

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 984 124**

51 Int. Cl.:

A61K 9/127 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 47/24 (2006.01)

A61K 47/42 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.04.2020** **PCT/EP2020/060594**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.10.2020** **WO20212423**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.04.2020** **E 20717232 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.04.2024** **EP 3955895**

54 Título: **Producción de partículas de salipro**

30 Prioridad:

15.04.2019 EP 19169321

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.10.2024

73 Titular/es:

SALIPRO BIOTECH AB (100.0%)
Greenhouse Labs Teknikringen 38A
114 28 Stockholm, SE

72 Inventor/es:

LÖVING, ROBIN y
FRAUENFELD, JENS

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 984 124 T3

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

DESCRIPCIÓN

Producción de partículas de salipro

5 Campo técnico de la invención

La invención se refiere a un procedimiento para preparar partículas de lipoproteínas de saposina, que comprenden proteína similar a saposina, lípidos y opcionalmente un agente hidrófobo.

10 Antecedentes de la invención

Las membranas rodean todas las células vivas y forman las envolturas de muchos virus (p. ej., VIH). En células vivas, la membrana celular sirve como barrera semipermeable para preservar el contenido de la célula. Los constituyentes de la membrana, en particular proteínas de membrana como receptores y transportadores, también determinan y regulan cómo la célula interactúa con su entorno. Esta última función, que incluye procesos biológicos como la transducción de señales, transporte de moléculas, metabolismo de energía, formación de contactos célula-célula y homeostasis celular, es fundamental y depende de proteínas de membrana. Las proteínas de membrana están codificadas por aproximadamente el 30 % de todos los ORF (Wallin y von Heijne, Protein Science 1998 Abril; 7 (4): 1029-38) y, por tanto, representan aproximadamente una cuarta parte de las proteínas de una célula. Las proteínas de membrana de las envolturas virales también sirven para mediar en las interacciones con el entorno, como las membranas celulares del hospedador, que permiten que la cápside viral y el genoma viral entren e infecten las células hospedadoras.

Las proteínas de membrana son de gran interés para la investigación en ciencias de la vida y, en particular, para el descubrimiento de fármacos debido a sus funciones críticas antes mencionadas. De hecho, la mayoría de los fármacos, es decir más del 60 %, se dirigen a proteínas de membrana (Overington et al., Nature Reviews Drug Discovery 5, 993-996 (Diciembre 2006). Por lo tanto, para fines de investigación y desarrollo de fármacos clínicos, es crucial que las proteínas de membrana, pero también otros agentes hidrófobos (por ejemplo, fármacos hidrófobos), se puedan someter a plataformas tecnológicas de última generación sin perjudicar el funcionamiento del agente hidrófobo o de la tecnología. Esto presenta una paradoja ya que la mayoría de las proteínas de membrana y otros agentes hidrófobos requieren un entorno hidrófobo (idealmente integrado en una estructura que imite su entorno natural de membrana) para funcionar correctamente. La mayoría de los ensayos bioquímicos, a menudo realizados en plataformas tecnológicas de última generación, sin embargo, se basan en sistemas acuosos, que estos ensayos y plataformas requieren para funcionar correctamente. Por lo tanto, un objetivo de la presente invención es proporcionar procedimientos mejorados y más eficientes para formular agentes hidrófobos con el fin de hacerlos solubles en sistemas acuosos, al mismo tiempo que se preserva o imita la membrana natural y el entorno lipídico del agente hidrófobo.

Esto también permitiría emplear proteínas de membrana u otros agentes hidrófobos en el cribado de alto rendimiento (HTS), que en sus configuraciones de última generación también suele requerir solubilidad en sistemas acuosos para funcionar correctamente. Los avances en la biología molecular, la computación, la robótica y las tecnologías de detectores han hecho avanzar a HTS hasta convertirlo en el "caballo de batalla" de la investigación farmacéutica, en biotecnología y ciencias de la vida. Mediante la ejecución rápida y paralela de pruebas bioquímicas, HTS ha permitido la rápida identificación de fármacos, anticuerpos, interacciones moleculares y proteínas que modulan una vía biomolecular particular. Los resultados obtenidos proporcionan puntos de partida y pistas importantes para seguir diseñando fármacos y también para comprender el papel de un proceso bioquímico particular en un sistema vivo.

La necesidad de reducir HTS, combinado con avances en microfluidos, ha llevado al desarrollo continuo de enfoques bioquímicos de laboratorio en un chip en los que los análisis se pueden realizar aún más rápidamente y a menor costo en configuraciones de pequeña escala. Sería un gran avance si se pudieran emplear también de forma rutinaria proteínas de membrana y otros agentes hidrófobos en tales aplicaciones de HTS o de laboratorio en un chip. Para ello, a menudo es necesario inmovilizar el agente de prueba sobre una superficie tal como un chip. En consecuencia, un objetivo adicional de la presente invención es proporcionar formas mejoradas y más eficientes de inmovilizar agentes hidrófobos sobre soportes, en particular haciéndolos compatibles con los sistemas de prueba acuosos, al mismo tiempo que se preserva o imita la membrana natural y el entorno lipídico del agente hidrófobo.

Muchas configuraciones de última generación para medir interacciones y reacciones bioquímicas (por ejemplo, la unión de un ligando a su receptor correspondiente, la interacción de un anticuerpo con su antígeno correspondiente o el recambio de un sustrato por una enzima) dependen de biosensores y analitos que se adhieren a la superficie de un soporte sólido. Un conocido sistema de biosensor óptico se basa en la resonancia de plasmones superficiales (SPR). Las proteínas de membrana desempeñan un papel central en la detección de diversos estímulos ambientales, haciéndolos atractivos para su aplicación como analitos adheridos a la superficie en sistemas biosensores. Sin embargo, como también estos sistemas de biosensores se basan en su mayoría en entornos acuosos, las proteínas de membrana y otros agentes hidrófobos no se pueden emplear fácilmente. Por lo tanto, un objetivo adicional de la presente invención es proporcionar formas mejoradas y más eficientes de inmovilizar agentes hidrófobos sobre soportes, en particular haciéndolos compatibles con los sistemas de prueba acuosos, al mismo tiempo que se preserva

o imita la membrana natural y el entorno lipídico del agente hidrófobo.

Resumiendo, como se ha señalado anteriormente, la naturaleza hidrófoba de las proteínas de membrana y otros agentes hidrófobos es inconveniente para aplicaciones y estudios bioquímicos, que normalmente tienen lugar en soluciones acuosas. La naturaleza hidrófoba de las proteínas de membrana y otros agentes hidrófobos también es inconveniente para sus posibles administraciones como agentes terapéuticos o de diagnóstico ya que la mayoría de los sistemas biológicos, incluyendo sangre humana, presentan un entorno acuoso, hidrófilo. Por lo tanto, los agentes hidrófobos (como las proteínas de membrana o los compuestos hidrófobos) plantean dos desafíos importantes para la investigación en ciencias de la vida y la industria farmacéutica: (i) hacer que las proteínas de membrana y otros agentes hidrófobos sean solubles en soluciones acuosas para fines de ensayo y prueba sin perjudicar su función y (ii) administrar dichos agentes hidrófobos como agentes terapéuticos y de diagnóstico, nuevamente sin perjudicar su función deseada y/o natural.

El segundo desafío, es decir, la administración y el suministro de agentes hidrófobos (por ejemplo, compuestos y/o proteínas hidrófobos) como agentes terapéuticos o de diagnóstico, se debe principalmente a su limitada solubilidad acuosa. En el caso de fármacos, esto hace que sean propensos a la agregación, lo que da lugar a partículas de fármaco altamente concentradas localmente que pueden causar una alta toxicidad, respuestas inmunitarias indeseadas y/o volver inactivo al fármaco (Allen y Cullis, *SCIENCE*, 303 (5665): 1818-1822, MAR 19, 2004).

Un objetivo de la presente invención es hacer que agentes hidrófobos tales como proteínas de membrana o fármacos hidrófobos sean más fácilmente empleables en tecnologías de ensayos bioquímicos de última generación tales como HTS, aplicaciones de laboratorio en un chip y biosensores, sin embargo también para proporcionar mejores procedimientos de fabricación y formulación para administrar dichos agentes hidrófobos en aplicaciones terapéuticas o de diagnóstico. Para cumplir este objetivo, son muy deseados métodos eficaces, que ahorran costos y recursos que incorporan agentes hidrófobos en partículas solubles, al mismo tiempo que preservan o imitan la membrana natural y el entorno lipídico del agente hidrófobo.

Las proteínas de membrana se purifican con mayor frecuencia en detergentes, que forman micelas alrededor de las proteínas. Sin embargo, los detergentes suelen ser perjudiciales para la estructura y actividad de las proteínas. Además, los detergentes pueden interferir con los métodos analíticos posteriores. Por lo tanto, un objetivo en la técnica es evitar el uso de altas concentraciones de detergentes en agentes hidrófobos solubilizantes. Los métodos de la técnica anterior que abordan el desafío de hacer que los agentes hidrófobos insolubles sean solubles en soluciones acuosas implican, entre otros, sistemas de nanodiscos (Bayburt et al., *Archives of biochemistry and biophysics*, 450.2 (2006): 215-222 y Denisov et al., *Journal of the American Chemical Society*, 126.11 (2004): 3477-3487).

El documento EP 1 596 828 B1 describe partículas de administración de agentes bioactivos en forma de disco que comprenden una apolipoproteína, que rodea estrechamente una bicapa lipídica en forma de doble cinturón. El interior de dichas partículas se forma por la región hidrófoba de la bicapa lipídica. Esto contrasta con los liposomas, que son envolturas de bicapa lipídica cerradas que contienen un interior acuoso. Las partículas de administración de agentes bioactivos en forma de disco descritas en el documento EP 1 596 828 B1 tienen un diámetro de Stokes de aproximadamente 10 nm y se proponen para su uso como vehículos de administración para medicamentos hidrófobos como la anfotericina B o la camptotecina.

El documento EP 1 345 959 B1 describe un tipo similar de partícula en nanoescala con un diámetro de aproximadamente 10 nm y un peso de aproximadamente 5,5 nm. Las partículas tienen una forma de disco y están compuestas de (i) una proteína de armazón de membrana artificial, (ii) una bicapa de fosfolípidos y (iii) al menos una proteína de membrana hidrófoba o parcialmente hidrófoba.

Sin embargo, hay varios inconvenientes con esta tecnología de nanodiscos en el sentido de que, por ejemplo, se requiere una eliminación del detergente durante el ensamblaje de las partículas. Además, la homogeneidad de tamaño proporcionada por el ajuste a modo de doble cincha de la MSP procedente de apolipoproteína parece ir a expensas de un tamaño mínimo de partícula fijo y una limitación en cuanto a los diámetros máximos obtenibles con los métodos de la técnica anterior.

Recientemente, se han desarrollado nuevas tecnologías de nanopartículas que involucran la familia de proteínas de unión a lípidos de proteínas similares a saposina conservadas (SAPLIP) (documento WO 2014/095576 A1, WO 2015/036549 A1 y WO 2018/033647 A1).

La familia SAPLIP se basa en cuatro miembros fundadores de saposinas. Estas son proteínas pequeñas (~ 80 aminoácidos), saposina A a D, que se unen y/o interactúan con los lípidos y funcionan como cofactores esenciales para varias enzimas lisosomales en el catabolismo de los esfingolípidos (véase Bruhn, *Biochem J.* (2005) 389, 249-257 y referencias citadas en el mismo). Se ha descrito que las saposinas prefieren lípidos cargados negativamente y un pH bajo, que muestran actividades notablemente elevadas a pH ácido, con un punto óptimo de pH en el pH dentro del lisosoma de 4,75. Saposina A, B, C y D se hidrolizan proteolíticamente a partir de una sola proteína precursora de gran tamaño, prosaposina. Las secuencias completas de aminoácidos de las saposinas A, B, C y D se han notificado así como la organización genómica y la secuencia del ADNc de la prosaposina (O'Brien et al. (1988) *Science* 241,

1098- 1101; Furst et al (1992) Biochim Biophys Acta 1126: 1-16).

Saposina C es capaz de inducir la fusión de membranas de vesículas que contienen fosfolípidos en un entorno ácido (Archives of Biochemistry and Biophysics, 1 de julio de 2003; 415(1): 43-53), una característica que no presentan las demás saposinas. Qi et al. (2009) Clin Cancer Res 15(18): 5840-5851 informan sobre las nanovesículas de dioleoilfosfatidilserina acopladas a saposina C (SapC-DOPS) que contienen un interior acuoso, tienen un diámetro medio de aproximadamente 190 nm y muestran actividad dirigida a tumor *in vivo*. En las SapC-DOPS, la saposina C o un péptido derivado de la misma actúa como péptido de asentamiento para el liposoma al que está unida. La saposina C dirige posteriormente el liposoma a células cancerosas que exponen fosfatidilserina en la cara externa de la membrana celular. Los autores creen que un microentorno ácido único alrededor de las células cancerosas causado por la fuga extracelular de enzimas lisosomales hace que el tejido tumoral sea un objetivo óptimo para la saposina C. De acuerdo con Qi et al., los liposomas de SapC-DOPS se preparan secando fosfolípidos purificados disueltos en disolvente bajo N₂ (g), dispersando los fosfolípidos en tampón ácido (pH 5) que contienen saposina C purificada, diluyendo la mezcla 50 x en una solución acuosa fisiológica y facilitando el ensamblaje de nanovesículas mediante tratamiento con ondas sonoras.

Popovic et al., PNAS, vol. 109, n.º 8 (2012) 2908-2912 informan sobre la estructura de discos detergentes de saposina A. La saposina A existe en un estado soluble y uno unido lípido/detergente. En ausencia de lípido, la saposina A adopta una conformación apo monomérica cerrada. Por el contrario, la estructura de saposina A-detergente comunicada por Popovic et al. revela dos cadenas de saposina A en una conformación abierta que encapsula 40 moléculas unidas internamente a detergente organizadas en un núcleo hidrófobo similar a una bicapa altamente ordenado.

Aparte de la cristalización de discos de saposina A-detergente, Popovic et al. también describen la preparación de complejos solubles de lípido-saposina A a pH 4,75 mediante un método que requiere múltiples etapas. En primer lugar, se prepara una fracción uniforme de vesículas de liposomas unilamelares grandes secando lípidos purificados disueltos en cloroformo bajo N₂ (g), dispersando los lípidos secos mediante mezclado en vórtex en tampón ácido (acetato sódico 50 mM, pH 4,8, NaCl 150 mM), sometiendo la suspensión a 10 ciclos de congelación y descongelación, mezclando en un mezclador de vórtex durante 5 min y extruyendo la mezcla a través de un filtro de 200 nm. El mezclado de las grandes vesículas liposómicas artificiales unilamelares preparadas de este modo con saposina A purificada en tampón ácido dieron como resultado partículas de lípido-saposina A solubles. La partícula presentaba una estrecha distribución de tamaño en torno a un radio hidrodinámico (Stokes) promedio de 3,2 nm y contenía aproximadamente 5:1 moléculas lipídicas por cadena de saposina A. El tamaño exacto de las partículas se vio tan solo moderadamente afectado por la relación molar de lípido a proteína y la composición de los liposomas. Los autores observaron partículas similares de 3,2 nm independientemente de si estaban presentes o no fosfolípidos aniónicos, colesterol o glicosfingolípidos en las mezclas liposomales. En todos los casos, se observó un único pico en el intervalo de tamaño de un radio de Stokes de 3,2 nm, lo que indica una distribución de especies relativamente estrecha. Por lo tanto, la tecnología de dicha publicación se limita a un valor de pH de 4,75, al tamaño anteriormente mencionado de las partículas e incluye una laboriosa etapa previa de preparación de liposomas.

El documento WO 2014/095576 A1 y su homólogo europeo EP 2 745 834 A1 demostró por primera vez que es posible incorporar moléculas de carga hidrófobas solubilizadas con detergente, purificadas o proteínas de membrana solubilizadas con detergente, purificadas en partículas de lipoproteínas de saposina utilizando lípidos purificados y solubilizados con detergente. El método descrito en el documento WO 2014/095576 A1 permite el autoensamblaje de partículas de lipoproteínas de saposina poniendo en contacto la proteína similar a saposina en un entorno líquido con lípidos solubilizados y el agente hidrófobo en forma de molécula de carga hidrófoba solubilizada con detergente, purificada o una proteína de membrana solubilizada con detergente, purificada. Todos los componentes individuales están presentes en forma libre y soluble y su autoensamblaje en partículas de lipoproteínas de saposina se basa en el movimiento aleatorio libre de todos los componentes de partículas involucrados en el entorno líquido.

El documento WO 2015/036549 A1 amplió el método descrito en el documento WO 2014/095576 A1 a la incorporación de moléculas de antígeno solubilizadas (mostradas para proteínas virales de membrana) a partir de partículas similares al virus VIH-1 (VLP) bien definidas y purificadas. De acuerdo con los Ejemplos del documento WO 2015/036549 A1, las VLP prepurificadas se lisan, la proteína de pico de membrana del VIH-1 se solubiliza con detergente y luego la proteína de pico libre se pone en contacto con la proteína saposina A libre en un entorno líquido. De esta manera, la proteína similar a saposina proporciona un entorno que imita los lípidos de modo que la molécula de antígeno se ensambla en él. También en este caso, todos los componentes individuales están presentes en forma libre y soluble y su autoensamblaje en partículas de lipoproteínas de saposina se basa en el movimiento aleatorio libre de todos los componentes de partículas involucrados en el entorno líquido. Las partículas de salipro de acuerdo con los documentos WO 2014/095576 A1 y WO 2015/036549 A1 también se describen en Frauenfeld et al., Nature Methods, vol. 13, n.º 4 (2016) 345-351.

El documento WO 2018/033647 A1 y su homólogo europeo EP 3 284 460 A1 describen un proceso para preparar una biblioteca de partículas de lipoproteínas de saposina a partir de membranas celulares o de orgánulos. En lugar de tener que emplear lípidos purificados, solubilizados y componentes proteicos, el documento WO 2018/033647 A1 permite el uso directo de membranas celulares o de orgánulos crudas como material de partida para ensamblar las

partículas de lipoproteína saposina. De esta manera, se obtiene una biblioteca que comprende una mezcla heterogénea de partículas de lipoproteínas de saposina con diferente composición de lípidos de membrana y/o proteínas de membrana. Las bibliotecas de partículas de lipoproteínas de saposina obtenidas mediante el método del documento WO 2018/033647 A1 presentan, por lo tanto, una instantánea de los microdominios y componentes de la membrana real a partir de la cual fueron producidos. El método del documento WO 2018/033647 A1 permite el autoensamblaje de las partículas de lipoproteína de saposina proporcionando membranas crudas o vesículas de membrana crudas que se ponen en contacto con la proteína similar a saposina en un entorno líquido. También en este caso, durante el proceso de ensamblaje, todos los componentes individuales están presentes en forma libre (es decir, no unida a soporte) y su autoensamblaje en partículas de lipoproteínas de saposina se basa en el movimiento aleatorio libre de todos los componentes de partículas involucrados en el entorno líquido.

Si bien los documentos WO 2014/095576 A1, WO 2015/036549 A1 y WO 2018/033647 A1 presentan una mejora significativa al proporcionar una nueva clase de nanopartículas derivadas de proteínas saposinas, que tienen muchas ventajas sobre la tecnología de nanodiscos anterior, todavía existe la necesidad de mejorar aún más los procedimientos para preparar partículas de lipoproteínas de saposina.

Para el uso de partículas de lipoproteínas de saposina en aplicaciones comerciales, es necesario suministrar grandes cantidades a costos de producción reducidos. Por lo tanto, existe una necesidad de procedimientos mejorados para ensamblar partículas de lipoproteínas de saposina en términos de eficiencia, costos y uso de recursos.

A la luz de la creciente importancia antes explicada de las plataformas tecnológicas en la investigación farmacéutica y de ciencias de la vida, es crucial que los agentes hidrófobos incorporados en nanopartículas solubles se puedan emplear en estas plataformas. Esto a menudo requiere, sin embargo, la inmovilización de las nanopartículas en un soporte como en el caso de aplicaciones de biosensores.

Los procedimientos de la técnica anterior para preparar partículas de lipoproteínas de saposina se pueden optimizar aún más para lograr una producción de nanopartículas eficiente, que ahorre costes y recursos. En particular, los procedimientos de la técnica anterior requieren y presuponen una movilidad ilimitada de los materiales de partida en el entorno líquido durante el ensamblaje de las partículas. Además, la técnica anterior no ofrece una posibilidad fácil de reciclar componentes de partículas sobrantes para su uso en otra reacción de ensamblaje de partículas.

Un objetivo de esta invención es abordar uno o más de estos inconvenientes.

Sumario de la invención

El problema subyacente a la invención se ve más generalmente en la provisión de un procedimiento mejorado, que ahorra costos y recursos para producir partículas de lipoproteínas de saposina.

Este problema se soluciona mediante el procedimiento definido en la reivindicación 1. Realizaciones ventajosas se describen en las reivindicaciones dependientes y más adelante en el presente documento.

La invención proporciona un procedimiento para producir una partícula de lipoproteína de saposina, en donde la partícula de lipoproteína de saposina producida comprende

- una proteína similar a saposina,
- lípidos y
- opcionalmente, un agente hidrófobo, en donde el agente hidrófobo es diferente de los lípidos y

(I) en donde el procedimiento comprende las siguientes etapas:

- a) proporcionar los lípidos y opcionalmente el agente hidrófobo;
- b.1) poner en contacto la proteína similar a saposina con un soporte que sea capaz de unir selectivamente la proteína similar a saposina al soporte en un entorno líquido;
- c.1) poner en contacto la proteína similar a saposina unida al soporte con los lípidos y, opcionalmente, el agente hidrófobo, para permitir el autoensamblaje de la partícula de lipoproteína de saposina sobre el soporte;
- d) opcionalmente eluir la partícula de lipoproteína saposina unida al soporte; o

(II) en donde como alternativa el procedimiento comprende las siguientes etapas:

- a) proporcionar el agente hidrófobo y los lípidos;
- b.2) poner en contacto el agente hidrófobo con un soporte que sea capaz de unir selectivamente el agente hidrófobo al soporte;
- c.2) poner en contacto el agente hidrófobo unido al soporte con la proteína similar a saposina para permitir el autoensamblaje de la partícula de lipoproteína de saposina sobre el soporte;
- d) opcionalmente eluir la partícula de lipoproteína de saposina unida al soporte.

En el procedimiento de acuerdo con la invención, o bien el agente hidrófobo o la proteína similar a saposina se unen selectivamente a un soporte y el ensamblaje de partículas se produce en este estado unido al soporte poniendo en contacto el agente hidrófobo unido al soporte o la proteína similar a saposina unida al soporte con los componentes restantes de la partícula de lipoproteína de saposina, lo que permite el autoensamblaje de las partículas de lipoproteínas de saposina sobre el soporte. Esto es diferente de los procedimientos de la técnica anterior, que dependía de procedimientos de ensamblaje, en los que todos los componentes individuales están presentes en forma libre (es decir, no unida a soporte) y su autoensamblaje en partículas de lipoproteínas de saposina se basa en el movimiento aleatorio libre de todos los componentes de partículas involucrados en el entorno líquido.

El procedimiento de acuerdo con la invención tiene la ventaja de que la proteína similar a saposina o el agente hidrófobo se une selectivamente a un soporte, que produce directamente partículas de lipoproteínas de saposina unidas al soporte o de las que se pueden eluir las partículas ensambladas posteriormente. Esto limita la cantidad de partículas de salipro formadas a la cantidad de componentes de partículas unidas previamente, es decir, la cantidad de proteína similar a saposina unida o de agente hidrófobo unido. Por consiguiente, cualquier material que quede sin unir se puede reciclar. El reciclaje puede referirse a la proteína similar a saposina o al agente hidrófobo que no está unido al soporte en las etapas b.2) y b.1), respectivamente. El reciclaje, sin embargo, también puede referirse a componentes de partículas sobrantes, que se pusieron en contacto con el material unido al soporte para permitir el autoensamblaje de las partículas de salipro en la etapa c.1)/c.2), pero no se incorporaron a las partículas. Este reciclaje de los componentes "no utilizados" permite un ensamblaje de partículas que ahorra costes y recursos.

El ensamblaje directo de partículas de lipoproteínas de saposina sobre un soporte es particularmente ventajoso si las partículas necesitan usarse de todos modos en un estado unido al soporte. Este es el caso de muchas aplicaciones analíticas basadas en chips, como aplicaciones de biosensores, en particular para aplicaciones de biosensores ópticos como la resonancia de plasmones superficiales. A continuación se describen éstas con más detalle. En el pasado, las partículas de lipoproteínas de saposina libres tuvieron que prepararse primero mediante los procedimientos de la técnica anterior y luego requirieron una segunda etapa de acoplamiento para inmovilizarlas sobre el soporte. Con el método de la invención, es posible realizar el ensamblaje real de las partículas sobre el soporte, lo que ahorra costos y etapas de procedimiento adicionales.

Fue sorprendente que las partículas de salipro pudieran ensamblarse también cuando un componente de la partícula, es decir, la proteína similar a saposina o el agente hidrófobo, está unido a un soporte. La unión de uno de los componentes de partículas al soporte limita su libertad para entrar en contacto con otros componentes de partículas en solución y también su libertad para interacciones espaciales con los componentes de partículas. Por consiguiente, un deterioro del ensamblaje de partículas con respecto a la eficiencia, en última instancia, también influye en el rendimiento global de las partículas obtenidas, lo que era de esperar.

Debe tenerse en cuenta que se debe suponer que el ensamblaje de partículas de lipoproteínas de saposina implica reordenamientos significativos en la estructura de la proteína saposina y la organización de los lípidos (por ejemplo, desde el movimiento aleatorio de los lípidos libres hasta estructuras bicapa de nanomembranas altamente ordenadas). La proteína saposina probablemente sufre un cambio conformacional al pasar de la forma cerrada libre de lípidos al estado abierto unido a lípidos. Se cree que el autoensamblaje de partículas implica una etapa en la que la proteína similar a saposina captura y abraza los lípidos y el agente hidrófobo que se incorporará a la partícula. Mientras que se sabía que este autoensamblaje se produce en solución, fue completamente inesperado ver que funcionaba igual de bien y rápido cuando uno de los componentes principales de las partículas (es decir, la proteína saposina o el agente hidrófobo) está inmovilizado sobre un soporte sólido.

Fue inesperado descubrir que con el procedimiento de acuerdo con la invención se pueden obtener partículas de salipro unidas al soporte de alta calidad, lo que proporciona una forma fácil, rápida y eficiente de producir partículas de salipro unidas al soporte que mantienen una calidad y composición uniformes a lo largo del tiempo. En principio, la invención proporciona un procedimiento más eficiente y "sencillo" para obtener partículas de salipro unidas al soporte entrelazando el ensamblaje y el acoplamiento de las partículas de salipro. De esta manera, los agentes hidrófobos pueden, en un proceso continuo, solubilizarse en partículas estables que imitan su entorno natural de membrana y, al mismo tiempo, inmovilizarse sobre un soporte para su uso directo en aplicaciones como aplicaciones de laboratorio en un chip o de biosensores como SPR.

Las partículas de lipoproteína de saposina obtenidas mediante el procedimiento de la invención son en principio las mismas que las conocidas en la técnica anterior, sólo que están directamente en forma unida al soporte. Las partículas de lipoproteínas de saposina se denominan también en el presente documento "partícula(s) de salipro". Son nanopartículas que comprenden una proteína similar a saposina, lípidos y opcionalmente un agente hidrófobo. Estos componentes y realizaciones ventajosas de los mismos se definirán con más detalle a continuación. La proteína similar a saposina pertenece a la familia bien conocida y conservada SAPLIP de proteínas que interactúan con lípidos o es un derivado o forma truncada de la misma.

Los experimentos prácticos de los inventores han revelado que el tamaño de las partículas de salipro se autoajusta a la naturaleza del agente hidrófobo y los lípidos incorporados, por ejemplo, al tamaño de la proteína de membrana

incorporada. Las partículas de salipro tienen un tamaño sorprendentemente flexible. También en el procedimiento de acuerdo con la invención, se ha observado que las partículas de salipro ajustan su tamaño a la naturaleza de los agentes hidrófobos incorporados. Esto resulta ventajoso frente a la limitación de tamaño de otras partículas de la técnica anterior no derivadas de saposina. Esta flexibilidad también permite la incorporación de agentes hidrófobos de gran tamaño, como las proteínas de membrana (multiméricas). Para éstas en particular, el procedimiento de la invención tiene la ventaja de que pueden ser reconstituídos en su entorno natural, por ejemplo, los lípidos de membrana u otros componentes celulares asociados a la proteína de membrana y potencialmente necesarios para mantener la estructura y/o la función de la proteína.

Sorprendentemente, las partículas de salipro muestran un determinado grado de termoestabilidad y también parecen ser susceptibles de liofilización y rehidratación cuando se unen a soportes sin que se observe un deterioro importante de la calidad. Esto permite que las partículas de salipro que se obtienen mediante el procedimiento de la invención se utilicen en aplicaciones en las que la portabilidad y la estabilidad del almacenamiento son un problema. Con el procedimiento de la invención es posible obtener partículas de salipro unidas al soporte que se puedan fabricar a medida con antelación, se puedan almacenar y enviar a los usuarios finales más adelante. También es posible emplearlas en aplicaciones durante un período de tiempo más largo, por ejemplo, experimentos de laboratorio en un chip que reutilizan el mismo chip varias veces.

Las partículas de salipro unidas al soporte obtenidas con el método de la invención han demostrado ser capaces de incorporar una variedad de lípidos, proteínas de membrana y compuestos hidrófobos en un pH fisiológico, dando lugar a complejos a nanoescala que son solubles, pero unidos al soporte y estables en un entorno acuoso. Para los agentes hidrófobos probados hasta ahora, en particular para muchas proteínas de membrana complejas, la incorporación en las partículas de salipro unidas al soporte no ha tenido ningún efecto negativo sobre su función biológica. Por el contrario, para muchos de éstos, la incorporación en las partículas de salipro imita eficientemente el entorno natural de la membrana del agente hidrófobo y, por lo tanto, tiene un efecto positivo en su función biológica.

La invención también proporciona la ventaja de que los agentes hidrófobos, para los cuales no es posible la inmovilización directa sobre soportes sin deterioro o pérdida de su función biológica, puede inmovilizarse indirectamente mediante incorporación en una partícula de salipro preparada de acuerdo con el procedimiento (I) de la invención, es decir, en el que la partícula de salipro está unida al soporte no a través del agente hidrófobo sino a través de un resto de unión en la proteína similar a saposina. Esto permite que el agente hidrófobo permanezca sin modificar y/o no en contacto directo con el soporte, sin dejar de estar efectivamente unido a un soporte.

Como se ha descrito anteriormente, la provisión de partículas de salipro unidas al soporte, que opcionalmente también se pueden eluir del soporte, es una herramienta muy útil en aplicaciones basadas en chips, como aplicaciones de laboratorio en un chip o de biosensores (por ejemplo, SPR).

Parece que uniendo selectivamente el agente hidrófobo o la proteína similar a saposina a un soporte y poniéndolos en contacto con los otros componentes de partículas obligatorios respectivos, el procedimiento de la invención proporciona una técnica robusta para ensamblar partículas de salipro, que son estables en soluciones acuosas en un amplio intervalo de pH, en particular a pH fisiológico, y permite partículas más grandes que las partículas de lipoproteínas derivadas de saposina A de 3,2 nm obtenidas a partir de liposomas preparados sintéticamente de acuerdo con la enseñanza de la técnica anterior de Popovic et al.

Como se ha descrito en la introducción, la importancia de las proteínas de membrana en los desarrollos terapéuticos necesita el descubrimiento de métodos innovadores para interrogar las proteínas de membrana en medios sin células, preferentemente en un ambiente sin detergente.

Las partículas de salipro obtenibles por el procedimiento de la invención cumplen este requisito. Las partículas de salipro, una vez obtenidas, son estables en medios libres de células y entornos libres de detergentes, y están directamente unidas a soportes sobre los que posteriormente podrán usarse.

En una realización ventajosa particular de la invención, el agente hidrófobo y los lípidos que se van a incorporar en las partículas de lipoproteínas de saposina se proporcionan en forma de membranas biológicas que comprenden el agente hidrófobo y los lípidos que se van a incorporar en las partículas de lipoproteínas de saposina. En particular, se pueden emplear directamente membranas virales, de arquea, eucarióticas o procarióticas en el procedimiento de la invención como materiales de origen para el agente hidrófobo y los lípidos. Las membranas biológicas pueden proporcionarse en forma de células, virus u orgánulos, todos los cuales pueden estar intactos, tratados con un agente anfifílico o lisados. El agente anfifílico puede seleccionarse del grupo que consiste en detergentes, péptidos anfifílicos, polímeros anfifílicos, otros compuestos anfifílicos y mezclas de los mismos. Ejemplos de polímeros anfifílicos que pueden usarse de acuerdo con la invención son los copolímeros de ácido maleico, en particular copolímero de estireno-ácido maleico (SMA) o copolímero de diisobutileno-ácido maleico (DIBMA). Los péptidos anfifílicos y los polímeros anfifílicos pueden considerarse detergentes especiales. Los SMA adecuados se describen, por ejemplo, en Postis, Vincent, et al. "The use of SMALPs as a novel membrane protein scaffold for structure study by negative stain electron microscopy." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1848.2 (2015): 496-501. Los DIBMA están disponibles comercialmente, p. ej. de anatrache como BMA101. Preferiblemente, el agente anfifílico es un detergente como se

define en el presente documento. Preferiblemente, las células son células eucariotas, en particular células animales no humanas o humanas. Sorprendentemente, la investigación que condujo a esta invención ha demostrado que no se requiere purificación de las membranas biológicas. En su lugar, cuando se usa el método de la invención, las partículas de lipoproteínas de saposina se pueden preparar directamente a partir de células, virus u orgánulos intactos, tratados con agentes anfífilicos o lisados.

Al utilizar membranas biológicas como material de partida en el procedimiento de la invención, se pueden incorporar agentes hidrófobos a las partículas de salipro junto con su entorno de membrana nativo. En comparación con el procedimiento del documento WO 2018/033647 A1, la alternativa de procedimiento (II) de la invención tiene la ventaja de que sólo se preparan las partículas de salipro que comprenden el agente hidrófobo de interés, y no una biblioteca completa de partículas de salipro que representan todo el proteoma/lipidoma de la membrana, del cual nuevamente es necesario aislar las partículas que comprenden el agente hidrófobo de interés. Además, el procedimiento de la invención tiene la ventaja sobre el documento WO 2018/033647 A1 de que las partículas unidas al soporte se pueden obtener en un "procedimiento de una sola etapa" sencillo, simplificado y continuo, lo cual es rentable y deseable, especialmente si las partículas de salipro se van a utilizar en forma unida al soporte.

Al utilizar membranas biológicas como material de partida en la alternativa de procedimiento (I) de la invención, puede obtenerse una biblioteca de partículas de salipro en la que la biblioteca comprende una mezcla heterogénea de partículas de lipoproteínas de saposina con diferentes composiciones de lípidos de membrana y proteínas de membrana. En comparación con el procedimiento del documento WO 2018/033647 A1, esta realización del procedimiento de la invención tiene la ventaja de que las partículas unidas al soporte se pueden obtener en un "procedimiento de una sola etapa" continuo, lo cual es rentable y deseable, especialmente si la biblioteca de partículas de salipro se va a utilizar en forma unida al soporte.

Las partículas de salipro o la biblioteca de partículas de Salipro que se pueden obtener mediante el procedimiento de la invención se pueden implementar para su uso en medicina, para su uso en un método de diagnóstico, un tratamiento cosmético o para su uso como formulación para vacunación. Además, las partículas que se pueden obtener mediante el procedimiento de la invención puede usarse como herramienta para diagnósticos, el desarrollo de fármacos, el cribado de fármacos, el descubrimiento de fármacos, el desarrollo de anticuerpos, el desarrollo de agentes biológicos terapéuticos, para la purificación de membranas o proteínas de membrana, para la expresión de proteínas de membrana, para la investigación de membranas y/o proteínas de membrana, para el aislamiento, identificación y/o estudio de membranas y/o proteínas de membrana o creación de una base de datos de lipidoma o proteoma de membrana.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se expone en el conjunto de reivindicaciones adjuntas. Tal y como se ha explicado anteriormente, la invención proporciona un procedimiento para producir una partícula de lipoproteína de saposina, en donde la partícula de lipoproteína de saposina comprende

- una proteína similar a saposina,
- lípidos y
- opcionalmente, un agente hidrófobo, en donde el agente hidrófobo es diferente de los lípidos y

(I) en donde el procedimiento comprende las siguientes etapas:

- a) proporcionar los lípidos y opcionalmente el agente hidrófobo;
- b.1) poner en contacto la proteína similar a saposina con un soporte que sea capaz de unir selectivamente la proteína similar a saposina al soporte en un entorno líquido;
- c.1) poner en contacto la proteína similar a saposina unida al soporte con los lípidos y, opcionalmente, el agente hidrófobo, para permitir el autoensamblaje de la partícula de lipoproteína de saposina sobre el soporte;
- d) opcionalmente eluir la partícula de lipoproteína saposina unida al soporte; o

(II) en donde como alternativa el procedimiento comprende las siguientes etapas:

- a) proporcionar el agente hidrófobo y los lípidos;
- b.2) poner en contacto el agente hidrófobo con un soporte que sea capaz de unir selectivamente el agente hidrófobo al soporte;
- c.2) poner en contacto el agente hidrófobo unido al soporte con la proteína similar a saposina para permitir el autoensamblaje de la partícula de lipoproteína de saposina sobre el soporte;
- d) opcionalmente eluir la partícula de lipoproteína de saposina unida al soporte.

