

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 804 578**

21 Número de solicitud: 201930734

51 Int. Cl.:

G01N 33/58 (2006.01)
C07K 17/14 (2006.01)
C07K 17/06 (2006.01)
C07K 17/08 (2006.01)
C07K 17/00 (2006.01)
C07K 14/25 (2006.01)
B82Y 15/00 (2011.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:
07.08.2019

43 Fecha de publicación de la solicitud:
08.02.2021

71 Solicitantes:

UNIVERSIDAD DE CANTABRIA (70.0%)
Avda. de los Castros s/n
39005 Santander (Cantabria) ES y
FUNDACIÓN INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN
MARQUÉS DE VALDECILLA (30.0%)

72 Inventor/es:

LÓPEZ FANARRAGA, Mónica;
PADÍN GONZÁLEZ, Esperanza;
NAVARRO PALOMARES, Elena María;
VILLEGAS SORDO, Juan Carlos y
ITURRIOZ RODRIGUEZ, Nerea

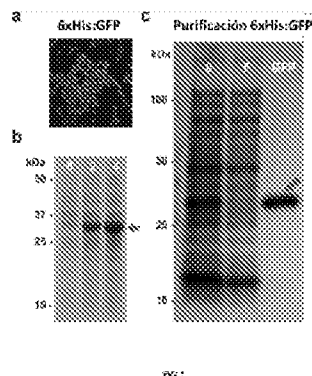
Observaciones:

La lista de secuencias está accesible al público en la página web de la OEPM para su descarga en formato electrónico.

54 Título: **Método de recubrimiento proteico de materiales mediante bioconjugación electrostática**

57 Resumen:

Método de recubrimiento proteico de materiales mediante bioconjugación electrostática. La presente invención se refiere a un método de recubrimiento proteico de materiales mediante bioconjugación electrostática entre el material y un complejo proteico mediado por cargas electrostáticas opuestas entre la superficie del material y el complejo proteico, generando así una corona proteica biocompatible dispuesta de manera uniforme sobre la superficie del material. El método permite además mantener la funcionalidad del complejo proteico para poder emplear así el material recubierto obtenido en clínica.



ES 2 804 578 A1

DESCRIPCIÓN

Método de recubrimiento proteico de materiales mediante bioconjugación electrostática

La presente invención se encuadra dentro del campo de la medicina y de los métodos
5 para el recubrimiento proteico de superficies de materiales, los cuales dan lugar a una cobertura proteica dispuesta sobre la superficie del material. El material así recubierto comprende por tanto un complejo proteico que mantiene su funcionalidad y especificidad por su receptor en la célula diana, lo que permite su uso en clínica, por ejemplo, en procedimientos de marcaje celular, en terapia dirigida o en tratamientos de regeneración
10 tisular entre otros.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La nanotecnología se define como el diseño, producción, manipulación y uso de materiales y estructuras de tamaño de entre 1 a 100 nanómetros. Esta ciencia ha permitido la posibilidad de nuevas aplicaciones en campos tan diversos como la
15 medicina, la alimentación, la energía o la electrónica.

En medicina, la nanotecnología ha mejorado el diagnóstico y tratamiento de enfermedades mediante el uso de nanomateriales que, además de las propiedades específicas debidas a su pequeño tamaño, presentan ventajas como el permitir el transporte dirigido y específico de fármacos o compuestos activos, la producción de
20 calor para tratamiento en cáncer, la producción de gradientes magnéticos en imágenes de resonancia magnética, la encapsulación en su interior de diversos compuestos para mejorar la solubilidad de compuestos poco solubles o para la protección de la biodegradación o su uso como biosensores.

Para el uso de nanomateriales *in vivo* estos deben cumplir una serie de requisitos
25 mínimos, como ser biocompatibles, es decir, ser estables a pH=7 y en un entorno fisiológico y no presentar toxicidad ni desencadenar una respuesta inmune en el organismo. La biocompatibilidad se refiere a la capacidad de un nanomaterial para desempeñar una función deseada, sin provocar ningún efecto indeseable y al mismo tiempo generando la mejor respuesta celular o tisular.

30 Dotar a los nanomateriales de biocompatibilidad supone una barrera técnica en la

mayoría de las aplicaciones terapéuticas de la nanobiotecnología. Su escaso éxito es el resultado de la falta de comprensión de las interacciones biosintéticas que ocurren tras la exposición de los nanomateriales, por ejemplo, nanopartículas, a los medios biológicos. Por este motivo, una alternativa para proporcionar biocompatibilidad a los nanomateriales es la bioconjugación. Mediante el recubrimiento de dichos nanomateriales con compuestos biológicos (biocompatibles) a veces se mejora su estabilidad en el entorno fisiológico. Los principales compuestos biológicos utilizados en la bioconjugación son proteínas de diferente naturaleza (Walkey C., *et al.*, *Chem. Soc. Rev.* 41, 2780-99 (2012)).

Concretamente, la bioconjugación con proteínas ligando permite utilizar los nanomateriales para la detección de diferentes tipos celulares en procedimientos de marcaje biológico, así como la administración de fármacos o terapias dirigidas. Uniendo proteínas ligando a los materiales, éstos son capaces de interaccionar con receptores celulares específicos, siendo posible utilizar este sistema como soporte para la unión, *in vivo* o *in vitro*, a células diana. Esto permite la aplicación clínica de los materiales bioconjugados, particularmente en terapia celular para regeneración tisular, en diagnóstico por imagen o *in silico*, así como para el direccionamiento de fármacos de manera localizada.

La bioconjugación entre nanomateriales y proteínas se puede llevar a cabo mediante interacciones no covalentes y complementarias entre la proteína y la superficie. Variando estratégicamente la carga e hidrofobicidad de la superficie se permite la interacción regioespecífica (Rana S., *et al.*, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 14, 828–834 (2010)). Un ejemplo de este proceso de bioconjugación es la interacción electrostática entre nanopartículas de oro funcionalizadas con ligandos aniónicos y proteínas marcadas con histidinas (Mout R., *et al.*, *Nanoscale* 6(15): 8873–8877 (2014)).

Sin embargo, una desventaja de esta aproximación es que la superficie del nanomaterial puede inducir cambios conformacionales en las moléculas de proteínas adsorbidas, que pueden afectar su reactividad general y provocar la desnaturalización del polipéptido y su consiguiente pérdida de función, así como la desorientación de la proteína en la superficie del material. Por su parte, las proteínas cambian la reactividad superficial y la naturaleza hidrodinámica de los nanomateriales, reorientándose y posicionándose de manera impredecible. El gran reto de la bioconjugación es, por tanto, la comprensión y el control de dichos cambios conformacionales para la generación de nanomateriales

biocompatibles con características de superficie controladas en un entorno biológico (Saptarshi S., *et al.*, *J Nanobiotechnology* 11,26 (2013)).

Las proteínas adsorbidas sobre la superficie de los nanomateriales, dependiendo del tamaño de éstos, sufren cambios conformacionales resultado de su unión “íntima” a los nanomateriales (Satzter P., *et al.*, *Eng. Life Sci.* 16, 238–246 (2016)). Los polipéptidos se despliegan y exponen al medio sus residuos aminoacídicos hidrófobos y/o no polares, normalmente ocultos en su núcleo. Esta desnaturalización parcial representa una señal de advertencia para diferentes proteínas y células circulantes, desencadenando fagocitosis de los nanomateriales, reduciendo su tiempo de circulación y, por lo tanto, el posible efecto terapéutico (Seong S., *et al Nat. Rev. Immunol.* 4, 469–478 (2004)).

Además, más del 95% de las proteínas adsorbidas o ligadas químicamente a las superficies de los nanomateriales presentan una colocación u orientación incorrecta (Herda, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 1391, 111-114 (2017); Kelly, *et al.*, *Nat Nanotechnol.*, 10(5):472-9 (2015)), lo que impide que su dominio de unión a la célula de interés quede adecuadamente expuesto en la superficie del material para poder ejercer su función. Esto disminuye significativamente las posibilidades de interacción con su diana.

Existen, por tanto, tres grandes objetivos en la bioconjugación de las proteínas a los nanomateriales: (i) la no inactivación o desnaturalización de la proteína que se une a la superficie, es decir, que la proteína mantenga su estructura y funcionalidad una vez unida al nanomaterial, (ii) la adecuada orientación de la misma en la superficie, de manera que exhiba correctamente expuesto su dominio de interacción con la diana y (iii) que el recubrimiento del nanomaterial con la proteína sea completo, para evitar la interacción con otras proteínas que puedan contaminar el material y por tanto reducir su especificidad de unión con la diana.

Existe por tanto una necesidad de establecer una estrategia eficiente de bioconjugación entre proteínas y nanomateriales que permita obtener una superficie biocompatible recubierta de manera estable, suficiente y homogénea, evitando la inactivación de la proteína o su desnaturalización y manteniendo su funcionalidad y especificidad de unión a su diana o receptor. Esto posibilitaría la aplicación clínica exitosa de dichos nanomateriales.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

En la presente invención se describe un método de recubrimiento proteico de materiales, preferiblemente nanomateriales, más preferiblemente nanopartículas, mediante bioconjugación electrostática entre el material y un complejo proteico que comprende una proteína ligando capaz de interaccionar con su sustrato o con un receptor celular en las células diana de interés. Dicho método permite generar una cobertura proteica biocompatible dispuesta de manera homogénea sobre la superficie del material. La bioconjugación está mediada, en la presente invención, por cargas electrostáticas opuestas entre la superficie del material y el complejo proteico, generando un recubrimiento de la totalidad de la superficie del material. Esto permite mantener la viabilidad del material en condiciones *in vivo*, evitando a su vez la desnaturalización y desorientación de las proteínas conjugadas, y por tanto manteniendo su funcionalidad y especificidad por su receptor/sustrato.

El método propuesto en la presente invención conduce a una correcta orientación de la proteína ligando en la superficie del material, exhibiendo su dominio de interacción con la diana correctamente posicionado. Así, se ha desarrollado una estrategia de bioconjugación electrostática de proteínas con materiales que permite posicionar las proteínas de una manera estable y funcional sobre la superficie del material. Para ello, se ha de diseñar un sistema que comprenda al menos tres unidades: (i) un material cuya superficie se encuentre cargada electrostáticamente, con un potencial ζ , (ii) una cola aminoacídica que comprende, en al menos uno de sus extremos, aminoácidos con cargas opuestas a las del material y que interacciona electrostáticamente con el mismo, y (iii) una proteína ligando unida al otro extremo de la cola aminoacídica y que es capaz de unirse, *in vitro* o *in vivo*, a su sustrato o a un receptor presente en las células diana.

En los ejemplos mostrados más adelante, y sin que sirva de limitación, los inventores han funcionalizado electrostáticamente partículas de sílice en una solución acuosa o tampón que genera un potencial ζ en su superficie, y han sintetizado un complejo proteico que comprende una proteína ligando fusionada por uno de sus extremos a una cola aminoacídica que comprende aminoácidos polares con carga opuesta a la de las partículas. Esta cola aminoacídica cargada se une electrostáticamente a la superficie del material, obteniendo como resultado un recubrimiento completo del material que además permite mantener la funcionalidad de la proteína ligando por encontrarse ésta orientada adecuadamente con su dominio de interacción con la diana expuesto hacia el exterior.

En dichos ejemplos se ha elegido, pero sin que sirva de limitación, como cola aminoacídica una cola catiónica de poli-histidina (6xHis), y como proteína ligando la proteína verde fluorescente (GFP), un fragmento de la toxina Shiga (ShTxB) o un
5 fragmento de la neurotoxina botulínica (BTX-C). La histidina es un aminoácido básico que podría combinarse o sustituirse en la cola aminoacídica por cualquier otro aminoácido positivo, tal como la lisina o la arginina. Por su parte, la GFP emite fluorescencia verde brillante cuando se excita con luz azul, pero pierde la fluorescencia tras su desnaturalización. En estas construcciones, GFP, ShTxB o BTX-C pueden ser
10 sustituidas por cualquier otra proteína ligando, o fragmento de la misma de unión al sustrato o receptor celular de interés.

La posición de la proteína ligando en la superficie del material está determinada por su fusión a la cola aminoacídica. De esta manera, para que la proteína ligando quede
15 correctamente orientada en superficie, es necesario que ésta se una a la cola aminoacídica por el extremo opuesto a su dominio de interacción con el sustrato/receptor diana. La cola aminoacídica crea una cremallera molecular electrostática con la superficie del material, asegurando el correcto posicionamiento de la proteína a conjugar.

20 Por tanto, las principales ventajas del método descrito en la presente invención son que permite un posicionamiento controlado de la proteína ligando en la superficie del material, lo que posibilita su interacción con el sustrato/receptor de las células diana. Además, se consigue un recubrimiento completo de la superficie del material con dicha proteína. Por el contrario, otros métodos solo consiguen un recubrimiento parcial de la
25 superficie, lo que provoca que se peguen otras proteínas que redirigen el sistema hacia células no deseadas, es decir, otros sistemas de recubrimiento se contaminan con proteínas que redirigen al material hacia dianas no deseadas. En el material recubierto generado mediante el método de la invención no se pegan proteínas que interaccionen con otros receptores que lleven a la inespecificidad de interacción con células no diana.
30 Así, el sistema generado en la presente invención es estable y se dirige adecuadamente a la diana deseada, ya que la proteína de unión o proteína ligando se encuentra correctamente posicionada en la superficie del material exponiendo su dominio de interacción con el sustrato/receptor hacia fuera.

Otra de las ventajas del método propuesto es que la reacción de bioconjugación entre

el material y el complejo proteico dura tan solo unos pocos segundos, por lo que se trata de un proceso sencillo y rápido. Además, la bioconjugación generada en la presente invención resiste a condiciones fisiológicas de temperatura, sal y presencia de proteínas, por lo que es idónea para ser utilizada en clínica. Esta estabilidad es debida a las uniones electrostáticas que se generan entre el extremo de la cola aminoacídica comprendida en el complejo proteico y la superficie del material.

Este método permite el recubrimiento de cualquier tipo de material con un único condicionante: que la superficie del material presente cargas electrostáticas claramente positivas o negativas que permitan que se una de forma electrostática el extremo carboxílico o amino de la cola aminoacídica comprendida en el complejo proteico y que presenta cargas opuestas. La carga electrostática de la superficie del material puede estar presente en dicho material de manera natural o bien se puede provocar de forma dirigida o artificial, por ejemplo, incubando el material con polielectrolitos cargados, como se explicará posteriormente. En ese caso, la última capa de polielectrolito debe presentar una carga opuesta al extremo cargado de la cola aminoacídica comprendida en el complejo proteico con el que se pretende recubrir la superficie.

Como ya se ha mencionado, la cola aminoacídica se puede generar incluyendo (adicionando) aminoácidos positivos (por ejemplo, His, Arg y/o Lys) o negativos (por ejemplo, Glu y/o Asp). Aumentando o disminuyendo la afinidad que tienen estos aminoácidos por la superficie cargada del material, se puede modular esta unión de acuerdo con las condiciones ambientales en las que se encuentre o vaya a ser utilizado el material.

En resumen, el método de la invención permite obtener un material con una cobertura proteica muy estable, homogénea y biodegradable, constituida por proteína/s ligando funcional/es y perfectamente orientada/s. Esta estructura puede emplearse, por ejemplo, pero sin limitarnos, como un sistema o cápsula proteica para la liberación dirigida y, opcionalmente sostenida, de fármacos (mediada por receptores celulares específicos), es decir, para terapias dirigidas, o bien para el diseño de sistemas de detección, diagnóstico, seguimiento o monitorización por imagen tanto *in vitro* como *in vivo*.

Por tanto, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método, también llamado "método de la invención", para el recubrimiento proteico de un material que

comprende las siguientes etapas:

- 5 i) seleccionar un material cuya superficie se encuentre cargada electrostáticamente con cargas positivas o negativas o funcionalizar la superficie de un material con cargas positivas o negativas, preferiblemente generando un potencial ζ por debajo de -30 mV o por encima de +30 mV (o valores más extremos),
- 10 ii) sintetizar un complejo proteico mediante la fusión génica de una cola aminoacídica con al menos una proteína ligando, donde al menos un extremo de la cola aminoacídica, preferiblemente el extremo opuesto al de unión con la proteína ligando, comprende aminoácidos con una carga electrostática opuesta a la carga de la superficie del material de la etapa (i), y
- iii) bioconjuguar, mediante uniones electrostáticas, la superficie del material obtenida en la etapa (i) con la cola aminoacídica comprendida en el complejo proteico sintetizado en la etapa (ii).

15 En la presente invención se entiende por “recubrimiento proteico” o “revestimiento proteico” el acto de cubrir la superficie de un soporte, sustrato o material con proteínas, péptidos o polipéptidos para mejorar alguna/s propiedades o cualidades de dicha superficie por ejemplo, sin limitar, adhesión celular, estabilidad, solubilidad, transporte intracelular, transporte extracelular, endocitosis, o para funcionalizar la superficie y/o biocompatibilizarla con el medio, o para la identificación de patógenos, o para insertar

20 receptores específicos o proteínas o fragmentos proteicos de unión a los mismos, anclaje, protección frente a la fagocitosis, direccionamiento específico o bloqueo de receptores, entre otros, con el fin de ser empleados en, por ejemplo, terapia dirigida, diagnóstico o marcaje.

25 El método de recubrimiento proteico de la presente invención es aplicable a cualquier tipo de material, incluyendo nanomateriales. Por ello, en una realización preferida, el material es un nanomaterial, preferiblemente una nanopartícula.

30 Se entiende por “material” cualquier superficie de carga neutra (sin carga) que pueda ser funcionalizada, es decir, cargada artificialmente, con cargas positivas o negativas, así como cualquier superficie que comprenda cargas electrostáticas intrínsecas, es decir de manera natural, tales como superficies que comprenden sílice (SiO_2). Ejemplos de materiales que podrían ser empleados en el método de la invención son partículas,

preferiblemente esferas, de 10 a 500 nm, compuestas de SiO₂, más preferiblemente esferas huecas de 500 nm en las que el SiO₂ se haya empleado como molde y después se haya disuelto.

En la presente invención se entiende por “nanomateriales” materiales formados tanto de forma natural, como aquellos de origen biológico, o los generados de manera accidental o sintética, que comprenden partículas, sueltas o formando un agregado o aglomerado, y en los que al menos el 50% de dichas partículas, en la granulometría numérica, presenta una o más de las dimensiones externas en el intervalo de tamaños comprendido entre 1 a 100 nanómetros (nm).

