



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 293 243**

51 Int. Cl.:
G01N 33/543 (2006.01)
G01N 33/58 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **04725404 .0**
86 Fecha de presentación : **02.04.2004**
87 Número de publicación de la solicitud: **1608977**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **28.12.2005**

54 Título: **Nanopartícula para ensayos de bioafinidad.**

30 Prioridad: **02.04.2003 US 459374 P**
24.04.2003 FI 20030615

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.03.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.03.2008

73 Titular/es: **Turun Yliopisto**
Yliopistonmäki
20014 Turun Yliopisto, FI

72 Inventor/es: **Soukka, Tero;**
Korpimäki, Teemu;
Lamminmäki, Urpo y
Virta, Marko

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

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

Nanopartícula para ensayos de bioafinidad.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a nanopartículas para ensayos de bioafinidad. Más particularmente, la presente invención se refiere a partículas de ferritina para ensayos de bioafinidad.

10 **Antecedentes de la invención**

La ferritina es una proteína producida, por ejemplo, por bacterias, plantas y mamíferos, incluyendo los seres humanos. Es una proteína particular y hueca que consta de múltiples subunidades que pueden ser de tipo similar o diferente. Típicamente, una molécula de ferritina consta de 24 subunidades que se autoensamblan en una estructura esférica. Por ejemplo, la ferritina hepática humana consta de subunidades pesadas (peso molecular 21 kDa) y subunidades ligeras (19 kDa) [Boyd D, Vecoli C, *et al.* (1985) *Journal of Biological Chemistry* 260:11755-61]. Tiene un diámetro de 12 nm, y una cavidad interior con un diámetro de 8 nm. La cavidad interior es capaz de almacenar alrededor de 4500 iones de hierro como óxido férrico hidratado [Chasteen ND, Harrison PM. (1999) *Journal of Structural Biology* 126:182-94].

Además, se han encontrado en bacterias proteínas esféricas similares a ferritina, con un menor tamaño. Los ejemplos son la proteína Dpr, producida por *Streptococci* [Haataja S, Penttinen A, *et al.* *Acta Crystallographica* (2002) 58:1851-1853], la proteína Dps producida por *Listeria* [Bozzi M, Mignogna G, *et al.* (1997) *Journal of Biological Chemistry* 272:3259-3265], la proteína Dps producida por *Helicobacteria* [Tonello F, Dundon WG, *et al.* (1999) *Molecular Microbiology* 34:238-246], y la proteína Dps producida por *Escherichia* [Ilari A, Ceci P, *et al.* (2002) *Journal of Biological Chemistry* 277:37619-37623].

El núcleo de hierro es visible en el microscopio electrónico, y se ha utilizado en microscopía electrónica como un marcador [Anderson KL. (1998) *Biotechnic and Histochemistry* 73:278-88].

La ferritina se ha conjugado químicamente con otras moléculas [Hsu KC. (1981) *Scanning electron microscopy* 4:17-26], o mediante fusiones proteínicas [Lofdahl, S, Uhlen, M *et al.* patente US n° 5.100.788].

Se ha estudiado ampliamente la expresión de proteínas o péptidos extraños sobre la superficie de virus como fusiones proteínicas de la superficie de virus. También se ha estudiado la presentación de proteínas y péptidos sobre la superficie de bacteriófagos T4, T7 λ y [Sternberg, N. y Hoess, R. (1995), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 1609-1613; Ren, Z. y Black, L. (1998), *Gene* 215, 439-444; Danner, S. y Belasco, J. (2001), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 12954-12959]. En estos ejemplos, los fagos conectan la actividad de unión localizada sobre la superficie de una partícula a la información genética localizada en el interior de la partícula. Además, se ha investigado la expresión de proteínas extrañas sobre la superficie de virus con el objeto de usar estos virus modificados como vacunas, inmunógenos y agentes de revestimiento (US n° 5.008.373; US n° 5.041.385; US n° 5.463.024; US n° 5.736.368; US n° 5.804.196 y US n° 6.051.410). Además, se ha sugerido el uso de cápsidas víricas o a base de fagos como partículas funcionales en ensayos de bioafinidad (documento US 2002/0025515).

Las ventajas de cápsidas fágicas y víricas son que se autoensamblan en estructuras similares a partículas. Sin embargo, tienen desventajas: se pueden replicar en sus hospedantes respectivos. Pueden infectar a sus hospedantes por accidente y, en consecuencia, pueden dar como resultado un brote descontrolado de virus o fagos. También contienen moléculas de ácidos nucleicos que pueden dar como resultado una producción accidental de proteínas indeseadas en situaciones imprevistas. El tamaño de incluso el bacteriófago más pequeño supera el óptimo para la estabilidad coloidal óptima de las partículas.

Un marcador es una molécula que es posible detectar por medios químicos o físicos. El marcador puede tener actividad catalítica, que se usa para la detección. Los ejemplos de esos marcadores son ácidos nucleicos o proteínas que tienen actividad catalítica. Una manera útil para detectar un marcador se basa en sus propiedades de fluorescencia, luminiscencia, ópticas, eléctricas o magnéticas. Las proteínas marcadoras se usan ampliamente en investigación biológica, y especialmente en ensayos de bioafinidad. Las siguientes enzimas son ejemplos de proteínas marcadoras ampliamente usadas: fosfatasa alcalina (EC 3.1.3.1), β -galactosidasa (EC 3.2.1.23), β -glucuronidasa (EC 3.2.1.31), glucosa oxidasa (EC 1.1.3.4), luciferasa (EC 1.13.12.7), y peroxidasa de rábano picante (EC 1.11.1.7). La característica común de todas ellas es que su detección es posible a concentraciones bajas usando un protocolo simple. Además de las enzimas, se han descrito proteínas marcadoras alternativas, tales como las proteínas fluorescentes [Heim R, y Tsien RY, (1996), *Current Biology* 6:178-82] o las proteínas coloreadas [Lukyanov KA, Fradkov AF, *et al.* (2000), *Journal of Biological Chemistry* 275: 25879-82].

Se han producido numerosos conjugados bien definidos entre una molécula de unión y una proteína marcadora para el desarrollo de un ensayo. Un conjugado se produce tradicionalmente marcando *in vitro* la molécula de unión con una proteína o péptido marcador [Kopetzki, E.; Lehnert, K; Buckel, P. *Clin. Chemo.* (1994), 40: 688-704]. Una manera alternativa para producir el conjugado es fusionar genes que codifican una molécula de unión con una proteína informadora, lo que da como resultado la producción de una proteína de fusión que tiene actividad tanto de unión como marcadora [Zenno e Inouye, *Biochemical and Biophysical Research Communications* (1990), 171:169-74].

Luzzago *et al.* [The EMBO Journal 8, 569-576 (1989)] describen el aislamiento de mutaciones de punto que afectan al plegamiento de la cadena H de la ferritina humana en *E. coli* usando una molécula híbrida recombinante que comprende el α -péptido de β -galactosidasa. Si las mutaciones no afectan al plegamiento, el dominio del α -péptido se segrega en el interior de la corteza de apoferritina al ensamblarse, y es incapaz de interactuar con el sustrato y realizar su función enzimática.

