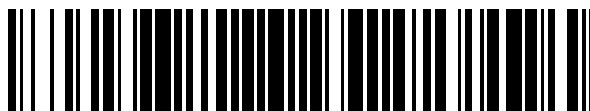


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 390 515**

51 Int. Cl.:
G01N 33/543 (2006.01)
G01N 33/542 (2006.01)
G01N 33/58 (2006.01)
C07K 14/32 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **09100171 .9**
96 Fecha de presentación: **10.03.2009**
97 Número de publicación de la solicitud: **2101175**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.09.2009**

54 Título: **Nanoestructura de orden elevado y sensor y su uso**

30 Prioridad:
10.03.2008 DE 102008014298

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
13.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
13.11.2012

73 Titular/es:
**HELMHOLTZ-ZENTRUM DRESDEN -
ROSSENDORF E.V. (100.0%)
Bautzner Landstrasse 400
01328 Dresden, DE**

72 Inventor/es:
**POLLMANN, KATRIN;
FAHMY, KARIM y
RAFF, JOHANNES**

74 Agente/Representante:
LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 390 515 T3

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

DESCRIPCIÓN

Nanoestructura de orden elevado y sensor y su uso.

5 La presente invención se refiere a una estructura de orden elevado y a un sensor, en la que o bien en el que están ligados de forma ordenada grupos de moléculas orgánicas, en particular ligandos (tales como, p. ej., aptámeros), que tienen propiedades de unión específicas para una molécula diana, y a su uso.

10 Sectores de aplicación de la invención se encuentran, en particular, en los campos de la biotecnología, la técnica de procedimientos, la técnica medioambiental y farmacia. La estructura de acuerdo con la invención se adecua, en particular, para la producción de biosensores, para la analítica biomédica, para eliminar contaminantes y patógenos, para la analítica del ADN, para la preparación de materiales de filtración, para procedimientos de separación o para catalizadores, y en la terapia médica para el transporte preestablecido de un principio activo a su sitio diana (el denominado "drug targeting" – "fijación de objetivo del fármaco").

15 Grupos de moléculas orgánicas que tienen propiedades de unión específicas para moléculas diana definidas son conocidos del estado de la técnica. Junto a anticuerpos, estos son, en particular, los denominados aptámeros, es decir, oligonucleótidos de cadena sencilla en el intervalo de tamaños entre 25 y 70 nucleótidos, que son identificados, p. ej., mediante procedimientos de selección *in vitro* (también conocidos como procedimientos SELEX) y que, a través de su estructura tridimensional, se unen de manera muy específica a los más diversos compuestos químicos.

20 El documento WO 02/097118 A1 da a conocer un procedimiento para el revestimiento de materiales de soporte con proteínas de la capa S mediante separación electroquímica. El estrato de proteínas de la capa S puede utilizarse como soporte para moléculas funcionales. En tal caso, las moléculas funcionales se ligan a las proteínas de la capa S antes de la separación sobre un sustrato o después de la configuración de una estructura cristalina. En tal caso, las moléculas funcionales se depositan en posiciones que vienen predeterminadas por la estructura cristalina.

25 El documento WO 02/061392 A2 da a conocer un procedimiento y un dispositivo para la detección de analitos en líquidos. Sobre un sustrato se crea una disposición ordenada de sensores con cavidades mediante la tecnología de ataque químico. En éstos se posicionan partículas químicamente sensibles, las cuales son combinadas en una forma de realización con moléculas orgánicas en calidad de receptores y que en el caso de la interacción con el analito emiten una señal óptica.

30 Procedimientos utilizados hasta la fecha para la producción de capas de sensores hacen uso de moléculas individuales que deben ser funcionalizadas a través de una modificación múltiple. Junto a la introducción de una funcionalidad para la unión de la molécula diana y la introducción de otra funcionalidad para la detección (p. ej., una enzima o un colorante fluorescente) son necesarias otras etapas de procedimiento con el fin de disponer las moléculas sobre una capa.

35 Los inconvenientes de los procedimientos utilizados hasta ahora son la elevada complejidad en la creación de superficies que están ocupadas con nanoestructuras regulares y que pueden ser ligadas a los grupos orgánicos, las dificultades en la modificación secuencial y el enlace simultáneo con nanopartículas inorgánicas dispuestas de manera regular. A través de estos procedimientos, la realización de estructuras regulares de distinta periodicidad sólo es posible en parte.

40 Aplicaciones hasta ahora conocidas de proteínas de la capa S para aplicaciones nanobiotecnológicas se reúnen en un Artículo recopilatorio de Sleytr U. B. et al. 2007 (FEMS Microbiol. Lett 267: 131-144). Pleschberger M et al. 2004 (Bioconjugate Chem 15: 664-671) describe la aplicación de una proteína de fusión procedente de una proteína de la capa S y una cadena pesada de un anticuerpo que reconoce el antígeno específico para la próstata (PSA – siglas en alemán) en la espectrometría por resonancia de plasmón de superficie (Surface Plasmon Resonance, SPR) para la detección de PSA.

45 La misión de la invención es proporcionar una estructura en la que estén ligados de manera ordenada grupos de moléculas orgánicas, en particular grupos de moléculas que tienen propiedades de unión específicas (tales como, p. ej., aptámeros) y, con ello, llevar las sustancias ligadas por los grupos de moléculas orgánicas a la proximidad de componentes funcionales con los que entren en interacción específica.

Conforme a la invención, este problema se resuelve mediante las características de la reivindicación principal y de las reivindicaciones subordinadas.

50 Objeto de la invención es una nanoestructura conforme a la reivindicación 1, que contiene:

- a) Proteínas de la capa S a la que están ligados grupos de moléculas orgánicas que presentan propiedades de unión específicas para una molécula diana, y

5 b) nanopartículas inorgánicas y/o colorantes fluorescentes inorgánicos o bien orgánicos u otras biomoléculas, ligados a las proteínas de la capa S, que en calidad de componentes funcionales cumplen diferentes funciones, configurando las proteínas de la capa S un estrato cristalino sobre una superficie de un sustrato o presentándose en un líquido adecuado en forma de suspensión,

en donde los aptámeros de ácidos nucleicos y/o anticuerpos están ligados de manera ordenada a las proteínas de la capa S de modo que llevan a las moléculas diana ligadas a la proximidad de los componentes funcionales que entran en interacción específica con la molécula diana (analito).

10 La nanoestructura forma en tal caso una capa sobre la superficie de un sustrato o una suspensión, preferiblemente en un medio acuoso.

De acuerdo con la invención, a proteínas de la capa S se ligan grupos de moléculas orgánicas que presentan propiedades de unión específicas para una molécula diana. Dado que estas proteínas de la capa S configuran una estructura ordenada, resulta de manera ventajosa una disposición muy ordenada de los grupos de moléculas orgánicas y la posibilidad de la modificación secuencial de la estructura, p. ej. mediante unión secuencial de 15 ligandos.

Los ligandos, es decir, grupos de moléculas que presentan propiedades de unión específicas para una molécula diana, son aptámeros y anticuerpos que hacen posible ligar de manera selectiva la molécula diana a la estructura. El término "anticuerpo" comprende en tal caso también anticuerpos preparados de forma recombinante (tales como p. ej., scFv - fragmento variable de cadena sencilla, siglas en inglés) y otros fragmentos de anticuerpos (tales como, p. ej., los fragmentos Fab y F(ab')₂). 20

De acuerdo con la invención, a las proteínas de la capa S se ligan, además, nanopartículas y/o colorantes fluorescentes inorgánicos o bien orgánicos u otras biomoléculas (tales como, p. ej., enzimas) que, en calidad de componentes funcionales, cumplen diferentes funciones tales como, p. ej., la separación magnética, la descomposición enzimática o bien catalítica, en particular fotocatalítica de la molécula diana o la detección de la 25 molécula diana.

De manera preferida, se utilizan proteínas de la capa S bacterianas de los géneros *Bacillus*, *Geobacillus*, *Lactobacillus*, *Lysinibacillus*, *Deinococcus*, *Sporosarcina*. La particularidad de las proteínas de la capa S consiste en su capacidad de organizarse por sí mismas formando nanoestructuras de orden elevado, las denominadas 30 capas S. En tal caso, los monómeros de las proteínas se reúnen para formar estructuras de la red paracristalinas que pueden presentar distintas simetrías. Éstas pueden ser una simetría oblicua (Figs. 1a, b), una simetría cuadrada (Fig. 1c) o una simetría hexagonal (Fig. 1d, e). Las constantes de la red ascienden a 5 nm hasta 40 nm y, a menudo, a 12 nm hasta 20 nm. Las redes de proteínas poseen poros de un tamaño unitario dispuestos de forma regular, con un diámetro de 2 nm a 8 nm. Con ello, con la capa S está disponible una nanoestructura auto-organizativa compleja que no puede ser creada o sólo puede ser creada con mucha complejidad con medios 35 técnicos.