Los nanomateriales formados de manera natural, son, a modo de ejemplo, las cenizas generadas por un volcán, o subproductos no intencionados de un proceso industrial. Los nanomateriales de origen biológico son, por ejemplo, microorganismos (tales como virus, o bacterias tipo micoplasma), nanovesículas (tipo exosomas o similares), liposomas o las organelas celulares (ej, mitocondrias). Los nanomateriales formados accidentalmente son, por ejemplo, los humos de soldadura o los productos de combustión. Los nanomateriales sintéticos o fabricados incluyen los nanomateriales manufacturados diseñados intencionadamente con unas propiedades específicas (mecánicas, eléctricas, ópticas y/o catalíticas), en muchos casos muy distintas a las que presenta el mismo material en un tamaño no nanométrico. Estos materiales sintéticos pueden ser orgánicos o inorgánicos. Ejemplos de nanomateriales orgánicos incluyen, sin limitar: fulerenos, grafeno, nanotubos de carbono, negro de humo o “carbono puro”, dendrímeros, nanocelulosa, liposomas, nanopolímeros, o nanocristales. Ejemplos de nanomateriales incluyen, sin limitar: metales (oro, cobre, plata, hierro, platino o paladio), óxidos o cerámicas (sílice, óxido de aluminio, dióxido de titanio, óxido de cerio, óxido de zinc, óxido de cobre o zeolitas), quantum dots o partículas de carbonato cálcico (CaCO₃).

Los nanomateriales, tal y como se entienden en la presente invención, pueden ser clasificados en nanopartículas, nanocapas, nanotubos, nanoagujas, nanoestrellas y nanocompuestos. Se entiende por “nanopartícula” una partícula microscópica con una de sus dimensiones menor o igual que 100 nm. Se entiende por “nanocompuesto” o “nanomaterial compuesto” un material compuesto o multifásico donde una de las fases tiene una, dos o tres dimensiones de menos de 100 nm o 100 nm. Se pueden incluir dentro de los nanocompuestos, sin limitarse: medios porosos, coloides, geles y

copolímeros, combinación de un sólido a granel que actúa como matriz y una fase (o más) nano-dimensional (un nanocompuesto) dispersada en la matriz. Las propiedades mecánicas, eléctricas, térmicas, ópticas, electroquímicas o catalíticas del nanomaterial compuesto se diferencian de la de los materiales componentes por separado. Se entiende por “nanotubos” en la presente invención, estructuras tubulares (cilíndricas), cuyo diámetro es del tamaño de entre 1 y 100 nm. Los nanotubos de carbono en concreto, son láminas de grafeno enrolladas en forma de tubo que tienen propiedades inusuales, y dependiendo del grado de enrollamiento y la manera como se conforma la lámina original el resultado puede llevar a nanotubos de distinto diámetro y geometría interna, que pueden ser nanotubos monocapa de pared simple o nanotubos concéntricos, entre otros. Se entiende por “nanocapas” revestimientos o recubrimientos con espesor en un tamaño a nanoescala entre 1 a 100nm.

Ejemplos de materiales cuya superficie se encuentra cargada electrostáticamente de forma intrínseca, o natural, con cargas positivas o negativas son, aunque sin limitarnos, materiales compuestos de SiO₂, partículas de poliestireno modificado con carboxilato, fulerenos, grafeno, nanotubos de carbono, carbono puro, dendrímeros, nanocelulosa, liposomas, nanopolímeros, nanocristales o nanopartículas de oro, cobre, plata, hierro, platino, paladio, sílice, óxido de aluminio, dióxido de titanio, óxido de cerio, óxido de zinc, óxido de cobre, zeolitas, *quantum dots*, partículas de carbonato cálcico (CaCO₃), esferas de poliestireno funcionalizadas, o cualquier combinación de los mismos.

En la presente invención, el término “funcionalizar la superficie” se refiere a la modificación o tratamiento de la superficie del material y/o modificación del medio o de la solución donde se encuentra dicho material, para obtener una superficie cargada electrostáticamente con cargas electrostáticas positivas o negativas, o con grupos reactivos en dicha superficie. En el método de la invención la funcionalización de la superficie del material comprende proporcionar una carga electrostática. La funcionalización electrostática de la superficie del material se puede obtener mediante cualquier técnica adecuada que permita obtener o estabilizar una superficie cargada electrostáticamente, positiva o negativamente. La técnica de funcionalización dependerá del tipo de material y puede llevarse a cabo mediante, por ejemplo, modificaciones en el pH de la solución, electrización por contacto, electrización por fricción, electrización por inducción, electrización mediante efecto fotoeléctrico, electrización por electrólisis y/o electrización mediante efector termoelectrónico.

Otro método para funcionalizar electrostáticamente la superficie de un material es la adición de polielectrolitos. En la presente invención, el término “polielectrolito” se refiere, químicamente, a cualquier polímero que posea grupos electrolitos, es decir, polímeros cuyas unidades de repetición soportan un grupo electrolito que se disocian en disoluciones acuosas quedando cargados electrostáticamente generando policationes o polianiones. Los polielectrolitos pueden ser tanto naturales como sintéticos. Los polielectrolitos cargados positivamente, policationes, se seleccionan preferiblemente de la lista que consiste en: polietilenimina, dextrano sulfato de sodio o clorhidrato de poli-L-arginina, poli-L-lisina, poli-D-lisina, cloruro de polidialildimetilamonio (PDDA) o (3-aminopropil)trimetoxisilano. Los polielectrolitos cargados negativamente, polianiones, se seleccionan preferiblemente de la lista que consiste en: poli (4-estirenosulfonato de sodio) (PSS), ácidos nucleicos, sulfonato de poliestireno, poliacrilamida, ácido poliacrílico y ácido polimetacrílico.

Preferiblemente, la superficie del material se funcionaliza con cargas electrostáticas negativas. Para ello la superficie se funcionaliza, preferiblemente, con polielectrolitos diluidos en una solución acuosa salina en agitación unas 3 h. El exceso se elimina, preferiblemente, mediante 3 ciclos de redispersión/centrifugación (7000 rpm, 20 min).

El término “potencial ζ ” se refiere a la unidad de medida de la magnitud de repulsión o atracción entre partículas en un sistema coloidal o suspensión coloidal, es decir, la intensidad del campo eléctrico superficial del material en un sistema físico-químico compuesto por dos fases: una continua, una solución fluida o líquida, y otra dispersa en forma de material en estado sólido. Para que haya atracción electrostática, el potencial ζ deberá estar comprendido en el rango de entre +30 mV y -30 mV (o voltajes más extremos).

En una realización más preferida, la funcionalización de la superficie del material se realiza mediante el cambio del pH de la solución en la que se encuentra.

En una segunda etapa, el método de la invención comprende sintetizar un complejo proteico mediante la fusión de una cola aminoacídica con al menos una proteína ligando, donde al menos un extremo de la cola aminoacídica (el opuesto al extremo de interacción con la proteína ligando) comprende aminoácidos con una carga electrostática opuesta a la carga de la superficie del material de la etapa (i).

El término “complejo proteico” tal como se usa en el presente documento, se refiere a

un sistema diseñado artificialmente que comprende: (i) una cadena o cola aminoacídica como se describe en la presente invención que a su vez comprende, fusionada a uno de sus extremos, (ii) al menos una proteína ligando o fragmento de unión a sustrato o a receptor de la misma.

- 5 El complejo proteico de la invención se puede obtener mediante cualquier técnica de ingeniería genética adecuada que permita obtener diferentes péptidos fusionados en una sola cadena de polipéptido. Dichas técnicas incluyen técnicas recombinantes, donde se introduce una construcción génica, que comprende los genes que codifican el complejo proteico de interés, en un vector de expresión para la producción del complejo
- 10 en un sistema de expresión adecuado, por ejemplo, una célula procariota o eucariota, y técnicas de ligación de proteínas que involucran la formación de un enlace peptídico entre dos polipéptidos, como la ligación química nativa o ligación de proteínas expresadas.

- 15 Este complejo proteico comprende una cola aminoacídica, en la que al menos uno de sus extremos comprende residuos con carga eléctrica opuesta a la carga eléctrica de la superficie del material, y una proteína ligando, o fragmento de unión a sustrato o a receptor de la misma, fusionada al otro extremo de la cola aminoacídica.

Preferiblemente, al menos uno de los extremos de la cola aminoacídica comprende residuos con carga eléctrica positiva.

- 20 El término "cola aminoacídica", como es usado en el presente documento, se refiere a una cadena peptídica formada por la unión, en un orden definido, de alfa-aminoácidos mediante un enlace peptídico. Los términos "aminoácidos", "enlace peptídico", "péptido" y "polipéptido" son conocidos por los expertos en la materia. Esta cola aminoacídica comprende, en al menos uno de sus extremos, aminoácidos con carga eléctrica, positiva
- 25 o negativa, y que, además, es opuesta a la carga eléctrica de la superficie del material. La cola aminoacídica del complejo proteico comprende la carga electrostática de dicho complejo proteico, debido a que está compuesta por al menos un 80% de aminoácidos polares cuya cadena lateral a pH fisiológico está cargada. Más preferiblemente, esta cola aminoacídica del complejo proteico está compuesta por un 81, 82, 83, 84, 85, 86,
- 30 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 % de aminoácidos polares con carga. Aún más preferiblemente, la cola aminoacídica está compuesta por un 100% de aminoácidos polares con carga. Estos aminoácidos se seleccionan preferiblemente de

la lista que consiste en: histidina, arginina, lisina, ácido glutámico y ácido aspártico.

Los aminoácidos comprendidos en la cola aminoacídica pueden ser iguales o diferentes entre sí. Preferiblemente, son iguales.

La cola aminoacídica tiene, preferiblemente, una longitud de entre 1 y 50 aminoácidos, más preferiblemente de entre 1-30 aminoácidos, aún más preferiblemente de entre 1 y 20 aminoácidos y aún más preferiblemente de entre 1 y 15 aminoácidos. En una realización aún más preferida, la cola aminoacídica comprende entre 6 y 12 aminoácidos. En una realización particular, la cola aminoacídica comprende 6 o 12 aminoácidos.

El complejo proteico de la presente invención, además, comprende una proteína ligando o fragmento de unión a sustrato o a receptor de una proteína ligando.

En la presente invención, el término "proteína ligando" o "proteína funcional" se refiere a receptores de interacción con proteínas celulares o víricas, así como a proteínas que comprenden un dominio catalítico (por ejemplo, enzimas) o un dominio de unión a un receptor celular, preferiblemente a un receptor de superficie celular, más preferiblemente donde dicho receptor se encuentra en células nerviosas, tales como neuronas, o células tumorales, tales como células cancerosas. Preferiblemente, la proteína ligando se une a receptores implicados en procesos químicos, metabólicos o enzimáticos, estructurales, inmunológicos, de señalización, de toxicidad, de almacenamiento de energía y/o homeostáticos, generalmente, y preferiblemente, donde dichos receptores se encuentran anclados a la membrana celular y por tanto se unen a la proteína ligando por la parte exterior de la célula sin comprometer la viabilidad de ésta. Por ejemplo, y sin limitarse, la proteína ligando a la que se refiere la presente invención se une a receptores o moléculas tales como receptores acoplados a proteína G (GPCR), receptores tirosina quinasa (RTK) que se unen a factores de crecimiento como el factor de crecimiento derivado de plaquetas: PDGF, el factor de crecimiento transformante beta: TGF-beta, BMPs (proteínas morfogenéticas del hueso), factores de crecimiento de los fibroblastos: FGF y KGF, el factor de crecimiento epidérmico: EGF y relacionados TGF-alfa, el factor de crecimiento de hepatocitos: HGF, el factor de crecimiento endotelial vascular: VEGF, el factor de crecimiento insulínico tipo 1: IGF-1, el factor de crecimiento nervioso: NGF, el factor estimulante de colonias de granulocitos: G-CSF, el factor estimulante de colonias de granulocito y macrófagos: GM-CSF, la

eritropoyetina: EPO, la trombopoyetina: TPO, o el factor de células madre: SCF. En esta categoría también se considerarán los receptores de cualquier tipo de proteínas de interacción celular incluidos los receptores neuronales como los receptores de glutamato ionotrópicos, que se clasifican en cuatro familias: AMPA, Kainato, Delta y NMDA, constituidas por varias subunidades. También se incluyen los receptores de glutamato metabotrópicos de los grupos I, II y III.

Se incluyen también dentro del alcance de la presente invención las proteínas ligando que se unen a aquellas moléculas de la superficie celular que, sin ser proteínas, puedan servir de anclaje y reconocimiento de éstas como son, por ejemplo, los denominados CDXX, siendo "XX" un número identificativo, por ejemplo, CD77, un glicolípido neutro (globotriaosilceramida; Gb3). Alternativamente, pueden ser proteínas que intervienen en procesos inmunológicos, tales como inmunoglobulinas o anticuerpos (o fragmentos de éstos), citoquinas y proteínas del complemento.

En una tercera etapa, el método de la invención comprende bioconjugar, mediante uniones electrostáticas, la superficie del material obtenida en la etapa (i) con la cola aminoacídica comprendida en el complejo proteico sintetizado en la etapa (ii).

En la presente invención el término "bioconjugación" se refiere al proceso de obtención de un conjugado proteico entre la superficie del material y el complejo proteico mediante enlace electrovalente (interacción electrostática), es decir, el resultado de la presencia de atracción electrostática entre iones de distinto signo, uno electropositivo y otro electronegativo. En la presente invención, la superficie del material y la cola aminoacídica del complejo proteico comprenden cargas electrostáticas opuestas que establecen el enlace electrostático de la bioconjugación. La cola aminoacídica del complejo proteico comprende aminoácidos polares con carga, generando una zona, en el complejo proteico, con alta densidad de carga electrostática, positiva o negativa, y opuesta a la de la superficie del material.

Esta cola aminoacídica dirige y orienta la unión del complejo proteico en la superficie del material, generando una cobertura proteica estable en la que el dominio de unión a sustrato o a receptor o el dominio catalítico de la proteína ligando se expone hacia el exterior quedando la cola aminoacídica hacia el interior y unida a la superficie del material. Se mantiene así la funcionalidad de la proteína ligando, evitando su desnaturalización o su inactivación, y se consigue un recubrimiento homogéneo del

material de, preferiblemente, al menos un 90%, evitando uniones inespecíficas del material con otras proteínas o receptores.

En una realización preferida, la etapa de bioconjugación además comprende un paso de sonicación.

- 5 En el presente documento, el término “sonicación” se refiere a la aplicación de energía de ultrasonidos para agitar, desaglomerar, emulsionar, funcionalizar, activar y dispersar uniformemente las partículas del material en medio líquido. Mediante corriente eléctrica se transmite energía, que se convierte en vibraciones de alta intensidad, que generan ondas de ultrasonido. Los ultrasonidos generan, a su vez, vibraciones en la solución
- 10 generando millones de burbujas microscópicas, las cuales sufren rapidísimos procesos de expansión dispersando uniformemente las partículas. Preferiblemente, en la presente invención, la sonicación se realiza en 3 pulsos de 2 segundos mediante sonicación en punta o en baño de ultrasonidos. Alternativamente, los materiales pueden incubarse durante 1 hora en rotación (60 rpm) o en vórtex 5 minutos.
- 15 En otra realización preferida la cola aminoacídica del complejo proteico está fusionada o unida a la proteína ligando por el extremo amino terminal o por el extremo carboxilo terminal de dicha proteína. La cola aminoacídica se fusiona al extremo opuesto a donde se encuentra el dominio de unión o dominio catalítico de la proteína ligando.

- En otra realización preferida, un extremo de la cola aminoacídica, el opuesto al de fusión con la proteína ligando, comprende aminoácidos con una carga electrostática positiva y la superficie del material comprende cargas electrostáticas negativas al pH de uso, es decir, a pH fisiológico (pH de aproximadamente 7, preferiblemente 7.4). Más preferiblemente, en esta realización, el extremo de la cola aminoacídica comprende aminoácidos con una carga electrostática positiva seleccionados de la lista que consiste
- 20 en: histidina, arginina y lisina, aún más preferiblemente histidina. Así, en esta realización preferida, la cola aminoacídica comprende aminoácidos polares y básicos, es decir, aminoácidos en los que el radical es un grupo básico o amino, de tal modo que, a pH neutro, tienen carga eléctrica positiva. En la realización más preferida, el extremo de la cola aminoacídica comprende al menos 6 residuos de histidina consecutivos, más
- 25 preferiblemente la cola aminoacídica de la invención consiste en 6 residuos de histidina consecutivos.
- 30

En otra realización preferida, un extremo de la cola aminoacídica, el opuesto al de fusión

- con la proteína ligando, comprende aminoácidos con una carga electrostática negativa y la superficie del material comprende cargas electrostáticas positivas al pH de uso, es decir, a pH fisiológico (pH de aproximadamente 7, preferiblemente 7.4). Más preferiblemente, en esta realización, el extremo de la cola aminoacídica comprende
- 5 aminoácidos con una carga electrostática negativa seleccionados de la lista que consiste en: ácido glutámico y ácido aspártico. Así, en esta realización, la cola aminoacídica comprende aminoácidos polares y ácidos, es decir, aminoácidos en los que el radical es un grupo ácido o carboxilo, de tal modo que, a pH neutro, tienen carga eléctrica negativa.
- 10 El sistema generado mediante el método de la invención, comprendiendo el material recubierto con el complejo proteico, puede ser opcionalmente estabilizado estructuralmente empleando fijadores o estabilizadores clásicos, como por ejemplo los aldehídos (preferiblemente glutaraldehído o paraformaldehído). Así, en otra realización preferida, el método de la invención además comprende una etapa (iv) en la que se
- 15 adiciona un estabilizador. En la presente invención, el término “estabilizador” o “fijador” se refiere a compuestos capaces de conservar y fijar el estado morfológico y químico de los materiales bioconjugados con una cobertura proteica, preservar las características de las moléculas que la componen y mantener intacta su ultraestructura. La fijación se puede realizar mediante métodos físicos, por ejemplo mediante calor, o bien mediante
- 20 compuestos químicos preferiblemente seleccionados de la lista que consiste en: paraformaldehído, glutaraldehído, acroleína, glioxal, cloruro de mercurio, acetato mercúrico, tetróxido de osmio, permanganato potásico, dicromato potásico, ácido pícrico, ácido acético, alcohol metílico, alcohol etílico, alcohol isopropílico, glicerina, formalina, saponina o cualquiera de sus combinaciones. Preferiblemente, el
- 25 estabilizador es glutaraldehído o paraformaldehído.