El documento US n° 5.358.722 describe análogos de ferritina que comprenden una corteza proteínica de apoferritina que rodea a un núcleo sólido con forma de esférica de un material inorgánico u orgánico que está desprovisto esencialmente de ferrihidrita. El material puede ser, por ejemplo, europio.

El documento EP0354847 describe un conjugado para uso en un sistema de marcaje, que comprende avidina o estreptavidina enlazada a una partícula portadora, por ejemplo apoferritina. El conjugado es útil para formar un sistema reactivo fluorescente. El sistema de marcaje fluorescente es particularmente útil en ensayos de unión.

El documento WO 03/094849 describe proteínas de fusión de ferritina, para uso en vacunas y en otras aplicaciones.

Objetivo y resumen de la invención

Un objetivo de la presente invención consiste en proporcionar partículas alternativas para ensayos de bioafinidad.

Otro objetivo de la presente invención consiste en proporcionar ensayos de bioafinidad que hagan uso de las partículas alternativas.

Todavía otro objetivo de la presente invención es proporcionar kit mejorados para ensayos de bioafinidad que hagan uso de las partículas alternativas.

De este modo, la invención proporciona el uso de una nanopartícula en un ensayo de bioafinidad de unión a ligando, en el que dicha nanopartícula comprende una corteza que se autoensambla formada por varias subunidades proteínicas y/o peptídicas, subunidades proteínicas y/o peptídicas las cuales pueden ser de uno o varios tipos diferentes, ensambladas de una manera organizada para formar la corteza que tiene una superficie interna que mira hacia el interior y una superficie externa que mira hacia el exterior de dicha partícula, en la que la corteza de la nanopartícula es una partícula de apoferritina recombinante o una partícula de proteína Dpr/Dps similar a apoferritina recombinante, en el que

- a) uno o varios de los tipos de subunidades tienen uno o varios primeros restos de unión genéticamente fusionados por tipo de subunidad, mirando el resto de unión hacia el exterior de la partícula para la unión de cualquier proteína de unión a ligando específica; y
- b) i) la partícula contiene dentro de su corteza un marcador y/o
 - ii) uno o varios de los tipos de subunidades tienen uno o varios segundos restos de unión genéticamente fusionados por tipo de subunidad, mirando el resto de unión hacia el interior y/o el exterior de la partícula que se une a un marcador; y
- c) el marcador o marcadores que permiten la detección de una partícula.

La presente invención también proporciona una nanopartícula, útil para ensayos de bioafinidad de unión a ligando, que comprende una corteza que se autoensambla formada por varias subunidades proteínicas y/o peptídicas, subunidades proteínicas y/o peptídicas las cuales pueden ser de uno o varios tipos diferentes, ensambladas de una manera organizada para formar la corteza que tiene una superficie interna que mira hacia el interior y una superficie externa que mira hacia el exterior de dicha partícula, en la que la corteza de la nanopartícula es una partícula de apoferritina recombinante o una partícula proteínica Dpr/Dps similar a apoferritina recombinante, en la que

- a) uno o varios de los tipos de subunidades tienen uno o varios primeros restos de unión genéticamente fusionados por tipo de subunidad, mirando el resto de unión hacia el exterior de la partícula para la unión de cualquier proteína de unión a ligando específica; y
- b) i) la partícula contiene dentro de su corteza un marcador y/o
 - ii) uno o varios de los tipos de subunidades tienen uno o varios segundos restos de unión genéticamente fusionados por tipo de subunidad, mirando el resto de unión hacia el interior y/o el exterior de la partícula para la unión a un marcador seleccionado de entre el grupo constituido por una enzima, una proteína luminiscente, una proteína fluorescente o coloreada o una molécula orgánica, y un metal de tierras raras, y
- c) el marcador o marcadores permiten la detección de la partícula.

La presente invención también proporciona un ensayo de bioafinidad que usa la nanopartícula.

La presente invención proporciona además un kit para un ensayo de bioafinidad, que comprende la nanopartícula.

5 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra la estructura de una nanopartícula proteínica.

La Figura 2 muestra la detección de la actividad de unión de una partícula proteínica.

10

La Figura 3 muestra la estructura del plásmido pBccpHFI.

La Figura 4 muestra la estructura del plásmido pPrGHFI.

15

La Figura 5 muestra la estructura del plásmido pTSHscHFI.

La Figura 6 muestra la estructura del plásmido pCBPHFI.

Descripción detallada de la invención

20

Definición de términos

El término “apoferritina” debe entenderse que consiste en ferritina carente de moléculas en el interior de la cavidad de una proteína.

25

La expresión “una partícula similar a apoferritina” debe entenderse que consiste en una partícula similar a ferritina deficiente en moléculas en el interior de la cavidad de la proteína, como se define en las reivindicaciones. La “partícula similar a apoferritina” típicamente es una partícula de proteína que se autoensambla, que consiste en un número específico de subunidades. La partícula es típicamente esférica. Más abajo se han dado ejemplos de partículas similares a ferritina.

30

La expresión “ensayos de bioafinidad” debe entenderse que incluye ensayos de unión a ligando competitivos y no competitivos, de una sola etapa y de múltiples etapas, e inmunoensayos basados en restos de unión a ligandos específicos individuales o múltiples, por ejemplo anticuerpos monoclonales, polipéptidos, receptores, anticuerpos recombinantes o fragmentos de anticuerpos, así como ligantes artificiales como aptámeros y proteínas modificadas mediante ingeniería.

35

Los ensayos de bioafinidad incluyen ensayos heterogéneos y homogéneos. En el ensayo heterogéneo, el analito se une a una fase sólida, y la partícula se usa para la detección del analito unido. Una partícula se puede unir directamente al analito o a una molécula, que está unida al analito. La partícula y el analito se pueden añadir a la reacción ya sea secuencial o simultáneamente. En el ensayo homogéneo, el analito se detecta de la disolución sin la separación de la partícula no unida. El ensayo homogéneo se puede basar, por ejemplo, en transferencia de energía de resonancia por fluorescencia (FRET) o transferencia de energía de resonancia por bioluminiscencia (BRET) (Boute, N, Jockers, R e Issad, T. 2002. Trends in Pharmacological Sciences 23:351-354). También se puede basar en la canalización del sustrato, producto o intermedio de una reacción enzimática (Gibbons, I, Armenta, R, DiNello, RK y Ullman, EF. 1987. Methods in Enzymology 136:93-103).

45

El término “marcador” debe entenderse como una característica detectable midiendo la luminiscencia o absorbancia, así como otras propiedades ópticas, propiedades eléctricas, por ejemplo corriente eléctrica o voltaje, o propiedades magnéticas, que se originan directamente o que resultan indirectamente de la existencia de la característica. Un ejemplo de la medida directa de la característica es la medida de la emisión de fluorescencia de la proteína fluorescente verde usando una luz de excitación apropiada. Un ejemplo de medida indirecta de la característica es una medida de la luminiscencia que se origina de una reacción química catalizada por el marcador enzimático luciferasa. Un ejemplo de la medida de propiedades eléctricas es, por ejemplo, la detección de la reacción redox midiendo el voltaje eléctrico o corriente.