La estructura de acuerdo con la invención formada por las proteínas de la capa S forma preferiblemente una capa sobre la superficie de un sustrato, preferiblemente vidrio, mica, óxido de magnesio, óxido de aluminio, silicio o dióxido de silicio. Las proteínas de la capa S se recrystalizan, además, en superficies límite a monocapas. Se adecuan para el revestimiento de superficies tales como silicio, vidrio, fibras de carbono. Mediante modificación 40 química tal como, p. ej., amination, silanización, unión de polímeros de la pared celular secundarios (SCWPs – siglas en inglés) o revestimiento con polímeros se favorece una unión estable a superficies y se amplía el espectro de materiales a posibles sustratos. La capa de proteínas es preferiblemente una monocapa (es decir, tiene un espesor de una molécula proteica) o también una doble capa (es decir, tiene el espesor de dos moléculas proteicas).

Alternativamente, las proteínas de la capa S en la estructura de acuerdo con la invención se presentan en un líquido adecuado en una suspensión. En particular, en disoluciones acuosas, las proteínas de la capa S pueden configurar una suspensión estable. Así, monómeros en una disolución proteica cristalizan con el tiempo para formar cristallitos de proteínas de la capa S. En el caso de los cristales resultantes se trata, por norma general, de estructuras planas de una capa o de doble capa, pero también se observa la formación de estructuras tubulares. En tal caso, se forma 50 una suspensión heterogénea de diferentes cristales de la capa S. En tal caso, la velocidad, el tamaño y el tipo de las formas constituidas dependen de numerosos parámetros de la reacción tales como la fuerza iónica, el valor del pH, la temperatura y la concentración de proteínas. Una ventaja resulta debido a que la matriz de las proteínas y las moléculas ligadas a la misma pueden ser obtenidas en forma de precipitado mediante centrifugación a partir de la suspensión.

55 Después del revestimiento de las superficies o bien de la formación de suspensiones por parte de las proteínas de

la capa S tiene lugar la síntesis de nanopartículas ligadas a las proteínas. El acoplamiento de ligandos puede tener lugar, por una parte, antes de la formación de la capa proteica. En este caso, recristalizan los híbridos de la capa S y conservan su función y estructura. Por otra parte, puede tener lugar una unión de ligandos, pero también después del revestimiento de las superficies o de la formación de la suspensión.

- 5 La creación de nanopartículas sobre las proteínas de la capa S tiene lugar preferiblemente mediante la sorción de complejos de metales a partir de una disolución salina con subsiguiente adición de un agente reductor o una disolución de carácter básico (p. ej. amoníaco).

10 La unión de los grupos de moléculas orgánicas y/o biomoléculas (tales como p. ej., de los anticuerpos, aptámeros, moléculas fluorescentes orgánicas o enzimas) a la proteína de la capa S tiene lugar preferiblemente de forma covalente a grupos amino o grupos carboxilo libres de las cadenas laterales de aminoácidos (restos lisina o aspartato o glutamato) de la proteína. Alternativamente, la unión de aptámeros tiene lugar mediante modificación genética de la proteína de la capa S, mediante la introducción de secuencias de unión de ácidos nucleicos en la proteína tales como p. ej., motivos del dedo de zinc.

15 La unión de biomoléculas tales como, p. ej., anticuerpos, enzimas, biomoléculas fluorescentes o luminiscentes, tiene lugar preferiblemente mediante reticulantes a grupos amino o grupos carboxilo libres de las cadenas laterales de aminoácidos (restos lisina o aspartato o glutamato) de la proteína. Alternativamente, esta unión puede tener lugar también, sin embargo, mediante la producción de una proteína de fusión, es decir, mediante modificación genética de la proteína de la capa S.

20 La unión de aptámeros o anticuerpos u otros grupos de moléculas que presentan propiedades de unión específicas para una molécula diana, a las proteínas de la capa S tiene lugar, preferiblemente, después de la unión de las nanopartículas.

25 El uso de aptámeros posibilita ventajosamente la unión de las más diversas moléculas diana a la estructura consistente en proteínas de la capa S y componentes funcionales. Con ello, las estructuras de acuerdo con la invención se adecuan para una pluralidad de aplicaciones. Así, por ejemplo, se conocen aptámeros que pueden unirse a moléculas orgánicas de bajo peso molecular, iones de metales, macromoléculas, proteínas o, incluso, a partículas víricas.

Aptámeros preferidos son, por ejemplo:

Mediante la estructura de acuerdo con la invención pueden detectarse las partículas ligadas a aptámeros, separarse por filtración de una disolución, separarse por centrifugación o incluso disociarse catalíticamente.

5 Las partículas ligadas a los aptámeros pueden desprenderse de nuevo ventajosamente mediante modificación de la concentración salina, de modo que la estructura de acuerdo con la invención puede ser regenerada después de su uso y ser utilizada varias veces.

10 La presente invención describe el desarrollo y uso de materiales híbridos que se auto-organizan, consistentes en proteínas de la capa S naturales o modificadas por tecnología genética, nanopartículas inorgánicas y moléculas orgánicas funcionales tales como, p. ej., aptámeros. La invención se basa en la producción de nanopartículas dispuestas de forma estructurada y en su combinación con moléculas biológicas funcionales o grupos de moléculas orgánicas con el uso de proteínas de la capa S que se auto-organizan en calidad de matriz y enlazador. La invención incluye, además, la inmovilización de los híbridos de nanopartículas-biomoléculas, así producidos, mediante el revestimiento de diversos materiales.

15 Las estructuras multifuncionales de acuerdo con la invención hacen posible, por una parte, una miniaturización de componentes que pueden encontrar aplicación como componentes en el sector de la electrónica, óptica, medicina, técnica de catalizadores y biotecnología. Al mismo tiempo, con este método se inmovilizan grupos de moléculas orgánicas y, de un modo económico y sencillo pasan a formar estructuras de ordenación elevada.

20 La presente invención se basa, por una parte, en la capacidad de proteínas de la envoltura bacterianas o arqueales (proteínas de la capa S) de reunirse por sí mismas para formar estructuras bidimensionales regulares de la red. Estas estructuras paracristalinas de la red comprenden poros de un tamaño unitario, dispuestos de forma regular. Esta disposición especial conduce a relaciones de separación regulares entre grupos de moléculas del monómero, racimos de metales o grupos de moléculas que fueron ligados mediante modificación al monómero. Con ello, con las proteínas de la capa S se encuentran a disposición estructuras complejas que se auto-organizan, que no pueden ser producidas con medios técnicos o sólo lo pueden ser de manera muy compleja.

25 Otra propiedad de las proteínas de la capa S consiste en que forman monocapas en las superficies límite y se adecuan para el revestimiento de superficies.

30 El acoplamiento de grupos de moléculas con nanopartículas puede encontrar aplicación en diferentes sectores de la electrónica, óptica, medicina y biotecnología. Mediante el uso de proteínas de la capa S en calidad de moléculas de enlazador se garantiza la disposición regular de las nanopartículas funcionalizadas con distancias definidas del grupo de moléculas y nanopartículas. Adicionalmente, con las proteínas de la capa S modificadas de este modo pueden revestirse diversos materiales. De esta forma, en un procedimiento comparativamente sencillo y económico pueden producirse estructuras de nanopartículas regularmente funcionalizadas.

35 A partir del principio combinatorio, en el que se fundamentan los agentes de acuerdo con la invención, de la unión de nanopartículas y ligandos o bien moléculas de receptor utilizando proteínas de la capa S como enlazadores, de la posibilidad de revestir diversos materiales con proteínas de la capa S y, con ello, conseguir una disposición estructurada de nanopartículas unidas a ligandos, se ofrecen aplicaciones, cuya diversidad permanece cerrada por lo regular a los agentes habituales. Esto concierne, por una parte, al empleo de estas moléculas híbridas como componente para biosensores. En tal caso, se trata de sensores de medición que se basan en el acoplamiento espacial directo de un sistema biológico (de la molécula funcional) con un transformador de señales y un amplificador electrónico. En la presente invención, las moléculas funcionales entran en interacción específica con los analitos. La proteína de la capa S induce el acoplamiento con un transformador de señales y garantiza una estructuración espacial específica.

40 En una ejecución ventajosa de la invención, a la estructura a base de proteínas de la capa S se unen nanopartículas de magnetita. Con ello, se posibilita ventajosamente separar determinadas sustancias, que se unen específicamente a los aptámeros o anticuerpos de otros ligandos, mediante imanes a partir de una disolución.