En otra realización preferida, el material al que se refiere la presente invención es, o está compuesto de, partículas de sílice (SiO_2), partículas de poliestireno modificado con grupos carboxilato, fulerenos, grafeno, nanotubos de carbono (dispersos o como parte de estructuras), carbono puro, dendrímeros, nanocelulosa, liposomas, nanopolímeros,

30 nanocristales o nanopartículas de oro, cobre, plata, hierro, platino, paladio, sílice, óxido de aluminio, dióxido de titanio, óxido de cerio, óxido de zinc, óxido de cobre, zeolitas, *quantum dots*, partículas de carbonato cálcico (CaCO_3), así como cualquier nanoestructura susceptible de ser recubierta con polielectrolitos para alcanzar el potencial indicado, o cualquier combinación de los mismos.

En una realización más preferida el material está compuesto de sílice. Más preferiblemente, el material es una esfera de sílice, aún más preferiblemente una esfera hueca donde la sílice ha sido disuelta.

5 El núcleo interior de la cápsula o esfera de sílice se puede disolver o degradar, una vez se ha bioconjugado con el complejo proteico, para generar una cápsula nanométrica hueca formada solo por el recubrimiento con el complejo proteico. Esto se puede realizar, mediante, por ejemplo, pero sin limitarnos, la incubación con soluciones salinas fisiológicas a pH neutro para que la sílice se disuelva progresivamente, resultando de la incubación y disolución de la sílice una cápsula de proteína no desnaturalizada y con
10 las moléculas de proteína ligando dispuestas en una orientación adecuada para realizar su función, a modo de cápsula o cubierta, tal como una cubierta vírica. Las ventajas de esta realización, es decir, de disolver el núcleo de sílice para obtener una cápsula hueca recubierta con el complejo proteico, es que el sistema final así obtenido es totalmente biodegradable y biocompatible al no contener materiales inorgánicos, por lo que es de
15 especial interés para su aplicación en medicina.

La disolución del núcleo de la partícula se puede aplicar también a otros nanomateriales, como los compuestos de carbonato cálcico (CaCO_3), liposomas, así como cualquier nanoestructura susceptible de desintegrarse o disolverse en cualquier buffer o disolvente. La disolución de los núcleos podría también realizarse a partir de materiales
20 multiestructurados (multicapa) compuestos por varios elementos de los cuales, tras su disolución, quedaría parte de su composición (por ejemplo, nanopartículas magnéticas o de oro) en el interior de la cápsula después de la disolución de la capa de sílice, liposoma o partícula.

En otra realización preferida, la proteína ligando del complejo proteico se selecciona de
25 la lista que consiste en: GFP (*Green Fluorescent Protein*), toxina Shiga (preferiblemente su dominio de interacción), neurotoxina botulínica (preferiblemente su dominio de interacción), toxina tetánica (preferiblemente su dominio de interacción) o cualquier otra toxina proteica, neuropéptidos de diferente naturaleza fusionados o no a la GFP u a otra proteína marcadora, proteínas de las cubiertas víricas o fragmentos (péptidos, dominios
30 o cadenas) de éstas, como por ejemplo péptidos de la proteína G del virus de la rabia. Más preferiblemente, la proteína ligando es GFP, toxina Shiga o neurotoxina botulínica, aún más preferiblemente neurotoxina botulínica.

En una realización más preferida, la neurotoxina botulínica comprende, preferiblemente consiste en, la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1.

La “neurotoxina botulínica” es una neurotoxina elaborada por la bacteria *Clostridium botulinum*. Esta toxina produce intoxicación y envenenamiento produciendo el botulismo, enfermedad caracterizada por parálisis muscular progresiva hasta ser causa de muerte por afectar a la función respiratoria. La toxina botulínica es una proteína que está compuesta por una cadena pesada y una ligera, unidas por un puente disulfuro. El efecto farmacológico de la toxina botulínica tiene lugar a nivel de la unión neuromuscular. En la región de transición entre el nervio periférico y el músculo se produce la liberación de acetilcolina, un neurotransmisor necesario para producir la contracción muscular. La toxina botulínica actúa de forma local mediante el bloqueo de esta liberación de acetilcolina, lo que se traduce en parálisis muscular temporal. El efecto final es una denervación química temporal en la unión neuromuscular sin producir ninguna lesión física en las estructuras nerviosas.

La cadena pesada de la toxina botulínica está compuesta por 3 regiones (A, B, C). En la presente invención, se emplea preferiblemente un fragmento de la cadena pesada de dicha toxina consistente en la SEQ ID NO: 1 (BTX-C), el cual corresponde al dominio de interacción de dicha toxina con su molécula diana. Dicha SEQ ID NO: 1 está codificada, preferiblemente, por la SEQ ID NO: 2.

Preferiblemente, la toxina Shiga a la que se refiere la presente invención comprende, más preferiblemente consiste en, la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 3 (ShTxB), la cual corresponde al dominio de interacción de dicha toxina con su molécula diana.

En otra realización preferida, el complejo proteico comprende la cola aminoacídica, preferiblemente una cola aminoacídica que comprende 6 histidinas, más preferiblemente que consiste en 6 histidinas, fusionada a al menos dos proteínas ligando, donde una de las proteínas ligando es GFP y la otra es la neurotoxina botulínica.

Otro aspecto de la presente invención es un material, preferiblemente nanomaterial, más preferiblemente nanopartícula o esfera, aún más preferiblemente esfera hueca, recubierto con un complejo proteico, obtenido por el método de la invención, donde el complejo proteico comprende: (i) una cola aminoacídica en la que uno de sus extremos, preferiblemente el opuesto al extremo de unión con la proteína ligando, comprende al menos 6 histidinas, (ii) fusionada por el otro extremo a una proteína ligando

seleccionada de entre la neurotoxina botulínica o la toxina Shiga.

Los términos “nanomaterial”, “complejo proteico”, “cola aminoacídica”, “proteína ligando”, “toxina Shiga” y “neurotoxina botulínica” han sido anteriormente descritos y explicados en el anterior aspecto de la invención y son aplicables al producto de la
5 invención (material descrito en el párrafo anterior).

En una realización particular, la neurotoxina botulínica del material comprende, preferiblemente consiste en, la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1. En otra realización particular, la toxina Shiga del material comprende, preferiblemente consiste en, la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 3.

10 En otra realización preferida, el complejo proteico del material comprende una cola aminoacídica que consiste en 6 histidinas fusionada a la neurotoxina botulínica.

En otra realización preferida, el complejo proteico del material comprende, preferiblemente consiste en, una cola aminoacídica que consiste en 6 histidinas fusionada a la toxina Shiga, preferiblemente donde dicho complejo proteico comprende,
15 más preferiblemente consiste en, la SEQ ID NO: 4 (ShTxB:6xHis).

En otra realización preferida, la proteína ligando del material es una proteína de fusión que comprende la neurotoxina botulínica o la toxina Shiga fusionada por uno de sus extremos a la proteína GFP.

En una realización particular, el complejo proteico del material comprende una cola
20 aminoacídica que consiste en 6 histidinas fusionada a una proteína de fusión que comprende la neurotoxina botulínica fusionada por uno de sus extremos a la proteína GFP, donde preferiblemente dicho complejo proteico comprende, más preferiblemente consiste en, la SEQ ID NO: 5 (6xHis:GFP:BTX-C).

En otra realización preferida, la proteína ligando además comprende acoplado un
25 fármaco, más preferiblemente un fármaco antitumoral o para el tratamiento de trastornos o enfermedades del sistema nervioso, o un colorante, compuesto marcador, agente fluorescente o luminiscente o similares o un agente reparador tal como una proteína reparadora.

En otra realización preferida, el material además comprende un fármaco encapsulado

en su interior, más preferiblemente un fármaco antitumoral o para el tratamiento de trastornos o enfermedades del sistema nervioso. El material podría ser así empleado como un sistema de encapsulación de fármacos.

En la presente invención el término “fármaco” o “composición farmacéutica” se refiere a una sustancia, compuesto o principio activo, incluyendo compuestos químicos tales como antibióticos, y fármacos de naturaleza biológica tales como ADN, ARN, preferiblemente ARNs de interferencia, anticuerpos, proteínas o péptidos o similares, que ocasionan un cambio en la acción biológica del organismo, a través de sus acciones químicas, metabólicas o inmunológicas, modificando la actividad celular y que se utiliza con fines terapéuticos, diagnósticos o preventivos. Dicho fármaco se fusiona al complejo proteico del recubrimiento del material o bien se introduce en el interior del material recubierto con el complejo proteico formando así un sistema de encapsulación.

En la presente invención, el término “sistema de encapsulación” se refiere a un sistema mediante el cual un fármaco o una composición farmacéutica es encapsulado o envuelto en el interior del material de la invención, preferiblemente cuando dicho material es una esfera o cápsula, más preferiblemente una cápsula hueca o porosa (mesoporosa).

En otra realización preferida, el material es, o está compuesto de, partículas de sílice (SiO_2), partículas de poliestireno modificado con carboxilato, fulerenos, grafeno, nanotubos de carbono (dispersos o como parte de estructuras), carbono puro, dendrímeros, nanocelulosa, liposomas, nanopolímeros, nanocristales o nanopartículas de oro, cobre, plata, hierro, platino, paladio, sílice, óxido de aluminio, dióxido de titanio, óxido de cerio, óxido de zinc, óxido de cobre, zeolitas, *quantum dots*, partículas de carbonato cálcico (CaCO_3) o cualquier combinación de los mismos. Más preferiblemente, el material está compuesto de sílice, aún más preferiblemente es una esfera de sílice mesoporosa, en una realización particular es una esfera hueca donde la sílice ha sido disuelta.

En una realización particular, el material es una esfera o cápsula hueca donde la sílice ha sido disuelta y comprende un fármaco encapsulado en su interior. Preferiblemente, dicho fármaco es empleado en terapia biológica.

La neurotoxina botulínica, preferiblemente la SEQ ID NO: 1, presenta especificidad de unión por las terminaciones y los axones neuronales y la toxina Shiga, preferiblemente la SEQ ID NO: 3, presenta especificidad de unión por el receptor CD77 presente en

células de carcinoma metastásico humano entre otros. Por ello, otro aspecto de la presente invención es el uso *in vivo* o *in vitro*, preferiblemente *in vitro*, del material para el marcaje celular, preferiblemente de neuronas (cuando la proteína ligando comprende la neurotoxina botulínica) o de células tumorales (cuando la proteína ligando comprende la toxina Shiga).

El uso *in vitro* se refiere al uso en un cultivo celular o en una muestra biológica aislada, es decir, se refiere al uso fuera del cuerpo humano o animal.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso del material para el diagnóstico, *in vivo* o *in vitro* (a partir de una muestra biológica aislada), preferiblemente de tumores, más preferiblemente de cáncer, aún más preferiblemente de carcinoma metastásico (cuando la proteína ligando comprende la toxina Shiga, preferiblemente la SEQ ID NO: 3), o de trastornos o enfermedades relacionadas con el sistema nervioso (cuando la proteína ligando comprende la neurotoxina botulínica, preferiblemente la SEQ ID NO: 1).

Otro aspecto de la invención es el uso del material como implante o para la elaboración de un medicamento. Preferiblemente, dicho medicamento es para el tratamiento de lesiones, enfermedades o trastornos del sistema nervioso o para el tratamiento de tumores, preferiblemente cáncer, más preferiblemente carcinoma metastásico.

En la presente invención, el término “medicamento” se refiere a uno o más fármacos integrados en una composición farmacéutica, para su uso industrial o clínico, y destinado para su utilización en humanos o animales, cuyo fin farmacológico es el de prevenir, aliviar, curar, mejorar o reestablecer el estado de salud de las personas enfermas o para modificar estados fisiológicos.

En una realización particular, el medicamento es un medicamento de liberación sostenida de fármacos.

En la presente invención, la expresión “medicamento de liberación sostenida de fármacos” se refiere a la administración y dosificación controlada, específica y dirigida de uno o varios fármacos que permite liberar dicho/s fármaco/s en la localización específica pretendida durante preferiblemente un periodo de tiempo determinado, para prolongar el efecto terapéutico o bien, disminuir los picos de concentración.

En otra realización particular, el medicamento es un medicamento empleado en terapia

biológica, es decir, el medicamento comprende ADN, ARN, proteínas, péptidos, anticuerpos, o similares, con funcionalidad terapéutica o preventiva.

En la presente invención, los términos "tratamiento biológico" o "terapia biológica", usados indistintamente, hacen referencia a terapias o tratamientos que comprenden la administración de organismos vivos o partes de los mismos, sustancias procedentes de organismos vivos o versiones de dichas sustancias producidas en el laboratorio para tratar enfermedades como, por ejemplo, enfermedades de origen autoinmune, cáncer o infecciones.

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

15 DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIGURA 1: Producción y purificación de proteínas recombinantes. **(a)** Imagen de microscopía confocal de bacterias que sobreexpresan 6xHis:GFP. **(b)** Análisis SDS-PAGE de la sobreexpresión de proteína recombinante 6xHis:GFP (flecha) después de 0, 2 y 4 horas de la inducción. **(c)** Análisis SDS-PAGE del extracto total de bacterias (0), el flujo de la columna (F), y el constructo 6xHis:GFP purificado (flecha).

FIGURA 2: **(a)** Describe un modelo teórico del constructo proteico 6xHis:GFP en un vector de expresión bacteriano. **(b), (c), (d)** Representa la bioconjugación en la superficie del material. **(e)** Imagen de microscopía confocal de partículas de SiO₂ incubadas con 6xHis:GFP purificado donde se muestra un halo de fluorescencia en la superficie de las partículas que es indicativo de un recubrimiento de la superficie de las partículas con 6xHis:GFP.

FIGURA 3: Eliminación enzimática de la cola de Histidinas. 6xHis:GFP fue tratado con tripsina al 0.025% en PBS durante 0, 2 minutos, 30 minutos, 24 horas, 42 horas para eliminar la cola 6xHis de N-terminal. La eliminación completa de 6xHis se observó a los 30 minutos después de la incubación. No se detectó degradación de proteínas y digestión adicional a las 42 h de exposición a la enzima.

FIGURA 4: Describe el acoplamiento entre 6xHis:GFP y la superficie del material mediante la cola de Histidinas. **(a)** Diagrama de la eliminación de la cola de Histidinas. **(b)** Partículas de SiO₂ con 6xHis:GFP y con GFP digerido con tripsina (sin cola de histidinas). No se observa fluorescencia cuando las partículas se incuban con el GFP digerido con tripsina y sin cola de Histidinas, mientras que sí se observa fluorescencia con 6xHis:GFP. **(c)** Análisis semicuantitativo de proteínas por electroforesis SDS-PAGE. En las calles 1 y 2 se muestran los controles 6xHis:GFP y la GFP sin incubar con partículas SiO₂. Las calles 3 y 5 muestran el exceso de proteínas 6xHis:GFP y de GFP en las incubaciones con SiO₂. Las calles 4 y 6 muestran la 6xHis:GFP y GFP unidas a las partículas de SiO₂ después de la incubación, respectivamente. En la calle 4 se detecta presencia de partículas bioconjugadas con 6xHis:GFP, sin embargo, en la calle 6 no se detectan partículas bioconjugadas con GFP.

FIGURA 5: 6xHis:GFP no se une a partículas recubiertas con un polielectrolito positivo (PDDA). Se muestran imágenes de contraste de fase y de fluorescencia de partículas de SiO₂ no recubiertas (izquierda) o recubiertas con PDDA (derecha). La unión del complejo proteico 6xHis:GFP a las partículas recubiertas con PDDA es insignificante, la fluorescencia corresponde a los agregados de la proteína no ligada (abajo, derecha).

FIGURA 6: Análisis termogravimétrico de partículas de SiO₂, partículas de SiO₂ conjugadas con suero y partículas bioconjugadas con 6xHis:GFP.

FIGURA 7: El complejo proteico 6xHis:GFP se une selectivamente a las partículas de SiO₂ en incubación con proteínas séricas en condiciones fisiológicas. **(a)** **(b)** Diseño teórico y experimental. **(c)** Mediante electroforesis SDS-PAGE se analizaron tanto la proteína 6xHis:GFP como GFP (6xHis:GFP digerido con tripsina) unida a las partículas de SiO₂, como el exceso de proteínas de la incubación con suero proteico. En la calle 2 se muestra que el complejo proteico 6xHis:GFP se une a las partículas en presencia de suero proteico en condiciones fisiológicas. **(d)** Las proteínas en solución (no unidas a partículas) se analizaron mediante espectroscopía de fluorescencia para ver el despegado de la GFP. Tanto la evidencia bioquímica como el análisis espectroscópico revelaron que 6xHis:GFP tenía especificidad de unión a las partículas de SiO₂ en comparación con el control negativo de GFP sin cola de histidina.

FIGURA 8: Control del recubrimiento en condiciones fisiológicas con suero a 37°C a pH 7,4. **(a)** Diagrama del diseño experimental (proteína/partícula) (las proporciones son

ilustrativas). **(b)** Representa una electroforesis SDS-PAGE cuantitativa/cualitativa del recubrimiento de proteína 6xHis:GFP en las partículas a tiempo 0, 1, 4, 24, 48 y 72 horas después de la exposición a las condiciones fisiológicas. **(c)** Cuantificación del porcentaje total de proteína 6xHis:GFP frente a la proteína total en la superficie de la partícula. **(d)** Imagen de microscopía confocal de células HeLa incubadas con partículas de SiO₂ recubiertas con 6xHis:GFP durante 2 h. La corteza celular se tiñe con TRITC-Faloidina y los núcleos con Hoechst. La mayoría de las partículas bioconjugadas 6xHis:GFP-SiO₂ son extracelulares y no han interactuado con las células (flechas). Por el contrario, **(e)** las células HeLa expuestas a FITC:FBS-SiO₂ han engullido las partículas.

FIGURA 9: Bioconjugación de 6xHis:GFP con diferentes partículas: partículas de poliestireno modificado con carboxilato, liposomas catiónicos y liposomas aniónicos. Partículas con un potencial ζ negativo, como las esferas de poliestireno modificadas con carboxilato, y los liposomas aniónicos fueron recubiertos de manera eficiente con 6xHis:GFP. Los liposomas catiónicos, para su funcionalización, fueron recubiertos con un polielectrolito negativo (poli (4-estirenosulfonato de sodio), PSS) para invertir su potencial antes de la incubación con el complejo 6xHis:GFP.