El procedimiento según la invención permite, en particular, obtener partículas de salipro unidas al soporte, en donde cada partícula de salipro comprende una proteína similar a saposina, lípidos y un agente hidrófobo.

Cuando se proporciona un conjunto complejo de lípidos y agentes hidrófobos en la etapa a), por ejemplo, en forma de

membrana biológica, se genera una biblioteca de partículas de salipro en la alternativa de procedimiento (I) de la invención. Esta biblioteca comprenderá partículas de salipro que comprenden una proteína similar a saposina, un agente hidrófobo (por ejemplo, una proteína de membrana) y lípidos, pero también puede comprender partículas de salipro compuestas únicamente de lípidos y la proteína similar a saposina.

Las partículas de lipoproteínas de saposina se denominan también en el presente documento "partícula(s) de salipro". Comprenden una proteína similar a saposina y lípidos como componentes obligatorios. Normalmente, una partícula de salipro comprende un tipo de proteína similar a saposina. Normalmente, y también de acuerdo con una realización preferida, la partícula de lipoproteína de saposina preparada de acuerdo con la invención comprende una proteína similar a saposina, lípidos y un agente hidrófobo.

Las partículas de salipro de la invención también pueden comprender múltiples agentes hidrófobos, que pueden ser iguales o diferentes entre sí. Ejemplos de multímeros del mismo agente hidrófobo en una partícula de salipro son una proteína de membrana multimérica o una pluralidad de compuestos hidrófobos. Un ejemplo de diferentes agentes hidrófobos en una partícula de salipro es una partícula de salipro que comprende una proteína de membrana y un compuesto hidrófobo.

Las partículas de salipro de la invención comprenden una pluralidad de lípidos, que pueden ser iguales o diferentes entre sí.

La proteína similar a saposina utilizada en el procedimiento de la invención es una proteína similar a saposina (SAPLIP) o un derivado o forma truncada de la misma. El término "proteína similar a saposina" (SAPLIP) está reconocido en la técnica e incluye todos los miembros de la familia de proteínas que interactúan con lípidos de proteínas conservadas similares a saposina (SAPLIP). La abreviatura "SAPLIP" se usa de manera sinónima con el término "proteína similar a saposina". La familia SAPLIP se caracteriza por el plegamiento de saposina, una estructura tridimensional alfa-helicoidal conservada que está estabilizada por enlaces disulfuro intramoleculares altamente conservados (Munford et al. (1995), *Journal of Lipid Research*, vol. 36, n.º 8, 1653-1663 y Bruhn (2005), *Biochem J* 389 (15): 249-257). Ejemplos de miembros de la familia de proteínas similares a saposina (SAPLIP) de acuerdo con la invención se describen en Munford et al. (1995), *Journal of Lipid Research*, vol. 36, n.º 8, 1653-1663 y Bruhn (2005), *Biochem J* 389 (15): 249-257.

En el estado "cerrado", sin ligandos (es decir, sin detergentes/sin lípidos), las SAPLIP adoptan una estructura monomérica compacta de tipo ovillo de cuatro hélices, el pliegue de saposina. Este plegamiento se ilustra por la estructura de la forma apo cerrada de saposina A humana (código de ID del Protein Data Bank (PDB): 2DOB, Ahn et al. (2006) *Protein Sci.* 15: 1849-1857) o las estructuras de saposina C (código de ID del PDB: 1M12; de Alba et al. (2003) *Biochemistry* 42, 14729-14740), NK-lisina (código de ID del PDB: 1NKL; Liepinsh et al. (1997) *Nat. Struct. Biol.* 4, 793-795), amoebaporo A (código de ID del PDB: 10F9) y granulisina (código de ID del PDB: 1L9L; Anderson et al. (2003) *J. Mol. Biol.* 325, 355-365), que son todas casi idénticas y fácilmente superponibles.

Las SAPLIP sufren un cambio conformacional tras unirse a ligandos, tales como lípidos o moléculas de detergente. En la conformación "abierta" unida a ligando, las SAPLIP adoptan una conformación en forma de V o en forma de bumerán con superficies hidrófobas expuestas que entran en contacto con los lípidos unidos. La conformación abierta se ilustra por la estructura de disco de saposina A-detergente de la técnica anterior (código de ID del PDB: 4DDJ; Popovic et al., *PNAS*, vol. 109, n.º 8 (2012) 2908-2912) y la estructura de saposina C unida a micelas de detergente de SDS (código de ID del PDB: 1SN6; Hawkins et al. (2005) *J. Mol. Biol.* 346: 1381-1392).

En las partículas de salipro, la proteína similar a saposina es preferiblemente anfipática, con una parte de su estructura más o menos hidrófila y orientada hacia el disolvente acuoso y la otra parte más o menos hidrófoba y orientada hacia el centro hidrófobo de la partícula, que comprende los lípidos. La proteína similar a saposina se caracteriza preferiblemente por α -hélices anfipáticas con más residuos hidrófobos (tal como A, C, F, G, I, L, M, V, W o Y) predominantemente en una cara de la hélice y restos más polares o cargados (tales como D, E, N, Q, S, T, H, K o R) en la otra cara de la hélice.

Las abreviaturas para los restos de aminoácido como se usan en el presente documento son las siguientes: A, Ala, alanina; V, Val, valina; L, Leu, leucina; I, Ile, isoleucina; P, Pro, prolina; F, Phe, fenilalanina; W, Trp, triptófano; M, Met, metionina; G, Gly, glicina; S, Ser, serina; T, Thr, treonina; C, Cys, cisteína; Y, Tyr, tirosina; N, Asn, asparagina; Q, Gln, glutamina; D, Asp, ácido aspártico; E, Glu, ácido glutámico; K, Lys, lisina; R, Arg, arginina; y H, His, histidina.

Al contrario de los nanodiscos derivados de apolipoproteína de la técnica anterior, la proteína similar a saposina de la invención no encierra los lípidos en forma de doble cinturón, sino más bien, las partículas de salipro se mantienen unidas por un núcleo que comprende los lípidos y que está rodeado por dos o más proteínas similares a saposina, aproximadamente en forma de V o de boomerang, dispuestas en una orientación en la que prácticamente no hay contactos directos proteína-proteína entre las proteínas individuales similares a saposina dentro de una determinada partícula de salipro. Sin desear quedar ligados a esta teoría, se cree que esta disposición de proteínas similares a saposina y lípidos en las partículas de salipro proporciona la flexibilidad de tamaño que se observa cuando se incorporan agentes hidrófobos voluminosos o cantidades crecientes de lípidos en las partículas en el procedimiento

de la invención.

Mientras que la capacidad de interactuar con lípidos, así como la naturaleza anfipática y la estructura tridimensional descritas anteriormente están muy conservadas entre las SAPLIP, son altamente diversas a nivel de secuencia de aminoácidos, con identidades de secuencia por debajo de la zona umbral habitual del 25-30 % de identidad para definir homología (véase la comparación de secuencias en la figura 4 A y 4 B de Bruhn (2005), Biochem J 389 (15): 249-257 reproducido en las figuras 13A y 13B adjuntas).

En las partículas de lipoproteínas de salipro, la proteína similar a saposina sirve principalmente como proteína estructural, proporcionando el armazón para la estructura de las partículas de lipoproteínas de salipro, por ejemplo, una estructura similar a un disco. Por este motivo, las características estructurales, en particular el pliegue de saposina que es característico de las SAPLIP, son más importantes para definir la proteína similar a saposina de la invención que los meros determinantes de secuencia.

Los ejemplos de SAPLIP de acuerdo con la invención son las saposinas A, B, C o D (por ejemplo de *Homo sapiens* [véase la SEQ ID NO. 1 a 4], *Equus caballus*, *Bos taurus*, *Mus musculus*, *Oryctolagus cuniculus*, *Rattus norvegicus* o *Xenopus laevis*); proteína tensioactiva B (por ejemplo, de *Homo sapiens*, *Canis familiaris*, *Mus musculus*, *Oryctolagus cuniculus*, *Ovis aries* o *Rattus norvegicus*); granulisina (por ejemplo, de *Homo sapiens*; véase la SEQ ID NO. 5); NK-lisina (por ejemplo, de *Sus scrofa*; véase la SEQ ID NO. 6); ortólogos de NK-lisina (por ejemplo, de *Equus caballus* o *Bos taurus*); amoebaporos (por ejemplo, de *Entamoeba histolytica*); ortólogos de amoebaporo (por ejemplo, de *Entamoeba dispar* o *Entamoeba invadens*); proteína similar a amoebaporo (por ejemplo, de *Fasciola hepatica*); naegleriaporos (por ejemplo, de *Naegleria fowleri*); clonorina (por ejemplo, de *Clonorchis sinensis*); prosaposina (por ejemplo, de *Homo sapiens*, *Equus caballus*, *Bos taurus*, *Mus musculus*, *Oryctolagus cuniculus*, *Rattus norvegicus* o *Xenopus laevis*) y MSAP (por ejemplo, de *Homo sapiens*).

Las secuencias de SAPLIP específicas utilizadas de acuerdo con la invención se indican en las figuras 4 A y 4 B de Bruhn (2005), Biochem J 389 (15): 249-257, reproducido en las figuras 13A y 13B adjuntas, y cuyas secuencias se incorporan en el presente documento específicamente como referencia. Las secuencias de SAPLIP particulares usadas de acuerdo con la invención se proporcionan en el listado de secuencias como se expone a continuación:

Tabla 1

SEQ ID NO.	Fuente	Proteína	Especie	Número de aa
1	Dominio publico	Saposina A	Homo sapiens	81
2	Dominio publico	Saposina B	Homo sapiens	79
3	Dominio publico	Saposina C	Homo sapiens	80
4	Dominio publico	Saposina D	Homo sapiens	78
5	Dominio publico	Granulisina	Homo sapiens	145
6	Dominio publico	NK-lisina	Sus scrofa	129
7	Bruhn, 2005, Figura 4A	Amoebaporo C	Entamoeba histolytica	77
8	Bruhn, 2005, Figura 4A	Disparporo C	Entamoeba dispar	75
9	Bruhn, 2005, Figura 4A	Amoebaporo B	Entamoeba histolytica	77
10	Bruhn, 2005, Figura 4A	Disparporo B	Entamoeba dispar	75
11	Bruhn, 2005, Figura 4A	Amoebaporo A	Entamoeba histolytica	77
12	Bruhn, 2005, Figura 4A	Disparporo A	Entamoeba dispar	75
13	Bruhn, 2005, Figura 4A	NK-Lisina 1	Sus scrofa	83
14	Bruhn, 2005, Figura 4A	NK-Lisina 2	Sus scrofa	78
15	Bruhn, 2005, Figura 4A	<i>E. caballus</i> similar a NK-1	Equus caballus	83
16	Bruhn, 2005, Figura 4A	Bolisina	Bos taurus	84
17	Bruhn, 2005, Figura 4A	<i>F. hepatica</i> similar a AP	Fasciola hepatica	81
18	Bruhn, 2005, Figura 4A	Granulisina	Homo sapiens	83
19	Bruhn, 2005, Figura 4A	Naegleriaporo B2	Naegleria fowleri	83
20	Bruhn, 2005, Figura 4A	Clonorina	Clonorchis sinensis	73
21	Bruhn, 2005, Figura 4A	Naegleriaporo A1	Naegleria fowleri	83
22	Bruhn, 2005, Figura 4A	<i>C. elegans</i> similar a AP	Caenorhabditis elegans	88
23	Bruhn, 2005, Figura 4B	Saposina A	Homo sapiens	83
24	Bruhn, 2005, Figura 4B	Saposina A	Bos taurus	83
25	Bruhn, 2005, Figura 4B	Saposina A	Mus musculus	83
26	Bruhn, 2005, Figura 4B	Saposina A	Gallus gallus	83

(continuación)

SEQ ID NO.	Fuente	Proteína	Especie	Número de aa
27	Bruhn, 2005, Figura 4B	Saposina A	Danio rerio	83
28	Bruhn, 2005, Figura 4B	Saposina A	Xenopus laevis	83
29	Bruhn, 2005, Figura 4B	Saposina C	Homo sapiens	80
30	Bruhn, 2005, Figura 4B	Saposina C	Bos taurus	79
31	Bruhn, 2005, Figura 4B	Saposina C	Mus musculus	79
32	Bruhn, 2005, Figura 4B	Saposina C	Gallus gallus	80
33	Bruhn, 2005, Figura 4B	Saposina C	Xenopus laevis	79
34	Bruhn, 2005, Figura 4B	Saposina C	Danio rerio	79
35	Bruhn, 2005, Figura 4B	Saposina D	Homo sapiens	81
36	Bruhn, 2005, Figura 4B	Saposina D	Bos taurus	81
37	Bruhn, 2005, Figura 4B	Saposina D	Mus musculus	81
38	Bruhn, 2005, Figura 4B	Saposina D	Gallus gallus	81
39	Bruhn, 2005, Figura 4B	Saposina D	Danio rerio	81
40	Bruhn, 2005, Figura 4B	Saposina D	Xenopus laevis	81
41	Bruhn, 2005, Figura 4B	Saposina B	Homo sapiens	79
42	Bruhn, 2005, Figura 4B	Saposina B	Bos taurus	79
43	Bruhn, 2005, Figura 4B	Saposina B	Gallus gallus	83
44	Bruhn, 2005, Figura 4B	Saposina B	Mus musculus	83
45	Bruhn, 2005, Figura 4B	Saposina B	Danio rerio	79
46	Bruhn, 2005, Figura 4B	Saposina B	Xenopus laevis	79
47		Saposina A	Homo sapiens	19
48		Saposina A	Homo sapiens	17
49		Saposina A	Homo sapiens	27
50		Saposina A	Homo sapiens	8

Una SAPLIP usada de acuerdo con la invención también puede ser un polipéptido que comprende el pliegue de saposina como parte de una proteína multidominio. Este es el caso, por ejemplo, en la esfingomielinasa ácida (de *Homo sapiens*, *Caenorhabditis elegans*, *Ciona intestinalis*, *Anopheles*, *Drosophila*, *Mus musculus* o *Rattus norvegicus*); GDSL (Gly-Asp-Ser-Leu) lipasa, tal como aciloxi hidrolasa (de *Homo sapiens* o *Rattus norvegicus*); countina (de *Dictyostelium discoideum*); J3-cristalina (de *Tripedalia cystophora*) y proteasas aspárticas vegetales (de *Viridiplantae*). Una SAPLIP adicional usada de acuerdo con la invención puede ser bacteriocina AS-48. La bacteriocina AS-48 muestra actividad antimicrobiana, también es capaz de unirse a lípidos y posee el mismo pliegue que los demás miembros de la familia de SAPLIP, pero está desprovista de cualquier puente disulfuro.

Por otro lado, en lo sucesivo, la invención se describe con más detalle para la saposina A o un derivado o forma truncada de la misma como proteína similar a saposina, y considerando que saposina A o un derivado o forma truncada de la misma es una realización preferida, la invención no estará limitada por ello. En su lugar, la invención se extiende explícitamente a toda la familia de proteínas similares a saposina (SAPLIP) como proteínas similares a saposina de la invención. Debido al algo grado de conservación estructural y funcional entre las SAPLIP, se ha demostrado que las características y ventajas de ciertas realizaciones con saposina A como proteína similar a saposina también se aplican a otras realizaciones que utilizan otras SAPLIP o derivados o formas truncadas de las mismas como proteína similar a saposina.

De acuerdo con una realización preferida, la SAPLIP es saposina A, saposina B, saposina C o saposina D. En una realización, la SAPLIP es saposina A, saposina B o saposina D. La saposina A, saposina B, saposina C o saposina D es preferiblemente una saposina A, saposina B, saposina C o saposina D de *Homo sapiens*, *Equus caballus*, *Bos taurus*, *Mus musculus*, *Oryctolagus cuniculus*, *Rattus norvegicus* o *Xenopus laevis*. En una realización, la SAPLIP es de origen humano (es decir, una SAPLIP de *Homo sapiens*).

En una realización preferida, la SAPLIP es saposina A, preferiblemente saposina A de *Homo sapiens*, *Equus caballus*, *Bos taurus*, *Mus musculus*, *Oryctolagus cuniculus*, *Rattus norvegicus* o *Xenopus laevis*, y particularmente preferida saposina A humana, cuya secuencia de aminoácidos se indica como SEQ ID NO. 1. La expresión, purificación y cristalización de saposina A como complejo LDAO-detergente se ha descrito, por ejemplo, en PNAS, vol. 109, n.º 8 (2012) 2908-2912 (Popovic et al.).

De acuerdo con una realización, la proteína similar a saposina comprende la secuencia de longitud completa de una SAPLIP. En otra realización, la proteína similar a saposina es un derivado de una SAPLIP, en particular, un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 20, 25, 30, 40, 50 o un 60 %, preferiblemente al menos un 75 % de identidad a la secuencia de longitud completa de la respectiva SAPLIP. En particular, la proteína similar a saposina puede comprender una secuencia que tenga una identidad con la secuencia de longitud completa de una SAPLIP de al menos el 80 %, 85 %, 90 % o 95 %.

Se puede usar un derivado o una forma truncada de una SAPLIP en el procedimiento de la invención siempre que sea

capaz de autoensamblarse en partículas de salipro en el procedimiento de la invención que se especifica en las reivindicaciones y con mayor detalle en el presente documento. Esto puede ser probado fácilmente por aquellos expertos en la técnica de acuerdo con los Ejemplos descritos en el presente documento sin carga excesiva.

- 5 En una realización, la proteína similar a saposina es saposina A, saposina B, saposina C, saposina D o un derivado o forma truncada de las mismas, que sea capaz de formar partículas de lipoproteínas de saposina en el procedimiento de la reivindicación 1.

10 El término "identidad de secuencia", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grado de identidad entre proteínas que puede calcularse mediante la alineación óptima de las secuencias utilizando una matriz de puntuación como la matriz Blosum62 descrita en Henikoff S. y Henikoff JG., P. N. A. S. USA 1992, 89: 10915-10919. El cálculo del porcentaje de identidad y alineamiento óptimo de dos secuencias utilizando la matriz de similitud de Blosum62 y el algoritmo de Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol. 1970, 48: 443-453) puede realizarse usando el programa GAP de Genetics Computer Group (GCG, Madison, WI, EE. UU.) usando los parámetros por defecto del programa. A modo de comparación para alineamientos de aminoácidos, se usa la herramienta *online* del EMBL "EMBOSS Stretcher" (http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_stretcher/), usando la configuración por defecto del programa.

20 En otra realización, el derivado de una SAPLIP es un polipéptido que comprende una secuencia que tiene una o más deleciones, adiciones, inserciones y/o sustituciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la SAPLIP respectiva. Por ejemplo, el derivado de SAPLIP puede ser un polipéptido que comprende una secuencia de una SAPLIP particular en la que de 1 a 40, preferentemente de 1 a 30 y en particular, de 1 a 20 o de 1 a 15 aminoácidos se han eliminado, añade, insertado y/o sustituido.

25 El término "eliminación", como se usa en el presente documento, se refiere a la retirada de 1, 2, 3, 4, 5 o más restos de aminoácido de la secuencia de partida respectiva.

El término "inserción" o "adición", como se usa en el presente documento, se refiere a la inserción o adición de 1, 2, 3, 4, 5 o más restos de aminoácido en la secuencia de partida respectiva.

30 El término "sustitución", como se usa en el presente documento, se refiere al intercambio de un resto de aminoácido ubicado en una cierta posición por uno diferente.

En una realización preferida, el derivado o forma truncada de la SAPLIP se selecciona de

- 35 i. una proteína que tiene al menos el 20 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de longitud completa de SEQ ID NO. 1, 2, 3, 4, 5 o 6; en particular una proteína que tiene al menos el 20 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de longitud completa de SEQ ID NO. 1, 2, 3, 4, 5 o 6, en donde dicha proteína es capaz del autoensamblaje junto con lípidos en partículas de lipoproteínas cuando se emplea en el procedimiento de la reivindicación 1; y
- 40 ii. una proteína que comprende la secuencia de SEQ ID NO. 1, 2, 3, 4, 5 o 6 en la que se han deleccionado, añadido, insertado y/o sustituido de 1 a 40 aminoácidos.

45 Las identidades de secuencia descritas en el presente documento, por ejemplo, la realización en la que el derivado de la proteína similar a saposina tiene al menos un 20 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de longitud completa de SEQ ID NO. 1, 2, 3, 4, 5 o 6, se puede combinar con la característica de que dicha proteína es anfipática, forma al menos una hélice alfa y es capaz del autoensamblaje junto con lípidos en partículas de lipoproteínas cuando se emplea en el procedimiento de la reivindicación 1.

50 De acuerdo con una realización adicional, la proteína similar a saposina es un derivado de saposina A que comprende uno o más fragmentos de SEQ ID NO. 1. Los fragmentos preferidos corresponden a las hélices a1, a2, a3 y a4 de saposina A, en donde la hélice a1 se forma por el siguiente tramo continuo de aminoácidos: "SLPCDICKDVVTAAGDMLK"; la hélice a2 se forma por el siguiente tramo continuo de aminoácidos: "ATEEEILVYLEKTCDWL"; la hélice a3 se forma por el siguiente tramo continuo de aminoácidos:

55 "PNMSASCKEIVDSYLPVILDIKGEEMS"; y la hélice a4 se forma por el siguiente tramo continuo de aminoácidos: "PGEVCSAL". De acuerdo con una realización particular, el derivado de saposina A es un polipéptido que comprende una secuencia seleccionada entre las hélices a1, a2, a3, a4 de saposina A y combinaciones de las mismas, en particular, en donde el polipéptido comprende la secuencia de las hélices a1, a2 y a3 de saposina A. Los fragmentos de saposina A, tales como sus hélices a1, a2, a3, a4, pueden tener una o más deleciones, adiciones, inserciones y/o sustituciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos.

60

De acuerdo con otra realización, la proteína similar a saposina es un derivado de una proteína similar a saposina que comprende uno o más de los fragmentos definidos en relación con la saposina A en el párrafo anterior, en donde los fragmentos se reemplazan por las secuencias correspondientes de la proteína similar a saposina respectiva.

65 De acuerdo con una realización, cuando se utiliza un derivado o una forma truncada de una SAPLIP como proteína

similar a saposina de acuerdo con la invención, dicho derivado o forma truncada debe ser anfipático, formar al menos una hélice alfa. Además, o como alternativa, dicho derivado o forma truncada debería ser capaz de autoensamblarse junto con lípidos en partículas de lipoproteínas cuando se emplea en el procedimiento de acuerdo con la invención. Como se usa en el presente documento, el término "anfipático" se refiere a polipéptidos o moléculas que tienen regiones tanto hidrófilas como hidrófobas.

Preferiblemente, en caso de usarse un derivado de una SAPLIP, al menos tres, cuatro, cinco o todos los seis residuos de cisteína correspondientes a las seis cisteínas del miembro fundador de SAPLIP, saposina A, deben estar presentes. Se refiere a este respecto a las posiciones de las cisteínas en la comparación de secuencias de las figuras 4 A y 4 B de Bruhn (2005), Biochem J 389 (15): 249-257. Las secuencias y alineamientos de secuencias de las figuras 4 A y 4B de Bruhn et al. se reproducen en las figuras 13A y 13B adjuntas.

La SAPLIP de acuerdo con la invención también puede incluir uno o más aminoácidos no naturales, análogos de aminoácidos o una estructura peptidomimética, en la que el enlace peptídico se reemplaza por una estructura más resistente a la degradación metabólica.

Etapas a) del procedimiento de la invención

En la etapa a) del procedimiento de la invención, se proporcionan los lípidos y opcionalmente el agente hidrófobo, que se van a incorporar en la partícula de salipro. De manera importante, también se pueden proporcionar lípidos y/o agentes hidrófobos adicionales en otras etapas del procedimiento.

"Uno" y "el" se utilizan generalmente en el presente documento en el sentido de "al menos uno" o "al menos un tipo". Por ejemplo, al menos un agente hidrófobo está comprendido en las partículas de salipro de la invención y se proporciona correspondientemente en la etapa a).

El agente hidrófobo y/o los lípidos se pueden proporcionar en una composición con otros constituyentes. Preferiblemente, el agente hidrófobo y/o los lípidos se proporcionan en una composición líquida. En una realización, la composición líquida comprende un disolvente orgánico. En otra realización, la composición líquida es una composición acuosa. En otra realización, la composición líquida es una composición acuosa que comprende detergentes. En una realización adicional, la composición líquida es una dispersión en la que el agente hidrófobo y/o los lípidos están dispersos en una fase acuosa.

El agente hidrófobo y los lípidos se pueden proporcionar juntos o en forma separada. Si se proporcionan juntos, pueden proporcionarse en forma de una membrana biológica o una composición derivada de una membrana biológica. Por ejemplo, los lípidos y opcionalmente el agente hidrófobo pueden proporcionarse en forma de una membrana celular, un endosoma, exosoma, partículas similares a un virus o un liposoma. Si se proporcionan diferentes lípidos y/o diferentes agentes hidrófobos, éstos nuevamente pueden proporcionarse juntos o en forma separada. La membrana biológica puede proporcionarse en forma de células, virus u orgánulos intactos, tratados con agentes anfífilos o lisados, cuando se usen en el procedimiento de la invención.

El agente hidrófobo es diferente de los lípidos comprendidos de otro modo en la partícula. Esto significa que si el agente hidrófobo es en sí mismo un lípido o un lípido modificado, la mayoría de los lípidos comprendidos en la partícula (es decir, más del 50 % en mol basado en la cantidad total de lípidos presentes en la partícula) deben ser diferentes del lípido que forma el agente hidrófobo. En una realización, el agente hidrófobo no es un lípido; en otra realización, el agente hidrófobo no es ni un lípido ni un detergente.

"Agente hidrófobo" tal como se usa en el presente documento, significa cualquier molécula que sea sustancialmente hidrófoba. "Hidrófobo" es un término de la técnica y se refiere a la propiedad de ser inmisible con o tener una fuerte falta de afinidad para/solubilidad en agua. El agente hidrófobo puede ser un compuesto orgánico hidrófobo y/o una biomolécula hidrófoba. Puede ser un agente hidrófobo terapéutica o biológicamente activo o un agente hidrófobo que simplemente estabiliza la forma discoidal de la partícula de salipro. Un agente hidrófobo es un agente, es decir, un compuesto y/o una biomolécula, que no penetra completamente ni permanece soluble en agua y/o que tiende a agregarse y/o dividirse en un entorno hidrófobo cuando está presente en fase acuosa. Al estar comprendido en la partícula de salipro, el agente hidrófobo se solubiliza eficazmente en el interior hidrófobo de la partícula. De este modo puede mantener sus funcionalidades nativas como, por ejemplo, actividad catalítica o unión a ligando.

Los agentes hidrófobos comprendidos en las partículas de salipro generalmente incluyen al menos una región hidrófoba (por ejemplo, lipófila) capaz de asociarse con o integrarse en la porción hidrófoba de una bicapa lipídica. Como tal, el agente hidrófobo también puede ser una molécula quimérica, en donde un resto, módulo o compuesto hidrófobo (por ejemplo, lipófilo), capaz de asociarse con o integrarse en la porción hidrófoba de una bicapa lipídica se ha unido a otra molécula. Por ejemplo, un compuesto acoplado a lípidos o ácidos grasos, especialmente un fármaco acoplado a lípidos o ácidos grasos, puede usarse como agente hidrófobo de acuerdo con esta invención. En estos casos, el compuesto o fármaco en sí no debe ser necesariamente hidrófobo. En algunas realizaciones, al menos una porción del agente hidrófobo se intercala entre o penetra en las porciones hidrófobas (por ejemplo, cadenas de acilo graso) de las moléculas lipídicas en el interior de la partícula.

En una realización, el compuesto orgánico hidrófobo y/o la biomolécula hidrófoba pueden, por ejemplo, ser un agente biológicamente activo, un fármaco, un principio activo de un fármaco, un principio activo de un producto cosmético, un principio activo de un producto fitosanitario, un complemento dietético y/o nutricional, una sonda de diagnóstico, un agente de contraste, un marcador y/o un indicador.

Los fármacos hidrófobos que pueden incluirse en la partícula de salipro y administrarse a un paciente que lo necesite pueden ser cualquier fármaco que tenga baja solubilidad en un entorno acuoso. La baja solubilidad en un entorno acuoso puede ser sólo aparente bajo determinadas condiciones, por ejemplo, determinados intervalos de pH o temperatura o cuando la concentración del agente hidrófobo excede un determinado umbral.

Los fármacos que, por ejemplo, pueden incluirse en la partícula de salipro y administrarse a un paciente que lo necesite para el tratamiento del cáncer, afecciones inflamatorias o infecciosas, enfermedades cardiovasculares, trastornos neurológicos y reumatismo entre otros. El agente hidrófobo puede ser un antioxidante, una vitamina, un agente antiproliferativo, una hormona, un esteroide o una enzima. Puede ser un compuesto herbicida o fungicida.

Algunos ejemplos específicos de fármacos hidrófobos que se pueden incorporar en las partículas de salipro incluyen: curcumina, sulfonamida, tal como sulfonamida, sulfametoxazol y sulfacetamida; trimetoprim, en particular en combinación con sulfametoxazol; una quinolina tal como norfloxacin y ciprofloxacina; un compuesto de beta-lactama que incluye una penicilina como la penicilina G, penicilina V, ampicilina, amoxicilina y piperacilina, una cefalosporina tal como la cefalosporina C, cefalotina, cefoxitina y ceftazidima, otros antibióticos de beta-lactama como imipenem y aztreonam; un inhibidor de beta lactamasa tal como ácido clavulánico; un aminoglucósido como la gentamicina, amikacina, tobramicina, neomicina, kanamicina y netilmicina; una tetraciclina como la clortetraciclina y la doxiciclina; cloranfenicol; un macrólido como la eritromicina; o antibióticos diversos como clindamicina, una polimixina y bacitracina para infecciones antibacterianas y, en algunos casos, antifúngicas; un antibiótico de polieno como la anfotericina B, nistatina y hancina; flucitosina; un imidazol o un triazol como el ketoconazol, miconazol, itraconazol y fluconazol; griseofulvina para enfermedades antifúngicas como aspergilosis, candidiasis o histoplasmosis; zidovudina, aciclovir, ganciclovir, vidarabina, idoxuridina, trifluridina, un interferón (por ejemplo, interferón alfa-2a o interferón alfa-2b) y ribavirina para enfermedades antivirales; aspirina, fenilbutazona, fenacetina, acetaminofeno, ibuprofeno, indometacina, sulindaco, piroxicam, diclofenaco; antiinflamatorios de oro y esteroides para enfermedades inflamatorias como la artritis; un inhibidor de ACE como captopril, enalapril y lisinopril; los organonitratos como el nitrito de amilo, nitroglicerina y dinitrato de isosorbida; los bloqueadores de canales de calcio como diltiazem, nifedipina y verapamilo; los antagonistas beta adrenérgicos como el propranolol para enfermedades cardiovasculares; un diurético como una tiazida; por ejemplo, benzotiadiazina o un diurético de asa tal como furosemida; un agente simpaticolítico como la metildopa, clonidina, guanabenz, guanetidina y reserpina; un vasodilatador como hidralazina y minoxidil; un bloqueador de canales de calcio como verapamilo; un inhibidor de ACE tal como captopril para el tratamiento de la hipertensión; quinidina, procainamida, lidocaína, encainida, propranolol, esmolol, bretilium y diltiazem para el tratamiento de la arritmia cardíaca; lovostatina, lipitor, clofibrato, colestiramina, probucol y ácido nicotínico para el tratamiento de hipolipoproteinemias; una antraciclina como doxorubicina, daunorubicina e idamubicina; un compuesto de unión a ADN covalente, un compuesto de unión a ADN covalente y un compuesto de platino tal como cisplatino y carboplatino; un antagonista de folato como metotrexato y trimetrexato; un antimetabolito y un antagonista de la pirimidina como fluorouracilo, 5-fluorouracilo y fluorodesoxiuridina; un antimetabolito y un antagonista de purina como mercaptopurina, 6-mercaptopurina y tioguanina; un antimetabolito y un análogo modificado con azúcar como citarabina y fludarabina; un antimetabolito y un inhibidor de la ribonucleótido reductasa como hidoxiurea; un compuesto de unión a ADN covalente y un compuesto de mostaza nitrogenada como ciclofosfamida e ifosfamida; un compuesto de unión a ADN covalente y un alcanosulfonato como busulfano; una nitrosourea tal como carmustina; un compuesto de unión a ADN covalente y un agente metilante como procarbazona; un compuesto de unión a ADN covalente y una aziridina como mitomicina; un compuesto de unión a ADN no covalente; un compuesto de unión a ADN no covalente como mitoxantrona y, bleomicina; un inhibidor de la función de la cromatina y un inhibidor de la topoisomerasa como etopósido, tenipósido, camptotecina y topotecán; un inhibidor de la función de la cromatina y un inhibidor de microtúbulos como los alcaloides de la vinca, incluida la vincristina, vinblastina, vindisina y paclitaxel, taxotere u otro taxano; un compuesto que afecta la función endocrina como la prednisona, prednisolona, tamoxifeno, leuprolida, etinilestradiol, un anticuerpo tal como herceptina; un gen como el gen p-53, el gen p16, el gen MIT y el gen E-cadherina; una citocina como las interleucinas, particularmente, IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8 y IL-12, los factores de necrosis tumoral como el factor de necrosis tumoral alfa y el factor de necrosis tumoral beta, los factores estimulantes de colonias, como el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) y, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), un interferón como el interferón alfa, interferón-beta 1, interferón-beta 2 e interferón-gamma; ácido todo-trans retinoico u otro retinoide para el tratamiento del cáncer; un agente inmunosupresor como: ciclosporina, una inmunoglobulina y sulfasazina, metoxsaleno y talidomida; insulina y glucagón para la diabetes; calcitonina y alendronato de sodio para el tratamiento de la osteoporosis, hipercalcemia y enfermedad de Paget; morfina y opioides relacionados; meperidina o un congénere; metadona o un congénere; un antagonista opioide como nalorfin; un agente antitúxico de actividad central tal como dextrometorfano; tetrahidrocannabinol o marinol, lidocaína y bupivacaína para el tratamiento del dolor; clorpromazina, proclorperazina; un cannabinoide como tetrahidrocannabinol, una butirofenona como droperidol; una benzamida como metoclopramida para el tratamiento de náuseas y vómitos; heparina, estroptocinasa, factor activador del plasminógeno tisular (t-PA) como anticoagulante, fármacos antitrombóticos o antiplaquetarios; heparina,

sulfasalazina, nicotina y esteroides y factor de necrosis tumoral alfa para el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal; nicotina para el tratamiento de la adicción al tabaco; hormona del crecimiento, hormona luteinizante, corticotropina y somatotropina para terapia hormonal; y adrenalina para la anafilaxia general.

- 5 El experto puede determinar fácilmente de manera experimental si un determinado compuesto se incorpora bien en las partículas de salipro mediante los métodos y ejemplos descritos en el presente documento y en los ejemplos del documento WO 2014/095576 A1, por ejemplo, ejemplo 9. Para compuestos que no son detectables por métodos espectroscópicos, el experto puede basarse, por ejemplo, en CL-EM o cromatografía de capa fina para determinar si un determinado compuesto se incorpora bien en las partículas de salipro.

10 El beneficio de incluir agentes hidrófobos en las partículas de salipro es que se solubilizan efectivamente en la estructura estable de las partículas, que de ese modo puede servir como depósito y/o vehículo de administración para los agentes hidrófobos en un entorno acuoso, que está, por ejemplo, presente en la mayoría de los fluidos y tejidos corporales. En comparación con los medios clásicos de solubilización mediante detergentes o disolventes orgánicos, las partículas de salipro ofrecen la ventaja de que desde el exterior son hidrófilas mientras que el agente hidrófobo se solubiliza eficazmente en el interior hidrófobo de la partícula, por lo que el agente hidrófobo puede mantener sus funcionalidades nativas tales como, por ejemplo, actividad catalítica o unión a ligando. Además, a diferencia de la mayoría de los detergentes y disolventes orgánicos, las partículas de salipro parecen ser biocompatibles.

