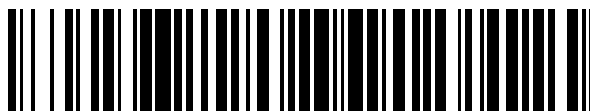


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 756 601**

51 Int. Cl.:

G01N 33/543 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.01.2015 PCT/SE2015/050108**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.08.2015 WO15115993**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.01.2015 E 15709372 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2019 EP 3100050**

54 Título: **Proteínas inmovilizadas y uso de las mismas**

30 Prioridad:

31.01.2014 SE 1450105
02.07.2014 SE 1450822

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.04.2020

73 Titular/es:

ENGINZYME AB (100.0%)
Tomtebodavägen 6
171 65 Solna, SE

72 Inventor/es:

CASSIMJEE, KARIM ENGELMARK y
BÄCKVALL, JAN-ERLING

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 756 601 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

Proteínas inmovilizadas y uso de las mismas

5 **Campo técnico**

La invención se refiere a un material proteico inmovilizado que comprende una proteína que se inmoviliza sobre un material de vidrio mediante unión por etiqueta de afinidad. El material de vidrio es un material de vidrio poroso tal como vidrio de porosidad controlada (híbrido). La invención también se refiere al uso de un material enzimático inmovilizado como biocatalizador heterogéneo en síntesis química.

Técnica anterior

Las proteínas son moléculas biológicas grandes formadas por una o varias cadenas lineales de residuos de aminoácidos. Las enzimas son un grupo específico de proteínas que sirven como catalizadores biológicos en el metabolismo de todas las células vivas. Como tal, las enzimas pueden transformar moléculas orgánicas en diferentes moléculas. Debido a la estructura tridimensional específica de cada enzima en particular, solo muy pocas moléculas orgánicas interactuarán con el sitio activo de la enzima de tal manera que pueda tener lugar la transformación. Por tanto, las enzimas son habitualmente catalizadores altamente selectivos, y el uso de enzimas como catalizadores en química orgánica sintética es por ese motivo muy atractivo. Sin embargo, dado que las enzimas son moléculas biológicas que han evolucionado para un entorno celular, a menudo no son adecuadas para otros entornos. Cuando se usan en disolventes orgánicos, las enzimas tienden a agregarse y, a menudo, a desplegarse (es decir, desnaturalizarse). Por tanto, resulta interesante inmovilizar enzimas sobre un soporte sólido y usarlas como catalizadores en este estado inmovilizado, ya que esto puede mejorar la estabilidad de la enzima, permitir condiciones de reacción que la enzima normalmente no toleraría y además facilitar la separación de la mezcla de reacción y recuperación del material.

La inmovilización de enzimas sobre un soporte sólido se ha logrado usando diferentes técnicas y diferentes soportes sólidos (Tischer y Wedekind, "Immobilized Enzymes: Methods and Applications", Topics in Current Chemistry, 1999, vol. 200, págs. 95-126; Brena y Batista-Viera, "Immobilization of Enzymes: A Literature Survey", Methods in Biotechnology: Immobilization of Enzymes and Cells, 2006, segunda edición, págs. 15-30).

La adsorción de enzimas a superficies sólidas puede conducir a interacciones no deseadas entre la enzima y el soporte sólido. Se ha demostrado que la adsorción de proteínas sobre nanopartículas de sílice puede conducir a cambios en la estructura secundaria de la proteína, lo que puede dar como resultado la desactivación de la enzima (Lundqvist *et al.*, Langmuir 2004, vol. 20, págs. 10639-10647). Por tanto, es importante que el soporte sólido no interfiera con la estructura y la actividad de las enzimas inmovilizadas.

La cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC) es una técnica para la purificación de proteínas que se basa en la afinidad de proteínas por iones de metal tales como Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} y Co^{2+} . Los iones de metal se inmovilizan sobre un gel de agarosa y pueden adsorber selectivamente proteínas que contienen histidina y cisteína (Porath *et al.*, Nature 1975, vol. 258, págs. 598-599). Una versión mejorada de esta técnica usa proteínas recombinantes que contienen un péptido de polihistidina condensado. Como el péptido de polihistidina tiene una afinidad mucho mayor por los iones de metal inmovilizados que un único residuo de histidina, el nivel de purificación que puede lograrse es mucho mayor (Hochuli *et al.*, Nat. Biotechnol. 1988, vol. 6, págs. 1321-1325; Ljungquist *et al.*, Eur. J. Biochem. 1989, vol. 186, págs. 563-569). Aunque esta técnica puede aplicarse con éxito en procedimientos cromatográficos para la purificación y el aislamiento de proteínas, las enzimas inmovilizadas en gel son menos adecuadas como catalizadores heterogéneos en síntesis orgánica. La técnica de IMAC está limitada además principalmente a condiciones acuosas.

En los intentos de preparar catalizadores heterogéneos, el principio basado en IMAC de unión por etiqueta de afinidad se ha aplicado a la inmovilización de enzimas con etiqueta de polihistidina sobre sílice modificada (Cassimjee *et al.*, Biotechnol. Bioeng. 2008, vol. 99, págs. 712-716; Cassimjee *et al.*, Biotechnol. J. 2011, vol. 6, págs. 463-469). Esto funcionó bien para la lipasa B de *Candida antarctica* (CalB), pero se encontró que otras enzimas menos estables se desactivaron en presencia de sílice, especialmente en presencia de disolventes orgánicos. En la bibliografía se sabe que las nanopartículas de sílice tienen un efecto desestabilizador sobre proteínas (Lundqvist *et al.*, Langmuir 2004, vol. 20, págs. 10639-10647).

El vidrio de porosidad controlada (CPG) es otro material que se ha usado para la inmovilización de enzimas. El CPG se trata habitualmente con 3-aminopropiltrietoxisilano, y después de eso se permite a las enzimas unirse al aminopropil-CPG a través de residuos de lisina presentes sobre la superficie de las enzimas, usando glutaraldehído como agente de reticulación. Esto da como resultado una unión no específica de la enzima al CPG, a menudo con pérdida concomitante de la actividad enzimática. Una desventaja adicional de este método es que la enzima que va a inmovilizarse debe purificarse a partir de otras enzimas antes de la etapa de inmovilización, con el fin de evitar la inmovilización de una mezcla de diferentes enzimas sobre el CPG.

También se ha dado a conocer la inmovilización de enzimas sobre CPG usando organotitanatos (documento US 4.632.904) o usando capas de polisacárido y 1,1'-dicarbonildiimidazol (Rogalski *et al.*, J. Mol. Catal. B: Enzym. 1999, vol. 6, págs. 29-39).

5 Engström *et al.* (Angew. Chem. Int. Ed. 2013, vol. 52, págs. 14006-14010) dan a conocer un catalizador híbrido en el que lipasa B de *Candida antarctica* y una especie de nanopaladio se inmovilizan conjuntamente en los compartimentos de sílice mesoporosa.

10 El documento WO 93/10162 da a conocer partículas de vidrio de poro controlado magnéticas que se recubren con proteína A como matriz de afinidad. Se muestra que el material se une a anticuerpo anti-BSA.

15 Las partículas de vidrio poroso magnéticas que contienen estreptavidina o avidina como matriz de afinidad se comercializan bajo los nombres comerciales MPG® estreptavidina y MPG® avidina, respectivamente, por PureBiotech LCC (Middlesex, NJ, EE.UU.). Las partículas tienen afinidad de unión por la biotina y se usan para la unión de biomoléculas biotiniladas.

Ling *et al.* (Chem. Eur. J. 2014, vol 20, págs. 7916-7921) dan a conocer un material portador de sílice mesoporosa con nanopartículas de NiO para la inmovilización enzimática dirigida al sitio.

20 Chikh *et al.* (Biochim. Biophys. Acta 2002, vol. 1567, págs. 204-212) dan a conocer la unión de proteínas con etiqueta de histidina a portadores basados en lípidos usando lípidos quelantes de iones de metal.

Ryan *et al.* (Talanta 1985, vol 32, n.º 9, págs. 859-863) dan a conocer CPG con un agente quelante inmovilizado sobre el mismo para la retirada y concentración previa de cobre (II) traza.

25 El documento US 6.087.452 da a conocer un tensioactivo quelante de metales, que comprende una superficie porosa con un sistema de inmovilización de etiqueta de polihistidina - de ion quelado.

30 El uso de enzimas como catalizadores en la industria química, es decir biocatálisis, es clave para lograr una mayor sostenibilidad, menos residuos tóxicos y mayor rentabilidad. Sin embargo, los altos costes de las enzimas y la pérdida de actividad observada con frecuencia tras la inmovilización de la enzima sobre un soporte sólido constituyen obstáculos en este desarrollo. Sería muy deseable un procedimiento normalizado y generalmente viable para la inmovilización de enzimas, lo que permitiría la reutilización de la enzima. A pesar de los avances realizados en los últimos años, todavía no hay ningún método general y simple para la preparación de catalizadores heterogéneos mediante la inmovilización de enzimas. Por tanto, existe una necesidad continuada de métodos mejorados para la inmovilización de enzimas sobre un soporte sólido, y de biocatalizadores heterogéneos estables que puedan aplicarse en síntesis orgánica en condiciones de reacción tanto acuosas como orgánicas.

40 Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un material proteico inmovilizado que comprende un portador y al menos una proteína inmovilizada sobre el portador, en el que el portador comprende un material portador al que se une una matriz de afinidad, eligiéndose dicho material portador del grupo que consiste en:

45 (a) vidrio de porosidad controlada (CPG); y

(b) vidrio de porosidad controlada híbrido (CPG híbrido);

50 en el que la al menos una proteína contiene una etiqueta de afinidad y se inmoviliza sobre el portador mediante unión por afinidad específica a la matriz de afinidad, en el que la etiqueta de afinidad es una etiqueta de polihistidina, y en el que la matriz de afinidad contiene un ion de metal quelado.

En una realización, el material portador es vidrio de porosidad controlada (CPG).

55 En otra realización, el material portador es vidrio de porosidad controlada híbrido (CPG híbrido). En otra realización, el ion de metal quelado es Co^{2+} .

En otra realización, la al menos una proteína es una enzima.

60 En otra realización, el material proteico inmovilizado comprende dos o más enzimas inmovilizadas.

En otra realización, el material proteico inmovilizado comprende además nanopartículas de metal.

En otra realización, dichas nanopartículas de metal son nanopartículas de metales de transición.

65 En aún otra realización, dichas nanopartículas de metal se seleccionan del grupo que consiste en nanopartículas de

cobalto, níquel y paladio.