45 En esta ejecución de la invención, la estructura se presenta preferiblemente en una suspensión en una disolución acuosa.

Las partículas de magnetita tienen preferiblemente un tamaño medio de partículas de 5 a 20 nm, de manera particularmente preferida de 8 a 15 nm.

50 La producción de las nanopartículas tiene lugar en este caso, preferiblemente, mediante la adición de proteínas de la capa S a una disolución acuosa en la que están disueltas tanto sales de hierro(II) como de hierro(III), y subsiguiente aumento del valor del pH mediante la adición de una base tal como, p. ej., una disolución de amoníaco. La relación de sal de hierro(II) a sal de hierro(III) en la disolución asciende preferiblemente a 0,1 : 1 hasta 10 : 1, de manera particularmente preferida a 0,2 : 1 hasta 5 : 1.

En el sector de la terapia médica resulta, además, la posibilidad de encapsular medicamentos en los tubos de la capa S que están ocupados con nanopartículas magnéticas. Estos medicamentos, administrados en el cuerpo, pueden ser entregados de manera controlada al cuerpo mediante calentamiento inductivo de las nanopartículas.

5 Otra posibilidad de aplicación de las nanopartículas magnéticas ligadas a la capa S se refiere a la descontaminación de agentes patógenos o de gérmenes infecciosos en líquidos. Los gérmenes pueden ser separados selectivamente mediante la unión a los ligandos y pueden ser exterminados o bien inactivados mediante un calentamiento inductivo de las partículas magnéticas.

10 Otro sector de empleo para partículas magnéticas acopladas a la capa S lo representa el sector de la tecnología de la separación, en particular de la técnica de separación por afinidad. Los ligandos hacen posible una unión selectiva de sustratos a partir de una disolución. Mediante la combinación con nanopartículas magnéticas, por una parte estos sustratos pueden separarse de la disolución después de su unión mediante la aplicación de un campo magnético. Con ello, este procedimiento se adecua para la descontaminación, p. ej., de aguas freáticas, pero también de otras aguas contaminadas.

15 Por otra parte, el acoplamiento con nanopartículas magnéticas posibilita sin embargo, también, el calentamiento inductivo de los sustratos ligados y, con ello, su transformación o también su elución del ligando. Procedimientos para la inmovilización de enzimas son de interés, ante todo, en el sector de la biotecnología y la técnica de procedimientos. En este caso, los sustratos son transformados en una disolución mediante las enzimas. La inmovilización de las enzimas mediante el acoplamiento a proteínas de la capa S y en combinación con el revestimiento de superficies, pero también el acoplamiento con partículas magnéticas posibilita la separación de las 20 enzimas del medio, así como su reutilización después de efectuada la conversión de los sustratos.

Otro sector de aplicación es el desarrollo de nuevos catalizadores. Los ligandos acoplados posibilitan una unión selectiva de moléculas diana a partir de una disolución. Estas moléculas pueden transformarse posteriormente mediante las nanopartículas catalíticamente activas contiguas.

25 En otra ejecución ventajosa de la invención, a la estructura se unen moléculas que actúan como catalizadores. Catalizadores particularmente preferidos son en este caso enzimas o nanopartículas que pueden actuar tanto como catalizadores como también como fotocatalizadores.

30 Mediante las enzimas o nanopartículas, las moléculas diana unidas mediante aptámeros o anticuerpos a la estructura son descompuestas catalíticamente de manera ventajosa. Esto tienen lugar, p. ej. en el caso de nanopartículas fotocatalíticas, después de la excitación por parte de la luz. Mediante la irradiación con luz de onda corta se forman en la superficie de las nanopartículas, mediante la disociación fotocatalítica del agua, radicales hidroxilo, adicionalmente puede activarse una molécula de oxígeno adsorbida y formar de esta manera una superoxidación. Ambas conducen en última instancia a la oxidación de las moléculas orgánicas ligadas.

35 Las proteínas de la capa S sirven en este caso como matriz que ponen en contacto entre sí ventajosamente a las moléculas diana y las sustancias catalíticamente activas. Para la excitación de los fotocatalizadores se utiliza preferiblemente luz en el intervalo UV, pero de manera particularmente preferida encuentran aplicación sobre todo aquellos fotocatalizadores que ya pueden ser excitados mediante la luz diurna difusa para la descomposición de las moléculas diana. Con ello, podrían ser descontaminadas de manera ventajosa disoluciones acuosas independientemente de la presencia de una fuente de luz UV.

40 Las nanopartículas catalíticas se eligen preferiblemente de partículas de Pd, Pt, Au y tienen, preferiblemente, un tamaño de partículas de 1-10 nm, de manera particularmente preferida 2-8 nm. La producción tiene lugar mediante la sorción de complejos de metales a partir de una disolución de Pt(II), Pd(II) o Au(III) y la subsiguiente adición de un agente reductor (p. ej., H₂, DMAB, NaBH₄).

45 Las nanopartículas fotocatalíticas se eligen preferiblemente de partículas de ZnO, TiO₂, con o sin dotaciones (p. ej. CaO, CoO) y tienen preferiblemente un tamaño medio de partículas de 5 a 30 nm, de manera particularmente preferida de 10 a 25 nm.

La producción de nanopartículas de ZnO tiene lugar preferiblemente mediante mezclas de proteínas de la capa S y Zn(II) en una disolución acuosa de Zn(II). La formación de partículas de ZnO soportadas por la capa S tiene lugar mediante la adición de una disolución de carácter básico, p. ej. amoníaco, NaOH o hexametilentetraamina.

50 Esta ejecución de la invención se adecua, en particular, para la purificación de agua potable contaminada con fármacos u otras moléculas contaminantes orgánicas. Las aguas freáticas o potables están a menudo contaminadas por residuos de medicamentos tales como diclofenac, carbamazepina o ibuprofeno. Además, se encuentran residuos de antibióticos u hormonas que, a menudo, pasan a emplearse en agricultura.

Para eliminar estas sustancias contaminantes se eligen aptámeros que se unen de manera muy específica a

fármacos, sustancias contaminantes orgánicas tales como antibióticos, plaguicidas u hormonas, biomoléculas tales como, p. ej., proteínas, y patógenos tales como, p. ej., virus en calidad de moléculas diana. Precisamente los productos farmacéuticos, al igual que también otras muchas sustancias contaminantes orgánicas son sustancias muy activas a menudo ya en dosis muy bajas, es decir, incluso con una fuerte dilución siguen poseyendo todavía un elevado potencial contaminante. Por lo tanto, a menudo se presentan en disoluciones de baja concentración y tiene lugar una dilución adicional en la alimentación al sistema de aguas residuales. Con ello, a menudo son ineficaces métodos de purificación habituales, dado que impurezas con una concentración baja de este tipo no pueden ser eliminadas. Mediante la elevada afinidad de aptámeros pueden, sin embargo, ligarse y eliminarse también impurezas dosificadas con una concentración extremadamente pequeña.

- 5
- 10 En otra ejecución ventajosa de la invención, la nanoestructura contiene adicionalmente al menos dos moléculas diferentes entre sí que son adecuadas para la creación de una transferencia de energía por resonancia Förster (FRET – siglas en alemán). Estas dos moléculas diferentes entre sí se denominan en lo que sigue también molécula de donante FRET y molécula de aceptor FRET (o también simplemente donante y aceptor). El donante y/o el aceptor son ligados preferiblemente a la proteína de la capa S y/o al ligando (p. ej. el aptámero o el anticuerpo), p. ej. de forma covalente o mediante coordinación. Tal como se explica posteriormente con mayor detalle, también restos de triptófano (o restos de tirosina) de la proteína pueden servir por sí mismos como donantes FRET, con lo que se suprime la unión de un donante FRET.

20 La transferencia de energía por resonancia Förster (acortado FRET) es un proceso físico en el que energía de una molécula de donante excitada puede ser transmitida exenta de radiación a una molécula de aceptor a una distancia de aproximadamente 1,5 a 10 nm. Las moléculas están seleccionadas de manera que el espectro de emisión de la molécula de donante se solape con el espectro de excitación de la molécula de aceptor. Si tanto el donante como el aceptor son colorantes fluorescentes, se habla de una transferencia de energía por resonancia de fluorescencia. Por el contrario, si el donante o el aceptor es una fuente de quimioluminiscencia o una fuente de bioluminiscencia, se utiliza la expresión transferencia de energía por resonancia de quimioluminiscencia (CRET) o bien transferencia de energía por resonancia de bioluminiscencia (BRET).

