



REGISTRO DE LA
PROPIEDAD INDUSTRIAL

ESPAÑA

①① N.º de publicación: ES 2 009 450
 ②① Número de solicitud: 8803769
 ⑤① Int. Cl.⁴: C07K 17/12
 C12N 11/12

⑫

PATENTE DE INVENCION

A6

②② Fecha de presentación: **12.12.88**④⑤ Fecha de anuncio de la concesión: **16.09.89**④⑤ Fecha de publicación del folleto de patente:
16.09.89⑦③ Titular/es: **Consejo Superior Investigaciones
Científicas
Dept. Química Orgánica,
Universidad Madrid
Serrano, 117, Madrid, ES**⑦② Inventor/es: **Sánchez Montero, José María;
Sinisterra Gago, José Vicente y
Ballesteros Olmo, Antonio**⑦④ Agente: **Polo Sanz, Modesto**⑤④ Título: **Procedimiento de activación de zuro de maíz mediante sulfonación para la insolubilización de ligandos y proteínas.**

⑤⑦ Resumen

Se describe la reacción de activación, mediante cloruros de sulfonilo, de zuro molido y sometido a diversos tipos de lavado. El sólido resultante queda muy funcionalizado, siendo muy estables los grupos sulfonato introducidos. Este sólido activado es muy reactivo para insolubilizar en el ligandos o proteínas a través de grupos amino y/o sulfhidrilo de estas moléculas.

DESCRIPCION

La fijación de moléculas a sólidos -insolubilización- (1) ha resuelto dos graves limitaciones que para su utilización a escala industrial presentan, en principio, los enzimas nativos (solubles), permitiendo: 1) recuperar el biocatalizador para su posterior reutilización; y 2) aumentar su estabilidad. Es por ello que en la mayoría de los procesos industriales con biocatalizadores, éstos se usan en su forma insoluble.

Aunque la fijación de moléculas a sólidos puede ser de varios tipos, se prefiere la fijación por enlace covalente por la mayor fortaleza de la unión que se forma. El procedimiento más usado hasta ahora para insolubilizar moléculas consiste en la activación del sólido (soporte) con bromuro de cianógeno (2). Este método, aunque supuso un hito para el desarrollo de la bioquímica en fase sólida, actualmente se emplea menos porque el enlace que se forma con la molécula no es muy fuerte (y ésta puede separarse del soporte), y además introduce una carga iónica extra (3, 4). Por otra parte, un segundo método muy usado, el del glutaraldehído (5), requiere un elevado número de pasos y el procedimiento es difícilmente controlable y reproducible (6 y 7). De entre los nuevos métodos de insolubilización de moléculas, uno de los que más prometen actualmente es el que emplea los cloruros de sulfonilo (8, 9, 10, 11), mediante el cual la unión se realiza a través de los grupos amino y/o sulfhidrilo de la molécula: de esta manera, los enlaces formados son muy estables y no introducen cargas iónicas adicionales.

Como soporte se han usado sólidos de muy diversos tipos, tanto orgánicos (polisacáridos, poliácridamidas, etc.) como inorgánicos (silicatos, vidrios macroporosos, etc.). A la hora de elegir un soporte para utilización industrial se deben considerar muchos factores: posibilidades de funcionalización, propiedades mecánicas, resistencia a la temperatura, precio, etc. En los trabajos de investigación los soportes más empleados han sido vidrios macroporosos y geles de agarosa, que sin embargo no son adecuados para aplicaciones industriales principalmente por su precio, los primeros, y por su alta compresibilidad y poca resistencia térmica, los segundos.

En el estudio que venimos llevando a cabo sobre nuevos soportes y métodos de insolubilización hemos desarrollado un procedimiento de activación de zuro de maíz mediante cloruros de sulfonilo. El zuro o carozo (corazón o raspa de la panoja del maíz después de desgranada) es un desecho vegetal abundante que convenientemente molido puede servir como soporte. Es un material no poroso, muy duro y resistente a la compresibilidad y a la temperatura, y -como todos los materiales lignocelulósicos- muy resistente a la contaminación microbiana.

El método de funcionalización o activación ha sido el tratamiento con cloruros de sulfonilo mediante modificaciones introducidas por nosotros en procedimientos anteriores (9). De esta manera se obvian muchas de las dificultades apuntadas anteriormente referentes a soportes y a métodos de activación. Los cloruros de sulfonilo reac-

cionan con los grupos alcohol primario de los azúcares y también con los grupos fenólicos (de la lignina del zuro), consiguiéndose una activación de ésta muy alta. Los sulfonatos obtenidos son muy buenos "grupos salientes", facilitando la posterior reacción con moléculas que tengan grupos amino y/o sulfhidrilo. Este procedimiento tiene la peculiaridad de que entre el soporte y la molécula a insolubilizar se forma un enlace directo (tipo amina secundaria o tioeter), es decir, que no se introduce ningún brazo conector procedente del reactivo utilizado en la activación. Los ligandos y otras moléculas que por este procedimiento hemos insolubilizado en zuro al que previamente habíamos sometido a diversos tratamientos, poseen alta actividad, resistencia a la temperatura y magníficas propiedades mecánicas.