La invención también se refiere al uso de un portador que comprende un material portador al que se une una matriz de afinidad, eligiéndose dicho material portador del grupo que consiste en:

- 5 (a) vidrio de porosidad controlada (CPG); y
- (b) vidrio de porosidad controlada híbrido (CPG híbrido);
- 10 para la inmovilización de proteínas, en el que las proteínas se inmovilizan sobre el portador mediante unión por afinidad específica a la matriz de afinidad, y en el que la matriz de afinidad contiene ion de metal quelado que puede unirse a una proteína con etiqueta de polihistidina.
- 15 En una realización, el material portador es vidrio de porosidad controlada (CPG).
- En otra realización, el material portador es vidrio de porosidad controlada híbrido (CPG híbrido).
- En otra realización, el ion de metal quelado es Co^{2+} .
- 20 La invención también se refiere al uso del material proteico inmovilizado como catalizador heterogéneo.

Breve descripción de los dibujos

- 25 La figura 1 muestra la preparación de material de CPG de enzima inmovilizada a partir de amino-(Hyb)CPG, usando enzima con etiqueta de polihistidina y Co^{2+} como metal quelado. El grupo R es un grupo de unión adecuado, y varía entre los productos de GPG. La quelación del ion de cobalto al residuo de 2,4-dihidroxifenilo y la enzima con etiqueta de polihistidina se representa esquemáticamente.
- 30 La figura 2 muestra la preparación de nanopartículas de metal y enzimas inmovilizadas que contienen material de GPG de amino-(Hyb)CPG, usando enzima con etiqueta de polihistidina, Co^{2+} como metal quelado y paladio como nanopartícula de metal. El grupo R es un grupo de unión adecuado, y varía entre los productos de GPG. Tanto la unión de las nanopartículas de paladio al material de CPG como la quelación del ion de cobalto al residuo de 2,4-dihidroxifenilo y la enzima con etiqueta de polihistidina se representan esquemáticamente.

Descripción detallada de la invención

- 35 Se ha descubierto sorprendentemente que al movilizar proteínas sobre un material de vidrio poroso mediante unión por etiqueta de afinidad, se obtiene un material proteico inmovilizado que tiene propiedades mejoradas con respecto a la estabilidad de las proteínas inmovilizadas, y en el que se mantiene la función biológica de las proteínas. Se encontró que las preparaciones de enzimas inmovilizadas tenían una alta actividad catalítica, lo que las hace útiles en biocatálisis.
- 40 Según la invención, una proteína que contiene una etiqueta de afinidad se inmoviliza al unirse a un grupo específico sobre una matriz de afinidad unida al material de vidrio poroso. Debido a la alta afinidad de unión de la etiqueta de afinidad por el grupo específico sobre la matriz, la unión de la proteína a la matriz es fuerte y altamente específica. La invención proporciona, por tanto, métodos generales para la inmovilización de proteínas, tales como enzimas.
- 45 En un primer aspecto, la invención se refiere a un material proteico inmovilizado que comprende un portador y al menos una proteína inmovilizada sobre el portador, en el que el portador comprende un material portador al que se une una matriz de afinidad, eligiéndose dicho material portador del grupo que consiste en:
- 50 (a) vidrio de porosidad controlada (CPG); y
- (b) vidrio de porosidad controlada híbrido (CPG híbrido);
- 55 y en el que la al menos una proteína contiene una etiqueta de afinidad y se inmoviliza sobre el portador mediante unión por afinidad específica a la matriz de afinidad, y en el que la etiqueta de afinidad es una etiqueta de polihistidina y en el que la matriz de afinidad contiene un ion de metal quelado.
- 60 La inmovilización de proteínas sobre el portador por medio de una etiqueta de afinidad ofrece la ventaja de una unión específica de las proteínas sobre un sitio predefinido. Al mismo tiempo, sin embargo, el método de inmovilización puede aplicarse generalmente a muchas proteínas diferentes. La etiqueta de afinidad que se usa en la invención puede unirse específicamente a una matriz para la cual tiene afinidad. La unión por afinidad debe ser lo suficientemente fuerte como para permitir que la etiqueta de afinidad y la matriz permanezcan estrechamente unidas entre sí al menos hasta que se apliquen determinadas condiciones específicas con el fin de disociar la etiqueta de afinidad de la matriz.
- 65

En otro aspecto, la invención se refiere al uso de un portador que comprende un material portador al que se une una matriz de afinidad, eligiéndose dicho material portador del grupo que consiste en:

- 5 (a) vidrio de porosidad controlada (CPG); y
- (b) vidrio de porosidad controlada híbrido (CPG híbrido);

10 para la inmovilización de proteínas, y en el que las proteínas se inmovilizan sobre el portador mediante unión por afinidad específica a la matriz de afinidad, y en el que la matriz de afinidad contiene un ion de metal quelado que puede unirse a una proteína con etiqueta de polihistidina.

15 La proteína que va a inmovilizarse sobre el portador puede ser cualquier proteína que contenga una etiqueta de afinidad, tal como una proteína o enzima (recombinante) que contenga una etiqueta de afinidad. Preferiblemente, la proteína es una enzima que contiene una etiqueta de afinidad. Debe entenderse que la etiqueta debe tener afinidad específica por la matriz de afinidad unida al portador.

20 En la técnica se conocen varias etiquetas de afinidad y las matrices correspondientes. En la tabla a continuación se enumeran ejemplos de etiquetas de afinidad y los grupos correspondientes sobre la matriz:

Etiqueta de afinidad	Grupos correspondientes sobre la matriz
etiqueta de polihistidina	iones de metal quelado, por ejemplo, Fe ²⁺ , Co ²⁺ , Ni ²⁺ , Cu ²⁺ , Zn ²⁺
glutatión S-transferasa (GST)	glutatión
proteína de unión a quitina (CBP)	quitina
proteína de unión a maltosa (MBP)	amilosa reticulada
etiqueta FLAG	anticuerpo monoclonal anti-FLAG
avidina	biotina
estreptavidina	biotina

25 En la invención, la etiqueta de afinidad sobre la proteína es una etiqueta de polihistidina y la matriz de afinidad unida al portador contiene un ion de metal quelado. El ion de metal quelado es preferiblemente un ion de metal seleccionado del grupo que consiste en Fe²⁺, Co²⁺, Ni²⁺, Cu²⁺ y Zn²⁺, y se selecciona más preferiblemente del grupo que consiste en Ni²⁺ y Co²⁺. En una realización preferida, el ion de metal quelado es Co²⁺.

30 La elección del ion de metal quelado puede depender del uso previsto. Por ejemplo, si el portador va a usarse para la purificación y el aislamiento de una proteína con etiqueta de afinidad, la unión de la enzima al portador debe ser reversible. En tales casos, se prefiere que el ion de metal quelado sea Ni²⁺ o Co²⁺, y lo más preferiblemente Co²⁺. Estos iones de metal se unen lo suficientemente fuerte para inmovilizar una enzima con etiqueta de polihistidina, pero también pueden liberar la enzima inmovilizada cuando se aplican condiciones específicas, tales como tratamiento con una disolución tamponada que contiene imidazol o etilendiaminotetraacetato (EDTA).

35 Para el uso de enzimas inmovilizadas en biocatálisis heterogénea, es deseable una fuerte unión de la enzima al portador. En tales casos, se prefiere que el ion de metal quelado sea Co²⁺ o Fe³⁺, y lo más preferiblemente Fe³⁺, ya que esto da como resultado una unión particularmente fuerte de la etiqueta de polihistidina al portador. Tal como se demuestra en los ejemplos, la lixiviación de o bien enzima o bien ion de metal del material proteico inmovilizado que comprende Fe³⁺ como ion de metal quelado es casi despreciable. La ausencia de lixiviación permite que el material proteico inmovilizado (el biocatalizador) se use en cantidades catalíticas. El uso de cantidades catalíticas es particularmente importante en reacciones de flujo continuo.

40 Una ventaja adicional de Fe³⁺ como ion de metal quelado es que este metal no es tóxico. El material proteico inmovilizado resultante puede, por tanto, aplicarse de manera segura, por ejemplo, en la industria alimentaria.

45 La matriz para la proteína con etiqueta de afinidad se une a la superficie del portador a través de un grupo de unión apropiado. La superficie del vidrio de porosidad controlada (CPG) contiene grupos silanol (Si-OH) libres, que pueden unirse a una molécula de unión mediante un enlace covalente. Normalmente, la superficie se hace reaccionar con una molécula de unión de alquilsilano bifuncional (cuya longitud y estructura de la cadena pueden variar), mediante lo cual el átomo de silicio se une de manera covalente con los grupos silanol de la superficie del vidrio y en donde el grupo terminal del silano es un grupo funcional, tal como un aldehído, una amina, un grupo epoxi, un haluro o un derivado de ácido carboxílico. El grupo funcional apropiado que debe usarse dependerá de la naturaleza de la matriz

que va a unirse a la superficie del GPC. El experto en la técnica conoce métodos para unir la matriz a la superficie del CPG a través de un grupo de unión apropiado.

5 El CPG es un material de vidrio robusto e inerte que puede producirse como partículas de macro o mesoporos controlados por tamaño. La distribución del tamaño de poro definida de CPG puede variarse para tamaños de poro de aproximadamente 10 a 300 nm de diámetro. Esto proporciona un microambiente favorable sin complicaciones debido al impedimento estérico. La estructura de poros de interconexión da como resultado una baja resistencia al flujo de la disolución y facilita la transferencia de masa de reactivos y productos en todo el material. La estructura rígida de CPG proporciona un medio resistente, no compresible, adecuado para diseños de reactores de alto rendimiento y aumento a escala lineal a altas velocidades de flujo. El material presenta un hinchamiento limitado en disolventes y es química y dimensionalmente estable en la mayoría de los medios orgánicos y ambientes acuosos a un pH por debajo de 10.

15 El CPG convencional presenta una capacidad de carga de ligando que está inversamente relacionada con su tamaño de poro. Por tanto, un soporte de GPG de un gran tamaño de poro no puede cargarse con tanta proteína como un soporte de GPG de un tamaño de poro más pequeño. Esto se debe parcialmente a la relación inversa entre tamaño de poro y área de superficie, y parcialmente debido a grupos silanol accesibles en la superficie que sirven como restos de funcionalización que tienen una densidad definida por unidad de área de superficie, aproximadamente $4,5 \mu\text{mol}/\text{m}^2$. El CPG convencional muestra una distribución de silanol no uniforme donde los sitios de silanol impedidos estéricamente no pueden servir como puntos de unión funcionales.