25 Ventajosamente, mediante la unión a las proteínas de la capa S o a los ligandos unidos a ellas (p. ej. aptámeros o anticuerpos), las moléculas y átomos (analitos) a detectar pueden ser llevados a la proximidad del par donante/aceptor, con lo cual se modifica la señal FRET y la variación puede determinarse mediante técnicas de medición. La unión del analito tiene lugar, en el caso de iones de metales pesados, mediante unión específica a aptámeros o mediante unión directa a las proteínas de la capa S. En el caso de moléculas o macromoléculas orgánicas, la unión a la capa S es inducida por parte de ligandos que pueden ligar específicamente el analito, preferiblemente anticuerpos o aptámeros, los cuales habían sido previamente acoplados a las proteínas de la capa S. Mediante el uso de varios ligandos con diferentes especificidades de unión, que están unidos a diferentes lugares definidos de la capa S, pueden determinarse al mismo tiempo también varios analitos.

35 Las proteínas de la capa S permiten en tal caso ventajosamente la disposición definida de las moléculas de donante y aceptor en una distancia de aproximadamente 1,5 a 10 nm, la cual es importante para el efecto FRET. La eficacia de esta transmisión de energía del donante a los aceptores depende, a saber de manera sensible, de la distancia, de la orientación relativa y de los momentos de transición electrónicos entre donante y aceptor, así como del índice de refracción del medio circundante. Si una de estas cuatro magnitudes se modifica mediante la unión del analito, se modifica la eficacia de la FRET del donante excitado al aceptor. Esto se puede detectar con ayuda de una distribución espectral modificada y de la intensidad de la radiación emitida por el aceptor.

40 Mediante el empleo de diferentes pares de donante/aceptor, debido a las distancias a nano-escala entre los cromóforos, se pueden realizar FRETs a lo largo de varios cromóforos. En función del lugar de la interrupción de la FRET provocada por la unión del analito, la luz emitida partirá de diferentes cromóforos. El análisis espectral de la luz de fluorescencia porta con ello de manera indirecta información sobre el lugar predominante de la perturbación. Esto posibilita de manera ventajosa la detección simultánea, en una y la misma matriz, de varios analitos, siempre que éstos posean diferentes lugares de unión en la estructura de los cromóforos transmisores de energía. Lugares de unión diferenciables topológicamente de este tipo pueden realizarse mediante síntesis química o modificación genética de una matriz de proteínas. Premisa para este proceso dependiente del lugar es la localización fija de la primera excitación primaria del sistema acoplado a través de transmisión de energía de resonancia. Esta localización fija se alcanza debido a que la excitación primaria tiene lugar en un centro definido. Esto puede realizarse de manera particularmente bien en capas S mediante un metal de transición luminescente el cual, en contraposición a los otros cromóforos, no muestra emisión alguna dependiente de la orientación, sino que está embutido en un lugar específico en la matriz en forma de una fuente de radiación puntual local a nano-escala. La detección paralela de dos analitos puede tener lugar también mediante el uso de dos pares de FRET (en unión con dos ligandos diferentes) que no se solapan en sus espectros.

55 El marcaje de la proteína de la capa S tiene lugar preferiblemente de forma covalente a grupos amino o grupos carboxilo libres de las cadenas laterales de aminoácidos (restos lisina o aspartato o glutamato) de la proteína. La

unión de una biomolécula tal como GFP, YFP, CFP y/o luciferasa tiene lugar mediante reticulación o mediante producción de una proteína de fusión. Preferiblemente, en la invención se utilizan como donantes y aceptores colorantes fluorescentes orgánicos o inorgánicos. Alternativamente, como aceptor puede utilizarse también triptófano, el cual se presenta como un componente natural de las proteínas de la capa S. Fuentes de luminiscencia pueden emplearse como aceptores o donantes.

5

Preferiblemente, por cada molécula de proteína están ligadas 1 a 40, de manera particularmente preferida 1 a 5 moléculas de colorante.

Las moléculas de donante y aceptor están unidas en tal caso de manera preferida sobre la misma molécula de proteína o sobre moléculas de proteína diferentes. Con el fin de conseguir lo primero, moléculas de donante y aceptor se unen preferiblemente a la misma proteína, p. ej. mediante la unión a diferentes grupos funcionales tales como, p. ej., grupos amino y carboxilo, o una modificación secuencial dependiente de la concentración de grupos funcionales idénticos. Alternativamente, una parte de las proteínas de la capa S es marcada en disolución con la molécula de donante, y la otra parte lo es con la molécula de aceptor y, a continuación, ambas partes de mezclan, se recristalizan y, de esta forma, se genera una superficie mixta.

10

Los colorantes fluorescentes se eligen preferiblemente de colorantes orgánicos e inorgánicos. La expresión "colorantes orgánicos" comprende en tal caso también biomoléculas. En calidad de colorantes fluorescentes inorgánicos se utilizan europio (preferiblemente Eu^{3+}), cerio o terbio, o los denominados puntos cuánticos tales como, p. ej., nanopartículas de LaF_3 y LaPO_4 dotadas. Para ello, se utilizan preferiblemente proteínas de la capa S en calidad de sustrato para la producción de colorantes fluorescentes inorgánicos tales como, p. ej., nanopartículas de LaF_3 y LaPO_4 dotadas. Alternativamente, p. ej. Eu^{3+} puede ligarse de manera eficaz a través de los grupos carboxilo que se presentan de forma natural en la capa S de ácidos aspárticos y ácidos glutámicos, sin etapas de síntesis químicas. Estos grupos se encuentran también entonces a disposición cuando previamente otras moléculas tales como aptámeros o anticuerpos, son reticuladas químicamente con la capa S, dado que la unión de estas últimas puede tener lugar a través de otros aminoácidos (tales como p. ej. lisina).

15

20

25

En esta forma, p. ej. europio (preferiblemente Eu^{3+}) sirve como donante de FRET para fluoróforos que poseen un espectro de absorción en el intervalo espectral rojo y que emiten fluorescencia por encima de 620 nm. Una capa S marcada con un cromóforo correspondiente y que contiene al mismo tiempo Eu^{3+} representa con ello una matriz en la que se presentan múltiples pares de FRET en una disposición regular.

30

La ventaja del aprovechamiento de Eu^{3+} en esta disposición consiste en la reducción de la complejidad de síntesis química, dado que junto a la molécula inductora de especificidad sólo debe encapsularse un cromóforo en lugar de un par de cromóforos. Además, la unión del ion Eu, pequeño con respecto a las otras dos modificaciones, tiene lugar en espacios huecos definidos de la capa S, con lo cual permanecen accesibles en la superficie más grupos reactivos para la modificación química que lo que es el caso en la unión de grupos químicos mayores.

35

En otra ejecución ventajosa de la invención, en calidad de aceptor de FRET se utiliza un colorante fluorescente, cuyo espectro de excitación se solapa con la emisión de fluorescencia del triptófano que aparece como componente natural de las proteínas de la capa S. En este caso, triptófanos presentes en la proteína sirven como donantes de FRET. Un ejemplo preferido de un aceptor de FRET de este tipo es europio (preferiblemente Eu^{3+}). Si tiene lugar una unión del analito inducida, p. ej., a través de aptámeros o anticuerpos, entonces se ve afectada la FRET entre los triptófanos y el europio Eu^{3+} . En el caso de la excitación de triptófano en torno a 280 nm se puede detectar la presencia de una molécula diana con ayuda de la luminiscencia de europio que se manifiesta. En esta realización, se puede detectar un analito con una fluorescencia propia en el intervalo de la absorción de europio en torno a 320 nm sin acoplamiento adicional de colorantes. La complejidad de síntesis química se limita en este caso al acoplamiento de grupos inductores de especificidad tales como aptámeros o anticuerpos.

