

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 932 900**

21 Número de solicitud: 202130699

51 Int. Cl.:

**C07F 7/02** (2006.01)

**C07F 7/04** (2006.01)

**C07B 63/04** (2006.01)

**B03C 1/01** (2006.01)

**B82Y 5/00** (2011.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**20.07.2021**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**27.01.2023**

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD DE ALCALÁ (100.0%)**  
**Plaza de San Diego, s/n**  
**28801 Alcalá de Henares (Madrid) ES**

72 Inventor/es:

**GARCÍA LÓPEZ, M<sup>a</sup> Concepción;**  
**MARINA ALEGRE, M<sup>a</sup> Luisa;**  
**GÓMEZ RAMÍREZ, Rafael;**  
**DE LA MATA DE LA MATA, F. Javier;**  
**PRADOS NIETO, Isabel;**  
**BARRIOS GUMIEL, Andrea y**  
**SÁNCHEZ-NIEVES FERNÁNDEZ, Javier**

54 Título: **EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS CON NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS ESTABILIZADAS CON SISTEMAS DENDRÍTICOS CARBOSILANO**

57 Resumen:

Extracción y purificación de proteínas con nanopartículas magnéticas estabilizadas con sistemas dendríticos carbosilano.

La presente invención se refiere a la extracción o purificación de proteínas utilizando nanopartículas magnéticas (NPM) de óxido de hierro (magnetita:  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), recubiertas en su superficie con moléculas dendríticas de estructura carbosilano, funcionalizadas en su periferia con grupos activos que preferiblemente están en forma aniónica. Esta extracción se lleva a cabo en medio acuoso sin utilizar disolventes orgánicos. La presente invención también se refiere al procedimiento de reutilización de las NPM para dicho uso.

ES 2 932 900 A1

**DESCRIPCIÓN****EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS CON NANOPARTÍCULAS  
MAGNÉTICAS ESTABILIZADAS CON SISTEMAS DENDRÍTICOS CARBOSILANO**

5

La presente invención se refiere a la extracción o purificación de proteínas utilizando nanopartículas magnéticas (NPM) de óxido de hierro (preferentemente magnetita;  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), recubiertas en su superficie con moléculas dendríticas de estructura carbosilano, que a su vez están funcionalizadas en su periferia con grupos activos que preferiblemente están en forma aniónica. Esta extracción se lleva a cabo en medio acuoso sin utilizar disolventes orgánicos. La presente invención también se refiere al procedimiento de reutilización de las NPM para dicho uso.

10

**ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR**

15

La purificación/extracción de proteínas es una etapa tediosa que habitualmente requiere la utilización de reactivos y disolventes contaminantes y no reutilizables que, en definitiva, no son sostenibles (Wu, X., *et al. Proteomics* **2014**, 14, 645). Como consecuencia de este hecho, es importante el desarrollo de estrategias alternativas a los métodos habitualmente empleados que utilicen, por ejemplo, agua como medio de extracción.

20

Las nanopartículas magnéticas (NPM) han atraído gran atención por su gran relación superficie/volumen y por poder ser separadas o guiadas por un campo magnético externo (Akbarzadeh, A. *et al. Nanoscale Research Letters* **2012**, 7, 144). Entre ellas, las formadas por óxidos de hierro (magnetita,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ; maghemita,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) destacan por su biocompatibilidad. Sin embargo, su aplicabilidad en un determinado campo requiere de una adecuada funcionalización. Además, el recubrimiento de la superficie puede favorecer su dispersión en estado líquido y, por tanto, su utilización. Entre sus aplicaciones se pueden destacar la bioseparación, la detección molecular o la concentración de analitos (Oksvold, M. P. *et al. Methods Mol Biol* **2015**, 1218, 465). Las NPM recubiertas con diferentes ligandos han sido empleadas en la purificación de distintas enzimas y proteínas (Farzi-Khajeh, H. *y col. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2019**, 175, 644; Cimen, D. *y col., Separation Science and Technology* **2020**, 55, 2259; Xu, J. *y col. Molecules* **2014**, 19, 11465; Gu, H. *y col. Chemical Communications*, **2006**, 9, 941; Nicolás, P. *y col. Journal of Food Engineering*, **2019**, 263, 380). En la mayor parte de estos trabajos, no se ha comprobado la validez de la

30

35

aplicación de las NPM con muestras reales sino con proteínas patrón. Además, en ninguno de estos trabajos se ha evaluado la posibilidad de reutilización de estos materiales.

5 Un tipo de moléculas que se ha utilizado recientemente para estabilizar NP, y que además tiene un atractivo específico para aplicaciones biomédicas, son las moléculas dendríticas (MD) (Newkome, G. R.; Shreiner, C. D. *Polymer* **2008**, 49, 1). Las MD, dendrímeros y dendrones, son moléculas hiperramificadas de construcción arborescente, de tamaño y estructura tridimensional bien definidos y que poseen unas propiedades  
10 químicas uniformes debidas, en parte, a su baja polidispersidad como consecuencia de su síntesis controlada. Los dendrímeros y dendrones de mayores generaciones presentan una topología molecular esférica. En ambos casos, su superficie contiene los grupos activos de estas moléculas. Además, en el caso de los dendrones, éstos presentan una posición adicional denominada punto focal, que puede servir para  
15 introducir una nueva función activa o como anclaje a otros sistemas, como por ejemplo una NP.

Las MD o sistemas modificados con ellas pueden interactuar con distintas biomacromoléculas. Esta interacción dependerá del tipo de función que presenten las MD  
20 en su periferia y está relacionada con la multivalencia de las mismas, ya que presentan un número elevado de funcionalidades sobre una misma molécula. Por ejemplo, sistemas dendríticos con grupos aniónicos o catiónicos interactúan con péptidos o proteínas en función de la carga del sistema dendrítico y del punto isoeléctrico de la proteína. Además, esta capacidad se mantiene si estos sistemas dendríticos se incorporan a NP de oro  
25 (Vásquez-Villanueva, R. et al. *Microchimica Acta* **2019**, 186, 508). Este tipo de sistemas se han ensayado para la extracción de proteínas y son capaces de interactuar selectivamente con algunas proteínas en función de la carga y tamaño de estas. Desafortunadamente, la separación del medio de estos conjugados MD-proteína no resulta fácil por tener comportamientos similares a las proteínas libres.

30

En este sentido, si la funcionalización con MD se realizara sobre NPM, se podría plantear que la interacción específica de estas NPM modificadas (NPM-MD) con determinadas proteínas permitiría, por una parte, la concentración de estas sobre las NPM-MD, y por otra, la aplicación de un campo magnético que retiraría el sistema NPM-MD-proteína del  
35 medio separándolo de otras moléculas. Por ejemplo, los sistemas NPM-MD se han mostrado útiles para interactuar con virus en un medio biológico que los contiene

(Barrios-Gumiel, A. et al. *Colloids Surf. B* **2019**, 181, 360). La separación de dichas NPM-MD del medio mostraba que la infectividad de la muestra se reducía. Sin embargo, se ha comprobado que las condiciones empleadas para que tuviera lugar la interacción de las NPM-MD con el virus no son adecuadas en el caso de las proteínas y, además, en aquel trabajo no era posible la reutilización de las NPM-MD donde quedaba retenido el virus.