FIGURA 10: Diseño, purificación y ensamblaje de proteínas ShTxB:6xHis. **(a)** Diagrama teórico de la secuencia del constructo. SEQ ID NO: 4 corresponde al fragmento B de la toxina Shiga (ShTxB) empleado en el constructo (SEQ ID NO: 3) fusionado en su extremo C-terminal a la cola de 6xHis. **(b)** Expresión de ShTxB:6xHis en bacterias (calle 1), lavado de columna de purificación (calle 2), elución (calle 3) y proteína purificada utilizada para bioconjugación (calle 4). La calle 5 muestra la unión de ShTxB:6xHis a partículas de SiO₂. No se detecta ninguna proteína en el sobrenadante después de la bioconjugación con partículas de SiO₂. **(c)** Imágenes de microscopía confocal de partículas de SiO₂ incubadas con FITC:ShTxB:6xHis donde la fluorescencia en la superficie de las partículas es indicativa del recubrimiento de las partículas con las proteínas conjugadas con FITC.

FIGURA 11: Especificidad de la orientación de las partículas. **(a)** Estructura del complejo proteico con el dominio B de la toxina Shiga (ShTxB, de SEQ ID NO: 3) fusionado a la cola de Histidinas, modelo de recubrimiento y la imagen de microscopía confocal de las partículas recubiertas con FITC:ShTxB:6xHis. **(b)** Imagen de microscopía confocal de células Detroit 562 incubadas con las partículas de SiO₂ bioconjugadas durante 24 horas. Las células se inmunotñieron para el receptor CD77. Se muestra la colocalización

de todas las partículas en los receptores. El espectrograma correspondiente a la flecha incluida en el recuadro demuestra la colocación de ambas fluorescencias correspondientes al receptor CD77 y una sola partícula funcionalizada localizada dentro de la membrana endosomal que contiene el receptor CD77.

- 5 **FIGURA 12:** Partículas recubiertas de ShTxB:6xHis interactúan con los receptores CD77. Mediante contraste de fase y microscopia confocal se obtuvieron imágenes de cultivos de células incubadas con ShTxB:6xHis-SiO₂ y con partículas conjugadas con proteínas séricas acopladas a FITC. Las partículas recubiertas de suero aparecen extracelulares o se distribuyen aleatoriamente dentro de las células pero no se unen a
- 10 receptores CD77. Por el contrario, ShTxB:6xHis-SiO₂ se observan en los receptores CD77. Una célula en etapa de división, que no puede endocitar mientras tiene lugar la mitosis, muestra el receptor, pero no las partículas y sirve como control negativo.

- FIGURA 13:** Se funcionalizaron partículas con el complejo proteico 6xHis:GFP:BTX-C (SEQ ID NO: 5), donde BTX-C consiste en la SEQ ID NO: 1, que se incubaron con tejido
- 15 neuronal del nervio ciático. Se muestra en el zoom de la imagen de microscopía confocal una reconstrucción lateral del nervio donde se puede apreciar una partícula (flecha) dentro de éste y se muestra que los axones neuronales están marcados con la GFP, debido a que BTX-C del complejo proteico se une al axón neuronal.

EJEMPLOS

- 20 A continuación, se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto la efectividad del método de la invención.

EJEMPLO 1: Bioconjugación del complejo proteico 6xHis:GFP y partículas de sílice. Determinación de la afinidad de la cola de histidina por la partícula.

- Mediante bioingeniería, los inventores han generado un complejo proteico que
- 25 comprende la fusión de un péptido catiónico de 6 residuos aminoácidos de histidina (6xHis) con la proteína fluorescente GFP (Green Fluorescent Protein), 6xHis:GFP. El constructo génico fue sintetizado mediante General Biosystems, Inc. (Morrisville, EE. UU.) y fue clonado en un sistema de plásmido pET-15b (Novagen). El complejo proteico recombinante se produjo en One Shot™ BL21 (DE3) *E. coli* (Thermo Fisher, Waltham,
- 30 EE. UU.) y las células fueron transformadas con el vector de expresión. Los cultivos bacterianos fueron cultivados en medio LB suplementado con 100 µg/ml de ampicilina

y 35 µg/ml de cloranfenicol hasta alcanzar una absorbancia a 600nm (A600) de 0,6. La expresión de la proteína fue inducida mediante la adición de 0,1-0,5mM de isopropil β-D tiogalactopiranosido (IPTG). Las células se recogieron 4 h después mediante centrifugación y se resuspendieron en un tampón NaPi 50 mM, NaCl 300 mM, pH 8,0 con 1mg/ml de lisozima e inhibidor de proteasas (Pierce, Thermo Fischer). Los lisados de células bacterianas se obtuvieron por sonicación (5 repeticiones x 15 segundos de pulsos a 130 W, 65% de amplitud, con intervalos de 15 s, 4º C) y el material insoluble fue separado por centrifugación.

El lisado bacteriano de proteína soluble se cargó en columnas Ni-TED pre-equilibradas (Protino® Ni-TED, Macherey-Nagel GmbH & Co., Düren, Alemania). La proteína recombinante se eluyó en un tampón suplementado con imidazol 250 mM. Mediante columnas de desalinización PD-10 (GE Healthcare, Chicago, EE. UU.) se eliminó el imidazol y se intercambió el tampón con PBS (Figura 1).

Los materiales utilizados fueron esferas de SiO₂ monodispersas (~ 500 nm) que fueron preparadas mediante el método Stöber. Los materiales fueron caracterizados utilizando un microscopio electrónico de transmisión (TEM), JEOL JEM 2100, que operó a 120 kV y las muestras fueron adsorbidas en una rejilla de cobre de Lacey. Se realizó un análisis de dispersión de luz dinámica (Dynamic light scattering, DLS) mediante el sistema ZetaView NTA.

Se realizó una caracterización de sus propiedades fisicoquímicas, incluyendo morfología, distribución del tamaño utilizando microscopía de transmisión de electrones (TEM) (516 ± 29 nm de diámetro) y utilizando la dispersión de luz dinámica (DLS) (660 ± 10 nm de diámetro) y el potencial ζ, que fue medido en función del pH (Tabla 1). Las partículas de SiO₂ tienen un potencial ζ negativo tanto en H₂O (-27,5) como en tampón fosfato (PBS, pH 7,4) (-24,4). El potencial ζ negativo es un requisito previo para la bioconjugación electrostática entre las partículas y el complejo proteico 6xHis:GFP, ya que la cola de 6 histidinas tiene potencial positivo.

Tabla 1: Tamaños y Potencial ζ de partículas de SiO₂ en incubación con diferentes solventes.

Tamaño (nm) TEM	516 ± 29
Tamaño (nm) DLS	660 ± 10

Potencial ζ	H ₂ O: - 27,5
	PBS: -24,4

La bioconjugación se realizó mediante la funcionalización de las partículas mediante sonicación durante 3 repeticiones de 2 segundos cada una (3 x 2s) a temperatura ambiente en tampón fisiológico (tampón fosfato, PBS) con concentración saturante del complejo proteico fluorescente 6xHis:GFP (0,5 mg/ml). Se tomaron alícuotas en
5 diferentes momentos, se centrifugaron a 4200g durante 10 min y se lavaron repetidamente en agua.

A continuación, se confirmó la bioconjugación entre las partículas y el complejo proteico fluorescente 6xHis:GFP utilizando microscopía confocal de alta resolución (Figura 2).

Posteriormente, para determinar la afinidad del posicionamiento de proteínas en la
10 superficie de las partículas, se digirió enzimáticamente el péptido de 6 histidinas (cola de histidina), del complejo proteico 6xHis:GFP purificado, con tripsina 0,025% en PBS a pH 7,4 y temperatura de 37°C, para la eliminación de la cola de histidina del extremo N-terminal. La digestión completa de la cola de histidina tuvo lugar a los 30 minutos. No se detectó degradación adicional de la proteína GFP ni a las 24 horas ni a las 42 horas
15 de exposición a la enzima (Figura 3).

Mediante microscopía de fluorescencia confocal y electroforesis SDS-PAGE se examinó la afinidad del posicionamiento en la superficie de las partículas, tanto del complejo proteico 6xHis:GFP sin digerir como del complejo proteico digerido (sin cola de histidina) (Figura 4). La microscopia confocal reveló fluorescencia sólo en las partículas incubadas
20 con el complejo proteico 6xHis:GFP (Figura 4b). Del mismo modo, mediante la electroforesis SDS-PAGE (Figura 4c) se confirmó la presencia de 6xHis:GFP y ausencia del complejo proteico digerido (sin cola de histidina) (Figura 4c, calles 4 y 6, respectivamente). La electroforesis SDS-PAGE se realizó con geles prefabricados de poliacrilamida Mini-Protean® (BioRad). El análisis de proteínas se realizó en los geles
25 teñidos con azul de Coomassie y se escanearon utilizando el sistema BioRad GelDoc EZ. Por tanto, se demostró que la eliminación de la cola de histidina del complejo proteico resultaba en una pérdida de afinidad completa por las partículas de SiO₂.

Adicionalmente, se confirmó que la afinidad de la unión a las partículas de SiO₂ residía en la cola de histidinas del complejo proteico, mediante un recubrimiento adicional de

las partículas de SiO₂ con un polielectrolito cargado positivamente (polidialildimetilamonio, PDDA) para dotar a las partículas con un potencial ζ de $+ 40,5 \pm 0,2$ en H₂O ($+ 19,55 \pm 1,1$ en PBS). No se observó unión del complejo proteico 6xHis:GFP en la partícula cargada positivamente (Figura 5), por tanto, es la cola de histidina
5 lo que predispone el posicionamiento de la proteína en la superficie de la partícula.

EJEMPLO 2: Eficacia del recubrimiento de las partículas de sílice.

Para evaluar la eficiencia de la bioconjugación entre el complejo proteico 6xHis:GFP y la superficie de la partícula y, por consiguiente, la eficacia del recubrimiento, se calculó el número máximo de moléculas de proteína que podría bioconjugarse en la superficie
10 de SiO₂ y se compararon los datos obtenidos empíricamente mediante análisis de termogravimetría (TGA). Para el cálculo del valor teórico del número de proteínas necesario para recubrir la superficie completa de la partícula, se tuvo en cuenta que la bioconjugación de 6xHis:GFP sobre la superficie se realiza en una monocapa resistente o "*hard corona*" y que las dimensiones geométricas y moleculares de la GFP son de un
15 cilindro de 2,4 nm de ancho y 4,2 nm de altura, junto a los parámetros de la tabla 2. Según esto, se concluyó que el número necesario aproximado de moléculas de GFP para recubrir por completo la superficie de cada partícula de SiO₂, es de 184.900 moléculas, que es aproximadamente el 5,6% de la masa total de la partícula bioconjugada. Valores experimentales obtenidos por análisis termogravimétrico de las
20 partículas bioconjugadas, en un Setaram Setsys Evolution 1750 (SETSYS Evolution 1750) simultáneamente con un análisis TGA-DSC térmico mediante un analizador (Setaram), de 20 a 1000°C y un desnivel de temperatura de 10°C/min en una atmósfera N₂, revelaron una masa real aproximada de 4,9% de la masa de partículas correspondientes al complejo proteico (Figura 6).

25 Tabla 2. Parámetros de superficie y masa de partículas de SiO₂ bioconjugadas.

Superficie aproximada de partículas de SiO ₂	836.470 nm ²
Total de moléculas 6xHis:GFP/ Partículas SiO ₂	184.900
Peso total de 6xHis:GFP por partícula	$8,7 \times 10^{-15}$ g
Masa total aproximada de partícula de SiO ₂ (diámetro=516nm, $\rho=1,9-2,2$ g/cm ³)	$1,37^*-1,58^{**} \times 10^{-13}$ g

Masa total aproximada de partícula + proteína	$1,45^*-1,66^{**} \times 10^{-13} \text{ g}$
Porcentaje en peso máximo teórico de 6xHis:GFP en partículas bioconjugadas de SiO ₂	5,97*/5,22**%

Los símbolos (*) y (**) hacen referencia a las dos densidades de SiO₂ mesoporosa necesarias para calcular la masa, * = 1,9 g/cm³ y ** = 2,2 g/cm³ (J. Aerosol Sci. 2014; 275, 217–234).

5 Teniendo en cuenta los posibles efectos estéricos entre las moléculas de proteínas, se demostró que esta estrategia de recubrimiento de material satura la superficie por completo.

EJEMPLO 3: Ensayo *in vitro* de adhesión selectiva y competitiva de proteínas en un medio biológico complejo sintético.

10 Se utilizaron métodos bioquímicos para comprobar la afinidad de 6xHis:GFP frente a otros componentes proteicos. Se mezcló una solución salina al 30% de proteínas séricas con una solución del complejo proteico purificado 6xHis:GFP 0,43 mg/mL en PBS junto a las partículas de sílice y se incubaron durante 2 h (37°C; pH 7,4, 137 mM NaCl) en agitación suave. Como control negativo se utilizó, en otro ensayo paralelo y en las mismas condiciones anteriores, la proteína GFP sin cola de histidina.

15 Después de la incubación, mediante centrifugación, se aislaron las partículas de sílice bioconjugadas de la solución proteica. Se analizaron, mediante electroforesis SDS-PAGE, tanto el precipitado o “pellet” del ensayo con 6xHis:GFP como del ensayo con GFP (control negativo). Los análisis de los datos demostraron que, incluso en presencia de abundante suero proteico, la unión del complejo proteico 6xHis:GFP a las partículas
20 de sílice fue extremadamente eficiente y selectiva, un 80% del total de las proteínas adsorbidas a las partículas de SiO₂ correspondieron a 6xHis:GFP. Por el contrario, no se detectó ninguna unión de GFP sin cola de histidina (control negativo) a la superficie de las partículas (Figura 7a,b,c).

25 Por otro lado, mediante espectroscopía de fluorescencia, fueron analizados tanto el sobrenadante del ensayo con el complejo proteico purificado 6xHis:GFP, como el sobrenadante del ensayo con el control negativo, proteína GFP sin cola de histidina. El análisis de fluorescencia reveló una reducción de la fluorescencia en el sobrenadante

del ensayo con 6xHis:GFP, en comparación con el nivel de fluorescencia del sobrenadante del ensayo del control negativo con GFP. Esto es debido a que el complejo proteico 6xHis:GFP tiene más afinidad por las partículas de SiO₂ que la GFP sin cola de histidinas. Tras la incubación con las partículas, el complejo 6xHis:GFP se une a la superficie de dichas partículas y, por ende, se ve reducida su concentración en el sobrenadante (Figura 7d).

EJEMPLO 4: Ensayo *in vitro* de estabilidad de la bioconjugación mediante ensayo reproduciendo las condiciones biológicas *in vivo*.

Para evaluar la estabilidad de la bioconjugación y el recubrimiento de las partículas, se realizó un ensayo en el que se expusieron las partículas bioconjugadas, donde su superficie estaba recubierta con una corona proteica del complejo proteico 6xHis:GFP, a condiciones *in vivo* (37°C; pH 7,4; 137mM NaCl; 30% de suero bovino) durante 1, 4, 24, 48 y 72 horas (Figura 8). Mediante electroforesis SDS-PAGE se analizaron, cualitativamente y cuantitativamente, los cambios en la corona proteica de la superficie de las partículas tras la exposición al suero. En el análisis a las 24h, se demostró una alta estabilidad de la corona proteica donde el 90% de la proteína total era 6xHis:GFP y a las 72h, se mantenía estable un 70% del complejo 6xHis:GFP en la corona proteica de la superficie de la partícula (Figura 8 b y c).

Para demostrar la funcionalización del recubrimiento proteico de 6xHis:GFP, se incubaron partículas de SiO₂ bioconjugadas con el complejo proteico de 6xHis:GFP y partículas de SiO₂ sin recubrimiento proteico, ambas en células HeLa. Estas células carecen de receptores de unión a GFP. Las células HeLa se cultivaron en medio mínimo esencial de Eagle (Biowhittaker™), que contiene 10% FBS, se mantuvieron en condiciones estándar y se incubaron con las partículas de SiO₂:6xHis-GFP 10µg/mL durante 2 horas y con las partículas de SiO₂ sin recubrimiento proteico. Las células se fijaron con paraformaldehído al 4% y el córtex celular fue teñido con TRITC-Faloidina y los núcleos con Hoechst, ambos de Sigma-Aldrich. La figura 8 d y e muestra, mediante imágenes de microscopia confocal, el posicionamiento; tanto de las partículas de SiO₂ bioconjugadas con el complejo proteico de 6xHis:GFP (figura 8d) como de las partículas de SiO₂ sin recubrimiento proteico (figura 8e). Las partículas de SiO₂ bioconjugadas con el complejo proteico 6xHis:GFP se encontraban en el medio extracelular, no habían sido engullidas o ingeridas por las células HeLa, a diferencia del ensayo con partículas de SiO₂ sin recubrimiento proteico que se encontraban en el interior del núcleo de las

células HeLa, lo que demuestra que el procedimiento de recubrimiento descrito en este documento retarda o previene la endocitosis inespecífica.

EJEMPLO 5: Ensayo de funcionalización de otros nanomateriales.

La versatilidad del método de recubrimiento proteico de materiales aquí descrito se probó en una selección de diferentes partículas, concretamente: partículas de poliestireno modificado con carboxilato, obtenidas comercialmente (Sigma-Aldrich, San Luis, USA), y liposomas catiónicos/aniónicos, obtenidos ambos por Nanovex Biotechnologies (Oviedo, España) y fueron bioconjugados en PBS usando un paso de sonicación suave, como ya ha sido descrito para las esferas de SiO₂ en los ejemplos anteriores. Partículas con un potencial ζ negativo, como las esferas de poliestireno modificadas con carboxilato, y los liposomas aniónicos fueron recubiertos de manera eficiente tras la incubación directa con el complejo 6xHis:GFP. Sin embargo, para los liposomas catiónicos fue requerido un paso previo de funcionalización basado en el recubrimiento con un polielectrolito negativo (poli (4-estirenosulfonato de sodio), PSS) para invertir su potencial antes de la incubación con el complejo 6xHis:GFP (Figura 9).

EJEMPLO 6: Ensayo de eficiencia usando un complejo proteico recombinante específico del receptor celular CD77 en células vivas.

Finalmente, se probó el método de recubrimiento proteico de materiales aquí descrito con partículas recubiertas con una proteína ligando dirigida al receptor celular CD77 o globotriaosilceramida, el cual está presente en algunas células de carcinoma metastásico humano (células cancerosas humanas Detroit 562). Para ello, se utilizó un complejo proteico que comprende la proteína ligando de dicho receptor CD77: el dominio B de unión de la toxina Shiga (ShTxB) que consiste en la SEQ ID NO: 3.

