

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 352 489**

21 Número de solicitud: 200900045

51 Int. Cl.:

**C12P 21/02** (2006.01)

**C12N 15/62** (2006.01)

**C07K 14/00** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **30.12.2008**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **21.02.2011**

Fecha de la concesión: **23.12.2011**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **04.01.2012**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:  
**04.01.2012**

73 Titular/es:  
**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS (Titular al 41%)  
C/SERRANO, 117  
28006 MADRID, ES;  
UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA  
(Titular al 41%) y  
CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA EN  
RED EN BIOINGENIERÍA, BIOMATERIALES Y  
NANOMEDICINA (Titular al 18%)**

72 Inventor/es:  
**VILLAVERDE CORRALES, ANTONIO PEDRO;  
VÁZQUEZ GÓMEZ, ESTHER;  
DÍEZ GIL, CÉSAR;  
GARCÍA FRUITÓS, ELENA;  
RATERA BASTARDAS, INMACULADA y  
VECIANA MIRÓ, JAUME**

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

54 Título: **CUERPOS DE INCLUSIÓN, CELULAS BACTERIANAS Y COMPOSICIONES QUE LOS  
CONTIENEN Y SUS USOS.**

57 Resumen:

Cuerpos de inclusión, células bacterianas y composiciones que los contienen y sus usos. La presente invención se refiere a un cuerpo de inclusión aislado que comprende un polipéptido caracterizado porque el cuerpo de inclusión está en forma particulada. La presente invención también se refiere a una célula bacteriana que comprenda dicho cuerpo de inclusión. La presente invención se refiere además a una composición que comprende dicho cuerpo de inclusión y una célula eucariota. La presente invención se refiere también a una composición que comprende dicho cuerpo de inclusión y un tejido de animal o planta. La presente invención se refiere también a los usos de dicho cuerpo de inclusión como medicamentos y estimuladores de la proliferación celular y regeneradores de tejido.

ES 2 352 489 B1

## DESCRIPCIÓN

Cuerpos de inclusión, células bacterianas y composiciones que los contienen y sus usos.

### 5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a cuerpos de inclusión, a células bacterianas y composiciones que los contienen y a su uso como medicamentos y estimuladores de la proliferación celular y regeneradores de tejido.

### 10 Antecedentes de la invención

Los cuerpos de inclusión bacterianos (IBs) son depósitos de proteínas altamente puros producidos en bacterias recombinantes<sup>1</sup>. Siendo insolubles en agua, se observan como partículas amorfas porosas y altamente hidratadas en el rango de tamaño de varios cientos de nanómetros. Las cadenas polipeptídicas que forman los IBs se pliegan en una estructura molecular de tipo amiloide compatible con su estructura nativa, manteniendo de este modo las actividades biológicas de los polipéptidos incluidos (por ejemplo, fluorescencia o actividad enzimática). Por lo tanto, tras la debida manipulación de los mismos, surge un amplio espectro de usos potenciales de los IBs como materiales funcionales y biocompatibles. Aunque teóricamente viable mediante el ajuste de condiciones genéticas y de producción, nunca se han manipulado las características biofísicas de estas partículas proteináceas, tales como la actividad y el tamaño. En este estudio, se caracterizan las propiedades a nanoescala de IBs como nuevos materiales particulados y se explora en qué grado las partículas producidas se pueden diseñar mediante estrategias simples. Además, como prueba de concepto destacada, se han obtenido superficies modificadas con cuerpos de inclusión que estimulan de manera significativa la proliferación de células de mamífero, demostrando el potencial de los IBs en la manipulación de tejidos y la medicina regenerativa entre otras aplicaciones biomédicas prometedoras.

Muchos polipéptidos recombinantes producidos en bacterias modificadas genéticamente agregan como IBs. Estos depósitos de proteínas aparecen como partículas altamente hidratadas que se encuentran en el citoplasma bacteriano<sup>2</sup> o, en algunos casos, en el periplasma<sup>3</sup>. Los IBs son químicamente puros, ya que la propia proteína recombinante es el componente principal - hasta alrededor de un 95% de la proteína total -<sup>2,4,5</sup>. Otras moléculas celulares, tales como ARN, ADN y lípidos resultan atrapados durante la formación de IB y están presentes en cantidades menores<sup>6</sup>. La formación de IBs es un proceso rápido y eficaz, tal como se observa después de unos minutos de la inducción de la expresión génica. Varias horas más tarde, pueden representar fácilmente alrededor del 50% de la biomasa celular total<sup>5</sup>. Aunque en el pasado se creía que los IBs estaban formados por cadenas polipeptídicas no plegadas o ampliamente mal plegadas y, por lo tanto, biológicamente inertes, recientes observaciones, presentan estas partículas como constituidas por especies de proteínas que se pliegan correctamente y que, por tanto, son biofuncionales<sup>8</sup>. La estructura molecular de IBs se basa en una organización particular de tipo amiloide<sup>9,10</sup> que permite interacciones de lámina beta cruzada que coexisten con dominios de proteínas correctamente plegadas<sup>11</sup>. Por lo tanto, los IBs formados por enzimas pueden ser catalizadores útiles en diferentes tipos de bioprocesos tal como se ha observado recientemente para la  $\beta$ -galactosidasa, D-aminoácido oxidasa, maltodextrina fosforilasa, ácido siálico aldolasa y polifosfato quinasa<sup>11-15</sup>, entre otras. Por otro lado, su formación *in vivo*, que implica la deposición de proteínas dependiente de la secuencia alrededor de centros de nucleación, está regulada por varios genes celulares (que codifican principalmente proteasas y chaperones que actúan como una red funcional, lo que permite la manipulación de sus propiedades a nanoescala)<sup>16,17</sup>. En la presente invención se determinan las características más relevantes de IB como nanopartículas y prueba que pueden diseñarse mediante una manipulación genética y del proceso apropiada de las bacterias productoras. Al ser materiales totalmente biocompatibles y mecánicamente estables, se ha utilizado además los IBs como nanopartículas para modificar la rugosidad de las superficies para la estimulación de la proliferación de células de mamífero. Dado que esencialmente cualquier especie de proteína se puede producir como IBs bacterianos y sus propiedades a nanoescala se pueden ajustar fácilmente, las posibilidades funcionales de estos materiales novedosos ofrecen un espectro inusual de aplicaciones biomédicas adicionales aparte de las mostradas aquí en el contexto de la manipulación de tejidos.

### Descripción resumida de la invención

La presente invención se refiere a cuerpos de inclusión, a células bacterianas y composiciones que los contienen y a su uso como estimuladores de la proliferación celular y regeneradores de tejido.

Un primer objeto de la presente invención se refiere a un cuerpo de inclusión aislado que comprende un polipéptido caracterizado porque el cuerpo de inclusión está en forma particulada.

Un segundo objeto de la presente invención se refiere a una célula bacteriana que comprende el cuerpo de inclusión según el primer objeto de la invención y sus diferentes aspectos estructurales.

Un tercer objeto de la presente invención se refiere a una composición que comprende el cuerpo de inclusión según el primer objeto de la invención y sus diferentes aspectos estructurales y una célula eucariota.

Un cuarto objeto de la presente invención se refiere a una composición que comprende el cuerpo de inclusión según el primer objeto de la invención y sus diferentes aspectos estructurales y un tejido de animal o planta.

Un quinto objeto de la presente invención se refiere a los usos del cuerpo de inclusión según el primer objeto de la invención y sus diferentes aspectos estructurales y de disposición, como medicamentos y estimuladores de la proliferación celular y regeneradores de tejido.

## 5 Breve descripción de los dibujos

Figura 1. *Caracterización morfológica y funcional de IBs*. A. Imágenes de microscopía confocal de células bacterianas salvajes que producen IBs formados por una proteína GFP de fusión. De arriba abajo, muestras de células tomadas a 1 hora, 2 horas y 3 horas después de la inducción de la producción de IB. B. Imágenes de microscopía confocal utilizando una paleta Metamorf de células bacterianas salvajes, IbpAB<sup>-</sup>, ClpA<sup>-</sup>, ClpP<sup>-</sup> y DnaK<sup>-</sup> que producen IBs formados por una GFP de fusión de 2 horas de formación (parte superior). Imágenes de microscopía confocal de IBs de 3 horas de formación purificados de estas cepas (parte inferior). Las barras en A y B indican 1 μm. C. Curvas de distribución del tamaño de partícula medidas mediante dispersión de luz dinámica de IBs de 3 horas de formación producidos por diferentes cepas bacterianas. Los IBs de células deficientes en IbpAB se excluyeron de este estudio debido a su particular tendencia por agregarse como complejos supraparticulados (resultados no mostrados). Las curvas se representan en términos del porcentaje en volumen de partícula. Las distribuciones del tamaño volumétrico de partícula se describen mediante D[v,0,5], que es el diámetro de partícula (nm) por debajo del cual existe un 50% del volumen total del sistema. D[v,0,5] es el diámetro medio de partícula en volumen (nm). El índice de polidispersidad (PdI) se define como  $[D(v, 0,1)/D(v,0,9)] \cdot 100$ . D. Fluorescencia emitida por IBs analizada mediante citometría de flujo, para partículas purificadas de las cepas de *E. coli* IbpAB<sup>-</sup>, ClpA<sup>-</sup>, ClpP<sup>-</sup> y DnaK<sup>-</sup>.

Figura 2. *Estructura fina y estabilidad de IBs con GFP*. En las imágenes superiores, caracterización por AFM de IBs formados por una GFP de fusión, de 3 horas de formación. A. Imagen topográfica de 2,5 x 2,5 μm de IBs depositados sobre la superficie de forma aleatoria. B. Imagen tridimensional de 600 x 600 nm que muestra dos IBs de la imagen del panel A. C. Sección transversal topográfica de una partícula de IB aislada (indicada como una línea azul en A), que indica la existencia de una cierta rugosidad RMS intrínseca en la superficie de IB de 1,89 nm, como consecuencia de la estructura interna que da lugar a una textura de superficie fina. En D, las imágenes SEM de IBs de 3 horas de formación producidos en células salvajes (parte superior) y en células DnaK<sup>-</sup> (parte inferior). Las barras blancas indican 500 nm. En E, se muestran las estabildades de IBs en tampón acuoso a 37°C, 25°C y 4°C, o liofilizados (L) y guardados posteriormente a 25°C ó 4°C. F. Imágenes de microscopía confocal de IBs purificados mantenidos en tampón durante un mes a 25°C, 4°C y -80°C, y después de liofilización/reconstitución (L).