55

El término “luminiscencia” debe entenderse que cubre la luminiscencia, bioluminiscencia, quimioluminiscencia, electroluminiscencia, fotoluminiscencia, fluorescencia, fluorescencia retrasada o fosforescencia.

60

La expresión “proteína luminiscente” y “proteína fluorescente”, respectivamente, debe entenderse como una proteína o enzima, que produce luminiscencia o es fluorescente, respectivamente, con o sin grupos prostéticos. Un ejemplo de proteína luminiscente es la enzima luciferasa. Un ejemplo de proteína fluorescente es la proteína fluorescente verde (GFP).

65

El término “nanopartícula” debe entenderse como un reactivo en partículas compuesto de múltiples “subunidades”, cada una compuesta de proteínas o polipéptidos y, además, opcionalmente de una o múltiples características de las siguientes: ácidos nucleicos, grupos prostéticos, compuestos orgánicos e inorgánicos. El material en partículas tiene al menos un único “resto de unión” sobre la superficie exterior, y el material en partículas contiene un único “marca-

dor” o múltiples “marcadores”. Las dimensiones del material en partículas oscilan entre un nanómetro y diez micrómetros.

El término “lantánido” y la expresión “metal de tierras raras” deben entenderse que incluyen elementos y combinaciones de diferentes elementos de iones de tierras raras, a partir de los siguientes: neodimio (Nd), samario (Sm), europio (Eu), gadolinio (Gd), terbio (Tb), disprosio (Dy), erbio (Er), iterbio (Yb) e itrio (Y).

El término “subunidad” debe entenderse como una única proteína o polipéptido o complejo de múltiples proteínas o polipéptidos, compuestos de componentes idénticos o diferentes.

La expresión “resto de unión” debe entenderse que cubre anticuerpos monoclonales, polipéptidos, receptores, anticuerpos recombinantes o fragmentos de anticuerpos, así como aptámeros artificiales de tipo ligantes y proteínas manipuladas mediante ingeniería genética, o una forma derivatizada de cualquiera de las características enumeradas. Un ejemplo de polipéptido es el péptido de unión a calmodulina (CBP). Un ejemplo de una característica derivatizada es una secuencia peptídica de una proteína transportadora de carboxibiotina (BCCP), que se puede biotinilar *in vivo* con la enzima biotina ligasa BirA.

El término “enzima” se debe entender como una proteína o polipéptido o ácido nucleico con actividad catalítica. Los ejemplos de enzimas son la luciferasa y la galactosa oxidasa (GAO).

La expresión “galactosa oxidasa (GAO)” debe entenderse como una enzima con el número de comisión de enzima EC 1.1.3.9.

La expresión “proteína coloreada” debe entenderse como una proteína o polipéptido, que tiene una absorción significativa a longitudes de onda visibles, 300-700 nm, con o sin grupos prostéticos.

La expresión “molécula orgánica” debe entenderse como cualquier compuesto químico que contiene al menos carbono, con un peso molecular por debajo de 7.000 Daltons. Los ejemplos de moléculas orgánicas son grupos prostéticos en la proteína alofocianina fluorescente.

La expresión “molécula inorgánica” debe entenderse como cualquier átomo inorgánico, compuesto químico formado por átomos inorgánicos, o una combinación de átomos de manera organizada. Un ejemplo de molécula inorgánica es la partícula semiconductor de CdSe fluorescente.

La expresión “corteza que se autoensambla” debe entenderse como una estructura en partículas capaz de ensamblarse ella misma a partir de un conjunto de proteínas de corteza vitales.

La expresión “proteína de corteza vital” debe entenderse como una proteína que es necesaria para el autoensamblado de una entidad en forma de partículas, por ejemplo una nanopartícula.

El término “GFP” debe entenderse como proteína fluorescente verde procedente de *Aequorea victoria*, sus derivados mutantes o una proteína homóloga procedente de otra especie.

El término “CRP” debe entenderse como proteína reactiva C.

El término “TSH” debe entenderse como hormona estimulante de tiroides.

El término “BCCP” debe entenderse como proteína transportadora de carboxibiotina.

La expresión “proteína G” debe entenderse como proteína G procedente de bacterias de los géneros *Streptococcus*.

La expresión “proteína A” debe entenderse como proteína A procedente de bacterias de los géneros *Staphylococcus*.

La expresión “proteína L” debe entenderse como proteína L procedente de bacterias de los géneros *Peptostreptococcus*.

Descripción general de realizaciones preferidas

Las nanopartículas según la invención pueden tener propiedades útiles. Éstas pueden ser, pero sin limitarse a, bajo coste, producción simple, alta estabilidad y una estructura muy definida. La producción puede ser muy simple, ya que todo lo que se necesita es típicamente una simple fermentación microbiana con un pequeño procesamiento aguas abajo.

La nanopartícula según la invención puede tener un marcador que es una enzima, una proteína luminiscente, una proteína fluorescente coloreada, o una molécula orgánica, o un metal de tierras raras. Si el marcador es una proteína, puede ser una enzima, tal como luciferasa o GAO, o una proteína fluorescente como GFP. Si el marcador es un ion de

metal de tierras raras, puede ser un ion de Tb, Eu, Sm o Dy. El marcador también puede ser una partícula inorgánica, por ejemplo una partícula de CdSe.

La nanopartícula de la invención puede tener, además de los primeros y segundos restos de unión, terceros restos de unión. Uno o varios de los tipos de subunidades pueden tener, por ejemplo, uno o varios terceros restos de unión por tipo de subunidad, mirando el resto de unión el exterior de la partícula para la unión a un soporte sólido. La nanopartícula puede tener también restos de unión adicionales con funciones adicionales.

La corteza de la nanopartícula es una partícula de apoferritina recombinante o de tipo ferritina.

El primer, segundo, tercer o adicionales restos de unión pueden ser proteína A, proteína G, proteína L o proteína de unión a calmodulina (CBP). El primer, segundo, tercero o adicional resto de unión puede ser un anticuerpo frente a, por ejemplo, CRP, antígenos del grupo sanguíneo ABO o TSH. El primer, segundo, tercer o adicionales restos de unión pueden ser proteína A, proteína G, proteína L o CBP.

El radio mínimo de la nanopartícula es típicamente de 10 a 40 nm. El número de subunidades de la corteza de la nanopartícula es típicamente superior a 8, preferentemente superior a 20.

La apoferritina tiene un tamaño que da como resultado una mayor estabilidad coloidal. Consiste solamente en subunidades proteínicas sin ácidos nucleicos, lo que hace que sea una partícula biosegura como tal, y también se autoensambla en disolución.

Descripción de las figuras

La Figura 1 muestra la estructura de una nanopartícula proteínica según la invención. La figura muestra una corteza proteínica 1, una primera molécula de unión 2 que mira hacia el exterior de la nanopartícula, un marcador 3 dentro de la corteza de la nanopartícula, y una segunda o tercera molécula de unión 4 que mira hacia el exterior de la nanopartícula.

