amoniaco mediante el uso de filtros especiales permite la separación de todos los aminoácidos en una columna PEEK de alta resolución de 4,6 x 200 mm con resina Ultrapac 8 (Biachrome). Se detectó la cantidad de aminoácidos a dos longitudes de onda diferentes, 440 nm y 570 nm, mediante el uso de los aparatos analíticos Biachrome 20 y Biachrome 30. El límite de detección es de 25-50 pmoles y el límite de cuantificación es de 50-100

pmoles. Se añadieron 2 ml de HCl 6 M (que contenía un patrón interno) a un volumen fijo de suspensión de partículas de peso conocido, que después se hidrolizó a 100°C durante 24 h. Las partículas de agarosa se liofilizaron antes del análisis de aminoácidos.

Ejemplo 2

5 Estudio de diferente potencial durante la electro-oxidación

Las moléculas inmovilizadas se distribuyeron homogéneamente por toda la superficie de la cuenta investigada mediante el uso de moléculas marcadas con FITC. La capacidad para unirse a las moléculas depende del voltaje aplicado durante la etapa de electro-oxidación (véase la Tabla 1a) con una adsorción inespecífica de las moléculas a voltaje cero y un máximo a un voltaje de 0,9 V. Los resultados mostrados en la Tabla 1 indican que es posible regular el grado de sustitución de las moléculas sobre las partículas, tanto por el voltaje aplicado como por la concentración de partículas. Se investigó la capacidad de unión de las biomoléculas sobre agarosa (Sephacrose 6B) y se encontró que era de 29,4 mg de IgG por g de agarosa liofilizada.

Tabla 1a:

Potencial, V	Masa de partículas (mg)	biomolécula	Capacidad mg/partícula
0,9	0,75	IgG	3,5
0,75	0,75	IgG	2,2
0,45	0,75	IgG	1,8

15 La capacidad de unión de α -lactoalbúmina a agarosa se investigó para diferentes voltajes. La electrooxidación se llevó a cabo durante 60 segundos. Se realizó un análisis de aminoácidos para calcular la cantidad de α -lactoalbúmina unida. Véanse los resultados en la Tabla 1b.

Tabla 1b:

Potencial, V	Masa en mg de α -lactoalbúmina por peso en g de agarosa seca	biomolécula
0	1,23 mg / g	α -lactoalbúmina
0,5	0,91 mg / g	α -lactoalbúmina
1,0	51,96 mg / g	α -lactoalbúmina
1,5	28,7 mg / g	α -lactoalbúmina
2,0	26,0 mg / g	α -lactoalbúmina

20 Ejemplo 3

Estudios de estabilidad

Con el fin de investigar la estabilidad de los enlaces entre la superficie y la biomolécula inmovilizada, se inmovilizaron IgG y β -alanina a partículas magnéticas sometidas a electro-oxidación. Las partículas se lavaron exhaustivamente con un gran exceso de solución salina tamponada con fosfato a pH 7,2 durante horas y los análisis de aminoácidos se llevaron a cabo antes y después de este extenso procedimiento de lavado.

La estabilidad para la IgG y la β -alanina inmovilizadas sobre las partículas magnéticas después de un lavado

exhaustivo es de 100% y 75% respectivamente, véase la Tabla 2a.

5 La estabilidad del complejo de azufre reactivo/Au sobre la superficie de las partículas magnéticas fue investigada mediante el almacenamiento de las partículas recién electro-oxidadas durante 30 días en dioxano y etanol (50% v/v en agua destilada) antes del anclaje de IgG, véase la Tabla 2b. Las estructuras reactivas formadas en la electro-oxidación muestran una estabilidad de 66% y 42% respectivamente.

10 Investigación de la estabilidad del complejo de azufre/Au reactivo sobre agarosa formado durante la electro-oxidación. La agarosa se sometió a electro-oxidación a 1,0 V durante 60 s. La mitad de la agarosa se hizo reaccionar con α -lactoalbúmina, como una muestra de referencia, y la otra mitad se almacenó en tampón de acetato a pH 5. Después de 40 días se retiró el tampón de acetato y se añadió α -lactoalbúmina. Los análisis de aminoácidos se realizaron en ambas muestras. La muestra de referencia obtuvo 31 mg de α -lactoalbúmina por g de agarosa seca mientras que las partículas de agarosa almacenadas en tampón de acetato obtuvieron 27 mg de α -lactoalbúmina por g de agarosa seca. Por lo tanto, la reactividad del complejo de azufre/Au fue de 88% después del almacenamiento en tampón de acetato.

15 Tabla 2a y 2b. A parte superior, estabilidad de los enlaces para IgG y β -alanina inmovilizadas a partículas magnéticas electro-oxidadas. B parte inferior, estabilidad de las estructuras reactivas en la superficie de las partículas en dioxano y etanol al 50% antes del anclaje de IgG.