Los haluros de sulfonilo utilizables para activar al zuro son cloruro de p-toluensulfonilo, cloruro de bencensulfonilo, cloruro de tionilo, cloruro de trifluoroetanosulfonilo.

Los ligandos y sustancias proteínicas activas son aminoácidos, cofactores, antibióticos, hormonas, proteínas, enzimas, células (es decir, cualquier molécula que posea al menos un grupo amino y/o sulfhidrilo).

La invención se ilustra con ayuda del procedimiento y ejemplos siguientes:

Para la activación del zuro de maíz se procedió, previamente, a la obtención de acetona pura y seca (12).

Ejemplo 1:

Se pesa zuro de maíz (1 g) (con un diámetro de partícula de aproximadamente 0.8 mm) y se le añaden (todas las cantidades en los ejemplos 1-9 se dan por gramo de zuro) 50 ml de acetona pura y seca y 1 g de p-toluensulfonilo (cloruro de tosilo, TsCl). A continuación se añade lentamente con agitación 1 ml de piridina y se mantiene la mezcla en agitación durante 20 h a temperatura ambiente. Seguidamente se filtra la mezcla por gravedad, lavando el soporte con 90 ml de acetona pura y seca, en dos porciones, una de 60 y otra de 30 ml.

El grado de funcionalización del zuro de maíz se determina realizando la hidrólisis alcalina (con NaOH 1 N; 24 h) del zuro tosulado y determinando por espectrofotometría UV (λ 256.8 nm), la cantidad de tosيلات liberados por la muestra. En este caso el número de grupos tosilo presente en el zuro de maíz fue de 86 μ moles/g de zuro.

Ejemplo 2.

Se toma 1 g de zuro y se realiza la activación en las mismas condiciones que en el ejemplo 1, excepto que se añade 1 ml de etanolamina. El número de grupos tosilo fue en este caso de 60 μ moles/g de zuro.

Ejemplo 3

Se toman 0.5 g de zuro de maíz y se realiza la activación en las mismas condiciones que en el ejemplo 1. El número de grupos tosilo unidos al zuro es en este caso de 53 μ moles tosilo/g soporte.

Ejemplo 4

Se toman 0.5 de zuro de maíz y se realiza la activación en las mismas condiciones que en el ejemplo 1 excepto que el tiempo de tosilación fue de 1 h. El número de grupos tosilo unidos al zuro es en este caso de 10 μ moles tosilo/g zuro.

Ejemplo 5

Se realizó la tosilación del zuro en condiciones análogas a las del ejemplo 3 pero el tiempo de tosilación fue de 9 h. El número de grupos tosilo unidos al zuro es en este caso de 40 μ moles tosilo/g zuro.

Ejemplo 6

Se pesa zuro de maiz (2 g) y se le añaden (por cada g) 20 ml de agua destilada, agitándose la mezcla durante 24 h a temperatura ambiente. Seguidamente se filtra el sólido, recogiendo un filtrado amarillento, que se desprecia. El sólido se lava con 2 x 30 ml H₂O y después con 2 x 30 ml de acetona pura y seca. El sólido tratado se somete a las condiciones de tosilación indicadas en el ejemplo 1, pero el tiempo de tosilación fue de 24 h a temperatura ambiente. El número de grupos tosilo unidos al zuro fue en este caso de 34 μ moles tosilo/g soporte.

Ejemplo 7.

Se toma zuro de maiz (2 g) y se le añaden 20 ml de HCl 0.1 N, agitándose la mezcla durante 24 h a temperatura ambiente. Seguidamente se filtra el sólido, recogiendo un filtrado ligeramente amarillento, que se desprecia. El sólido se lava como en el ejemplo 6 y se tosila durante 24 h en las condiciones del ejemplo 1. El número de grupos tosilo unidos al zuro es en este caso de 26 μ moles tosilo/g soporte.

Ejemplo 8

Se trata zuro (2 g) con 20 ml de tampón 0.1 N carbonato-bicarbonato, pH9, durante 24 h a temperatura ambiente. Seguidamente se filtra la mezcla recogiendo un filtrado amarillo intenso, quedando el sólido de color amarillo claro. El sólido se lava como en el ejemplo 6 y se tosila durante 24 h en las condiciones del Ejemplo 1. El número de grupos tosilo unidos al zuro en este caso es 26 μ moles tosilo/ soporte.

Ejemplo 9

Se trata zuro de maiz (2g) con 20 ml de NaOH 1 N durante 24 h a temperatura ambiente y con agitación. Seguidamente se filtra la mezcla recogiendo un filtrado rojizo y un sólido blanco amarillento. La destrucción del sólido es evidente pues de los 2 g de partida sólo se recogieron 0.6 g. El sólido se lavó como en el Ejemplo 6 y se tosilo durante 24 h en las condiciones del Ejemplo 1. El número de grupos tosilo al zuro es en este caso 41 μ moles tosilo/g zuro de maiz (peso final).