40

45

Pares de donantes-aceptores preferidos y sus máximos de excitación (Máx_{ex}) así como máximos de emisión (Máx_{em}) respectivos son:

Donante			Aceptor		
Denominación	Máx _{ex}	Máx _{em}	Denominación	Máx _{ex}	Máx _{em}
Alexa Fluor 488	495 nm	519 nm	Alexa Fluor 555	555 nm	565 nm
Alexa Fluor 488	495 nm	519 nm	Alexa Fluor 546	556 nm	573 nm
Alexa Fluor 488	495 nm	519 nm	Alexa Fluor 568	578 nm	603 nm
Alexa Fluor 546	556 nm	573 nm	Alexa Fluor 633	632 nm	647 nm
Alexa Fluor 555	555 nm	565 nm	Alexa Fluor 647	650 nm	668 nm
Alexa Fluor 568	578 nm	603 nm	Cy5	649 nm	670 nm
Alexa Fluor 568	578 nm	603 nm	Alexa Fluor 633	632 nm	647 nm
Alexa Fluor 568	578 nm	603 nm	Alexa Fluor 647	650 nm	668 nm
Alexa Fluor 568	578 nm	603 nm	Cy5	649 nm	679 nm
Proteína fluorescente de ciano (CFP)	452 nm	505 nm	Proteína amarilla fluorescente (YFP)	514 nm	527 nm
Proteína verde fluorescente (GFP)	395 nm	509 nm	Rodamina 123	507 nm	529 nm
Isotiocianato de fluoresceína (FITC)	494 nm	518 nm	Cy3	550 nm	570 nm
Europio (Eu ³⁺)	395 nm, 466 nm	617 nm	Alofocianina	650 nm	660 nm
Luciferasa			YFP	514 nm	527 nm
FITC	494 nm	518 nm	TRITC	550 nm	570 nm
Cy3	550 nm	570 nm	Cy5	649 nm	670 nm
Cy3	550 nm	570 nm	Alexa Fluor 633	632 nm	647 nm
Cy3	550 nm	570 nm	Alexa Fluor 647	650 nm	668 nm
EGFP	488 nm	509 nm	Cy3	550 nm	570 nm
EGFP	488 nm	509 nm	YFP	514 nm	527 nm
Fluoresceína	494 nm	518 nm	TRITC	550 nm	570 nm
Fluoresceína	494 nm	518 nm	Cy3	550 nm	570 nm
Eu ³⁺ (o LaF ₃)	395 nm	591 nm	Alexa Fluor 594 (o también Alexa Fluor 610 ó 633)	590 nm	630 nm
LaPO ₄ (o Ce o Tb)	266 nm	542 nm	Alexa Fluor 532	530 nm	560 nm
Trp propio de la proteína	280 nm	353 nm	Eu ³⁺	395 nm, 466 nm	617 nm
Tyr	274 nm	303 nm	Trp	280 nm	353 nm

Por lo tanto, otro objeto de la invención es un sensor conforme a la reivindicación 7 que contiene proteínas de la capa S y dos moléculas diferentes que son adecuadas para generar una transferencia de energía por resonancia

5 Förster (FRET), configurando las proteínas de la capa S un estrato cristalino sobre una superficie de un sustrato o presentándose en un líquido adecuado en forma de suspensión, estando ligados aptámeros y/o anticuerpos a las proteínas que se auto-organizan, en donde mediante la unión a los aptámeros o anticuerpos, las moléculas y/o átomos a detectar son llevados a la proximidad del par de donante/aceptor, con lo cual se modifica la señal de la FRET y se determina la variación por técnicas de medición.

El sensor se adecua, en particular:

a) para la detección de metales pesados y

b) para la detección de moléculas de medicamentos o moléculas orgánicas en particular moléculas de sustancias contaminantes.

10 La proteína de la capa S, el sustrato, el aceptor de FRET y pares de donante/aceptor de FRET alternativos se seleccionan preferiblemente tal como se describe arriba.

Las proteínas que se auto-organizan son proteínas de la capa S, dado que éstas pueden ligar de manera no específica muchos metales pesados tales como, por ejemplo, aluminio, cadmio o plomo.

15 Particularmente preferidas son proteínas de la capa S que proceden de bacterias de entornos con contenido en metales pesados tales como, por ejemplo, escombreras de uranio. Estas bacterias pertenecen preferiblemente a los géneros *Lysinibacillus* y *Bacillus* (p. ej. *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12, *Bacillus sp* JG-B12). Estas proteínas de la capa S, en virtud de su estructura especial, pueden ligar de manera específica metales pesados tales como uranio, sin que se requieran para ello moléculas de unión específicas adicionales.

Mediante la unión de metales pesados a la capa S puede detectarse una variación de la FRET.

20 Para la detección específica de moléculas de medicamentos o moléculas orgánicas o también metales pesados, a las proteínas de la capa S están ligados aptámeros o anticuerpos. Éstos son ligados de manera preferible a la capa de proteínas tal como se ha descrito arriba. En este caso, el aceptor de FRET y/o donante de FRET pueden también estar unidos al ligando.

25 Mediante este acoplamiento adicional de aptámeros o anticuerpos se alcanza ventajosamente una elevada especificidad.

Mediante la unión de la molécula diana a detectar al aptámero o al anticuerpo se produce una variación de parámetros ópticamente relevantes tales como, p. ej., el impedimento estérico del aceptor de FRET o la variación del índice de refracción, lo cual afecta a la eficacia de la señal de la FRET pre-existente y puede ser detectada por espectroscopía.

30 En ambos casos, la proteína de la capa S puede presentarse en suspensión, tal como se ha descrito arriba, o puede formar una (o varias) capas sobre un sustrato. En tal caso, el sustrato se selecciona preferiblemente tal como se describe arriba. Capas de este tipo pueden ser inmovilizadas sobre sustratos transparentes en calidad de soportes tales como por ejemplo, vidrio o MgO, y pueden ser incorporadas en una cámara de paso. Alternativamente, la proteína puede presentarse también, tal como se ha descrito arriba, en una nanoestructura (p. 35 ej. en forma de las partículas de magnetita descritas).

El sensor contiene preferiblemente como otros componentes una fuente de radiación, una óptica emisora para conducir la luz a la suspensión de proteínas, la nanoestructura o la capa de proteínas (excitación del donante) una óptica receptora para conducir la luz así como un detector (para medir la emisión, p. ej. para la detección de las modulaciones de la FRET pre-existente).

40 El detector es un aparato de lectura de la fluorescencia adecuado tal como, p. ej., un microscopio de fluorescencia o un lector de la matriz.

45 Para la protección de la óptica, ésta puede realizarse sobre la cara no modificada del soporte transparente. La unión de un analito condiciona entonces una modulación creciente de la señal de la FRET, la cual puede ser detectada a partir de un valor umbral determinado. La disposición altamente regular de los colorantes conduce en tal caso a un refuerzo de la señal.

En tal caso, los biosensores pueden estar configurados ventajosamente también de modo que posibiliten la detección específica paralela de diferentes analitos dentro de la sustancia de ensayo.

50 Para ello, preferiblemente en diferentes coordenadas del soporte, se aplican aptámeros u otros ligandos con diferentes especificidades de unión. Esto tiene lugar preferiblemente acoplado en suspensión primeramente diferentes ligandos a muestras de la proteína de la capa S, separadas entre sí, y registrando luego estas proteínas

marcadas en diferentes coordenadas en forma de una matriz. El número de los analitos a detectar en paralelo puede aumentarse también mediante el uso de dos pares de FRET diferentes (en unión con distintos ligandos). Los pares de FRET se eligen en tal caso de modo que no se solapen los espectros de excitación y los espectros de emisión.

5 Ejemplos de realización:

Con ayuda de las siguientes figuras y Ejemplos de realización se ha de explicar con mayor detalle la invención, sin limitar la invención a los mismos.

La **Figura 1** muestra diferentes simetrías de cristalización de capas S: oblicua (Figs. 1a, b), cuadrada (Fig. 1c) y hexagonal (Figs. 1d, e).

10 La **Figura 2** ilustra el principio de la modulación de una FRET pre-existente mediante la unión de un analito a la capa S. a) A la capa S están acoplados dos colorantes fluorescentes en calidad de donante (representado por una esfera sombreada) y aceptor (representado por un cuadrado en blanco). El donante es excitado por la luz de una longitud de onda adecuada, y la energía de excitación es transferida a través de la FRET al aceptor, el cual emite luz de una longitud de onda específica. b) Mediante la unión del
15 analito (representado por una estrella negra) se impide la FRET, el aceptor no emite luz alguna. El donante emite la energía de excitación mediante la emisión de luz, la cual presenta, sin embargo, otra longitud de onda que la emitida por el aceptor.

20 La **Figura 3** muestra asimismo al principio de la modulación de una FRET pre-existente mediante la unión de un analito. No obstante, en este caso la unión del analito no tiene lugar directamente a la capa S, sino a una molécula con propiedades de unión específicas tal como un aptámero o un anticuerpo (simbolizado por un bucle negro).

25 La **Figura 4** ilustra la estructura de un biosensor de acuerdo con la invención. La nanoestructura de acuerdo con la invención es inmovilizada sobre un soporte transparente tal como, por ejemplo, vidrio o MgO. El sensor se compone de una fuente de radiación, una óptica emisora para conducir la luz a la capa proteica (excitación del donante), una óptica receptora para conducir la luz así como un detector (detección de las modulaciones de la FRET pre-existente). Para la protección de la óptica, ésta puede realizarse en la cara no modificada del soporte transparente. Las Figuras 2a) y b) muestran la forma en la que los
30 aceptores y donantes ligados a la capa S pueden estar localizados en diferentes lugares en la capa S.

La **Figura 5** muestra la estructura de un biosensor de acuerdo con la invención a base de soporte, capa S, donante (esfera sombreada), aceptor (cuadrado en blanco) y ligando de unión específica (aptámero o anticuerpo).