Para esto, se diseñó un nuevo complejo proteico mediante ingeniería genética fusionando el dominio B de la toxina Shiga (UniProtKB, P09386; SEQ ID NO: 3) con la cola de 6 histidinas, generando el complejo proteico ShTxB:6xHis (Figura 10, SEQ ID NO: 4). Mediante sonicación (3 ciclos x 2s) en un tampón fisiológico, se bioconjugaron las partículas de SiO₂ con el complejo proteico ShTxB:6xHis. Mediante electroforesis SDS-PAGE, se comprueba que el complejo proteico ShTxB:6xHis se une a las partículas de SiO₂. La figura 10 muestra los resultados de la electroforesis SDS-PAGE donde en la calle 5 está presente el complejo proteico ShTxB:6xHis unido a las partículas de SiO₂ (ShTxB:6xHis-SiO₂) y, por el contrario, en la figura 10 calle 6,

correspondiente al sobrenadante de la bioconjugación, están ausentes las partículas bioconjugadas ShTxB:6xHis:SiO₂. Mediante microscopia confocal y fusionando el fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC) al complejo proteico ShTxB:6xHis, se obtuvieron imágenes de fluorescencia donde se comprobó el recubrimiento proteico de la superficie de las partículas (Figura 10c), confirmando la bioconjugación de ShTxB:6xHis-SiO₂.

Mediante técnicas de microscopia confocal de alta resolución y espectroscopia confocal, se confirmó la interacción de las partículas recubiertas ShTxB:6xHis-SiO₂ con los receptores CD77 en células Detroit 562 vivas (Figura 11). Las células Detroit 562 se cultivaron en medio mínimo esencial de Eagle (Biowhittaker™) que contiene 10% FBS, se mantuvieron en condiciones estándar y se incubaron con las partículas de ShTxB:6xHis-SiO₂ 10µg/mL durante 24 horas. Las células se fijaron con paraformaldehído al 4% y los núcleos fueron teñidos con Hoechst (Sigma-Aldrich). Todas las partículas bioconjugadas ShTxB:6xHis-SiO₂, tras 24h de incubación, se localizaron en las regiones teñidas del receptor CD77 (Figura 11).

Este efecto también fue observable, paralelamente, tras una exposición a células Detroit 562 de 2h, con las mismas características descritas en el párrafo anterior, con las partículas SiO₂ recubiertas con FITC acoplado tanto con proteínas séricas (Figura 12 arriba) como con ShTxB:6xHis (Figura 12 abajo). Las partículas recubiertas de proteínas séricas aparecen en el medio extracelular o se distribuyen aleatoriamente en las células, pero no coinciden con los receptores CD77 (Figura 12 arriba). Sin embargo, las partículas recubiertas con ShTxB:6xHis se observaron en los receptores CD77 (Figura 12 abajo).

En cuanto a la endocitosis, las partículas recubiertas con ShTxB:6xHis se unen a la membrana debido a que son reconocidas por el receptor CD77, y al contacto, se desencadena la invaginación y endocitosis de la membrana, utilizando mecanismos similares a los virus (Figura 11).

EJEMPLO 7: Ensayo de eficiencia usando un complejo proteico recombinante específico de tejido neuronal.

Mediante ingeniería genética, se construyó un constructo que comprende una cola de 6 histidinas fusionado a la GFP y a una región de la cadena pesada de la toxina botulínica (BTX-C) que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 1 (resultando en 6His:GFP:BTX-C

de SEQ ID NO: 5). Este complejo proteico se usó para funcionalizar partículas que, posteriormente, se incubaron con el tejido neuronal del nervio ciático. En la figura 13, se ve cómo los axones neuronales están marcados con la GFP, debido a que BTX-C del complejo proteico se une al axón neuronal.

REIVINDICACIONES

1. Un método para el recubrimiento proteico de un material que comprende las
5 siguientes etapas:
 - i) seleccionar un material cuya superficie se encuentre cargada electrostáticamente con cargas positivas o negativas o funcionalizar la superficie de un material con cargas positivas o negativas,
 - 10 ii) sintetizar un complejo proteico mediante la fusión de una cola aminoacídica con al menos una proteína ligando, donde al menos un extremo de la cola aminoacídica comprende aminoácidos con una carga electrostática opuesta a la carga de la superficie del material de la etapa (i), y
 - 15 iii) bioconjugar, mediante uniones electrostáticas, la superficie del material obtenida en la etapa (i) con la cola aminoacídica comprendida en el complejo proteico sintetizado en la etapa (ii).
2. El método según la reivindicación 1, donde la bioconjugación de la etapa (iii) comprende un paso de sonicación.
3. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, donde la cola aminoacídica se fusiona a la proteína ligando por el extremo amino o el extremo carboxílico de dicha
20 proteína.
4. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el extremo de la cola aminoacídica comprende aminoácidos con una carga electrostática positiva y la superficie del material comprende cargas electrostáticas negativas.
5. El método según la reivindicación 4, donde el extremo de la cola aminoacídica
25 comprende aminoácidos con una carga electrostática positiva seleccionados de la lista que consiste en: histidina, arginina y lisina.
6. El método según la reivindicación 5, donde el extremo de la cola aminoacídica comprende al menos 6 histidinas.

7. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el extremo de la cola aminoacídica comprende aminoácidos con una carga electrostática negativa y la superficie del material comprende cargas electrostáticas positivas.
8. El método según la reivindicación 7, donde el extremo de la cola aminoacídica
5 comprende aminoácidos con una carga electrostática negativa seleccionados de la lista que consiste en: ácido glutámico y ácido aspártico.
9. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que además comprende una etapa (iv) en la que se adiciona un estabilizador.
10. El método según la reivindicación 9, donde el estabilizador es glutaraldehído o
10 paraformaldehído.
11. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde el material es un nanomaterial, preferiblemente una nanopartícula.
12. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde el material está
15 compuesto de partículas de sílice (SiO_2), partículas de poliestireno modificado con carboxilato, fulerenos, grafeno, nanotubos de carbono, carbono puro, dendrímeros, nanocelulosa, liposomas, nanopolímeros, nanocristales o nanopartículas de oro, cobre, plata, hierro, platino, paladio, sílice, óxido de aluminio, dióxido de titanio, óxido de cerio, óxido de zinc, óxido de cobre, zeolitas, quantum dots, partículas de carbonato cálcico (CaCO_3) o cualquier combinación de los mismos.
- 20 13. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, donde el material está compuesto de sílice.
14. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, donde la proteína ligando del complejo proteico se selecciona de la lista que consiste en: GFP, toxina Shiga, neurotoxina botulínica, toxina tetánica, neuropéptidos y proteínas o fragmentos de
25 proteínas de las cubiertas víricas.
15. El método según la reivindicación 14, donde la neurotoxina botulínica comprende, preferiblemente consiste en, la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1.
16. El método según la reivindicación 14, donde la toxina Shiga comprende, preferiblemente consiste en, la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 3.

17. El método según cualquiera de las reivindicaciones 14 ó 15, donde el complejo proteico comprende la cola aminoacídica fusionada a al menos dos proteínas ligando, donde una de las proteínas ligando es GFP y la otra es la neurotoxina botulínica.
18. Un material recubierto con un complejo proteico obtenido por el método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, donde el complejo proteico comprende una cola aminoacídica en la que uno de sus extremos comprende al menos 6 histidinas fusionada por el otro extremo a una proteína ligando seleccionada de entre la neurotoxina botulínica o la toxina Shiga.
19. El material según la reivindicación 18, donde la neurotoxina botulínica comprende, preferiblemente consiste en, la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1.
20. El material según la reivindicación 18, donde la toxina Shiga comprende, preferiblemente consiste en, la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 3.
21. El material según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 20, donde la proteína ligando es una proteína de fusión que comprende la neurotoxina botulínica o la toxina Shiga fusionada por uno de sus extremos a la proteína GFP.
22. El material según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 21, donde la proteína ligando además comprende acoplado un fármaco.
23. El material según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 21, que además comprende un fármaco encapsulado en su interior.
24. El material según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 23, que es un nanomaterial, preferiblemente una nanopartícula.
25. El material según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 24, donde el material está compuesto de partículas de sílice (SiO₂), partículas de poliestireno modificado con carboxilato, fulerenos, grafeno, nanotubos de carbono, carbono puro, dendrímeros, nanocelulosa, liposomas, nanopolímeros, nanocristales o nanopartículas de oro, cobre, plata, hierro, platino, paladio, sílice, óxido de aluminio, dióxido de titanio, óxido de cerio, óxido de zinc, óxido de cobre, zeolitas, *quantum dots*, partículas de carbonato cálcico (CaCO₃) o cualquier combinación de los mismos.
26. El material según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 25, donde el material está

compuesto de sílice.

27. Uso *in vitro* del material según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 26, para el marcaje de neuronas o de células tumorales.

28. Uso del material según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 26 para la elaboración
5 de un medicamento.

29. Uso del material según la reivindicación 28, donde el medicamento es un medicamento de liberación sostenida de fármacos.

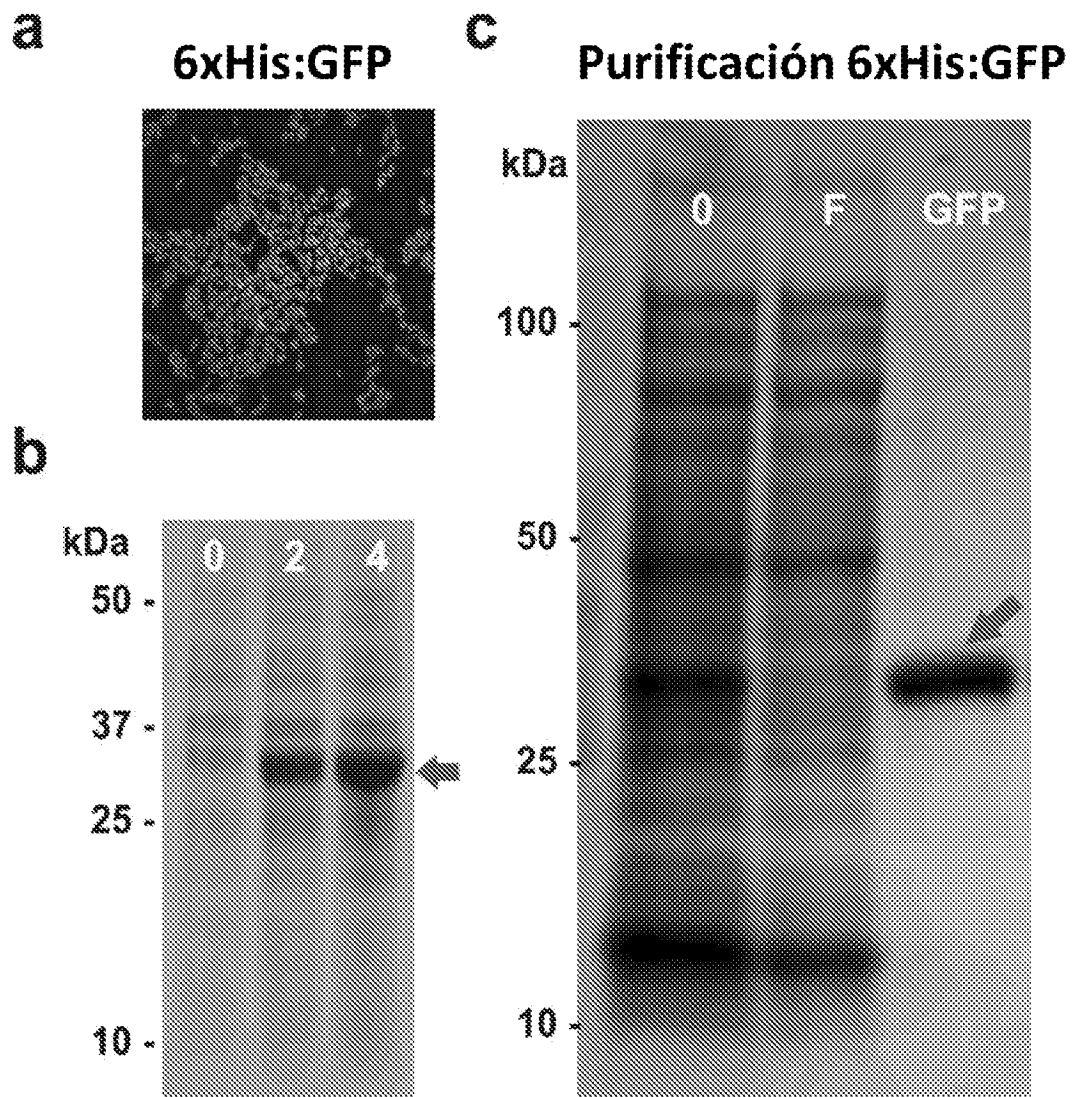


FIG 1

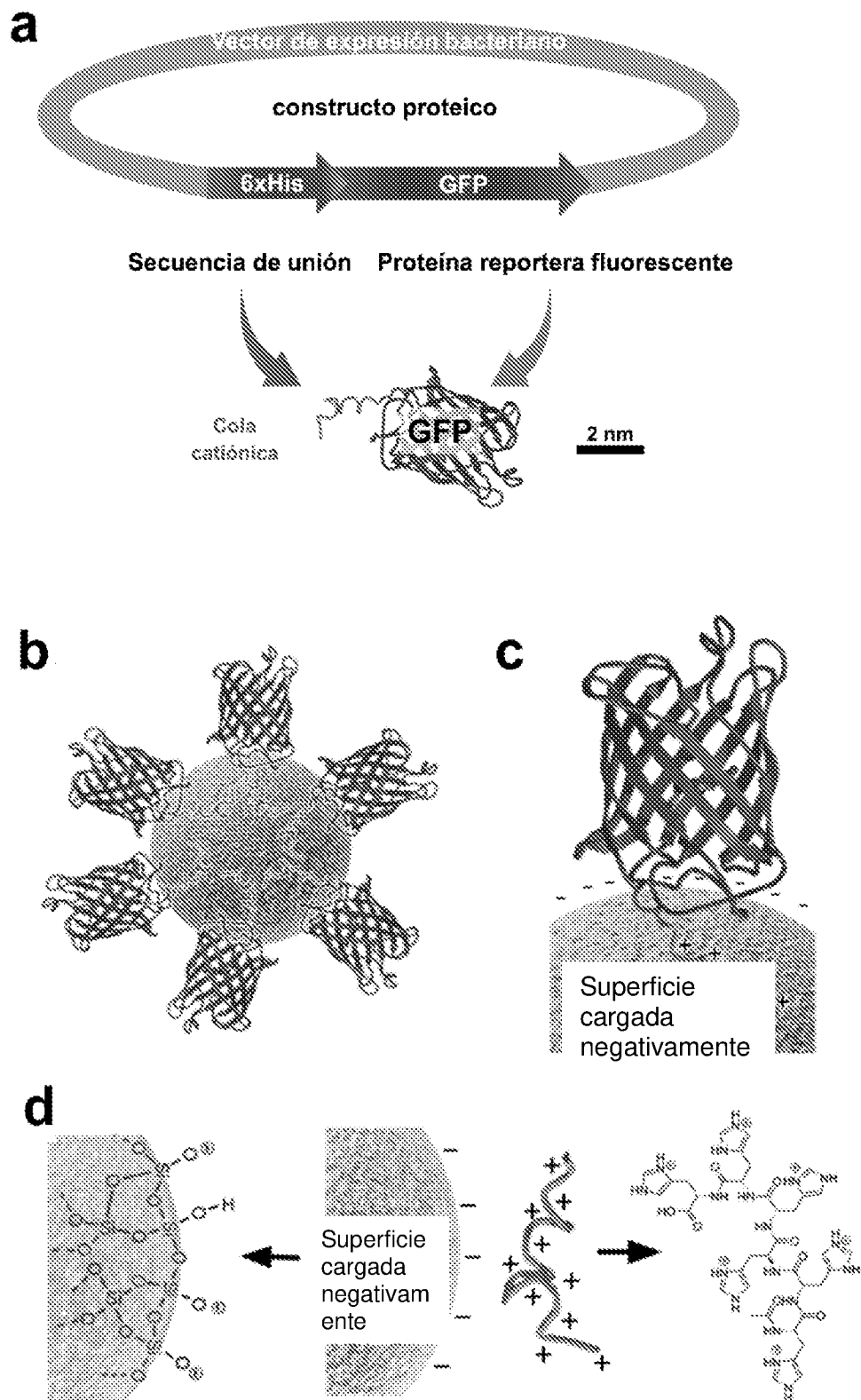


FIG 2

e

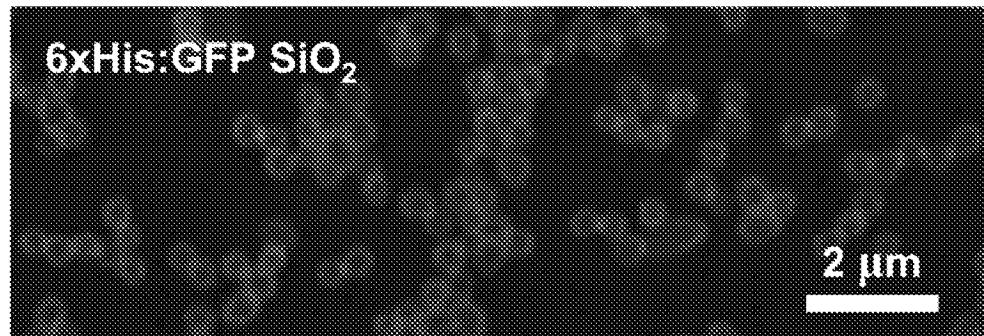


FIG 2 (cont.)