Figura 3. *Proliferación de células de mamífero estimuladas por IB*. Imagen confocal de una placa de poliestireno de 35 mm recubierta con 240 μg de IBs con GFP producidos en células naturales. B. Para el mismo campo, el recubrimiento de células BHK de la sección de 0,6 μm 75 horas después de la deposición celular y una proyección xzy de IBs formados por una GFP de fusión (parte superior) y el recubrimiento celular (parte inferior). C. Los núcleos celulares se tiñeron con Hoechst 33342 y las membranas celulares con CellMask inmediatamente antes de ser analizadas mediante microscopía confocal de rastreo láser de tres canales secuenciales. En D, el crecimiento de células BHK a diferentes tiempos de incubación en placas recubiertas de IB (IB), en placas recubiertas de vitronectina (V) y en placas control (C). E. Crecimiento de células BHK en placas recubiertas con diferentes concentraciones de IBs en comparación con placas recubiertas de vitronectina (V) y placas control (C). Los experimentos se llevaron a cabo en paralelo en placas de poliestireno tratadas para cultivo (barras negras) y no tratadas (barras grises). F. Apilamiento xyz confocal de 22 secciones procesadas con software Imaris 3D mediante la aplicación del módulo Isosurface. G. Imágenes de las superficies de silicio terminadas en amino estampadas con IBs recubiertos de 50 μm tomadas mediante microscopía convencional (parte superior) y microscopía confocal (parte media) y la distribución de células BHK después de 48 horas de crecimiento sobre las mismas (parte inferior).

## Descripción de la invención

La presente invención se refiere a cuerpos de inclusión, a células bacterianas y composiciones que los contienen y a su uso como estimuladores de la proliferación celular y regeneradores de tejido.

Por “cuerpo de inclusión” o también denominado en la presente invención como “IB” se entiende lo indicado anteriormente en la sección de antecedentes o, de forma más simplificada, un depósito amorfo intracelular que comprende proteínas agregadas que se hallan en el citoplasma de una célula.

Un primer objeto de la presente invención se refiere a un cuerpo de inclusión aislado que comprende un polipéptido caracterizado porque el cuerpo de inclusión está en forma particulada.

En una realización preferente, la forma particulada tiene un tamaño de partícula entre 24 y 1500 nm.

En una realización más preferente, la partícula está en forma amorfa hidratada.

Con respecto al polipéptido comprendido en el cuerpo de inclusión según el primer objeto de la presente invención, éste puede ser un polipéptido quimérico que comprende una proteína viral fusionada de manera traduccional con una proteína informadora.

En una realización preferente, dicha proteína viral es una proteína de cápside.

Además, en otra realización preferente, la proteína informadora es una proteína fluorescente. En particular, dicha proteína fluorescente es GFP (proteína verde fluorescente).

5 En una realización particular, el cuerpo de inclusión según el primer objeto de la invención y sus diferentes aspectos estructurales se deposita sobre una placa tratada con cultivo de tejido.

En otra realización particular, el cuerpo de inclusión según el primer objeto de la invención y sus diferentes aspectos estructurales se deposita sobre un sustrato de silicio.

10 En aún otra realización particular, el cuerpo de inclusión según el primer objeto de la invención y sus diferentes aspectos estructurales se incorpora dentro de un andamiaje tridimensional, ya sea de tipo sintético o natural.

Un segundo objeto de la presente invención se refiere a una célula bacteriana que comprende el cuerpo de inclusión según el primer objeto de la invención y sus diferentes aspectos estructurales.

15 En una realización preferente, dicha célula bacteriana es *Escherichia Coli* (*E. coli*).

En una realización más preferente, dicha célula bacteriana de *E. coli* es una cepa salvaje (WT) o es una cepa mutante.

20 Un tercer objeto de la presente invención se refiere a una composición que comprende el cuerpo de inclusión según el primer objeto de la invención y sus diferentes aspectos estructurales y una célula eucariota.

25 En una realización preferente, dicha célula eucariota es una célula de mamífero.

Un cuarto objeto de la presente invención se refiere a una composición que comprende el cuerpo de inclusión según el primer objeto de la invención y sus diferentes aspectos estructurales y un tejido de animal o planta.

30 Un quinto objeto de la presente invención se refiere a los usos del cuerpo de inclusión según el primer objeto de la invención y sus diferentes aspectos estructurales y de disposición.

Un primer uso de dicho cuerpo de inclusión es como estimulador de la proliferación de células eucariotas.

35 Un segundo uso de dicho cuerpo de inclusión es como regenerador de tejido.

Un tercer uso de dicho cuerpo de inclusión es como medicamento. En particular, dicho uso como medicamento tendría en cuenta las ventajas observadas (ver parte experimental) en la proliferación celular y la regeneración de tejidos.

40 Los siguientes ejemplos se ofrecen sólo con objetivos ilustrativos, y no pretenden limitar de ningún modo el alcance de la presente invención.

## Materiales y métodos

### 45 Células bacterianas, plásmidos y producción de cuerpos de inclusión

Los IBs se produjeron en diferentes cepas de *Escherichia coli*, concretamente MC4100 (cepa salvaje con respecto al plegamiento y degradación de proteínas, *araD139 Δ(argF-lac) U169 rpsL150 relA1 ffbB530I deoC1 ptsF25 rbsR*)<sup>18</sup> y sus derivados JGT4 (deficiente en la co-proteasa ClpA, *clpA::kan*), JGT17 (deficiente en las proteínas de choque térmico pequeñas *IbpAB, Δibp::kan*), JGT19 (deficiente en la co-proteasa ClpP, *clpP::cat*) y JGT20 (deficiente en la chaperona principal DnaK, *dnak756 thr::Tn10*)<sup>19</sup>. Estas cepas productoras se transformaron con el vector de expresión pTVP1GFP (Ap<sup>R</sup>) que codifica una proteína verde fluorescente (GFP) fusionada en el extremo amino a VP1, la proteína de la cápside en forma de pentámero del virus de la fiebre aftosa<sup>20</sup>. Esta proteína viral, al ser altamente hidrofóbica, dirige la deposición de proteínas de fusión como IBs<sup>9</sup>. El gen recombinante se expresó bajo el control de un promotor *trc* inducible por isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG).

60 Las células bacterianas se cultivaron en medio rico en LB<sup>18</sup> y el gen de fusión se expresó bajo condiciones estándar tal como se ha descrito anteriormente<sup>17</sup>. Los IBs se detectaron claramente después de 1 h de adición de IPTG (figura 1A).

### Purificación de los cuerpos de inclusión

65 Se centrifugaron muestras de 200 ml de cultivos bacterianos a 4°C a 5000 g durante 5 minutos y se resuspendieron en 50 ml de tampón de lisis (Tris HCl 50 mM pH = 8,1, NaCl 100 mM y EDTA 1 mM). Las muestras envueltas en hielo se sonicaron (durante 25 a 40 minutos) a un 40% de amplitud bajo ciclos de 0,5 s. Una vez sonicadas, se añadieron 28 μl de fenilmetanosulfonilfluoruro (PMSF) 100 mM y 23 μl de lisozima 50 mg/ml a muestras que se incubaron a 37°C bajo agitación durante 45 minutos. A continuación, se añadieron 40 μl de Nonidet P40 (NP-40) y la mezcla se mantuvo durante 1 hora a 4°C durante la agitación. Se extrajo el ADN con 120 μl de DNasa 1 mg/ml y 120

$\mu\text{l}$  de  $\text{Mg}_2\text{SO}_4$  1 M durante 45 minutos a  $37^\circ\text{C}$  bajo agitación. Finalmente, las muestras se centrifugaron a  $4^\circ\text{C}$  a 15000 g durante 15 minutos y el residuo, que contenía IBs puros, se lavó con tampón de lisis que contenía Tritón X-100 al 0,5% y se guardó a  $-20^\circ\text{C}$  hasta su análisis.

#### 5 *Análisis por microscopio de bacterias e IBs*

Se analizaron muestras utilizando un microscopio de fluorescencia confocal Leica TSC SP2 AOBS (Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Mannheim, Alemania) después de una excitación a una longitud de onda de 488 nm y las imágenes se registraron a longitudes de emisión entre 500 y 600 nm (63X (NA 1,4 aceite) utilizando un objetivo Plan-Apochromat (zoom 8; 1024 por 1024 píxels). Para el análisis de las células bacterianas que producen IBs fluorescentes, se fijaron muestras tomadas 1, 2 ó 3 horas después de la inducción por IPTG con formaldehído al 0,2% en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se guardaron a  $4^\circ\text{C}$  hasta su uso. Los IBs aislados se resuspendieron en 20 ml de PBS. Para la microscopía electrónica de barrido (SEM), se analizaron muestras mediante procedimientos convencionales utilizando un FEG (pistola de emisión de campo)-ESEM (microscopía electrónica de barrido ambiental).

#### *Citometría de flujo*

Los IBs purificados se resuspendieron en PBS y se sonicaron durante 4 minutos bajo ciclos de 0,5 s y se analizaron mediante citometría de flujo en un sistema FACS Calibur (Becton Dickinson), utilizando un láser de iones argón enfriado al aire de 15 mW a una excitación de una longitud de onda de 488 nm. La emisión por fluorescencia de IB se midió en el canal FL-1 (filtro de paso de banda de 530/30 nm) utilizando un modo logarítmico.

#### *Caracterización de microscopía de fuerza atómica*

El análisis de la microscopía de fuerza atómica (AFM) se realizó en aire con un microscopio de fuerza atómica comercial (PicoScan/PicoSPM de Molecular Imaging Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA) operando en modo acústico. Los IBs resuspendidos en tampón fosfato 0,1 M a pH 7,4 se depositaron sobre una superficie de mica y se secaron al aire antes de la medición. Para las mediciones en modo acústico, se utilizó una punta de silicio monolítico PPP-NHC (Nanosensors, Inc.), con una constante elástica nominal de 42 N/m y una frecuencia de resonancia de 330 kHz.