35 La **Figura 6** ilustra el principio de la detección de iones de metales (pesados) mediante la unión al estrato a base de proteínas de la capa S y la modificación provocada por ello de una señal de la FRET pre-existente.

40 La Figura 6 a) muestra esquemáticamente que los dos colorantes fluorescentes utilizados como donante (representado por un cuadrado) y aceptor (representado por un triángulo) sólo pueden producir una FRET, si no están demasiado alejados uno de otro. En el caso de distancias demasiado grandes (más de aprox. 10 nm), no se produce transmisión alguna de la energía de excitación del donante al aceptor. Sin embargo, si el donante y el aceptor están situados próximos uno de otro (Figura 6 b), la energía de excitación por parte de la FRET es transferida, exenta de radiación, del donante al aceptor, y el donante emite luz con su longitud de onda de emisión específica.

45 Figura 6 c): Mediante la unión de iones de metales (pesados) (representada por un hexágono) se perturba la FRET, es decir, ya no se transfiere energía alguna al aceptor, y éste no emite luz alguna. El donante emite la energía de excitación mediante emisión de luz la cual presenta, sin embargo, otra longitud de onda que la emitida por el aceptor.

Las **Figuras 7 a 11** se explican seguidamente en el texto.

50 Ejemplo de Realización 1a: Partículas de magnetita y marcaje con aptámeros

A una disolución consistente en disoluciones salinas de Fe(III) y Fe(II) con relaciones molares variables (2:1, 0,5:1 a

4:1) se añaden proteínas de la capa S purificadas, preferiblemente del género *Bacillus* o *Lysinibacillus*, en concentraciones variables (preferiblemente 0,5-5 mg/ml). La formación de partículas de magnetita tiene lugar mediante la subsiguiente adición de una disolución amoniaca al 25%. Las partículas de magnetita resultantes poseen un tamaño de 10-12 nm y están ligadas a las proteínas de la capa S.

5 Seguidamente, a las proteínas de la capa S se ligan aptámeros que ligan específicamente moléculas orgánicas o también iones de metales a partir de una disolución acuosa (p. ej. aptámero de unión a AMP con la secuencia ACCTGGGGGAGTATTGCGGAGGAAGGT, Nishihira et al. 2004 Nucl. Ac. Sympos. Ser. 48, págs. 135-136, o aptámero de unión a etanolamina con la secuencia, p. ej., TGAGGCGGGTGGGTGGGTTGAATATGCTGATTACCCCATCGGAGAACGTTAAGGCGCTTC, D. Mann et al. 2005
10 Biochemical and Biophysical Research Communications 338, 1928-1934).

Mediante la aplicación de un campo magnético, las partículas de magnetita unidas a la capa S pueden separarse del medio junto con las moléculas orgánicas o iones de metales ligados.

Otras secuencias de aptámeros preferidas son:

1.) para oxitetraciclina:

15 5'-CGACCGCAGGTGCACTGGGCGACGTCTCTGGGTGTGGTGT-3'

5'-CGACGCGCGTTGGTGGTGGATGGTGTGTTACACGTGTTGT-3'

5'-ACGTTGACGCTGGTGCCCGTTGTGGTGCGAGTGTTGTGT-3'

5'-CGAGTTGAGCCGGGCGCGGTACGGTACTGGTATGTGTGG-3'

5'-ACGTTGACGCTGGTGCCCGTTGTGGTGCGAGTGTTGTGT-3'

20 (Niazi JH, Lee SJ, Kim YS, Gu MB. ssDNA aptamers that selectively bind oxytetracycline Bioorg Med Chem. 16 (2008) 3 págs. 1254-61)

2.) para tetraciclina:

5'-GGGCAGCGGTGGTGTGGCGGGATCTGGGGTTGTGCGGTGT-3'

5'-GGAGGAACGGGTTCCAGTGTGGGGTCTATCGGGGCGTGCG-3'

25 5'-CGGGAGGGCGGGGTGTGGTATGTATTGAGCGTGGTCCGTG-3'

5'-CCCCCGGCAGGCCACGGCTTGGGTTGGTCCCACTGCGCGT-3'

5'-GTGCGCACGCTAGGTGGTGTGCTGTGCTACACGTGTTGT-3'

5'-GGGGGCACACATGTAGGTGCTGTCCAGGTGTGGTTGTGGT-3'

5'-GGGCGGGGGTGTGGGGGAATGGAGTGCTGCGTGCTGCGG-3'

30 (Niazi JH, Lee SJ, Gu MB. ssDNA aptamers specific for antibiotics tetracyclines. Bioorg. Med. Chem. 16 (2008) 15 págs. 7245-53).

Ejemplo de Realización 1b: Revestimiento de un sustrato con proteínas de la capa S

La producción de un estrato de la capa S sobre un sustrato tiene lugar, por una parte, mediante la adsorción de una proteína nativa sobre un sustrato que puede estar modificado. Alternativamente, puede tener lugar una
35 recristalización de la proteína de la capa S desnaturalizada con hidrócloruro de guanidina después de separar el hidrócloruro de guanidina mediante diálisis frente a una disolución de CaCl₂ (5-20 mM). La concentración de proteínas asciende en este método a 0,5-5 mg/ml. Como sustratos sirven, p. ej., vidrio, MgO, mica, SiO₂, Si, Al₂O₃. Éstos pueden estar silanizados o modificados con una capa a base de polímeros aniónicos o catiónicos o polímeros de la pared celular secundarios (SCWPs), con el fin de favorecer un revestimiento estable. Alternativamente, es

imaginable una modificación de la superficie, p. ej. con grupos amino (aminación, Wieringa, R. H., Schouten, A. J., 1996, *Macromolecules* 29, págs. 3032-3034). En este caso, las proteínas de la capa S se enlazan de manera covalente con el sustrato mediante reticulación de la proteína con los grupos amino.

5 Diferentes sustratos se revistieron con éxito con proteínas de la capa S (procedentes de *L. sphaericus* JG-A12) con el método de recristalización arriba descrito. Los resultados están recopilados en la Tabla siguiente:

Sustrato	mg de capa S/g de sustrato
Silicato nanoporoso (SBA 15)	53
Silicato mesoporoso (MCM 41)	116
Óxido de aluminio (Puralox)	52
Arcilla expandida (almacén de materiales de construcción) Ø de partículas < 0,63 mm	62
Cerámica de arcilla industrial Ø de partículas < 0,63 mm	56
Espuma de vidrio (TECHNOpor) Ø de partículas < 0,63 mm	56
Gel de sílice G 62	68
Nanotubos de carbono CNT (Sigma-Aldrich)	168
Nanotubos de carbono CNT C 150 HP (Bayer)	67

10 El transcurso del revestimiento se vigiló mediante microscopía de fuerza atómica (AFM), cantidades de proteínas ligadas se cuantificaron a través de una determinación de las proteínas y el éxito del revestimiento se examinó adicionalmente mediante marcaje de fluorescencia de las proteínas de la capa S utilizadas para el revestimiento.

Ejemplo de Realización 2: Partículas catalíticas

a) Nanopartículas de ZnO en calidad de fotocalizadores

15 A una disolución acuosa de Zn (II) se añaden proteínas de la capa S purificadas. La formación de partículas de ZnO soportadas por la capa S tiene lugar mediante la adición de una disolución de carácter básico (p. ej. NH₃, NaOH, hexametilentetraamina) con agitación a la temperatura ambiente. El precipitado resultante se dializa frente a H₂O a la temperatura ambiente y/o se calienta (50-80°C). Las partículas de ZnO resultantes poseen un tamaño de 12-23 nm y están ligadas a las proteínas de la capa S.

20 En la **Figura 7** se comparan diferentes parámetros del proceso en la producción de nanopartículas de ZnO sobre capas S. Se comparan diferentes concentraciones de ZnCl₂ y la diálisis a la temperatura ambiente (ningún dato de temperatura en la Fig. 7) y 60°C.

Resultan partículas unitarias con un diámetro de 14 nm (↔ 23 nm sin capa S).

La **Figura 8** muestra espectros de XRD de las nanopartículas de ZnO sobre capas S de diferentes cepas. Los análisis confirman la formación de nanopartículas de ZnO de diferente tamaño, pero cristalinas.

25 Junto a la producción de partículas de ZnO puras, también es imaginable la producción de partículas de ZnO dotadas, con lo cual se mejoran las propiedades fotocatalíticas. La dotación tiene lugar mediante una mezcla de la disolución de Zn(II) con otra disolución de sal metálica (p. ej. Ce(II), Co(II), Cu(II)) en una relación de mezcla variable.