La Figura 2 muestra la descripción de la actividad de unión de una partícula proteínica. El analito específico de la molécula de unión a ensayar se marca con una molécula adecuada para la detección. El analito marcado se hace reaccionar entonces con partículas, y los complejos de partícula/analito se separan del analito no unido mediante filtración en gel, y se mide la señal del marcador.

La Figura 3 muestra la estructura del plásmido pBccpHFI. Las abreviaturas representan: Bccp-ferritina = gen que codifica BCCP-proteína de fusión de cadena ligera de ferritina humana.

La Figura 4 muestra la estructura del plásmido pPrGHFI. Las abreviaturas representan: pBR322 ori = origen de la replicación, Kan gen de resistencia a canamicina, LacI = gen que codifica el represor de Lac, Proteína G-ferritina = gen que codifica la proteína G-proteína de fusión de cadena ligera de ferritina humana.

La Figura 5 muestra la estructura del plásmido pTSHscHFI. Las abreviaturas representan: anti-TSHsc-ferritina = gen que codifica anticuerpo antiTSHscFV-proteína de fusión de cadena ligera de ferritina humana.

La Figura 6 muestra la estructura del plásmido pCBPHFI. Las abreviaturas representan: CBP-ferritina = gen que codifica CBP-proteína de fusión de cadena ligera de ferritina humana.

Métodos

Manipulaciones de ADN

Todas las manipulaciones del ADN se realizaron según protocolos conocidos [Sambrook J, Fritsch EF, y Maniatis T, (1989), Molecular Cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour).

Cepas bacterianas

Se usaron en los ejemplos las siguientes cepas bacterianas: XL-1 Blue, BL21, BL21 (DE3), BL21 (DE3:pLysS), Origami B, Origami B(DE3) y Origami B(DE3:pLysS) (Stratagene, La Jolla, CA, USA).

Medición de la fluorescencia

La fluorescencia de europio y terbio, resuelta en el tiempo, se midió con reactivos Delfia de Perkin Elmer Life Sciences (Boston, MA, USA). La fluorescencia de Alexa Fluor 594 (Molecular Probes Europe, Leiden, Países bajos) se midió como lo sugiere el fabricante. Todas las medidas se realizaron con un contador de múltiples marcadores Wallac Victor (Perkin Elmer Life Sciences, Boston, MA, USA).

ES 2 293 243 T3

Detección de proteínas informadoras

La actividad de la luciferasa de luciérnaga se midió midiendo la luminiscencia producida con el kit de ensayo de luciferasa de BioThema Ltd (Haninge, Suecia).

La actividad de la galactosa oxidasa se determinó midiendo la luminiscencia de la oxidación del luminol mediante H_2O_2 generado en la reacción de la enzima con 50 mM de galactosa en 100 mM de tampón de fosfato que contiene 1 mM de luminol y 0,4 mM de CuSO_4 a pH 8,6. Todas las medidas se realizaron en un contador de múltiples marcadores Wallac Victor (Perkin Elmer Life Sciences, Boston, MA, USA).

Ejemplo 1

Producción de partículas a base de ferritina

Se hicieron crecer en 50 ml de medio SB en agitación, a 37°C, hasta que se alcanzó una OD_{600} de 0,4, células de *Escherichia coli* que expresan plásmidos que codifican una molécula de unión fusionada al término N de subunidades de ferritina (Ejemplo 8, Ejemplo 9, Ejemplo 10 y Ejemplo 11). La producción de proteínas se indujo añadiendo IPTG a la concentración de 0,5 mM, y el cultivo se continuó a 26°C toda la noche. Después de eso, las células se recogieron mediante centrifugación a 1500 g durante 10 minutos, y se suspendieron hasta 5 ml de disolución salina tamponada con fosfato (PBS). Las células se lisaron entonces mediante tratamiento con ultrasonidos, y el desecho celular se eliminó mediante centrifugación a 5000 g durante 10 minutos. El sobrenadante se filtró entonces con filtros con un valor de corte de 100 kDa (Pall Life Science, Ann Arbor, MI, USA), y el retenido se suspendió en PBS.

Ejemplo 2

Purificación de las partículas con filtración en gel

Las nanopartículas proteínicas se purificaron mediante filtración en gel con una columna de 10 ml de Sepharose 6B (Amersham Biosciences Corp. Piscataway, NJ, USA). La columna se equilibró primeramente usando tampón que contiene 5 mM de Tris-HCl, 0,01% de Tween-20 y 0,05% de NaN_3 , a pH 7,5, con 10 volúmenes de la columna. Se aplicó a la columna una muestra de 500 μl , y se recogieron fracciones de 1 ml.

Ejemplo 3

Detección de la actividad de unión sobre la superficie de la partícula proteínica usando filtración en gel

En la Figura 2 se muestra el fundamento del análisis de la actividad de las moléculas de unión sobre las superficies de las partículas. El analito específico para la molécula de unión a ensayar se marcó con una molécula adecuada para la detección. Los analitos se marcaron según lo siguiente: TSH (hormona estimulante del tiroides) (Scripps Laboratories, San Diego, CA, USA), estreptavidina (Perkin Elmer Life Sciences, Boston, MA, USA) y anticuerpos con europio y calmodulina con Alexa Fluor 594. En el análisis de la actividad de la Proteína G, se usó una mezcla de cuatro anticuerpos monoclonales marcados con Eu. El marcaje de las moléculas con Europio se realizó con un kit de reactivos obtenido de Perkin Elmer Life Sciences (Boston, MA, USA). La calmodulina marcada se obtuvo de Molecular Probes Leiden, Países Bajos). El analito marcado se hizo reaccionar con partículas, y los complejos de partícula/analito se separaron del analito sin unir mediante filtración en gel, como se describe en el Ejemplo 2. Las partículas a base de ferritina se produjeron como se describe en el Ejemplo 1. Como control negativo, se usaron partículas producidas sin molécula de unión.

Ejemplo 4

Detección de la actividad de unión sobre la superficie de la partícula proteínica usando placas de múltiples pocillos

La biotilación *in vitro* de TSH y anticuerpos se realizó mediante el kit de reactivos obtenido de Perkin Elmer Life Sciences, Boston, MA, USA). En el análisis de la actividad de la Proteína G se usó una mezcla de cuatro anticuerpos monoclonales marcados con Eu. Las moléculas biotiniladas se adhirieron a placas de 96 pocillos revestidas con estreptavidina (Innotrac Diagnostics, Turku, Finlandia), como se describe en el kit, y los pocillos se lavaron cuatro veces. Después de eso, se añadieron las partículas a ensayar, y los pocillos se lavaron nuevamente durante cuatro veces. Después, se añadió el analito marcado como se describe en el Ejemplo 3. los pocillos se lavaron cuatro veces, y se midió la señal del marcador.

Ejemplo 5

Detección de la actividad de unión sobre la superficie de la partícula proteínica usando filtros de corte de peso molecular

Las moléculas del analito se marcaron como se describe en el Ejemplo 3. Las partículas junto con el analito unido se separaron de las moléculas más pequeñas con filtros de valor de corte de 100 kDa (Pall Life Science, Ann Arbor, MI, USA). La señal de la molécula marcada se midió a partir del retenido.