20 Además de los compuestos orgánicos hidrófobos, las partículas de lipoproteína de salipro también han demostrado ser capaces de incorporar de forma estable biomoléculas hidrófobas como, por ejemplo, una proteína que comprende un resto hidrófobo. De acuerdo con una realización preferida, el agente hidrófobo es una proteína hidrófoba, en particular una proteína de membrana. La proteína de membrana se puede seleccionar de una proteína transmembrana integral, una proteína integral de membrana monotópica, una proteína periférica de membrana, una proteína anfitrópica en un estado unido a lípido, una proteína anclada a lípidos y una proteína quimérica con un dominio hidrófobo y/o transmembrana fusionado. El término "proteína de membrana", tal como se usa en el presente documento, no engloba la proteína similar a saposina.

30 Las proteínas integrales de membrana son proteínas de membrana que están permanentemente unidas a la bicapa lipídica y normalmente requieren un detergente o disolvente apolar para que se desplacen de la membrana. Las proteínas transmembrana son proteínas integrales de membrana que atraviesan la membrana al menos una vez. Ejemplos de proteínas transmembrana que pueden incorporarse en las partículas de salipro son los receptores acoplados a proteínas G (GPCR), portadores, tales como uniportadores, simportadores o antiportadores, canales, tales como canales de iones o enzimas.

35 Las proteínas integrales de membrana monotópicas están unidas permanentemente solo a un lado de la membrana y no atraviesan la membrana. Esta clase incluye proteínas de membrana que están unidas a la membrana mediante anclajes transmembrana alfa-helicoidales. Los ejemplos incluyen citocromo P450 oxidasas y glucoforina A.

40 Las proteínas periféricas de membrana están asociadas temporal o indirectamente a la bicapa lipídica o a las proteínas integrales de membrana incorporadas en la misma. Las proteínas periféricas de membrana normalmente se disocian de las membranas después del tratamiento con un reactivo polar con un pH elevado o altas concentraciones de sal. Los ejemplos de proteínas periféricas de membrana incluyen fosfolipasa A2 o C, lipooxigenasas y citocromo c.

45 Las proteínas ancladas a lípidos se unen a la bicapa lipídica mediante residuos de aminoácidos lipidados, en particular prenilados o anclados a GPI. Los ejemplos incluyen lipoproteínas bacterianas, proteínas G y ciertas cinasas.

50 Las proteínas anfitrópicas son proteínas que existen en al menos dos estados conformacionales, un estado sin lípidos, soluble en agua y un estado unido a lípidos. Tras la asociación con los lípidos, las proteínas anfitrópicas sufren un cambio conformacional que les permite asociarse a la membrana de manera reversible o irreversible. Los ejemplos de proteínas anfitrópicas son las toxinas formadoras de poros y los péptidos antibacterianos.

55 El agente hidrófobo para su uso en el procedimiento de la invención se puede obtener por diferentes medios. Puede ser de origen sintético o natural. Puede proporcionarse en la etapa a) en forma purificada o todavía en forma cruda, por ejemplo, en forma de una membrana cruda o de una mezcla de reacción cruda. Este es especialmente el caso si se usa la alternativa (II) del procedimiento de la invención, en la que la etapa b.2) puede usarse como una etapa de purificación concomitante para el agente hidrófobo. Esto puede, por ejemplo, lograrse realizando una etapa de lavado entre las etapas b.2) y c.2). Una etapa de lavado como se usa en el presente documento puede limitarse a la eliminación de partes de la composición no unida en la que se proporcionó el agente hidrófobo en la etapa a) y/o se puso en contacto con el soporte en la etapa b.2).

60 Cuando el agente hidrófobo es una biomolécula hidrófoba, se puede obtener mediante purificación de una fuente natural. El experto conoce las estrategias de purificación y puede seleccionar un método de purificación adecuado en función del objetivo de purificación que desee alcanzar. La naturaleza de la biomolécula hidrofóbica determina el proceso de purificación, que puede comprender cromatografía de exclusión por tamaño, separación basada en carga o hidrofobicidad como en cromatografía de interacción hidrófoba o cromatografía de intercambio iónico, y/o

cromatografía de afinidad.

El término "purificado", tal como se usa en el presente documento, está reconocido en la técnica y no denota ningún grado particular de pureza. "Purificada" significa que una molécula biológica fue sometida a un proceso de purificación. La eliminación de cualquier cantidad de moléculas no deseadas se considera purificación.

Junto a la proteína similar a saposina y el al menos un agente hidrófobo, las partículas de salipro obtenidas en el procedimiento de la invención también comprenden lípidos como tercer componente obligatorio. Al menos una parte de los lípidos que se van a incorporar en las partículas de salipro se proporciona en la etapa a) del proceso de la invención.

El término "lípidos" tal como se usa en el presente documento está reconocido en la técnica y se refiere a una sustancia natural de origen biológico o a un lípido sintético, en donde los lípidos son solubles o parcialmente solubles en disolventes orgánicos o se dividen en un entorno hidrófobo cuando están presentes en fase acuosa. El término "lípidos", tal como se usa en el presente documento, no se refiere a un tipo único de molécula de lípido en las partículas de lipoproteína de saposina obtenidas mediante el procedimiento de la invención.

Las partículas de salipro normalmente comprenden una mezcla de lípidos. En una realización, los lípidos de las partículas de salipro son una mezcla que se produce naturalmente en células de arquea, virus, procariotas, eucariotas o membranas de orgánulos eucariotas de las que se obtienen. Por ejemplo, los lípidos pueden ser lípidos cerebrales, lípidos de extracto de corazón, lípidos de extracto de hígado, lípidos de extracto de levadura o lípidos de extracto de *E. coli*. En otra realización, los lípidos pueden ser de origen sintético. En una realización adicional, los lípidos pueden ser de origen semisintético, lo que significa que se usan mezclas de lípidos sintéticos y naturales y/o que los lípidos naturales han sido modificados químicamente, por ejemplo, para obtener lípidos marcados de manera fluorescente o lípidos modificados con grupo de cabeza tales como lípidos glicosilados, lípidos funcionalizados, lípidos sensibles al pH o lípidos adhesivos. En una realización, las partículas de salipro comprenden al menos 3, 5, 10 o 20 lípidos diferentes.

En una realización preferida, los lípidos comprenden o consisten en lípidos anfipáticos. Éstos pueden seleccionarse del grupo que consiste en fosfolípidos, glucolípidos, esteroides y mezclas de los mismos.

Los fosfolípidos poseen una parte polar que se disuelve en agua (la "cabeza" de fosfato) y una parte hidrófoba no polar que no ("la cola de lípido"). Estas partes están conectadas por un resto de glicerol. En el agua, los fosfolípidos pueden formar un cúmulo con las cabezas orientadas hacia el agua y las colas orientadas hacia fuera. Las cadenas grasas en los fosfolípidos y glucolípidos normalmente contienen un número par de átomos de carbono, normalmente de entre 16 y 20. Los ácidos grasos de 16 y 18 carbonos son los más comunes. Los ácidos grasos pueden ser saturados o insaturados. La configuración de los dobles enlaces se encuentra normalmente en la denominada configuración *cis*. El isomerismo *cis* y *trans* es un término utilizado en química orgánica para referirse al estereoisomerismo engendrado en la orientación relativa de los grupos funcionales dentro de una molécula de acuerdo con Cahn-Ingold-Prelog (CIP; Cahn, R.S. e Ingold, C.K.; Prelog, V., "Specification of Molecular Chirality". *Angewandte Chemie International Edition*, 5 (4), páginas 385-415, 1966). Los ácidos grasos típicos presentes en la membrana celular también se describen en Alberts et al., "The Cell", 4ª edición, Macmillan Magazines Ltd, 2002 en páginas 61 y 62. Los ejemplos adicionales de los lípidos de membrana son fosfolípidos, tales como fosfatidilcolina, tal como POPC (1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfolina), fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina, como POPS (1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfo-L-serina) fosfatidilinositol y esfingomielina.

Los glucolípidos son lípidos con un carbohidrato unido a los mismos por medio de un enlace glucosídico. Los carbohidratos se encuentran normalmente en la superficie externa de las membranas de células eucariotas. Se extienden desde la bicapa de fosfolípidos hasta el ambiente acuoso fuera de la célula. Los ejemplos de glucolípidos son glicerolípidos, galactolípidos, sulfolípidos, glucoesfingolípidos, glucocerebrósidos, sulfátidos, gangliósidos, globósidos, glucosfosfingolípidos y glucosfosfatidilinositoles.

Los esteroides son un subgrupo de esteroides. Los esteroides, como parte de la membrana, se producen normalmente en membranas de eucariotas, tales como plantas, animales y hongos. Los ejemplos de esteroides son colesterol, campesterol, sitosterol, estigmasterol y ergosterol.

De acuerdo con una realización preferida, los lípidos son lípidos formadores de bicapas lipídicas y/o lípidos biocompatibles. El término "biocompatible", tal como se usa en el presente documento, denota que es biológicamente compatible al no producir una respuesta tóxica, dañina o inmunológica en el tejido vivo. Como se usa en el presente documento, "lípidos formador de bicapa lipídica" se refiere a un lípido que es capaz de formar una bicapa lipídica con un interior hidrófobo y un exterior hidrófilo. Puede usarse cualquier lípido formador de bicapa que sea capaz de asociarse con una SAPLIP o un derivado o forma truncada de la misma para ensamblarse en una estructura de partícula de acuerdo con la invención. Los lípidos formadores de bicapa incluyen, pero sin limitación, fosfolípidos, esfingolípidos, glucolípidos, alquilfosfolípidos, éter-lípidos y plasmalógenos. Puede usarse un tipo de lípido formador de bicapas o una mezcla de dos o más tipos.

Los lípidos también pueden comprender lípidos que no sean lípidos formadores de bicapas. Dichos lípidos incluyen, pero sin limitación, colesterol, cardiolipina, fosfatidiletanolamina (este lípido puede formar bicapas en ciertas circunstancias), oxisteroles, esteroides vegetales, ergosterol, sitosterol, lípidos catiónicos, cerebrósidos, esfingosina, ceramida, diacilglicerol, monoacilglicerol, triacilglicerol, gangliósidos, éter-lípidos, alquilfosfolípidos, plasmalógenos, prostaglandinas y lisofosfolípidos.

Los lípidos pueden ser una mezcla de los lípidos enumerados anteriormente, pero no se limitan a los mismos. Normalmente, los lípidos usados en el procedimiento de la invención comprenden al menos fosfolípidos, glucolípidos, colesterol y mezclas de los mismos. De acuerdo con una realización preferida, los lípidos son lípidos eucarióticos y/o procarióticos, en particular, de tal forma que están típicamente presentes en una cualquiera de las membranas presentes en una célula eucariota o procariota. Los lípidos preferidos, por ejemplo, son fosfolípidos, glucoesfingolípidos, esteroides, fosfatidilcolina, fosfatidilserina (PS), 2-oleoil-1-palmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (POPC), 2-oleoil-1-palmitoil-sn-glicero-3-glicerol (POPG), 2-oleoil-1-palmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (POPE), diacilglicerol, colesterol, esfingomielina, galactosilceramida, gangliósidos, fosfatidilinositoles y sulfogalactoceramidas o combinaciones de los mismos.

En otra realización, los lípidos comprenden fosfolípidos. Los ejemplos de fosfolípidos adecuados incluyen, pero sin limitación, DMPC, DMPG, POPC, dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), dipalmitoilfosfatidilserina (DPPS), cardiolipina, dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG), diesteoilfosfatidilglicerol (DSPG), fosfatidilcolina de yema de huevo (PC de huevo), fosfatidilcolina de soja, fosfatidilinositol, ácido fosfatídico, esfingomielina y fosfolípidos catiónicos.

Los lípidos usados en el procedimiento de la invención son normalmente una mezcla heterogénea de lípidos tal y como se produce en la membrana de una célula u orgánulo. Pero también es posible incluir además un lípido sintético o atípico que puede ser un lípido modificado que incluya uno o más restos funcionales unidos, tales como un resto de direccionamiento o un resto bioactivo.

Los lípidos usados en el procedimiento de la invención también pueden comprender o consistir en lípidos que se producen de manera natural, lípidos sintéticos, lípidos modificados, grasas, ceras, esteroides, vitaminas liposolubles, monoglicéridos, diglicéridos, triglicéridos, fosfolípidos, ácidos grasos, glicerolípidos, glicerofosfolípidos, esfingolípidos, sacarolípidos, policétidos, lípidos de esteroide y lípidos de prenil o combinaciones de los mismos.

En una realización adicional, uno o más de los agentes hidrófobos, los lípidos y/o la proteína similar a saposina están en un estado solubilizado con detergente. En una realización, el agente hidrófobo está en un estado solubilizado con detergente. En otra realización, los agentes hidrófobos y los lípidos están en un estado solubilizado con detergente. Estado solubilizado con detergente significa que el detergente aporta y/o mantiene el componente respectivo soluble en solución acuosa.

El término "detergente", tal como se usa en el presente documento, está reconocido en la técnica y no está comprendido en la definición de "lípidos", tal como se usa en el presente documento: Aunque muchos detergentes tienen una estructura general anfifílica similar a la de los lípidos, es decir, un grupo de cabeza hidrófilo polar y una cola hidrófoba no polar - los detergentes difieren de los lípidos en la forma de los monómeros, en el tipo de agregados formados en solución y en el intervalo de concentración necesario para la agregación. Los lípidos en general tienen una estructura sustancialmente cilíndrica; el volumen ocupado por la cola hidrófoba es similar al volumen ocupado por el grupo de cabeza polar. Los monómeros detergentes suelen tener una forma más cónica; el volumen ocupado por la cola hidrófoba es más pequeño que volumen ocupado por el grupo de cabeza polar. Los detergentes tienden a agregarse en micelas esféricas o elipsoidales que son solubles en agua sin formar estructuras bicapa en ausencia de lípidos (véase el manual "Detergents and their uses in membrane protein science" de Anatrache, www.anatrache.com).

Los detergentes que pueden emplearse pueden ser aniónicos, catiónicos, no iónicos, zwitteriónicos y mezclas de los mismos.

Los detergentes aniónicos típicos son alquilbencenosulfonatos. La porción alquilbenceno de estos aniones es lipófila y el sulfonato es hidrófilo. Los detergentes aniónicos pueden, por ejemplo, comprender grupos alquilo ramificados o grupos alquilo lineales. Los ejemplos de detergentes aniónicos adecuados son ácidos biliares, tales como el ácido desoxicólico (DOC), alquilbencenosulfonatos, tales como dodecilbencenosulfonato de sodio ramificado, dodecilbencenosulfonato de sodio lineal y mezclas de los mismos.

Los detergentes catiónicos son similares a los aniónicos, con un componente hidrófobo, pero, en lugar del grupo sulfonato aniónico, los tensioactivos catiónicos tienen amonio cuaternario como el extremo polar. El centro de amonio está cargado positivamente.

Los detergentes no iónicos se caracterizan por sus grupos de cabeza no cargados, hidrófilos. Los detergentes no iónicos típicos son, por ejemplo, a base de polioxietileno o un glucósido. Ejemplos comunes del primero incluyen Tween, Tritón y la serie Brij. Estos materiales también se conocen como etoxilados o PEGilados y sus metabolitos, nonilfenol. Los glucósidos tienen un azúcar como grupo de cabeza hidrófilo no cargado. Los ejemplos incluyen tioglucósido de octilo y maltósidos. El grupo de cabeza de glucósidos también puede ser de alto peso molecular, como

en el caso de las saponinas. Las saponinas consisten en un resto de azúcar unido a un triterpeno o aglicona esteroide. Dependiendo de la porción no sacárida de la molécula de saponina, las saponinas se pueden dividir en glucósidos triterpénicos, glucósidos esteroideos y glicosidos alcaloides esteroideos. Los detergentes de las series HEGA y MEGA poseen como grupo de cabeza un alcohol de azúcar. Ejemplos de detergentes no iónicos adecuados que pueden utilizarse en el procedimiento de acuerdo con la invención son las saponinas, por ejemplo, escina, bacopaside, bacósido, chaconina, charantina, digitonina, glicirrizina, ginsenósido, holoturina, protodioscina y solanina y mezclas de las mismas. También son adecuados para su uso en el procedimiento de acuerdo con la invención, detergentes sintéticos estructuralmente similares a las saponinas, tales como glicol-diosgenina. Otros ejemplos de detergentes no iónicos adecuados que pueden usarse en el procedimiento de acuerdo con la invención son los alquilglucósidos, tales como alquil maltósidos de cadena corta, media o más larga, tales como n-dodecil- β -maltósido (DDM), decanoil-N-hidroxietilglucamida (HEGA), n-decanoil-N-metil-D-glucamida (MEGA) y mezclas de los mismos.

Un detergente particularmente preferido de acuerdo con la presente invención se selecciona de la clase de las saponinas, en particular digitonina. Experimentos prácticos con digitonina han demostrado que el procedimiento de la invención es más eficiente en términos de producción de partículas de salipro en caso de que se use digitonina como detergente en comparación con la ausencia de detergente o el uso de otros tipos de detergentes.

Los detergentes zwitteriónicos poseen una carga neta nula derivada de la presencia de igual número de grupos químicos con carga adversa, es decir, en la suma el número de cargas negativas y positivas es igual, de modo que la carga total es neta cero. Los ejemplos incluyen Fos-colinas, CHAPS/CHAPSO, óxidos de laurildimetilamina (LDAO) y mezclas de los mismos.

En una realización de la invención, el detergente puede seleccionarse del grupo que consiste en alquilbencenosulfonatos o ácidos biliares, detergentes catiónicos y detergentes no iónicos o zwitteriónicos, tales como óxidos de laurildimetilamina (LDAO), Fos-colinas, CHAPS/CHAPSO, saponinas como digitonina y detergentes sintéticos estructuralmente relacionados como glicol-diosgenina, alquilglucósidos como alquil maltósidos de cadena corta, media o más larga, en particular, β -D-maltósido de n-dodecilo, glucósidos, anfífilos de maltosa-neopentilglicol (MNG), polímeros anfífilos (anfipoles), copolímero de estireno y ácido maleico (SMA), oligómeros macrocíclicos o cíclicos a base de un producto de hidroxialquilación de un fenol y un aldehído (calixareno) y mezclas de los mismos.

Si el agente hidrófobo usado en el procedimiento de la invención está en un estado solubilizado con detergente, es ventajoso que el detergente sea un detergente que tenga colas hidrófobas de cadena corta a media. Esto es particularmente cierto si se incorpora una proteína de membrana como agente hidrófobo. "Colas hidrófobas de cadena corta", como se usa en el presente documento, significa de C2 a C9, como por ejemplo en n-nonil- β -maltósido (NM); "colas hidrófobas de cadena media", como se usa en el presente documento, significa de C10 a C15, tal como, por ejemplo, en n-decil- β -maltósido (DM) o n-dodecil- β -maltósido (DDM). En una realización, el detergente tiene de 2 a 12 átomos de carbono en su cola hidrófoba, preferentemente de 2 a 10 y lo más preferentemente, de 2 a 9 átomos de carbono en su cola hidrófoba.

Los experimentos prácticos han demostrado que las proteínas similares a saposina no suelen necesitar detergentes ni otros disolventes durante la purificación, el almacenamiento o la manipulación. Opcionalmente, sin embargo, además, la proteína similar a saposina se encuentra en un estado solubilizado con detergente.

Si el agente hidrófobo está en forma de una biomolécula hidrófoba que está en un estado solubilizado con detergente, además puede estar en complejo con lípidos, en particular lípidos anulares. Lípidos anulares, también denominados en el presente documento "lípidos de cubierta" o "lípidos límite", representan un conjunto seleccionado de lípidos, que se unen o se adhieren preferentemente a la superficie de biomoléculas hidrófobas durante su purificación a partir de membranas. Constituyen una capa, o un anillo o cubierta, de lípidos que están altamente inmovilizados debido a la existencia de fuertes interacciones de unión entre lípidos y proteínas.

En una realización, el detergente usado para solubilizar el agente hidrófobo, los lípidos y/o la proteína similar a saposina no se transfiere en cantidades sustanciales a las partículas de salipro formadas en el procedimiento de la invención. En particular, la cantidad de detergente en las partículas obtenibles mediante el proceso de acuerdo con la invención puede ser de baja a indetectable. En una realización, la partícula de salipro obtenida no comprende cantidades sustanciales de detergente, en particular, menos de un 0,1 % en peso, preferentemente, menos de un 0,01 % en peso, de manera particularmente preferente, menos de un 0,001 % en peso de detergente basándose en el peso de la partícula. La cantidad de detergente (u otros componentes) presentes en las partículas puede determinarse, por ejemplo, mediante espectrometría de masas.

En otra realización, el agente hidrófobo y los lípidos se proporcionan en la etapa a) en forma de una membrana biológica, que comprende el agente hidrófobo y los lípidos que se van a incorporar en las partículas de lipoproteínas de saposina. La membrana biológica puede ser una membrana viral, de arquea, eucariótica o procariótica, es decir, una membrana derivada de un virus, una arquea, célula u orgánulo eucariota o procariótica. La membrana biológica se puede utilizar en el procedimiento de la invención en forma de células, virus u orgánulos intactos, tratados con agentes anfífilos o lisados. En particular, la membrana biológica puede proporcionarse en forma de células, virus u orgánulos que han estado en contacto con un detergente. La membrana puede comprender el agente hidrófobo y los

lípidos que se van a incorporar en las partículas de lipoproteínas de saposina de forma natural. La membrana puede, sin embargo, también derivarse de un virus, una arquea, célula u orgánulo eucariota o procariota que fue diseñado para expresar o comprender el agente hidrofóbico y/o los lípidos en sus membranas. Por ejemplo, si el agente hidrofóbico es una proteína hidrofóbica, la membrana se puede obtener a partir de una célula que expresa dicha proteína hidrofóbica como un transgén. La proteína hidrofóbica puede expresarse en particular en una forma genéticamente modificada (por ejemplo, etiquetada). Si el agente hidrofóbico es un fármaco hidrofóbico, la membrana puede derivarse de una célula que estuvo expuesta al fármaco hidrofóbico. Si el fármaco es suficientemente lipofílico, esto conduce a la incorporación del fármaco en la membrana, que se puede probar fácilmente extrayendo la fracción de membrana y probando la presencia del fármaco.

La membrana que puede usarse en el procedimiento de la invención se selecciona preferiblemente de una membrana viral, de arquea, de orgánulo o célula eucariota o procariótica. El término "membrana" se refiere a cualquier membrana que comprende una capa de lípidos. Preferiblemente, la membrana es una bicapa lipídica. En ocasiones, el término "membrana" se usa en el presente documento indistintamente para "membrana celular" y/o "membrana orgánulo".

Si la membrana se proporciona en forma de células, éstas pueden seleccionarse de células procariotas, eucariotas y arqueas. Preferiblemente, las células son células eucariotas, en particular células animales no humanas o humanas. Dichas células pueden obtenerse a partir de cultivos celulares, sin embargo también de una fuente natural como muestras de tejido, muestras de biopsia y otros materiales biológicos.

El término "membrana celular" se refiere a una membrana biológica que separa el interior de las células del entorno exterior. La estructura compleja y la pluralidad de componentes comprendidos en una membrana celular, tales como lípidos de membrana y proteínas de membrana, se describen también en detalle en Alberts et al., "The Cell", 4ª edición, Macmillan Magazines Ltd, 2002 en las páginas 583 a 614 y en Campbell et al., "Biologie", 6ª edición, Spektrum Verlag, 2003 en las páginas 163 a 177.

En una realización, la partícula de salipro obtenida mediante el procedimiento de la invención consiste esencialmente en la proteína similar a saposina y componentes de la membrana obtenidos de la membrana viral, celular o de orgánulo.

El agente hidrofóbico y los lípidos se pueden proporcionar en la etapa a) en forma de una membrana cruda, que comprende el agente hidrofóbico y los lípidos que se van a incorporar en las partículas de lipoproteínas de saposina. "Membrana cruda" tal como se usa en el presente documento se refiere a las membranas que ya no están completamente intactas pero que aún comprenden esencialmente la composición natural de la membrana, en particular con respecto a los lípidos de membrana y las proteínas de membrana. La membrana cruda pueden ser membranas celulares crudas, membranas de orgánulos crudas o porciones de las mismas, en cada caso de una arquea, célula procariota o eucariota. La membrana cruda también puede ser una membrana de envoltura viral cruda de un virus envuelto. Por ejemplo, una fracción de membrana cruda obtenida después de la rotura celular o la lisis de células (de origen arqueal, eucariota o procariota) u orgánulos es una "membrana cruda de célula u orgánulo". Se puede obtener una fracción de membrana viral cruda después de romper la envoltura viral. Las "membranas víricas, celulares o de orgánulo crudas" comprenden necesariamente los componentes naturales de la membrana presentes en la envoltura vírica, célula y orgánulo. En particular, las "membranas víricas, celulares o de orgánulo crudas" comprenden tanto lípidos de membrana como también proteínas de membrana. La rotura o lisis de las células puede ocurrir por medios mecánicos pero también poniendo en contacto las células con un agente anfifílico, en particular un detergente.

Las membranas celulares crudas, membranas de orgánulos crudas o membranas virales crudas ya no son membranas celulares, membranas de orgánulos o envolturas virales completamente intactas. Forman espontáneamente vesículas de membrana cruda debido a interacciones hidrofóbicas entre dos sitios de ruptura de membrana determinados.

El agente hidrofóbico y los lípidos se pueden proporcionar en la etapa a) en forma de las membranas que todavía están comprendidas en células, virus u orgánulos intactos, tratados con agentes anfifílicos o lisados. Por lo tanto, las células, virus u orgánulos se pueden usar directamente en la etapa a). Pueden estar intactos, pretratados con un agente anfifílico o lisados. En particular, el agente hidrofóbico y los lípidos se pueden proporcionar en la etapa a) en forma de células, virus u orgánulos que han estado en contacto con un agente anfifílico, en particular con un detergente. Las membranas particularmente adecuadas para ser utilizadas en el procedimiento de la invención se pueden obtener directamente a partir de cualquier célula, virus u orgánulo nativos, simplemente tratándolos con un agente anfifílico, en particular con un detergente. Preferiblemente, las células en contacto con el agente anfifílico son células eucariotas, en particular células animales no humanas o humanas. Las células eucariotas tratadas con agentes anfifílicos pueden, por ejemplo, ser células neoplásicas o células cancerosas/tumorales. Las células que se han puesto en contacto con el agente anfifílico en el método de la invención, también se pueden organizar como, por ejemplo, un tumor tisular o sólido.

El tratamiento de células, virus u orgánulos con el agente anfifílico normalmente tiene lugar en un entorno líquido. El tratamiento con el agente anfifílico, en particular cuando es un detergente, parece tener el efecto de que las estructuras de membrana de células, virus u orgánulos se vuelven más fluidizados y se aflojan. Aunque no se desee estar unido

a esta teoría científica, también parece que los agentes anfífilos, en particular detergentes, activan la proteína saposina, quizás induciendo una conformación abierta. En una realización preferida, no se lleva a cabo ningún tratamiento adicional de las células, virus u orgánulos, además del tratamiento con el agente anfílico, en particular, ningún tratamiento adicional para lograr la alteración de las células, virus u orgánulos tales como mediante tratamiento químico y/o mecánico. Tratamientos químicos y/o mecánicos adecuados para conseguir la rotura de las células, virus u orgánulos se conocen por el experto en la técnica.

En una realización preferida, el tratamiento con detergente en un entorno líquido implica el contacto de las células, virus u orgánulos con un detergente en una concentración de 0,01 a 2000000 veces la CMC del detergente, preferiblemente en una concentración de 0,1 a 20000 veces la CMC del detergente y lo más preferiblemente en una concentración de 1 a 2000 veces la CMC del detergente. En muchas realizaciones, los mejores resultados se logran cuando la concentración de detergente en el entorno líquido está por encima de la CMC del detergente. Las concentraciones de detergente inferiores a la CMC parecen tener también efectos positivos, posiblemente activando la saposina sin que el detergente realmente solubilice las membranas. La concentración micelar crítica (CMC) se define como la concentración de un detergente a la que se forman micelas y todas las moléculas de detergente adicionales agregadas al sistema se incorporan en las micelas. Normalmente, las células, virus u orgánulos se incuban con el agente anfílico, en particular cuando es un detergente, durante 0,5 min a 180 min y preferiblemente de 30 min a 90 min. Además, la incubación con el detergente se realiza normalmente a una temperatura de 1 a 37 °C y preferiblemente a una temperatura de 2 a 6 °C.

Etapas b.1)/b.2) del procedimiento de la invención

En la etapa b.1)/b.2) del procedimiento de la invención, ya sea la proteína tipo saposina (etapa b.1) o el agente hidrófobo (etapa b.2) se ponen en contacto con un soporte que es capaz de unirse selectivamente al agente hidrófobo o la proteína tipo saposina. En la etapa b.2) del procedimiento de la invención, el agente hidrófobo se pone en contacto con un soporte que es capaz de unir selectivamente el agente hidrófobo al soporte. Como alternativa, en la etapa b.1) del procedimiento de la invención, la proteína tipo saposina se pone en contacto con un soporte que es capaz de unirse selectivamente a la proteína similar a saposina.

Preferiblemente, el agente hidrófobo en la etapa b.2) o la proteína similar a saposina en la etapa b.1) se ponen en contacto, es decir, se llevan a contacto, con el soporte en un entorno líquido. Preferiblemente, el entorno líquido es un entorno líquido acuoso. En determinadas realizaciones, el entorno líquido acuoso es una solución tamponada a un pH de 2,0 a 10,0, de 5,0 a 10,0 o de 5,0 a 8,5; en particular de 6,0 a 8,0 y lo más preferiblemente de 7,0 a 8,0.

El término "soporte", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier material de soporte que sea capaz de unirse selectivamente a la molécula diana de interés. Para los soportes empleados en la etapa b.1) del procedimiento de la invención (alternativa I), la molécula diana es la proteína similar a saposina. Para los soportes empleados en la etapa b.2) del procedimiento de la invención (alternativa II), la molécula diana es el agente hidrófobo. La estructura molecular en el soporte que se une a la molécula diana se denomina en el presente documento "resto de captura". La estructura molecular en la molécula diana que está unida por el soporte se denomina en el presente documento "resto de unión". Por lo tanto, el soporte comprende o ha sido funcionalizado para comprender restos de captura que se unen a restos de unión correspondientes presentes en la molécula diana de interés, es decir, en la proteína similar a saposina (etapa b.1) o el agente hidrófobo (etapa b.2).

El soporte, tal como se usa en el presente documento, puede ser en particular un "portador", "material portador" o "fase estacionaria" que comprende dichos restos de captura. En una realización preferida, es un soporte sólido.

El soporte puede estar en forma de perlas, un lecho, una membrana o un soporte sólido con una superficie plana, curvada, contorsionada, retorcida y/o angular.

En una realización, el soporte está en forma de perlas. Se consiguen resultados especialmente buenos con perlas que se utilizan en la técnica anterior como soportes cromatográficos, por ejemplo, en cromatografía de bioafinidad. Estas perlas suelen estar basadas en materiales hechos de polisacáridos, tales como agarosa, celulosa, lignocelulosa y dextrano, que pueden estar reticulados, u otros polímeros, tal como óxido de polietileno. Para su uso en el proceso de la invención, el material de perlas comprende o ha sido funcionalizado para comprender restos de captura que se unen a restos de unión correspondientes presentes en la molécula diana de interés, es decir, en la proteína similar a saposina (etapa b.1) o el agente hidrófobo (etapa b.2). Las perlas utilizadas en el procedimiento de la invención, tales como perlas de afinidad, pueden tener un diámetro promedio en el intervalo de 1 a 900 µm o de 10 a 500 µm. En una realización, el diámetro es inferior a 500 µm, inferior a 250 µm o inferior a 100 µm. Preferiblemente, las perlas utilizadas en el procedimiento de la invención tienen estructuras de poros accesibles. El soporte también puede formar un gel debido a la hidratación de los sólidos. Se prefieren estos materiales porosos o geles debido a la gran cantidad de sitios de unión disponibles por volumen de material. El elevado número de sitios de unión proporciona una mayor unión, capacidad reactiva y/o separativa. En otra realización, las perlas son magnéticas, lo que permite unir de manera conveniente el soporte a otras superficies. Las perlas magnéticas suelen ser más pequeñas que las perlas de afinidad estándar. Por lo tanto, las perlas de acuerdo con la invención también pueden tener un diámetro promedio en el intervalo de 600 nm a 10 µm, de 400 nm a 7 µm o de 200 nm a 5 µm. En otra realización, el diámetro de las perlas

magnéticas es inferior a 7 μm , inferior a 4 μm o inferior a 1 μm .

En una realización, el soporte tiene forma de un lecho. El lecho puede estar formado por perlas o fibras. El lecho puede ser, sin embargo, también una estructura continua tal que el lecho comprenda una única pieza de material atravesada por poros. Ejemplos de lechos continuos son perlas o fibras reticuladas covalentemente. El lecho puede ser un lecho cromatográfico como es bien conocido por el experto del campo de la cromatografía de proteínas y lípidos. El lecho puede estar basado en materiales hechos de polisacáridos, tales como agarosa, celulosa, lignocelulosa y dextrano, que pueden estar reticulados, u otros polímeros, tal como óxido de polietileno. Para su uso en el proceso de la invención, el material de lecho comprende o ha sido funcionalizado para comprender restos de captura que se unen a restos de unión correspondientes presentes en la molécula diana de interés, es decir, en la proteína similar a saposina (etapa b.1) o el agente hidrófobo (etapa b.2).

En una realización, el soporte tiene forma de una membrana. La membrana es una membrana no biológica que no consiste en componentes biológicos típicos de membrana tales como lípidos y/o proteínas de membrana. Preferiblemente se utiliza una membrana cromatográfica que es bien conocida por el experto del campo de la cromatografía de membrana de proteínas y lípidos. La membrana puede estar basada en materiales hechos de polisacáridos, tales como agarosa, celulosa, lignocelulosa y dextrano, que pueden estar reticulados, u otros polímeros, tal como óxido de polietileno. Para su uso en el proceso de la invención, la membrana comprende o ha sido funcionalizado para comprender restos de captura que se unen a restos de unión correspondientes presentes en la molécula diana de interés, es decir, en la proteína similar a saposina (etapa b.1) o el agente hidrófobo (etapa b.2).

En una realización, el soporte es un soporte sólido con una superficie plana. "Plana", tal como se utiliza en el presente documento, significa "sustancialmente plana" en el sentido de que la superficie es sustancialmente plana macroscópicamente. Esto significa que la microestructura puede comprender estructuras no planas, y también la macroestructura puede comprender áreas que no son perfectamente planas. En una realización, las estructuras dobladas o inclinadas también se consideran sustancialmente planas en el sentido de esta invención si comprenden un área superficial amplia. El término "soporte sólido con una superficie plana" sirve para distinguir soportes sólidos sustancialmente planos tales como chips o planos de superficie de las realizaciones de perlas descritas anteriormente. El término "sólido" tal como se usa en el presente documento no significa que incluye geles. En una realización, sólido significa sustancialmente rígido e inflexible. En otra realización, el soporte sólido con una superficie plana comprende una superficie no porosa.

Un ejemplo de un soporte sólido con una superficie plana que se puede utilizar en el procedimiento de la invención es un chip o una superficie de biosensor. En una realización, la superficie plana del soporte sólido está hecha de metal. En particular, el metal puede seleccionarse del grupo que consiste en oro, plata, cobre, aluminio y mezclas de los mismos. En otra realización, la superficie está hecha de vidrio y/o de una resina sintética, es decir, un material polimérico. Para su uso en el proceso de la invención, la superficie plana del soporte sólido comprende o ha sido funcionalizada para comprender restos de captura que se unen a los correspondientes restos de unión presentes en la molécula diana de interés, es decir, en la proteína similar a saposina (etapa b.1) o el agente hidrófobo (etapa b.2). En una realización, las dimensiones del soporte sólido con una superficie plana están en el intervalo de 1 a 50 mm^2 , en particular de 5 a 25 mm^2 .

El soporte comprende un resto de captura que le permite unirse selectivamente a la molécula diana de interés a través de un resto de unión en la molécula diana. Para los soportes empleados en la etapa b.1) del procedimiento de la invención (alternativa I), la molécula diana es la proteína similar a saposina. Para los soportes empleados en la etapa b.2) del procedimiento de la invención (alternativa II), la molécula diana es el agente hidrófobo.