Finalmente, si una vez separado este nanoconjugado NPM-MD-proteína, es posible romper esta interacción y separar las NPM-MD de las proteínas, estaríamos ante un sistema muy atractivo frente a las metodologías empleadas en la actualidad, tanto a escala laboratorio como a escala industrial, para la extracción/purificación de proteínas. La utilización de las NPM-MD en la recuperación/purificación de proteínas se convertiría en un proceso mucho más sencillo ahorrando tiempo y disolventes y haciéndolo más sostenible desde el punto de vista medioambiental.

## DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona un método de separación de proteínas y péptidos utilizando nanopartículas magnéticas (NPM) de óxido de hierro, preferentemente de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), pero sin descartar otros como maghemita ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ). Estas NPM están recubiertas de moléculas dendríticas (MD) de estructura carboxilano que están funcionalizados en su periferia con grupos aniónicos (por ejemplo, como carboxilato, sulfonato o fosfato), catiónicos (grupos amonio) o neutros (grupos carboxílicos, sulfónicos y amino) (Figuras 1-4). Este tipo de NPM-MD corresponden con las que se encuentran ya descritas en Barrios-Gumiel, A. et al. *Colloids Surf. B* **2019**, 181, 360; o en la solicitud de patente española ES2830873A1 (Figura 5).

Por tanto, un primer aspecto de la presente invención se refiere a una NPM-MD (a partir de ahora compuesto de la invención) que comprende:

-Un núcleo compuesto por óxido de hierro, preferentemente magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) de tamaño nanoscópico. Este núcleo puede tener una disposición de sus átomos esférica, cilíndrica, de prisma u otras, con al menos una dimensión entre 1 y 1000 nm.

-La superficie de la NPM está a su vez recubierta por al menos una molécula dendrítica (MD). Por "molécula dendrítica" se refiere en la presente invención a una macromolécula muy ramificada donde las unidades, ramas o ramificaciones de crecimiento tienen esqueleto carboxilano y esta molécula dendrítica está funcionalizada en su capa externa con grupos aniónicos seleccionados de grupos carboxilato o

sulfonatos, con grupo catiónicos seleccionados de grupo amonio o con grupos neutros seleccionados de grupos carboxílicos, sulfónicos y amino y que comprende una cadena anclante de fórmula  $-\text{Si}-(\text{CH}_2)_b-\text{R}^1-(\text{CH}_2)_a-$  donde:

la molécula dendrítica está unida al núcleo por el átomo de Si,

5 a es un número entero que varía entre 0 a 10;

b es un número entero que varía de 1 a 10, preferiblemente varían de 1 a 5; y

R<sup>1</sup> se selecciona de entre un grupo urea, carbamato, tiocarbamato, tiourea o un grupo triazol, preferentemente es un grupo urea.

10

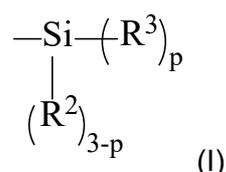
Este compuesto dendrítico es preferentemente un dendrón (Figuras 1 y 3), también denominado este último como cuña dendrítica, que se refiere a una macromolécula muy ramificada con forma de cono y que está definida por un punto focal, las unidades, ramas o ramificaciones de crecimiento, que parten de dicho punto focal y la capa externa, superficie o periferia de dichas ramificaciones, que incorpora grupos funcionales, y

15

donde:  
-el punto focal del dendrón es la cadena anclante de fórmula  $-\text{Si}-(\text{CH}_2)_b-\text{R}^1-(\text{CH}_2)_a-$  donde: el dendrón está unido al núcleo por el átomo de Si, a es un número entero que varía entre 1 a 10, preferiblemente entre 1 y 5; y b y R<sup>1</sup> están definidos en la

20

anteriormente; y  
-la capa externa del dendrón consiste en unidades iguales o diferentes del grupo de fórmula (I):



donde: R<sup>2</sup> es un grupo alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>), preferiblemente R<sup>2</sup> es un grupo metilo;

25

p es un número entero y varía entre 1 y 3, preferiblemente p es 2;

R<sup>3</sup> es el siguiente grupo  $-(\text{CH}_2)_c-\text{S}-(\text{CH}_2)_d-\text{R}^4$ ;

c representa un número entero que varía de 2 a 5; preferiblemente c es 2 ó 3;

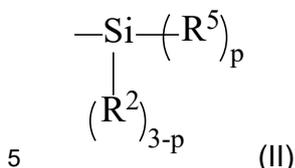
d representa un número entero que varía de 1 a 10; preferiblemente d varía entre 1 y 5; y

30

R<sup>4</sup> se selecciona de entre  $-\text{NR}'\text{R}''$ ,  $-\text{NR}'\text{R}''\text{R}'''$ ,  $-\text{COOR}'$ ,  $-\text{COO}^-$ ,  $-\text{SO}_3\text{R}'$  y  $-\text{SO}_3^-$ ,

donde R', R'' y R''' representan de manera independiente un grupo alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) o un hidrógeno. Preferiblemente, R<sup>4</sup> es un grupo  $-\text{CO}_2^-$ , un grupo  $-\text{CO}_2\text{H}$  o un grupo  $-\text{NMe}_3^+$ ; y más preferiblemente c es 2 o 3 y aún más preferiblemente d es 1 o 2.

Cuando este compuesto dendrítico es preferentemente un dendrímero carbosilano, este dendrímero se encuentra heterofuncionalizado (ver por ejemplo WO 2014016460) y consiste en una capa externa, que presenta unidades iguales o diferentes del grupo de fórmula (II):



donde: R<sup>2</sup> es un grupo alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>), preferiblemente R<sup>2</sup> es un grupo metilo;

p es un número entero y varía entre 1 y 3, preferiblemente p es 2;

R<sup>5</sup> es el grupo -(CH<sub>2</sub>)<sub>c</sub>-S-(CH<sub>2</sub>)<sub>d</sub>-R<sup>6</sup>;

c representa un número entero que varía de 2 a 5; preferiblemente c es 2 ó 3;

d representa un número entero que varía de 1 a 10; preferiblemente d varía entre 1 y 5;

R<sup>6</sup> se selecciona de entre -NR'R'', -NR'R''R''', -COOR', -COO<sup>-</sup>, -SO<sub>3</sub>R' y -SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, donde R', R'' y R''' representan de manera independiente un grupo alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) o un hidrógeno, y con la condición que al menos un grupo R<sub>6</sub> de la capa externa del dendrímero consiste en la cadena anclante de fórmula -Si-(CH<sub>2</sub>)<sub>b</sub>-R<sub>1</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>- donde el dendrímero está unido al

núcleo por el átomo de Si, y a, b y R<sub>1</sub> están definidos anteriormente. Preferiblemente, R<sup>6</sup> es un grupo -CO<sub>2</sub><sup>-</sup>, un grupo -CO<sub>2</sub>H, o un grupo -NMe<sub>3</sub><sup>+</sup>, más preferiblemente c es 2 o 3 y aún más preferiblemente d es 1 o 2. Por lo tanto, este átomo de silicio presente en dicha cadena es el que ancla el dendrímero a la superficie de la NPM.

El término "alquilo" se refiere en la presente invención a cadenas alifáticas, lineales o ramificadas, que tienen de 1 a 4 átomos de carbono, por ejemplo, metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, tert-butilo o sec-butilo, preferiblemente tiene de 1 a 2 átomos de carbono, más preferiblemente el grupo alquilo es un metilo o un etilo.