20 El vidrio de porosidad controlada híbrido (CPG híbrido o HybCPG) es una variante de CPG en la que las superficies interna y externa del CPG se recubren con una película de aproximadamente 10 nm de un polímero orgánico reticulado, tal como se describe en el documento WO 2009/005631. El recubrimiento polimérico sobre el CPG híbrido puede contener grupos funcionales, tales como aldehídos, grupos amino, grupos epoxi, haluros, ácidos carboxílicos y ésteres, o mezclas de los mismos, a los que puede unirse una matriz. Los expertos en la técnica conocen métodos para unir una matriz a un grupo funcional apropiado.

25 El CPG híbrido ofrece determinadas ventajas respecto a CPG convencional. Como resultado del recubrimiento polimérico, la dependencia entre carga y tamaño de poro puede minimizarse y la separación entre sitios de funcionalización puede controlarse de manera más precisa y uniforme. El CPG híbrido como material portador para la inmovilización de proteínas puede ofrecer beneficios adicionales, debido a que el diseño del recubrimiento polimérico puede ajustarse con el fin de proporcionar características de superficie que se desean o requieren para una aplicación dada. Por ejemplo, un polímero homogéneo tal como poliestireno producirá una superficie de portador más hidrófoba, mientras que un polímero homogéneo tal como poliacrilonitrilo producirá una superficie de portador más hidrófila. Al usar mezclas de dos o más polímeros diferentes, puede obtenerse un recubrimiento copolimérico en el que las características de la superficie del portador se adaptan específicamente para una aplicación dada. Los recubrimientos de capa fina permiten algún grado de hinchamiento microscópico en disolventes orgánicos, pero sin expansión en volumen del lecho de CPG híbrido o un aumento en la contrapresión. Los recubrimientos también permiten el uso de CPG híbrido en ambientes acuosos por encima de pH 10.

30 En todo el resto de la descripción y las reivindicaciones adjuntas, cualquier referencia a CPG ha de interpretarse como que incluye tanto CPG (convencional) como CPG híbrido, a menos que se indique específicamente lo contrario.

35 El material proteico inmovilizado en CPG puede producirse fácilmente en sólo unas pocas etapas, a partir de o bien amino-CPG o bien amino-HybCPG, tal como se resalta en la figura 1. Por ejemplo, los materiales de CPG pueden tratarse con 2,4-dihidroxiacetofenona, uniendo de ese modo el grupo fenilo al CPG por medio de una imina. Si se desea, la funcionalidad imina puede reducirse después de eso a la correspondiente amina usando un agente reductor apropiado, tal como, por ejemplo, borohidruro de sodio, cianoborohidruro de sodio o hidruro de litio y aluminio. Un ion de metal quelado, tal como Co^{2+} o Fe^{3+} , puede introducirse posteriormente mediante suspensión del material en una disolución acuosa de CoCl_2 o FeCl_3 , respectivamente. Después del secado, el material obtenido puede usarse directamente como matriz de unión para una o más proteínas con etiqueta de polihistidina.

40 La alta afinidad de la etiqueta de polihistidina por iones de metal tales como Co^{2+} permite que se realice la inmovilización de proteínas con etiqueta de polihistidina a partir de disoluciones brutas que contienen las proteínas sin la necesidad de purificación extensiva de la disolución antes de la etapa de inmovilización. El material orgánico que no contiene una etiqueta de polihistidina se unirá a los iones de metal quelado sólo de manera débil, o no se unirá en absoluto, y se retirará fácilmente del material de proteínas inmovilizadas final lavando con, por ejemplo, agua o disoluciones acuosas tamponadas. Por tanto, si la proteína con etiqueta de polihistidina se prepara mediante sobreexpresión intracelular, la inmovilización de proteínas puede realizarse directamente a partir del lisado celular. Alternativamente, si la proteína con etiqueta de polihistidina es secretada por el organismo huésped, la inmovilización de proteínas puede realizarse directamente a partir del sobrenadante de cultivo celular.

45 También se describe en el presente documento un método para la inmovilización de una proteína con etiqueta de afinidad, que comprende las etapas de

i) inmovilizar la proteína con etiqueta de afinidad sobre un portador que comprende un material portador al que se une una matriz de afinidad, eligiéndose dicho material portador del grupo que consiste en:

- 5 (a) vidrio de porosidad controlada (CPG); y
(b) vidrio de porosidad controlada híbrido (CPG híbrido);
10 (c)

ii) opcionalmente lavar el material proteico inmovilizado con agua o un tampón apropiado.

También se describe en el presente documento un método para la preparación de un material proteico inmovilizado, comprendiendo dicho método:

15 i) proporcionar un material portador que contiene grupos amino, eligiéndose dicho material portador del grupo que consiste en:

- 20 (a) vidrio de porosidad controlada (CPG); y
(b) vidrio de porosidad controlada híbrido (CPG híbrido);

ii) hacer reaccionar el material portador con 2,4-dihidroxiacetofenona, uniendo de ese modo un grupo dihidroxifenilo al material portador;

25 iii) formar un complejo quelado entre el grupo dihidroxifenilo y un ion de metal que puede unirse a una proteína con etiqueta de polihistidina; y

30 iv) unir una enzima con etiqueta de polihistidina al material portador que comprende dicho ion de metal.

Opcionalmente, el método para la preparación de un material proteico inmovilizado tal como se describió anteriormente comprende además la unión de una nanopartícula de metal de transición al material portador.

35 En un caso, el portador es vidrio de porosidad controlada (CPG). En otro caso, el portador es vidrio de porosidad controlada híbrido (CPG híbrido).

40 En un caso preferido, el método comprende la inmovilización de proteínas con etiqueta de afinidad sobre CPG o CPG híbrido. En un caso más preferido, el método comprende la inmovilización de enzimas con etiqueta de polihistidina sobre CPG o CPG híbrido, en el que el ion de metal quelado usado es Co^{2+} .

45 La disociación de la proteína unida puede lograrse usando métodos de IMAC convencionales. La proteína unida puede, por ejemplo, liberarse del portador reduciendo el pH o añadiendo una molécula competitiva que tiene igual o mayor afinidad por los iones de metal quelado que el grupo de polihistidina, tal como aplicando una disolución tamponada que contiene imidazol o etilendiaminotetraacetato (EDTA). Después de la disociación de las proteínas purificadas del portador, la etiqueta de polihistidina puede retirarse de las proteínas, si es necesario, mediante técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo, escindiendo la etiqueta de afinidad con una enzima apropiada tal como una proteasa específica, obteniendo de ese modo la proteína pura y sin etiqueta.

50 También se describe en el presente documento un método para la purificación y el aislamiento de una proteína con etiqueta de afinidad, que comprende las etapas de

i) inmovilizar una proteína con etiqueta de afinidad sobre un portador que comprende un material portador al que se une una matriz de afinidad, eligiéndose dicho material portador del grupo que consiste en:

- 55 (a) vidrio de porosidad controlada (CPG); y
(b) vidrio de porosidad controlada híbrido (CPG híbrido);

60 ii) opcionalmente lavar el material proteico inmovilizado con agua o un tampón apropiado; y

iii) disociar la proteína purificada de la matriz de afinidad.

65 La etapa de inmovilización puede realizarse en un tampón apropiado. Si es necesario, el material proteico inmovilizado puede lavarse después de eso con agua o un tampón apropiado con el fin de retirar cualquiera proteína no unida y otros compuestos no deseados del material proteico inmovilizado. La disociación de la proteína purificada de la matriz de afinidad puede lograrse aplicando condiciones que sean apropiadas para la etiqueta de afinidad

particular. En la técnica se conocen condiciones apropiadas para la disociación de las diferentes etiquetas de afinidad.

5 El método puede comprender opcionalmente la etapa adicional de iv) retirar la etiqueta de afinidad de la proteína purificada.

10 El método comprende la purificación y el aislamiento de proteínas con etiqueta de afinidad sobre CPG o CPG híbrido. Particularmente, el método comprende la purificación y el aislamiento de enzimas con etiqueta de polihistidina sobre CPG o CPG híbrido, en el que el ion de metal quelado usado es Co^{2+} .

15 Si las proteínas inmovilizadas sobre el portador, tal como se describió anteriormente, son enzimas, contienen un sitio activo que puede catalizar una reacción química. Como tal, el material enzimático inmovilizado es potencialmente útil como biocatalizador en síntesis orgánica. Por tanto, en otro aspecto, la invención se refiere al uso de un material enzimático inmovilizado tal como se da a conocer en el presente documento como biocatalizador heterogéneo, por ejemplo, en transformaciones de síntesis orgánica. También se describe en el presente documento un método para catalizar una reacción catalizada por enzimas, que comprende proporcionar un material proteico inmovilizado según la invención, y poner en contacto dicho material proteico inmovilizado con al menos un sustrato sobre el que una enzima, que se inmoviliza sobre el portador, puede actuar.

20 La inmovilización de enzimas sobre el portador mediante unión por etiqueta de afinidad, tal como se da a conocer en el presente documento, mejora la estabilidad de las enzimas usadas. Se ha encontrado que las enzimas inmovilizadas toleran tanto condiciones acuosas así como una variedad de diferentes disolventes orgánicos. Esto permite que se usen los materiales enzimáticos inmovilizados en condiciones de reacción bajo las cuales las enzimas no inmovilizadas libres no habrían sido estables. Es posible que el material enzimático inmovilizado también pueda usarse en un intervalo de pH más amplio que el que habrían tolerado las enzimas no inmovilizadas libres.

25 Cuando se une una enzima de una preparación bruta (no purificada), el material proteico inmovilizado resultante consiste en enzima enriquecida. Dado que se conserva la actividad nativa del método enzimático, la preparación inmovilizada muestra una actividad catalítica mayor por masa de proteína que el material proteico no inmovilizado inicial.

30 Otra ventaja de la presente invención es que el material enzimático inmovilizado puede reciclarse fácilmente. Dado que el material enzimático inmovilizado es un catalizador heterogéneo, el material puede recogerse simplemente de la mezcla de reacción mediante filtración. El material puede, después de eso, reutilizarse en una reacción adicional, si es necesario, después de purificación del material. Especialmente para las enzimas que son costosas y/o difíciles de cultivar, la posibilidad de reciclar el material enzimático inmovilizado es un aspecto importante.