#### *Mediciones de dispersión de luz dinámica*

Se midieron las distribuciones de tamaño en volumen de IB y el potencial Z utilizando un analizador de la dispersión de luz dinámica (DLS) a una longitud de onda de 633 nm, combinado con una tecnología de retrodispersión no invasiva (NIBS) (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments Limited, Malvern, Reino Unido). Las dispersiones de IBs de 3 horas de vida en tampón fosfato 0,1 M a pH = 7,4 (500 ng/ $\mu\text{l}$ ) se prepararon mediante una breve sonicación (1 minuto a temperatura ambiente). Se midieron alícuotas de 3 ml de la dispersión resultante a  $20^\circ\text{C}$  sin filtrar antes de la medición. Los datos de intensidad se normalizaron utilizando tampón fosfato 0,1 M a pH 7,4 como patrón de referencia. El valor promedio de tres mediciones diferentes se tomó como el diámetro hidrodinámico promedio de IB.

#### *Preparación de monocapas terminadas en amino*

Se utilizaron sustratos de silicio (100) 1x1 cm pulidos por una cara para la preparación de monocapas terminadas en amino. Antes de la formación de la monocapa, los sustratos se trataron con solución RCA1 oxidante ( $\text{NH}_4\text{OH}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$  en una proporción 1:1:5) durante 30 minutos a  $80^\circ\text{C}$  y se aclararon de manera ligera con agua ultrapura/MilliQ con una conductividad superior a 18,2 M $\Omega$ . Posteriormente, los sustratos se introdujeron en solución de piraña durante 15 minutos ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado (Panreac) y  $\text{H}_2\text{O}_2$  acuoso al 33% (Aldrich) en una proporción 3:1), se aclararon abundantemente con agua ultrapura y se secaron bajo una corriente de nitrógeno. Este tratamiento proporciona a los sustratos una nueva superficie terminada en hidroxilo para reacciones posteriores. Las monocapas terminadas en amino se formaron mediante la exposición de los sustratos bajo atmósfera controlada a una solución 5 mM de N-[3-(trimetoxisilil)propil]etilendiamina (TPEDA) (97% Aldrich) en tolueno anhidro durante 3 horas. Tras la formación de la monocapa, los sustratos se aclararon con tolueno y etanol para eliminar el exceso de silano y se secaron bajo una corriente de nitrógeno. El ángulo de contacto del sustrato terminado en amino se midió con una gota de 3  $\mu\text{l}$  de agua ultrapura (MilliQ con 18,2 M $\Omega$  cm) en un Instrumento de Medición del Ángulo de Contacto OCA15+ (Data Physics Instruments GmbH, Alemania), equipado con una cámara CCD y el software SCA20 para la determinación del ángulo. Los espectros XPS se obtuvieron en un instrumento PHI ESCA-500 (Perkin Elmer), equipado con una fuente de rayos X Al K $\alpha$  monocromática que operaba a 350 W. Los espectros hacían referencia al pico principal C1s observado a 284,8 eV.

#### *Impresión por microcontacto ( $\mu\text{CP}$ ) de IBs en el sustrato de silicio terminado en amino*

La  $\mu\text{CP}$  de IBs sobre el sustrato de silicio terminado en amino se realizó utilizando estampaciones de PDMS (Sylgard 184, Dow Corning, Estados Unidos). Las estampaciones se fabricaron mediante la fundición de una mezcla 10:1 (v/v) de PDMS y agente de curación (Sylgard 184, Dow Corning) contra una base de silicio con un patrón fotolitográfico, se curaron durante 1 hora a  $60^\circ\text{C}$  y se extrajeron a esta temperatura de curación. Las estampaciones de PDMS se dejaron en el horno a  $60^\circ\text{C}$  durante por lo menos 18 horas para asegurar una curación completa. Para los IBs

impresos con  $\mu$ CP, las estampaciones de PDMS se impregnaron con una suspensión de tampón PBS con IB (pH 7,5) durante 40 minutos, se secaron bajo una corriente de nitrógeno y se colocaron en una superficie de sustrato limpio de silicio terminado en amino. Después de un tiempo de contacto de 1 minuto se extrajo la estampación con precaución.

- 5 La fluorescencia de las muestras impresas se analizó utilizando un microscopio de fluorescencia confocal Leica TSC SPE (Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Mannheim, Alemania) después de una excitación a una longitud de onda de 488 nm y se recuperó a una emisión entre 500 y 600 nm (x 10 aire).

#### *Análisis de estabilidad*

- 10 Los IBs formados en células DNak<sup>-</sup> durante 5 horas se diluyeron en PBS con albúmina de suero bovino (BSA) 10 g/l y sacarosa 60 g/l, en presencia de gentamicina 40 mg/l, penicilina 100 U/ml y estreptomycin 10  $\mu$ g/ml, y se incubaron las alícuotas a diferentes temperaturas (37°C, 25°C ó 4°C). A diferentes tiempos, se congelaron las muestras a -80°C hasta la determinación de la fluorescencia. La fluorescencia se registró a 510 nm en un espectrofotómetro de fluorescencia Cary Eclipse (Variant, Inc., Palo Alto, CA) utilizando una longitud de onda de excitación de 450 nm. Los resultados se refieren como el porcentaje de actividad o fluorescencia remanente con respecto a las muestras de control mantenidas a -80°C que eran completamente estables. Otro grupo de muestras se liofilizaron en un liofilizador Cryodos-80, de Telstar, y se guardaron a 4°C ó 25°C hasta su análisis.

#### *Ensayo de proliferación celular*

- 20 Los cuerpos de inclusión con GFP aislados tal como se ha descrito anteriormente se esterilizaron después de 3 horas de producción bajo la exposición a una lámpara germicida de luz UV de 253 nm durante 4 horas. A continuación, se resuspendieron en PBS y se utilizaron diferentes cantidades de proteína IB, concretamente 0,08, 0,8 y 8  $\mu$ g por pocillo para recubrir placas de poliestireno Falcon 3072 de 96 pocillos tratadas con cultivo de tejido (Becton Dickinson) o placas Costar 3370 no tratadas, durante toda la noche a 4°C. Se utilizó Vitronectina (Calbiochem) como referencia a una concentración de 50 ng/cm<sup>2</sup>, siguiendo las instrucciones del fabricante. Los pocillos se lavaron en PBS y se bloquearon con BSA al 3% en PBS durante 1 hora a 37°C. A continuación, se añadieron por pocillo 1,5·10<sup>2</sup> células de una línea celular de riñón de hámster recién nacido (BHK) y se incubaron en Medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) complementado con aminoácidos no esenciales, suero de ternera fetal al 5%, gentamicina y antimicóticos a 37°C a tiempos diferentes. Los pocillos para blancos siguieron exactamente el tratamiento descrito anteriormente, pero se mantuvieron siempre sin IBs.

- 35 Después de la incubación, se determinó la proliferación celular utilizando el kit EZ4U (Biomedica, GmbH) siguiendo las instrucciones del fabricante y se analizó en el lector multimarcaje VICTOR<sup>3</sup> V 1420 (Perkin Elmer). Las absorbancias de lectura fueron 450 nm y 620 nm como referencia y los valores obtenidos se estandarizaron con respecto a los pocillos que contenían sólo medio. Se llevó a cabo un pre-test para seleccionar el tiempo de incubación antes de la saturación con los reactivos del kit; los tiempos óptimos fueron 3 h para cultivos de 24 horas, 2 h para cultivos de 48 horas y 30 min para cultivos de 72 horas. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Los datos se expresaron como la media  $\pm$  SEM de los valores de los tres experimentos llevados a cabo por cada condición y se evaluaron estadísticamente utilizando un test ANOVA, seguido de análisis *post-hoc* de Bonferroni. El nivel de significancia fue  $p < 0,05$ . Para un crecimiento celular en silicio. Las superficies con injertos de IB se cortaron en los tamaños apropiados, se irradiaron con UV y se depositaron en placas de poliestireno Falcon de 24 pocillos con medio de cultivo tejido donde se inocularon y se cultivaron las células bajo procedimientos convencionales.

#### *Análisis por microscopía confocal de cultivos celulares*

- 50 Los cultivos celulares se examinaron utilizando un microscopio Leica TCS SP5 AOBS confocal espectral (Leica Microsystems, Mannheim, Alemania) utilizando una lente Plan-Apochromat 63X 1,4 N.A. Todas las imágenes se obtuvieron de células vivas crecidas en Placas de Base de Vidrio (Mat Tek Corporation, Ashland, MA, Estados Unidos). Las células se sembraron a una densidad de 4 x 10<sup>4</sup>/pocillo en cuerpos de inclusión con GFP, 72 horas antes de la obtención y cultivo en DMEM + Glutamax 1 (Gibco) complementado con suero de albúmina fetal al 10%. Para el mareaje de la membrana nuclear y plasmática, las células se incubaron con 5  $\mu$ g/ml de Hoechst 33342 y 5  $\mu$ g/ml de CellMask (ambos de Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, Estados Unidos), respectivamente, durante 5 minutos a temperatura ambiente y se lavaron dos veces antes de la detección confocal. Los núcleos se excitaron con un haz de diodo láser a 405 nm y se detectaron a 414-461 nm (canal azul); la membrana plasmática se detectó mediante la excitación con luz de un láser de helio y neón a 633 nm y se detectó la fluorescencia a 656-789 nm (canal rojo lejano); finalmente, se utilizó una línea de 488 nm de un láser de argón para obtener imágenes de IBs (canal verde, emisión = 500-537 nm). Las series Z de 22 secciones ópticas se recogieron en un intervalo de 0,6  $\mu$ m. Las capas en Z se obtuvieron con el software LAS AF (Leica Microsystems) y se generaron modelos tridimensionales utilizando el software Imaris (Bitplane, Zürich, Suiza).