El compuesto de la presente invención es preferiblemente aniónico, por ejemplo formado R<sup>4</sup> o R<sup>6</sup> por grupos carboxilato (-CO<sub>2</sub><sup>-</sup>). Por lo tanto, la presente invención no solo incluye los compuestos por sí mismos, sino cualquiera de sus sales. Preferiblemente las sales son de sodio o potasio.

Cuando el compuesto de la presente invención es preferiblemente catiónico, formado R<sup>4</sup> o R<sup>6</sup> por grupos amonio (por ejemplo -NH<sub>3</sub><sup>+</sup> o -NMe<sub>3</sub><sup>+</sup>), la presente invención no solo incluye los compuestos por sí mismos, sino cualquiera de sus sales. Preferiblemente las sales son de halogenuro, que se pueden seleccionar entre sales de cloruro, bromuro,

ioduro; u otro tipo de aniones como triflato. Preferiblemente las sales son de ioduro y cloruro.

5 Un segundo aspecto de la presente invención incluye la extracción de las proteínas, que se lleva a cabo utilizando agua preferentemente, de manera que se evita el uso de disolventes orgánicos. Además, la presente invención también describe la reutilización de las NPM-MD.

10 Las NPM-MD (preferentemente de segunda generación, figura 5) se dispersan en agua y se ponen en contacto durante un tiempo determinado, preferentemente de entre 1 minuto y 120 minutos, más preferentemente unos pocos minutos, con las proteínas que se quieren extraer/purificar en condiciones de pH determinado, preferentemente pH ácido, más preferentemente a pH de entre 1,5 y 5, y aún más preferentemente a pH 1,8, utilizando preferentemente una proporción NPM-MD:proteína comprendida entre 1:1 y  
15 1:1000, que dependerá del tamaño de las proteínas a extraer/purificar (Figura 6). Por ejemplo, este método se ha empleado con diferentes proteínas modelo (ej. lisozima, mioglobina, concanavalina, seroalbúmina bovina), sin descartar otras.

20 A continuación, se utiliza un campo magnético externo, por ejemplo un imán, para separar las NPM-MD con las proteínas retenidas del resto de la disolución. El imán se mantendrá en contacto con la disolución durante un tiempo adecuado, preferentemente durante un tiempo de entre 1 y 120 minutos. Finalmente, el conjugado NPM-MD-proteína se lava con agua.

25 Además, la presente invención también se refiere a la liberación de las proteínas o péptidos del conjugado formado con las NPM-MD, tal que se obtiene por un lado la biomacromolécula y por otro el sistema NPM-MD. Para ello, se probaron diferentes medios. A continuación, se indican estos medios y algunas condiciones, pero sin descartar otros: urea 1 M, NaOH 0,1 M, 0,2% de ácido trifluoroacético, 0,2% de  
30 dodecilsulfato de sodio (SDS) a temperatura ambiente y a 100° C y agua a 100° C. La Figura 7 muestra los perfiles obtenidos por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato (SDS, SDS-PAGE) correspondientes a las proteínas que se liberaban de las NPM-MD tras el tratamiento del complejo formado con las proteínas con los medios y condiciones anteriormente citadas. Otros medios alquil o aril sulfonatos, o sulfatos  
35 pueden emplearse, sin descartar otros.

Por tanto, en una realización preferida la liberación de las proteínas o péptidos del conjugado formado con las NPM-MD se lleva a cabo en un medio seleccionado de entre urea, NaOH, ácido trifluoroacético, dodecilsulfato de sodio a una temperatura de entre 18°C y 100° C, agua a aproximadamente 100° C, alquil C<sub>4</sub>-C<sub>20</sub> o aril sulfonatos, o sulfatos.

5

La presente invención también muestra que la utilización del sistema NPM-MD obtenido después de liberar la proteína puede volver a ser empleado en la extracción de nuevas muestras de biomacromoléculas (Figura 8), aspecto que no se observa cuando se emplean NPM no recubiertas con MD.

10

Por "biomacromoléculas" se refiere en la presente invención a proteínas o péptidos, preferentemente proteínas, pero sin descartar otros sistemas formados por unión de aminoácidos.

15

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

20

## DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

**Figura 1.** Representación de una cuña carbosilano catiónica de segunda generación (EtO)<sub>3</sub>SiG2(CO<sub>2</sub><sup>-</sup>)<sub>4</sub> (R<sup>4</sup> = CO<sub>2</sub><sup>-</sup>, p = 4, n = 2, R<sup>7</sup> = Et).

25

**Figura 2.** Representación de un dendrímero carbosilano catiónico de primera generación (EtO)<sub>3</sub>SiG1(CO<sub>2</sub><sup>-</sup>)<sub>7</sub> (R<sup>6</sup> = CO<sub>2</sub><sup>-</sup>, p = 7, n = 1, R<sup>7</sup> = Et).

**Figura 3.** Representación de una cuña carbosilano catiónica de segunda generación (EtO)<sub>3</sub>SiG2(NMe<sub>3</sub><sup>+</sup>)<sub>4</sub> (R<sup>4</sup> = NMe<sub>3</sub><sup>+</sup>, p = 4, n = 2, R<sup>7</sup> = Et).

30

**Figura 4.** Representación de un dendrímero carbosilano catiónico de primera generación (EtO)<sub>3</sub>SiG1(NMe<sub>3</sub><sup>+</sup>)<sub>7</sub> (R<sup>6</sup> = NMe<sub>3</sub><sup>+</sup>, p = 7, n = 1, R<sup>7</sup> = Et).

35

**Figura 5.** Ejemplos de NPM-MD, que constan de un núcleo de magnetita Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> y

cubiertas de dendrones carboxilano de 2<sup>a</sup> generación con funciones ácido carboxílico (Figura 1 arriba) o amonio (Figura 1 abajo).

5 **Figura 6.** Porcentaje de proteínas retenidas sobre NPM-MD (MD de 2<sup>a</sup> generación con grupos carboxilato) a diferentes proporciones NPM-MD:proteína (desde 100:1 a 1000:1).

10 **Figura 7.** Perfiles obtenidos por SDS-PAGE correspondientes a disoluciones (blanks) que contenían lisozima (LYS), mioglobina (MYO), concanavalina (CONC) o seroalbúmina bovina (BSA) y a disoluciones que contenían las proteínas eluídas de las NPM-MD (de 2<sup>a</sup> generación con grupos carboxilato) utilizando diferentes medios y condiciones: NaCl 1 M, urea 1 M, 0.2% de NaOH, 0.2% de SDS a temperatura ambiente y a 100 °C y agua a 100 °C.

15 **Figura 8.** Porcentaje de las proteínas lisozima (LYS), mioglobina (MYO), concanavalina (CONC) y seroalbúmina bovina (BSA) retenidas en NPM-MD (de 2<sup>a</sup> generación con grupos carboxilato) en tres experimentos consecutivos.

20 **Figura 9.** Perfil de SDS-PAGE correspondiente a las proteínas del hueso de aceituna sin tratar (extract) y a las que quedan en disolución tras el tratamiento con las NPM-MD (de 2<sup>a</sup> generación con grupos carboxilato) a diferentes proporciones NPM:proteína (1:1, 5:1, 10:1 y 25:1) o mediante precipitación con acetona.

25 **Figura 10.** Separación de proteínas obtenida por cromatografía de líquidos de alta eficacia en fase inversa a partir de un suero de queso sin tratar (whey protein) y tras su tratamiento con NPM-MD (2<sup>a</sup> generación con grupos carboxilato) a diferentes proporciones NPM-MD:proteína.