35 La enzima que se inmoviliza sobre el portador puede ser cualquier enzima que sea útil como biocatalizador en transformaciones de síntesis orgánica, incluyendo, pero sin limitarse a, enzimas que actúan como oxidorreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas. Por tanto, los materiales enzimáticos inmovilizados pueden usarse como biocatalizadores heterogéneos en cualquier reacción orgánica en la que la enzima inmovilizada puede catalizar específicamente la reacción. Los ejemplos de tales reacciones biocatalíticas incluyen, pero no se limitan a, oxidación enzimática y reacciones de reducción, reacciones de hidrólisis enzimática y reacciones de isomerización enzimáticas. Reacciones biocatalíticas particularmente útiles son reacciones enantioselectivas. Los ejemplos específicos de reacciones biocatalíticas incluyen acilaciones selectivas de alcoholes o aminas con lipasa, transaminaciones con ω -transaminasa, monooxigenaciones con CYP P450 o monooxigenasa de Baeyer-Villiger, oxidaciones de alcoholes o reducciones de cetonas/aldehídos con alcohol deshidrogenasa, y oxidaciones de aminas con monoamina oxidasa.

40 En una realización, pueden inmovilizarse dos o más enzimas diferentes sobre el portador, en el que cada una de las diferentes enzimas puede catalizar una reacción diferente. Puede ser posible entonces usar el material que contiene dos o más enzimas inmovilizadas diferentes como biocatalizador heterogéneo en una reacción de múltiples etapas o en cascada. Una reacción en cascada de este tipo puede, por ejemplo, ser una reacción en la que dos o más reacciones catalizadas por enzimas se realizan sobre un sustrato en dos o más etapas posteriores (es decir, una reacción en la que un sustrato para una primera enzima se transforma en un sustrato para una segunda enzima, y así sucesivamente), tal como una reacción de transaminación mediante una ω -transaminasa seguido por una reacción de acilación mediante una lipasa. Alternativamente, una reacción en cascada de este tipo puede ser una reacción en la que un sustrato se transforma mediante una primera enzima y en la que un cofactor para la primera enzima se regenera mediante una segunda enzima, tal como la reducción selectiva/específica de una cetona/aldehído mediante alcohol deshidrogenasa con la regeneración concomitante de NADH consumido por formiato deshidrogenasa.

45 Cuando se inmovilizan dos o más enzimas diferentes sobre el portador, es conveniente si las diferentes enzimas contienen la misma etiqueta de afinidad, es decir, una etiqueta de polihistidina. Puesto que la afinidad de unión al ion de metal quelante es igual para cada una de las enzimas, las diferentes enzimas se unirán con la misma fuerza al portador. En teoría, por tanto, cuando se usan cantidades iguales de n enzimas diferentes que tienen la misma

etiqueta de afinidad, la cantidad de cada enzima diferente sobre el portador será 1/n (sin considerar ningún efecto de difusión).

5 Para las reacciones en cascada que usan un material proteico inmovilizado con dos o más enzimas inmovilizadas diferentes, y en las que las diferentes enzimas muestran una diferencia en la actividad catalítica, puede ser ventajoso inmovilizar cantidades mayores de la(s) enzima(s) que tiene(n) menor actividad catalítica, en comparación con la cantidad de enzima que tiene la mayor actividad catalítica. Esto acelerará la etapa de determinación de la velocidad y aumentará la velocidad global de la cascada de reacción.

10 Alternativamente, pueden realizarse reacciones en cascada mezclando uno o más materiales enzimáticos inmovilizados diferentes en razones deseadas.

15 También se da a conocer en el presente documento un método para catalizar una reacción en cascada o de múltiples etapas catalizada por enzimas. En este aspecto, el método comprende proporcionar un material proteico inmovilizado que comprende dos o más enzimas inmovilizadas, según la invención, y poner en contacto dicho material proteico inmovilizado con al menos un sustrato sobre el cual las enzimas, que se inmovilizan sobre el portador, pueden actuar.

20 En otra realización, el material enzimático inmovilizado comprende además nanopartículas de metal, tales como nanopartículas de metales de transición, tales como, pero sin limitarse a, cobalto, níquel o paladio. Un material que comprende nanopartículas de metal puede prepararse, por ejemplo, sumergiendo amino-CPG o amino-HybCPG en una disolución de una cantidad apropiada de sal de metal, tal como CoCl_2 , NiCl_2 , Li_2PdCl_4 , PdCl_2 o $\text{Pd}(\text{TFA})_2$, en acetonitrilo o agua, o en mezclas de los mismos. Los iones de metal se reducen, después de eso, a nanopartículas de metal mediante la adición de un exceso de agente reductor apropiado, tal como hidruro de sodio, borohidruro de sodio, cianoborohidruro de sodio, hidruro de litio y aluminio y similares. Tras la adición de 2,4-dihidroxiacetofenona, la imina inicialmente formada se reduce inmediatamente a la correspondiente amina. Después de la retirada del agente reductor mediante lavado, se quela entonces un ion de metal, tal como Co^{2+} , Fe^{3+} o Ni^{2+} , sobre la matriz mediante suspensión del material en una disolución acuosa de CoCl_2 , FeCl_3 o NiCl_2 , respectivamente. Después del secado, el material obtenido puede usarse directamente como matriz para una o más enzimas con etiqueta de polihistidina; véase la figura 2.

35 Sin pretender limitarse a la teoría, se cree que las nanopartículas de metal se unen al material de CPG a través de los grupos amino sobre el material de CPG. También puede concebirse que las nanopartículas de metal, formadas por la reducción de los iones de metal, sean de un tamaño lo suficientemente grande para que queden atrapadas en los poros del material de CPG.

40 El material proteico inmovilizado que contiene tanto la enzima inmovilizada como las nanopartículas de metal puede aplicarse como biocatalizador heterogéneo en reacciones catalizadas por metales de transición y enzimas combinadas. Los ejemplos de tales reacciones incluyen, pero no se limitan a, reacciones de resolución cinética dinámica. Un ejemplo específico de tales reacciones es la resolución cinética dinámica de aminas mediante racemización de la amina por nanopartículas de Pd seguido de acilación con lipasa, tal como se muestra en los ejemplos adjuntos.

45 También se da a conocer en el presente documento un método para catalizar una reacción catalizada por metales de transición y catalizada por enzimas combinada. En este aspecto, el método comprende proporcionar un material proteico inmovilizado que comprende además nanopartículas de metales de transición, según la invención, y poner en contacto dicho material proteico inmovilizado con al menos un sustrato sobre el cual una enzima y un metal de transición, que se inmovilizan sobre el portador, pueden actuar.

50 Los ejemplos del material proteico inmovilizado dado a conocer en el presente documento y el uso de tal material se describen en la sección experimental.

Definiciones

55 El término "etiqueta de afinidad" se refiere a un grupo definido, tal como una molécula orgánica u organometálica, fragmento de proteína u otro, que se une a una proteína recombinante y que puede unirse a un grupo específico inmovilizado sobre una matriz. Ejemplos de etiquetas de afinidad son una etiqueta de polihistidina, una etiqueta de glutatión S-transferasa (GST), una etiqueta de proteína de unión a quitina (CBP), una etiqueta de proteína de unión a maltosa (MBP), una etiqueta FLAG, una etiqueta de avidina o una etiqueta de estreptavidina. Las etiquetas de afinidad también pueden denominarse etiquetas de fusión.

65 Tal como se usa en el presente documento, el término "proteína con etiqueta de afinidad" se refiere a una proteína recombinante en donde una etiqueta de afinidad, tal como se definió anteriormente, se ha añadido a la proteína diana. Las proteínas con etiqueta de afinidad pueden prepararse mediante tecnología de ADN recombinante usando métodos conocidos en la técnica, tal como por ligación de fragmentos de ADN o por técnicas de PCR. Las proteínas con etiqueta de afinidad también pueden denominarse "proteínas de etiqueta de fusión" o "proteínas de fusión".

El término “etiqueta de polihistidina” se refiere a una hebra de al menos dos residuos de histidina, que se une al extremo C o N-terminal de una proteína. La etiqueta de polihistidina es preferiblemente una hebra de al menos seis residuos de histidina. Otros nombres comúnmente usados para una etiqueta de polihistidina son etiqueta poliHis, etiqueta de histidina, etiqueta de hexahistidina, etiqueta 6xHis y etiqueta His₆, así como His-tagTM. El término “enzima con etiqueta de polihistidina” se refiere a una enzima recombinante en donde la enzima diana se fusiona con una etiqueta de polihistidina tal como se definió anteriormente.

Tal como se usa en el presente documento, el término “amino-CPG” se refiere a un material CPG que se funcionaliza con un grupo amino a través de un grupo de unión apropiado. El término “amino-HybCPG” tal como se usa en el presente documento se refiere a un material CPG híbrido en donde el recubrimiento de polímero contiene grupos amino.

La invención se ilustra adicionalmente por medio de los siguientes ejemplos.

Abreviaturas

a _w	actividad del agua
AlaDH	alanina deshidrogenasa de <i>B. subtilis</i>
CalA	lipasa A de <i>Candida antarctica</i> (también conocida como lipasa A de <i>Pseudozyma antarctica</i>)
CalB	lipasa B de <i>Candida antarctica</i> (también conocida como lipasa B de <i>Pseudozyma antarctica</i>)
DCM	diclorometano
2,5-DKCMO	2,5-dicetocanfano monooxigenasa de <i>Pseudomonas putida</i>
equiv.	equivalente(s)
EtOAc	acetato de etilo
FMN	mononucleótido de flavina
RE-FLAVINA reductasa	de <i>E. coli</i>
CG	cromatografía de gas
HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil)piperazin-1-etanosulfónico
IPTG	isopropil-β-D-tiogalactopiranosido
min	minuto(s)
MOPS	ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico
MTBE	metil terc-butil éter (o terc-butil metil éter)
NADH	dinucleótido de nicotinamida-adenina (forma reducida)
PLP	5-fosfato de piridoxal
SDS-PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida de dodecil sulfato de sodio
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
ω-TA	ω-transaminasa de <i>Chromobacterium violaceum</i>

Métodos experimentales

Los materiales de CPG se obtuvieron de Prime Synthesis, Inc., (Aston, PA, EE.UU.). Los siguientes materiales de vidrio de porosidad controlada se usaron en los ejemplos:

- LCAA CPG es un CPG derivado con alquilaminas de cadena larga (CPG-0502-N12).

• Copoli-HybCPG-amina (en lo siguiente también denominada “HybCPG copo”) es un CPG híbrido recubierto con un copolímero formado por acrilonitrilo:cloruro de vinilbencilo 1:1 y reticulado *in situ*.

5 • VBC HybCPG-amina (en el siguiente también denominada “HybCPG VBC”) es un CPG híbrido recubierto con un polímero formado por monómeros de cloruro de vinilbencilo y reticulados *in situ*.

Los (co)polímeros de los recubrimientos se reticulan con una amina bifuncional, como se describe en WO 2009/005631. Los grupos amino después se introducen en los recubrimientos de cloro-polímero mediante reacción con ftalimida de sodio seguido por deftaloilación con hidrazina.