Utilización de los derivados tosilados de zuro de maiz en la inmovilización de Proteínas y otros ligandos

A fin de comprobar que nuestros derivados tosilados de zuro de maiz eran útiles para la insolubilización de proteínas y ligandos, se procedió a insolubilizar: A) endonucleasa de *Staphylococcus aureus*; y B) lisina.

A) La inmovilización de endonucleasa se realizó según un método similar al descrito por nosotros previamente para el caso de agarosa tosilada (11). Estos derivados se utilizaron en la hidrólisis de DNA desnaturizado. Algunos de los resultados obtenidos, prueba de la validez del método para el caso de insolubilización de macromoléculas proteinicas, se dan a continuación:

A	B	C	D
R-2	—	58	45
R-HCl	HCl 0.1 N	92	45
R-H ₂ O	H ₂ O	85	45
R-NaOH	NaOH 1 N	68	45
R-CO ₃	Na ₂ CO ₃ / NaHCO ₃ pH = 9.0	82	45

Siendo

A = Muestra

B = Tratamiento

C = %DNA hidrolizado (3h)

D = T de hidrólisis (°C)

B) Unión de lisina al zuro tosilado

Ejemplo 10:

A 0.5 g de soporte R-HCl (zuro que habia sido lavado con HCl y tosilado después) se le añaden 10 ml de tampón Na₂CO₃ /NaHCO₃ 0-1 M, PH 9-0, y 0-1891 g de lisina; y se agita durante 90 min a temperatura ambiente. Seguidamente se filtra y lava con 5 ml del tampón. La cantidad de lisina ligada se determinó por diferencia, midiendo mediante dinitrofluorobenceno y utilizando cromatografía líquida de alta presión- la lisina que no se habia unido al soporte activado. En este experimento se unió el 24 % de la lisina añadida.

Ejemplo 11:

Igual que el ejemplo 10 pero el tiempo de reacción fue de 24 h. La cantidad de lisina unida fue del 27 %.

Ejemplo 12:

Igual que el ejemplo 10 pero con 0.3782 g de lisina. El 16.5 % de ésta quedó ligada al soporte.

Ejemplo 13

Igual que el Ejemplo 10 pero con 0.3782 g de lisina. La cantidad de lisina unida fue del 30 %

Bibliografía

1. K.Kosbach, (ed.) *Methods in Enzymology*, vol 44 (1976)
2. R. Axen, J. Porath & S.Ernback, *Nature* 214, 1302 (1967).
3. M. Wilcheck, T.Oka & Y.J. Topper, *Proc. Natl. Acad. Sci.USA.* 72, 1055 (1975).
4. J.Kohn & M. Wilchek, in W.H. Scouten (ed.), *Solid Phase Biochemistry*, Wiley, New York, 1983, p. 599.
5. P.D. Weston and S. Avrameas, *Biochem. Biophys. Res Commun.* 45, 1574 (1971).
6. P. Monsan et al., *Biochimie* 57, 1281 (1975).
7. M.S. Casero y J.V. Sinisterra, observaciones sin publicar.
8. T.C.J.Gribnau, Tesis Doctoral, Universidad d Nijmegen (Holanda), 1977.
9. K. Nilsson and K. Mosbach, *Eur. J. Biochem.* 112, 397 (1980).

10. W.H.Scouten and W. van der Tweel, en Affinity Chromatography and Biological Recognition, Eds. Chaiken, M. Wilchek and I. Parik, Acdademic Press, New York 1983, p 299.

5

11. A. Ballesteros, J.M. Sánchez Montero and

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

J.V.Sinisterra, J. Mol. Cat. 38, 227 (1986).

12. A.I. Vogel, A. Textbook in Practical Organi Chemistry, Longmans New York, 3a. ed., 1974, p. 171

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de activación de zuro de maíz mediante sulfonación para la insolubilización de ligandos y proteínas **caracterizado** porque el zuro se muele y tamiza hasta tamaño adecuado, se trata con acetona pura y seca, y se añade un cloruro de sulfonilo y posteriormente piridina o aminas alifáticas, manteniéndose la reacción en agitación a temperatura ambiente durante 20 h; transcurrido este tiempo se lava con acetona pura y seca siguiendo el procedimiento descrito por nosotros para geles de agarosa; una vez obtenido el sólido activado, puede procederse a la fijación de la molécula de que se trate o bien ser almacenado largo tiempo antes de realizar la fijación; durante este almacenamiento no se pierde su capacidad de insolubilizar moléculas.

2. Un procedimiento según reivindicación

1 **caracterizado** porque el tiempo de reacción puede estar comprendido entre 1 y 48 horas.

3. Un procedimiento según reivindicación 1 **caracterizado** porque el sólido, antes de proceder a su activación, se somete a una extracción previa con agua destilada a temperatura ambiente durante 24 h., se filtra y se lava con agua y con acetona.

4. Un procedimiento según reivindicación 1 **caracterizado** porque el soporte se somete a una extracción previa con HCl durante 24 h a temperatura ambiente, se filtra y se lava con agua y con acetona.

5. Un procedimiento según reivindicación 1 **caracterizado** porque el soporte se somete a una extracción previa con solución tampón durante 24 h a temperatura ambiente, se filtra y se lava con agua y acetona.

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65