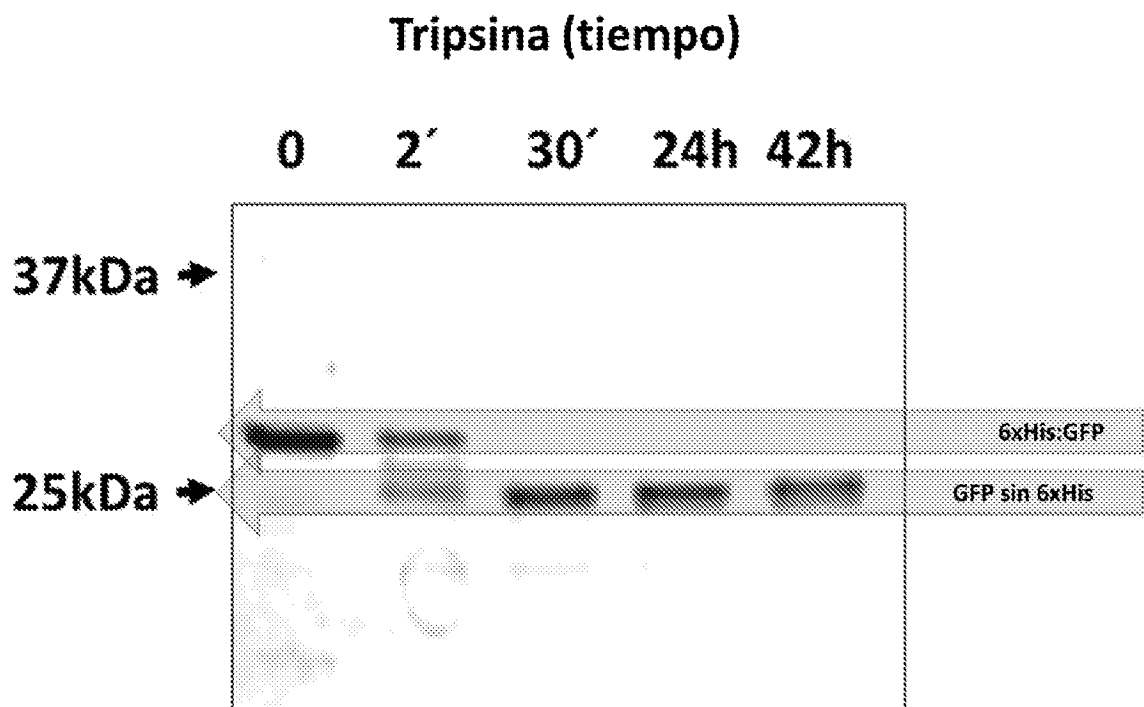


FIG 3

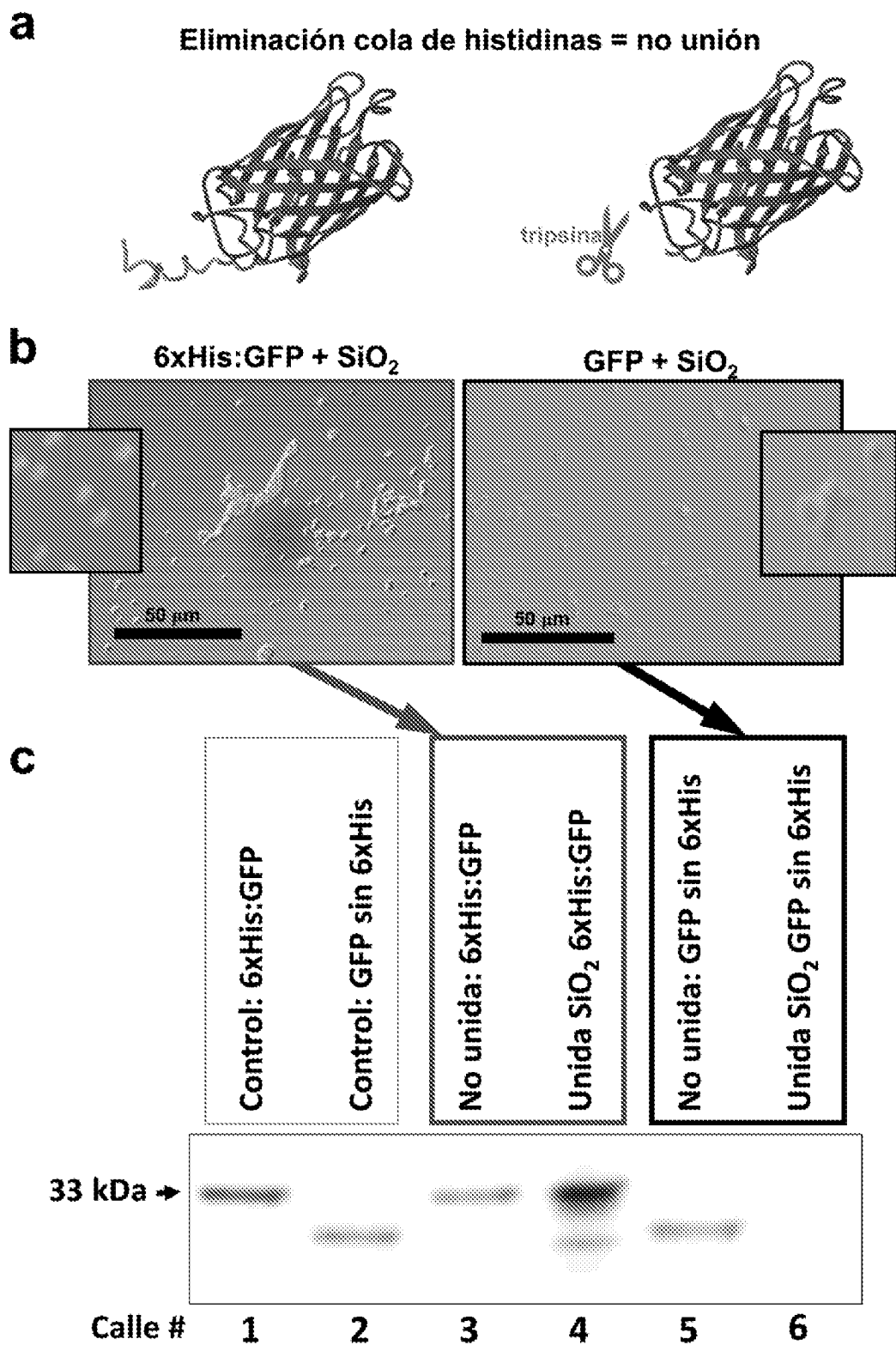


FIG 4

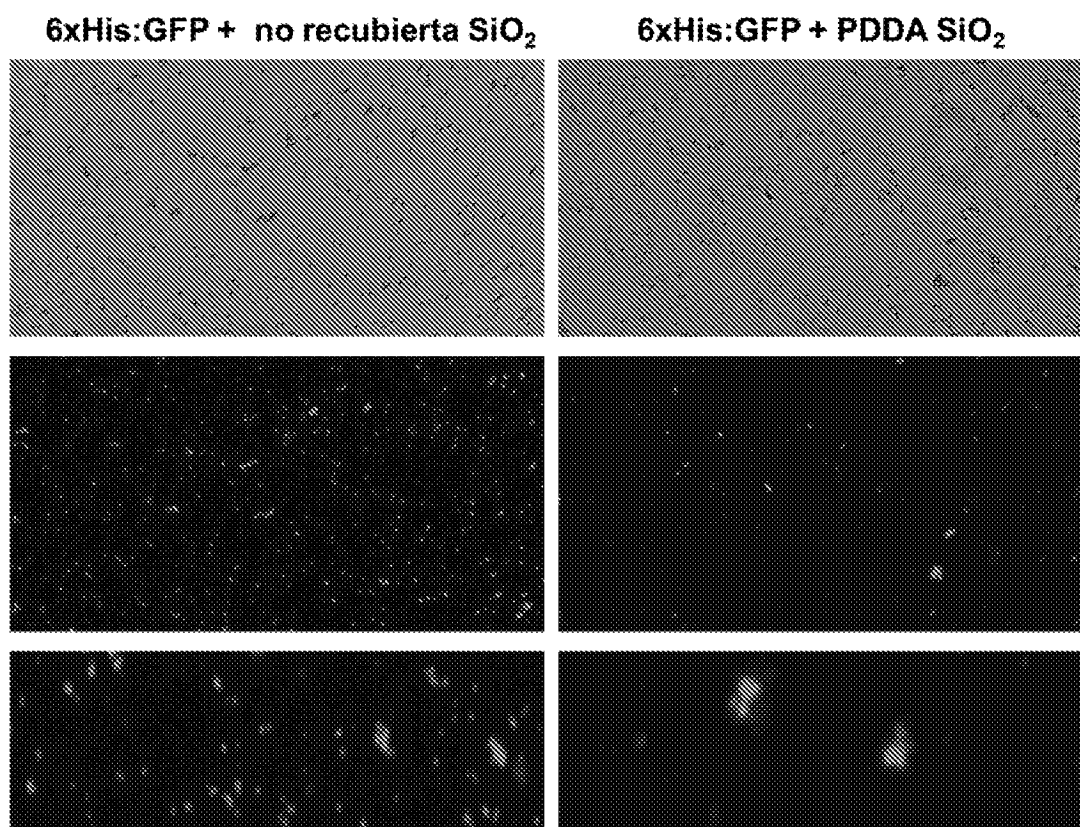


FIG 5

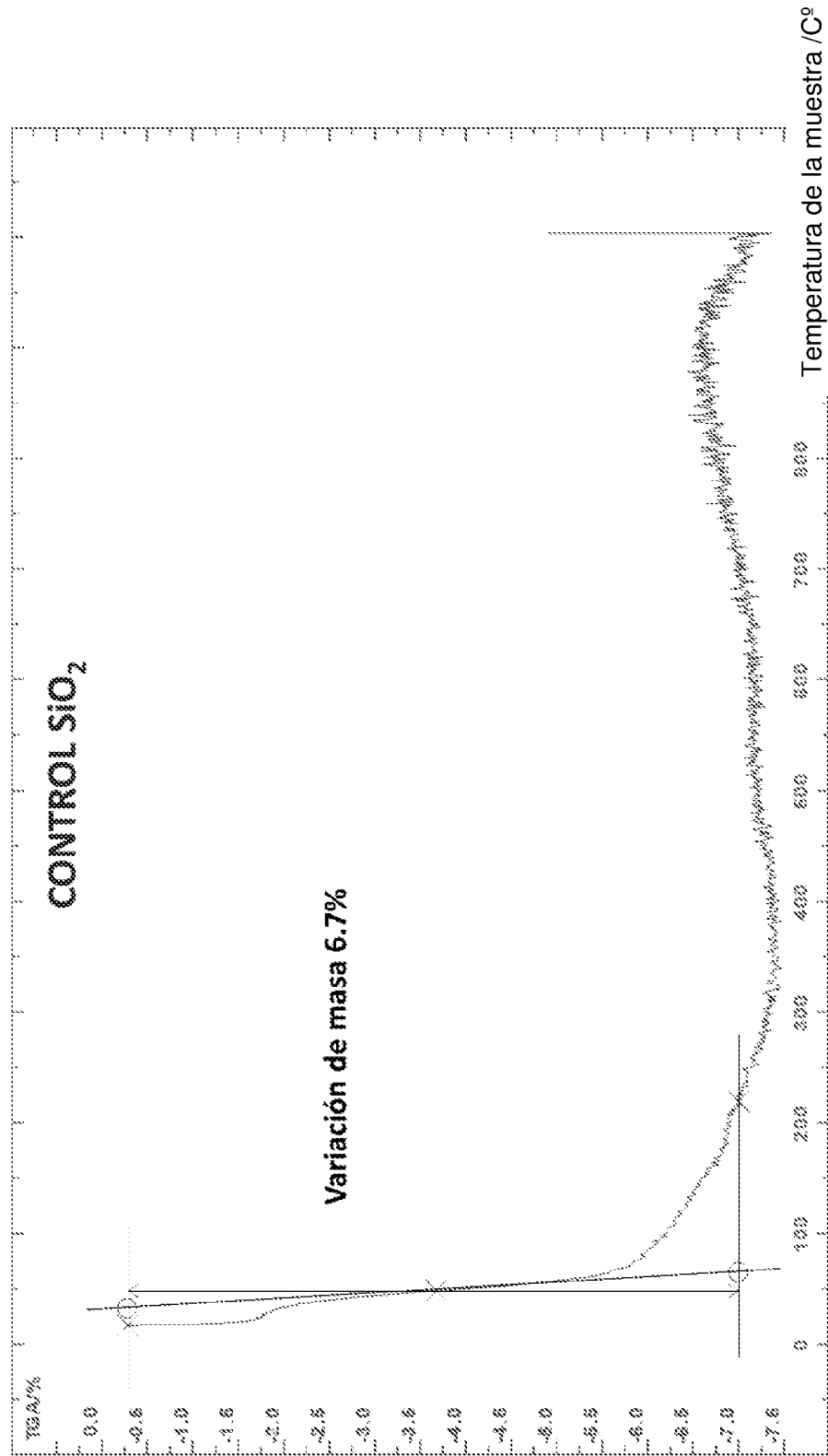


FIG 6

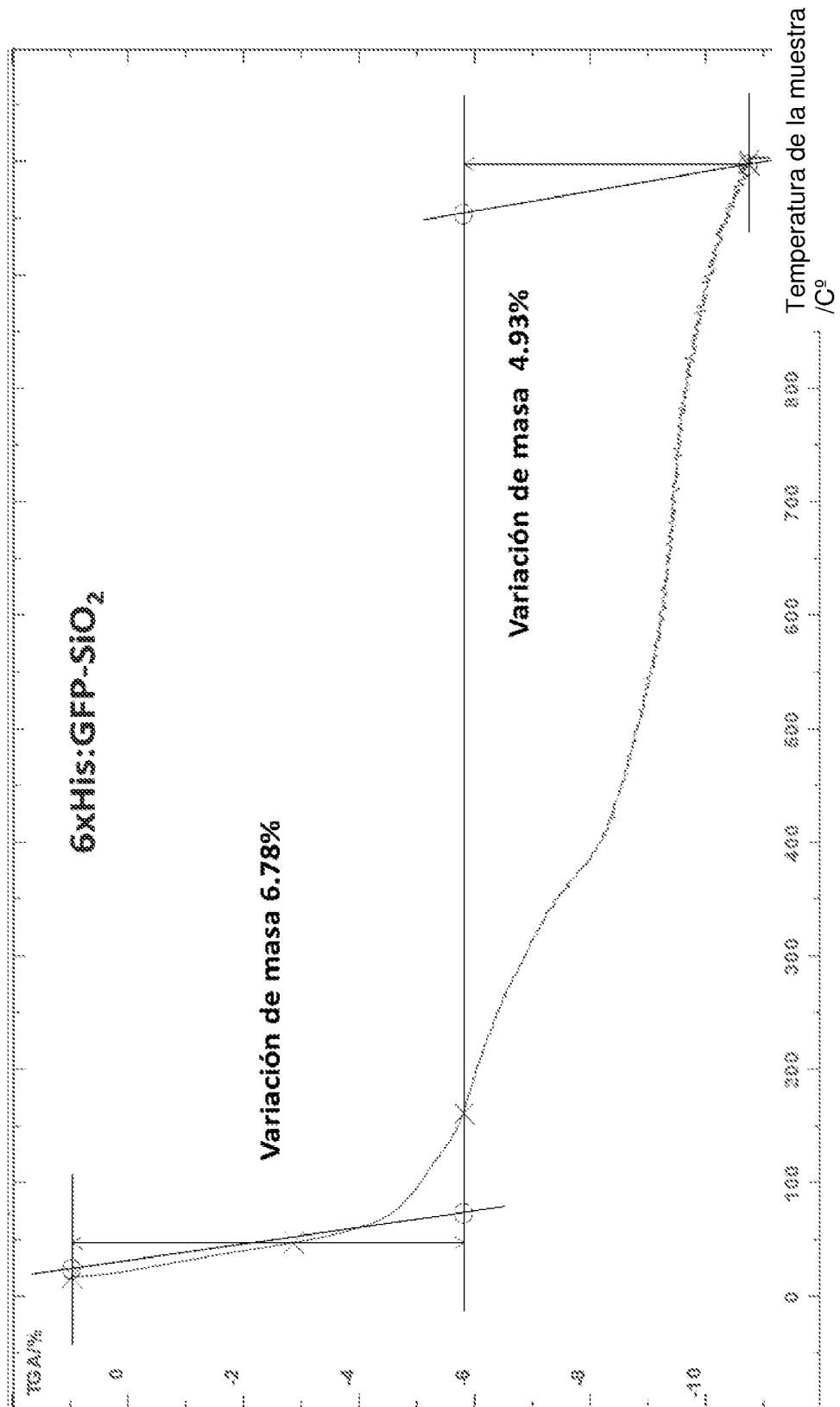


FIG 6 (cont.)

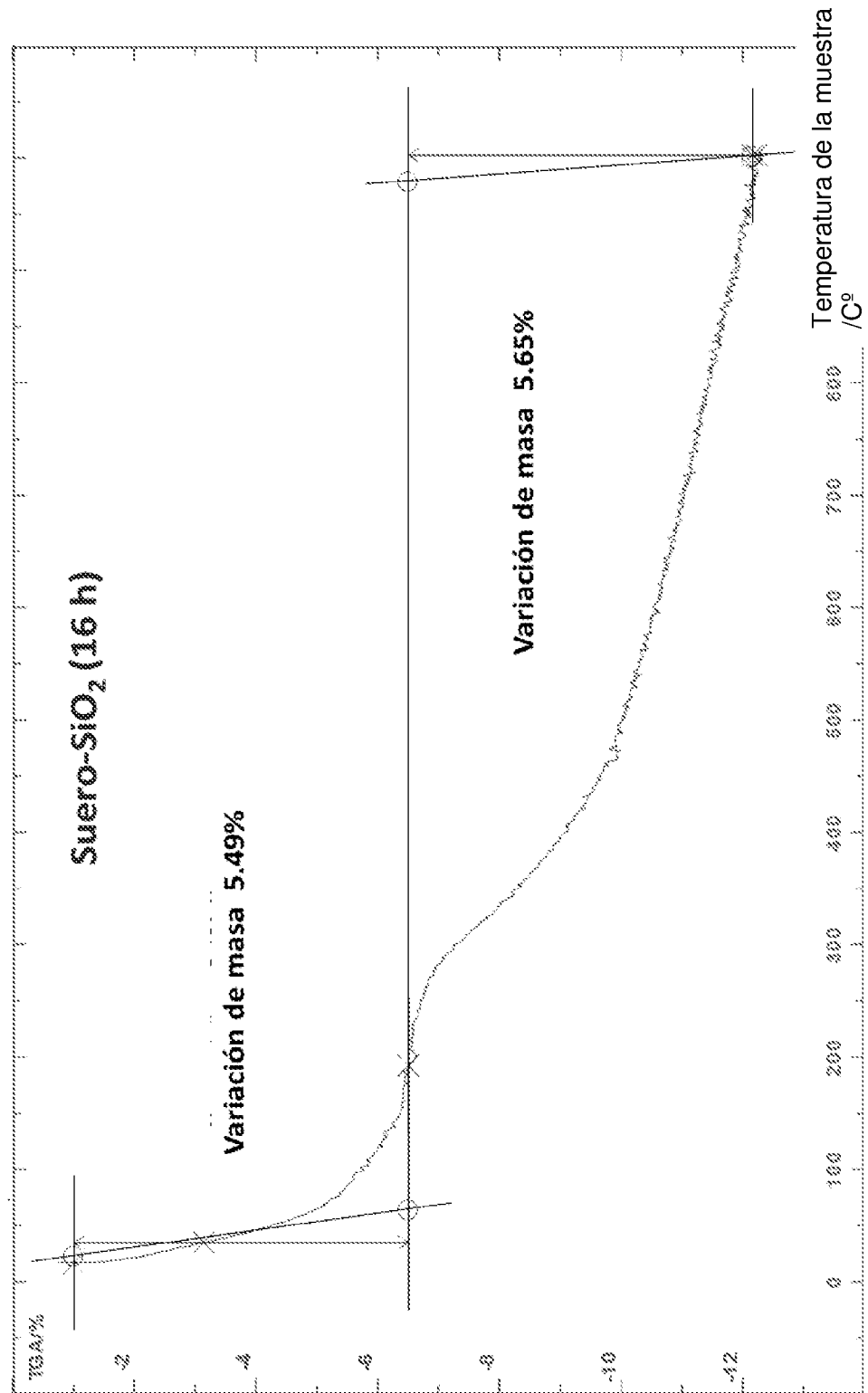


FIG 6 (cont.)