10 Los siguientes polímeros orgánicos porosos se usaron en los ejemplos:

15 • “Poliestireno de hinchamiento medio” (adquirido de 3-Prime LLC, EE.UU.; número de pieza 04-02-03-32), un soporte de poliestireno funcionalizado con amino. Tamaño de poro -1000 Å (distribución muy amplia), tamaño de partícula 100 µm, carga de amina 222 µmol/g.

20 • “Copolímero de metacrilato de bajo hinchamiento” (adquirido de SPRIN Technologies S.p.A., Italia; número de pieza 1A02BN), un soporte de metacrilato funcionalizado con amino. Diámetro de poro desconocido, tamaño de partícula 100-300 µm, carga de amina 270 µmol/g.

25 El cultivo de la ω-transaminasa sobreexpresada de *Chromobacterium violaceum* se llevó a cabo tal como se describe en Cassimjee *et al.* (ACS Catal. 2011, vol. 1, págs. 1051-1055). El cultivo de la lipasa A de *Candida antarctica* sobreexpresada se llevó a cabo tal como se describe en Sandström *et al.* (Protein Eng Des Sel. 2009, vol 22, págs. 413-420). El cultivo de la lipasa B de *Candida antarctica* sobreexpresada y CalB Trp104Ala, una variante inestable de la lipasa B, se llevó a cabo tal como se describe en Engström *et al.* (Org. Biomol. Chem. 2011, vol. 9, págs. 81-82). El cultivo de la 2,5-dicetocanfano monooxigenasa sobreexpresada de *Pseudomonas putida* se llevó a cabo tal como se describe en Kadow *et al.* (AMB Express 2011,1:13). El cultivo de la flavina reductasa sobreexpresada de *E. coli* se llevó a cabo tal como se describe en Kadow *et al.* (Appl. Microbiol. Biotechnol. 2013, publicada en línea el 5 de noviembre de 2013). El cultivo de la alanina deshidrogenasa sobreexpresada de *B. subtilis* se llevó a cabo tal como se describe en Mutti *et al.* (Eur. J. Org. Chem. 2012, tomo 5, págs. 1003-1007). Cuando estuvo ausente, se añadió una etiqueta His₆ a los genes por PCR. Se inmovilizaron CalA y CalB etiquetados con polihistidina sobre Accurel según los procedimientos tal como se describe en Engström *et al.* (Org. Biomol. Chem. 2011, vol. 9, págs. 81-82).

35 **Ejemplos**

Ejemplo 1

40 Preparación de portadores de CPG quelantes para la inmovilización y purificación de las enzimas con etiqueta de polihistidina

45 Se trató amino-CPG (5 g) de tipo deseado con 2,4-dihidroxiacetofenona (1,5 equivalentes a las funcionalidades amino del CPG) en metanol (200 ml) con agitación continua durante 60 minutos. Se redujo la imina formada mediante adición secuencial de borohidruro de sodio (4 equivalentes) con agitación continua durante 60 minutos. Se filtró el material sólido, se enjuagó con disolución de carbonato de sodio acuoso saturado, agua y después etanol, y después se secó a 80°C durante 2 horas. Después se sumergieron las partículas en una disolución acuosa saturada de CoCl₂ (100 ml). Después de la filtración y el enjuague con agua y etanol, se secaron las partículas a 80°C durante 2 horas. Las propiedades de los portadores de CPG quelantes diferentes se muestran en la tabla 1.

Tabla 1			
Portador de CPG quelante	Porosidad ¹ (Å)	Derivación de amino ³ (µmol/g)	Carga de cobalto ⁴ (II) (µmol/g)
LCAA CPG (Co ²⁺)	533	166	2,8
HybCPG VBC (Co ²⁺)	526 ²	398	18,7
HybCPG copo (Co ²⁺)	590 ²	360	25,5

¹ Medido por porosimetría de mercurio. ² Medido antes del recubrimiento con el polímero reticulado; el diámetro de poro accesible del HybCPG se reduce en 160-200 Å después del recubrimiento. ³ El contenido de nitrógeno antes de la preparación del CPG unido a enzimas según el esquema 1. ⁴ Análisis elemental del CPG quelante sin la enzima unida.

Se prepararon portadores que contienen Fe^{3+} como ion de metal quelado de manera similar al procedimiento anterior, pero usando una disolución acuosa de FeCl_3 en lugar de CoCl_2 .

5 Ejemplo comparativo 2

Preparación del poliestireno poroso quelante y portadores de polimetacrilato para inmovilización y purificación de enzimas con etiqueta de polihistidina

10 Se trataron partículas de polímero orgánicas porosas funcionalizadas con amino lavadas (agua/etanol 1:1, 400 ml) y secadas (vacío 16 horas después de filtración) (2 g) de tipo deseado (véase a continuación) con 2,4-dihidroxiacetofenona (1,5 equivalentes a las funcionalidades de amino del plástico) en metanol (50 ml) con agitación continua durante 60 minutos. Se redujo la amina formada por adición secuencial de borohidruro de sodio (4 equivalentes) con agitación continua durante 60 minutos. Se filtró el material sólido, se enjuagó con disolución de carbonato de sodio acuoso saturado, agua y después etanol, y después se secó a vacío a 25°C durante 16 horas.

Después se sumergieron las partículas en una disolución acuosa saturada de CoCl_2 (100 ml). Después de la filtración y el enjuague con agua y etanol, se secaron las partículas a vacío a 25°C durante 16 horas. Las propiedades de los portadores de plástico porosos quelantes diferentes se muestran en la tabla 2.

20

Portador de plástico poroso quelante	Derivación de amino (según lo establecido por el fabricante, $\mu\text{mol/g}$)	Carga de cobalto(II) (análisis elemental, $\mu\text{mol/g}$)
Poliestireno (Co^{2+})	222	67
Polimetacrilato (Co^{2+})	270	24

Ejemplo 3

Inmovilización de las enzimas con etiqueta de polihistidina sobre portadores quelantes

25

Se usaron los sobrenadantes del cultivo celular que contienen CalA o CalB sin tamponamiento. Se prepararon los lisados celulares de ω -TA mediante resuspensión celular en tampón HEPES (50 mM, NaCl 500 mM, pH 8,3). Después de la adición de detergentes (BugBuster™ 10X, Novagen), se retiraron los residuos celulares por centrifugación. Se sumergió el portador de CPG quelante en los lisados o sobrenadantes seguido por agitación en un agitador orbital (150 rpm). Las muestras analizadas Bradford de las disoluciones durante la inmovilización confirmaron la finalización de la unión y la saturación del portador de CPG quelante a medida que la concentración de proteína dimensionada disminuye. También se llevaron a cabo ensayos de actividad con las disoluciones después de la retirada del portador de CPG por filtración. Después se enjuagaron las preparaciones inmovilizadas con tampón (MOPS (50 mM, pH 7,4) para CalA y CalB; HEPES (véase lo anterior) para ω -TA) y se secaron a vacío durante 16 horas.

35

Se llevó a cabo la extracción de la enzima inmovilizada del portador de CPG al sumergir las partículas en tampón de elución (fosfato de sodio 50 mM, imidazol 500 mM, pH 7,5) e incubación en un agitador orbital durante 20 minutos. La presencia y pureza de las enzimas extraídas se visualizaron por SDS-PAGE; solo las bandas que corresponden a las enzimas con etiqueta de His₆ fueron visibles.

40

Se llevó a cabo la cuantificación del sitio activo de ω -TA en disolvente tal como se describió previamente (Cassimjee *et al.*, ACS Catal. 2011, vol. 1, págs. 1051-1055). Se llevó a cabo la cuantificación del sitio activo de ω -TA inmovilizado en disolvente al añadir ω -TA-CPG a 1-feniloetilamina (1 mM, 1 ml, MTBE $a_w=0,6$, pentadecano 1 mM). Se agitó la mezcla de reacción en un agitador orbital (150 rpm, 24 h, 22°C). Se ajustó la actividad del agua del disolvente por pares de hidrato de sal ($\text{Na}_2\text{HPCO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}/7\text{H}_2\text{O}$) pero no se controló después de la adición del ω -TA-CPG o durante la reacción. Las conversiones se midieron por CG (200 μl de muestras a EtOAc, 3 gotas de anhídrido acético y trietilamina, 8 horas de incubación a 22°C), con pentadecano como patrón interno.

45

50 Se llevó a cabo la cuantificación del sitio activo de ω -TA inmovilizado en tampón al añadir ω -TA-CPG a 1-feniloetilamina (1 mM, 1 ml, HEPES 50 mM, pH 7,0). Se agitó la mezcla de reacción en un agitador orbital (150 rpm,

24 h, 22°C). Se trataron las muestras (400 µl) con disolución de NaOH acuosa (1%), se extrajo con DCM y se analizó por CG después de la adición de pentadecano (1 mM, EtOAc). Las conversiones se compararon en todos los casos con las reacciones en blanco con el CPG quelante (sin unión de enzimas).

- 5 El rendimiento de inmovilización, es decir la cantidad de enzima activa retirada del lisado frente a la cantidad de enzima activa retenida en el CPG después del lavado, fue más del 99% basándose en la cuantificación del sitio activo. Los resultados se muestran en la tabla 3.

Portador de CPG	Rendimiento de inmovilización (% de enzimas activas en MTBE)	Carga, sitios activos en MTBE (% en p/p)	Carga, sitios activos en tampón ¹ (% en p/p)
LCAA CPG (Co ²⁺)	>99%	24	19
HybCPG VBC (Co ²⁺)	>99%	29	25
HybCPG copo (Co ²⁺)	>99%	21	13

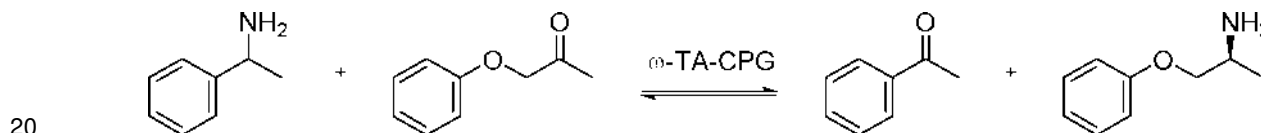
¹ No se añadió PLP después de la inmovilización.

- 10 Se llevó a cabo inmovilización de las enzimas con etiqueta de polihistidina (CaIA y CaIB) en el poliestireno poroso quelante y los portadores de metacrilato tal como se describió anteriormente para los portadores de CPG.