#### *Resultados y discusión*

- 65 Los IBs formados por proteína verde fluorescente (GFP) son modelos muy convenientes para un análisis cinético y funcional de su producción biológica, ya que son altamente fluorescentes<sup>20</sup>. Después de la adición en el cultivo bacteriano de IPTG, análogo de la lactosa, los IBs eran claramente visibles mediante microscopía confocal 1 hora después de la inducción de la expresión de gen GFP (figura 1A) y crecieron volumétricamente hasta alrededor de 3

horas durante la síntesis de GFP recombinante, permitiendo la recogida de IBs en un amplio espectro de tamaños. Bajo condiciones estándar de crecimiento bacteriano en el laboratorio sin ningún esfuerzo por mejorar, la producción fue superior a 5 mg/L después de 3 horas (resultado no mostrado), un dato muy prometedor para un escalado práctico. Además, diferentes cepas de *E. coli*, deficientes en chaperonas o proteasas, producen IBs de diferente tamaño (figura 1B) con los mismos rendimientos, debido a la diferente dinámica de la deposición de proteínas *in vivo* en las mismas <sup>16,17</sup>. Aunque los IBs maduros purificados de células naturales mostraron un diámetro promedio de 340 nm (compatible con estimaciones independientes<sup>21</sup>), dicho valor se puede incrementar progresivamente mediante el uso de células mutantes hasta más de 500 nm (en células deficientes DnaK<sup>-</sup>) (figura 1C), con un índice de polidispersión relativamente bajo en todas las muestras analizadas. La emisión de fluorescencia por partícula también se determinó en IBs purificados mediante citometría de flujo y se observó un intervalo definido desde nanopartículas con fluorescencia baja (cepa natural) hasta nanopartículas con fluorescencia elevada (cepa mutante ClpP<sup>-</sup>) (figura 1D). A continuación, la combinación apropiada entre el tiempo de recogida durante el proceso de producción (que determina la etapa de crecimiento de IB) y la cepa productora (que determina tanto la actividad biológica como el límite de tamaño superior) definiría las dimensiones de partícula y fluorescencia concretas que podrían ser más adecuadas para diferentes aplicaciones. Por ejemplo, los IBs obtenidos en Células ClpA<sup>-</sup> y ClpP<sup>-</sup>, con un tamaño de partícula muy similar (0,435 y 0,459 nm, respectivamente), mostraron diferentes niveles de emisión de fluorescencia (71 y 184 unidades FL1 promedio por partícula, respectivamente). Sin embargo, el mapeo de la fluorescencia de IBs con GFP era comparable en todas las cepas, mostrando un patrón fluorescente central homogéneo común (figura 1B).

Para caracterizar adicionalmente la morfología de IBs a nivel de nanoescala, se investigó mediante AFM y SEM. Tal como se observa en la figura 2 A,B,C, la AFM de IBs con GFP naturales muestra la presencia de partículas aisladas de forma esférica o cilíndrica con tamaños promedio de 300 nm de longitud, 170 nm de diámetro y 200 nm de altura. Las mediciones de sección transversal realizadas confirmaron los datos estadísticos obtenidos a partir de las mediciones de DLS (figura 1C). Las observaciones de SEM estaban en la línea de las imágenes de AFM, revelando una superficie de IB rugosa y acentuando la diferencia de tamaño entre IBs obtenidos en células naturales y DnaK<sup>-</sup> (figura 2D). Las mediciones de potencial Z realizadas en una suspensión de IB recién preparada mostraron un valor de potencial Z de -9,8 mV que es indicativo de la superficie cargada de forma ligeramente negativa y está de acuerdo con la tendencia de las proteínas de formar agregados. Por otro lado, se investigó la estabilidad de IBs bajo condiciones de almacenamiento utilizadas habitualmente para muestras biológicas. Se observó que los IBs eran completamente estables durante largos periodos de tiempo con respecto tanto a la emisión de fluorescencia como a la estructura a -80°C, 4°C, 25°C y también a 37°C (figura 2E,F), lo cual permite no sólo la conservación, sino también el uso conveniente y la manipulación de IBs bajo condiciones de ensayo fisiológico. De forma interesante, los IBs eran también mecánica y funcionalmente estables durante la liofilización (y bajo condiciones de almacenamiento diferentes adicionales, figura 2F) y sonicación (no mostrado), expandiendo sus potenciales usos bajo diversas condiciones experimentales.

Dado que los IBs bacterianos muestran una fácil capacidad de manipulación y son materiales totalmente biocompatibles, se investigó su potencial aplicabilidad para fines biomédicos mediante la realización de un ejercicio sencillo. En la generación de tejidos para medicina regenerativa, la unión y proliferación celular se pueden estimular a través de la modificación topográfica de las propiedades de la superficie del material mediante grabado, litografía y procedimientos similares, dependiendo de la naturaleza del propio material. Recientemente, otras estrategias basadas en la funcionalización de superficies con materiales <sup>22,23,24,25</sup> o en su decoración con nanopartículas también permitían un ajuste fino de la textura de la superficie y la rugosidad independientemente de la naturaleza del material utilizado para estimular la unión celular <sup>26,27</sup>. En este contexto, las nanopartículas de sílica y cerámicas de entre 24 y 1500 nm de diámetro afectan a las funciones de crecimiento celular y pueden modular de manera positiva la proliferación celular en superficies decoradas<sup>24,26</sup>. Dado que nos cuestionamos si los IBs bacterianos que aparecen en este intervalo de tamaños podrían también ser útiles para la nanomanipulación de superficies, se ensayó el efecto de IBs con GFP, una vez depositados en placas de poliestireno tratadas con cultivo de tejido (figura 3A), en el crecimiento de células BHK21 (figura 3B, C). A una densidad de 0,05 partículas/ $\mu\text{m}^2$ , los IBs mostraron una rugosidad de raíz media cuadrada (RMS) de 55,9 nm. En dicha superficie modificada, las células BHK21 crecieron íntimamente unidas a los IBs con GFP depositados, tal como se observa mediante la aparición de tinción en la membrana celular (marca roja) y fluorescencia de IB (marca verde), dando lugar a señales amarillentas (figura 3B). Curiosamente, en la superficie de poliestireno, que está ampliamente optimizada para la adhesión y el crecimiento celular, un agente de unión celular convencional, tal como la vitronectina, no presentaba efectos detectables en la proliferación celular (Figura 3D,E). Sin embargo, bajo dichas condiciones favorables, los IBs aún estimulaban de manera significativa la proliferación celular (figura 3D) dependiendo de la dosis (Figura 3E), hasta más de dos veces. Este efecto era mucho más pronunciado y biológicamente significativo que los ligeros o nulos efectos observados con otras nanopartículas, que a tamaños definidos y para algunas líneas celulares parecen mostrar efectos inhibidores en lugar de efectos estimuladores <sup>26,28,29</sup>. De forma interesante, no se observaron efectos citopáticos ni síntomas de toxicidad en las células cultivadas después de crecer en superficies tratadas con IB. Un análisis 3D de imágenes confocales (figura 3F) mostró IBs unidos a poliestireno totalmente integrados en las membranas celulares, indicando una interacción íntima entre las superficies celulares y las nanopartículas de IB que decoran la superficie del crecimiento celular.

Con el fin de demostrar adicionalmente la validez de los IBs como estimuladores de la proliferación celular, se realizó una microestructuración de los IBs en un sustrato de silicio terminado en amino <sup>30,31</sup> utilizando la técnica de impresión por microcontacto ( $\mu\text{CP}$ ) que implica la impregnación de una estampación elastomérica con una suspensión de los IBs. La figura 3G muestra la superficie de silicio estampada con IBs en una densidad de 0,04 IBs/ $\mu\text{m}^2$  y una rugosidad RMS de 32,4 nm, así como la consecuente estimulación de la proliferación celular en las regiones linealmente decoradas con IBs. Esto indica la preferencia por un crecimiento celular inducido por IBs y la capacidad de estas

nanopartículas para estimular la proliferación celular en superficies inicialmente no adecuadas para el crecimiento celular.

En resumen, los IBs producidos en bacterias se pueden diseñar con precisión durante la producción biológica con respecto a importantes características a nivel de nanoescala y son materiales nanoparticulados fascinantes producidos mediante procesos económicos por los sistemas biológicos. Al ser biofuncionales por naturaleza y dado que la proteína que los forma se puede seleccionar y que la su actividad biológica puede ser modulada mediante la modificación genética de la célula productora, la manipulación de IBs podría tener amplias y profundas implicaciones en diferentes campos nanomédicos. En particular, y como primera prueba de concepto de aplicabilidad biomédica, los IBs funcionalizan de manera eficaz superficies favoreciendo de este modo de manera significativa la proliferación de células de mamífero unidas.

## Referencias

1. Villaverde, A. & Carrio, M. M. Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies. *Biotechnol Lett* **25**, 1385-1395 (2003).

2. Carrio, M. M., Cubarsi, R. & Villaverde, A. Fine architecture of bacterial inclusion bodies. *FEBS Lett* **471**, 7-11 (2000).

3. Arie, J. P., Miot, M., Sassoon, N. & Betton, J. M. Formation of active inclusion bodies in the periplasm of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **62**, 427-437 (2006).

4. Bowden, G. A., Paredes, A. M. & Georgiou, G. Structure and morphology of protein inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Biotechnology (N. Y.)* **9**, 725-730 (1991).

5. Carrio, M. M., Corchero, J. L. & Villaverde, A. Dynamics of *in vivo* protein aggregation: building inclusion bodies in recombinant bacteria. *FEMS Microbiol Lett* **169**, 9-15 (1998).

6. Neubauer, P., Fahnert, B., Lilie, h. & Villaverde, A., pp. 237-292(2006).

7. Baneyx, F. & Mujacic, M. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nat. Biotechnol.* **22**, 1399-1408 (2004).

8. Ventura, S. & Villaverde, A. Protein quality in bacterial inclusion bodies. *Trends Biotechnol.* **24**, 179-185 (2006).

9. Carrio, M., Gonzalez-Montalban, N., Vera, A., Villaverde, A. & Ventura, S. Amyloid-like properties of bacterial inclusion bodies. *J. Mol. Biol.* **347**, 1025-1037 (2005).

10. Wang, L., Maji, S. K., Sawaya, M. R., Eisenberg, D. & Riek, R. Bacterial inclusion bodies contain amyloid-like structure. *PLoS. Biol.* **6**, e195 (2008).

11. Garcia-Fruitos, E., Aris, A. & Villaverde, A. Localization of functional polypeptides in bacterial inclusion bodies. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 289-294 (2007).

12. Nahalka, J., Dib, I. & Nidetzky, B. Encapsulation of *Trigonopsis variabilis* D-amino acid oxidase and fast comparison of the operational stabilities of free and immobilized preparations of the enzyme. *Biotechnol. Bioeng.* **99**, 251-260 (2008).

13. Nahalka, J., Gemeiner, P., Bucko, M. & Wang, P. G. Bioenergy beads: a tool for regeneration of ATP/NTP in biocatalytic synthesis. *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* **34**, 515-521 (2006).

14. Nahalka, J., Vikartovska, A. & Hrabarova, E. A crosslinked inclusion body process for sialic acid synthesis. *J. Biotechnol.* **134**, 146-153 (2008).