Los términos "un resto de captura" o "un resto de unión" se usan en el presente documento en el sentido de "al menos un resto de captura" y "al menos un resto de unión". Los soportes usados en el procedimiento de la invención normalmente comprenderán múltiples restos diana, que pueden ser iguales o diferentes. Normalmente, el soporte comprenderá una pluralidad de restos de captura del mismo tipo. La molécula diana puede comprender uno o más restos de unión. Por ejemplo, cuando la unión se basa en interacciones de afinidad, la molécula diana puede comprender una o múltiples copias de una etiqueta de afinidad. Cuando la unión se basa en interacciones hidrófobas, la molécula diana puede comprender uno o más sitios de unión hidrófobos, etc.

La molécula diana comprende un resto de unión que está unido selectivamente por el resto de captura del soporte. El término "resto de unión" se refiere a cualquier estructura molecular en la molécula diana, es decir, el agente hidrófobo o la proteína similar a saposina de acuerdo con el procedimiento de la invención que permite la unión selectiva al correspondiente resto de captura del soporte. El resto de unión de la molécula diana y el resto de captura del soporte forman un par de interacción complementario. En conjunto, los términos "resto de captura" y "resto de unión" se denominarán en el presente documento "restos de reconocimiento".

En consecuencia, en la alternativa (I) del procedimiento de la invención, el soporte comprende un resto de captura, y la proteína similar a saposina comprende un resto de unión, en donde el resto de captura es capaz de unirse selectivamente al resto de unión en la proteína similar a saposina. En la alternativa (II) del procedimiento de la invención, el soporte comprende un resto de captura, y el agente hidrófobo comprende un resto de unión, en donde el

resto de captura es capaz de unirse selectivamente al resto de unión en el agente hidrófobo. En cuanto a su unión al soporte, el "agente hidrófobo" y la "proteína similar a saposina" se denominarán colectivamente en el presente documento "molécula diana".

- 5 El término "unir" tal como se usa en el presente documento puede significar "inmovilizar", "capturar", "fijar", "acoplar" o "retener" la molécula diana sobre el soporte. El término "selectivamente" indica que el soporte se une preferencialmente, principalmente y/o casi exclusivamente a la molécula diana, es decir, el agente hidrófobo o la proteína similar a saposina. La unión selectiva se puede lograr mediante interacción electrostática, interacción hidrófoba, unión por afinidad y/o formación de enlaces covalentes entre el resto de captura del soporte y el resto de unión de la molécula diana. Por lo general, la unión será reversible. En una realización, sin embargo, la unión al soporte es sustancialmente irreversible. En otra realización, la unión al soporte se realiza mediante enlaces covalentes.

10 Como nota general, siempre que en el presente documento se haga referencia a pares de resto de captura/resto de unión adecuados, el par inverso también debe ser descrito. En otras palabras, en muchos casos, el resto de captura sobre el soporte y el resto de unión en la molécula diana se pueden usar indistintamente.

15 La unión puede implicar un enlazador o espaciador que conecta los restos de unión y captura. El conector o espaciador puede ser una molécula al menos bifuncional que reacciona con o se une tanto al resto de unión como al de captura o puede estar comprendido en el resto de unión o de captura.

20 El resto de captura del soporte puede permitir la unión selectiva de la molécula diana mediante una variedad de modos, que se explicarán con más detalle a continuación. Por ejemplo: (i) capturar la molécula diana acoplando químicamente su resto de unión al resto de captura del soporte mediante un enlace químico, (ii) capturar la molécula diana a través de interacciones basadas en afinidad entre el resto de captura del soporte y un resto de unión natural o diseñado en la molécula diana, (iii) unir indirectamente la molécula diana mediante modificación por ingeniería genética del resto de captura en el soporte para que se una a un agente de puente (p. ej., un epítopo peptídico, análogo de sustrato o ligando), que está unido selectivamente por el resto de unión en la molécula diana, (iv) capturar la molécula diana mediante interacciones hidrófobas entre el resto de captura del soporte y un resto de unión natural o modificado por ingeniería genética en la molécula diana, y/o (v) capturar la molécula diana mediante interacciones basadas en carga entre el resto de captura del soporte y un resto de unión natural o modificado por ingeniería genética en la molécula diana.

25 En una realización, la unión selectiva de la molécula diana al soporte en la etapa b.1)/b.2) se logra acoplando químicamente el resto de unión de la molécula diana al resto de captura del soporte mediante un enlace químico. Esto se puede lograr aprovechando los grupos funcionales de la molécula diana, como grupos tiol, amino, hidroxilo, aldehído o carboxilo. El experto conoce restos de captura adecuados del soporte para reaccionar con dichos restos de unión de la molécula diana. El experto puede seleccionar un par adecuado de resto de captura/resto de unión dependiendo del tipo de acoplamiento que se desee conseguir. Los grupos tiol en las moléculas diana pueden, por ejemplo, reaccionar con maleimidas, disulfuros o yodacetamida utilizados como restos de captura sobre el soporte o *viceversa*. Las aminas primarias en las moléculas diana pueden, por ejemplo, hacerse reaccionar con ésteres de succinimida (como N-hidroxisuccinimida, sulfosuccinimida u otros ésteres succinimidílicos), imidoésteres o isotiocianatos (tales como fenilisotiocianato) utilizados como restos de captura sobre el soporte o *viceversa*. Los grupos carboxi de las moléculas diana pueden, por ejemplo, hacerse reaccionar con carbodiimidas (tales como 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) utilizadas como restos de captura sobre el soporte o *viceversa*.

30 Dependiendo de la química elegida, el acoplamiento de las moléculas diana al soporte mediante la formación de enlaces químicos puede ser sustancialmente irreversible, lo que puede ser beneficioso para ciertas aplicaciones que requieren una unión particularmente estrecha de las partículas de salipro formadas al soporte. Por otro lado, la captura a través de restos de reconocimiento basados en afinidad, la interacción hidrófoba o interacción electrostática suele ser reversible y tiene la ventaja de una fácil elución en la etapa d) y la posibilidad de regenerar y reutilizar el soporte.

35 En otra realización, la unión selectiva de la molécula diana al soporte en la etapa b.1)/b.2) se logra mediante interacciones basadas en afinidad entre el resto de captura del soporte y un resto de unión natural o modificado por ingeniería genética en la molécula diana. De esta manera, las moléculas diana con un resto de unión natural o modificado por ingeniería genética se unen selectivamente al resto de captura del soporte mediante interacciones basadas en afinidad.

40 Ejemplos de pares basados en afinidad de resto de captura natural/resto de unión son lectinas que se unen a ciertos restos de azúcar en la molécula diana (por ejemplo, si se trata de una proteína de membrana glicosilada) o anticuerpos que reconocen epítopos naturales de la molécula diana (o *viceversa*). Modificaciones postraduccionales como la glicosilación, sulfatación, palmitoilación, miristoilación, ubiquitinación o SUMOilación también pueden servir como restos de unión de acuerdo con la invención. El experto conoce otras diversas interacciones naturales basadas en la afinidad entre un resto de captura y un resto de unión.

45 Ejemplos particularmente importantes de pares de resto de captura/resto de unión basados en afinidad modificados por ingeniería genética que son útiles en el procedimiento de la invención provienen del área bien conocida de las

etiquetas de afinidad. En consecuencia, en una realización, el resto de captura o el resto de unión es una etiqueta de afinidad y el otro resto de reconocimiento correspondiente es un resto que tiene alta afinidad por la etiqueta de afinidad. Por ejemplo, se puede usar una resina de Proteína A-sefarosa como soporte (la Proteína A entonces es la etiqueta de afinidad sobre el soporte) junto con una fusión de agente hidrófobo-anticuerpo (la porción Fc del anticuerpo es entonces el resto de unión en la molécula diana). Si se utiliza un complejo agente hidrófobo-anticuerpo, el anticuerpo actúa como un enlazador como se describió anteriormente. Preferiblemente, el resto de unión en la molécula diana es una etiqueta de afinidad. Por ejemplo, una resina de Ni^{2+} -NTA se puede utilizar como soporte (siendo entonces la Ni^{2+} -NTA el resto de captura) junto con una molécula diana etiquetada con His (siendo entonces la etiqueta His la etiqueta de afinidad y el resto de unión en la molécula diana). Las etiquetas de afinidad tienen la ventaja de que se introducen fácilmente, por ejemplo, mediante clonación estándar o ingeniería genética, y se unen a soportes bien conocidos, portadores de restos de captura a menudo disponibles comercialmente. La proteína similar a saposina usada en la etapa b.1) o el agente hidrófobo usado en la etapa b.2) (si este último es una proteína hidrófoba) pueden estar en una forma etiquetada por afinidad. Esto se puede obtener fácilmente introduciendo una etiqueta de afinidad en forma de péptido o polipéptido en la molécula diana mediante clonación o ingeniería genética. En consecuencia, en esta realización, el agente hidrófobo (si este último es una proteína hidrófoba) y/o la proteína similar a saposina se emplean como proteínas de fusión etiquetadas por afinidad en la etapa b.2) y la etapa b.1), respectivamente. El término "proteína de fusión" está reconocido en la técnica y se refiere a proteínas fusionadas a otro péptido o polipéptido mediante tecnología de ADN recombinante. A veces, el término "proteína de fusión" se usa en el presente documento indistintamente con "proteína quimérica".

Las interacciones entre una etiqueta de afinidad y un resto de captura correspondiente se desarrollaron originalmente para ayudar en la purificación e inmovilización de proteínas. Las moléculas diana de proteínas pueden modificarse a nivel genético con determinadas secuencias peptídicas, conocidas como etiquetas de afinidad que se unen a restos de captura conocidos. Las etiquetas de afinidad, tal como se usa en el presente documento, generalmente se dividen en tres categorías: a) secuencias peptídicas que se unen a moléculas pequeñas; b) proteínas que se unen a moléculas pequeñas; y c) péptidos o proteínas que se unen a anticuerpos. Una etiqueta de afinidad también puede ser un compuesto de molécula pequeña (por ejemplo, un ligando) que tenga un compañero de unión adecuado. La etiqueta de afinidad puede estar unida covalentemente a la molécula diana utilizada en el proceso de la invención. Por ejemplo, ácido nitrilo triacético, cuando se compleja para dar Ni^{2+} -(Ni^{2+} -NTA), es un resto de captura común que se une a proteínas modificadas con un tramo de histidinas, conocido como una etiqueta de histidina, que define una etiqueta de afinidad utilizable como resto de unión en la molécula diana.

A la "etiqueta de afinidad" se le otorga su significado convencional en la técnica. Una etiqueta de afinidad es cualquier material biológico o químico que puede unirse fácilmente a una molécula biológica o química diana. Los marcadores de afinidad pueden unirse a una molécula biológica o química diana mediante cualquier método adecuado. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el marcador de afinidad puede unirse a la molécula diana usando métodos genéticos. Por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico que codifica la etiqueta de afinidad puede colocarse en cualquier lugar dentro del ácido nucleico que permita que la etiqueta de afinidad se exprese con la molécula biológica, por ejemplo, dentro de, adyacente a o cerca de. En otras realizaciones, la etiqueta de afinidad también puede unirse a la molécula biológica o química diana después de haberse producido (por ejemplo, expresado o sintetizado) la molécula. Como ejemplo, una etiqueta de afinidad, tal como biotina, puede acoplarse químicamente, por ejemplo, covalentemente, a una proteína o péptido diana para facilitar la unión de la diana a estreptavidina.

Las etiquetas de afinidad incluyen, por ejemplo, etiquetas de unión a metal, tales como etiquetas de histidina, GST (en la unión de glutatión/GST), estreptavidina (en la unión biotina/estreptavidina) o maltosa (que se une a la MBP o proteína de unión a la maltosa). Otras etiquetas de afinidad incluyen Myc o Max en un par de Myc/Max o poliaminocidos, tales como polihistidinas. En diversos sitios en el presente documento, se describen etiquetas de afinidad específicas en relación con las interacciones de unión. La estructura molecular del soporte con la que interactúa la etiqueta de afinidad (por ejemplo, a la que se une selectivamente), que suele ser su pareja de unión biológica o química conocida, es el "resto de captura" tal como se usa en el presente documento.

Los pares de etiqueta de afinidad o antígeno (usado como resto de unión)/resto de captura útiles para la etapa b.1)/b.2) del procedimiento de la invención son, por ejemplo, polihistidina/NTA/ Ni^{2+} , glutatión S transferasa/glutatión, proteína de unión a maltosa/maltosa, estreptavidina/biotina, biotina/estreptavidina, antígeno (o un fragmento de un antígeno)/anticuerpo (o un fragmento de un anticuerpo) y similares.

Otros pares de etiqueta de afinidad o antígeno (usado como resto de unión)/resto de captura útiles para la etapa b.1)/b.2) del procedimiento de la invención son, por ejemplo, una interacción de anticuerpo/péptido, una interacción de anticuerpo/antígeno, una interacción de fragmento de un anticuerpo/antígeno, una interacción de ácido nucleico/ácido nucleico, una interacción de proteína/ácido nucleico, una interacción de péptido/péptido, una interacción de proteína/proteína, una interacción de molécula pequeña/proteína, una interacción de glutatión/GST, una interacción de maltosa/proteína de unión a maltosa, una interacción de carbohidrato/proteína, una interacción de derivado de carbohidrato/proteína, una interacción de marcador peptídico/ion metálico-quelato de metal, una interacción de péptido/NTA-Ni, interacción de etiqueta de epítopo (por ejemplo, etiqueta V5, etiqueta Myc, etiqueta FLAG o etiqueta HA)/anticuerpo, una interacción de proteína A/anticuerpo, una interacción de proteína G/anticuerpo, una interacción de proteína L/anticuerpo, una interacción de proteína fluorescente (por ejemplo, GFP)/anticuerpo, una interacción de

receptor de Fc/anticuerpo, una interacción de biotina/avidina, una interacción de biotina/estreptavidina, una interacción de dedo de cinc/ácido nucleico, una interacción de molécula pequeña/péptido, una interacción de molécula pequeña/diana y una interacción de ion metálico/agente quelante/poli aminoácido.

- 5 Cualquiera de las etiquetas de afinidad mencionadas anteriormente puede estar presente en el agente hidrófobo o en la proteína similar a saposina que se une selectivamente al soporte en la etapa b.1)/b.2) del procedimiento de la invención. También puede ser el caso lo contrario, es decir, las etiquetas de afinidad pueden estar presentes en el soporte y los respectivos restos de captura en las moléculas diana, u opcionalmente en un enlazador intermediario. Cualquiera de los pares de interacción basados en afinidad mencionados anteriormente se puede aplicar para el procedimiento de la invención.

10 En otra realización, la etiqueta de afinidad de la molécula diana es una etiqueta fluorescente. Tales etiquetas fluorescentes son útiles para detectar y seguir un agente hidrófobo particular o un tipo (especie) particular de partícula de salipro durante su generación en el procedimiento de la invención. GFP y sus variantes son ejemplos de etiquetas fluorescentes comúnmente usadas.

15 La investigación del inventor reveló que también es posible utilizar proteínas de membrana etiquetadas específicamente presentes en membranas crudas como agente hidrófobo en el procedimiento de la presente invención. Esto es posible etiquetando la proteína de membrana de interés en la célula o virus subyacente del que se derivan las membranas crudas. Las membranas crudas que comprenden la proteína hidrófoba etiquetada pueden usarse entonces en la etapa a) del procedimiento de la invención para proporcionar la proteína hidrófoba y los lípidos. El etiquetado se produce preferiblemente a nivel genético, por ejemplo, mediante ingeniería genética o insertando un vector que lleva un transgén etiquetado en el virus, célula u orgánulo del que se obtienen las vesículas de membrana cruda.

20 En otra realización, la unión selectiva de la molécula diana al soporte en la etapa b.1)/b.2) se logra mediante la unión indirecta de la molécula diana a través de su resto de unión al resto de captura del soporte. Esta unión indirecta de la molécula diana se puede lograr modificando por ingeniería genética el resto de captura del soporte para que se una a un agente de puente (p. ej., un epítipo peptídico, análogo de sustrato o ligando), que está unido selectivamente por el resto de unión en la molécula diana. De esta manera, se pueden usar interacciones secundarias entre agentes de puente capturados para unir selectivamente la proteína similar a saposina o el agente hidrófobo al soporte. Ejemplos de agentes de puente son cofactores, análogos de sustrato o inhibidores de enzimas, ligandos o epítopos peptídicos. Estos agentes de puente pueden acoplarse al resto de captura del soporte, donde pueden unirse selectivamente a la molécula diana. Por ejemplo, cuando se usa un cofactor, un análogo de sustrato o un inhibidor de una enzima como agente de puente, la enzima respectiva es la molécula diana y el bolsillo de unión respectivo en la enzima constituye el resto de unión.

30 En realizaciones adicionales, la unión selectiva de la molécula diana al soporte en la etapa b.1)/b.2) se logra capturando la molécula diana mediante interacciones hidrófobas entre el resto de captura del soporte y un resto de unión natural o modificado por ingeniería genética en la molécula diana, y/o capturando la molécula diana mediante interacciones basadas en carga entre el resto de captura del soporte y un resto de unión natural o modificado por ingeniería genética en la molécula diana. El experto conoce restos de captura adecuados para mediar en tales interacciones. En caso de que se utilicen interacciones hidrófobas para unir selectivamente la molécula diana al soporte, el soporte, por ejemplo, comprende grupos hidrófobos tales como grupos aromáticos, alquilo C₈-C₂₄, alqueno C₈-C₂₄ o ácidos grasos C₈-C₂₄ como restos de captura. En caso de que se utilicen interacciones electrostáticas para unir selectivamente la molécula diana al soporte, pueden usarse restos de intercambio aniónico y catiónico adecuados como restos de captura en el soporte. En particular, como soporte se pueden utilizar resinas de intercambio aniónico o catiónico disponibles comercialmente. Los grupos funcionales comúnmente utilizados en los intercambiadores aniónicos incluyen, por ejemplo, amonio cuaternario, dietilaminopropilo o dietilaminoetilo. Los grupos funcionales comúnmente utilizados en los intercambiadores de cationes incluyen, por ejemplo, ácido sulfónico, metilsulfonato o carboximetilo.

Etapas c.1)/c.2) del procedimiento de la invención

55 En la etapa c.1)/c.2) del procedimiento de la invención, el autoensamblaje de la partícula de lipoproteína de saposina se produce poniendo en contacto la molécula diana unida al soporte (el agente hidrófobo o la proteína similar a saposina) con los componentes restantes de la partícula de lipoproteína de saposina.

60 En el caso de la alternativa (I) del procedimiento de la invención, la etapa c.1) requiere que la proteína similar a saposina unida al soporte se ponga en contacto con el agente hidrófobo para permitir el autoensamblaje de la partícula de lipoproteína de saposina. Sin desear quedar ligados a esta teoría, es probable que las proteínas vecinas similares a saposinas capturadas contribuyan a formar una partícula de salipro individual. Además, el soporte puede estar presente en forma de una estructura 3D muy dinámica y densa, de modo que se facilite la interacción de proteínas similares a saposinas capturadas vecinas. En una realización preferida, se añade proteína similar a saposina adicional antes, durante o después de la etapa c.1) para ayudar aún más al autoensamblaje en las partículas de lipoproteínas de saposina.

En el caso de la alternativa (II) del procedimiento de la invención, la etapa c.2) requiere que el agente hidrófobo unido al soporte se ponga en contacto con la proteína similar a saposina para permitir el autoensamblaje de la partícula de lipoproteína de saposina.

Preferiblemente, el autoensamblaje de la partícula en la etapa c.1) y/o c.2) se lleva a cabo con un pH de 2,0 a 10,0, en particular de 6,0 a 10,0, preferentemente de 6,0 a 9,0, de manera particularmente preferente de 7,0 a 9,0 y lo más preferentemente, de 7,0 a 8,0. Preferiblemente, el contacto en la etapa c.1)/c.2 se realiza en un entorno líquido. Preferiblemente, el entorno líquido es un entorno líquido acuoso. En determinadas realizaciones, el entorno líquido acuoso es una solución tamponada a un pH de 2,0 a 10,0, de 5,0 a 10,0 o de 5,0 a 8,5; en particular de 6,0 a 8,0 y lo más preferiblemente de 7,0 a 8,0.

Cualquier material que permanezca sin unir después de entrar en contacto con los componentes de partículas unidas al soporte en la etapa c.1)/c.2), puede reciclarse del entorno líquido, almacenarse y reutilizarse para otra aplicación.

Una propiedad notable y sorprendente de las proteínas similares a saposina es que pueden autoensamblar agentes hidrófobos en partículas de salipro simplemente incubándolas con lípidos y agentes hidrófobos. La investigación subyacente a la presente invención reveló que, sorprendentemente, este autoensamblaje incluso funciona de manera muy eficiente cuando uno de los constituyentes primarios, es decir, la proteína similar a saposina (alternativa I del procedimiento) o el propio agente hidrófobo (alternativa II del procedimiento) están unidos e inmovilizados sobre un soporte. Entonces, el autoensamblaje se produce en condiciones más desafiantes en la interfase entre el soporte y el entorno líquido que contiene los componentes restantes.

La investigación de los inventores ha demostrado que las partículas obtenidas mediante el procedimiento de la invención tienen forma de disco como las partículas de salipro de la técnica anterior que se formaron en entornos puramente líquidos basados en el movimiento libre, aleatorio de todos los componentes de partículas involucrados en el entorno líquido. En una realización preferida, las partículas de salipro ensambladas tienen forma de disco. En otra realización preferida, las partículas de salipro no comprenden un núcleo acuoso o hidrófilo. En otra realización más, las partículas de salipro tienen forma de disco y no comprenden un núcleo acuoso o hidrófilo.

En una realización preferida, las partículas de salipro se consideran generalmente en forma de disco. En particular, pueden tener un radio de Stokes (radio hidrodinámico) RS en el intervalo de desde 2 nm hasta 500 nm, en particular desde 2 nm hasta 200 nm o desde 3 nm hasta 150 nm, preferiblemente desde 3 nm hasta 100 nm. El experto en la materia sabe cómo determinar el radio de Stokes. Esto se hace preferentemente eluyendo las partículas del soporte y sometiendo a filtración analítica en gel (cromatografía de exclusión por tamaño), en comparación con patrones de radios de Stokes conocidos. En particular, las partículas pueden someterse a una etapa de filtración en gel, por ejemplo, una columna de filtración en gel Superdex 200 HR10 30 y eluirse con un tampón adecuado a pH 7,5 y 0,5 ml/min a temperatura ambiente. La absorbancia se controla a 280 nm para la proteína. La columna se calibra utilizando una mezcla de patrones de proteínas de radios de Stokes conocidos, como por ejemplo, tiroglobulina 669 kDa (RS = 8,5 nm), ferritina 440 kDa (RS = 6,1 nm) catalasa 232 kDa (RS = 4,6 nm), lactato deshidrogenasa 140 kDa (RS = 4,1 nm), albúmina sérica bovina 66 kDa (RS = 3,55 nm) y citocromo c de corazón de caballo 12,4 kDa (RS = 1,8 nm). Las proteínas patrón han de abarcar valores de RS superiores e inferiores al de la partícula de interés. Una curva de calibración se genera representando la posición de elución frente al RS para las proteínas patrón. Esto proporciona generalmente una gráfica aproximadamente lineal, pero por lo demás, es satisfactorio representar líneas entre los puntos y leer el RS de la proteína de interés a partir de su posición de elución en esta curva patrón.

En algunas realizaciones, por ejemplo, cuando un agente hidrófobo voluminoso, como una proteína de membrana, o mayores cantidades de lípidos están presentes en las partículas, el radio de Stokes será superior a 3,2 nm, en particular al menos 3,5 nm, al menos 5,0 nm o al menos 10,0 nm.

Las partículas de salipro también se pueden examinar mediante microscopía electrónica de transmisión en un estado unido a un soporte o "libre". Si las partículas son lo suficientemente grandes, pueden analizarse mediante microscopía electrónica de tinción negativa y análisis de partículas individuales.

El análisis estructural ha indicado que en muchos casos, en las partículas de salipro, los lípidos de la membrana se ensamblan en una estructura a modo de bicapa discoidal de tamaño discreto en el interior de la partícula. El componente de proteína similar a saposina define generalmente el límite de la bicapa discoidal y proporciona estructura y estabilidad a la partícula. En la mayoría de las realizaciones, el interior de la partícula incluye una región hidrófoba (por ejemplo, formada por cadenas de ácido graso de los lípidos). A diferencia de los liposomas, las partículas de salipro no suelen comprender un núcleo hidrófilo o acuoso. Las partículas son preferentemente en forma de disco, que tienen una bicapa lipídica plana, discoidal, aproximadamente circular circunscrita por α -hélices anfipáticas proporcionadas por dos o más proteínas similares a saposina, que están asociadas con superficies hidrófobas de la bicapa alrededor de la periferia del disco.

En algunas realizaciones, y dependiendo del tamaño del agente hidrófobo incorporado a las partículas de salipro, la forma principal discoidal de las partículas (vacías) de salipro se puede aproximar mediante un cuadrado, triángulo o

cilindro. Por ejemplo, una partícula de salipro aproximada por un cilindro puede poseer una relación entre la altura máxima y el diámetro máximo (longitud del eje principal) de al menos 1,0:1,1, en particular 1,0:1,5, 1,0:2,0, 1,0:4,00, 1,0:8,00 o 1,0:9,00. La altura máxima de la partícula discoidal suele ser de al menos 3,5 nm, en particular al menos 5 nm, según lo determinado por microscopía electrónica de transmisión de las partículas libres eluidas o, si las partículas son lo suficientemente grandes, mediante microscopía electrónica de tinción negativa y análisis de una sola partícula. Preferiblemente, la partícula de salipro tiene una parte superior, una parte inferior y una superficie lateral circunferencial, siendo el diámetro máximo (longitud del eje mayor) de la superficie superior e inferior mayor que la altura de la superficie lateral circunferencial. En algunas realizaciones de la partícula de salipro, la proteína similar a saposina está situada, al menos parcialmente, para rodear la superficie lateral circunferencial de la partícula.

En algunas realizaciones, el diámetro máximo promedio (longitud del eje principal) de la partícula de salipro en forma de disco, determinado mediante microscopía electrónica de transmisión o, si las partículas son lo suficientemente grandes, mediante microscopía electrónica de tinción negativa y análisis de partículas individuales es de entre 2 nm y 200 nm, en particular de 3 nm a 150 nm, preferiblemente de 3 nm a 100 nm. En otra realización, el diámetro máximo promedio (longitud del eje principal) de la partícula en forma de disco es de 3 nm a 80 nm, en particular de 3 nm a 60 nm. Los experimentos prácticos han demostrado que las partículas que tienen un diámetro máximo promedio (longitud del eje principal) de 3 nm a 20 nm son particularmente fáciles de obtener con el procedimiento de la invención.

En otra realización, las partículas están definidas por una población sustancialmente monodispersa de estructuras de disco, según el perfil de elución por filtración en gel de las partículas libres eluidas en, por ejemplo, una columna HiLoad Superdex™ 200 16/60 GL.

En general, la interacción predominante entre la proteína similar a saposina y una bicapa lipídica en la partícula de salipro se produce a través de interacciones hidrófobas entre los residuos de las caras hidrófobas de las α -hélices anfipáticas de las moléculas de proteína similar a saposina y las superficies hidrófobas de los lípidos, por ejemplo, cadenas de acilo graso de fosfolípidos, en el límite de la bicapa en la periferia de la partícula de suministro de agente bioactivo. Una α -hélice anfipática de la proteína similar a saposina incluye tanto una superficie hidrófoba en contacto con una superficie hidrófoba de la bicapa lipídica en la periferia de la partícula, como una superficie hidrófila orientada hacia el exterior de la partícula y en contacto con el entorno acuoso cuando la partícula está suspendida en medio acuoso.

En otra realización, las partículas de lipoproteínas de saposina son estables en solución acuosa y pueden liofilizarse para su almacenamiento a largo plazo, seguido de su reconstitución en solución acuosa. "Estabilidad" o "estable", como se usa en el presente documento, significa niveles de bajos a indetectables de fragmentación de partículas, niveles de bajos a indetectables de agregación o deterioro de la calidad durante la preparación, el transporte y el almacenamiento de las partículas.

En una realización preferida, las partículas y la biblioteca de partículas de acuerdo con el procedimiento de la invención son estables en soluciones acuosas a un pH de 2,0 a 10,0, en particular de 6,0 a 10,0, preferentemente de 6,0 a 9,0, de manera particularmente preferente de 7,0 a 9,0 y lo más preferentemente, de 7,0 a 8,0. En otra realización, las bibliotecas y partículas de acuerdo con el procedimiento de la invención son estables en soluciones acuosas a una temperatura de -210 °C a 80 °C, en particular del -210 °C al 40 °C, de -210 °C a 30 °C o de -210 °C a 4 °C durante al menos 1 día, al menos 2 días, al menos 7 días, al menos 2 semanas, al menos 1 mes, al menos 6 meses o al menos 12 meses, tal como se determina, por ejemplo, mediante inspección visual (solución clara y sin precipitados) o filtración analítica en gel (menos del 50 %, en particular del 1 al 40 % de fragmentación de las partículas). Experimentos prácticos han demostrado que las partículas de salipro también son estables a temperaturas de 4 °C a 40 °C en soluciones acuosas con un pH de 5,0 a 8,0 durante al menos 1 día, al menos 2 días, al menos 7 días, al menos 2 semanas, al menos 1 mes o al menos 3 meses según se determina, por ejemplo, mediante inspección visual (solución clara y sin precipitados) o filtración analítica en gel (menos del 50 %, en particular del 1 al 40 % de fragmentación de las partículas). Las partículas de salipro también han demostrado ser estables en soluciones acuosas a un pH de 5,0 a 8,0 y a una temperatura de 40 °C a 75 °C durante al menos 10 minutos, tal como se determina, por ejemplo, mediante inspección visual (solución clara y sin precipitados) o filtración analítica en gel (menos del 50 %, en particular del 1 al 40 % de fragmentación de las partículas). En algunas realizaciones, las partículas pueden liofilizarse para su almacenamiento a largo plazo, seguido de su reconstitución en solución acuosa. En algunas realizaciones, las partículas de salipro son estables en forma liofilizada a de -210 °C a 80 °C, en particular del -210 °C al 40 °C, de -210 °C a 30 °C o de -210 °C a 4 °C durante al menos 1 día, al menos 2 días, al menos 7 días, al menos 2 semanas, al menos 1 mes, al menos 6 meses o al menos 12 meses, tal como se determina, por ejemplo, por filtración analítica en gel tras reconstitución en un tampón apropiado a pH 7,5 (menos del 50 %, en particular menos del 40 % o del 1 al 40 % de fragmentación de las partículas). "Fragmentación", como se usa en el presente documento, significa que en el perfil de elución de filtración en gel, el tamaño del pico (es decir, la altura del pico) correspondiente a la partícula de salipro ha disminuido a expensas del tamaño del pico de SAPLIP libre no unida a lípidos y/o lípidos libres y/o agregados, en comparación con el tamaño del pico de la partícula de salipro recién preparada. En consecuencia, una fragmentación del 40 %, por ejemplo, significa que el tamaño del pico (es decir, la altura del pico en el perfil de elución por filtración en gel) ha disminuido en un 40 % en comparación con el tamaño del pico antes del almacenamiento (100 %).

Experimentos prácticos han demostrado que las partículas de salipro son particularmente estables también en soluciones acuosas que están sustancialmente libres de detergentes. Preferiblemente, la solución acuosa comprende una concentración de detergente que es inferior a la concentración micelar crítica (CMC) del detergente empleado. La CMC se define como la concentración de detergente por encima de la cual se forman micelas y todas las moléculas de detergente adicionales agregadas al sistema se incorporan en las micelas.

Al menos una parte de los lípidos que se van a incorporar en las partículas de salipro se proporciona en la etapa a) del proceso de la invención. Se pueden proporcionar lípidos adicionales en cualquier etapa posterior del procedimiento, en particular durante la(s) etapa(s) b.1)/b.2) y/o c.1)/c.2) del procedimiento de la invención. En una realización, los lípidos se seleccionan del grupo que consiste en lípidos de arquea, procarióticos, eucarióticos o virales y mezclas de los mismos.

En una realización específica de la alternativa (I) del procedimiento de la invención, la proteína similar a saposina unida al soporte se pone en contacto en la etapa c.1) con una membrana de arquea, procariótica, eucariótica o viral que se proporcionó en la etapa a). La membrana comprende el agente hidrofóbico y al menos partes de los lípidos que se van a incorporar en la partícula de salipro. Esto permite la formación de una biblioteca de partículas de salipro en la que la biblioteca comprende una mezcla heterogénea de partículas de lipoproteínas de saposina con diferentes composiciones de lípidos de membrana y opcionalmente de proteínas de membrana.

La proteína similar a saposina unida al soporte parece no distinguir entre los constituyentes de membrana con los que está en contacto. Por lo tanto, si la proteína similar a saposina unida al soporte se pone en contacto con una membrana biológica compleja en la etapa c.1) del procedimiento de la invención, esto da como resultado una biblioteca de partículas de salipro unidas al soporte que refleja la complejidad y presenta instantáneas de la composición de lípidos y proteínas de membrana de la membrana biológica empleada. La preparación de bibliotecas unidas al soporte del lipidoma/proteoma de una membrana biológica de esta manera tiene la ventaja de que unidades discretas de la estructura original de la membrana parecen conservarse en las partículas de salipro. Estas bibliotecas unidas al soporte son ventajosas para aplicaciones especializadas, como aplicaciones de biosensores y cribado de alto rendimiento.

El término "biblioteca" de acuerdo con la invención significa un conjunto (pluralidad compleja) de diferentes partículas de salipro. En particular, la diferencia puede encontrarse en el tamaño y la composición de las partículas, especialmente en la composición de los componentes de membrana contenidos en las mismas, es decir, lípidos de membrana y, opcionalmente, proteínas de membrana. Normalmente, las bibliotecas son una mezcla de "partículas sólo lipídicas" y diferentes tipos de partículas de salipro que contienen proteínas de membrana. Esto se entiende por la expresión "diferentes composiciones de lípidos de membrana y opcionalmente de proteínas de membrana" usada en el presente documento. Las partículas en la biblioteca también pueden diferir en cuanto a su contenido y composición de diferentes lípidos de membrana. Preferiblemente, algunas partículas en la biblioteca difieren por el hecho de que contengan o no proteínas de membrana y de qué tipo sean.

Al poner en contacto la proteína similar a saposina unida al soporte en la etapa c.1) con una membrana de arquea, procariótica, eucariótica o viral proporcionada en la etapa a) se obtiene una biblioteca de partículas similares a saposina con diferentes composiciones de lípidos de membrana y opcionalmente proteínas de membrana.

La biblioteca de partículas de salipro que se puede obtener mediante el procedimiento de la invención puede comprender partículas de salipro que carecen de proteínas de membrana, es decir, puede estar compuesta esencialmente sólo por proteínas similares a saposina y lípidos de membrana procedentes de las membranas crudas (partículas de salipro "vacías"). La biblioteca, sin embargo, también comprenderá partículas de salipro que comprenden una o más proteínas de membrana (partículas de salipro "rellenas").

Un eucariota es cualquier célula u organismo cuyas células contienen un núcleo y opcionalmente orgánulos adicionales encerrados por membranas. En una realización, la membrana usada en el proceso de acuerdo con la invención es membrana de un eucariota, por ejemplo, la membrana celular y/o la membrana procedente de un orgánulo celular. Los ejemplos de orgánulos son el aparato de Golgi, mitocondrias, peroxisomas, retículo endoplasmático, cloroplastos, núcleo y similares.

Los ejemplos de eucariotas son plantas, animales y hongos, tales como levaduras y mohos. Las células eucariotas preferidas que pueden usarse en el proceso de acuerdo con la invención se seleccionan entre el grupo que consiste en células de mamífero, en particular, células animales y humanas, células de insecto, células aviares, células fúngicas, tales como células de levadura, células vegetales y mezclas de las mismas. La expresión células de mamífero incluye también especialmente células animales y humanas que se mantienen en medio de cultivo.

Un procariota es un organismo unicelular que carece de un núcleo. Las células procariotas son más sencillas y pequeñas que las células eucariotas y carecen de orgánulos de membrana. Los ejemplos de procariotas son las bacterias. Los fillos de bacterias ejemplares son acidobacterias, actinobacterias, acuíficas, armatimonadetes, bacteroidetes, caldiserica, clamidias, chlorobi, chloroflexi, crisiogenetas, cianobacterias, deferribacterias, deinococcus-thermus, dictyoglomi, elusimicrobia, fibrobacterias, firmicutes, fusobacterias, gemmatimonadetes, lentisferas,

nitrospira, planctobacterias, proteobacterias, espiroquetas, synergistetes, tenericutes, termodesulfobacterias, termotogas y verrucomicrobios. Las células procariotas preferidas que pueden usarse en el proceso de acuerdo con la invención son bacterias, en particular, bacterias patógenas y mezclas de las mismas.