Ejemplo 6

Carga de las partículas a base de ferritina con terbio

- 5 El tampón de reacción usado en la carga de iones de terbio en ferritina consistió en 50 mM de HEPES, 50 mM de NaCl y 10 mM de TbCl₃, a pH 7,0. La ferritina se añadió al tampón en una concentración de 0,1 μ M, y la reacción se incubó a 37°C durante 20 h. El terbio sin reaccionar se eliminó mediante filtración en gel con una columna NAP-5 (Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ, USA).

10 Ejemplo 7

Carga de ferritina con europio

- 15 La fracción peletizada de un cultivo bacteriano de 100 ml producido según el Ejemplo 1 usando BL21 de *E. coli* (DE3:pLysS:pBccpHFI) se disolvió hasta 1,5 ml de 8 M de urea, y se centrifugó a 5000 g. Se añadieron 10 ml de una disolución que contiene 100 mM de Tris, 150 mM de NaCl a pH 8,5, y la mezcla se incubó a +4°C toda la noche. Después se añadió HCl hasta que el pH de la disolución alcanzó 6,0, y la disolución se incubó a 4°C toda la noche. Se añadieron 0,056 ml de EuCl₃ 0,01 M, y la disolución se incubó a 25°C durante 2 h, después de lo cual se añadió gradualmente tampón (133 mM de Tris, 150 mM de NaCl, pH 9,0) hasta que el pH alcanzó 8,5. El europio
20 que precipitó se separó entonces de la ferritina soluble cargada con europio, recogiendo el sobrenadante después de 10 minutos de centrifugación a 5000 g. Las partículas cargadas con europio se ensayaron para determinar la capacidad de unión según el Ejemplo 4, y se detectó el europio dentro de la ferritina. Como control, se usó la reacción que contiene exceso de biotina soluble (0,001 mM de biotina). La señal sin biotina fue de 163 veces la del control, mostrando la unión de las partículas marcadas con Eu a la fase sólida revestida con estreptavidina.

25 Ejemplo 8

Producción de Proteína G sobre la superficie de ferritina

- 30 El gen que codifica la proteína G estreptocócica se insertó en un plásmido que produce la cadena ligera de ferritina humana ligando el fragmento digerido con NheI, obtenido mediante PCR con los oligonucleótidos 5'-AAGGATCC CATATGAACCTCTGTAAACATTTTCAG (SEC ID n°: 1) y 5'-AACCATGGCATATGGTGACAACTTACAAACT (SEC ID n°: 2) con ADN genómico de Streptococcus G148 como molde, con el plásmido pET-26(+)-rHuLFt digerido con NheI (Grace JE Jr., Van Eden ME, Aust SD. 2000. Archives in Biochemistry and Biophysics 384:116-22).
35 El constructo resultante se transformó en células BL21 de *E. coli* (DE3:pLysS). La estructura del plásmido resultante, pPrGHFI, se verificó mediante secuenciación parcial. En la Figura 4 se muestra la estructura de pPrGHFI. Las partículas a base de ferritina, que expresan la Proteína G sobre su superficie, se produjeron con células BL21 de *E. coli* (DE3:pLysS:pPrGHFI) usando el protocolo descrito en el Ejemplo 1. El retenido se suspendió en 1 ml y se diluyó diez veces antes del análisis de la funcionalidad según el Ejemplo 5 usando como marcador anticuerpos marcados con Eu.
40 Las partículas con Proteína G dieron una señal de 5,5 veces en comparación con las partículas producidas con pET-26(+)-rHuLFt.

Ejemplo 9

- 45 *Producción del fragmento scfv sobre la superficie de ferritina*

- El gen que codifica el fragmento anti-TSHscFv se insertó en un plásmido que produce la cadena ligera de ferritina humana, ligando el fragmento digerido con NheI, obtenido mediante PCR con los oligonucleótidos 5'-GTTATAT CAACTGTAAAAGT (SEC ID n°: 3) y 5'-AAC-CATGGCATATGGAAATTGTGCTCACCCA (SEC ID n°: 4) con
50 pTSHscHoc como molde, con el plásmido pET-26(+)-rHuLFt digerido con NheI (Grace JE Jr., Van Eden ME, Aust SD. 2000. Archives in Biochemistry and Biophysics 384:116-22). El constructo resultante se transformó en células Origami B de *E. coli* (DE3:pLysS). La estructura del plásmido resultante, pTSHscHFI, se verificó mediante secuenciación parcial. En la Figura 5 se muestra la estructura de pTSHscHFI. Las partículas a base de ferritina, que expresan el anticuerpo anti-TSHscFv sobre su superficie, se produjeron con células Origami B de *E. coli* (DE3:pLysS:pTSHscHFI) usando el
55 protocolo descrito en el Ejemplo 1. El retenido se suspendió en 1 ml y se diluyó cinco veces antes del análisis de la funcionalidad según el Ejemplo 5 usando como marcador TSH marcada con Eu. Las partículas con anti-TSHscFv dieron una señal de 33 veces en comparación con las partículas producidas con pET-26(+)-rHuLFt.

Ejemplo 10

- 60 *Producción de péptido que se une a calmodulina, sobre la superficie de ferritina*

- El gen que codifica cbp se construyó en dos reacciones de PCR. La primera PCR se realizó con los oligonucleótidos 5'-GAATTCGGATCCTTAGTCGTGCTTG (SEC ID n°: 5) y 5'-CTGCTGCGAACC GTTTCAAGAAAA
65 TCAGCTCTTCCGGTGCTGGCGGTATGAGCTCCCAGATTCGTCAGAATT (SEC ID n°: 6), con pET-26(+)-rHuLFt como molde. El producto de la primera PCR se usó como molde de la segunda PCR con los oligonucleótidos 5'-GAATTCGGATCCTTAGTCGTGCTTG (SEC ID n°: 7) y 5'-TAGATATACATATGAAACGCCGTTG GAAGAAAGCGTTCATCGCTGTTTCTGCTGCGAACC GTTTCAAGAAAAT (SEC ID n°: 8). El segundo produc-

to, digerido con NdeI-BamHI, se ligó con el fragmento de 5,3 kb de pET-26(+)rHuLFt digerido con NdeI-BamHI. El constructo resultante se transformó en células BL21 de *E. coli* (DE3:pLysS). La estructura del plásmido resultante, pCBPHFI, se verificó mediante secuenciación parcial. En la Figura 6 se muestra la estructura de pCBPHFI. Las partículas a base de ferritina, que expresan cbp sobre su superficie, se produjeron con células BL21 de *E. coli* (DE3:pLysS:pCBPHFI) usando el protocolo descrito en el Ejemplo 1. El retenido se suspendió en 1 ml y se diluyó cinco veces antes del análisis de la funcionalidad según el Ejemplo 3, con calmodulina marcada con Alexa Fluor 594. Las partículas con cbp dieron una señal de 4,1 veces en comparación con las partículas producidas con pET-26(+)rHuLFt.