## EJEMPLOS

30 A continuación, se describen los procedimientos para la purificación de algunas de las proteínas descritas en esta invención, sin descartar otros posibles.

### Ejemplo 1.- Purificación de proteínas de hueso de aceituna con NPM-MD

35 Se propone la utilización de las NPM-MD para la purificación de proteínas extraídas a partir de un subproducto de la industria del olivo, el hueso de aceituna, como alternativa a

un método convencional para la purificación de proteínas que consiste en la precipitación de las mismas utilizando un disolvente orgánico como la acetona o el etanol. El extracto de proteínas de los huesos de aceituna se obtiene utilizando el método descrito en la patente ES2487115B1. Brevemente, el hueso de la aceituna se deja secar a temperatura ambiente y se extrae del mismo la semilla mediante fractura por procedimientos mecánicos. Una vez extraída la semilla de la aceituna esta se tritura en un molinillo. Las proteínas de la semilla se extraen empleando un medio de extracción formado por un tampón Tris-HCl 125 mM (pH 7,5) que contiene dodecilsulfato de sodio y ditiotreitól. En estas condiciones las proteínas pasan a la disolución acuosa y el residuo sólido se elimina mediante centrifugación. Las proteínas extraídas se purifican mediante su precipitación con acetona durante 24 h a 4° C seguido de centrifugación. Alternativamente, se realiza la purificación de las proteínas extraídas utilizando las NPM-MD a pH ácido, preferentemente entre 1,5 y 5; utilizando diferentes relaciones NPM-MD:proteína. Estas NPM-MD son como las que se encuentran descritas en Barrios-Gumiel, A. et al. *Colloids Surf. B* **2019**, 181, 360 (NPM cubiertas de dendrones carbosilano preferentemente de segunda generación con funciones carboxilo, Figura 5 arriba) o en la solicitud de patente española ES2830873A1 (NPM cubiertas de dendrones carbosilano preferentemente de segunda generación con funciones amonio, Figura 5 abajo).

20

La Figura 9 muestra la separación de las proteínas que han quedado en los extractos tras su tratamiento con las NPM-MD, modificada preferentemente con dendrones de segunda generación con grupos carboxílico o bien modificada preferentemente con dendrones de segunda generación con grupos amonio, a diferentes relaciones NPM-MD:proteína o tras su precipitación con acetona. Cuando se emplea una relación NPM-MD:proteína de 25:1 es posible la retención de todas las proteínas del extracto no quedando ninguna en el mismo. Esto mismo se observa también cuando se realiza la precipitación de las proteínas con acetona, aunque en este caso es necesario un tiempo mayor para la purificación de las proteínas (24 h), así como la utilización de un disolvente orgánico como la acetona o el etanol.

30

A continuación, en los casos en los que se han empleado las NPM-MD, se ponen las disoluciones en contacto con un imán durante un tiempo adecuado (unos 10 min) que permite la separación del complejo NPM-MD-proteínas del resto. Tras el lavado del complejo con agua, se liberan las proteínas retenidas mediante la adición de una disolución de un tensioactivo, como por ejemplo dodecilsulfato sódico (SDS) de una

35

concentración determinada, por ejemplo un 0,4%, a una temperatura determinada (por ejemplo a 100° C), durante un tiempo determinado, por ejemplo 10 min. En estas condiciones, es posible romper las interacciones establecidas entre las proteínas y las NPM-MD y, tras el lavado de las mismas, es posible volver a utilizarlas para extraer o purificar proteínas.

### **Ejemplo 2.- Recuperación de proteínas del suero de queso con NPM-MD**

El suero del queso es un subproducto de la industria quesera que contiene proteínas como la  $\alpha$ -lactoalbúmina ( $\alpha$ -LA) y las  $\beta$ -lactoglobulinas ( $\beta$ -LG (A + B)), que presentan un elevado valor biológico y económico. La recuperación de las proteínas contenidas en este subproducto puede realizarse mediante filtración a través de membranas o spray-drying (Nicolás, P.; Ferreira, M. L.; Lassalle, V. *Journal of Food Engineering*, **2019**, 263, 380). Como alternativa, se han utilizado las NPM-MD, descritas en el ejemplo 1, a pH ácido (pH = 1,8) y se han probado diferentes relaciones NPM-MD:proteína. La Figura 10 muestra la separación cromatográfica de las principales proteínas del suero ( $\alpha$ -LA and  $\beta$ -LG (A + B)) que no se retienen en las NPM-MD, modificada preferentemente con dendrones de segunda generación con grupos carboxílico o bien modificada preferentemente con dendrones de segunda generación con grupos amonio, cuando se adicionan en relaciones NPM-MD:proteína comprendidas entre 1:1 y 25:1. A una proporción 1:1 NPM-MD:proteína, la  $\alpha$ -LA es parcialmente retenida mientras que no se observa la retención de las  $\beta$ -LG (A + B). La retención de las proteínas aumenta cuando se incrementa la proporción NPM-MD:proteína observando la mayor retención a partir de una proporción de 10:1.

### **RESULTADOS**

Como ejemplo, las NPM-MD, preferentemente con dendrones de segunda generación con grupos carboxílico, se dispersan en agua y se ponen en contacto durante unos pocos minutos (menos de dos minutos), con las proteínas que se quieren extraer/purificar en condiciones de pH determinado (preferentemente ácido, pH 1,8) utilizando una proporción NPM-MD:proteína comprendida entre 1:1 y 1:1000, que dependerá del tamaño de las proteínas a extraer/purificar. En la Tabla 1 se indican valores de puntos isoeléctrico y peso molecular de las proteínas modelo (ej. lisozima, mioglobina, concanavalina, seroalbúmina bovina) que sirven de ejemplo, sin descartar otras.

**Tabla 1.** Pesos moleculares y puntos isoeléctricos de las proteínas empleadas.

<b>Proteína</b>	<b>Lisozima</b>	<b>Mioglobina</b>	<b>Concanavalina</b>	<b>Seroalbúmina bovina</b>
<b>Punto isoeléctrico</b>	11,35	6,80	4,50-5,50	4,70
<b>Peso molecular (kDa)</b>	14,3	17,8	25,5	66,5

- Tal y como se muestra en la Figura 6, la mioglobina (6,80 kDa) y la lisozima (11,35 kDa) se retenían sobre la NPM-MD, modificada con dendrones de segunda generación carboxilato, cuando se empleaba una proporción NPM-MD:proteína de, al menos, 150:1 mientras que en el caso de la concanavalina (25,5 kDa) era necesaria una proporción NPM-MD:proteína de 300:1 y en el caso de la seroalbúmina bovina (66,5 kDa) se necesitaba una proporción mayor (1000:1).
- Respecto a la liberación de proteínas, la Figura 7 muestra los perfiles obtenidos por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) correspondientes a las proteínas que se liberaban de las NPM-MD tras el tratamiento del complejo formado con las proteínas con los medios y condiciones anteriormente citadas. El NaCl es un reactivo que se suele utilizar para romper interacciones electrostáticas aunque, en los ejemplos de esta invención, no permitió la liberación de las proteínas. Sin embargo, el uso de dodecilsulfato (SDS) a 100° C durante 10 min, permitió romper las interacciones establecidas entre las NPM-MD y las proteínas. Otros medios alquil o aril sulfonatos, o sulfatos pueden emplearse, sin descartar otros.
- Finalmente, esta invención muestra que la utilización del sistema NPM-MD obtenido después de liberar la proteína puede volver a ser empleado en la extracción de nuevas biomacromoléculas. La Figura 8 muestra los porcentajes de proteína retenidas en las NPM-MD, modificadas con un dendrón de segunda generación con grupos carboxílico, en tres extracciones consecutivas. Tal y como se observa, las NPM-MD pueden ser empleadas en extracciones sucesivas sin perder su magnetismo ni su capacidad de retención, aspecto que no se observa cuando se emplean NPM no recubiertas con MD.