Las arqueas están relacionadas tan solo de manera distante con los procariotas y los eucariotas. Se proporciona una descripción general detallada, por ejemplo, en De Rosa et al., "Structure, Biosynthesis, and Physicochemical Properties of Archaeobacterial Lipids", MICROBIOLOGICAL REVIEWS, p. 70-80 Vol. 50, n.º 1, 1986, o Albers et al., "The archaeal cell envelope", Nature Reviews Microbiology, 9, pág. 414-426, 2011. De Rosa et al. comunican que las membranas de las arqueas comprenden moléculas que difieren en gran medida de las de procariotas y eucariotas. Los procariotas y eucariotas comprenden membranas que comprenden principalmente lípidos de glicerol-éster, mientras que las arqueas comprenden membranas que comprenden lípidos de glicerol-éter. Los enlaces éter son químicamente más resistentes que los enlaces éster. Esta estabilidad puede ayudar a las arqueas a sobrevivir a temperaturas extremas y a ambientes muy ácidos o alcalinos. Los procariotas y eucariotas pueden comprender éter-lípidos, pero a diferencia de las arqueas, estos lípidos son un componente tan solo menor o nulo de la membrana.

Además, los lípidos de arquea se basan en una cadena lateral de isoprenoide. Las cadenas laterales de isoprenoide son cadenas largas que contienen 20, 25 o hasta 40 átomos de carbono, opcionalmente con múltiples ramificaciones laterales. También pueden comprender anillos de ciclopropano o ciclohexano. Esto contrasta con los ácidos grasos que se encuentran en las membranas de otros organismos, como se ha descrito anteriormente. Aunque los isoprenoides desempeñan un papel importante en la bioquímica de muchos organismos, solo las arqueas los emplean para producir fosfolípidos. En algunas arqueas, la bicapa lipídica puede estar reemplazada por una monocapa.

Los ejemplos de arqueas son las arqueas metanogénicas, las halobacterias y las arqueas termoacidófilas. Las arqueas preferidas que pueden usarse en el proceso de acuerdo con la invención son arqueas extremófilas y mezclas de diferentes arqueas extremófilas.

La estructura del virus y los componentes de su membrana, si procede, difieren de las membranas eucarióticas, procarióticas y de arquea. Esto se comunica en más detalle en, por ejemplo, Lorizate et al., "Comparative lipidomics analysis of HIV-1 particles and their producer cell membrane in different cell lines", Cellular Microbiology, 15(2), pág. 292-304, 2013 y Brügger et al., "The HIV lipidome: A raft with an unusual composition", PNAS, vol. 103, n.º. 8, pág. 2641-2646, 2006.

Lorizate et al. comunican que varios estudios indicaron que la membrana del VIH-1 difiere de las membranas plasmáticas de células productoras, lo que sugiere que el virus brota de subdominios preexistentes o la inducción mediada por el virus de una membrana de brotación especializada. El análisis de lípidos de las membranas plasmáticas y del VIH-1 purificado de dos líneas celulares diferentes reveló una composición lipídica significativamente diferente de la membrana vírica en comparación con la membrana plasmática de la célula hospedadora, independientemente del tipo celular investigado. Las partículas del virus estaban significativamente enriquecidas en fosfatidilserina, esfingomielina, hexosilceramida y especies saturadas de fosfatidilcolina cuando se comparan con la membrana plasmática de la célula hospedadora de las células productoras. Mostraron niveles reducidos de especies insaturadas de fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilinositol. Se observaron diferencias específicas del tipo celular en la composición lipídica de las membranas plasmáticas del VIH-1 y del donante para plasmalógeno-fosfatidiletanolamina y fosfatidilglicerol, que estaban fuertemente enriquecidas únicamente el en VIH-1 procedente de células MT-4. El VIH-1 procedente de células MT-4 también contenía dihidroesfingomielina. En conjunto, estos datos comunicados por Lorizate et al. apoyan que el VIH-1 selecciona un entorno lipídico específico para su morfogénesis y no es idéntico o similar a las membranas celulares de sus hospedadores. Normalmente, las partículas y las bibliotecas obtenidas por el procedimiento de la invención no contienen proteínas virales y/o membranas virales.

Los virus envueltos incluyen ortomoxivirus, flavivirus y retrovirus. Ejemplos de virus envueltos son el virus de influenza A, virus influenza B, virus influenza C, virus influenza D, virus Batken, virus Bourbon, virus Dhori, virus de la hepatitis C, virus del dengue, virus de la encefalitis japonesa, virus del murciélago de Entebbe, virus de la fiebre amarilla, virus de Zika, HTLV 1 y VIH.

Etapas d) del procedimiento de la invención

En la etapa d) del procedimiento de la invención las partículas de salipro unidas al soporte pueden eluirse del soporte. Esta etapa es opcional, porque para ciertas aplicaciones (por ejemplo, biosensor o laboratorio en un chip), la partícula de salipro unida al soporte es el producto de interés. Por tanto, en estos casos no hay necesidad de eluir la partícula del soporte.

El acoplamiento covalente del agente hidrófobo o la proteína similar a saposina al soporte mediante la formación de enlaces químicos (i) es en muchos casos sustancialmente irreversible. Para la elución, el enlace químico debe estar disuelto, por ejemplo, realizando la reacción de acoplamiento inversa o una reacción de escisión diferente. Por ejemplo, se puede emplear un enlazador con un enlace escindible. Esto puede, por ejemplo, ser un enlazador que comprende un sitio de escisión de proteasa, que permite la elución con incubación con la proteasa (p. ej., proteasa TEV). Por el contrario, la unión de la partícula de salipro mediante interacción de afinidad (ii), interacción indirecta a

través de un agente de puente (iii), interacción hidrófoba (iv) o interacción electrostática (v) suele ser reversible y permite la elución relativamente fácil de las partículas y, a menudo, la regeneración del soporte y su reutilización.

La elución de las partículas de salipro ensambladas del soporte se puede lograr mediante una variedad de técnicas, que dependen del tipo de interacción entre el soporte y la molécula diana, en particular entre el resto de captura y el resto de unión como se describió anteriormente. El experto conoce los métodos de elución adecuados. El experto es capaz de seleccionar una estrategia de elución adecuada dependiendo del tipo de interacción con la que la molécula diana se une selectivamente al soporte.

El término "elución", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la eliminación o desplazamiento de las partículas de salipro unidas al soporte.

Por ejemplo, las partículas de salipro unidas por interacciones de afinidad entre uno de sus componentes y el soporte (ii) se eluyen proporcionando moléculas específicas al entorno líquido que interrumpen y/o reemplazan la interacción de afinidad. Por ejemplo, si la molécula diana está etiquetada con una etiqueta de His y el soporte lleva restos de captura de Ni^{2+} -NTA, la elución se lleva a cabo poniendo en contacto las partículas de salipro unidas al soporte con imidazol. De la misma manera, si la molécula diana está etiquetada con una etiqueta GST y el soporte comprende glutatión como resto de captura, la elución se puede llevar a cabo poniendo en contacto las partículas de salipro unidas al soporte con glutatión. La elución de partículas de salipro que están unidas por un agente de puente que media una interacción indirecta entre la molécula diana y el soporte (iii) se puede llevar a cabo escindiendo el agente de puente o enlazador o interrumpiendo las interacciones entre el agente de puente y el resto de captura y/o de unión. En caso de interacciones similares a receptor/ligando entre el resto de captura y e unión, la elución se puede llevar a cabo usando una sustancia de unión competitiva, como azúcares en el caso de lectinas unidas a un soporte que se une a restos de azúcar en la molécula diana. La elución de partículas de salipro unidas mediante interacciones hidrófobas (iv) al soporte se puede lograr disminuyendo la concentración de sal en el entorno líquido para promover la solvatación y, por tanto, la elución del material unido. En el caso de que la partícula de salipro esté unida por interacciones electrostáticas al soporte (v), la elución se puede llevar a cabo cambiando el pH o la concentración de sal en el entorno líquido que rodea las partículas de salipro unidas al soporte.

De acuerdo con una realización particular, las etapas descritas anteriormente, en particular las etapas a), b.1)/b.2), c.1)/c.2) y d) se realizan a una temperatura de 1 °C a 85 °C, en particular de 1 °C a 40 °C, de manera particularmente preferida de 1 °C a 30 °C. Una temperatura de entre 1 °C y 25 °C, en particular del 1 °C al 20 °C, más en particular de 3 °C a 15 °C es suficiente para la mayoría de las aplicaciones. Sin embargo, mediante los métodos enseñados en el presente documento, el experto puede determinar la temperatura de incubación óptima con respecto a la estabilidad de temperatura de las membranas, compuestos, los lípidos y las proteínas usados.

El término "esencialmente" usado en el presente documento significa que también pueden estar presentes en las partículas de salipro trazas de otros componentes utilizados en el procedimiento de acuerdo con la invención, como otros componentes de las membranas crudas utilizadas para el suministro de agente hidrófobo y/o lípidos o agentes usados en el procedimiento, tales como detergentes. Que la partícula de salipro consista esencialmente en al menos una proteína similar a saposina y componentes de la membrana obtenidos de la membrana de célula o de orgánulo, sin embargo, significará particularmente que no se añaden lípidos y/o proteínas adicionales.

La partícula de salipro o la biblioteca de partículas de salipro que se pueden obtener de acuerdo con el procedimiento de la invención se pueden utilizar en medicina, en particular para su uso en la prevención, el tratamiento o la reducción de la gravedad de una enfermedad o para su uso en un método de diagnóstico, un tratamiento cosmético o para su uso como formulación para vacunación.

Por ejemplo, la partícula de salipro puede incluirse en una composición farmacéutica para administrar una o más proteínas y/o lípidos de membrana a un individuo que los necesite, en donde la composición comprende partículas de salipro como las descritas anteriormente.

Además de las partículas de salipro, la composición farmacéutica puede comprender opcionalmente un vehículo, portador o adyuvante (adicional) farmacéuticamente aceptable.

Cuando las partículas de salipro se usan en una composición farmacéutica, los componentes individuales de las partículas y la composición farmacéutica deben ser farmacéuticamente aceptables. Como se usa en el presente documento, la expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a componentes, compuestos o agente que son, dentro del alcance del buen criterio médico, adecuadas para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos o animales inferiores sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica y similares, y son proporcionadas con una relación beneficio/riesgo razonable.

Las composiciones farmacéuticas que contienen partículas de salipro pueden administrarse a seres humanos y otros animales por vía oral, por vía rectal, por vía parenteral, por vía intracisternal, por vía intravaginal, por vía intraperitoneal, por vía tópica (en forma de polvos, pomadas o gotas), por vía bucal, en forma de un aerosol, en forma de una pulverización oral o nasal o similares, dependiendo de la gravedad de la enfermedad o afección que se esté tratando.

En particular, la composición farmacéutica puede formularse para administración enteral, parenteral y/o tópica. Puede administrarse en forma de una cápsula, infusión o inyección, una composición aplicable con brocha o potable o en forma de un aerosol. También se describen en el presente documento composiciones farmacéuticas en donde las partículas de salipro están presentes en forma sólida, como una dispersión o en solución.

Las partículas de salipro también son útiles para aplicaciones diagnósticas y/o cosméticas. Por ejemplo, las partículas de Salipro que comprenden un antígeno o marcador detectable como se ha descrito, por ejemplo, anteriormente, pueden usarse como agentes de diagnóstico y aplicarse con fines de diagnóstico. Para lo último, también puede ser muy útil emplear las partículas de salipro en la forma unida al soporte como se puede obtener mediante la presente invención si se omite la etapa de elución d). Ejemplos de herramientas de diagnóstico e investigación en Ciencias de la Vida de acuerdo con la invención incluyen partículas con proteínas de membrana incorporadas etiquetadas, proteína similar a saposina etiquetada, lípidos marcados, fluoróforos incorporados o agentes de contraste (por ejemplo, para obtener imágenes por RM). El marcador puede ser, por ejemplo, un marcador fluorescente.

En otro aspecto, las partículas de salipro pueden ser útiles como formulación de vacunación, como portador de la misma o como vehículo de suministro de fármaco. Muchos antígenos patógenos que podrían ser especialmente potentes en las vacunas están expuestos en la superficie y/o comprendidos en la membrana celular externa de patógenos eucariotas o procariotas o células enfermas (por ejemplo, células cancerosas) en un paciente. Estos antígenos pueden, por ejemplo, proceder de lípidos patógenos, otras biomoléculas hidrófobas o proteínas de membrana. Con las partículas de salipro, dichos antígenos pueden incorporarse efectivamente en las partículas que posteriormente pueden usarse como vehículos de administración de presentación de antígenos en formulaciones para vacunación. A este respecto, las partículas de salipro también pueden ser útiles como vehículos de presentación de antígenos para generar anticuerpos contra lípidos o proteínas de membrana en animales hospedadores adecuados, preferiblemente en mamíferos tal como por ejemplo, conejos, cabras, llamas, ratones y primates.

También se describe en el presente documento el uso de partículas de salipro como herramienta para el desarrollo de fármacos, cribado de fármacos y descubrimiento de fármacos.

Por ejemplo, una diana farmacológica de proteína de membrana particular, tal como un receptor de la superficie celular o canal de iones, puede incorporarse en las partículas de salipro y solubilizarse así en su estado nativo. Posteriormente, dichas partículas pueden emplearse en ensayos para estudiar la actividad de la proteína de membrana diana del fármaco en su ambiente de bicapa lipídica nativo o usarse en detecciones sistemáticas de fármacos para identificar nuevos fármacos. De acuerdo con el proceso de la invención, las partículas de salipro se ensamblan mientras se unen selectivamente con un componente de partícula a un soporte. Las partículas de salipro unidas al soporte así obtenidas se pueden emplear directamente en aplicaciones basadas en chips, como laboratorio en un chip, así como resonancia de plasmones superficiales (SPR), interferometría acoplada a rejilla (GCI) u otras aplicaciones de biosensores.

Los biosensores SPR ópticos sin etiquetas son el estándar de oro para medir la afinidad de unión y la cinética de las interacciones moleculares. Existen principalmente cuatro plataformas de biosensores SPR: Biacore T100 de GE Healthcare, ProteOn XPR36 de Bio-Rad, Octet RED384 de ForteBio y IBIS MX96 de Wasatch Microfluidics.

Como alternativa a los biosensores SPR, los interferómetros de guía de ondas basados en GCI se pueden utilizar para caracterizar interacciones moleculares y/o determinar velocidades cinéticas, constantes de afinidad y concentraciones de las moléculas que interactúan.

Mientras que las mediciones ópticas basadas en SPR y GCI detectan cambios en el índice de refracción dentro de un campo evanescente cerca de la superficie de un sensor debido a cambios en la masa por la formación de complejos de las moléculas que interactúan, otros sistemas de biosensores aplican diferentes estrategias de detección: los biosensores calorimétricos registran el calor absorbido o liberado por una reacción. Los biosensores potenciométricos detectan la distribución de cargas que conducen a un potencial eléctrico. Como alternativa, los biosensores amperométricos pueden representar el movimiento de electrones producido en una reacción redox. Además, los biosensores también pueden detectar la salida de luz durante el curso de una reacción o la diferencia en la absorbancia de la luz entre los reactivos y los productos (biosensores ópticos). Además, los biosensores piezoeléctricos aprovechan los efectos atribuibles a la masa de los reactivos o productos unidos a la superficie del biosensor (biosensores piezoeléctricos). Todas estas aplicaciones de biosensores tienen en común que se benefician de tener una de las moléculas a estudiar unida a un soporte. El procedimiento de la invención proporciona un procedimiento sencillo y directo de "una sola etapa" para incorporar agentes hidrófobos de interés directamente en partículas de salipro unidas al soporte. Esto evita la necesidad de una etapa de acoplamiento adicional y, por lo tanto, es ventajoso en términos de eficiencia y costes del procedimiento.

El procedimiento de la invención también puede utilizarse como herramienta para la purificación de proteínas de membrana, la expresión de proteínas de membrana, para la investigación de membranas y/o proteínas de membrana, en particular, la lipidómica y la proteómica, preferentemente para el aislamiento, la identificación y/o el estudio de membranas y/o proteínas de membrana o la creación de una biblioteca o base de datos de lipidoma o proteoma.

En general, las partículas de salipro son útiles para hacer solubles en soluciones acuosas proteínas de membrana y dominios o componentes de membrana, que de otro modo serían insolubles, en su microentorno nativo de bicapa de membrana. Las partículas de salipro obtenidas con el método de la invención se pueden emplear en una amplia variedad de nuevas aplicaciones en la investigación de proteínas de membrana. Por ejemplo, las partículas de salipro permiten estudiar las proteínas de membrana incorporadas en las partículas de salipro mediante métodos como la resonancia magnética nuclear (RMN), cristalografía de rayos X, microscopía electrónica (EM), espectrometría de masas, calorimetría de titulación isotérmica (ITC), dispersión de luz diferencial, dispersión de rayos X de ángulo pequeño (SAXS), ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), clasificación celular activada por fluorescencia (FACS, por sus siglas en inglés), ensayos bioquímicos, cribado de alto rendimiento (HTS) y similares.

La biblioteca de partículas obtenibles con ciertas realizaciones del procedimiento de la invención es particularmente útil para la investigación en el campo de la biología de sistemas, especialmente la lipidómica y la proteómica de membrana. Las bibliotecas de la invención pueden ser adecuadas para capturar y solubilizar el lipidoma y/o proteoma de un virus, células u orgánulo celular. Las técnicas analíticas típicas en lipidómica y proteómica son tecnologías tales como espectrometría de masas (EM), espectroscopía por resonancia magnética nuclear (RMN), espectroscopía de fluorescencia y métodos computacionales. La aplicación de estos métodos o técnicas a las partículas de salipro permitirá seguir dilucidando el papel de los lípidos naturales y las proteínas de membrana en muchas enfermedades metabólicas, tales como, por ejemplo, cáncer, enfermedades autoinmunitarias, obesidad, aterosclerosis, ictus, hipertensión y diabetes. Si la biblioteca se encuentra en un estado unido al soporte, en particular unido a un soporte sólido con una superficie sustancialmente plana, se logra la separación espacial bidimensional y la inmovilización de las partículas de salipro, lo que ayuda en el análisis de mezclas tan complejas.

Toda la biblioteca de partículas de salipro obtenida a partir de una célula u orgánulo concreto que podría ser diana de una enfermedad puede utilizarse para el cribado de fármacos con el fin de identificar nuevas dianas moleculares de fármacos, tales como proteínas de membrana o lípidos presentes en la membrana de la célula u orgánulo diana.

Breve descripción de los dibujos

La invención se describirá en lo sucesivo haciendo referencia a las figuras, que representan ciertas realizaciones de la invención. La invención, sin embargo, es como se define en las reivindicaciones y como se ha descrito generalmente en el presente documento. No debe limitarse a las realizaciones mostradas con fines ilustrativos en las figuras más adelante.

Figura 1 representa una partícula de lipoproteína de la técnica anterior. La figura 1 es una ilustración esquemática de la forma y organización molecular de la partícula (10) de nanodisco que contiene apolipoproteína A-1 de la técnica anterior (documento EP 1 596 828 B1 discutido anteriormente) que comprende lípidos (3) y proteína de armazón (11) de apolipoproteína.

Las figuras 2a a 2c son ilustraciones esquemáticas de partículas de salipro en vista lateral (izquierda) y en vista superior (derecha) obtenidas mediante realizaciones particulares. En las figuras 2a, 2b y 2c se muestra una partícula de salipro que comprende una proteína similar a saposina (2), lípidos (3), una proteína de membrana (4a)/proteína de membrana oligomérica (4b) y opcionalmente un compuesto hidrófobo (4c), en donde la proteína de membrana (4a, 4b) comprende un resto de unión (5).

Las figuras 3a a 3c son ilustraciones esquemáticas de partículas de salipro en vista lateral (izquierda) y en vista superior (derecha) obtenidas mediante determinadas realizaciones. En las figuras 3a, 3b y 3c se muestra una partícula de salipro que comprende proteína similar a saposina (2), lípidos (3) y opcionalmente una proteína de membrana (4a)/proteína de membrana oligomérica (4b), en donde la proteína similar a saposina (2) comprende un resto de unión (5).

Las figuras 4a a 4b son ilustraciones esquemáticas de partículas de salipro en vista lateral (izquierda) y en vista superior (derecha) obtenidas mediante realizaciones particulares. En las figuras 4a y 4b se muestra una partícula de salipro que comprende una proteína similar a saposina (2), lípidos (3), un compuesto hidrófobo (4c) y opcionalmente una proteína de membrana (4a), en donde el compuesto hidrófobo (4c) comprende un resto de unión (5).

Las figuras 5a a 5b son ilustraciones esquemáticas de partículas de salipro en vista lateral (izquierda) y en vista superior (derecha) obtenidas mediante determinadas realizaciones. En las figuras 5a y 5b se muestra una partícula de salipro que comprende una proteína similar a saposina (2), lípidos (3), un compuesto hidrófobo (4c) y opcionalmente una proteína de membrana (4a), en donde la proteína similar a saposina (2) comprende un resto de unión (5).

Las figuras 6a a 6f son ilustraciones esquemáticas de modos para proporcionar el agente hidrófobo para determinadas realizaciones. En las figuras 6a y 6d se representan vesículas de membrana

5		crudas (7, 7'), que comprende lípidos (3) y opcionalmente proteínas de membrana (4a, 4b), en donde en la figura 6a la proteína de membrana (4a) comprende un resto de unión (5). En la figura 6b y la figura 6e se muestra una proteína de membrana (4a) asociada con lípidos (3) y moléculas de detergente (6), en donde en la figura 6b la proteína de membrana (4a) comprende un resto de unión (5). En la figura 6c y la figura 6f se representa un compuesto hidrófobo (4c) asociado con lípidos (3) y moléculas de detergente (6), en donde en la figura 6c el compuesto hidrófobo (4c) comprende un resto de unión (5).
10	Las figuras 7a a 7b	son ilustraciones esquemáticas de modos para proporcionar la proteína similar a saposina para realizaciones particulares. En las figuras 7a y 7b se representa una proteína similar a saposina (2), en donde en la figura 7a la proteína similar a saposina (2) comprende un resto de unión (5).
15	Las figuras 8a a 8d	son ilustraciones esquemáticas de realizaciones particulares de agente hidrófobo o proteína similar a saposina unida al soporte en la etapa b.2) y b.1), respectivamente. En la figura 8a se representa una proteína similar a saposina (2), que está unida a través de su resto de unión (5) al resto de captura (13) del soporte (12). En la figura 8b se representa un compuesto hidrófobo (4c) asociado con lípidos (3) y moléculas de detergente (6), que está unida a través de su resto de unión (5) al resto de captura (13) del soporte (12). En la figura 8c se muestra una proteína de membrana (4a) asociada con lípidos (3) y moléculas de detergente (6), que está unida a través de su resto de unión (5) al resto de captura (13) del soporte (12). En la figura 8d se muestra una vesícula de membrana cruda (7) que comprende lípidos (3) y proteínas de membrana (4a, 4b), que está unida a través del resto de unión (5) en la proteína de membrana (4a) al resto de captura (13) del soporte (12).
20		
25	Las figuras 9a a 9c	son ilustraciones esquemáticas de las etapas b.2) y c.2) de realizaciones particulares, en donde el agente hidrófobo está unido al soporte en la etapa b.2) y se pone en contacto con una proteína similar a saposina en la etapa c.2). En la figura 9a, una proteína de membrana (4a) unida al soporte (12) asociada con lípidos (3) y moléculas de detergente (6) se pone en contacto con proteína similar a saposina (2) para permitir en la etapa c.2) el auto-ensamblaje de una partícula de salipro (compárese con la figura 2a). En la figura 9b, un compuesto hidrófobo (4a) unido al soporte (12) asociado con lípidos (3) y moléculas de detergente (6) se pone en contacto con proteína similar a saposina (2) para permitir en la etapa c.2) el auto-ensamblaje de una partícula de salipro (compárese con la figura 4a). En la figura 9c, una vesícula de membrana cruda (7) unida al soporte (12) que comprende lípidos (3) y proteínas de membrana (4a, 4b) se pone en contacto con proteína similar a saposina (2) para permitir en la etapa c.2) el auto-ensamblaje de una partícula de salipro (compárese con la figura 2a).
30		
35		
40	Las figuras 10a a 10d	son ilustraciones esquemáticas de las etapas b.1) y c.1) de realizaciones particulares, en donde la proteína similar a saposina se une al soporte en la etapa b.1) y se pone en contacto con el agente hidrófobo en la etapa c.1). En la figura 10a, una proteína similar a saposina (2) unida al soporte (12) se pone en contacto con una proteína de membrana (4a) asociada con lípidos (3) y moléculas de detergente (6) para permitir la etapa c.1) el auto-ensamblaje de una partícula de salipro (compárese con la figura 3b). En la figura 10b, una proteína similar a saposina (2) unida al soporte (12) se pone en contacto con vesículas de membrana cruda (7, 7') que comprenden lípidos (3) y proteínas de membrana (4a, 4b) para permitir en la etapa c.1) el auto-ensamblaje de partículas de salipro y la formación de una biblioteca de partículas (compárese la figura 3a, 3b, 3c). En la figura 10c, una proteína similar a saposina (2) unida al soporte (12) se pone en contacto con un compuesto hidrófobo (4c) asociado con lípidos (3) y moléculas de detergente (6) para permitir en la etapa c.1) el auto-ensamblaje de una partícula de salipro (compárese con la figura 5a). En la figura 10d, una proteína similar a saposina (2) unida al soporte (12) se pone en contacto con un compuesto hidrófobo (4c) y una proteína de membrana (4a), los cuales están asociados con lípidos (3) y moléculas de detergente (6) para permitir en la etapa c.1) el auto-ensamblaje de una partícula de salipro (compárese con la figura 5b).
45		
50		
55		
60	La figura 11	muestra los resultados del Experimento 1 c. La figura 11 indica el análisis de cromatografía de exclusión por tamaño del ensamblaje de partículas de salipro tras la unión del transportador SLC etiquetado (una proteína de membrana) a un soporte de afinidad y el contacto del transportador SLC unido al soporte con diferentes concentraciones de saposina A.
65	Las figuras 12a a 12b	muestran los resultados del Experimento 1 d. La figura 12a indica el análisis de cromatografía de exclusión por tamaño de partículas de salipro obtenidas de la muestra 5 en el Experimento 1 c. Las fracciones obtenidas durante la cromatografía de exclusión por

tamaño se analizaron mediante SDS-PAGE, indicando que las fracciones 13, 14 y 15 contienen principalmente las partículas de salipro ensambladas. La figura 12b indica el análisis de cromatografía de exclusión por tamaño de la fracción 14 como se muestra en la figura 12a.

- 5 La figura 13 muestra los resultados del Experimento 3 c. La figura 13 indica el análisis de cromatografía de exclusión por tamaño del ensamblaje de partículas de salipro tras la unión de la saposina A a un soporte de afinidad y el contacto de la saposina A unida al soporte con saposina A adicional sin etiquetar, lípidos cerebrales y opcionalmente un agente hidrófobo en forma de
- 10 proteína T2 de membrana de canal iónico bacteriano.
- Las figuras 14a a 14b reproducen las figuras 4 A y 4 B de Bruhn (2005), *Biochem J* 389 (15): 249-257. Las secuencias se proporcionan como SEQ ID Nos 7-46 como se indica en la tabla 1 anterior.
- 15 La figura 1 representa una partícula de nanodisco (10) que contiene apolipoproteína A-1 de la técnica anterior (véase el documento EP 1 596 828 B1 discutido anteriormente) que comprende lípidos (3) y apolipoproteína A-1 como polipéptido de unión a lípidos (11). Al contrario de los nanodiscos derivados de apolipoproteína de la técnica anterior, el polipéptido de unión a lípidos de la presente invención, es decir, la proteína similar a saposina, no encierra los lípidos en forma de doble cinturón (compárese las figuras 2, 3 y 4), sino que las partículas de la invención se mantienen
- 20 unidas por un núcleo que comprende los lípidos de membrana y que está rodeado por dos o más polipéptidos de unión a lípidos con forma aproximada de V o de boomerang, dispuestos en una orientación de cabeza a cola, sin que existan prácticamente contactos directos proteína-proteína entre las proteínas similares a saposina individuales dentro de una partícula de salipro determinada obtenida por el procedimiento de la invención (compárese la figura 2, 3 y 4).
- 25 Las figuras 2a a 2c son ilustraciones esquemáticas de partículas de salipro obtenidas de acuerdo con determinadas realizaciones. Las partículas de las figuras 2a, 2b y 2c comprenden una proteína similar a saposina (2), una pluralidad de lípidos (3) diferentes, una proteína de membrana (4a)/proteína de membrana oligomérica (4b) y opcionalmente un compuesto hidrófobo (4c). La proteína de membrana (4a, 4b) en las figuras 2a a 2c comprende un resto de unión. El resto de unión en la proteína de membrana puede ser un resto de unión natural o modificado por ingeniería genética.
- 30 El resto de unión de la proteína de membrana puede residir en el extremo N terminal, extremo C terminal o dentro de la secuencia de aminoácidos de la proteína de membrana. En el caso de que la proteína de membrana contenga un resto de unión modificado por ingeniería genética, puede unirse a la proteína de membrana durante o después de la síntesis de proteínas. En otra realización, que no está representada, la proteína de membrana (4a, 4b) puede poseer múltiples restos de unión del mismo o diferente tipo. Los lípidos (3) de las partículas de salipro representadas en las
- 35 figuras 2a a 2c difieren entre sí, lo que significa que la composición lipídica de una partícula de salipro no es uniforme ni homogénea. Dependiendo de cómo se proporcione la proteína de membrana (4a, 4b) en la etapa a), la composición de los lípidos variará. En una realización adicional, que no se muestra, las partículas de salipro también pueden comprender otros componentes que suelen estar presentes en una membrana viral, de arquea, eucariótica y/o procariótica. Los lípidos (3) y las proteínas de membrana (4a, 4b) pueden provenir de la misma fuente de membrana
- 40 viral, de arquea, eucariótica o procariótica o de diferentes fuentes.
- Las partículas de las figuras 2a a 2c no están dibujadas a escala. Dependiendo del tamaño de la proteína de membrana (4a, 4b) incorporada a las partículas, las partículas pueden tener un tamaño sustancialmente diferente al de otras partículas. Las partículas de salipro obtenidas mediante el procedimiento de la invención son de tamaño flexible. Por
- 45 ejemplo, la partícula de la figura 2b que alberga una proteína de membrana oligomérica es más grande que y contiene más subunidades de saposina (2) en comparación con la partícula de la figura 2a, que contiene una proteína de membrana monomérica. Dependiendo del tamaño de las partículas de salipro, las partículas comprenden dos o más moléculas similares a saposina por partícula, que están dispuestas de cabeza a cola. Las partículas representadas en las figuras 2a y 2c comprenden dos moléculas similares a saposina, mientras que la partícula representada en la figura
- 50 2b comprende 3 moléculas similares a saposina.
- Las figuras 2a, 2b y 2c representan, de forma simplificada como vista lateral y vista superior, una partícula de salipro que comprende una proteína similar a saposina (2), lípidos (3) de una fuente de membrana viral, de arquea, eucariótica y/o procariótica, una proteína de membrana (4a, 4b) y opcionalmente un compuesto hidrófobo. La proteína de
- 55 membrana (4a) puede ser una proteína transmembrana integral en forma monomérica. Sin embargo, la proteína de membrana también puede ser una proteína transmembrana integral en forma oligomérica como se representa en la figura 2b o una proteína de membrana periférica, una proteína anfitrópica en un estado unido a lípido, una proteína anclada a lípidos o una proteína química con un dominio hidrófobo y/o transmembrana fusionado, todos los cuales que pueden encontrarse en un estado monomérico u oligomérico.
- 60 La partícula representada en la figura 2c se diferencia de 2a y 2b en que comprende adicionalmente un compuesto hidrófobo (4c) de origen natural o sintético. La cantidad de compuestos hidrófobos dentro de una partícula de salipro puede variar. El compuesto hidrófobo puede formar interacciones estrechas con los lípidos (3) y/o cualquier tipo de proteína de membrana. La proteína de membrana puede ser, por ejemplo, una proteína transmembrana monomérica
- 65 (4a) como se representa en la figura 2c.

Las figuras 3a a 3c representan, de nuevo en forma esquemática simplificada (vista lateral izquierda y vista superior derecha) y no dibujadas a escala, partículas de salipro obtenidas de acuerdo con realizaciones particulares. Las partículas representadas en las figuras 3a, 3b y 3c comprenden proteína similar a saposina (2), lípidos (3) y opcionalmente una proteína transmembrana de forma monomérica u oligomérica (4a, 4b), en donde la proteína similar a saposina (2) tiene un resto de unión (5). En otra realización, que no se muestra, la proteína similar a saposina (2) puede poseer múltiples restos de unión del mismo o diferente tipo. Como se describe para las partículas de la figura 2, las partículas representadas en la figura 3 pueden variar con respecto a su composición de lípidos (3) y su tamaño para incorporar cualquier tipo de proteína hidrófoba simplemente incorporando más de dos proteínas similares a saposina (2) para formar la partícula.

Las figuras 4a y 4b muestran ilustraciones esquemáticas sin escala de partículas de salipro en vista lateral (izquierda) y vista superior (derecha) de determinadas realizaciones de la invención. Las partículas representadas en las figuras 4a y 4b comprenden una proteína similar a saposina (2), lípidos (3), un compuesto hidrófobo (4c) y opcionalmente una proteína de membrana (4a). El compuesto hidrófobo revela un resto de unión, que puede ser de origen natural o modificado por ingeniería genética. Si bien el resto de unión natural puede formar una parte interna del compuesto hidrófobo (4c), el resto de unión modificado por ingeniería genética normalmente se une después de la síntesis del compuesto hidrófobo o después de la purificación de un compuesto hidrófobo natural a un grupo reactivo terminal adecuado. En una realización adicional, que no se muestra, las partículas de salipro pueden comprender diferentes tipos de compuestos hidrófobos que tienen el mismo resto de unión natural o modificado por ingeniería genética. Las partículas de las figuras 4a y 4b pueden variar en el número y tipo de lípidos (3), compuestos hidrófobos (4c), proteínas de membrana (4a) y proteínas similares a saposina (2) incorporadas en las partículas.

Las figuras 5a y 5b muestran, nuevamente en forma esquemática y no a escala (vista lateral izquierda y vista superior derecha), partículas de salipro de realizaciones particulares. Las partículas representadas en las figuras 5a y 5b difieren de las partículas representadas en las figuras 4a y 4b en que la proteína similar a saposina (2) y no el compuesto hidrófobo (4c) lleva un resto de unión. Con respecto a las diferentes composiciones de las partículas representadas en las figuras 5a y 5b, que no se muestra, se aplican las mismas consideraciones que las descritas para las figuras 4a y 4b.

Las figuras 6a a 6f representan realizaciones particulares que proporcionan el agente hidrófobo en forma de una biomolécula hidrófoba (es decir, por ejemplo, una proteína transmembrana en forma monomérica (4a) u oligomérica (4b)) o compuesto hidrófobo en la etapa a) del proceso de la invención. En la figura 6a, las proteínas de membrana (4a, 4b) se proporcionan como vesículas de membrana cruda (7, 7'). Las vesículas de membrana (7, 7') pueden ser de origen viral, de arquea, eucariótico o procariótico. Comprenden una pluralidad de lípidos (3) y en el caso de la vesícula (7) una pluralidad de proteínas de membrana, en este caso ilustrado en forma simplificada por sólo dos proteínas de membrana (4a, 4b), en donde la proteína de membrana (4a) tiene un resto de unión (5). La vesícula (7') es una partícula "vacía" sólo de lípidos. Las vesículas de membrana cruda, ilustradas como vesículas (7, 7') se pueden obtener directamente lisando, por ejemplo, una célula u orgánulo celular de origen de arquea, procariótico o eucariótico. También se pueden obtener vesículas de membrana cruda rompiendo una envoltura viral. Las vesículas como (7) y (7') suelen formarse espontáneamente tras la lisis o la ruptura de la membrana. La vesícula de membrana cruda puede comprender o estar asociada con moléculas de detergente (no representadas en el presente documento). En la figura 6b se representa una proteína de membrana (4a) con un resto de unión (5), que no está presente dentro de una membrana natural o una vesícula de membrana cruda, pero está en un estado artificial, solubilizado con detergente (véase la asociación de la proteína de membrana (4a) con lípidos (3) y moléculas de detergente (6) representadas en la figura 6b). En la figura 6c se representa un compuesto hidrófobo con un resto de unión (5) en estado solubilizado con detergente, lo que significa que el compuesto hidrófobo está incrustado dentro de una micela que contiene lípidos (3) y moléculas de detergente (6). Opcionalmente, la proteína de membrana (4a) representada en la figura 6b o el compuesto hidrófobo representado en la figura 6c se solubiliza únicamente mediante moléculas de detergente. Los modos para administrar los agentes hidrófobos representados en las figuras 6d a 6f difieren de los de las figuras 6a a 6c en que la biomolécula hidrófoba, ilustrada como proteína transmembrana (4a, 4b) o compuesto hidrófobo (4c), no comprende un resto de unión.