Ejemplo 11

Producción de péptido biotinilado, sobre la superficie de ferritina

El gen que codifica el péptido transportador de carboxibiotina (BCCP) se insertó en el plásmido que produce la cadena ligera de ferritina humana ligando el fragmento digerido con NheI, obtenido mediante PCR con los oligonucleótidos 5'-AACCATGGCATATGGAAGCGCCAGCAGCAGC (SEC ID n°: 9) y 5'-AGCCGCTGGTCGTCATC GAGGGTGGCCATATGCGTT-GCAA (SEC ID n°: 10) con ADN genómico XL-1 Blue de *E. coli* como molde, con el plásmido pET-26(+)rHuLFt digerido con NheI (Grace JE Jr., Van Eden ME, Aust SD. 2000. Archives in Biochemistry and Biophysics 384:116-22). El constructo resultante se transformó en células BL21 de *E. coli* (DE3:pLysS). La estructura del plásmido resultante, pBccpHFI, se verificó mediante secuenciación parcial. La estructura de pBccpHFI se muestra en la Figura 3. Las partículas a base de ferritina que expresan BCCP sobre su superficie se produjeron con células BL21 de *E. coli* (DE3:pLysS:pBccpHFI) usando el protocolo descrito en el Ejemplo 1. El retenido se suspendió en 1 ml y se diluyó mil veces antes del análisis de la funcionalidad según el Ejemplo 4, usando como marcador estrep-tavidina marcada con Eu. Las partículas producidas con pBccpHFI dieron una señal de 326 veces en comparación con las partículas producidas con pET-26(+)rHuLFt.

REIVINDICACIONES

1. Uso de una nanopartícula en un ensayo de bioafinidad de unión a ligando, en el que dicha nanopartícula comprende una corteza que se autoensambla formada de varias subunidades proteínicas y/o peptídicas, subunidades proteínicas y/o peptídicas las cuales pueden ser de uno o varios tipos diferentes, ensambladas de manera organizada para formar la corteza que tiene una superficie interna que mira hacia el interior y una superficie externa que mira hacia el exterior de dicha partícula, en el que la corteza de la nanopartícula es una partícula de apoferritina recombinante o una partícula proteínica de Dpr/Dps de tipo apoferritina recombinante, en el que
 - a) uno o varios de los tipos de subunidades tienen uno o varios primeros restos de unión genéticamente fusionados por tipo de subunidad, mirando el resto de unión hacia el exterior de la partícula para la unión de cualquier proteína de unión a ligando específica; y
 - b)
 - i) la partícula contiene dentro de su corteza un marcador y/o
 - ii) uno o varios de los tipos de subunidades tienen uno o varios segundos restos de unión genéticamente fusionados por tipo de subunidad, mirando el resto de unión el interior y/o el exterior de la partícula que se une a un marcador; y
 - c) el marcador o marcadores permiten la detección de la partícula.
2. Uso según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la corteza de la nanopartícula es una proteína Dpr/Dps seleccionada de entre el grupo constituido por proteínas de Dpr/Dps producidas por *Streptococci*, *Listeria*, *Helicobacter* y *Escherichia*.
3. Uso según la reivindicación 1 ó 2, **caracterizado** porque el marcador se selecciona de entre el grupo constituido por una enzima, una proteína luminiscente, una proteína fluorescente coloreada o una molécula orgánica, y un metal de tierras raras.
4. Uso según la reivindicación 3, **caracterizado** porque el marcador es una proteína, preferentemente una enzima seleccionada de entre el grupo constituido por luciferasa, GAO y GFP.
5. Uso según la reivindicación 3, **caracterizado** porque el marcador es un lantánido, preferentemente seleccionado de entre el grupo constituido por Tb, Eu, Sm y Dy.
6. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque uno o varios de los tipos de subunidades tienen uno o varios terceros restos de unión genéticamente fusionados por tipo de subunidad, mirando el resto de unión el exterior de la partícula para la unión a un soporte sólido.
7. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque se selecciona un primer resto de unión a partir del grupo constituido por proteína A, proteína G, proteína L, péptido de unión a calmodulina (CBP) y proteína transportadora de carboxibiotina (BCCP).
8. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque un primer resto de unión es un anticuerpo frente a uno de los miembros del grupo constituido por CRP, antígenos del grupo sanguíneo AB0 o TSH.
9. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque un segundo resto de unión es un resto de unión seleccionado de entre el grupo constituido por proteína A, proteína G, proteína L, péptido de unión a calmodulina (CBP) y proteína transportadora de carboxibiotina (BCCP).
10. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque un segundo resto de unión es un anticuerpo frente a uno del grupo constituido por CRP, antígenos del grupo sanguíneo AB0 y TSH.
11. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque el radio mínimo de la nanopartícula es de 10 a 40 nm.
12. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque el número de subunidades es superior a 8, preferentemente superior a 20.
13. Nanopartícula, útil para ensayo de bioafinidad de unión, que comprende una corteza que se autoensambla formada por varias subunidades proteínicas y/o peptídicas, subunidades proteínicas y/o peptídicas las cuales pueden ser de uno o varios tipos diferentes, ensambladas de manera organizada para formar la corteza que tiene una superficie interna que mira hacia el interior y una superficie externa que mira hacia el exterior de dicha partícula, en el que la corteza de la nanopartícula es una partícula de apoferritina recombinante o una partícula proteínica de Dpr/Dps de tipo apoferritina recombinante, en la que

a) uno o varios de los tipos de subunidades tienen uno o varios primeros restos de unión genéticamente fusionados por tipo de subunidad, mirando el resto de unión el exterior de la partícula para la unión de cualquier proteína de unión a ligando específica; y

b) i) la partícula contiene, dentro de su corteza, un marcador seleccionado de entre el grupo constituido por una enzima, una proteína luminiscente, una proteína fluorescente o coloreada, o una molécula orgánica, y un metal de tierras raras, y/o

ii) uno o varios de los tipos de subunidades tienen uno o varios segundos restos de unión genéticamente fusionados por tipo de subunidad, mirando el resto de unión el interior y/o el exterior de la partícula que se une a un marcador seleccionado de entre el grupo constituido por una enzima, una proteína luminiscente, una proteína fluorescente o coloreada, o una molécula orgánica, y un metal de tierras raras; y

c) el marcador o marcadores permiten la detección de la partícula.

14. Nanopartícula según la reivindicación 13, **caracterizada** porque los primeros restos de unión se seleccionan de entre el grupo constituido por anticuerpos monoclonales, polipéptidos, receptores, anticuerpos recombinantes o fragmentos de anticuerpos, aptámeros, proteínas manipuladas mediante ingeniería genética, y sus derivados.

15. Nanopartícula según la reivindicación 14, **caracterizada** porque el marcador es una proteína, preferentemente una enzima seleccionada de entre el grupo constituido por luciferasa, GAO y GFP.

16. Nanopartícula según la reivindicación 13, **caracterizada** porque el marcador es un lantánido, seleccionado preferentemente de entre el grupo constituido por Tb, Eu, Sm y Dy.

17. Nanopartícula según la reivindicación 13, **caracterizada** porque una o varios de los tipos de subunidades tienen uno o varios de terceros restos de unión genéticamente fusionados por tipo de subunidad, mirando el resto de unión el exterior de la partícula para la unión a un soporte sólido.