Ejemplo 4

- 15 Uso de ω-TA-CPG como catalizador

Se aplicaron los ω-TA-CPG preparados en el ejemplo 3 como catalizadores en la transaminación enantioespecífica de la fenoxi-2-propanona:



- 25 Se añadieron 20 mg de ω-TA-CPG a la disolución de 3 ml de MTBE (a_w=0,6) con 1-feniloetilamina racémica 10 mM y 2-fenoxipropanona 50 mM, y se incubó la mezcla de reacción con agitación orbital (150 rpm) a 50°C. Se usó pentadecano (50 mM) como patrón interno. La conversión y el exceso enantiomérico de 1-feniletilamina fue seguido por la cromatografía de gas quiral después de tomar las muestras (50 µl) en los puntos de tiempo registrados; las muestras se derivaron con anhídrido acético y trietilamina tal como se describió anteriormente. La formación de 1-fenoxipropano-2-amina se midió sin derivación. Los resultados se muestran en la tabla 4.

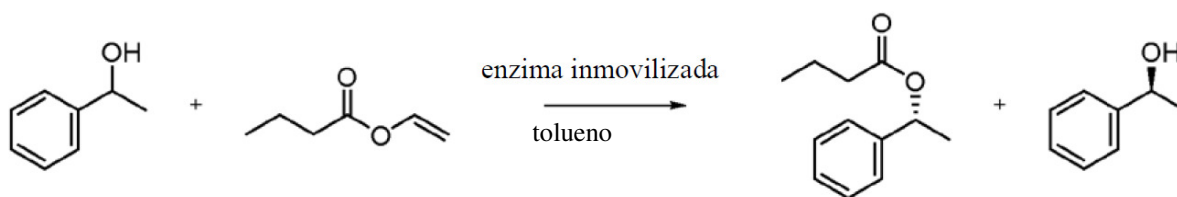
Enzima	Actividad en MTBE ¹ (µmol/min/g de CPG)	Actividad en MTBE ¹ (µmol/min/g de enzima activa)
ω-TA-LCAA CPG (Co ²⁺)	0,38	1,58
ω-TA-HybCPG VBC (Co ²⁺)	0,70	2,41
ω-TA-HybCPG copo (Co ²⁺)	0,06	0,29

¹ Velocidad inicial de la reacción

- 30 Ejemplo 5

Uso de CaIA y CaIB inmovilizados como catalizadores

- 35 Se aplicaron los CaIA-CPG, CaIB-CPG, CaIB-poliestireno y CaIB-polimetacrilato preparados en el ejemplo 3 como catalizadores en la acilación enantioselectiva de 1-feniletanol (una resolución cinética):



Se llevaron a cabo reacciones de resolución cinéticas catalizadas de lipasa mediante la adición de la enzima inmovilizada (20 mg) a una disolución de 3 ml de tolueno ($a_w=0,1$) con 1-feniletanol 10 mM y butirato de vinilo 100 mM, y la mezcla se incubó con agitación orbital (200 rpm) a 22°C (para CalA y CalB) o 50°C (para CalB Trp104Ala). Se usó pentadecano (5 mM) como patrón interno. La conversión y el exceso enantiomérico de 1-feniletanol y butirato de 1-feniletilo se midieron por CG quiral al tomar las muestras (50 μ l) en los puntos de tiempo registrados.

Las siguientes reacciones se incluyeron para comparación:

- CalB inmovilizado en Accurel™, un polvo de polipropileno poroso.

- CalB inmovilizado en amino-HybCPG copo en forma no modificada (es decir no procesada según el ejemplo 1).

Se llevó a cabo la inmovilización de CalB (y CalB Trp104Ala) en Accurel™ activado con etanol (Accurel MP1001, tamaño de partícula <1000 μ m, Membrana GmbH, Wuppertal, Alemania) al añadir el material poroso al sobrenadante concentrado en una razón de 50:1 a la cantidad de enzima (el contenido de proteína se midió por el método Bradford), seguido por incubación durante al menos ocho horas. Los resultados se muestran en la tabla 5.

Enzima	Densidad aparente ¹ (g/cm ³)	E^{app}	Actividad en tolueno ² (μ mol/min/g)	Actividad volumétrica en volumen en tolueno (μ mol /min/cm ³)
CalB-LCAA CPG (Co ²⁺)	0,28	>300 (R)	0,83	0,23
CalB-HybCPG VBC (Co ²⁺)	0,23	>300 (R)	0,90	0,21
CalB-HybCPG copo (Co ²⁺)	0,245	>300 (R)	1,08	0,26
CalB-Accurel®	0,10	>300 (R)	5,99	<0,60 ³
CalB Trp104Ala-LCAA CPG (Co ²⁺)	0,28	n/a	n/d	n/d
CalB Trp104Ala-HybCPG VBC (Co ²⁺)	0,23	1,3 (R)	0,19	0,04
CalB Trp104Ala-HybCPG copo (Co ²⁺)	0,245	1,0	0,04	0,01
CalB Trp104Ala-Accurel®	0,10	7,1 (R)	0,23	<0,023
CalB + Amino-HybCPG copo ⁴	0,245	>300 (R)	0,36	0,083
CalA-LCAA CPG (Co ²⁺)	0,28	1,3 (R)	16,18	4,53
CalB-poliestireno (Co ²⁺)	n/d	>300 (R)	0,068	n/d
CalB-polimetacrilato (Co ²⁺)	n/d	>300 (R)	0,174	n/d

¹ Portadores secos antes de la unión de la enzima. ² Velocidad inicial del consumo de 1-feniletanol. ³ Sin inclusión de hinchamiento que se presenta en contacto con el disolvente. ⁴ Se usó amino-HybCPG copo sin modificación.

Ejemplo 6

Preparación de cascada-CPG con tres enzimas diferentes ("BV-cascada-CPG")

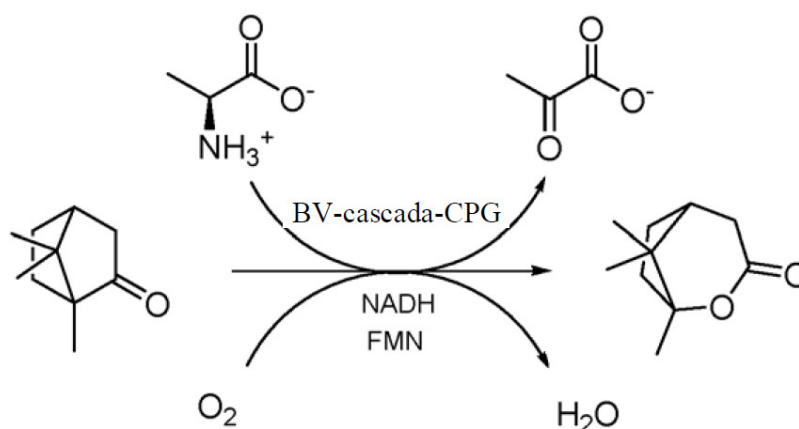
Se prepararon los lisados celulares de 2,5-DKCMO, FRE y AlaDH por resuspensión celular en tampón fosfato de sodio (50 mM, NaCl 500 mM, pH 7,5) y la adición de BugBuster™ 10X. Después de la centrifugación y retirada de

los residuos celulares, el portador de Co^{2+} CPG quelante se sumergió en una mezcla de volúmenes iguales de los tres lisados celulares, seguido por agitación en un agitador orbital (150 rpm). Las muestras analizadas Bradford de las disoluciones durante la inmovilización confirmaron la finalización de la unión y la saturación del portador de CPG a medida que la concentración de proteína dimensionada disminuye. También se llevaron a cabo ensayos de actividad con las disoluciones después de la eliminación del CPG por filtración. Después se enjuagaron preparaciones inmovilizadas con tampón fosfato de sodio (véase lo anterior) y después se secaron a vacío durante 16 horas.

Ejemplo 7

Reacción en cascada enzimática usando BV-cascada-CPG como catalizadores

Se aplicaron los cascada-CPG preparados en el ejemplo 6 como catalizadores en la oxidación de Baeyer-Villiger de (+)-alcanfor:



Se añadieron 65 mg de BV-cascada-CPG a una mezcla de reacción de tampón de fosfato (100 mM, pH 7,5) con (+)-alcanfor 2,0 mM, L-alanina 5,0 mM, FMN 0,3 mM y NADH 0,5 mM con un volumen líquido total de 5,0 ml. Después se disolvió oxígeno (burbujeando durante 30 s) seguido por el sellado del recipiente; la mezcla se incubó en un agitador orbital (150 rpm) a 22°C. Se extrajeron muestras (500 μl) a EtOAc con benzoato de etilo como patrón interno y se analizó por CG. La conversión se midió después de 3 horas. Se añadió oxígeno después de 24 horas y la reacción se dejó continuar durante 3 horas adicionales, después de lo cual la conversión se midió nuevamente (27 h).

También se llevó a cabo una reacción comparativa con 2,5-DKCMO, FRE y AlaDH libres (no inmovilizados) (de lisados celulares). Las proporciones y cantidades de las enzimas no se midieron. Los resultados se muestran en la tabla 6.

Enzima	Conversión después de 3 h	Conversión después de 24 h	Conversión después de 27 h ¹
BV-cascada-LCAA CPG (Co^{2+})	<5%	<5%	<5%
BV-cascada-HybCPG VBC (Co^{2+})	63%	63%	88%
2,5-DKCMO, FRE, AlaDH (sin, enzimas no inmovilizadas)	65%	65%	65%

¹ Con readición de oxígeno después de 24 horas

Se llevaron a cabo reacciones de múltiples fases al añadir 1,0 g de BV-cascada-CPG a una mezcla de reacción de tampón fosfato (100 mM, pH 7,5) con L-alanina 160 mM, FMN 0,3 mM y NADH 0,5 mM con un volumen de líquido total de 5,0 ml. Después se añadieron 5 ml de ciclohexano con (+)-alcanfor (100 mM) como una segunda fase

líquida. Se agitó el recipiente sellado en un agitador orbital (100 rpm) a 22°C con adición de oxígeno continua a la fase acuosa. Se tomaron muestras (50 μ l) de la fase orgánica en los puntos de tiempo registrados y se analizaron por CG después de la adición de benzoato de etilo (2,0 mM en EtOAc) como patrón interno. La conversión después de 72 horas se midió después de la extracción de todos los componentes con EtOAc (20 ml).

5 También se llevó a cabo una reacción comparativa con 2,5-DKCMO, FRE y AlaDH libres (no inmovilizados) (de lisados celulares). Las proporciones y cantidades de las enzimas no se midieron. Los resultados se muestran en la tabla 7.