15. Nahalka, J. Physiological aggregation of maltodextrin phosphorylase from *Pyrococcus furiosus* and its application in a process of batch starch degradation to alpha-D: -glucose-1-phosphate. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **35**, 219-223 (2008).

16. Carrio, M. M. & Villaverde, A. Role of molecular chaperones in inclusion body formation. *FEBS Lett* **537**, 215-221 (2003).

17. Garcia-Fruitos, E. *et al.* Divergent Genetic Control of Protein Solubility and Conformational Quality in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **374**, 195-205 (2007).

18. Sambrook, J., Fritsch, E. & Maniatis, T. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. 1989. Ref Type: Generic.



19. **Thomas, J. G. & Baneyx, F.** Roles of the *Escherichia coli* small heat shock proteins IbpA and IbpB in thermal stress management: comparison with ClpA, ClpB, and HtpG *In vivo*. *J Bacteriol* **180**, 5165-5172 (1998).
20. **Garcia-Fruitos, E. et al.** Aggregation as bacterial inclusion bodies does not imply inactivation of enzymes and fluorescent proteins. *Microb. Cell Fact.* **4**, 27 (2005).
21. **Margreiter, G., Messner, P., Caldwell, K. D. & Bayer, K.** Size characterization of inclusion bodies by sedimentation field-flow fractionation. *J. Biotechnol.* **138**, 67-73 (2008).
22. **Suci, P. A., Klem, M. T., Arce, F. T., Douglas, T. & Young, M.** Assembly of multilayer films incorporating a viral protein cage architecture. *Langmuir* **22**, 8891-8896 (2006).
23. **Ludden, M. J., Mulder, A., Tampe, R., Reinhoudt, D. N. & Huskens, J.** Molecular printboards as a general platform for protein immobilization: a supramolecular solution to nonspecific adsorption. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **46**, 4104-4107 (2007).
24. Masaki **Uchida**, Michael T. **Klem**, Mark **Alien**, Peter **Suci**, Michelle **Flenniken**, Eric **Gillitzer**, Zachary **Varpness**, Lars O. **Liebold**, Mark **Young**, and Trevor **Douglas**, Biological Containers: Protein Cages as Multifunctional Nanoplatfoms, *Adv. Mater.*, **19**, 1025-1042 (2007).
25. Dawn M. **Yanker** and Joshua A. **Mauer**, Direct printing of trichlorosilanes on glass for selective protein adsorption and cell growth, *Mol. Biosyst.*, **4**, 502-504 (2008).
26. **Lipski, A. M., Pino, C. J., Haselton, F. R., Chen, I. W. & Shastri, V. P.** The effect of silica nanoparticle-modified surfaces on cell morphology, cytoskeletal organization and function. *Biomaterials* (2008).
27. **El-Ghannam, A. R. et al.** Model surfaces engineered with nanoscale roughness and RGD tripeptides promote osteoblast activity. *J. Biomed. Mater. Res. A* **68**, 615-627 (2004).
28. **Dulgar-Tulloch, A. J., Bizios, R. & Siegel, R. W.** Human mesenchymal stem cell adhesion and proliferation in response to ceramic chemistry and nanoscale topography. *J. Biomed. Mater. Res. A* (2008).
29. **Samaroo, H. D., Lu, J. & Webster, T. J.** Enhanced endothelial cell density on NiTi surfaces with sub-micron to nanometer roughness. *Int. J. Nanomedicine.* **3**, 75-82 (2008).
30. Dorota I. **Rozkiewicz**, Bart Jan **Ravoo**, and David N. **Reinhoudt** Reversible Covalent Patterning of Self-Assembled Monolayers on Gold and Silicon Oxide Surfaces *Langmuir*, **21**, 6337-6343 (2005).
31. Shu-Han **Hsu**, David N. **Reinhoudt**, Jurrian **Huskens**, and Aldrik H. **Velders**, Imidazolide monolayers for reactive microcontact printing, *J. Mater. Chem.*, **18**, 4959-4963 (2008).
32. **Kane, R. S., Takayama, S., Ostuni, E., Ingber, D. E. & Whitesides, G. M.** Patterning proteins and cells using soft lithography. *Biomaterials* **20**, 2363-2376 (1999).
33. **Renault, J. P. et al.** Fabricating microarrays of functional proteins using affinity contact printing. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **41**, 2320-2323 (2002).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Cuerpo de inclusión aislado que comprende un polipéptido **caracterizado** porque el cuerpo de inclusión está en forma particulada.
2. Cuerpo de inclusión aislado según la reivindicación 1, en el que la forma particulada tiene un tamaño de partícula entre 24 y 1500 nm.
- 10 3. Cuerpo de inclusión aislado según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que la partícula está en forma amorfa hidratada.
4. Cuerpo de inclusión aislado según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el polipéptido es un polipéptido quimérico que comprende una proteína viral fusionada de manera traduccional con una proteína informadora.
- 15 5. Cuerpo de inclusión aislado según la reivindicación 4, en el que la proteína viral es una proteína de la cápside.
6. Cuerpo de inclusión aislado según cualquiera de las reivindicaciones 4-5, en el que la proteína informadora es una proteína fluorescente.
- 20 7. Composición que comprende el cuerpo de inclusión según cualquiera de las reivindicaciones 1-6 y una célula eucariota.
8. Composición según la reivindicación 7, en la que la célula eucariota es una célula de mamífero.
- 25 9. Composición que comprende el cuerpo de inclusión según cualquiera de las reivindicaciones 1-6 y un tejido de animal o planta.
10. Cuerpo de inclusión aislado según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el cuerpo de inclusión se deposita sobre una placa tratada con cultivo de tejido.
- 30 11. Cuerpo de inclusión aislado según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el cuerpo de inclusión se deposita sobre un sustrato de silicio.
- 35 12. Cuerpo de inclusión aislado según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el cuerpo de inclusión se incorpora dentro de un andamiaje tridimensional de tipo sintético o natural.
13. Uso del cuerpo de inclusión aislado según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, 10-12, como estimulador de la proliferación de células eucariotas.
- 40 14. Uso del cuerpo de inclusión aislado según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, 10-12, como regenerador de tejido.
- 45 15. Cuerpo de inclusión aislado según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, 10-12, para su uso como medicamento.
16. Célula bacteriana que comprende el cuerpo de inclusión tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-6.
- 50 17. Célula bacteriana según la reivindicación 16, en la que la célula bacteriana es *Escherichia Coli*.
18. Célula bacteriana según la reivindicación 17, en la que *E. coli* se selecciona entre *E. coli* de cepa salvaje o una cepa mutante.

55

60

65

**FIGURA 1A**

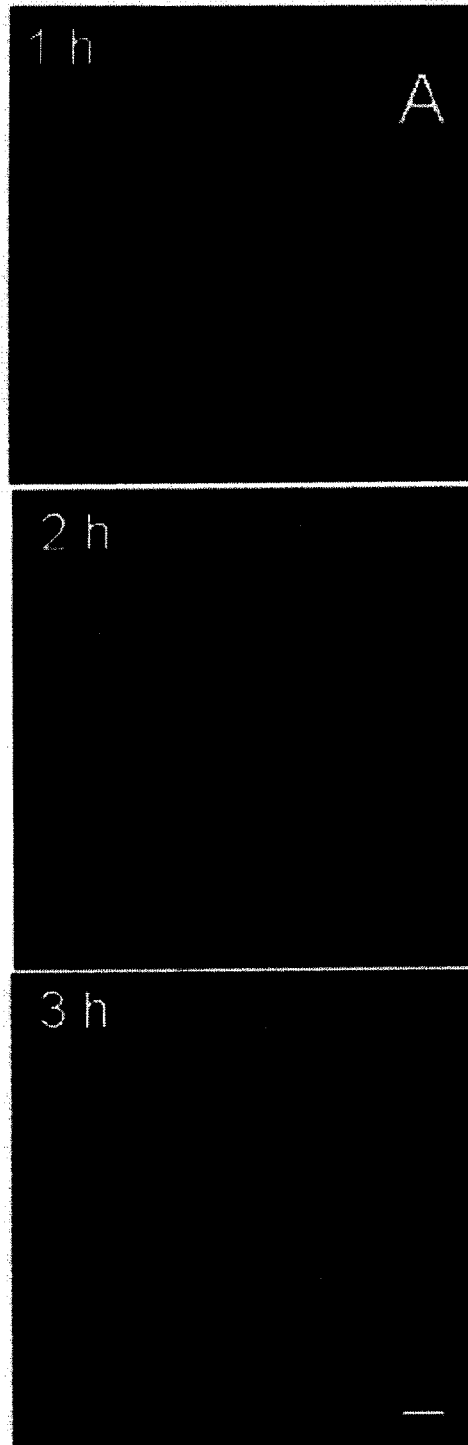
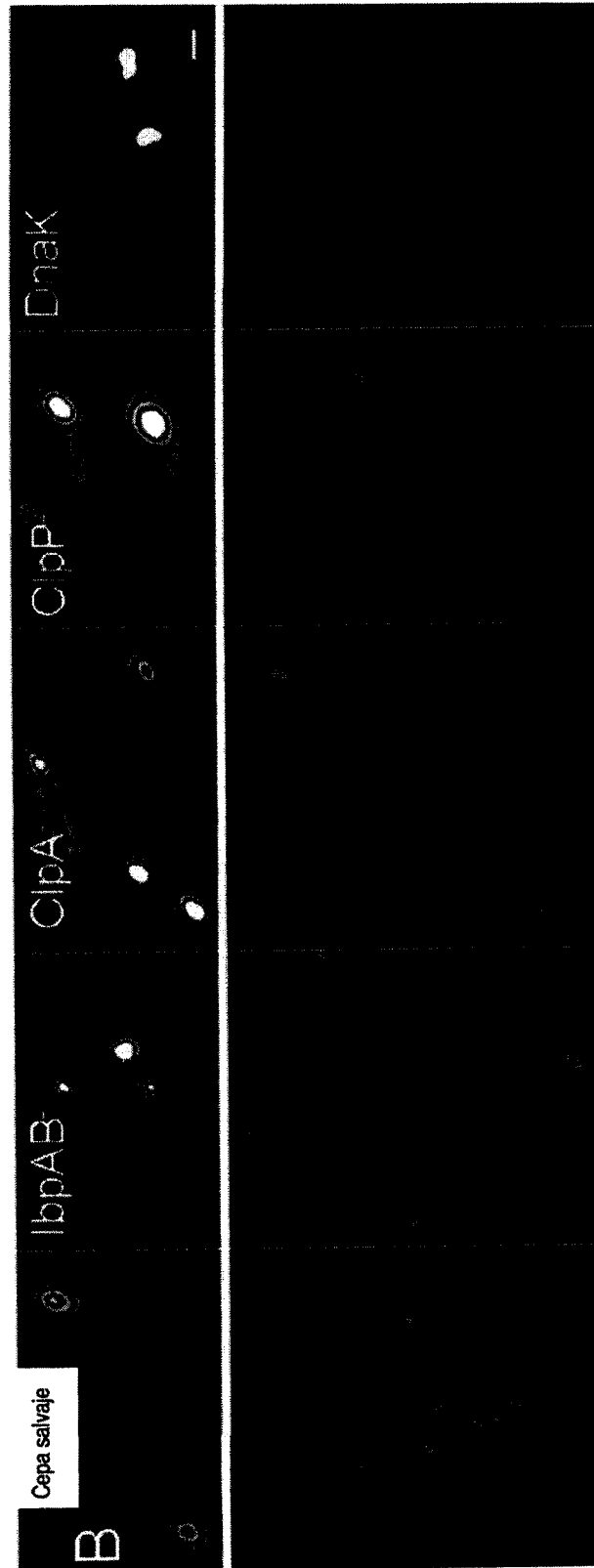