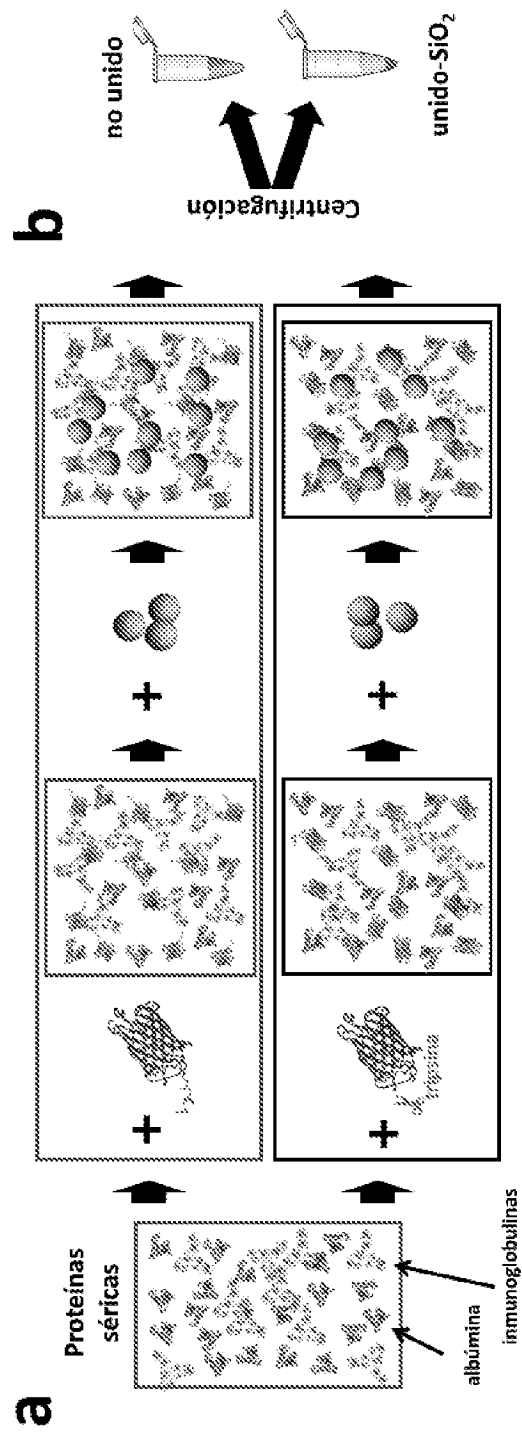
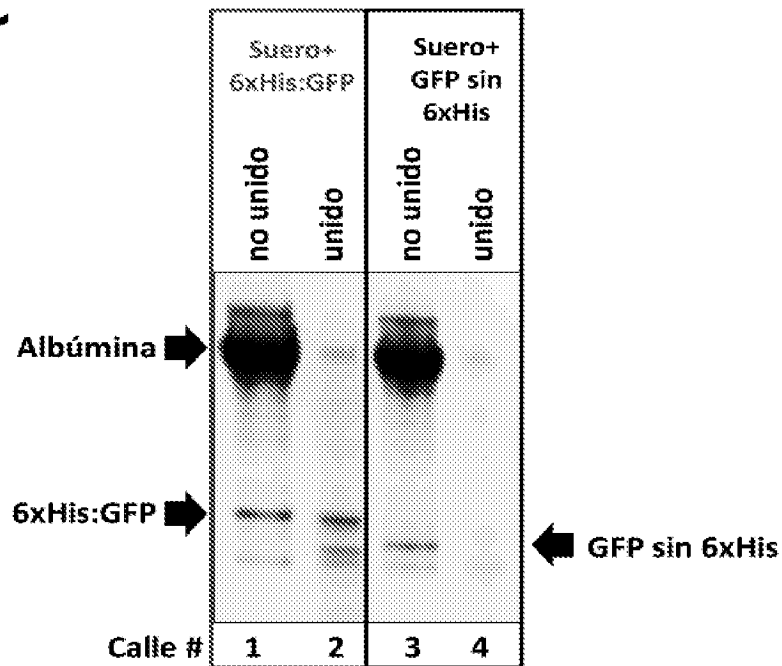


FIG 7

c



d

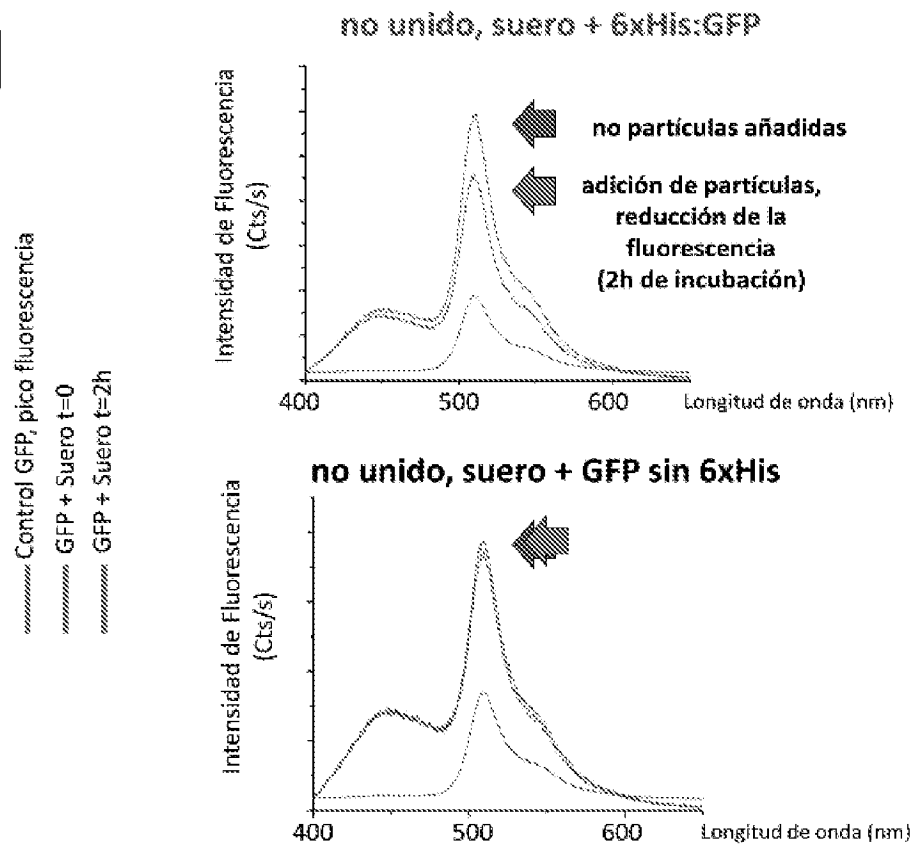


FIG 7 (cont.)

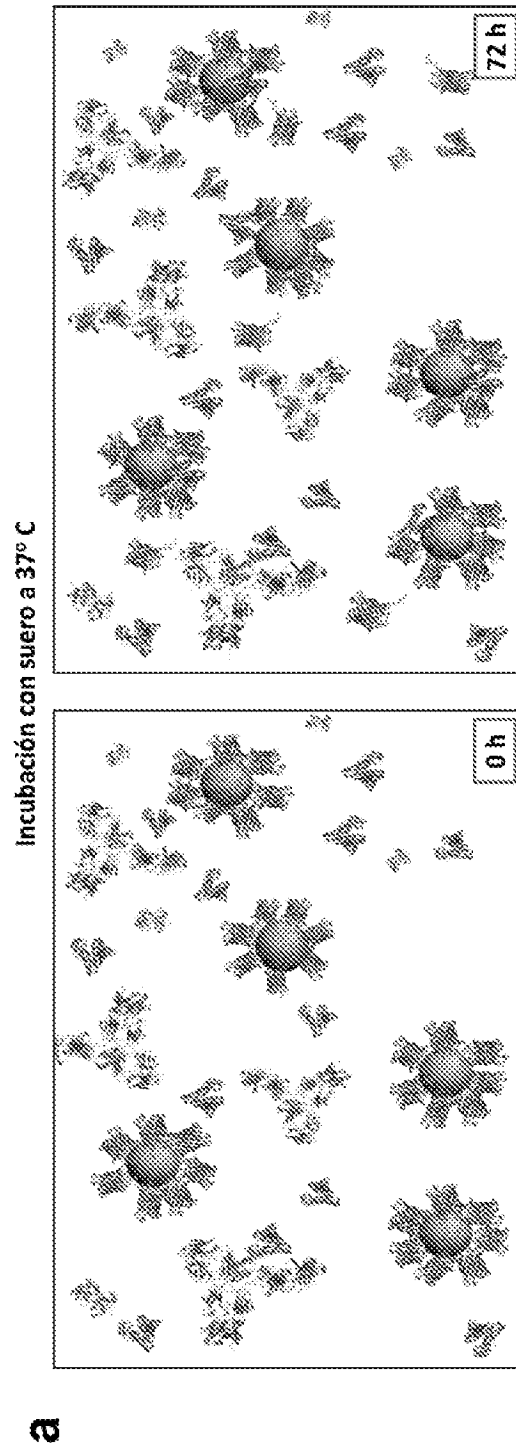
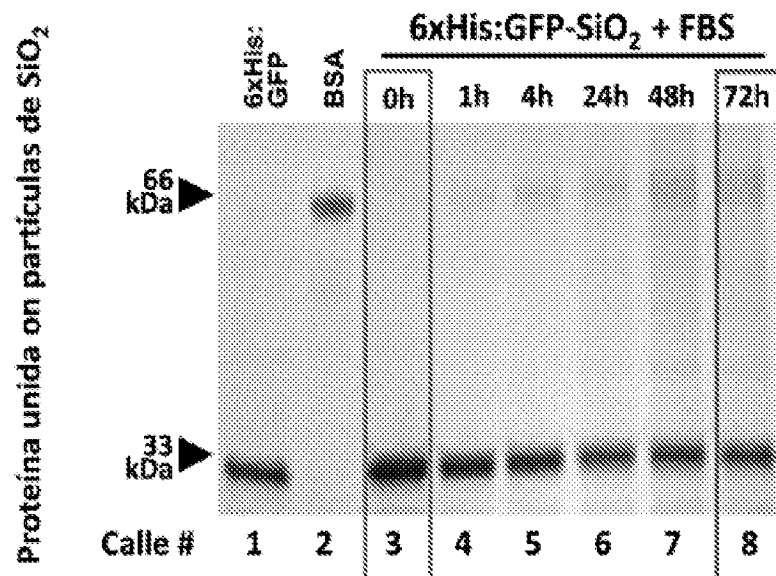


FIG 8

b



c

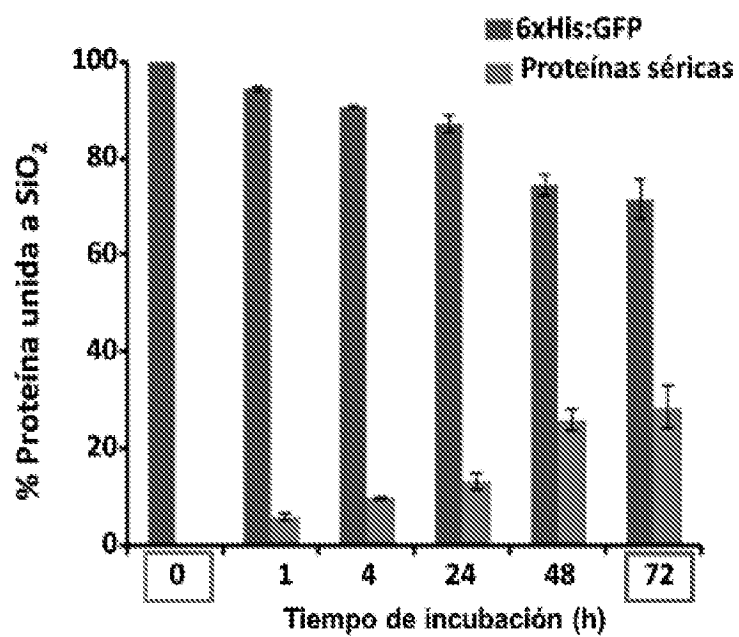
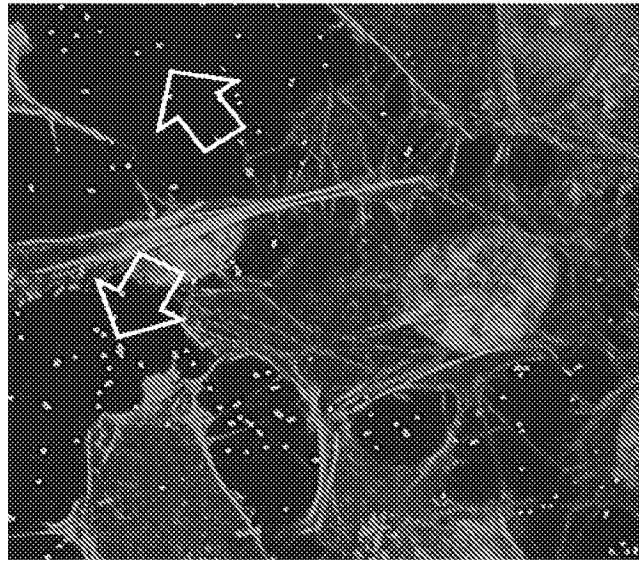


FIG 8 (cont.)

d

Núcleos/Actina/6xHis:GFP-SiO₂



e

Núcleos/Actina/FITC:FBS-SiO₂

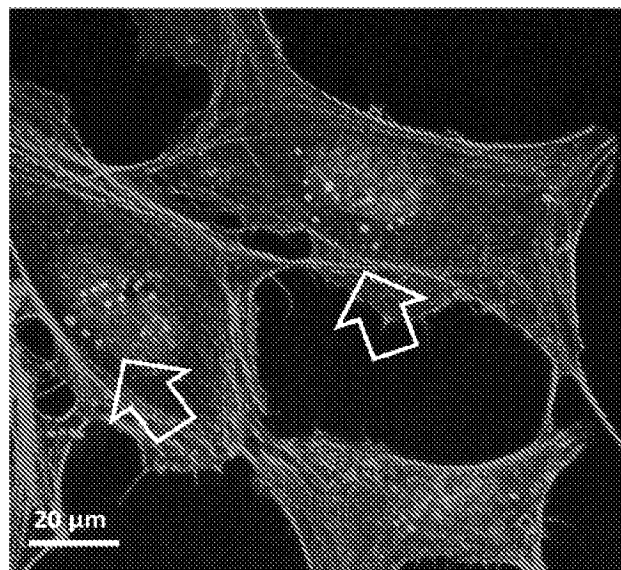


FIG 8 (cont.)

6xHis:GFP/Partículas poliestireno 6xHis:GFP/Liposomas aniónicos 6xHis:GFP/Liposomas catiónicos-PSS

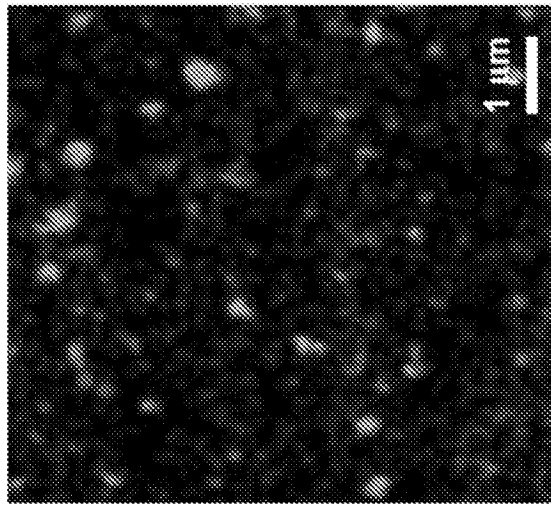
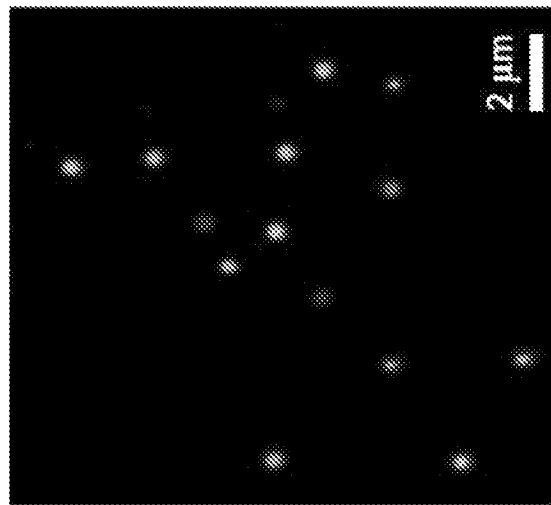