Las figuras 7a y 7b representan realizaciones particulares para proporcionar la proteína similar a saposina en el procedimiento de la invención. La figura 7a difiere de la figura 7b en que la proteína similar a saposina tiene un resto de unión de origen natural o modificado por ingeniería genética. Mientras que el resto de unión natural forma parte de la secuencia de aminoácidos nativa de la proteína similar a saposina, el resto de unión de origen modificado por ingeniería genética puede unirse durante o después de la síntesis de la proteína similar a saposina. Los restos de unión modificados por ingeniería genética están optimizados para unirse con alta afinidad a su correspondiente asociado de unión, que es el resto de captura en el procedimiento de la invención. En una realización adicional, la proteína similar a saposina puede estar asociada con moléculas de detergente (no representadas en el presente documento).

Las figuras 8a a 8d muestran ilustraciones no a escala de proteína similar a saposina unida al soporte (figura 8a) y agente hidrófobo (figuras 8b a 8d). La unión selectiva del resto de unión en la proteína similar a saposina (véase la figura 8a) o en el agente hidrófobo (véanse las figuras 8b a 8d) al resto de captura (13) del soporte (12) se ilustra para un solo resto de captura sobre el soporte. En realidad, pero no representado en el presente documento, el soporte

suele estar equipado con una pluralidad de restos de captura del mismo o incluso diferente tipo. La interacción del par de reconocimiento del resto de unión/resto de captura puede basarse en la formación de enlaces químicos, interacciones basadas en afinidad (incluida la mediación por un agente de puente), interacciones hidrofóbicas y/o interacciones electrostáticas. La proteína similar a saposina (2) unida al soporte puede estar en un estado solubilizado con detergente (no representado en el presente documento). También la vesícula de membrana cruda (7) puede comprender o estar asociada con moléculas de detergente (no representadas en el presente documento). Mientras que las proteínas de membrana (4a, 4b) de la figura 8d están incrustadas en su entorno lipídico natural en forma de una vesícula de membrana cruda (7), el compuesto hidrofóbico (4c) y la proteína de membrana (4a) están en estado solubilizado con detergente artificial, por lo que la micela alrededor de dichos agentes hidrofobos puede estar formada por lípidos y detergentes. En una realización adicional, los detergentes utilizados para solubilizar la proteína similar a saposina (2) y/o los agentes hidrofobos pueden ser de la misma o diferente naturaleza química.

Las figuras 9a a 9c muestran de forma simplificada y esquemática realizaciones particulares de las etapas de procedimiento b.2) y c.2). El agente hidrofobo unido al soporte en forma de una proteína de membrana (4a) solubilizada con detergente (figura 9a), un compuesto hidrofobo (4c) solubilizado con detergente (figura 9b) y una proteína de membrana (4c) incrustada en una vesícula de membrana cruda (7) (figura 9c) se ponen en contacto con la proteína similar a saposina (2) en la etapa c.2), que opcionalmente está en un estado solubilizado con detergente. Por lo general, el auto-ensamblaje de las partículas ocurre en el soporte directamente al contactar el agente hidrofobo unido al soporte con la proteína similar a saposina (2). Opcionalmente, lípidos solubilizados adicionales de origen viral, de arquea, eucariótico y/o procariótico se añaden a la reacción de ensamblaje de partículas, que no se muestra en las figuras 9a a 9c. La proteína de membrana solubilizada (4a) de la figura 9a y el compuesto hidrofobo solubilizado (4c) se proporcionan en forma purificada para la unión selectiva al soporte en la etapa b.2). La partícula ensamblada de las figuras 9a y 9b está compuesta sustancialmente de lípidos (3) que se han asociado con la proteína de membrana (4a) o el compuesto hidrofóbico (4c) solubilizados. Opcionalmente, se añaden lípidos adicionales al entorno líquido del soporte. En la figura 9c, una vesícula de membrana cruda (7) está unida al soporte (12). Como se representa en la figura 9c, solo la proteína de membrana (4a) unida por su resto de unión (5) al resto de captura (13) del soporte (12) permanece unida al soporte sólido al entrar en contacto con la proteína similar a saposina (2) para permitir el auto-ensamblaje de la partícula de salipro sobre el soporte. Otras proteínas de membrana, que forman inicialmente parte de la vesícula de membrana cruda unida al soporte en la etapa b.2) y que no presentan un resto de unión complementario para el resto de captura del soporte, ilustradas como proteína de membrana multimérica (4b) en vesícula de membrana cruda (7), no se incorporan a las partículas de salipro unidas al soporte. Por lo tanto, la realización representada en la figura 9c permite la producción de partículas de salipro que comprenden un único tipo de proteína de membrana (4c) a partir de una pluralidad de vesículas de membrana cruda unidas al soporte en la etapa b.2). Las partículas ensambladas están sustancialmente libres de detergentes. Las partículas unidas al soporte de las figuras 9a a 9c pueden eluirse. La estrategia de elución depende del tipo de interacción entre el resto de captura (13) del soporte (12) y el resto de unión (5) en el agente hidrofobo.

Las figuras 10a a 10d muestran de forma simplificada y esquemática realizaciones particulares de las etapas de procedimiento b.1) y c.1). La proteína similar a saposina unida al soporte se pone en contacto con una proteína de membrana solubilizada con detergente (ilustrada como proteína transmembrana monomérica (4a), véase la figura 10a), con vesículas de membrana cruda (ilustradas como vesículas (7, 7'), véase la figura 10b), un compuesto hidrofobo solubilizado con detergente (4c) (véase la figura 10c) o con ambos, un compuesto hidrofobo (4c) solubilizado con detergente y una proteína de membrana (4a) (véase la figura 10d) para permitir el auto-ensamblaje de las respectivas partículas de salipro sobre el soporte en la etapa c.1). Las proteínas similares a saposina capturadas vecinas o las proteínas similares a saposina libres añadidas adicionalmente contribuyen a formar una partícula de salipro individual (no mostrada). Por ejemplo, se añade proteína similar a saposina adicional durante o después de la etapa c.1) para permitir el auto-ensamblaje de la partícula de lipoproteína de saposina (no mostrada). La partícula ensamblada de la figura 10a está compuesta sustancialmente de lípidos (3) que se han asociado con la proteína de membrana solubilizada (4a). La proteína solubilizada generalmente se obtiene mediante un proceso de purificación de proteínas y, en estas circunstancias, frecuentemente está incrustada en una micela que comprende moléculas de detergente y lípidos (3). Los lípidos asociados con la proteína de membrana solubilizada son a menudo "lípidos de cubierta" de la membrana a partir de la cual se purificó la proteína de membrana (4a). La proteína de membrana puede purificarse a partir de su membrana "natural", pero no tiene por qué ser el caso. Por ejemplo, una proteína de membrana eucariótica puede sobreexpresarse a partir de un transgén en una célula procariota, como una bacteria o un virus del que luego se purifica la proteína de membrana. Por lo tanto, los lípidos (3) que permanecen asociados con la proteína de membrana eucariótica solubilizada con detergente podrían no formar parte del entorno lipídico "natural" de esta proteína purificada. Los lípidos de cubierta se adhieren firmemente a las superficies hidrofobas de la proteína de membrana (4a). Sólo opcionalmente, se añaden más lípidos al entorno líquido para su incorporación en las partículas de salipro.

El contacto de vesículas de membrana cruda (ilustradas como vesículas (7, 7') en la figura 10b) con proteína similar a saposina unida al soporte en la etapa c.1) (véase la figura 10b) permite la producción de una biblioteca de partículas de salipro unidas al soporte, es decir, las partículas de salipro unidas al soporte difieren en su tamaño y composición y comprenden proteína similar a saposina (2), lípidos (3) y/o proteínas de membrana (4a, 4b). Incluso se pueden producir partículas "vacías" que no contengan ningún agente hidrofobo. En las partículas de la biblioteca, la proteína de membrana (4a, 4b) respectiva está incrustada en el entorno de membrana del que se obtuvo, es decir, la proteína

de la membrana permanece incrustada en su entorno lipídico "natural". Por lo tanto, los lípidos (3) asociados con las proteínas de membrana (4a, 4b) en las partículas de salipro ensambladas son preferiblemente un remanente del entorno lipídico nativo de la proteína de membrana que está presente en la vesícula de membrana cruda (7). Las membranas virales, de arquea, eucarióticas o procarióticas pueden servir como membranas fuente. La partícula ensamblada de la figura 10c comprende tres compuestos hidrófobos por partícula. Por supuesto, el número de compuestos hidrófobos incorporados en una sola partícula se puede ajustar ajustando la relación molar de compuestos hidrófobos a lípidos empleados en la reacción de auto-ensamblaje de la etapa c.1). El compuesto hidrófobo de la figura 10c se añade a la reacción de auto-ensamblaje en un estado solubilizado. La solubilización de compuestos hidrófobos generalmente se logra mediante moléculas de detergente, similar a la solubilización de proteínas de membrana hidrófobas. Como se muestra en la figura 10c, los lípidos pueden formar parte del estado solubilizado del compuesto hidrófobo. Opcionalmente se pueden añadir lípidos adicionales. Como se representa en la figura 10d, los agentes hidrófobos en forma del compuesto hidrófobo solubilizado (4c) y la proteína de membrana (4a) se pueden aplicar juntos en la etapa c.1). Puede elegirse cualquier relación molecular deseada de compuesto hidrófobo solubilizado a proteína de membrana, lo que influye en la composición de las partículas obtenidas. Las partículas ensambladas representadas en las figuras 10a a 10d suelen estar sustancialmente libres de detergentes. Las partículas unidas al soporte de las figuras 10a a 10d pueden eluirse. La estrategia de elución depende del tipo de interacción entre el par de resto de captura (13)/resto de unión (5).

Ejemplos

El siguiente ejemplo sirve para explicar adicionalmente la invención con más detalle, específicamente por referencia a ciertas realizaciones y figuras que, sin embargo, no pretenden limitar la presente divulgación.

I

Abreviaturas

Se usarán las siguientes abreviaturas:

Asp	ácido aspártico
CV	volumen de columna
daGFP	este tipo de proteína fluorescente verde se puede usar de la misma manera que GFP normal usando un aparato de excitación basado en láser de argón o basado en UV para permitir la detección de fluorescencia. La proteína tiene un pico de excitación de 510 nm y un pico de emisión de 521 nm.
EB1	tampón de elución (HEPES 20 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, imidazol 400 mM)
EB2	tampón de elución (HEPES 50 mM, pH 7,5, DDM al 2 %, CHS al 0,4 %, NaCl 200 mM, L-Asp 1 mM, EDTA 1 mM, TCEP 1 mM y glicerol al 5 %, destiobiotina 2,5 mM)
EB3	HEPES 50 mM pH 7,5, NaCl 200 mM, glicerol al 10 %, péptido FLAG 250 µg/ml
EB4	HEPES 50 mM pH 7,5, NaCl 200 mM, glicerol al 10 % suplementado con biotina 2 mM
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
DDM	n-dodecil-β-D-maltopiranosido
GF	tampón de filtración en gel (HEPES 20 mM pH 7,5, NaCl 150 mM)
HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico
His	histidina
Tampón HNG	HEPES 50 mM pH 7,5, NaCl 200 mM y glicerol al 5 %
Tampón HNG II	HEPES 50 mM pH 7,5, NaCl 200 mM y glicerol al 10 %
IMAC	cromatografía de afinidad de metales inmovilizados
IPTG	isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido
LB1	HEPES 20 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, imidazol 20 mM
LB2	tampón PES 50 mM/Tris-base, pH 7,4, NaCl 50 mM suplementado con L-Asp 1 mM, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM, TCEP 1 mM y dilución 1:200 (v/v) de cóctel de inhibidores de proteasas de mamíferos (Sigma)
PEI	polietilenimina
PMSF	fluoruro de fenilmetilsulfonilo
SB	tampón de solubilización
SEC	cromatografía de exclusión molecular
SLC	portador de soluto
TCEP	tris(2-carboxietil)fosfina
TEV	virus del grabado del tabaco
Tris	tris (hidroximetil) aminometano
Medio TB	medio de caldo terrífico
WB	tampón de trabajo (HEPES 50 mM pH 7,5, DDM al 2 %, CHS al 0,4 %, NaCl 200 mM, L-Asp 1 mM, EDTA 1 mM, TCEP 1 mM y glicerol al 5 %)

II

Purificación de saposina A

La saposina A purificada usada en los experimentos a continuación se preparó como se expone a continuación. La expresión de la proteína saposina A se llevó a cabo utilizando un vector con la región codificante de la saposina A humana (SEQ ID NO: 1) insertada en un plásmido pNIC-Bsa4 y transformada y expresada en cepas de *E. coli* Rosetta gami-2 (DE3) (Novagen). Las células se cultivaron a 37 °C en medio TB suplementado con tetraciclina, cloranfenicol y kanamicina y se indujeron con IPTG 0,7 mM. Tres horas después de la inducción, las células se recogieron por centrifugación a 12.000 x g durante 15 min. El sobrenadante se desechó, el sedimento celular se resuspendió utilizando el tampón de lisis LB1 (HEPES 20 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, imidazol 20 mM) y se rompió mediante sonicación. Los lisados se sometieron a centrifugación a 26.000 x g durante 30 min, el sobrenadante se calentó hasta 85 °C durante 10 min, seguido de una etapa adicional de centrifugación a 26.000 x g durante 30 min. La purificación IMAC preparativa se realizó mediante adsorción por lotes del sobrenadante por rotación de extremo a extremo con medio Ni Sepharose™ 6 Fast Flow durante 60 min. Tras la unión de la saposina A a la resina IMAC, el medio cromatográfico se empaquetó en una columna abierta de flujo por gravedad de 10 mm (diámetro interno) y las proteínas no unidas se eliminaron lavando con 15 volúmenes de lecho de tampón de lisis LB1. La resina se lavó con 15 volúmenes de lecho de tampón de lavado (HEPES 20 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, imidazol 40 mM). La saposina A se eluyó añadiendo cinco volúmenes de lecho de tampón de elución EB1 (HEPES 20 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, imidazol 400 mM). El eluato se dializó durante una noche con tampón de filtración en gel GF pH 7,5 (HEPES 20 mM pH 7,5, NaCl 150 mM) suplementado con proteasa TEV recombinante. La proteasa TEV que contenía una etiqueta de His que no puede escindirse se eliminó del eluido pasándolo por 2 ml de resina IMAC. Las proteínas diana escindidas se concentraron hasta un volumen de 5 ml utilizando unidades de filtración centrífuga y se cargaron en una columna HiLoad Superdex™ 200 16/60 GL utilizando un sistema de cromatografía ÄKTAexplorer™ 10 (ambos GE Healthcare). Las fracciones de pico se agruparon y concentraron a 1,2 mg/ml de proteína. La muestra de proteína se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a - 80 °C.

III

Generación de partículas de salipro sobre soporte

Ejemplo 1:

En este ejemplo, en la alternativa (II) del procedimiento de acuerdo con la invención se utiliza un gran transportador transmembrana (SLC) como agente hidrófobo. Los lípidos y el agente hidrofóbico se proporcionan en forma de una fracción de membrana cruda obtenida de células HEK293F que sobreexpresan SLC. El transportador SLC contiene una etiqueta Strep II como resto de unión. Se utilizaron perlas de purificación por afinidad anti-Strep-II como soporte de acuerdo con la invención. Éstas contienen restos de captura anti-Strep-II que son capaces de unirse al resto de unión a Strep II comprendido en la proteína transportadora SLC. La adición de saposina A a las membranas solubilizadas que contienen transportador SLC unidas al soporte permitió la formación de partículas lipídicas de saposina que contienen transportador SLC que todavía estaban unidas al soporte a través de la etiqueta Strep-II comprendida en la proteína transportadora SLC. Por lo tanto, el ensamblaje de las partículas lipídicas de saposina tuvo lugar completamente sobre el soporte y con los lípidos endógenos que se derivaban de la membrana celular y aún formaban complejos con la proteína transportadora SLC unida al soporte.

1.a. Sobreexpresión de proteína de membrana

La secuencia codificante del transportador SLC humano se introdujo en un vector de expresión que codifica una etiqueta Strep-II en el extremo N terminal seguida de daGFP y un sitio de escisión de proteasa PreScission. Antes de la transfección, se cultivaron células HEK293F (línea celular ATCC, prueba de micoplasma negativa) en medio Excell293 (Sigma) suplementado con L-glutamina 4 mM (Sigma) y 5 µg ml⁻¹ de Rojo fenol (Sigma-Aldrich) a densidades de 2,5 × 10⁶ células ml⁻¹. Las células se transfectaron transitoriamente con el vector de expresión en medio Freestyle293 (Invitrogen) usando polietilenimina (PEI) (Polysciences) a una densidad de 2,5 × 10⁶ células ml⁻¹, se diluyeron con un volumen equivalente de Excell293 6 h después de la transfección, y se trataron con ácido valproico 2,2 mM (Sigma) 12 h después de la dilución de los cultivos. Luego, las células transfectadas sobreexpresaron la proteína de fusión Strep II-daGFP-SLC. Todas las células se recogieron aproximadamente 48 h después de la transfección.

1.b. Preparación de membranas celulares crudas

La expresión a gran escala de la proteína de fusión Strep II-daGFP-SLC se realizó en un cultivo de 5 l esencialmente como se describe en a. anteriormente. Las células se recogieron en tampón de lisis (LB2) que contenía HEPES 50 mM/Tris-base, pH 7,4, NaCl 50 mM suplementado con L-Asp 1 mM, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM, TCEP 1 mM y dilución 1:200 (v/v) de cóctel de inhibidores de proteasas de mamíferos (Sigma), y se rompieron en un homogeneizador celular (EmulsiFlex-C5, Avestin) mediante 3 ejecuciones a aproximadamente 103.000 kPa. El homogeneizado resultante se aclaró mediante centrifugación (4.500 g durante 0,5 h) y las membranas en bruto se recogieron mediante ultracentrifugación (186.000 g durante 1,5 h). Las membranas se lavaron una vez con el tampón LB2 y finalmente se

homogeneizaron con un homogeneizador Dounce en un tampón que contenía HEPES 50 mM/Tris-base, pH 7,4, NaCl 200 mM, L-Asp 1 mM, EDTA 1 mM, TCEP 1 mM y glicerol al 10 %, se congelaron rápidamente en N₂ líquido y se almacenaron a -80 °C en membranas de 0,5 g ml⁻¹.

5 1.c. Unión al soporte de afinidad y elución

Se usaron los siguientes tampones:

- 10 - Tampón de solubilización (SB): HEPES 50 mM pH 7,5, DDM al 2 %, CHS al 0,4 %, NaCl 200 mM, L-Asp 1 mM, EDTA 1 mM, TCEP 1 mM y glicerol al 5 %.
- Tampón de trabajo (WB): HEPES 50 mM pH 7,5, NaCl 200 mM, L-Asp 1 mM, TCEP 1 mM y glicerol al 5 %.
- Tampón de elución EB2: WB suplementado con destiobiotina 2,5 mM (dBiotina).
- tampón HNG: HEPES 50 mM pH 7,5, NaCl 200 mM y glicerol al 5 %.

15 Se solubilizaron 800 µl de membranas en bruto (0,5 g de membranas ml⁻¹) que contenían transportador SLC sobreexpresado con 4,2 ml de SB y se incubaron durante 90 min a 4 °C utilizando una rueda giratoria. Los restos de membrana se eliminaron mediante centrifugación a 30.000 g durante 30 min, seguido de la adición de 900 µl de perlas de purificación por afinidad anti-Strep-II equilibradas (perlas de StrepTactin Sepharose, GE Healthcare) y el volumen total se corrigió a 5 ml usando WB. Luego, la muestra se incubó a 4 °C durante 1 h para permitir la unión del

20 transportador SLC etiquetado con Strep-II a las perlas de afinidad. Luego, la muestra se dividió en 5 columnas separadas, lo que permitió eliminar el material no unido mediante flujo por gravedad. Las perlas de afinidad no se lavaron en esta etapa y contenían el transportador SCL unido por afinidad en un entorno ("volumen muerto" de las perlas) que contenía parcialmente lípidos nativos de la membrana celular, micelas de detergente y los componentes de WB.

25 Se añadieron diferentes cantidades (0-4 ml) de 3,6 mg/ml de saposina a las columnas correspondientes. Luego, las mezclas se transfirieron a cinco tubos nuevos y los volúmenes totales de muestra se corrigieron a 5 ml usando WB de la siguiente manera:

- 30 - Muestra 1: 0 ml de saposina A + 4 ml de WB
- Muestra 2: 0,5 ml de saposina A + 3,5 ml de WB
- Muestra 3: 1 ml de saposina A + 3 ml de WB
- Muestra 4: 2 ml de saposina A + 2 ml de WB
- Muestra 5: 4 ml de saposina A

35 Luego se incubaron las muestras 1-5 durante 1 h a 4 °C usando una rueda giratoria, antes de transferirse nuevamente a las columnas. El material no unido se eliminó de la columna utilizando flujo por gravedad, seguido de 6 lavados de CV en WB y una etapa de elución con 4 ml de tampón de elución EB2. Se analizaron 50 µl de cada muestra eluida mediante SEC (detección de proteínas a 280 nm) con una columna de aumento Superose 6, GL 5/150 que funcionaba

40 en WB sin detergente como tampón SEC.

Los resultados se representan en la figura 11. Los resultados demuestran que se pueden obtener partículas de lipoproteínas de saposina incluso si la proteína de membrana, que forma complejo con lípidos, está unida a un soporte de afinidad. Cantidades crecientes de saposina A (0,5 ml, 1 ml, 2 ml y 4 ml de saposina A en una concentración de

45 3,6 mg/ml) también conducen a una mayor formación de partículas de salipro. Como control negativo bajo estas condiciones, no se pudieron obtener partículas de salipro cuando se excluyó la saposina A del entorno líquido (figura 11, muestra 1).

Los resultados representados en la figura 11 también refuerzan que antes de la elución con tampón sin detergente,

50 las partículas de salipro unidas al soporte son estables durante las etapas de lavado minucioso de la columna.

1.d. Análisis de partículas de salipro obtenidas

El eluato obtenido después de la incubación de las perlas de afinidad con 4 ml de SapA (véase la sección c anterior, muestra 5) se concentró usando un filtro centrífugo Amicon Ultra-2 con un corte de tamaño molecular de 100 kDa. Se analizaron adicionalmente 40 µl de la muestra concentrada mediante SEC usando una columna de aumento Superose

55 6 5/150 GL en un tampón HNG sin detergente suplementado con L-Asp 1 mM.

El análisis de las fracciones SEC mediante SDS-PAGE indica (figura 12a) que principalmente las fracciones 13, 14 y

60 15 contienen partículas de salipro purificadas, que contiene el transportador SLC y saposina.

Para validar aún más la homogeneidad de las partículas de salipro reconstituidas, se analizaron adicionalmente 20 µl de la fracción 14 mediante SEC usando una columna de aumento Superose 6 5/150 GL en tampón HNG sin detergente

65 suplementado con L-Asp 1 mM. El perfil SEC correspondiente (figura 12b) demuestra además la estabilidad y homogeneidad de las partículas de salipro cuando se reconstituyen en las perlas de afinidad.

Los datos presentados en el presente documento demuestran claramente que es posible reconstituir agentes hidrófobos en partículas de saposina mientras uno de los componentes de la partícula está unido a un soporte de afinidad. Los datos también muestran que se pueden usar membranas en bruto en el procedimiento de la invención.

5 IV

Generación de partículas de salipro a partir de células enteras

Ejemplo 2:

10 En este ejemplo, en la alternativa (II) del procedimiento de acuerdo con la invención se utiliza una proteína de membrana como agente hidrófobo. Los lípidos y el agente hidrofóbico se proporcionan en forma de células intactas, es decir, células de riñón embrionario humano (HEK), que sobreexpresan la proteína de membrana. Dichas células HEK sólo se ponen en contacto con un detergente sin realizar una etapa de lisis celular mecánica. La proteína de
15 membrana eucariótica contiene una etiqueta FLAG como resto de unión. Como soporte de acuerdo con la invención se utilizan perlas de purificación por afinidad anti-FLAG. Éstas contienen restos de captura anti-FLAG que son capaces de unirse al resto de unión de FLAG comprendido en la proteína de membrana eucariótica. La adición de saposina A a la proteína de membrana eucariótica unida al soporte comprendida en las membranas tratadas con detergente permite la formación de partículas lipídicas de saposina que contienen la proteína de membrana eucariótica. Por lo
20 tanto, en este ejemplo, el ensamblaje de las partículas lipídicas de saposina tiene lugar completamente sobre el soporte y con los lípidos endógenos que se proporcionan en forma de células enteras tratadas con detergente que expresan la proteína de membrana eucariótica de interés que se va a incluir.

25 2.a. Sobreexpresión de proteína de membrana

La secuencia codificante de la proteína de membrana eucariótica se introduce en un vector de expresión que codifica una etiqueta FLAG en el extremo N terminal. Antes de la transfección, las células HEK 293F se cultivan en medios de cultivo 293 Freestyle y se transfectan utilizando el reactivo PEI-Max utilizando el protocolo proporcionado por los
30 fabricantes (ThermoFisher). Luego, las células transfectadas sobreexpresan la proteína de membrana. Todas las células se recogen aproximadamente 48 horas después de la transfección.

35 2.b. Preparación de membranas solubilizadas

Las células que sobreexpresan la proteína de membrana eucariótica etiquetada con FLAG se recogen en un sedimento celular. A continuación, el sedimento celular se disuelve en tampón HNG II, que comprende además un cóctel inhibidor de proteínas 25x a una concentración final de 2x. Por consiguiente, se añade una solución que comprende GDN al 10 % en agua (p/v) a las células resuspendidas hasta una concentración final de GDN al 1 % (p/v). Luego la muestra se
40 incuba en una rueda giratoria en una cabina frío durante 5 min. Después, la muestra se centrifuga a 5000 g a 4 °C durante 5 min. El sobrenadante que comprende el material solubilizado, incluyendo las membranas tratadas con detergente, se recupera y se incuba durante otros 50 minutos en una rueda giratoria en una cabina fría. Después de esta etapa de incubación, el sobrenadante se centrifuga a 30000 g y 4 °C durante 30 min para eliminar los restos de membrana y luego se usa en la siguiente etapa 2.c para unirse al soporte de afinidad.

45 2.c. Unión al soporte de afinidad y elución

Se usan los siguientes tampones:

- Tampón HNG II: HEPES 50 mM pH 7,5, NaCl 200 mM y glicerol al 10 %
- EB3: HEPES 50 mM pH 7,5, NaCl 200 mM, glicerol al 10 %, péptido FLAG 250 µg/ml

50 Se preparan 4 columnas que permiten eliminar el material no unido mediante flujo por gravedad cargando cada columna con 100 µl de perlas de purificación por afinidad anti-FLAG M2 equilibradas (SigmaAldrich). Posteriormente se añaden a cada columna 500 µl de membranas solubilizadas obtenidas en la etapa 2.b. Luego, el flujo se vuelve a pasar tres veces a través de la columna para permitir la unión eficaz de la proteína de membrana eucariótica etiquetada con FLAG a las perlas de afinidad. Las perlas de afinidad cargadas con la proteína de membrana eucariótica etiquetada con FLAG no se lavan en esta etapa y contienen la proteína de membrana eucariótica unida por afinidad en un entorno ("volumen muerto" de las perlas) que contiene parcialmente lípidos nativos de la membrana celular y micelas de detergente y componentes del tampón HNG II.

60 Se añaden diferentes cantidades (0-6 ml) de 1 mg/ml de saposina A a las columnas correspondientes.

- Muestra 1: 1 ml de tampón HNG II
- Muestra 2: 1 ml de saposina A
- Muestra 3: 3 ml de saposina A
- 65 - Muestra 4: 6 ml de saposina A

Luego, las mezclas se transfieren a cuatro tubos nuevos y se incuban durante 25 min a 4 °C utilizando una rueda giratoria, antes de transferirse nuevamente a las columnas. El material no unido se elimina de la columna utilizando flujo por gravedad, seguido de 10 lavados de CV en tampón HNG II y una etapa de elución con 500 µl de tampón de elución EB3.

5

2.d. Análisis de partículas de salipro

Los eluatos obtenidos después de la incubación de las perlas de afinidad con diferentes cantidades de SapA (véase la sección 2.c anterior, muestras 1 a 4) se concentran usando filtros centrífugos Amicon Ultra-2 (10 kDa NMWL) a 13000 g y 4 °C. Las muestras concentradas se analizan adicionalmente mediante SEC utilizando una columna de aumento Superose 6 5/150 GL en un tampón HNG II sin detergente para detectar partículas de salipro formadas.

10

Se espera que con el flujo de trabajo experimental antes mencionado se puedan obtener partículas de lipoproteínas de saposina a partir de células intactas como material de partida, que no se han sometido a una lisis celular mecánica y mientras que la proteína de membrana eucariótica de interés está unida a un soporte de afinidad. Como control negativo bajo estas condiciones, so se deben obtener partículas de salipro cuando se excluye saposina A del entorno líquido.

15

V

20

Generación de partículas de salipro sobre soporte

Ejemplo 3:

En este ejemplo, la reconstitución de las partículas de salipro se realizó según la alternativa (I) del procedimiento de la invención, es decir, saposina se inmovilizó sobre un soporte de afinidad. Para este fin, la saposina se biotiniló y se unió a una matriz de perlas de afinidad de avidina. El contacto de saposina unida al soporte con saposina adicional sin etiquetar, lípidos y opcionalmente un agente hidrófobo permitió la formación de partículas de salipro de acuerdo con la invención. Por lo tanto, el ensamblaje de las partículas lipídicas de saposina tuvo lugar sobre el soporte.

30

3.a. Preparación de saposina A biotinilada

La saposina A fue biotinilada usando EZ-Link®NHS-Biotin Reagents (Thermo Fisher, referencia 21343) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Luego se realizó la cuantificación de la cantidad de biotina por saposina A con el kit Quant*Tag Biotin (Vector laboratory, BDK-2000) y mostró que estaban presentes 1,1 biotinas por molécula de saposina A.

35

3.b. Unión al soporte de afinidad y elución

Se preparó y lavó una matriz de avidina monomérica (Thermo Fisher 20228) de acuerdo con el protocolo del fabricante. La saposina A biotinilada se unió a la matriz de afinidad de avidina preparada. Para cada muestra, se unieron 100 µl de saposina A biotinilada (1,2 mg/ml) a 25 µl de matriz de afinidad de avidina pasando la saposina A biotinilada tres veces sobre la matriz, que estaba contenida en una columna (BioRad, columna de cromatografía Polyprep, n.º de artículo 7311550). Luego, la matriz de afinidad se lavó exhaustivamente con tampón HNG II para garantizar la eliminación de la saposina A no unida.

40

45

Con la matriz de afinidad de avidina cargada con saposina A, se evaluaron dos condiciones diferentes de ensamblaje de partículas: En la muestra 1, se agregaron lípidos cerebrales y saposina A sin etiquetar a la resina de afinidad con saposina A preinmovilizada. En la muestra 2, se agregaron lípidos cerebrales, una proteína de membrana (proteína de membrana de canal iónico bacteriano T2) y saposina A sin etiquetar a la resina de afinidad con saposina A preinmovilizada.

50

La solución de lípidos cerebrales se preparó disolviendo 5 mg/ml de lípidos cerebrales (Sigma-Aldrich) en DDM al 0,5 % y se preincubó durante 5 minutos a 37 °C.

55

La proteína de membrana de canal iónico bacteriano T2 se purificó como se describió previamente en F Guettou et al., Nature structural & Molecular Biology, 21; 728-731, 2014.

Las condiciones de ensamblaje de partículas para las muestras 1 a 2 fueron las siguientes:

60

- Muestra 1: se agregaron 16 µl de solución de lípidos cerebrales a la resina de afinidad con saposina A preinmovilizada y se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente antes de agregar 100 µl de saposina A no etiquetada (1,2 mg/ml).
- Muestra 2: se mezclaron 16 µl de solución de lípidos cerebrales con 8 µl de T2 (10 mg/ml) y se incubaron durante 5 min a 37 °C, antes de agregar la mezcla a la resina de afinidad con saposina A preinmovilizada. Luego, la muestra se incubó a temperatura ambiente durante 5 min antes de agregar 100 µl de saposina A no etiquetada (1,2 mg/ml).

65

Luego, las dos muestras se incubaron simultáneamente a temperatura ambiente en una rueda giratoria durante 25 minutos. Después, se utilizaron los siguientes tampones para tratar las columnas de muestras:

- 5 - Tampón HNG II: HEPES 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM y glicerol al 10 %
- EB4: tampón HNG suplementado con biotina 2 mM (Thermo Fisher 29129)

Las perlas de afinidad se lavaron extensamente con tampón HNG II sin detergente (3 veces usando 10 CV) y las muestras inmovilizadas se eluyeron usando el tampón de elución EB4.

10

3.c. Análisis de las partículas de salipro obtenidas

Las muestras eluidas se sometieron a SEC analítica, usando una columna de filtración en gel analítica Superdex™ 200 5/150 GL que funciona en tampón HNG II.

15

Los resultados se muestran en la figura 13. Para las muestras 1 y 2, se detectaron partículas de salipro en el perfil de elución (véase el pico de SEC a los 6,4 min para la muestra 1 y el pico de SEC a los 4,5 min para la muestra 2 de la figura 13). Por lo tanto, la saposina A inmovilizada permitió que se llevara a cabo el ensamblaje de partículas de salipro sobre el soporte de afinidad.

20

En conjunto, los datos presentados en el presente documento demuestran claramente que es posible reconstituir partículas de salipro utilizando diferentes materiales de partida mientras uno de los componentes de las partículas está unido a un soporte de afinidad.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para producir una partícula de lipoproteína de saposina, en donde la partícula de lipoproteína de saposina producida comprende

- una proteína similar a saposina,
- lípidos y
- opcionalmente, un agente hidrófobo, en donde el agente hidrófobo es diferente de los lípidos y

(I) en donde el procedimiento comprende las siguientes etapas:

- a) proporcionar los lípidos y opcionalmente el agente hidrófobo;
- b.1) poner en contacto la proteína similar a saposina con un soporte que sea capaz de unir selectivamente la proteína similar a saposina al soporte en un entorno líquido;
- c.1) poner en contacto la proteína similar a saposina unida al soporte con los lípidos y, opcionalmente, el agente hidrófobo, para permitir el autoensamblaje de la partícula de lipoproteína de saposina sobre el soporte;
- d) opcionalmente eluir la partícula de lipoproteína saposina unida al soporte; o

(II) en donde como alternativa el procedimiento comprende las siguientes etapas:

- a) proporcionar el agente hidrófobo y los lípidos;
- b.2) poner en contacto el agente hidrófobo con un soporte que sea capaz de unir selectivamente el agente hidrófobo al soporte;
- c.2) poner en contacto el agente hidrófobo unido al soporte con la proteína similar a saposina para permitir el autoensamblaje de la partícula de lipoproteína de saposina sobre el soporte;
- d) opcionalmente eluir la partícula de lipoproteína de saposina unida al soporte.

2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, alternativa (I), en donde el soporte comprende un resto de captura, y la proteína similar a saposina comprende un resto de unión, en donde el resto de captura es capaz de unirse selectivamente al resto de unión en la proteína similar a saposina.

3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, alternativa (II), en donde el soporte comprende un resto de captura, y el agente hidrófobo comprende un resto de unión, en donde el resto de captura es capaz de unirse selectivamente al resto de unión en el agente hidrófobo.

4. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el soporte está en forma de

- i. perlas,
- ii. un lecho,
- iii. una membrana y/o
- iv. un soporte sólido, en particular un soporte sólido con una superficie plana.

5. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde los lípidos se seleccionan del grupo que consiste en lípidos virales, de arquea, eucarióticos y procarióticos, y mezclas de los mismos.

6. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde en la etapa a) el agente hidrófobo y los lípidos se proporcionan en forma de una membrana viral, de arquea, eucariótica o procariótica, que comprende el agente hidrófobo y los lípidos que se van a incorporar en las partículas de lipoproteínas de saposina.

7. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6 en la medida en que se refiere a la reivindicación 1, alternativa (I), en donde en la etapa c.1) la proteína similar a saposina unida al soporte se pone en contacto con la membrana viral, de arquea, eucariótica o procariótica proporcionada en la etapa a) para permitir la formación de una biblioteca de partículas similares a saposina, en donde la biblioteca comprende una mezcla heterogénea de partículas de lipoproteínas de saposina con diferentes composiciones de lípidos de membrana y opcionalmente de proteínas de membrana.

8. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la proteína similar a saposina es saposina A, saposina B, saposina C, saposina D o un derivado o forma truncada de las mismas, que sea capaz de formar partículas de lipoproteínas de saposina en el procedimiento de la reivindicación 1.

9. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el derivado o forma truncada se selecciona de

- i. una proteína que tiene al menos el 20 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de longitud completa de SEQ ID NO. 1, 2, 3, 4, 5 o 6; en particular en donde dicha proteína es anfipática, forma al menos una hélice alfa y es capaz del autoensamblaje junto con lípidos en partículas de lipoproteínas cuando se emplea en el

procedimiento de la reivindicación 1; y

ii. una proteína que comprende la secuencia de SEQ ID NO. 1, 2, 3, 4, 5 o 6 en la que se han delecionado, añadido, insertado y/o sustituido de 1 a 40 aminoácidos.

5 10. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el agente hidrófobo se selecciona del grupo que consiste en un compuesto orgánico hidrófobo y una biomolécula hidrófoba.

10 11. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, en donde el compuesto orgánico hidrófobo y/o la biomolécula hidrófoba se selecciona del grupo que consiste en un agente biológicamente activo, un fármaco, un principio activo de un fármaco, un principio activo de un producto cosmético, un principio activo de un producto fitosanitario, un complemento dietético y/o nutricional, una sonda de diagnóstico, un agente de contraste, un marcador y un indicador.

15 12. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11, en donde la biomolécula hidrófoba es una proteína que comprende un resto hidrófobo, en particular una proteína seleccionada del grupo que consiste en una proteína de membrana, una proteína transmembrana integral, una proteína integral de membrana monotópica, una proteína periférica de membrana, una proteína anfitrópica en un estado unido a lípido, una proteína anclada a lípidos y una proteína quimérica con un dominio hidrófobo y/o transmembrana fusionado.

20 13. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el agente hidrófobo, los lípidos y/o la proteína similar a saposina están en un estado solubilizado con detergente y en donde opcionalmente el detergente se selecciona del grupo que consiste en alquilbencenosulfonatos o ácidos biliares, detergentes catiónicos y detergentes no iónicos o zwitteriónicos, tales como óxidos de laurildimetilamina (LDAO), Fos-colinas, CHAPS/CHAPSO, saponinas como digitonina y detergentes sintéticos estructuralmente relacionados como glicol-diosgenina, alquilglucósidos como alquil maltósidos de cadena corta, media o más larga, en particular, β -D-maltósido
25 de n-dodecilo, glucósidos, anfífilos de maltosa-neopentilglicol (MNG), polímeros anfífilos (anfipoles), copolímero de estireno y ácido maleico (SMA), oligómeros macrocíclicos o cíclicos a base de un producto de hidroxialquilación de un fenol y un aldehído (calixareno) y mezclas de los mismos.

30 14. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde

i. las partículas obtenidas en la etapa c.2) y/o c.1) tienen forma de disco, en particular en donde tienen forma de disco y no comprenden un núcleo hidrófilo o acuoso;
ii. las partículas de la etapa c.2) y/o c.1) tienen un diámetro máximo promedio de desde 2 nm hasta 200 nm, en particular desde 3 nm hasta 150, preferiblemente desde 3 nm hasta 100 nm;
35 iii. el autoensamblaje de la partícula en la etapa c.2) y/o c.1) se lleva a cabo con un pH de 2,0 a 10,0, en particular de 6,0 a 10,0, preferentemente de 6,0 a 9,0, de manera particularmente preferente de 7,0 a 9,0 y lo más preferentemente, de 7,0 a 8,0.

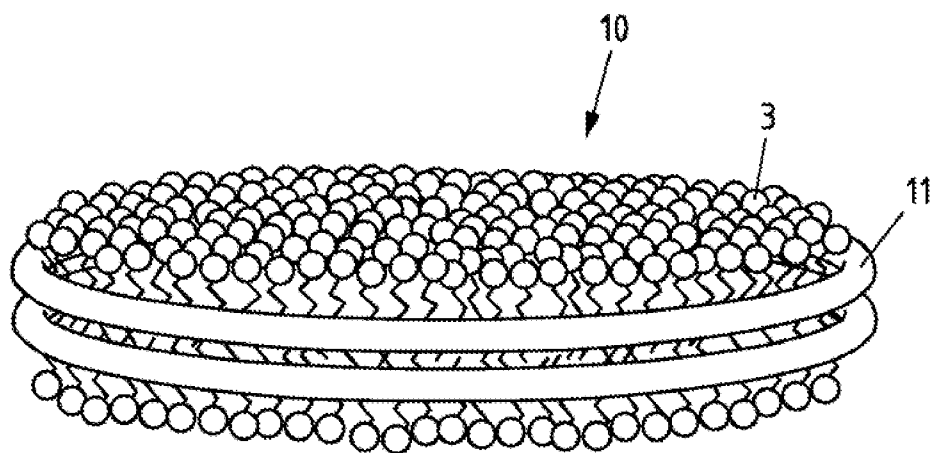


Fig.1 Técnica anterior

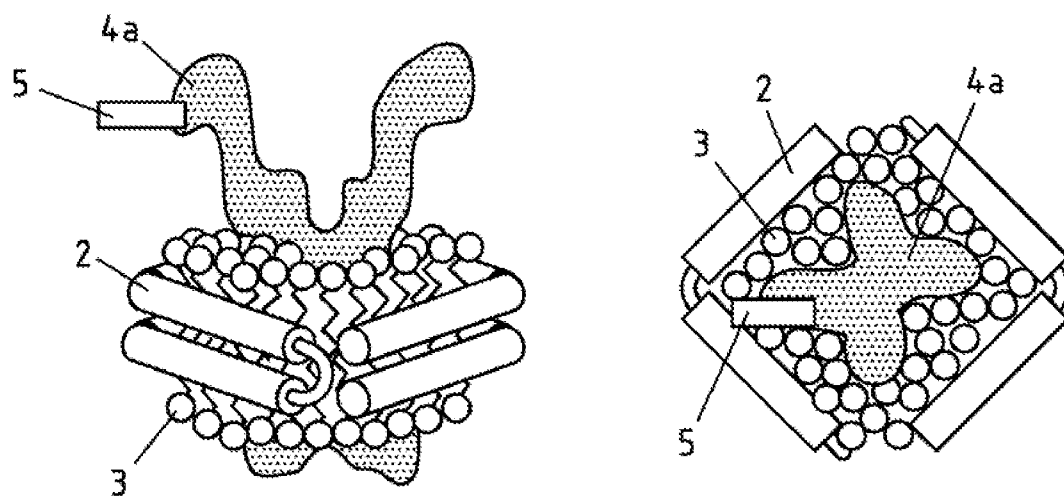


Fig.2a

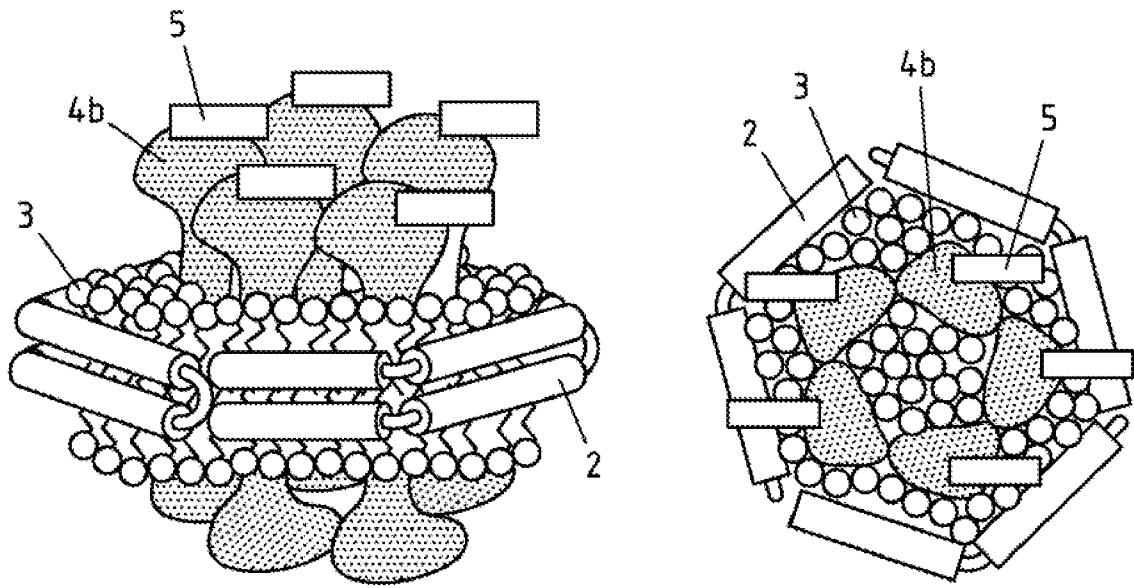


Fig. 2b

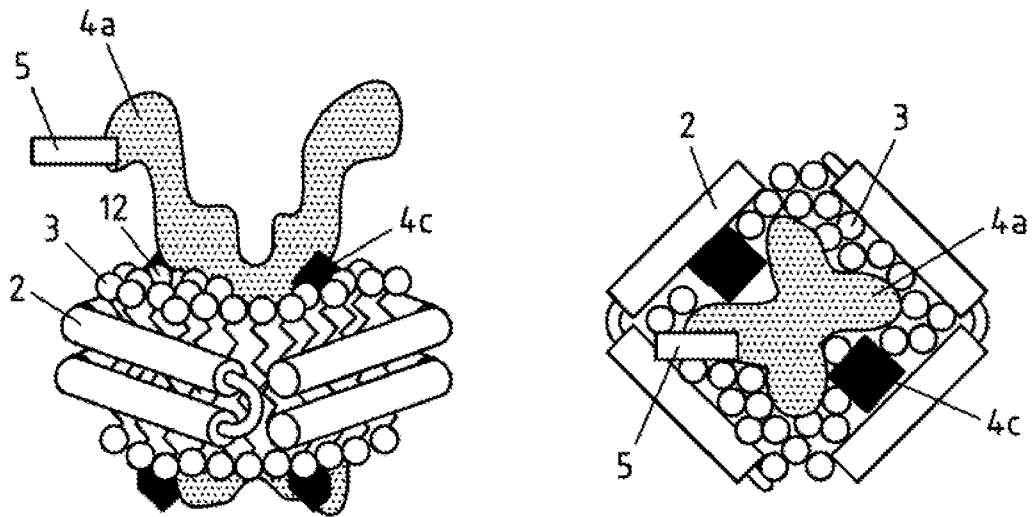


Fig. 2c

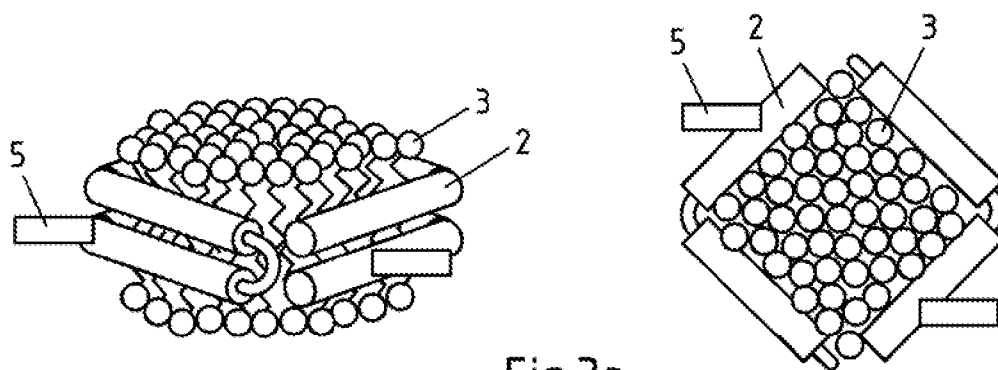


Fig.3a

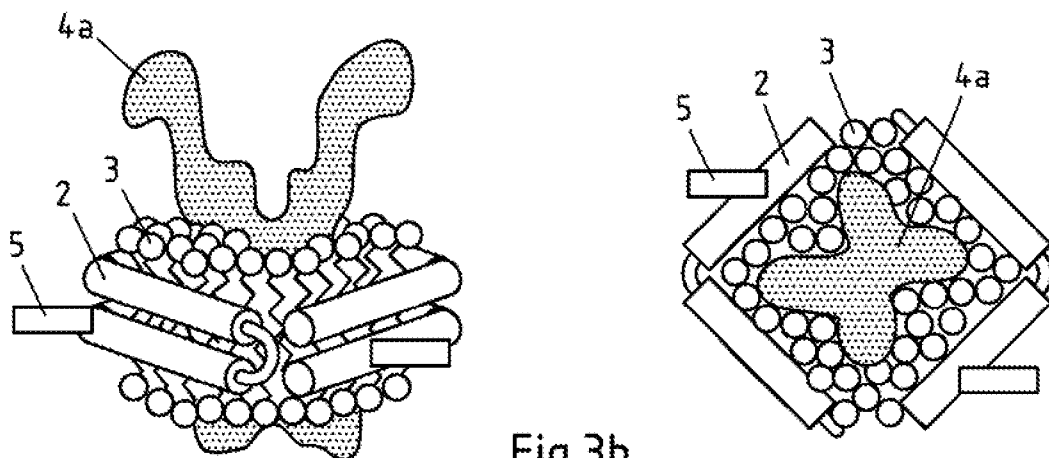


Fig.3b

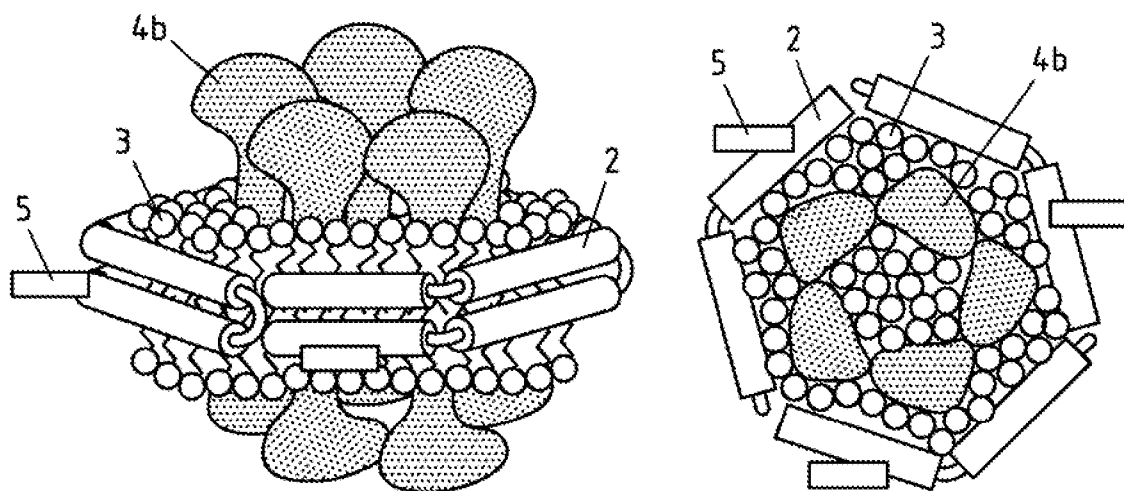


Fig.3c

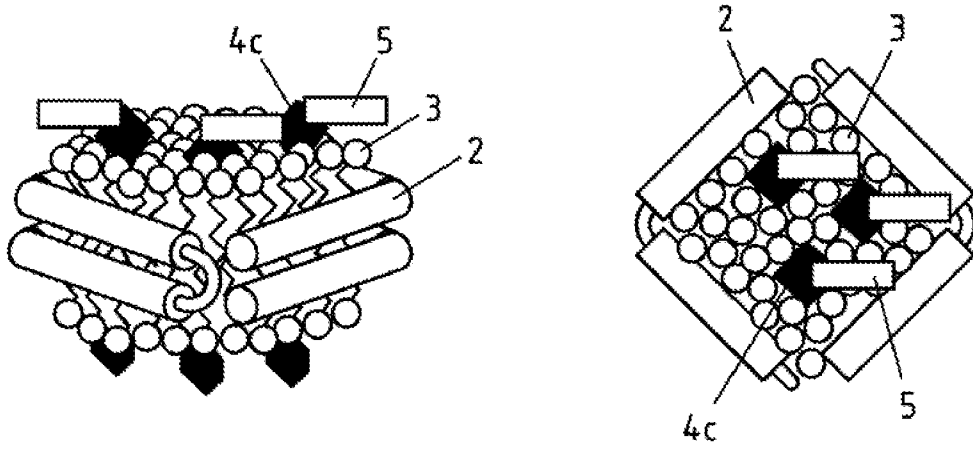


Fig. 4a

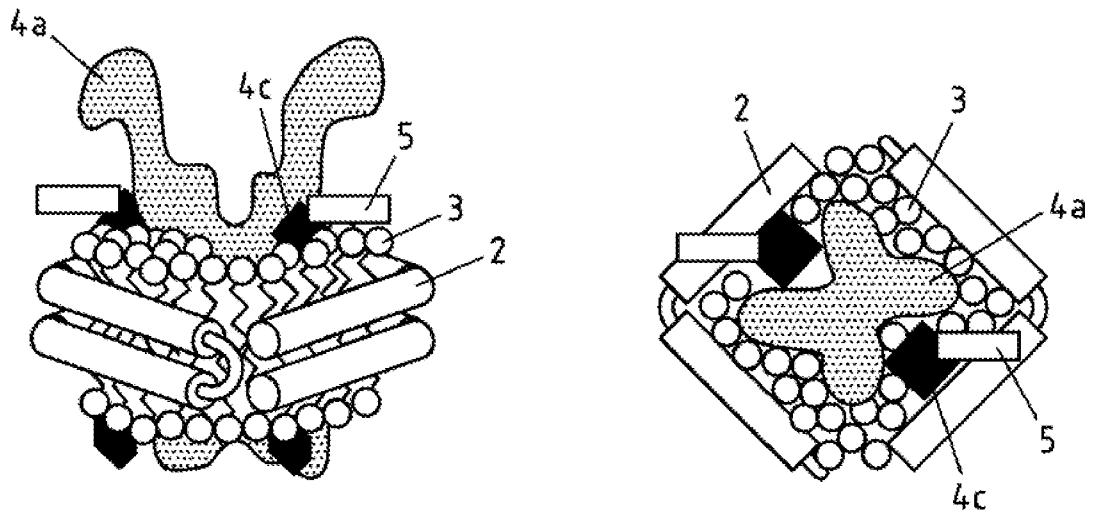


Fig. 4b

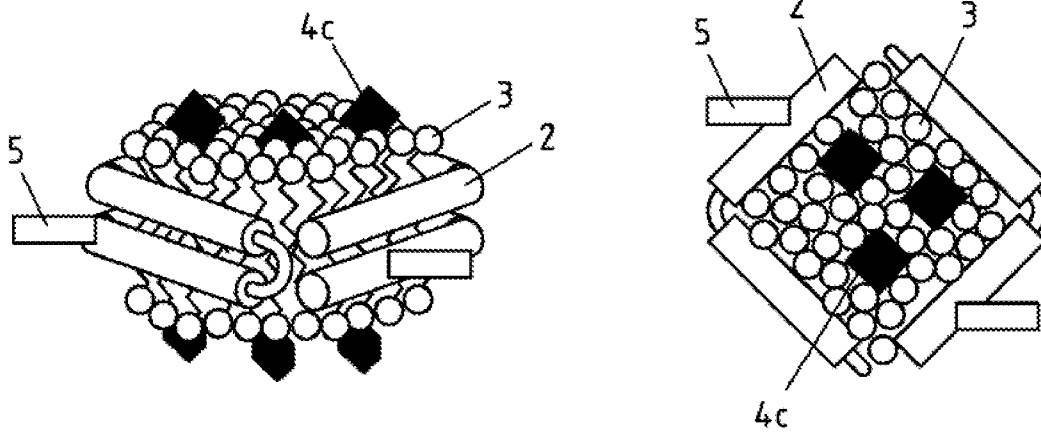


Fig. 5a

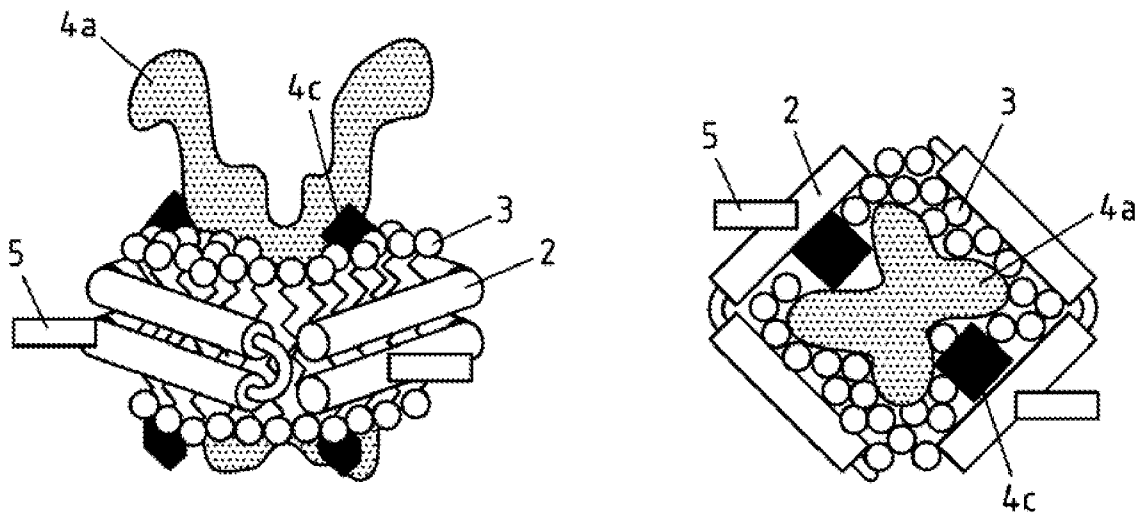
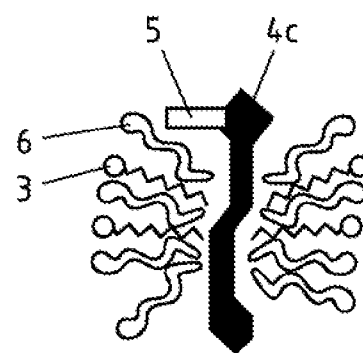
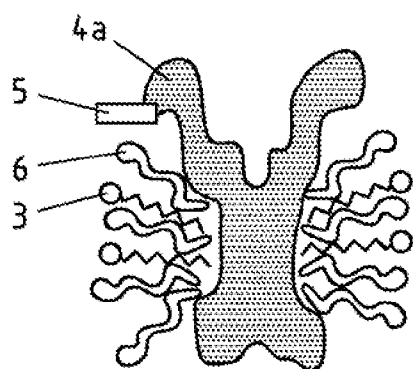
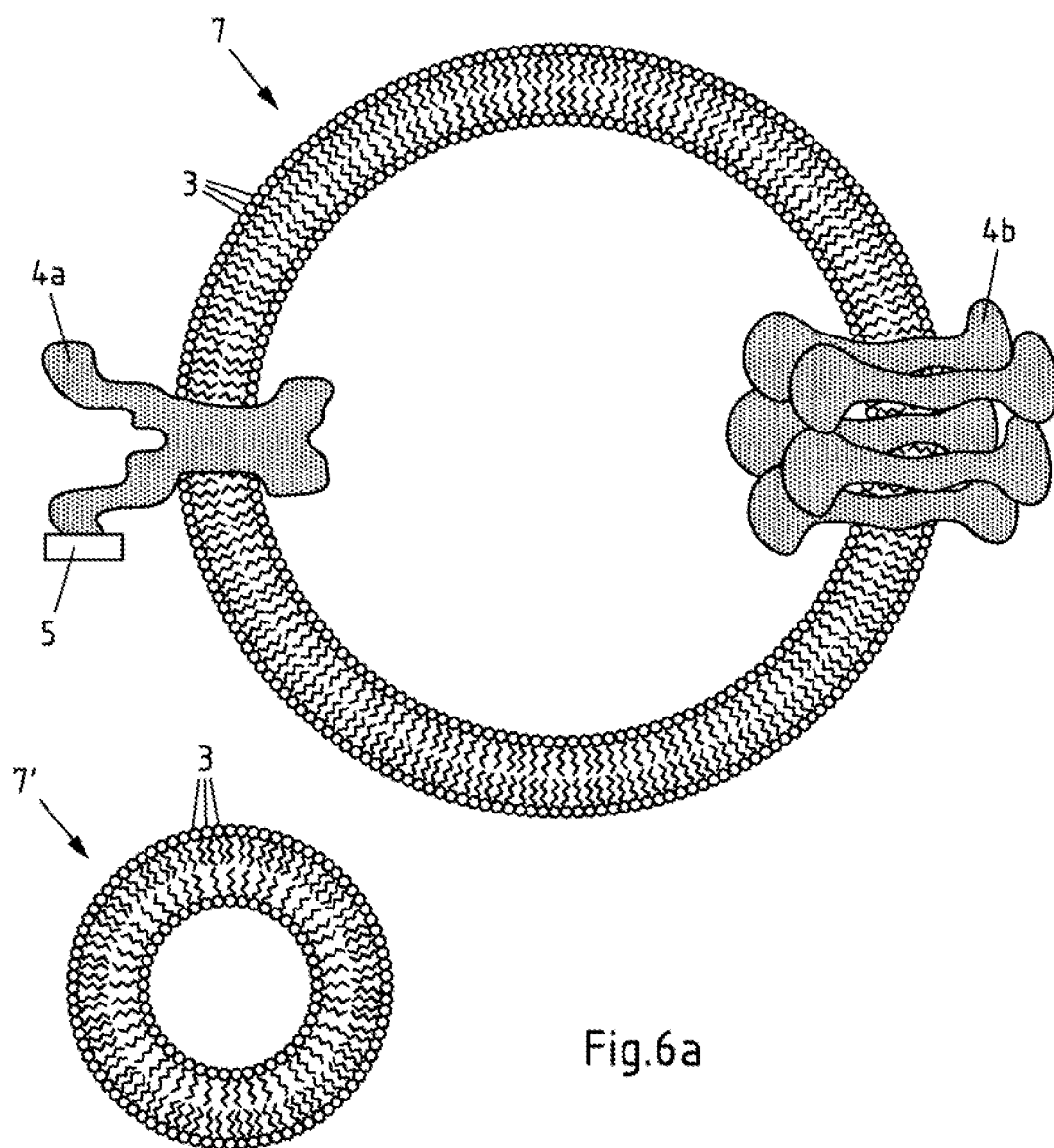
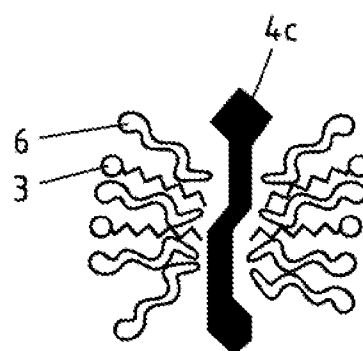
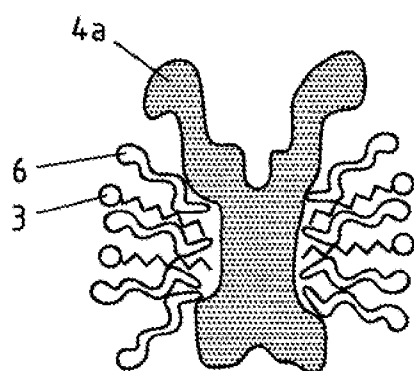
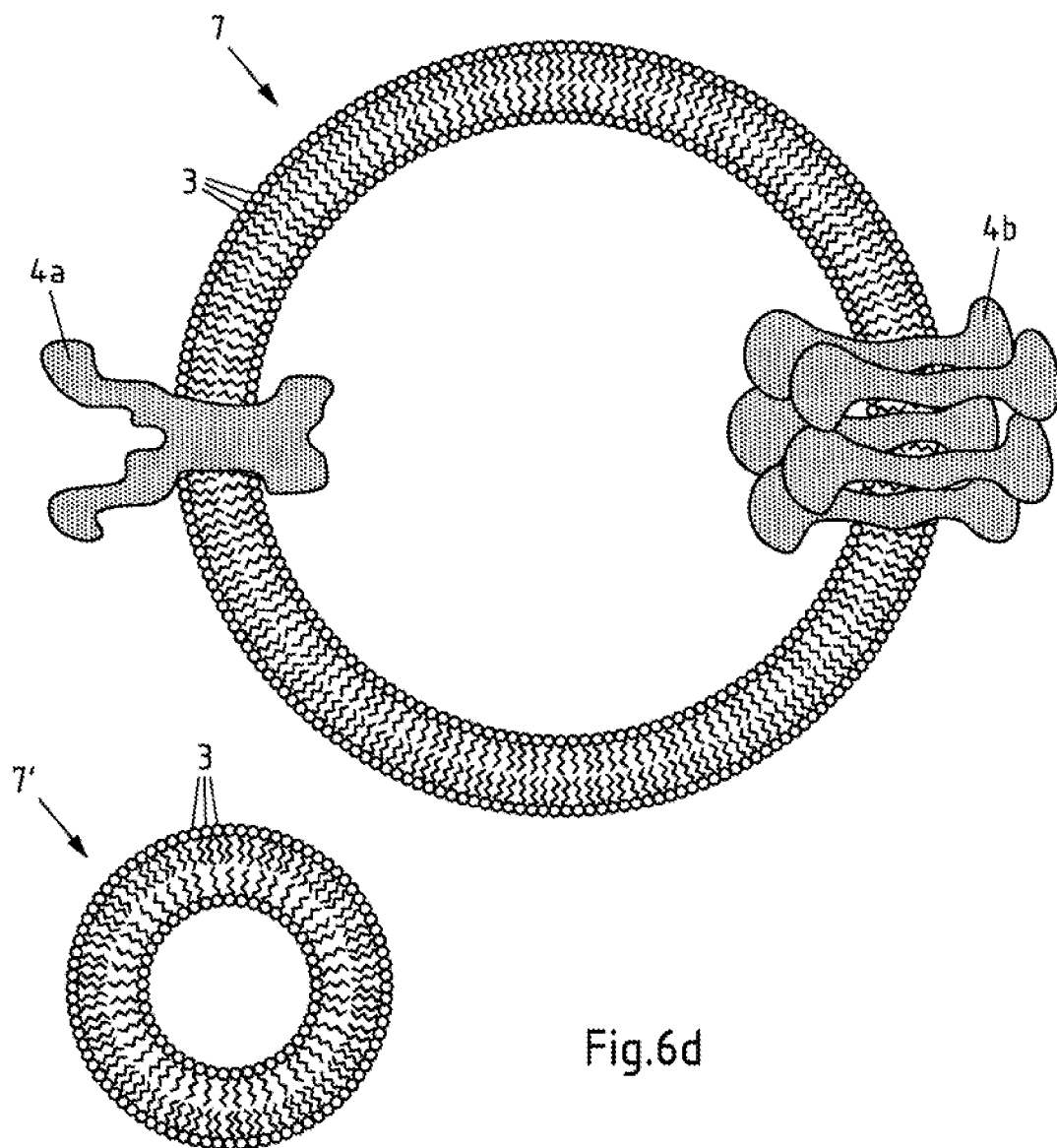


Fig. 5b





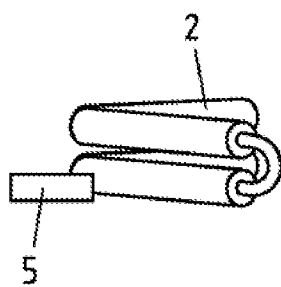


Fig. 7a

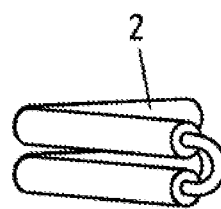


Fig. 7b

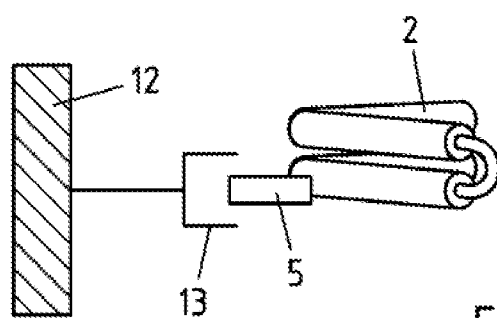


Fig. 8a

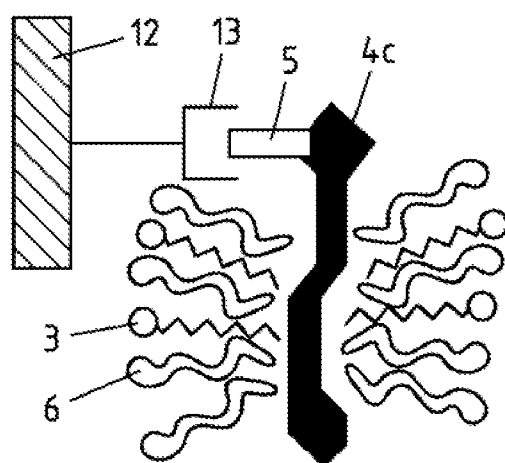


Fig. 8b

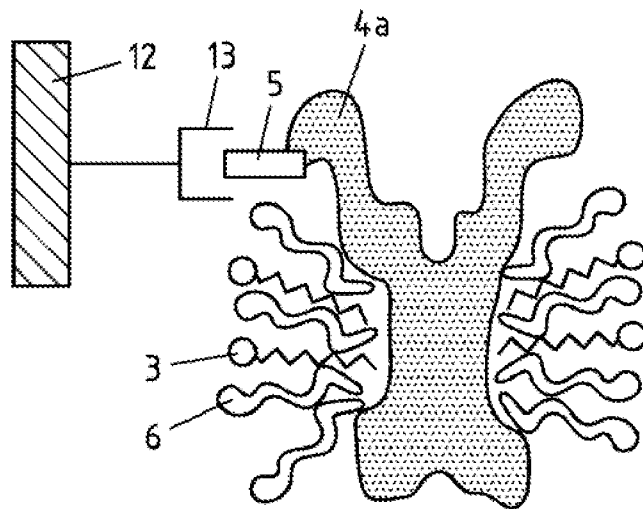


Fig. 8c

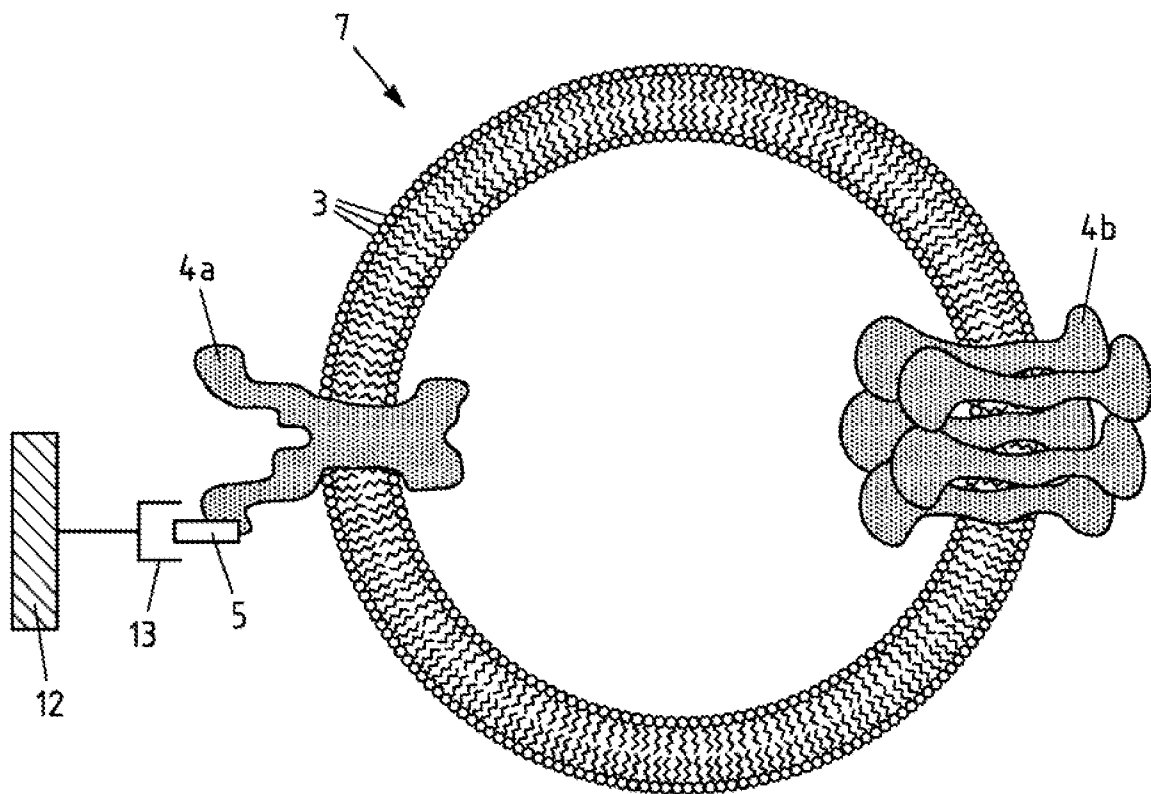


Fig. 8d

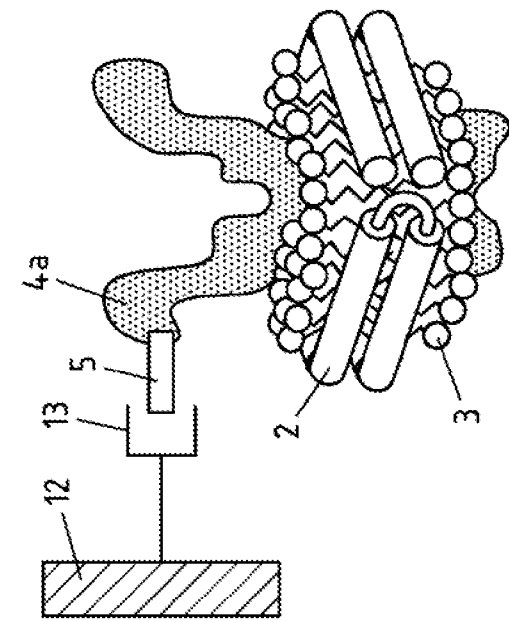
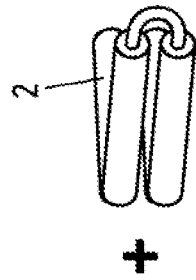
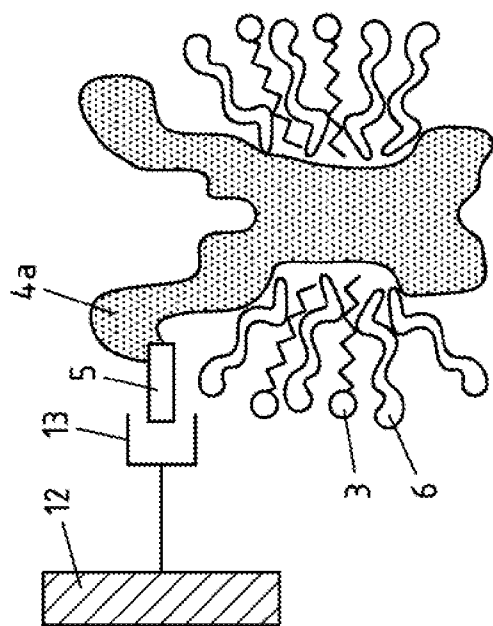