FIGURA 1B



**FIGURA 1C**

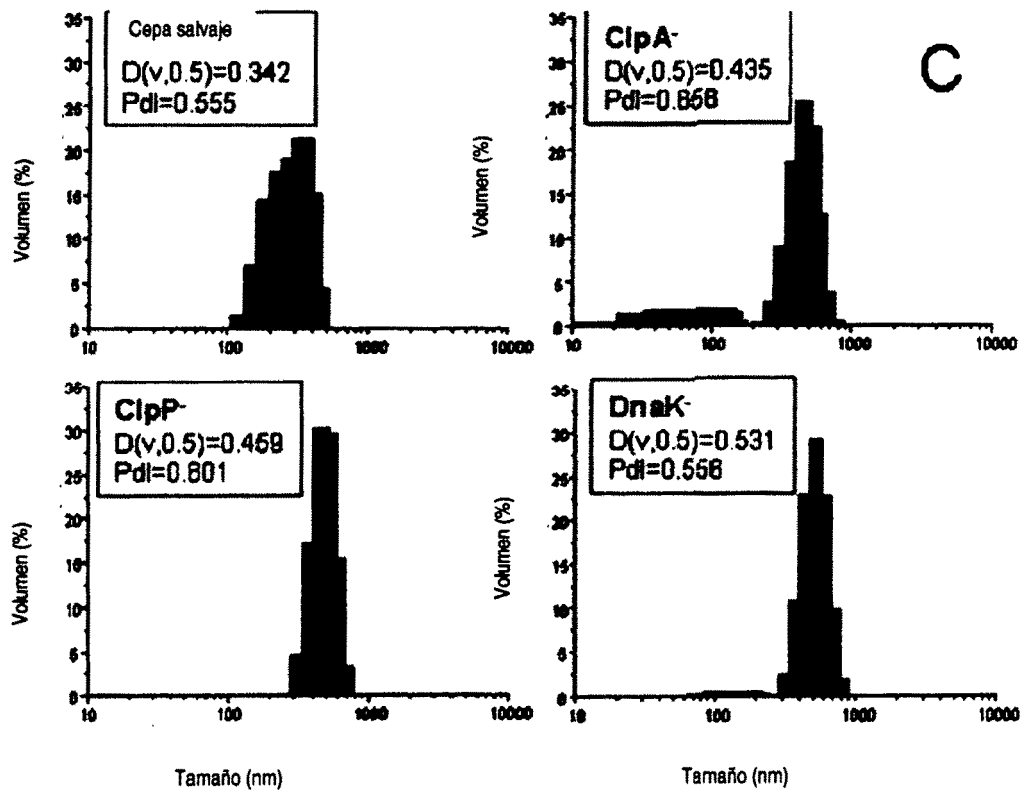
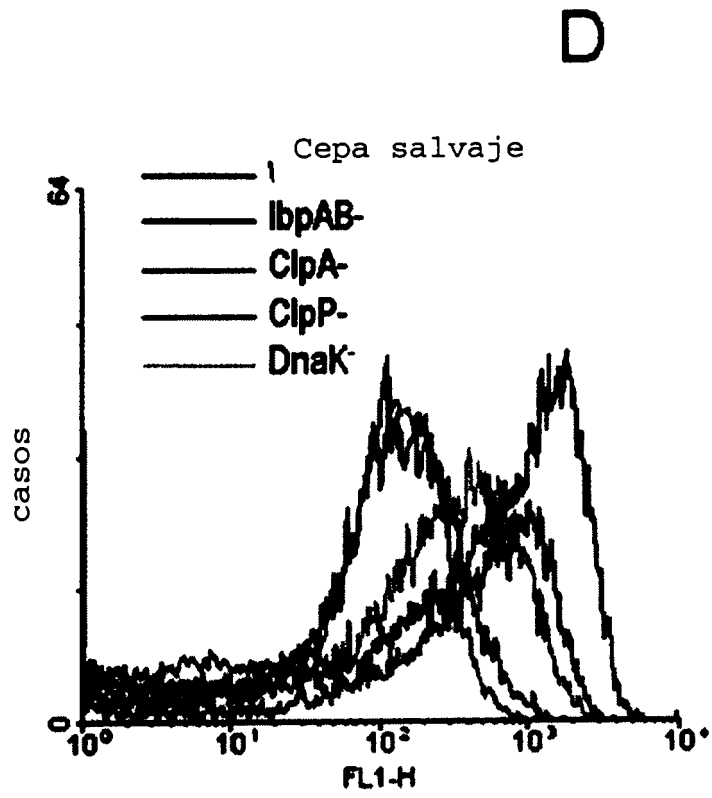


FIGURA 1D



FIGURAS 2A y 2B

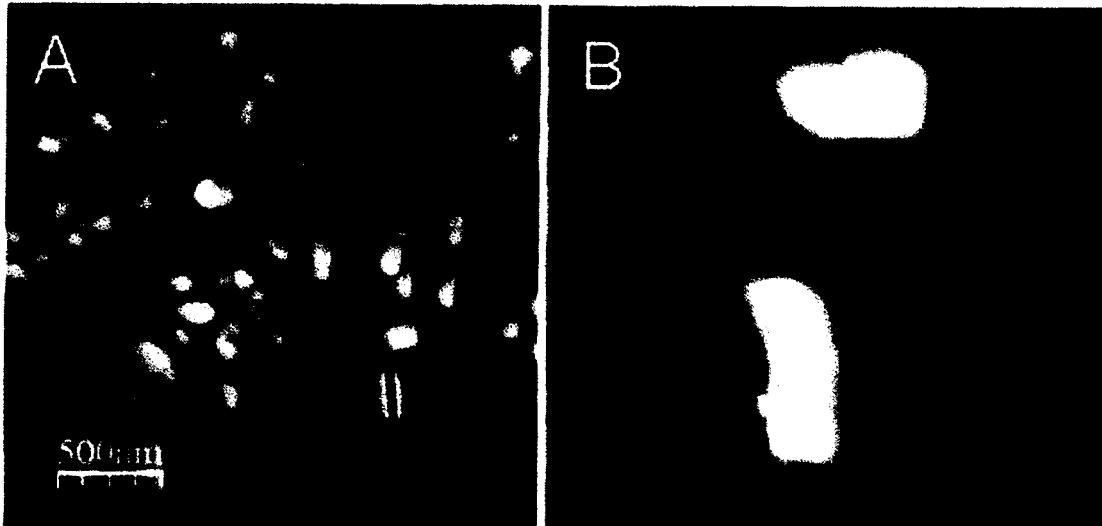
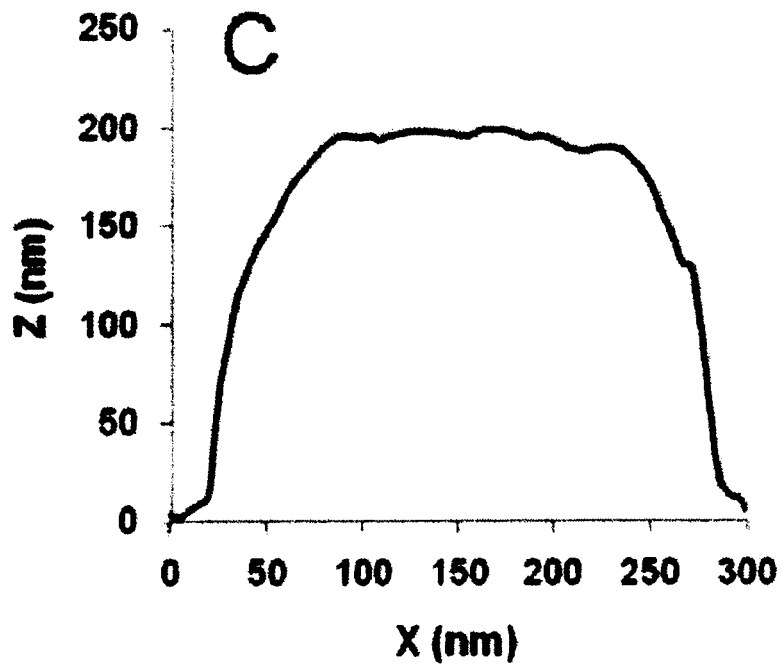