FIG 9

a

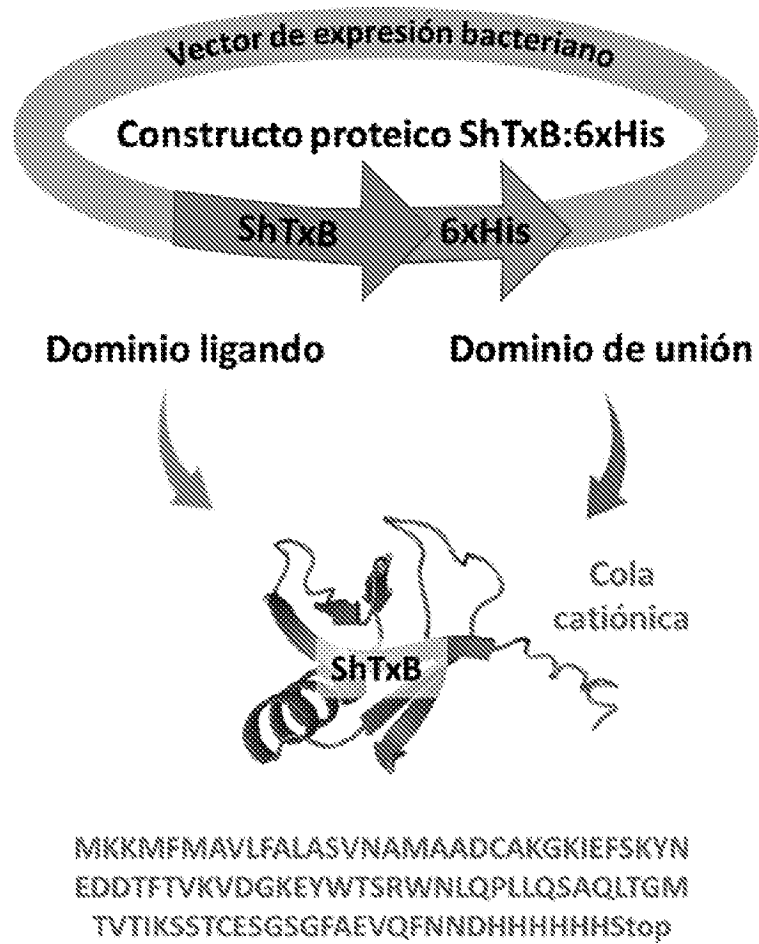
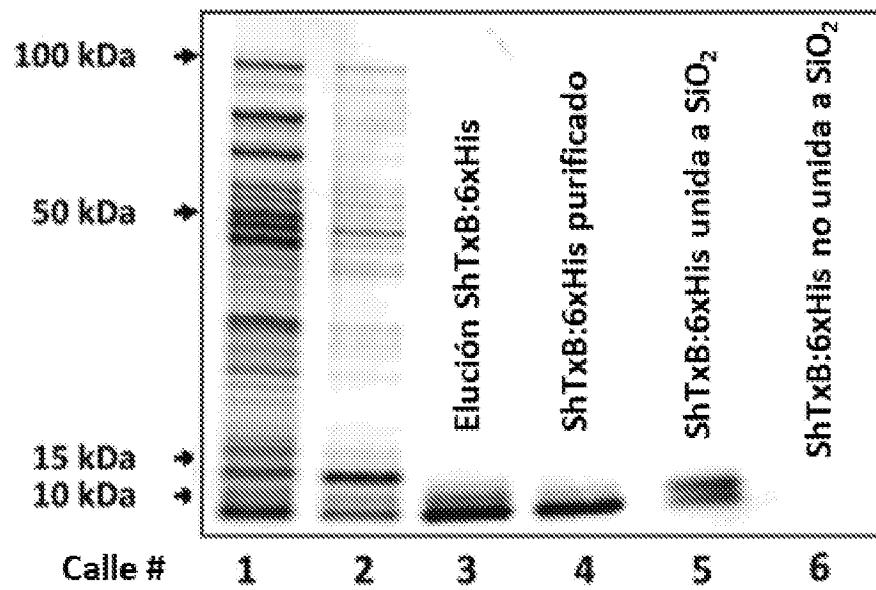


FIG 10

b



c

SiO₂+FITC-STxB:6xHis (partículas recubiertas)

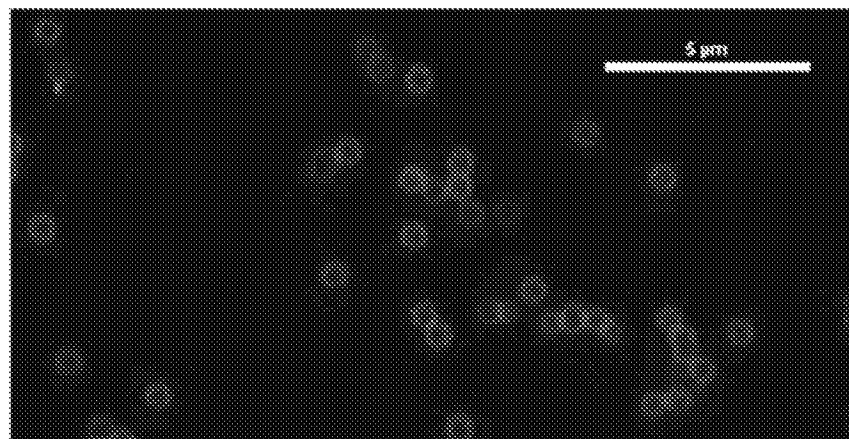


FIG 10 (cont.)

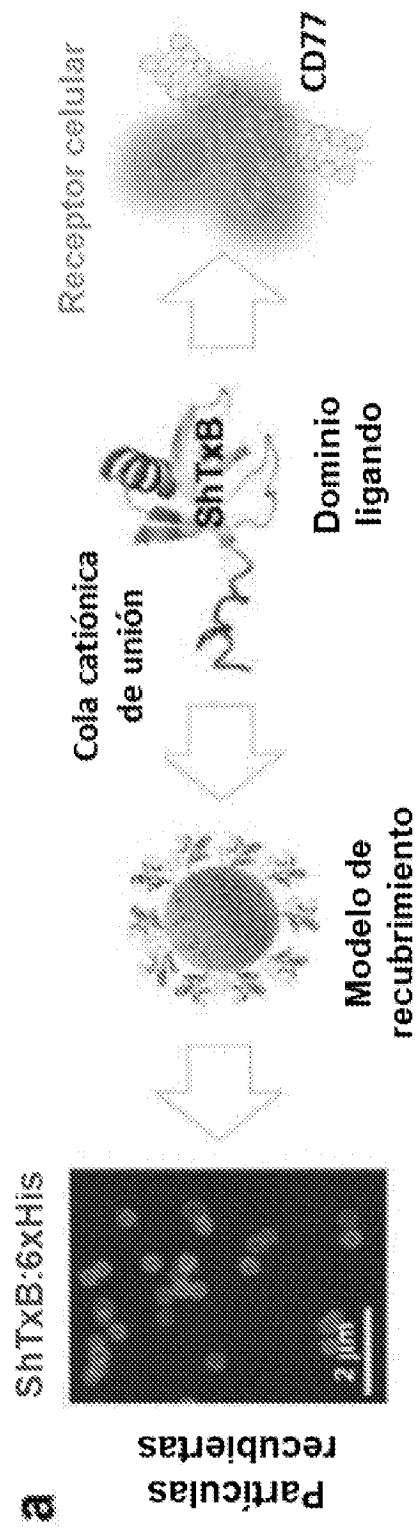


FIG 11

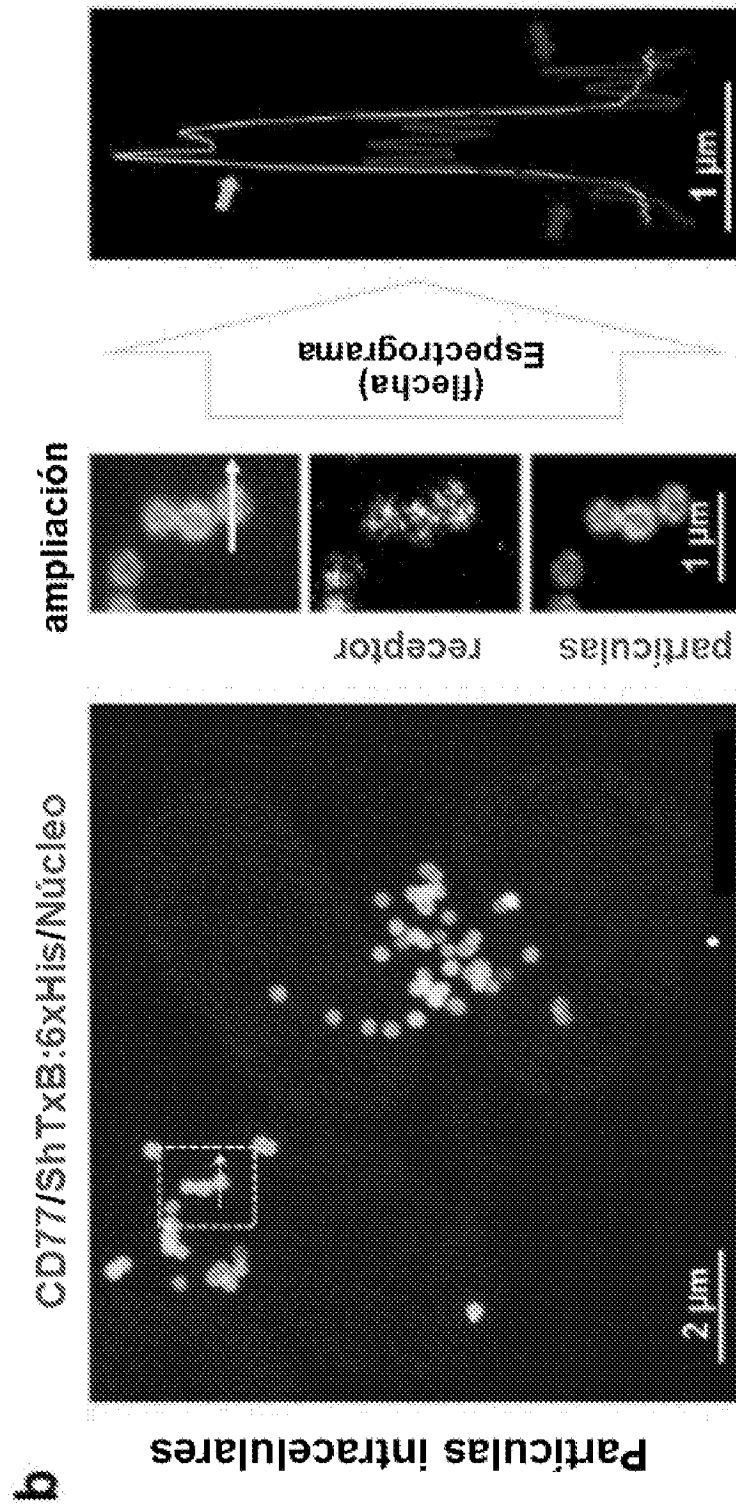


FIG 11 (cont.)

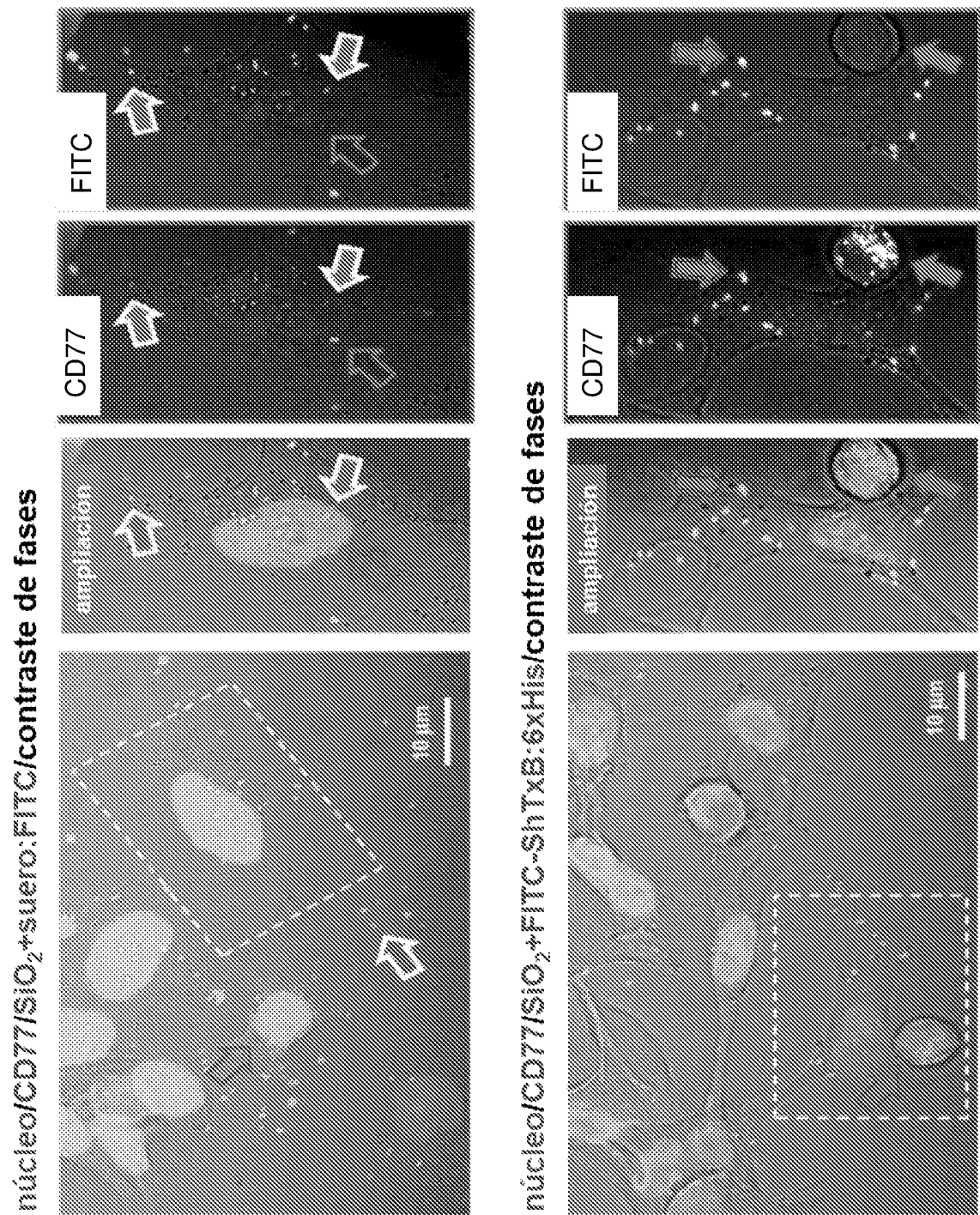


FIG 12

6His:GFP:BTX-C

SECUENCIA DE LA PROTEÍNA QUIMERA RECOMBINANTE 6xHis:GFP_BT-X-C

```

HHHHHHMVSKGEELFTGVVPILVEL
DGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKL
TLKICTTGKLPVPWPTLVTLITYGV
QCFIRYPDHMKQHDFFKSAMPEGY
VQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGD
TLVRIELKGIDFKEDGNILGHKLEY
NYNENHNVIYIMADKQKNGIKVNFKI
RHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDG
PVLDPDNHYLSTQSALSKDPNEKRD
HMYLLEFVTAAGITLGMDELYKNEK
EIKDLYDNQSNISGILKDFWGDYLQY
DKPYYMLNLYDPNKYVDVNNVGIR
GYMYLKGPRGSVMTTNIYLNSSLYR
GTKFIKKYASGNKDNIVRNNDRVY
INVVVKNKEYRLATNASQAGVEKIL
SALEIPDVGNLSQVVVMKSKNDQG
ITNKCKMNLQDNNGNDIGFIGFHQ
FNNIAKLVASNWNRYNRQIERSSRTL
CSWEFIPVDDGWGE

```

FIG 13

Partículas recubiertas de 6His:GFP:BTX-C en
nervio ciático

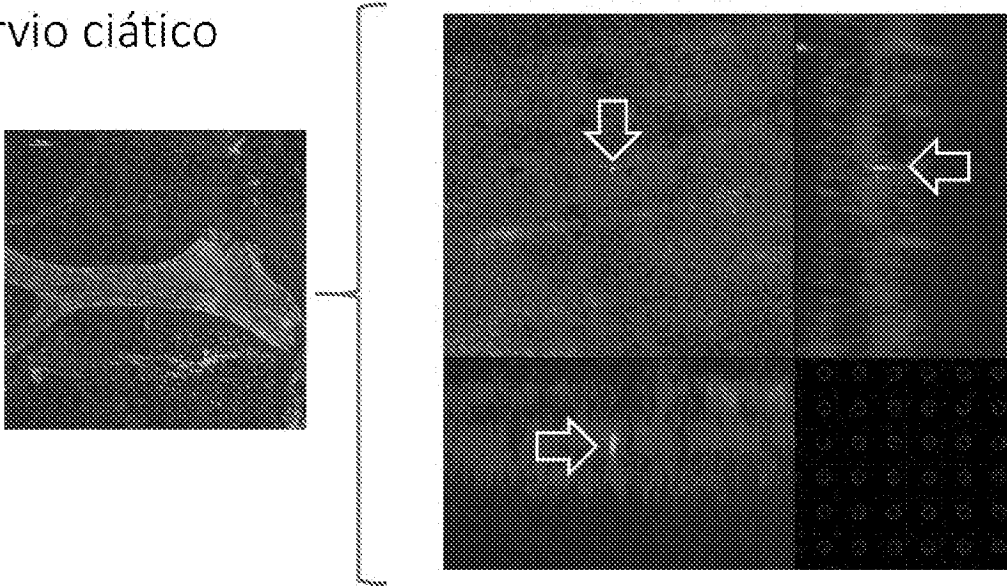


FIG 13 (cont.)



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201930734

②② Fecha de presentación de la solicitud: 07.08.2019

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	GUERRINI, LUCA; ALVAREZ-PUEBLA, RAMON A.; PAZOS-PEREZ, NICOLAS. Surface modifications of nanoparticles for stability in biological fluids. Materials, 2018, Vol. 11, N° 7, Páginas 1154. Resumen y páginas 11 y 12.	1-8, 11-12
A	GB 2474456 A (DUBLIN CITY UNIVERSITY) 20/04/2011, Página 1, líneas 1-7, 17-21, página 3, líneas 1-9, 27-31, página 4, líneas 3-8, 18-35, página 5, líneas 1-4, 9-15, 21-23, página 6, líneas 27-35, página 7, líneas 1-3, 12-33, página 8, líneas 1-9, página 10, líneas 3-9, página 25, líneas 16-33, página 26, líneas 16-34, página 27, líneas 1-4, 32-35, y reivindicaciones 1-4, 13-15, 23, 35, 36	1-29
A	KIM, KYOUNG-MIN, et al. Surface treatment of silica nanoparticles for stable and charge-controlled colloidal silica.. International journal of nanomedicine, 2014, Vol. 9, N° 2, Páginas 29. Todo el documento.	1-29
A	MUDUNKOTUWA, IMALI A.; GRASSIAN, VICKI H. . Histidine adsorption on TiO2 nanoparticles: an integrated spectroscopic, thermodynamic, and molecular-based approach toward understanding nano-bio interactions.. Langmuir, 2014, Vol. 30, N° 29, Páginas 8751-8760. Todo el documento.	1-29

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
06.04.2020

Examinador
M. J. García Bueno

Página
1/2

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

G01N33/58 (2006.01)
C07K17/14 (2006.01)
C07K17/06 (2006.01)
C07K17/08 (2006.01)
C07K17/00 (2006.01)
C07K14/25 (2006.01)
B82Y15/00 (2011.01)

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

G01N, C07K, B82Y

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

INVENES, EPODOC, WPI, NPL, BIOSIS, STN, EMBL ALL, INTERNET