Potencial, V	Masa de partículas, mg	biomolécula	lavado con PBS, ml	Capacidad mg/partícula	Estabilidad %
0,9	0,75	IgG	10	3,6	100
0,9	0,75	IgG	50	3,6	100
0,9	0,75	β -alanina	10	0,8	100
0,9	0,75	β -alanina	50	0,6	75
Potencial, V	Masa de partículas, mg	Medios de almacenamiento	Días	Capacidad mg/partícula	Estabilidad %
0,9	0,25	PBS	0	7,4	100
0,9	0,25	Dioxano	30	4,9	66
0,9	0,25	Etanol del 50% en peso	30	3,1	42

Ejemplo 4

Estudios de estabilidad a pH bajo

20 Con el fin de investigar la estabilidad a pH bajo de las proteínas inmovilizadas a agarosa electroquímicamente oxidada, se inmovilizaron satisfactoriamente proteína A e IgG como se ha descrito anteriormente. Después de eso, las partículas de agarosa-proteína se trataron con tampón de glicina, pH 3 durante 20 minutos. Como se muestra en la Tabla 3 la unión entre la proteína A inmovilizada y la IgG fue estable durante al menos 20 minutos a pH 3. Se puede concluir que las moléculas inmovilizadas son estables a pH bajo.

25 Tabla 3. IgG y proteína A inmovilizadas sobre partículas de tiol-agarosa electro-oxidadas para la investigación de la estabilidad de los enlaces entre la proteína A y la agarosa a pH 3.

Potencial, V	Masa de agarosa, mg	biomolécula	Capacidad mg/partícula
0,9	2,01	IgG	29,4

Potencial, V	Masa de agarosa, mg	biomolécula	Capacidad mg/partícula
0,9	2,01	Proteína A	3,2
0,9	2,01	Proteína A lavada con tampón de glicina pH 3 durante 20 minutos	7,8

Ejemplo 5

Comparación entre la oxidación química y la electro-oxidación de partículas de agarosa-SH

5 **Oxidación química con peróxido de hidrógeno.** Se oxidaron 2 mg de partículas de agarosa tiolada en 2 ml de H₂O₂ al 3,5% en tampón de acetato pH 5 durante 20 horas. Después de la oxidación las partículas se lavaron sobre un filtro de vidrio con 10 ml de PBS. Las biomoléculas, 500 µl de α-lactoalbúmina (FITC) (2 mg/ml en PBS) se añadieron a las partículas de agarosa - SH oxidadas. Se evaluó la reacción después de 40 minutos y después de 24 horas con respecto al grado de fluorescencia de la superficie de la partícula. Después de 40 minutos no se encontró ninguna fluorescencia. Después de 24 horas, apareció en la superficie de la partícula una fluorescencia débil, que era visible en el microscopio de fluorescencia con un aumento de 200 veces. En comparación con las partículas de agarosa - SH electro-oxidadas, donde la fluorescencia de la α-lactoalbúmina (FITC) es visible a simple vista después de 40 minutos, esta no es una técnica eficiente para la inmovilización de biomoléculas nativas sobre partículas de agarosa.

15 **Oxidación química con peróxido de hidrógeno y cloruro de oro (III).** Se oxidaron 8 mg de partículas de agarosa tiolada en 10 ml de H₂O₂ al 3,5% en tampón de acetato a pH 5 durante 12 horas. Después de la oxidación, las partículas se lavaron sobre un filtro de vidrio con 50 ml de PBS. Las partículas se mezclaron a continuación con una solución de 10 ml de cloruro de oro (III) (8 mM en PBS) durante 2 minutos. Las partículas se lavaron sobre un filtro de vidrio con 100 ml de PBS y a continuación se mezclaron con las biomoléculas, 500 µl de α-lactoalbúmina (FITC) (2 mg/ml en PBS) durante 40 minutos. A continuación, las partículas se lavaron de nuevo en un filtro de vidrio con 50 ml de PBS. Las partículas muestran una fuerte fluorescencia homogénea que indica que las biomoléculas se inmovilizan con éxito sobre las partículas de agarosa.

25 **Oxidación química con cloruro de oro (III).** Se mezclaron 8 mg de partículas de agarosa tiolada con una solución de 10 ml de cloruro de oro (III) (8 mM en PBS) durante 2 minutos. Las partículas se lavaron sobre un filtro de vidrio con 100 ml de PBS y a continuación se mezclaron con las biomoléculas, 500 µl de α-lactoalbúmina (FITC) (2 mg/ml en PBS) durante 40 minutos. A continuación, las partículas se lavaron de nuevo sobre un filtro de vidrio con 50 ml de PBS. Las partículas muestran una fuerte fluorescencia homogénea que indica que las biomoléculas se inmovilizan con éxito sobre las partículas de agarosa.