18. Nanopartícula según la reivindicación 14, **caracterizada** porque se selecciona un primer resto de unión del grupo constituido por proteína A, proteína G, proteína L, péptido de unión a calmodulina (CBP) y proteína transportadora de carboxibiotina (BCCP).

19. Nanopartícula según la reivindicación 14, **caracterizada** porque un primer resto de unión es un anticuerpo frente a uno de los miembros del grupo constituido por CRP, antígenos del grupo sanguíneo AB0 y TSH.

20. Nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 19, **caracterizada** porque un segundo resto de unión es un resto de unión seleccionado de entre el grupo constituido por proteína A, proteína G, proteína L, proteína de unión a calmodulina (CBP) y proteína transportadora de carboxibiotina (BCCP).

21. Nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 20, **caracterizada** porque un segundo resto de unión es un anticuerpo frente a uno del grupo constituido por CRP, antígenos del grupo sanguíneo AB0 y TSH.

22. Nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 21, **caracterizada** porque el radio mínimo de la nanopartícula es de 10 a 40 nm.

23. Nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 22, **caracterizada** porque el número de subunidades es superior a 8, preferentemente superior a 20.

24. Kit para un inmunoensayo de unión a ligando, que comprende la nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 23.

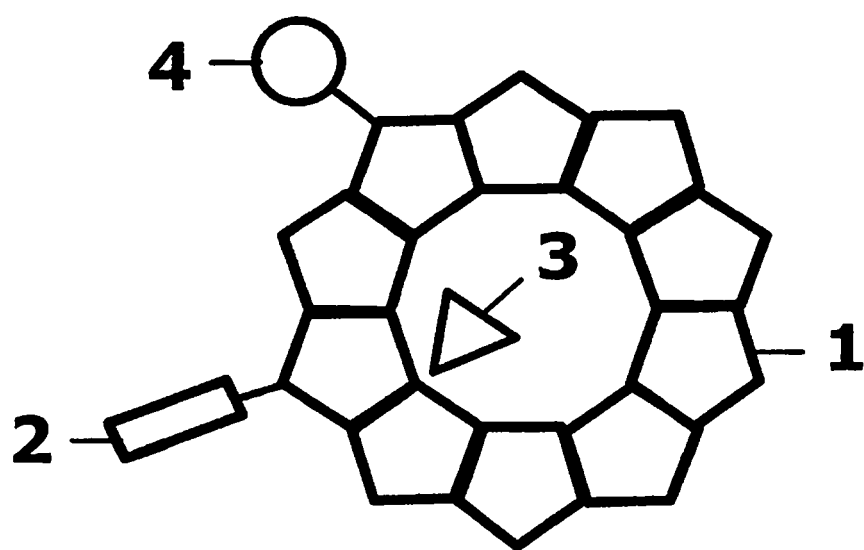


Figura 1

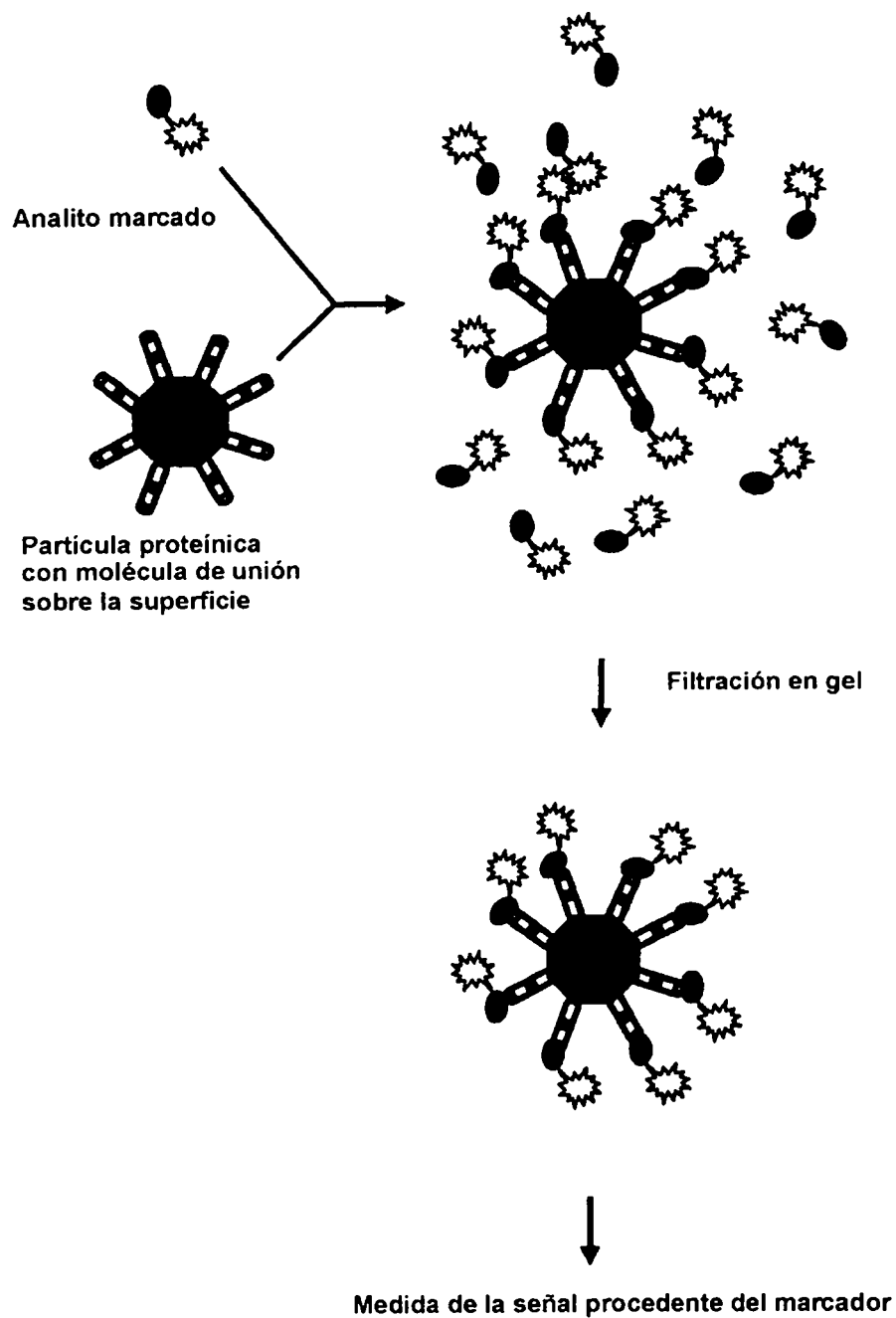


Figura 2

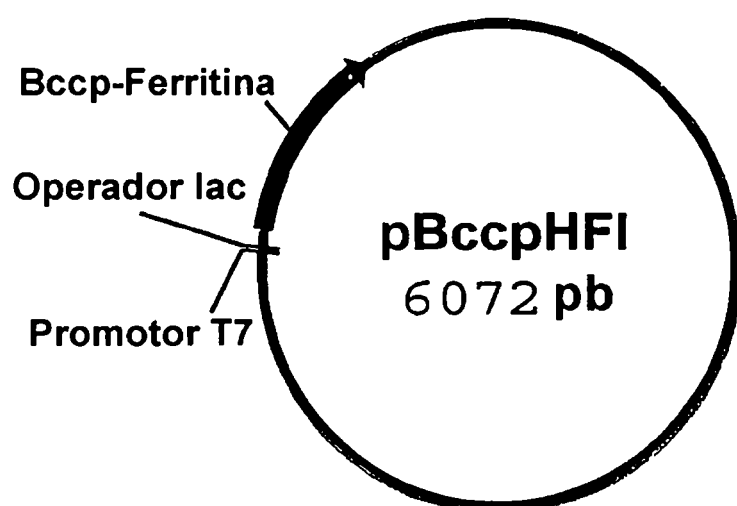


Figura 3

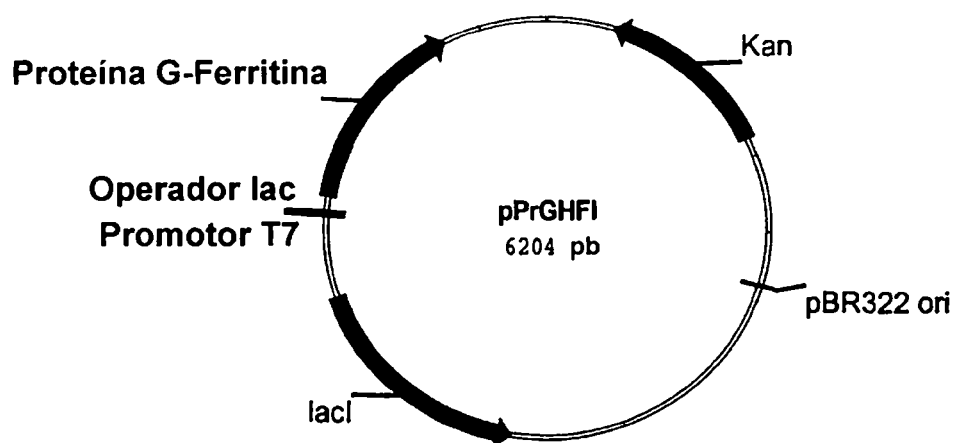


Figura 4

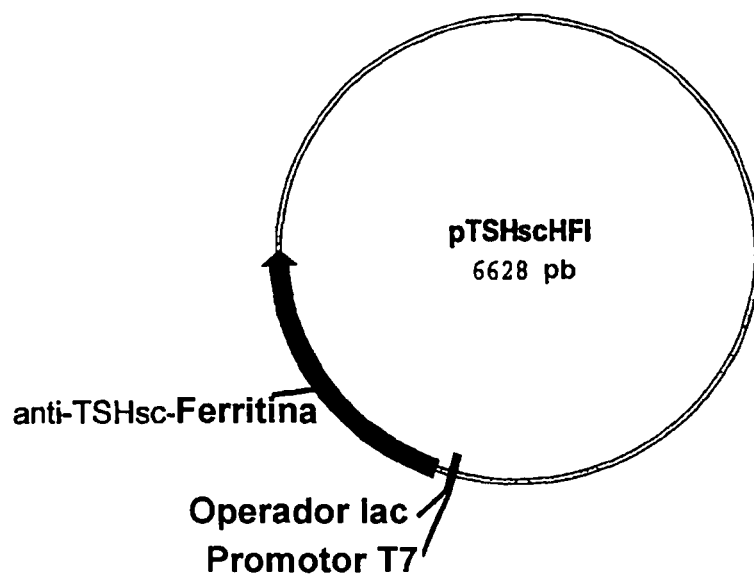


Figura 5

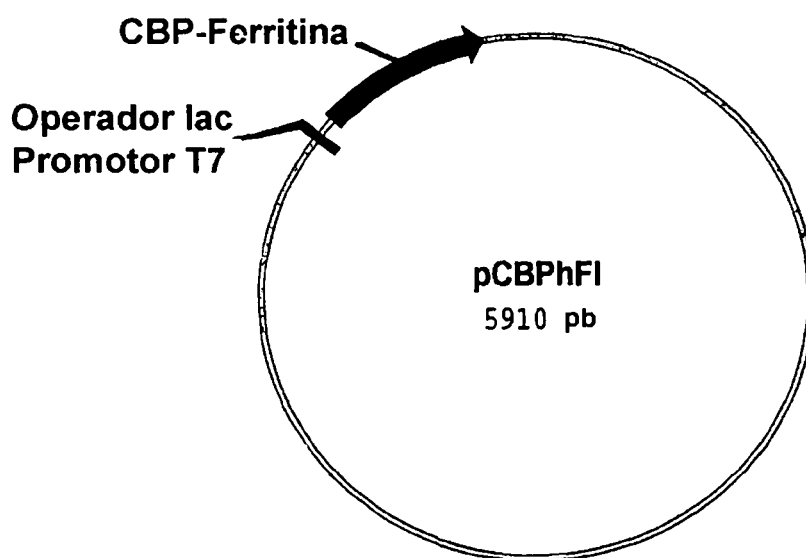


Figura 6

ES 2 293 243 T3