## REIVINDICACIONES

1. Uso de nanopartículas magnéticas recubiertas de al menos una molécula dendrítica de naturaleza carbo-silano (NPM-MD), como agente para extraer o purificar proteínas o péptidos de un medio que las contenga, caracterizadas por que:

-el núcleo de la nanopartícula está compuesto por óxido de hierro, preferiblemente  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ;

-la molécula dendrítica se selecciona entre dendrón o dendrímero, funcionalizada en su capa externa con grupos aniónicos seleccionados de grupos carboxilato o sulfonatos, con grupo catiónicos seleccionados de grupo amonio o con grupos neutros seleccionados de grupos carboxílicos, sulfónicos y amino y que comprende una cadena anclante de fórmula  $-\text{Si}-(\text{CH}_2)_b-\text{R}^1-(\text{CH}_2)_a-$  donde:

la molécula dendrítica está unida al núcleo por el átomo de Si,

a es un número entero que varía entre 0 a 10;

b es un número entero que varía de 1 a 10, preferiblemente varían de 1 a 5; y

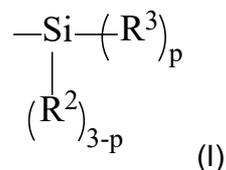
$\text{R}^1$  se selecciona de entre un grupo urea, carbamato, tiocarbamato, tiourea o un grupo triazol, preferentemente es un grupo urea.

2. Uso según la reivindicación 1, donde la molécula dendrítica es un dendrón o cualquiera de sus sales, caracterizada por que:

-el punto focal del dendrón es la cadena anclante de fórmula  $-\text{Si}-(\text{CH}_2)_b-\text{R}^1-(\text{CH}_2)_a-$

donde el dendrón está unido al núcleo por el átomo de Si, a es un número entero que varía entre 1 a 10, preferiblemente entre 1 y 5; y b y  $\text{R}^1$  están definidos en la reivindicación 1; y

-la capa externa del dendrón consiste en unidades iguales o diferentes del grupo de fórmula (I):



donde:  $\text{R}^2$  es un grupo alquilo ( $\text{C}_1\text{—}\text{C}_4$ ), preferiblemente  $\text{R}^2$  es un grupo metilo;

p es un número entero y varía entre 1 y 3, preferiblemente p es 2;

$\text{R}^3$  es el siguiente grupo  $-(\text{CH}_2)_c\text{—S—}(\text{CH}_2)_d\text{—R}^4$ ;

c representa un número entero que varía de 2 a 5; preferiblemente c es 2 ó 3;

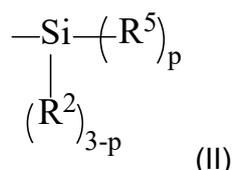
d representa un número entero que varía de 1 a 10; preferiblemente d varía entre 1 y 5; y

5 R<sup>4</sup> se selecciona de entre -NR'R'', -NR'R''R''', -COOR', -COO<sup>-</sup>, -SO<sub>3</sub>R' y -SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, donde R', R'' y R''' representan de manera independiente un grupo alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) o un hidrógeno.

3. Uso según la reivindicación 2, donde R<sup>4</sup> es un grupo -CO<sub>2</sub><sup>-</sup>, un grupo -CO<sub>2</sub>H o un grupo -NMe<sub>3</sub><sup>+</sup>; y preferiblemente c es 2 o 3 y más preferiblemente d es 1 o 2.

4. Uso según la reivindicación 1, donde la molécula dendrítica es un dendrímero o cualquiera de sus sales, caracterizado por que:

15 - la capa externa del dendrímero consiste en unidades iguales o diferentes del grupo de fórmula (II)



donde: R<sup>2</sup> es un grupo alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>), preferiblemente R<sup>2</sup> es un grupo metilo;

p es un número entero y varía entre 1 y 3, preferiblemente p es 2;

R<sup>5</sup> es el grupo -(CH<sub>2</sub>)<sub>c</sub>-S-(CH<sub>2</sub>)<sub>d</sub>-R<sup>6</sup>;

20 c representa un número entero que varía de 2 a 5; preferiblemente c es 2 ó 3;

d representa un número entero que varía de 1 a 10; preferiblemente d varía entre 1 y 5;

R<sup>6</sup> se selecciona de entre -NR'R'', -NR'R''R''', -COOR', -COO<sup>-</sup>, -SO<sub>3</sub>R' y -SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, donde R', R'' y R''' representan de manera independiente un grupo alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)

25 o un hidrógeno, y con la condición que al menos un grupo R<sub>6</sub> de la capa externa del dendrímero consiste en la cadena anclante de fórmula -Si-(CH<sub>2</sub>)<sub>b</sub>-R<sub>1</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>- donde el dendrímero está unido al núcleo por el átomo de Si, a, b y R<sub>1</sub> están definidos en la reivindicación 1..

30 5. Uso según la reivindicación 4, donde R<sup>6</sup> es un grupo -CO<sub>2</sub><sup>-</sup>, un grupo -CO<sub>2</sub>H, o un grupo -NMe<sub>3</sub><sup>+</sup>, preferiblemente c es 2 o 3 y más preferiblemente d es 1 o 2.

6. Método para la purificación de proteínas o péptidos de un medio que las contenga que comprende:
- a. añadir al medio que contiene las proteínas o péptidos las nanopartículas magnéticas recubiertas de al menos una molécula dendrítica de naturaleza carbosilano (NPM-MD) descritas en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 dispersas en agua o en un medio acuoso, preferentemente en agua; y
  - b. separar del medio el conjugado formado por la NPM-MD y la proteína o péptico y obtenido en el paso (a) mediante un campo magnético externo;
  - c. lavar con agua el conjugado extraído del paso (b); y
  - d. separar del conjugado lavado en el paso (c) la proteína o el péptido de las NPM-MD.
7. Método según la reivindicación 6, donde las NPM-MD se ponen en contacto con las proteínas o péptidos en el paso (a) durante un tiempo de entre 1 minuto a 120 minutos y a una proporción NPM-MD:proteína o péptido de entre 1:1 y 1:1000.
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 6 o 7, donde el campo magnético externo del paso (b) se aplica durante un tiempo de entre 1 y 120 minutos.
9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, donde la separación del paso (d) se lleva a cabo en un medio seleccionado de entre urea, NaOH, ácido trifluoroacético, dodecilsulfato de sodio a una temperatura de entre 18°C y 100° C, agua a aproximadamente 100° C, alquil C<sub>4</sub>-C<sub>20</sub> o aril sulfonatos, o sulfatos.
10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, donde las NPM-MD liberadas del conjugado NPM-MD y la proteína o el péptido se reutilizan en otro procedimiento de purificación de proteínas o péptidos.