Fig. 9a



+

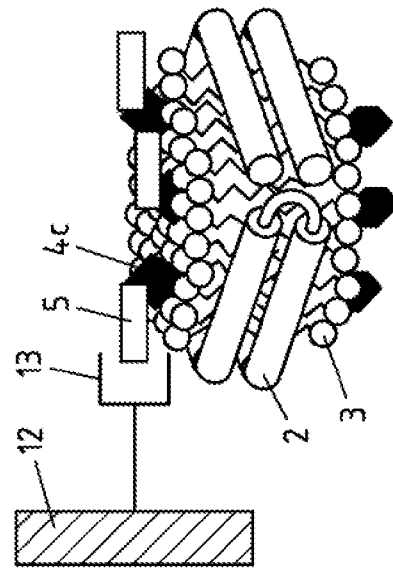
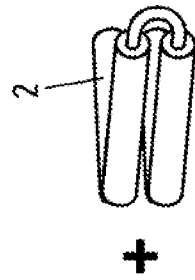
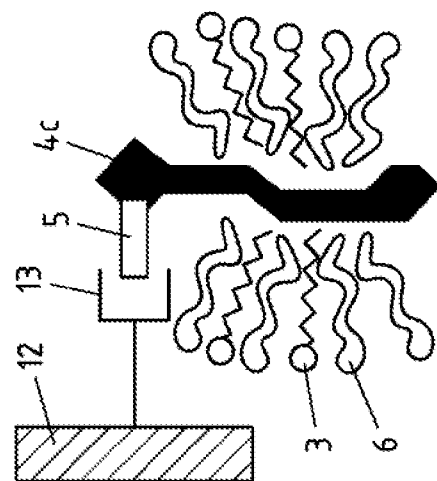


Fig. 9b



+

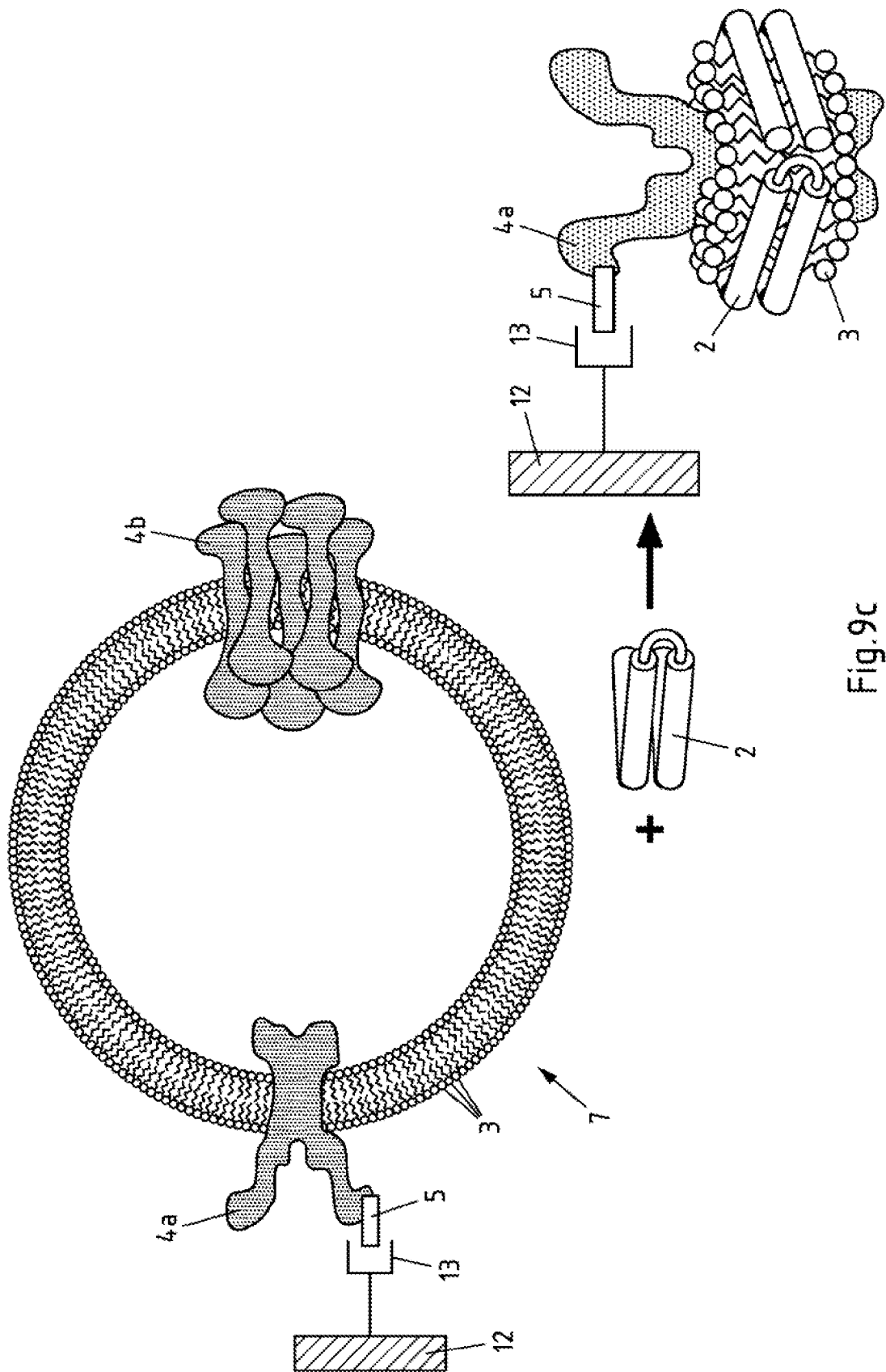


Fig. 9c

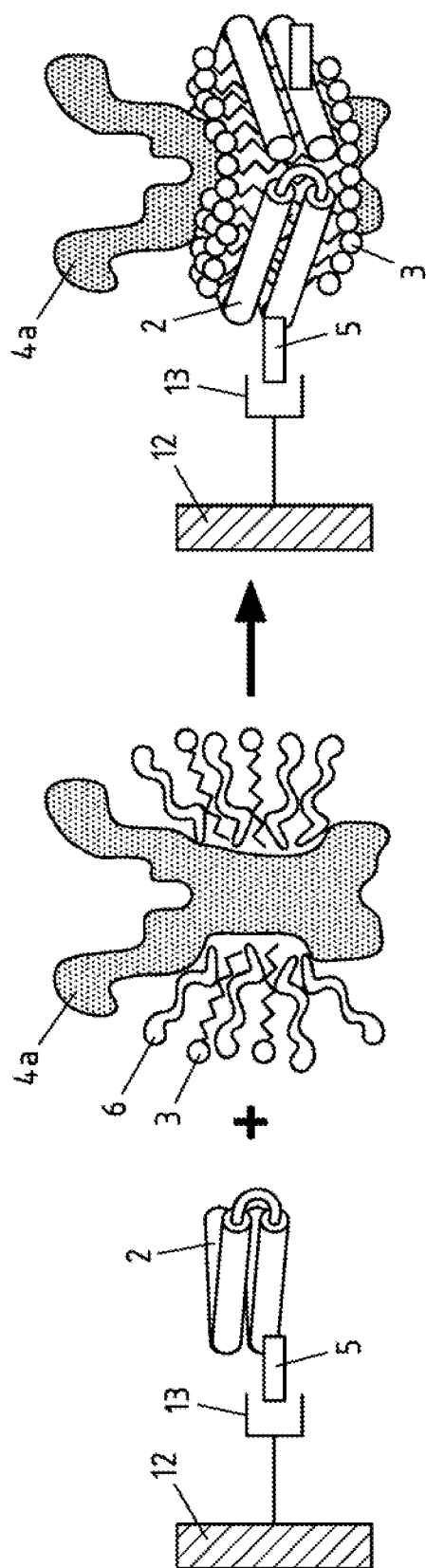


Fig. 10a

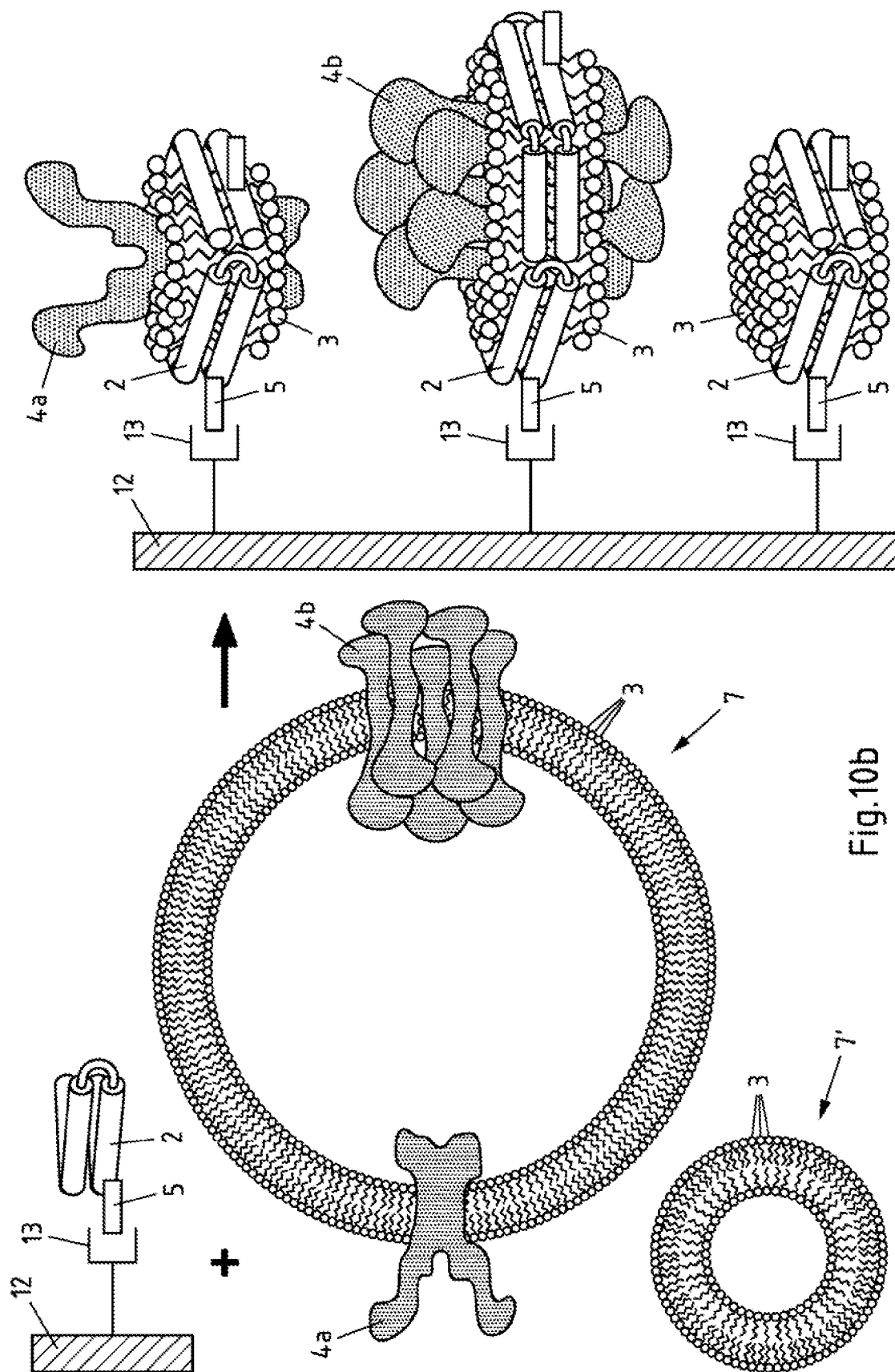


Fig.10b

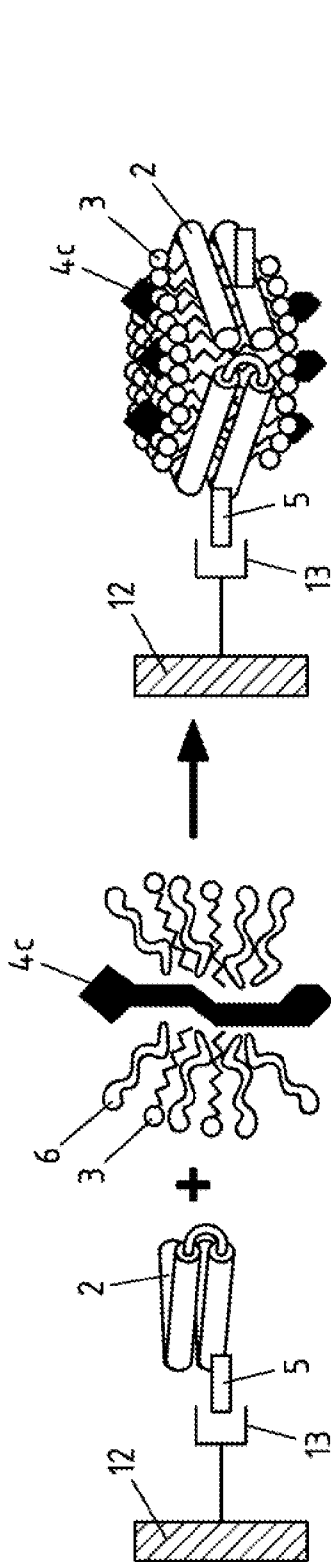


Fig. 10c

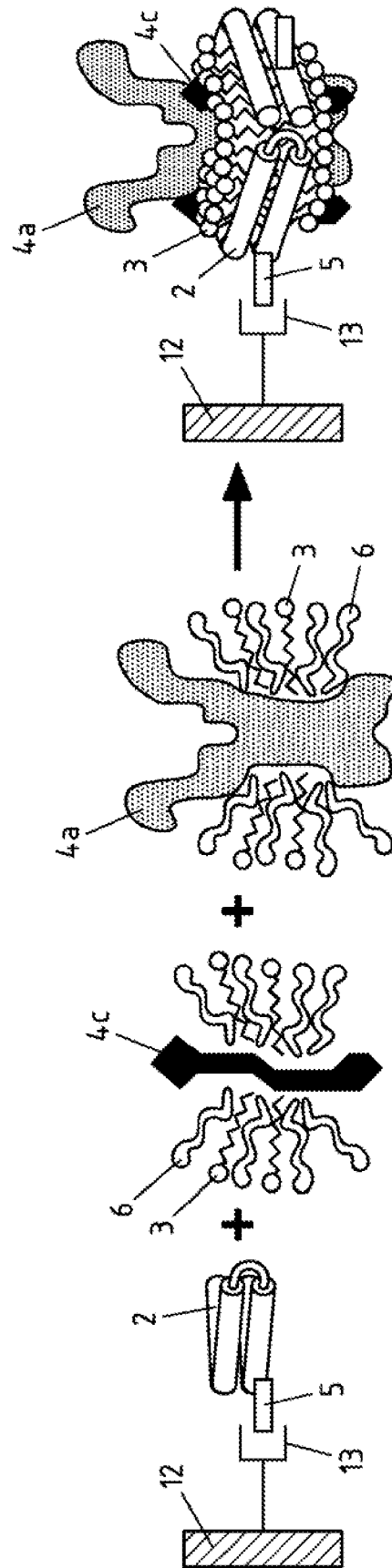


Fig. 10d

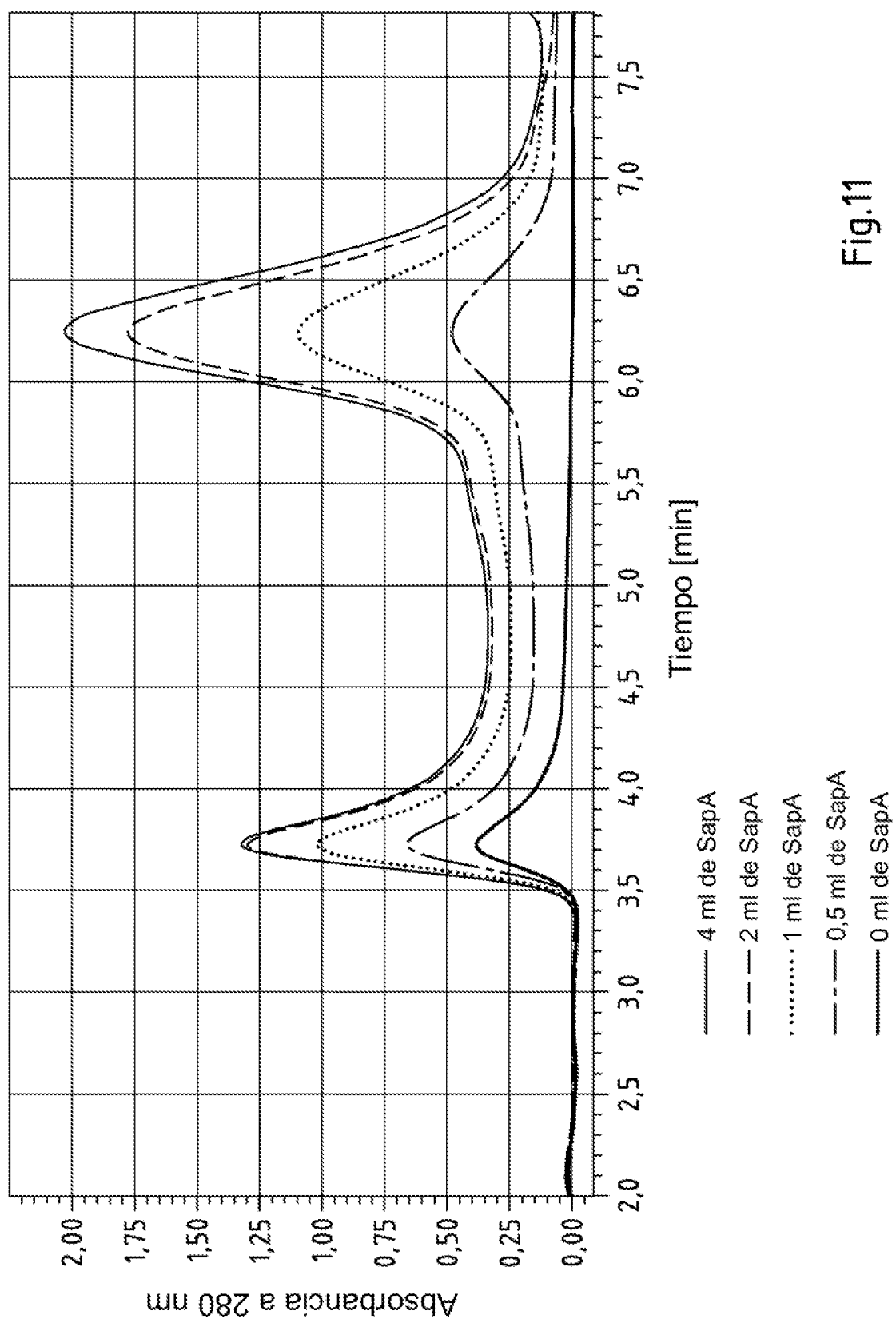


Fig.11

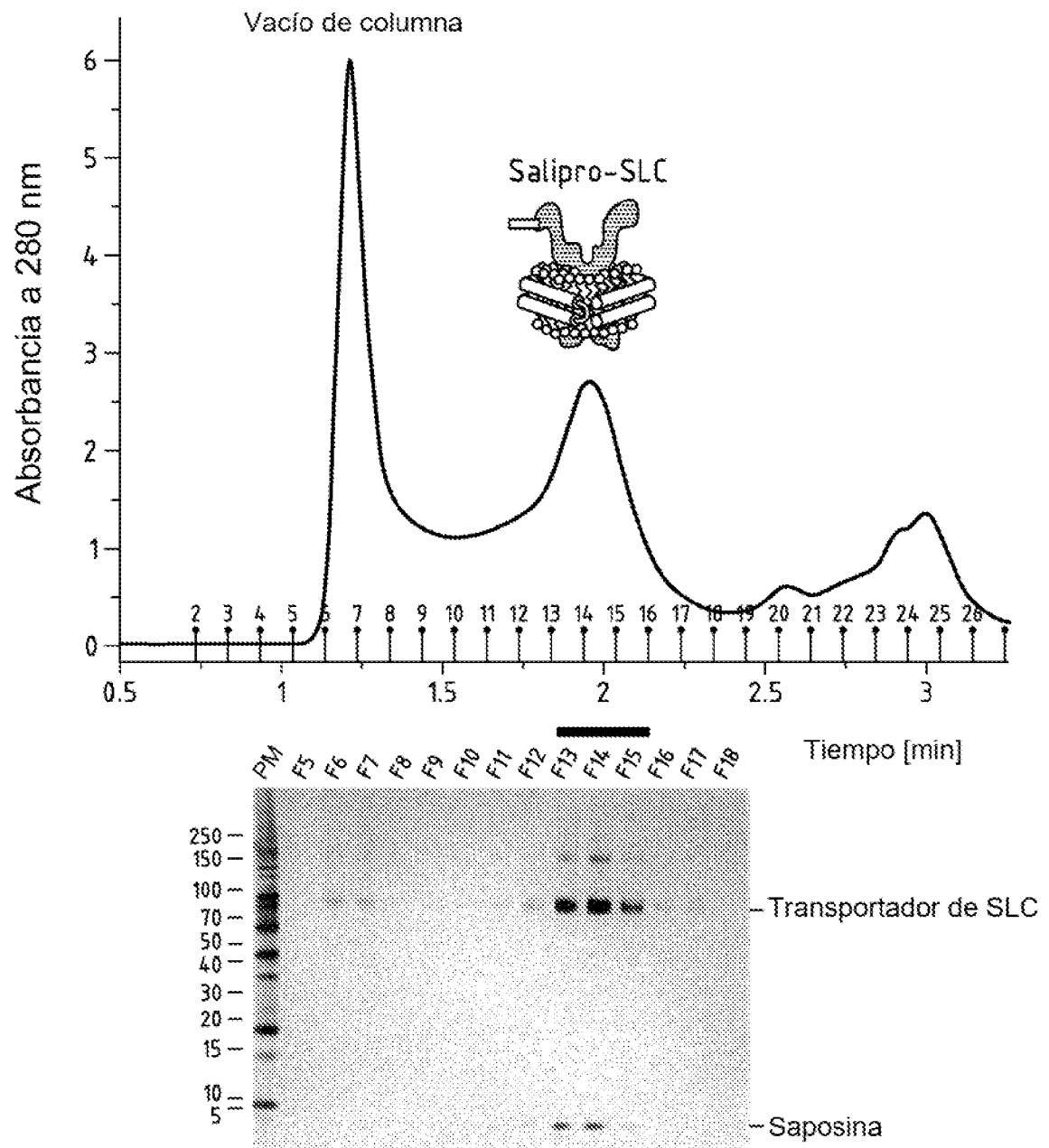


Fig.12a

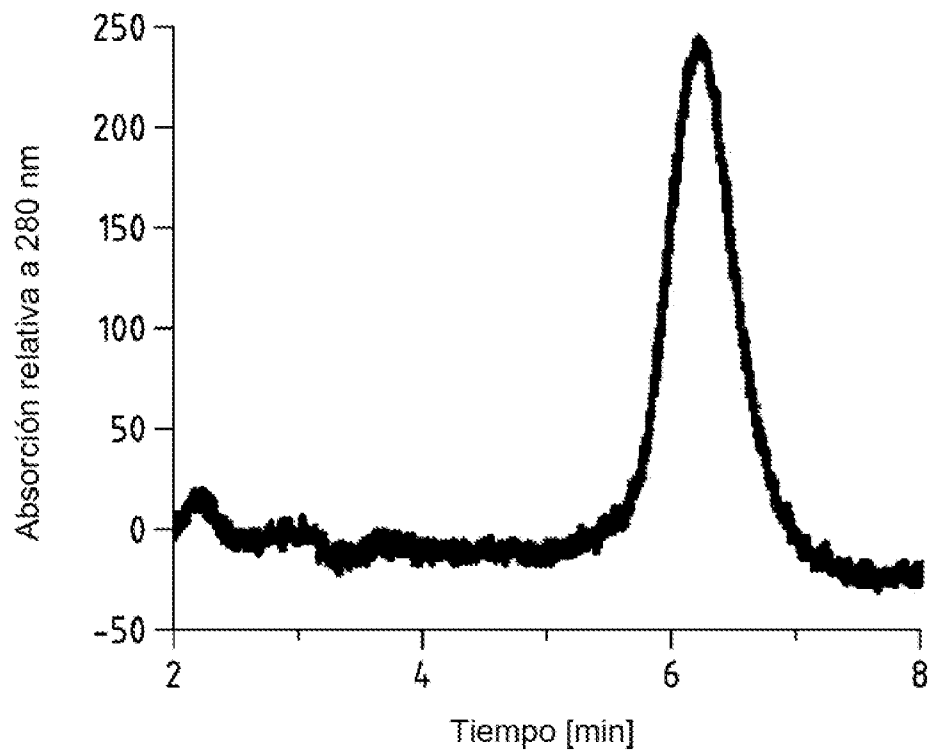


Fig.12b

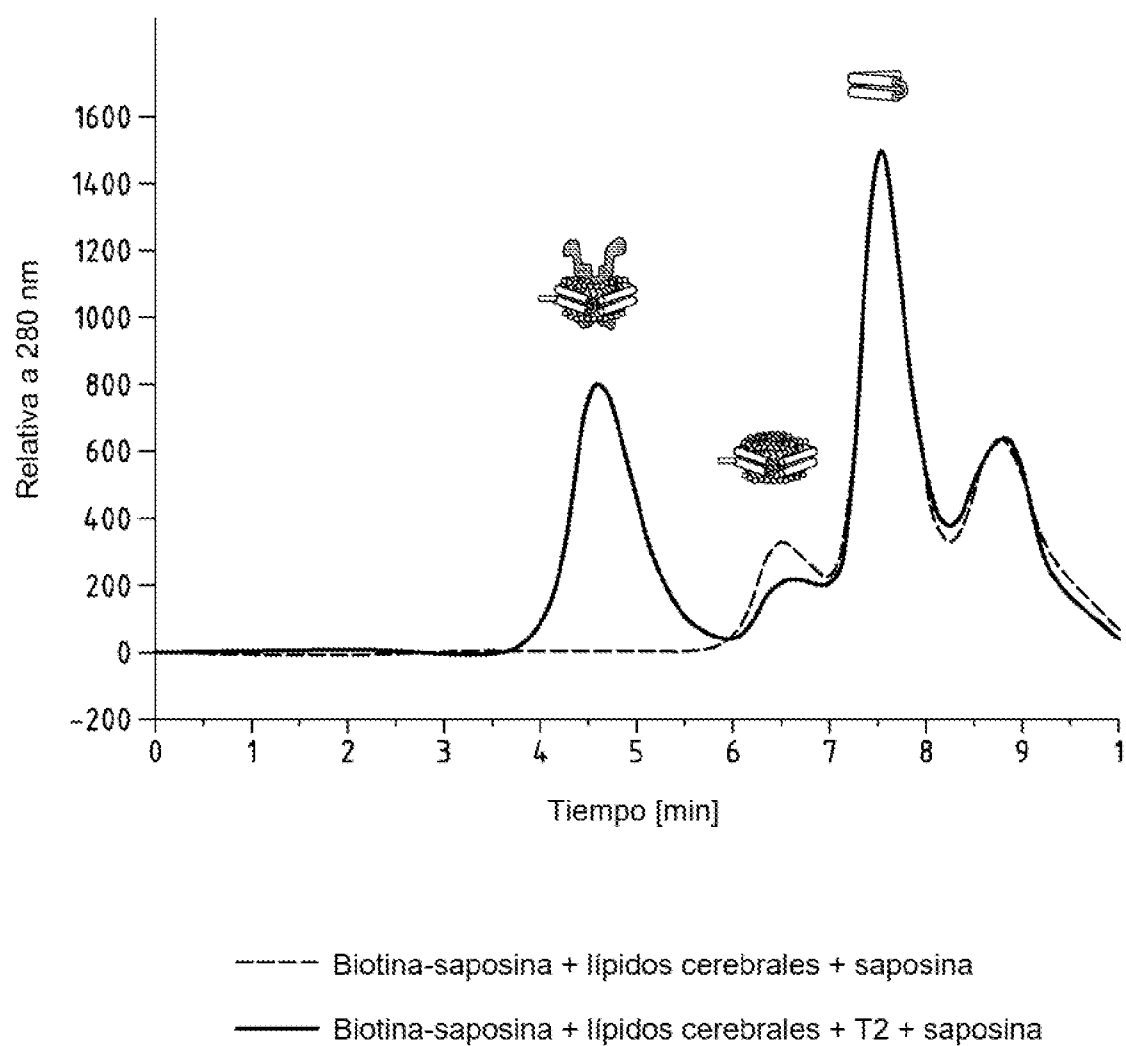


Fig.13

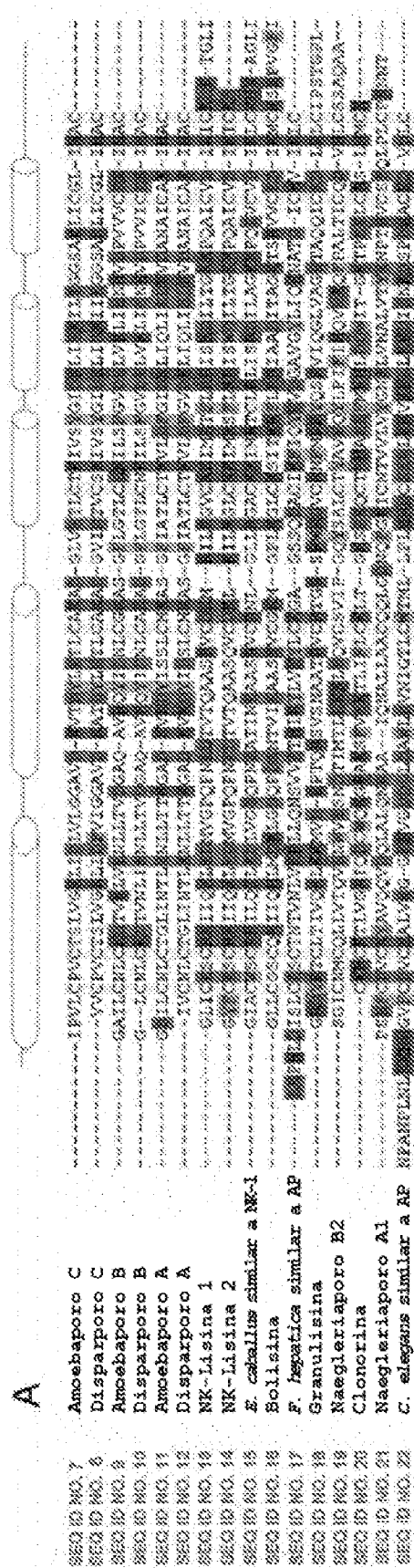


Fig.14a

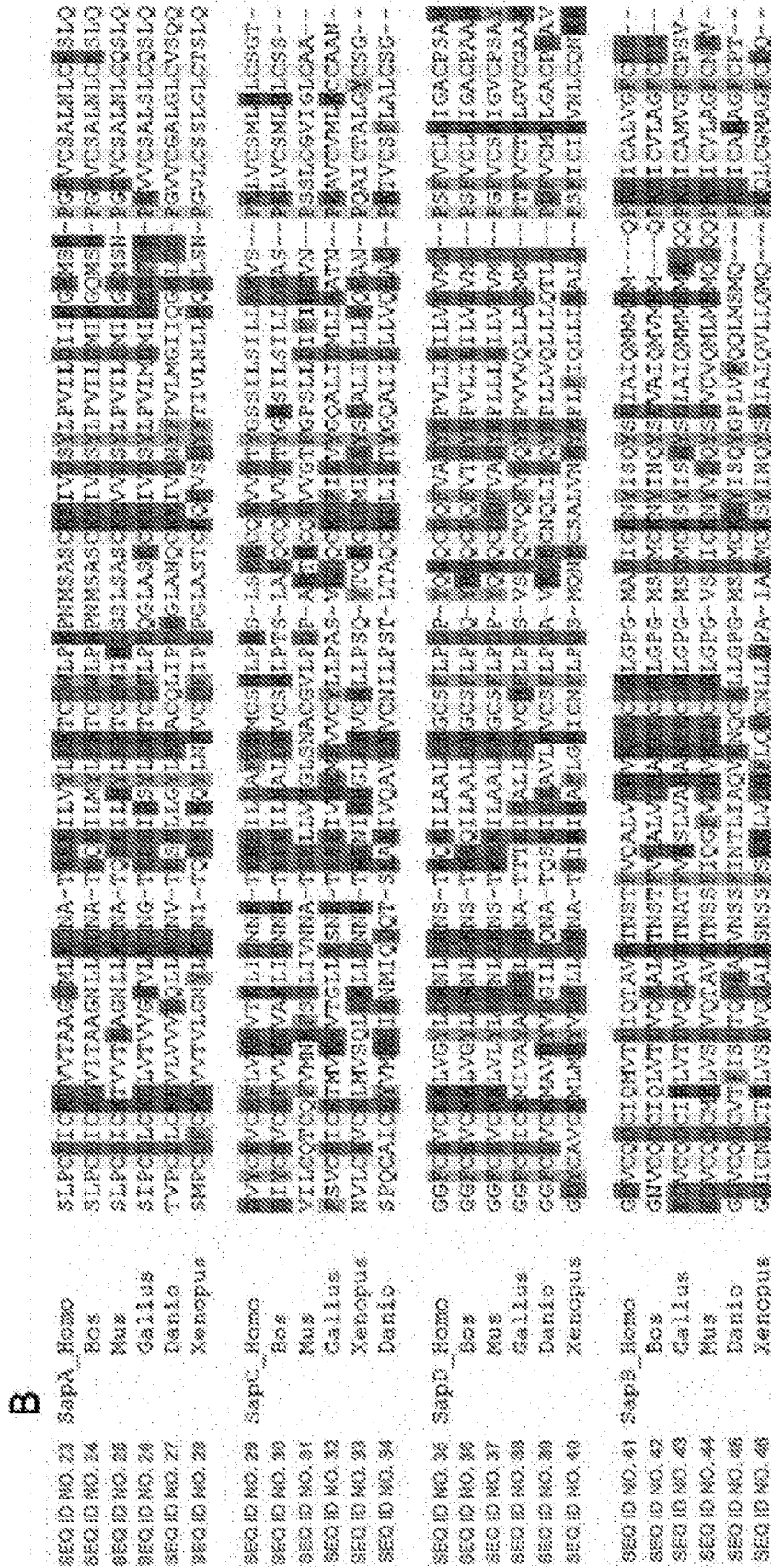


Fig.14b