El ligamiento de un aptámero a la capa de proteínas cargada con nanopartículas, así producida, tiene lugar tal como se describe en el Ejemplo de Realización 1a.

Los materiales compuestos, así producidos, consistentes en material de soporte, proteína de la capa S, nanopartículas fotocatalíticamente activas y aptámeros, sirven, por una parte, como material de filtración. A partir de una disolución acuosa se ligan moléculas orgánicas específicamente a través de los aptámeros. Con ello, estas moléculas se desplazan en proximidad espacial con las nanopartículas fotocatalíticamente activas. Mediante la irradiación con luz de onda corta (en el intervalo UV, pero de manera ideal también luz diurna difusa) se activan en la superficie de las nanopartículas moléculas de oxígeno y agua que oxidan a las moléculas orgánicas ligadas.

b) Nanopartículas de TiO₂ en calidad de fotocatalizadores

La producción de partículas de TiO₂ tiene lugar según la patente DE 19941448. Disoluciones de TiF₃ y glicolato de Ti(III)-etileno se disuelven en una disolución de NaCl (2 mol/L) a 0°C bajo argón en calidad de gas protector. A esta disolución se añade proteína de la capa S purificada. Después, la temperatura de la disolución se aumenta linealmente, en el espacio de 10 min, hasta 30°C. La reacción de separación se produce en disolución saturada de O₂, mientras que el valor del pH de la disolución se mantiene en 6,2-6,4.

La producción de un estrato de la capa S sobre un sustrato tiene lugar tal como se ha descrito en el Ejemplo de Realización 1b, y la unión de un aptámero a la capa de proteínas cargada con nanopartículas, así producida, tiene lugar tal como se describe en el Ejemplo de Realización 1a.

Los materiales compuestos, así producidos, consistentes en material de soporte, proteína de la capa S, nanopartículas fotocatalíticamente activas y aptámeros, sirven, por una parte, como material de filtración, por otra, como fotocatalizador. A partir de una disolución acuosa se ligan moléculas orgánicas específicamente a través de los aptámeros. Con ello, estas moléculas se desplazan en proximidad espacial con las nanopartículas fotocatalíticamente activas. Mediante la irradiación con luz de onda corta se activan en la superficie de las nanopartículas moléculas de oxígeno y agua que oxidan a las moléculas orgánicas ligadas.

c) Producción de racimos de Pt y Pd así como de racimos de oro-paladio o platino-paladio bimetálicos en calidad de catalizadores.

Proteínas de la capa S bacterianas se utilizan como matriz para la producción de estructuras de nanopartículas de elevado orden. Este procedimiento se describe en la patente DE 10204532 en el ejemplo de partículas de Pd y Pt. En este caso, proteínas de la capa S aisladas se incuban en una disolución salina acuosa de Pd(II) o Pt(II). Los complejos de metales ligados se reducen mediante la adición de un agente reductor (tal como p. ej., NaN₃, DMAB, H₂, NaBH₄). La preparación de partículas de Au o Pt soportadas por la capa S tiene lugar tal como se ha descrito en el Ejemplo de Realización 1a o en el Ejemplo de Realización 1b. Estas nanopartículas sirven como gérmenes de nucleación en la reducción de una disolución acuosa de Na₂PdCl₄ con una disolución acuosa de la sal trisódica del ácido cítrico a 70°C (patente DE 19930893 A1) o, alternativamente, mediante la adición de DMAB o NaBH₄.

La producción de un estrato de la capa S sobre un sustrato tiene lugar tal como se ha descrito en el Ejemplo de Realización 1b. La unión de un aptámero a la capa de proteínas cargada con nanopartículas, así producida, tiene lugar tal como se describe en el Ejemplo de Realización 1a.

Los materiales compuestos, así producidos, consistentes en material de soporte, proteína de la capa S, nanopartículas fotocatalíticamente activas y aptámeros, sirven como catalizador. A partir de una disolución acuosa se ligan moléculas orgánicas específicamente a través de los aptámeros. Con ello, estas moléculas se desplazan en proximidad espacial con las nanopartículas catalíticamente activas y se disocian catalíticamente.

Ejemplo de Realización 3: FRET con colorantes covalentemente acoplados

a) FRET con moléculas orgánicas en calidad de donante y aceptor

Los colorantes fluorescentes FITC y TRITC utilizados se adquirieron de la razón social Molecular Probes. Ambos colorantes fluorescentes se disolvieron primeramente en DMSO, de modo que resultó una concentración de 1 mg/ml. La unión de los colorantes a la proteína de la capa S tuvo lugar a través de grupos amino libres (restos lisina) o bien de grupos carboxilo libres (restos Asp y Glu). Para ello, al respectivo participante en la reacción se añadió EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) en un exceso 200 veces molar y, de esta manera, se activaron sus grupos carboxilo. En todos los ensayos, el disolvente era un tampón fosfato de pH 5,4. Para cada tanda, se disolvió 1 mg de proteína en 1 ml de tampón fosfato. Esta disolución de proteínas se añadió luego al colorante fluorescente respectivo en la relación molar 2:1 (colorante:proteína) y la tanda se mezcló. Las tandas se incubaron durante 24 h a la temperatura ambiente en la oscuridad. A continuación, el colorante que no había reaccionado se separó mediante filtración múltiple mediante ultrafiltración.

La producción de un estrato de la capa S sobre un sustrato tiene lugar tal como se ha descrito en el Ejemplo de Realización 1a o el Ejemplo de Realización 1b. La unión de un aptámero a la capa de proteínas, así producida, tiene lugar tal como se describe en el Ejemplo de Realización 1a.

Las mediciones de emisión y extinción tuvieron lugar con el espectrómetro de fluorescencia LS 55 (espectrómetro de fluorescencia LS 55: 230 V, Perkin Elmer). Como longitudes de onda de excitación se eligieron 408, 460, 488 y 530 nm. En tal caso, las primeras tres longitudes de onda servían para la excitación del donante, y la longitud de onda de 530 nm servía para la excitación del aceptor. La medición de la extinción tuvo lugar a las longitudes de onda de 520 y 610 nm, iniciándose la excitación a 400 nm.

b) FRET con un par de donante/aceptor consistente en un colorante fluorescente inorgánico y en uno orgánico

Alternativamente, se utilizan proteínas de la capa S en calidad de sustrato para la producción de colorantes fluorescentes inorgánicos tales como, p. ej., partículas de LaF_3^- y LaPO_4 dotadas. Para la producción de las partículas de LaF_3^- o bien LaPO_4^- las proteínas de la capa S purificadas y recristalizadas (p. ej. 0,5 mg/ml) se incuban en una disolución de, p. ej., La(III) 20 mM y se mezclan con una disolución de F^- o PO_4^- hasta que tenga lugar una clara precipitación. Una dotación, p. ej. con Eu o Ce, pero también metales tales como Co, Cu, puede tener lugar mediante la adición, p. ej., de una disolución de Eu(III) o Ce(III) de concentración variable, ligada con una co-precipitación en el caso de la adición de la disolución de NH_4F o bien PO_4^{3-} . Las partículas producidas tienen un tamaño de partícula de 10-30 nm, preferiblemente de 12-20 nm.

La producción de un estrato de la capa S sobre un sustrato tiene lugar tal como se describe en el Ejemplo de Realización 1a o el Ejemplo de Realización 1b; la unión de un aptámero a la capa de proteínas, así producida, tiene lugar tal como se describe en el Ejemplo de Realización 1a. Las mediciones de extinción y emisión se llevaron a cabo tal como se describen en el Ejemplo de Realización 3a.

Ejemplo de Realización 4: Modificación genética de proteínas de la capa S

Mediante modificación genética pueden introducirse en la proteína de la capa S secuencias de aminoácidos que ligan ADN. Estas secuencias de aminoácidos, también denominados dedos de zinc o dedos Zn, reconocen y ligan motivos de ADN específicos, p. ej. Zif268 (Kim et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998; 95(6):2812-2817), NRE (Kim et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998; 95(6):28 12-2817), Sp1C (Wolfe et al., Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 2000; 29: 183-212). La introducción de secuencias de este tipo, ligantes de ADN, posibilita la unión de oligonucleótidos, en particular aptámeros a la proteína de la capa S.

Ejemplo de Realización 5: Aplicación de nanopartículas de ZnO para la degradación de diclofenac

En este ejemplo de aplicación se utilizan las nanopartículas de ZnO fotocatalíticas producidas en el Ejemplo de Realización 2a con proteínas de la capa S, con el fin de degradar el producto farmacéutico diclofenac: (2-((2,6-dicloroanilino)fenil)acetato). Para ello, se utiliza una disolución acuosa de diclofenac 100 μM . La degradación de diclofenac se mide mediante HPLC.