30 **Tabla 4.** Muestra el contenido de oro, después de diferentes procedimientos de oxidación, y α-lactoalbúmina (FITC) (LALBA) después de la inmovilización de las biomoléculas sobre las partículas de agarosa - SH oxidadas. e.Ox es la electro-oxidación como se describió anteriormente durante 60 segundos a 1,0 voltios, C.Ox Agarosa (AuCl₃) es la oxidación química con cloruro de oro (III) y C.Ox Agarosa (H₂O₂/AuCl₃) es la oxidación química con peróxido de hidrógeno y cloruro de oro (III). Se oxidan 8 mg de partículas de agarosa - SH en todos los casos. El contenido de oro se mide con ICP y el contenido de LALBA se determina con el análisis de aminoácidos.

Muestra	µg Au	µmoles Au	µg LALBA	nmoles LALBA
e.Ox Agarosa-SH	80,3	0,407614	176	12,57143
C.Ox Agarosa (AuCl ₃)	729,7	3,704061	296,8	21,2
C.Ox Agarosa	372,3	1,889848	218,1	15,57857

ES 2 575 224 T3

Muestra	µg Au	µmoles Au	µg LALBA	nmoles LALBA
(H2O2/AuCl3)				

REIVINDICACIONES

1. Un método para la inmovilización covalente de al menos una molécula que comprende al menos un grupo amino, comprendiendo dicho método las etapas sucesivas de:
- a. proporcionar una superficie que comprende grupos -SH,
 - 5 b. oxidar la superficie que comprende grupos -SH por medio de reacciones rédox en presencia de al menos un ion de metal noble, para obtener agrupaciones de iones de metales nobles reactivos con azufre,
 - c. poner en contacto la superficie con al menos una molécula que comprende al menos un grupo amino para obtener la unión covalente de la al menos una molécula a la superficie, en donde dicho al menos un grupo amino está involucrado en la obtención de dicho enlace covalente con la agrupación de ión de metal noble-azufre.
- 10
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el al menos un ion de metal noble se selecciona del grupo que consiste en Au y Pt.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en donde al menos una fracción de los grupos -SH se hace reaccionar entre sí antes de la etapa de oxidación de la superficie utilizando reacciones rédox.
- 15
4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la al menos una molécula que comprende al menos un grupo amino es al menos una molécula seleccionada del grupo que consiste en una proteína, y un anticuerpo.
5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde dicha reacción rédox comprende electrooxidación, y en donde la electro-oxidación se lleva a cabo utilizando un potencial de 0,5 a 3 V.
- 20
6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde dicha reacción rédox comprende electrooxidación, y en donde la electro-oxidación se lleva a cabo durante un período de tiempo de 1 segundo a 10 minutos.
7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde la superficie se somete a derivatización para obtener grupos funcionales sobre la superficie, en donde los grupos funcionales se seleccionan del grupo que consiste en grupos -SH y grupos -SS-.
- 25
8. Un objeto que comprende al menos una superficie, en donde al menos una molécula que comprende al menos un grupo amino se une covalentemente a la superficie, en donde la al menos una molécula se inmoviliza sobre la superficie por el método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7.
9. El objeto de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el objeto es un sensor.
- 30
10. El objeto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8-9, en donde el objeto es un medio de separación cromatográfica.
11. El objeto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8-10, en donde el objeto es un biomaterial.
12. El objeto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8-11, en donde al menos una superficie que comprende grupos tiol oxidados se une con al menos una superficie que comprende grupos amino.
- 35
13. El objeto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8-12, en donde la al menos una molécula que comprende al menos un grupo amino es al menos una molécula seleccionada del grupo que consiste en una proteína, y un anticuerpo.

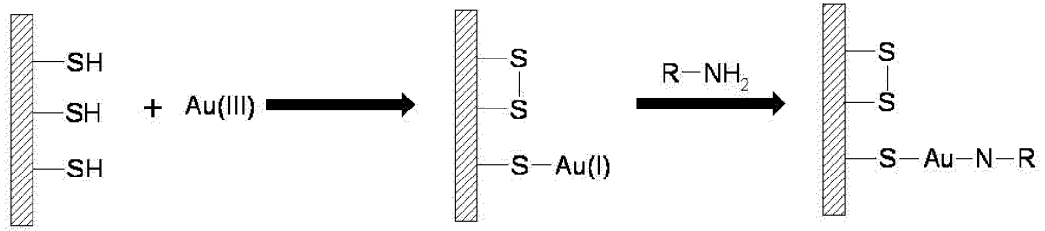


Fig 1

Fig. 2