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> Soukka, Tero Korpimaki, Teemu Lamminmäki, Urpo Virta, Marko	
5	<120> Nanopartículas para ensayos de bioafinidad	
	<130> AP101838	
	<160> 10	
	<170> PatentIn version 3.1	
10	<210> 1	
	<211> 34	
	<212> ADN	
15	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
20	<400> 1	
	aaggatccca tatgaacctc tgtaaccatt tcag	34
25	<210> 2	
	<211> 31	
	<212> ADN	
30	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
35	<400> 2	
	aacatggca tatggtgaca acttacaac t	31
40	<210> 3	
	<211> 20	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
50	<400> 3	
	gttatatcaa ctgtaaaagt	20
55	<210> 4	
	<211> 31	
	<212> ADN	
60	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
65	<223> cebador	

ES 2 293 243 T3

<400> 4

aaccatggca tatggaaatt gtgctcaccc a

31

5

<210> 5

<211> 25

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador

15

<400> 5

gaattcggat ccttagtcgt gcttg

25

20

<210> 6

<211> 72

<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador

30

<400> 6

cigctgcgaa ccgtttcaag aaaatcagct ctccgggtgc tggcgggatg agtcccaga
ttcgtcagaa tt

60
72

35

<210> 7

40

<211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

45

<220>

<223> cebador

<400> 7

50

gaattcggat ccttagtcgt gcttg

25

<210> 8

55

<211> 73

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

60

<220>

<223> cebador

65

ES 2 293 243 T3

<400> 8

5	tagatataca tatgaaacgc cgttgaaga aagcgttcat cgctgtttct gctgcgaacc	60
	gttcaagaa aat	73

<210> 9

<211> 31

10 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> cebador

<400> 9

20	aaccatggca tatggaagcg ccagcagcag c	31
----	------------------------------------	----

<210> 10

<211> 40

25 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> cebador

<400> 10

35	agccgctggt cgtcatcgag ggtggccata tgcgttgcaa	40
----	---	----

40

45

50

55

60

65