FIGURA 2C



**FIGURA 2D**

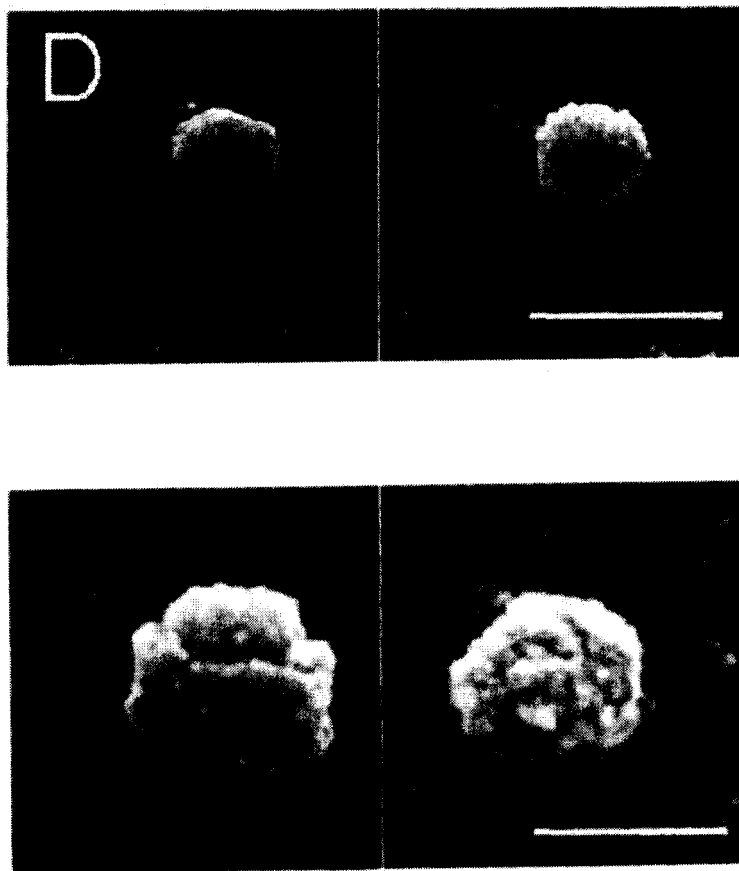
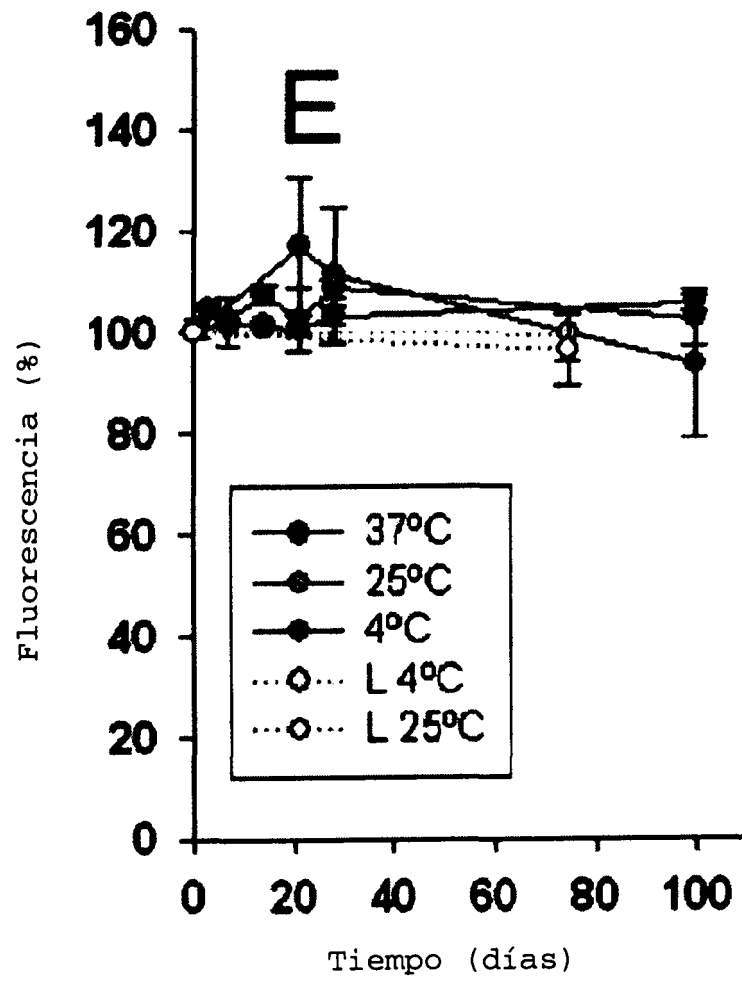
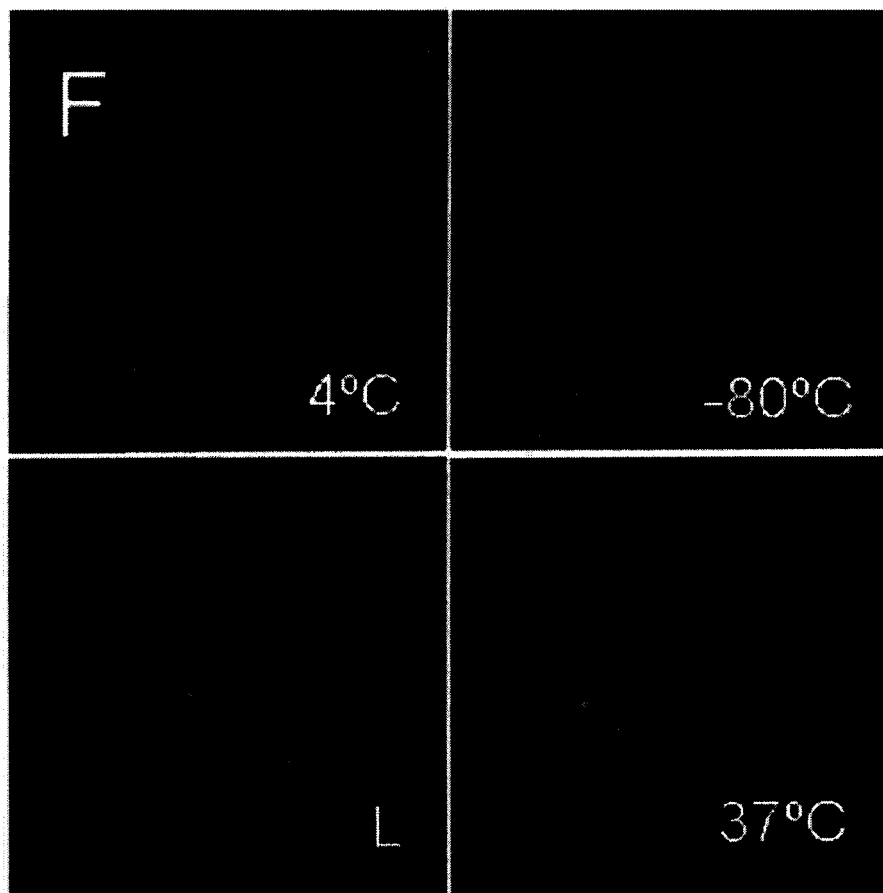