FIGURA 1

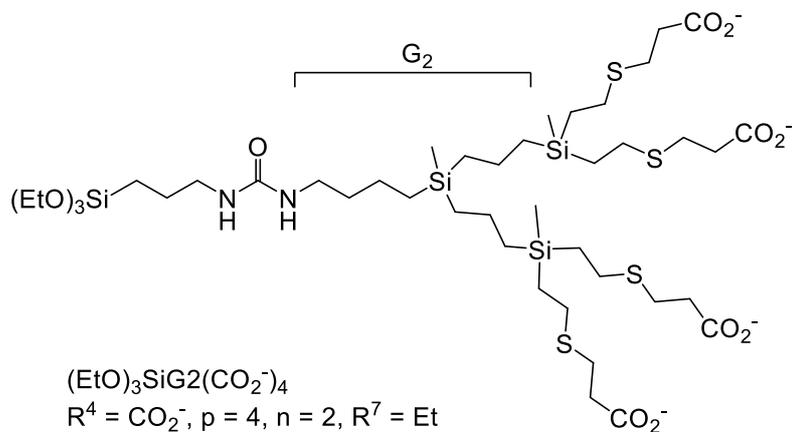


FIGURA 2

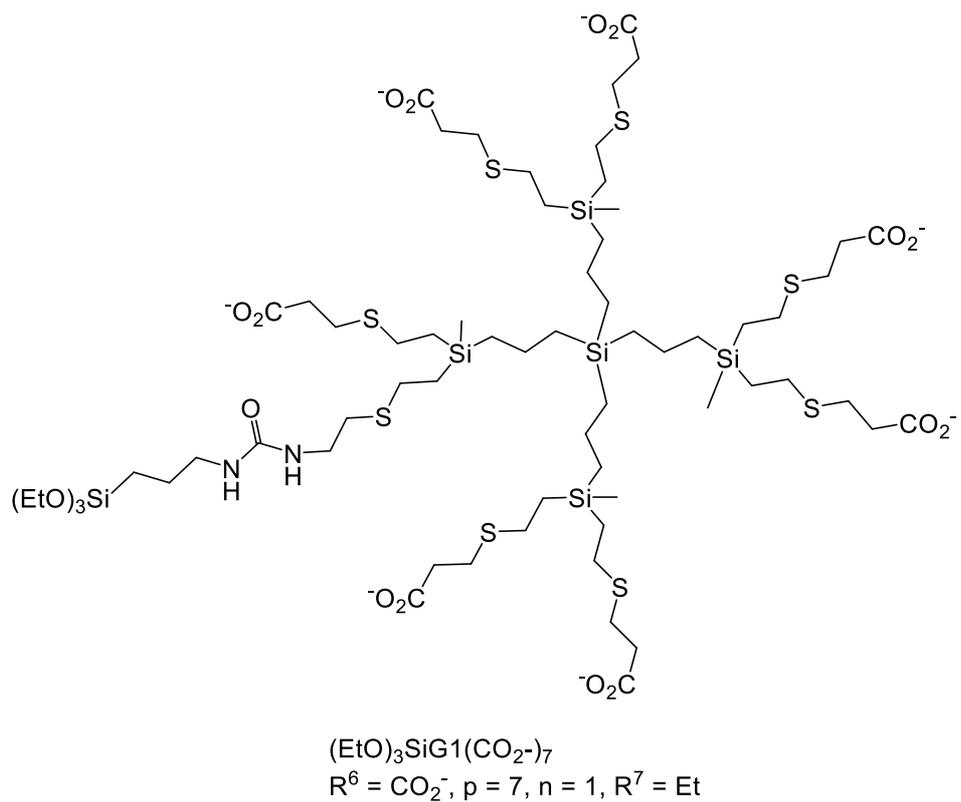


FIGURA 3

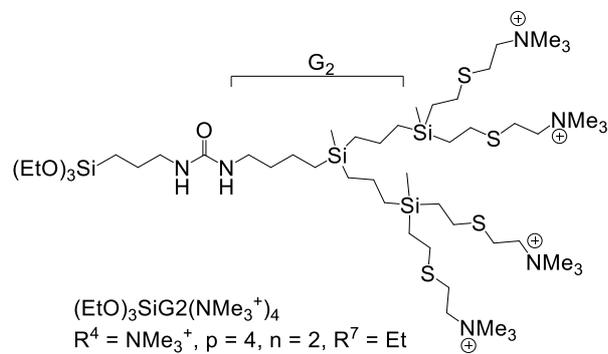


FIGURA 4

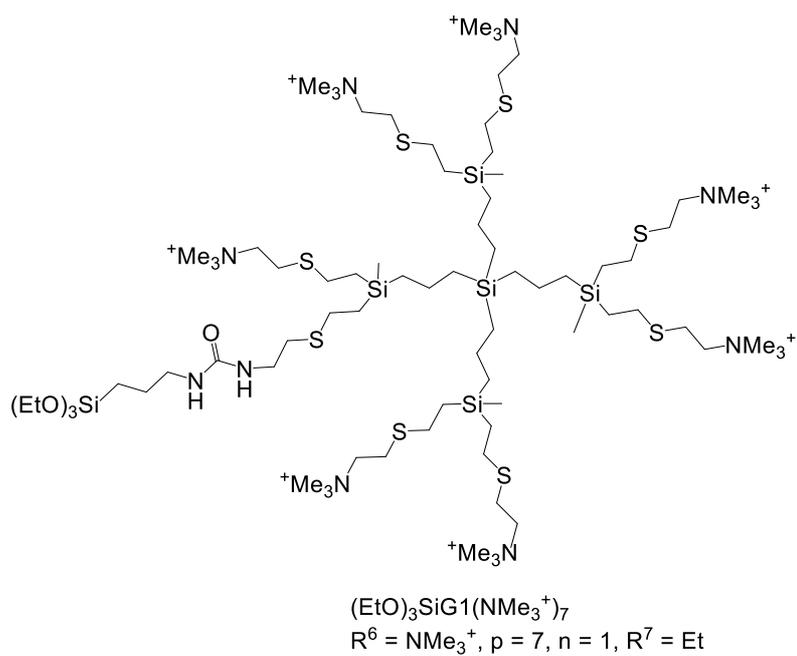


FIGURA 5

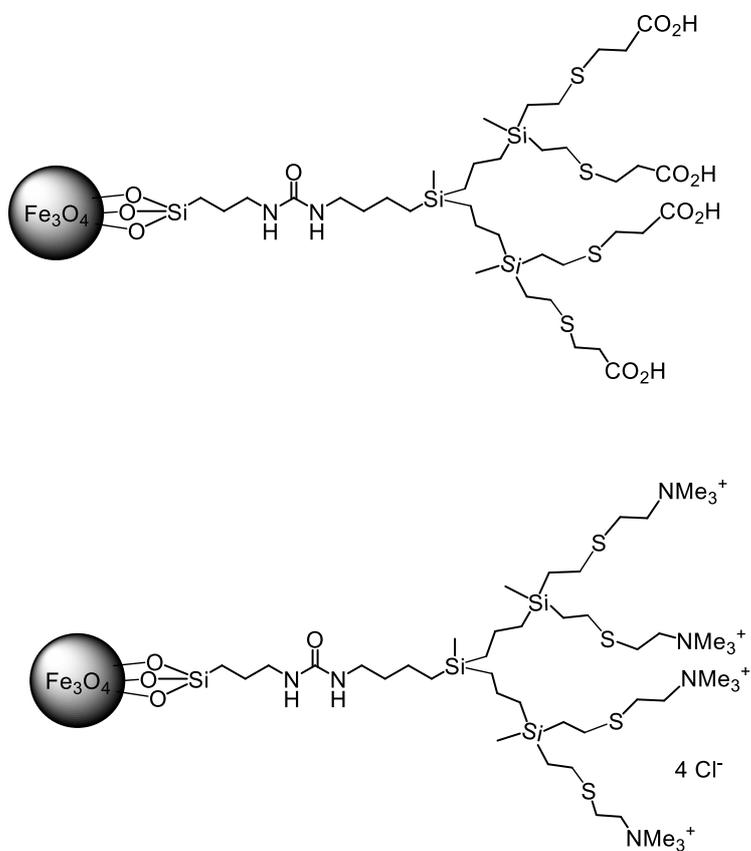


FIGURA 6

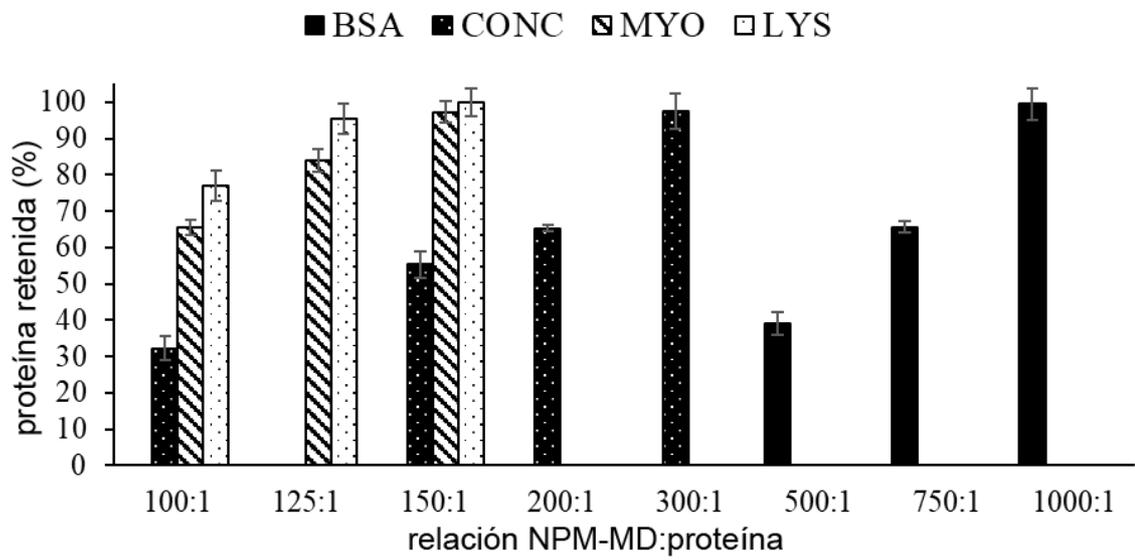


FIGURA 7

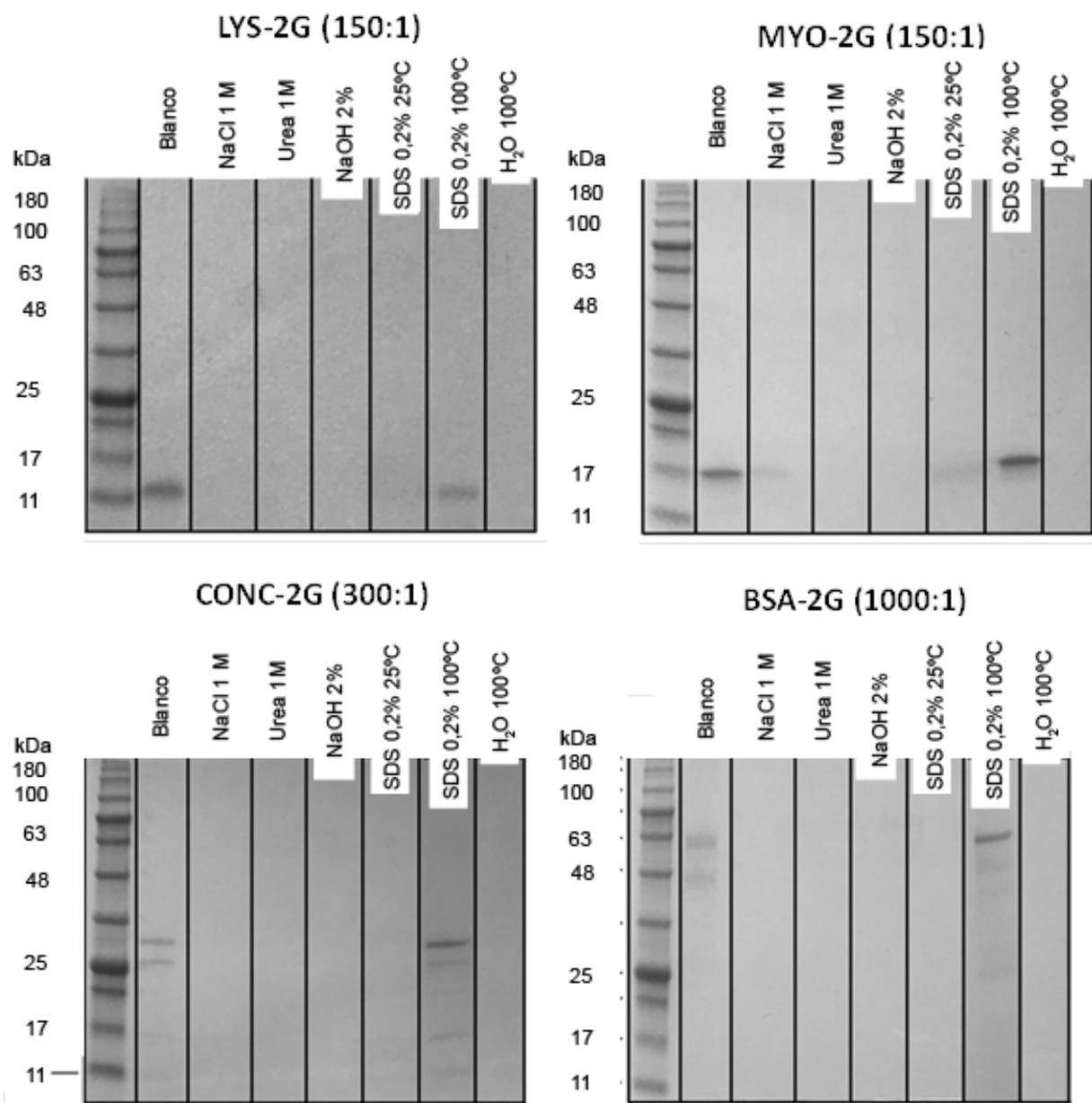


FIGURA 8

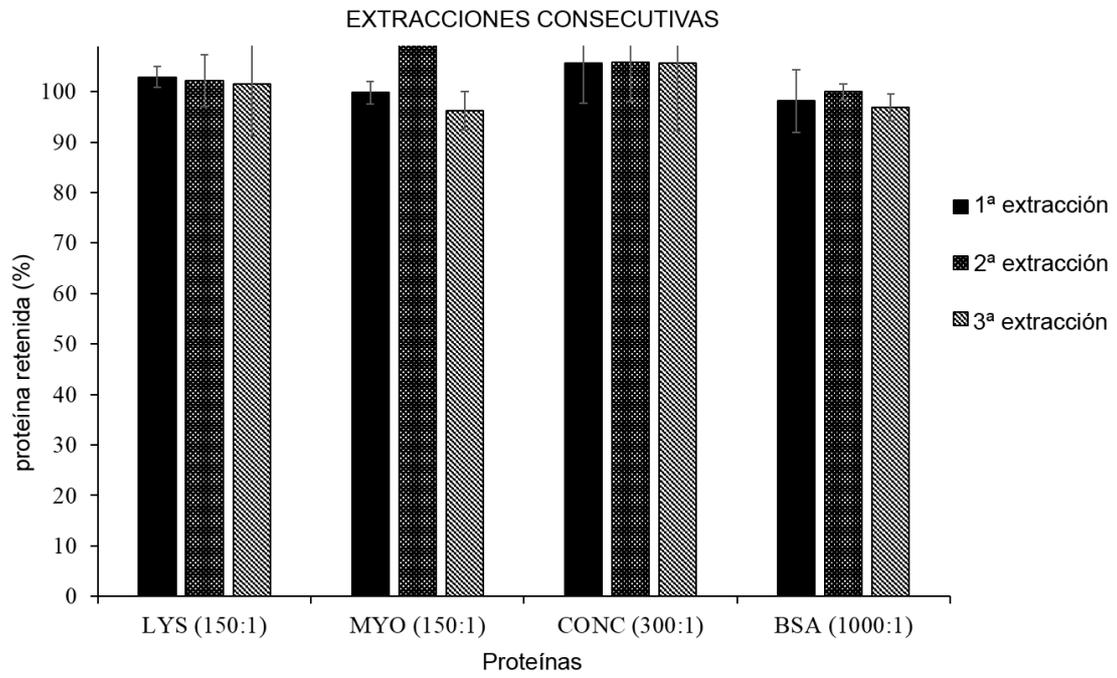


FIGURA 9

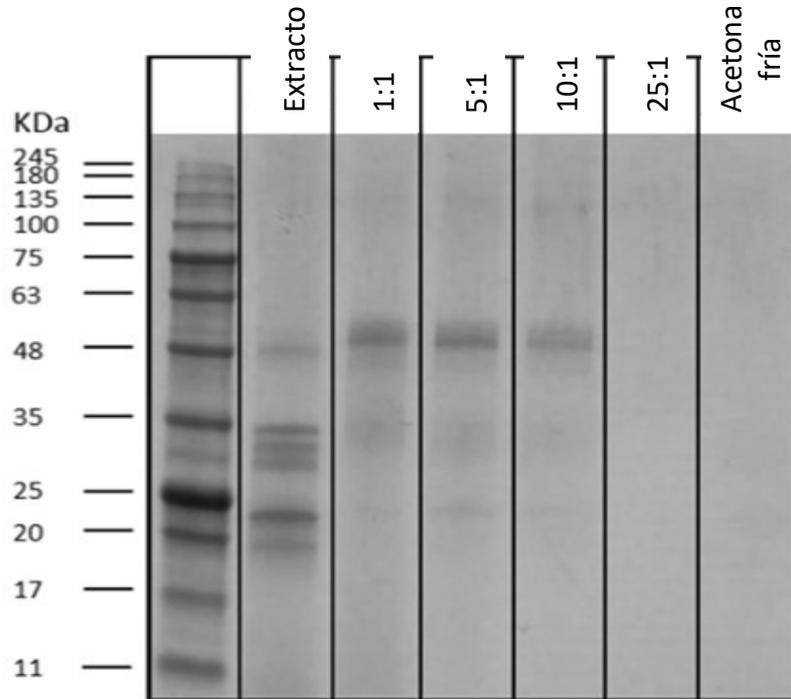
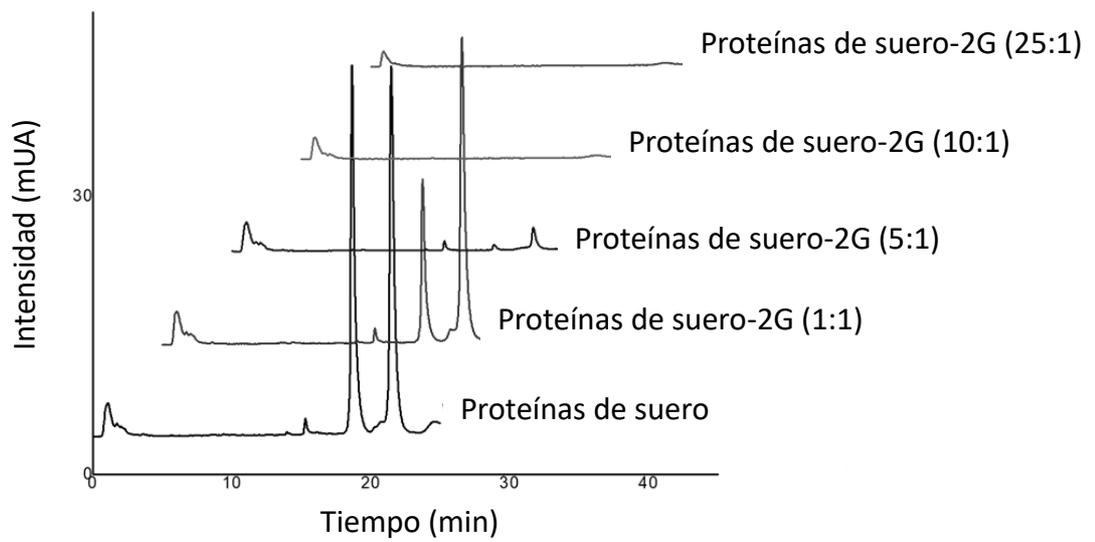


FIGURA 10





21 N.º solicitud: 202130699

22 Fecha de presentación de la solicitud: 20.07.2021

32 Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