Enzima	Conversión después de 72 h
BV-cascada-LCAA CPG (Co^{2+})	<5%
BV-cascada-HybCPG VBC (Co^{2+})	56%
2,5-DKCMO, FRE, AlaDH (enzimas libres no inmovilizadas)	<5%

10

Ejemplo 8

Preparación de cascada-CPG con CalB y nanopartículas de Pd ("Pd-CalB-CPG")

15 Se sumergió amino-CPG (5 g) en una disolución de $\text{Pd}(\text{TFA})_2$ (0,5 equivalentes a las funcionalidades amino del CPG) en agua (200 ml) y se agitó la mezcla continuamente durante 10 minutos. Después se añadió NaBH_4 (7 equivalentes) y se agitó la mezcla durante 30 minutos adicionales. Después se añadió 2,4-dihidroxiacetofenona (0,5 equivalentes), después de lo cual se agitó la mezcla durante 30 minutos. Se filtró el material sólido y se enjuagó completamente con agua, y después se sumergió en una disolución acuosa saturada de COCl_2 (100 ml). Después de la filtración y el lavado con agua, se sumergió el material sólido en una disolución de CalB etiquetado con polihistidina (purificado o de sobrenadante) y se agitó durante 30 minutos. Después se filtró la preparación inmovilizada, se enjuagó con tampón (MOPS 20 mM, pH 7,4) y después se secó a vacío durante 16 horas.

20

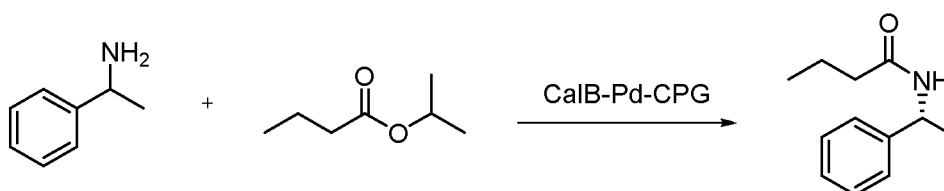
Ejemplo 9

25

Reacción en cascada usando Pd-CalB-CPG

Se aplicó el material preparado en el ejemplo 8 como catalizador en la acilación enantioselectiva de 1-feniletilamina (una resolución cinética dinámica):

30



35 Se sumergieron 100 mg del Pd-CalB-CPG en una disolución de 1,0 ml de tolueno que contiene 1-feniletilamina racémica 20 mM y butirato de isopropilo 100 mM. Se añadió 1 mg de NaBH_4 y se selló la vesícula de reacción. Se incubó el sistema a 65°C con agitación continua en un agitador orbital (100-800 rpm) durante de 24 a 48 horas. La conversión y el exceso enantiomérico del sustrato y el producto (por ejemplo (R)-N-(1-feniletil)butiramida) se midió por CG quiral al tomar las muestras en los puntos de tiempo registrados.

40 Se obtiene el producto por separación de las fases, agitando la fase orgánica con HCl 1 N (tres veces) a fin de eliminar el donador de acilo residual y la amina, y después la extracción de nuevo de las fases de lavado con EtOAc. Las fases orgánicas combinadas se evaporan a vacío para producir el producto, que se purifica adicionalmente por cromatografía instantánea.

Ejemplo 10

45

A. Determinación de la lixiviación de iones de metal

Para determinar la cantidad de ion de metal que se lixivia del portador en las condiciones dadas, los portadores basados en CPG y HybCPG y que contienen o bien Co^{2+} o bien Fe^{3+} se sometieron a incubación prolongada en

tampón acuoso.

Se sometieron 250 mg de cada uno de LCAA CPG, HybCPG VBC y HybCPG copo, con o bien Co^{2+} o bien Fe^{3+} unidos, a incubación en 3 ml de tampón acuoso (HEPES 20 mM, pH 7,0) durante 72 horas en una mesa de agitación a temperatura ambiente.

Se midió la cantidad de Co^{2+} al mezclar una parte de la disolución incubada con una parte de disolución de NH_4SCN (1,0 M), una parte de disolución de HCl (6,0 M) y dos partes de acetona. Este procedimiento revela un color azul proporcional a la concentración de Co^{2+} , que se cuantificó por espectrometría a 620 nm. También se sometió a prueba una muestra en blanco con el tampón solo.

Se midió la cantidad de Fe^{3+} al mezclar una parte de la disolución incubada con una parte de disolución de NH_4SCN (1,0 M) y una parte de disolución de HCl (6,0 M). Este procedimiento revela un color rojo proporcional a la concentración de Fe^{3+} , que se cuantificó por espectrometría a 480 nm. También se sometió a prueba una muestra en blanco con el tampón solo.

Después de eliminar la mitad de las disoluciones (1,5 ml) de los materiales portadores incubados, se añadieron 1,5 ml de disolución de HCl 6,0 M y los materiales se incubaron en el agitador durante 1 hora; este procedimiento desorbe efectivamente todos los iones de metal unidos. Después se mezcló una parte de esta disolución incubada con una parte de disolución de HCl (3 M) y una parte de disolución de NH_4SCN (1,0 M). A las muestras donde Co^{2+} se iba a cuantificar, también se añadieron dos partes de acetona. Se registró la absorbancia a 620 nm para la cuantificación de Co^{2+} , y a 480 nm para la cuantificación de Fe^{3+} . Basándose en las mediciones de absorbancia, los valores que corresponden a la cantidad total de los iones de metal se calcularon para los volúmenes sometidos a prueba en las dos incubaciones diferentes (primero en pH 7,0 y después en HCl 3,0 M), y se corrigió para el volumen eliminado (1,5 ml después de la primera incubación). La fracción de los iones de metal lixiviados a pH 7,0 se podría cuantificar de esta manera. Los resultados se presentan en la siguiente tabla 8.

Portador	iones de metal lixiviados después de 72 h a pH 7,0 (%)
LCAA CPG (Co^{2+})	16
HybCPG VBC (Co^{2+})	14
HybCPG copo (Co^{2+})	7,0
LCAA CPG (Fe^{3+})	1,5
HybCPG VBC (Fe^{3+})	0,36
HybCPG copo (Fe^{3+})	0,61

Puede observarse que el Fe^{3+} unido al material portador de CPG y HybCPG es menos propenso a la lixiviación que Co^{2+} .

B. Determinación de la lixiviación de enzimas

Para determinar la cantidad de enzimas que se disocian del portador en las condiciones dadas, las preparaciones inmovilizadas de ω -TA sobre CPG o HybCPG se sometieron a incubación prolongada en tampón acuoso.

Se incubaron 12-16 mg de cada uno de ω -TA-LCAA CPG, ω -TA-HybCPG VBC y ω -TA-HybCPG copo, en donde la enzima se une a o bien Co^{2+} o bien Fe^{3+} , en 4 ml de tampón acuoso (HEPES 100 mM, pH 7,0) durante 1 minuto en un agitador orbital. Después de este tiempo, no pudieron detectarse enzimas en la disolución. Esto se midió por el ensayo de actividad, en el cual 1 ml de la disolución se usó después de la sedimentación del material inmovilizado. Las preparaciones con los 3 ml restantes se incubaron durante 24 horas en el agitador orbital, después de lo cual algunas de las preparaciones mostraron cantidades medibles de la enzima en la disolución.

El ensayo de la actividad se llevó a cabo al tomar 1 ml de la solución, al añadir 1 ml de mezcla de ensayo (1-feniletilamina (10 mM), piruvato de sodio (5 mM) y PLP (1 μM), disuelto en el mismo tampón), y al medir el cambio de absorbancia a lo largo del tiempo a 245 nm durante 5 minutos. También se sometió a prueba una reacción en blanco con tampón puro. A esta longitud de onda, la formación de acetofenona, un producto de la reacción de transaminación, puede monitorizarse como un aumento de la absorbancia con un coeficiente de extinción de $12 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Schätzle *et al.*, Anal. Chem. 2009, vol. 81, págs. 8244-8248). Puesto que las constantes cinéticas se conocen (Cassimjee *et al.*, Org. Biomol. Chem. 2012, vol. 10, págs. 5466-5470), puede calcularse la cantidad de enzima lixiviada. Antes del experimento de lixiviación, la cantidad de enzima ligada en las preparaciones inmovilizadas se

midió por cuantificación de sitio activo. La cantidad de lixiviación después de 24 horas para cada material se muestra en la tabla 9.

Material	Enzima lixiviada después 24 h a pH 7,0 (%)
ω -TA-LCAA CPG (Co^{2+})	7,9
ω -TA-HybCPG VBC (Co^{2+})	0,4
ω -TA-HybCPG copo (Co^{2+})	n/d
ω -TA-LCAA CPG (Fe^{3+})	3,4
ω -TA-HybCPG VBC (Fe^{3+})	n/d
ω -TA-HybCPG copo (Fe^{3+})	n/d

5 Los valores muestran que las condiciones sometidas a prueba, Fe^{3+} como ion de metal quelado da como resultado menos lixiviación de enzimas. El HybCPG copo como portador no dio como resultado ninguna lixiviación de enzimas detectable en las condiciones seleccionadas con o bien Co^{2+} o bien Fe^{3+} como ion de metal quelado. LCAA CPG, que tiene una superficie vítrea, dio la cantidad más alta de la lixiviación de enzimas. Esto puede ser el resultado de la unión enzimática no específica a la superficie vítrea.

10

Ejemplo 11

Purificación de ω -TA etiquetado con polihistidina con HybCPG copo (Co^{2+})

15 Se preparó lisado celular (5,0 ml) de un cultivo de 24 horas inducido por IPTG sedimentado de ω -TA en 100 ml de medio de Luria-Bertani con la adición de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de kanamicina mediante el uso de BugBusterTM. Se añadió un exceso de coenzima (PLP) y la disolución se incubó a 37°C durante 1 hora. Después se retiró PLP en exceso (no unido por la enzima) mediante cambio de tampón, usando una columna PD10 (dos rondas), a un tampón HEPES (50 mM, NaCl 500 mM, pH 8,2 (tampón 1)), que dio 7,0 ml de disolución que contiene la holoenzima diana, proteínas nativas y otras impurezas.

20

Se cargó una columna con 204 mg de HybCPG copo (Co^{2+}) que contiene 26 $\mu\text{mol}/\text{g}$ de Co^{2+} . El material se humedeció previamente al añadir 7,0 ml de tampón 1, y el flujo pasante se descartó.