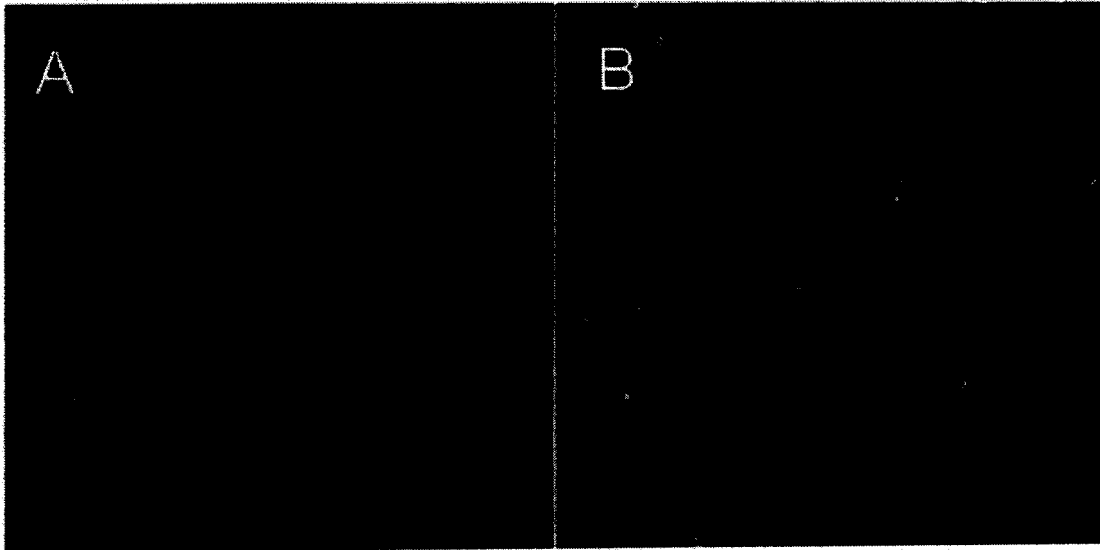
FIGURA 2E



**FIGURA 2F**



**FIGURAS 3A y B**



**FIGURA 3C**



FIGURA 3D

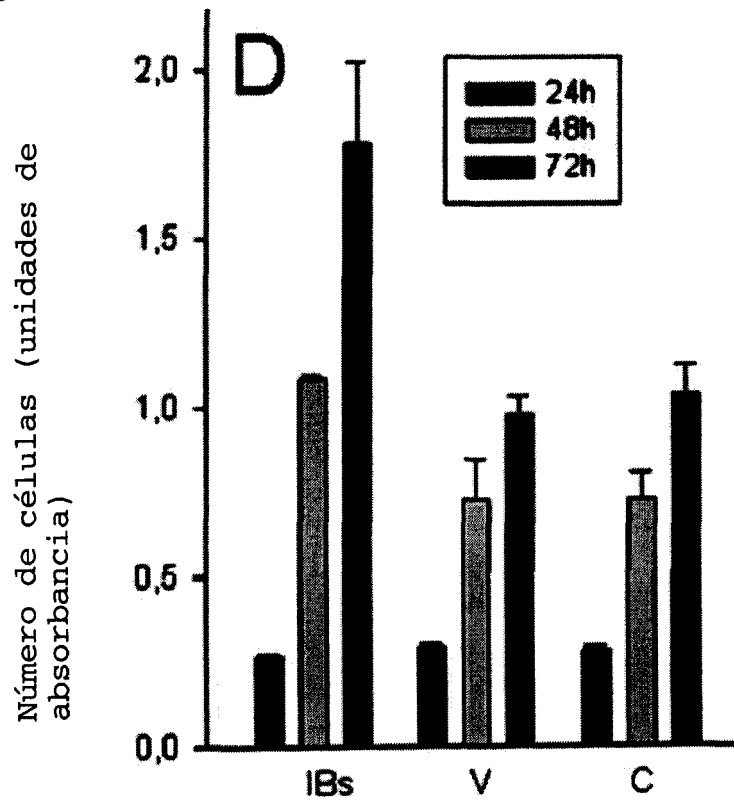
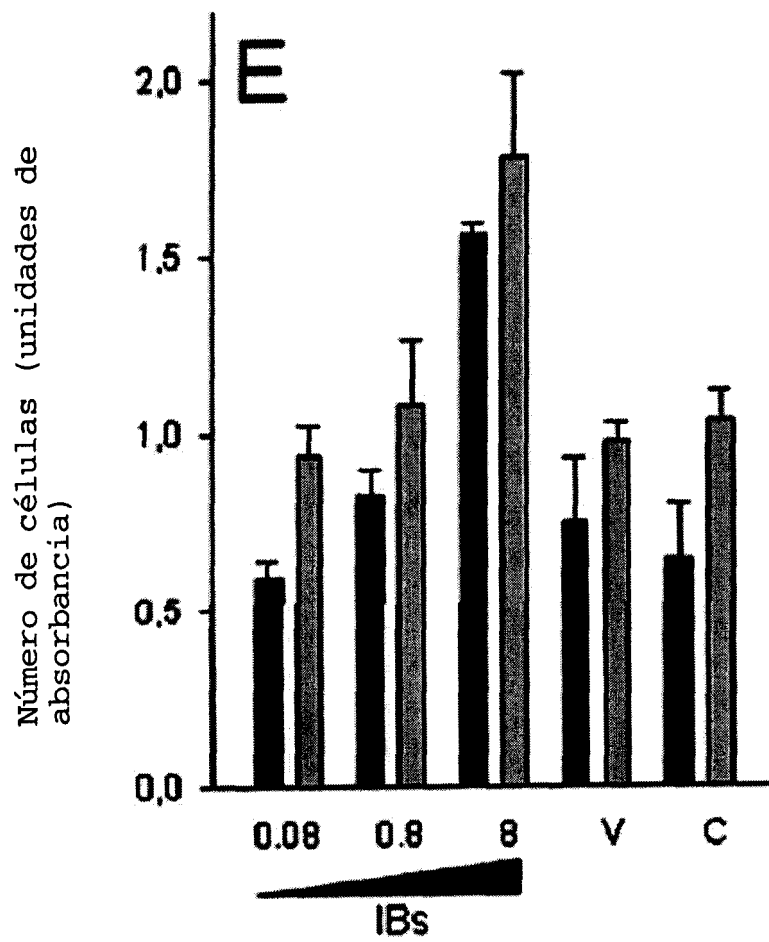


FIGURA 3E



**FIGURA 3F**



**FIGURA 3G**

**G**





OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud:200900045

②② Fecha de presentación de la solicitud: 30.12.2008

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X A	JEONG HYUN SEO et al. "Baculoviral polyhedrin as a novel fusion partner for formation of inclusion body in Escherichia coli" BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, vol. 84, no. 4, 20.11.2003, páginas 467-473. Resumen, páginas 467-470,472. Página 472.	1-6,10-12,15-18  7-9,13,14
X A	KWANG KOOK LEE et al. "Abnormal cell division caused by inclusion bodies in E. coli; increased resistance against external stress" MICROBIOLOGICAL RESEARCH, vol.163, 15.07.2008, páginas 394-402. Resumen, páginas 394-396,400,401. Páginas 400-401.	1-6,10-12,15-18  7-9,13,14
A	DAVID D.CHOIE et al. "Cell proliferation in rat kidneys after prolonged treatment with lead" AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY, vol. 68, no. 2, 1972, páginas 359-370. Resumen, páginas 362,364-365.	1-18
A	ANNA M. LIPSKI et al. "The effect of silica nanoparticle-modified surfaces on cell morphology, cytoskeletal organization and function" BIOMATERIALS, vol.29, 01.10.2008, páginas 3836-3846. Resumen, páginas 3836-3837,3839,3841-3843,3845.	1-18

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  
17.12.2010

Examinador  
S. González Peñalba

Página  
1/5



CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**C12P21/02** (01.01.2006)

**C12N15/62** (01.01.2006)

**C07K14/00** (01.01.2006)

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

C12P, C12N, C07K

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, MEDLINE, EMBASE, XPESP

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 17.12.2010

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 7-9, 13, 14	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1-6, 10-12, 15-18	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 7-9, 13, 14	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1-6, 10-12, 15-18	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	JEONG HYUN SEO et al. "Baculoviral polyhedrin as a novel fusion partner for formation of inclusion body in Escherichia coli" BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, vol. 84, no. 4, 20.11.2003, páginas 467-473. Resumen, páginas 467-470,472.	
D02	página 472	
D03	KWANG KOOK LEE et al. "Abnormal cell division caused by inclusion bodies in E. coli; increased resistance against external stress" MICROBIOLOGICAL RESEARCH, vol.163, 15.07.2008, páginas 394-402. Resumen, páginas 394-396,400,401.	
D04	páginas 400-401	
D05	DAVID D.CHOIE et al. "Cell proliferation in rat kidneys after prolonged treatment with lead" AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY, vol. 68, no. 2, 1972, páginas 359-370. Resumen, páginas 362,364-365.	
D06	ANNA M. LIPSKI et al. "The effect of silica nanoparticle-modified surfaces on cell morphology, cytoskeletal organization and function" BIOMATERIALS, vol.29, 01.10.2008, páginas 3836-3846. Resumen, páginas 3836-3837,3839,3841-3843,3845.	

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

La presente solicitud de patente hace referencia a un cuerpo de inclusión aislado que comprende un polipéptido quimérico formado por una proteína viral fusionada con una proteína informadora (proteína fluorescente), a sus composiciones, a su uso y a la célula bacteriana que comprende dicho cuerpo de inclusión.

**NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA. LP ARTS 6 Y 8**

El documento D01 hace referencia a la expresión de una proteína polihedrin (procedente del virus AcNPV) recombinante, fusionada con la proteína verde fluorescente (GFP) que se expresó como cuerpo de inclusión en células bacterianas de Escherichia coli (resumen y páginas 467-469). Se divulga también, que la cepa que expresa proteína de fusión polihedrin-GFP muestra mayor crecimiento celular y densidad celular máxima. Pero no se ha podido demostrar que la formación del cuerpo de inclusión tenga efectos positivos sobre el crecimiento celular (página 472: discussion).

El documento D02 se refiere a la división celular anormal causada por cuerpos de inclusión en Escherichia coli que da lugar a un aumento de resistencia contra el estrés externo. Dicho artículo muestra que la formación de cuerpos de inclusión induce interconexión entre las células, dando lugar a células con una velocidad de crecimiento normal, pero con mayor grado de agrupamiento celular, lo que mejora la resistencia al estrés in vitro.

El documento D03 describe la proliferación celular en riñones de rata después de tratamiento prolongado con plomo. En las ratas tratadas, aproximadamente el 40% de las células tubulares proximales contenían inclusiones intranucleares. Las células con inclusiones intracelulares pueden replicar DNA (página 359). Los cuerpos de inclusión nuclear contenían tanto proteínas como plomo.

EL documento D04 hace referencia al efecto que producen las superficies modificadas con nanopartículas de sílice sobre los procedimientos celulares tales como proliferación, apoptosis y diferenciaciones. Describe que las características superficiales (rugosidad) de los biomateriales empleados alteran el comportamiento celular a muchos niveles. Demostrando que la rugosidad de las superficies formadas por partículas pequeñas (50 nm) tiende a favorecer la proliferación celular frente a la rugosidad proporcionada por partículas de mayor tamaño (300 nm) (página 3839, párrafo 3.3).

Por lo tanto a la vista de los documentos citados, las reivindicaciones 1-6 sobre cuerpos de inclusión que comprenden una proteína viral fusionada con una proteína informadora carecen de novedad y actividad inventiva por encontrarse dichos cuerpos de inclusión ya recogidos en el estado de la técnica (véase D01, resumen, página 467-470). En cuanto a las reivindicaciones 10-12, considerándolas también como reivindicaciones de producto (cuerpos de inclusión) carecen asimismo de novedad y actividad inventiva por la existencia de dichos cuerpos de inclusión, no considerándose características técnicas de los mismos el hecho de que se depositen sobre una placa tratada con cultivo de tejido o sobre un sustrato de silicio o se incorporen dentro de un andamiaje tridimensional de tipo sintético o natural. Y lo mismo sucede con la reivindicación 15 relativa a cuerpo de inclusión para su uso como medicamento; su uso como medicamento no sería una característica técnica del cuerpo de inclusión como producto, por lo que carecería de novedad y actividad inventiva, ya que dicho cuerpo de inclusión se encuentra recogido en el estado de la técnica. En relación con las reivindicaciones 16-18 que hacen referencia a la célula bacteriana (E.coli) que comprende el cuerpo de inclusión también se encuentra divulgada en el documento D01 (resumen, página 467-470).

Por otro lado, las reivindicaciones 13 y 14 relativas al uso del cuerpo de inclusión como estimulador de la proliferación de células eucarióticas, y su uso como regenerador de tejido, sí tendrían novedad y actividad inventiva, por no haberse encontrado dicho uso divulgado en el estado de la técnica. Tan sólo se hace referencia en el documento D01 que la cepa que expresa proteína de fusión muestra mayor crecimiento y densidad celular, pero no se ha podido demostrar que la formación de cuerpos de inclusión tenga efectos positivos sobre el crecimiento celular (página 472: discussion). En el documento D02 dice que la formación de cuerpos de inclusión induce interconexión entre células, dando lugar a células con una velocidad de crecimiento normal, pero con mayor grado de agrupación celular, y el documento D03 recoge que las células con inclusiones intranucleares pueden replicar DNA (página 359).

No se ha encontrado, por lo tanto, ningún documento donde se utilice dicho cuerpo de inclusión para la regeneración de tejido o estimulación de la proliferación celular eucariótica. En cuanto a las reivindicaciones 7-9, sobre composición que comprende el cuerpo de inclusión y una célula eucariótica (de mamífero) y el cuerpo de inclusión y un tejido de animal a planta también tienen novedad y actividad inventiva por no encontrarse divulgadas en el estado de la técnica.

Por lo tanto, las reivindicaciones 1-6 10-12 y 15-18 carecen de novedad y actividad inventiva, mientras que las reivindicaciones 7-9, 13 y 14 cumplen el requisito de novedad y actividad inventiva de acuerdo con la LP arts. 6 y 8.