51 Int. ci.: Ver Hoja Adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	56 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	ES 2830873 A1 (UNIV ALCALA HENARES) 04/06/2021, página 3, línea 32 – página 10, línea 33; página 11, línea 3 – página 13, línea 1.	1-10
A	BARRIOS-GUMIEL ANDREA et al. "Dendronized magnetic nanoparticles for HIV-1 capture and rapid diagnostic". Colloids and surfaces. B, Biointerfaces Netherlands 01 Sep 2019, 01/09/2019, Vol. 181, Páginas 360-368, ISSN 1873-4367 (Electronic), <DOI: 10.1016/j.colsurfb.2019.05.050 pubmed:31158698>. Ver resumen; apartados 2.1 - 2.4; esquema 2.	1-10
A	GONZALEZ BLANCA et al. "Covalently bonded dendrimer-maghemite nanosystems: nonviral vectors for in vitro gene magnetofection". Journal of Materials Chemistry, 20110101 Royal Society of Chemistry, GB. , 01/01/2011, Vol. 21, Páginas 4598, ISSN 0959-9428, <DOI: 10.1039/c0jm03526b>. Ver resultados y discusión; esquema 1; tabla 1.	1-10
A	SAFARIK, I. et al. "Magnetic techniques for the isolation and purification of proteins and peptides". Biomagnetic Reseach and Technology, 2004, Vol. 26, Páginas 1-17, <DOI: 10.1186/1477-044X-2-7>. Ver resumen; tablas 1-7.	1-10

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
06.06.2022

Examinador  
N. Martín Laso

Página  
1/2

## CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**C07F7/02** (2006.01)

**C07F7/04** (2006.01)

**C07B63/04** (2006.01)

**B03C1/01** (2006.01)

**B82Y5/00** (2011.01)

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

C07F, C07B, B03C, B82Y

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, TXT-DB, NPL, XPESP, BIOSIS, CAS.