25 Se mide la holoenzima activa espectrofotométricamente a 395 nm, $\epsilon=8,1 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Cassimjee *et al.*, ACS Catal. 2011, vol. 1, págs. 1051-1055). Después de la medición de la absorbancia, se añadió el lisado a la columna, y se recogió el flujo pasante. Se midió la diferencia de la absorbancia a esta longitud de onda del lisado antes y después de pasar a través de la columna a 0,62 (todas las mediciones se llevaron a cabo con una longitud de trayectoria de 1,0 cm). Esto corresponde a 29 mg de enzima, ahora unida al portador HybCPG copo (Co^{2+}) en la columna.

30

Después se lavó la columna con 7,0 ml de tampón 1. Se recogió el flujo pasante del cual se midió la absorbancia a 0,11, con el tampón 1 como blanco. Esto corresponde a 5 mg de enzima que se retiró por lavado de la columna, presumiblemente debido a una enzima no específicamente unida o no unida, dejando 24 mg de enzima unida en la columna.

35

Se llevó a cabo disociación de la enzima unida en la columna al aplicar 5,0 ml de tampón Tris (50 mM, imidazol 500 mM, pH 7,5 (tampón 2)). Se recogió el flujo pasante y se añadió nuevamente un exceso de coenzima. Tal como se describió anteriormente, se retiró PLP en exceso mediante cambio de tampón, usando una columna PD10, al tampón 1, dando un volumen total de 7,0 ml de la disolución con holoenzima disuelta. Se midió la absorbancia a 0,465. Esto corresponde a 22 mg de enzima purificada, o a un rendimiento del 92%. La disolución parecía significativamente limpia de proteína de células huésped contaminantes, lo que también se confirmó por SDS-PAGE.

40

REIVINDICACIONES

- 5 1. Material proteico inmovilizado que comprende un portador y al menos una proteína inmovilizada sobre el portador, en el que el portador comprende un material portador al que se une una matriz de afinidad, eligiéndose dicho material portador del grupo que consiste en:
- (a) vidrio de porosidad controlada (CPG); y
(b) vidrio de porosidad controlada híbrido (CPG híbrido);
- 10 en el que la al menos una proteína contiene una etiqueta de afinidad y se inmoviliza sobre el portador mediante unión por afinidad específica a la matriz de afinidad, en el que la etiqueta de afinidad es una etiqueta de polihistidina, y en el que la matriz de afinidad contiene un ion de metal quelado.
- 15 2. Material proteico inmovilizado según la reivindicación 1, en el que el material portador es vidrio de porosidad controlada (CPG).
3. Material proteico inmovilizado según la reivindicación 1, en el que el material portador es vidrio de porosidad controlada híbrido (CPG híbrido).
- 20 4. Material proteico inmovilizado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el ion de metal quelado es Co^{2+} .
5. Material proteico inmovilizado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la al menos una proteína es una enzima.
- 25 6. Material proteico inmovilizado según la reivindicación 5, que comprende dos o más enzimas inmovilizadas.
7. Material proteico inmovilizado según la reivindicación 5 ó 6, que comprende además nanopartículas de metal.
- 30 8. Material proteico inmovilizado según la reivindicación 7, en el que las dichas nanopartículas de metal son nanopartículas de metales de transición.
- 35 9. Material proteico inmovilizado según la reivindicación 7 u 8, en el que las nanopartículas de metal se seleccionan del grupo que consiste en nanopartículas de cobalto, níquel y paladio.
- 40 10. Uso de un portador que comprende un material portador al que se une una matriz de afinidad, eligiéndose dicho material portador del grupo que consiste en:
- (a) vidrio de porosidad controlada (CPG); y
(b) vidrio de porosidad controlada híbrido (CPG híbrido);
- 45 para la inmovilización de proteínas, en el que las proteínas se inmovilizan sobre el portador mediante unión por afinidad específica a la matriz de afinidad, y en el que la matriz de afinidad contiene ion de metal quelado que puede unirse a una proteína con etiqueta de polihistidina.
- 50 11. Uso según la reivindicación 10, en el que el material portador es vidrio de porosidad controlada (CPG).
12. Uso según la reivindicación 10, en el que el material portador es vidrio de porosidad controlada híbrido (CPG híbrido).
- 55 13. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en el que el ion de metal quelado es Co^{2+} .
14. Uso del material proteico inmovilizado según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, como catalizador heterogéneo.

Fig. 1

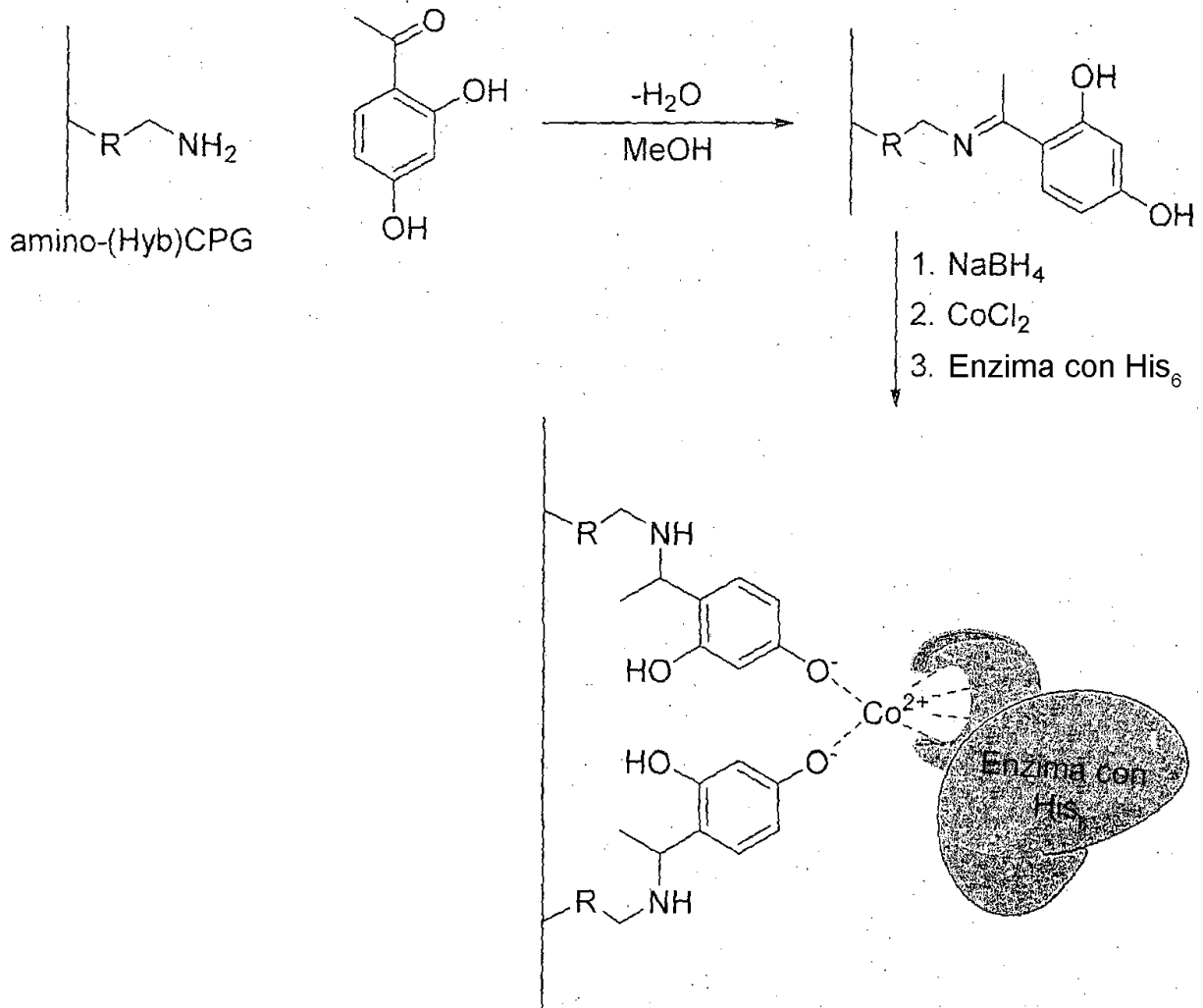
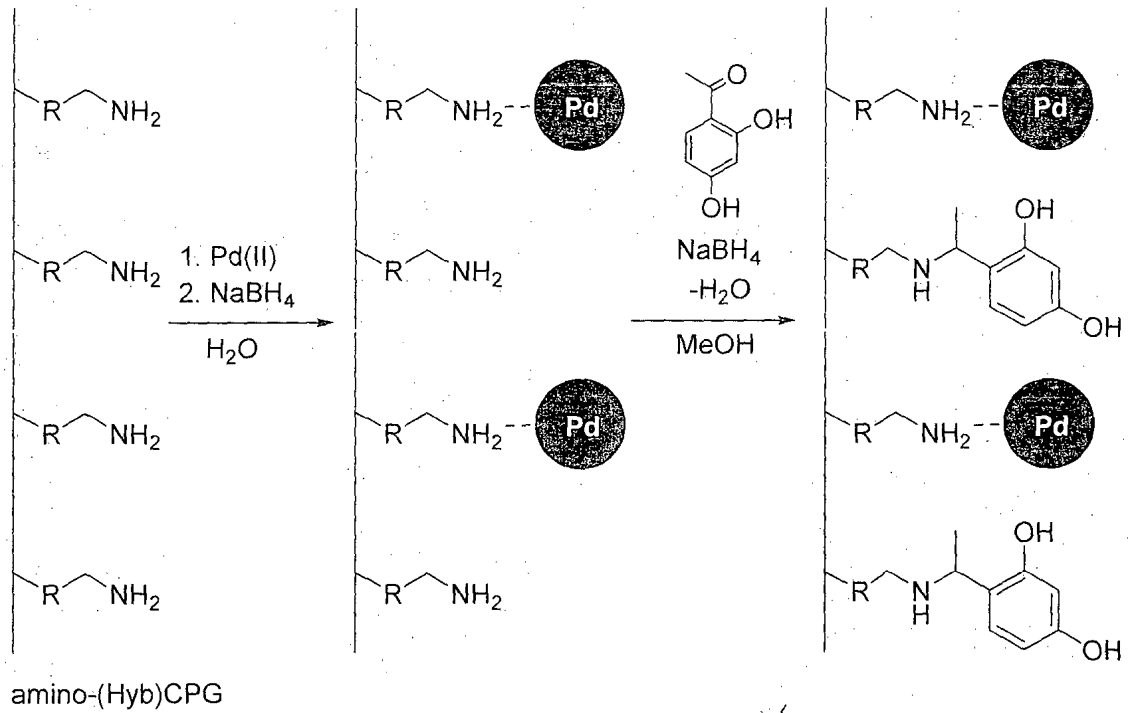


Fig. 2



1. Co(II)
 2. Enzima con His₆