La **Figura 9** muestra la degradación de diclofenac mediante 1 mg de nanopartículas de ZnO sin capa S (\blacktriangle), producidas con 30 mg de capa S (\blacklozenge) y producidas con 10 mg de capa S (\blacksquare) de la cepa *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12.

La **Figura 10** compara la degradación de diclofenac mediante 3 mg de nanopartículas de ZnO producidas con 10 mg de capas distintas de la capa S.

La **Figura 11** muestra un cromatograma de HPLC de la eliminación fotocatalítica de diclofenac (DCF) 100 μM , por medio de nanopartículas de ZnO producidas de modo biomolecular sobre 1,6 mg de capas S (*Lysinibacillus sphaericus* JG-A12), en el caso de irradiación con luz de una longitud de onda de 365 nm.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Forschungszentrum Dresden – Rossendorf e.V.
 <120> Nanoestructura de orden elevado y sensor y su uso
 <130> 00466P0001DEEP
 5 <150> DE 10 2008 014 298
 <151> 10-03-2008
 <160> 13
 <170> PatentIn versión 3.3
 <210> 1
 10 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Aptámero
 15 <400> 1
 acctggggga gtattgcgga ggaaggt 27
 <210> 2
 <211> 60
 <212> ADN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> Aptámero
 <400> 2
 tgaggcgggt ggggtgggtg aatatgctga ttaccccatc ggagaacgtt aaggcgcttc 60
 25 <210> 3
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <400> 3
 30 cgaccgcagg tgactgggc gacgtctctg ggtgtggtg 40
 <210> 4
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial

ES 2 390 515 T3

<220>
 <223> Aptámero
 <400> 4
 cgacgcgctg ttggtgga ttggtgta cacgttgt 40
 5 <210> 5
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 10 <223> Aptámero
 <400> 5
 acgttgacgc ttggtcccgg ttggtgagc agtgttgt 40
 <210> 6
 <211> 40
 15 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Aptámero
 <400> 6
 20 cgagtgagc cgggcgctg acgggtactg gtatgttg 40
 <210> 7
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial
 25 <220>
 <223> Aptámero
 <400> 7
 gggcagcgtg ggtgtggcgg gatctggggt tggcgggt 40
 <210> 8
 30 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Aptámero

ES 2 390 515 T3

<400> 8
 ggaggaacgg gttccagtgt ggggtctatc ggggcgtgcg 40
 <210> 9
 <211> 40
 5 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Aptámero
 <400> 9
 10 cgggagggcg ggggtgggta tgtattgagc gtggtccgtg 40
 <210> 10
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> Aptámero
 <400> 10
 cccccggcag gccacggctt gggttgtcc cactgcgctg 40
 <210> 11
 20 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Aptámero
 25 <400> 11
 gtgcgcacgc taggtggtga tgctgtgcta cacgtgtgtg 40
 <210> 12
 <211> 40
 <212> ADN
 30 <213> Artificial
 <220>
 <223> Aptámero
 <400> 12
 gggggcacac atgtaggtgc tgtccaggtg tggttgtggt 40

ES 2 390 515 T3

<210> 13

<211> 40

<212> ADN

<213> Artificial

5 <400> 13

gggcgggggt gctgggggaa tggagtgctg cgtgctgcgg

40

REIVINDICACIONES

- 1.- Nanoestructura, que contiene:
- 5 a) proteínas de la capa S a la que están ligados aptámeros de ácidos nucleicos y/o anticuerpos que presentan propiedades de unión específicas para una molécula diana, y
- b) nanopartículas inorgánicas y/o colorantes fluorescentes inorgánicos o bien orgánicos u otras biomoléculas, ligados a las proteínas de la capa S, que en calidad de componentes funcionales cumplen diferentes funciones,
- 10 configurando las proteínas de la capa S un estrato cristalino sobre una superficie de un sustrato o presentándose en un líquido adecuado en forma de suspensión,
- en donde los aptámeros de ácidos nucleicos y/o anticuerpos están ligados de tal manera a las proteínas de la capa S que llevan a las moléculas diana ligadas a la proximidad de los componentes funcionales que entran en interacción específica con la molécula diana.
- 15 2.- Estructura según la reivindicación 1, caracterizada porque los aptámeros y/o anticuerpos ligan específicamente metales pesados, sustancias medicamentosas o moléculas orgánicas en sistemas acuosos.
- 3.- Estructura según la reivindicación 1 ó 2, caracterizada porque se utilizan proteínas de la capa S de los géneros de bacterias elegidos de *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Lysinibacillus*, *Geobacillus*, *Deionococcus*, *Sporosarcina*.
- 4.- Estructura según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada porque las partículas son de magnetita o presentan propiedades catalíticas, preferiblemente propiedades fotocatalíticas.
- 20 5.- Estructura según una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizada porque la estructura contiene dos moléculas diferentes entre sí que son adecuadas para crear una transferencia de energía por resonancia Förster (FRET), estando ligados para ello a la estructura preferiblemente dos colorantes fluorescentes orgánicos y/o inorgánicos diferentes entre sí.
- 25 6.- Estructura según la reivindicación 5, caracterizada porque al menos uno de los colorantes fluorescentes es un punto cuántico.
- 7.- Sensor que contiene proteínas de la capa S y dos moléculas diferentes entre sí que son adecuadas para crear una transferencia de energía por resonancia Förster (FRET), configurando las proteínas de la capa S una capa cristalina sobre una superficie de un sustrato o presentándose en forma de suspensión en un líquido adecuado, estando ligados a las proteínas que se auto-organizan aptámeros y/o anticuerpos, en donde mediante la unión a los
- 30 aptámeros o anticuerpos, las moléculas y/o átomos a detectar se aproximan al par de donante/aceptor, con lo cual se modifica la señal FRET y se determina la modificación mediante técnicas de medición.
- 8.- Sensor según la reivindicación 7, caracterizado porque los aptámeros y/o anticuerpos ligan específicamente metales pesados o moléculas orgánicas o sustancias medicamentosas en sistemas acuosos.
- 35 9.- Sensor según la reivindicación 7 u 8, caracterizado porque al menos uno de los dos colorantes fluorescentes es un punto cuántico.
- 10.- Sensor según una de las reivindicaciones 7 a 9, caracterizado porque se utilizan proteínas de la capa S de los géneros de bacterias elegidos de *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Lysinibacillus*, *Geobacillus*, *Deionococcus*, *Sporosarcina*.
- 11.- Uso de la estructura según una de las reivindicaciones 1 a 6 o del sensor según una de las reivindicaciones 7 a 10 en biotecnología, técnica de procedimientos, técnica medioambiental, farmacia y/o analítica biomédica.
- 40 12.- Uso de la estructura según una de las reivindicaciones 1 a 6 para eliminar sustancias contaminantes y/o patógenos, para la analítica del ADN, para la producción de materiales de filtración, para procedimientos de separación y/o catalizadores.

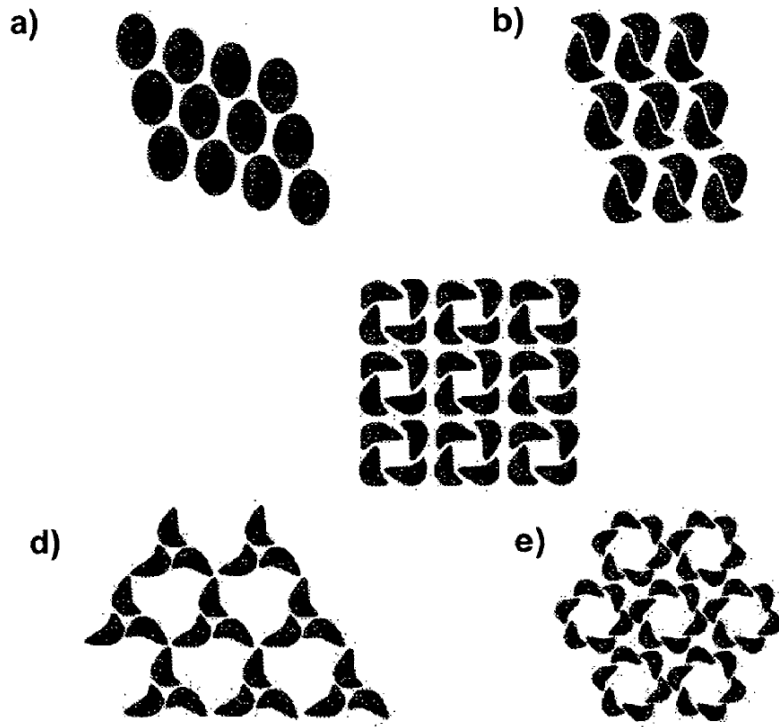


Fig. 1

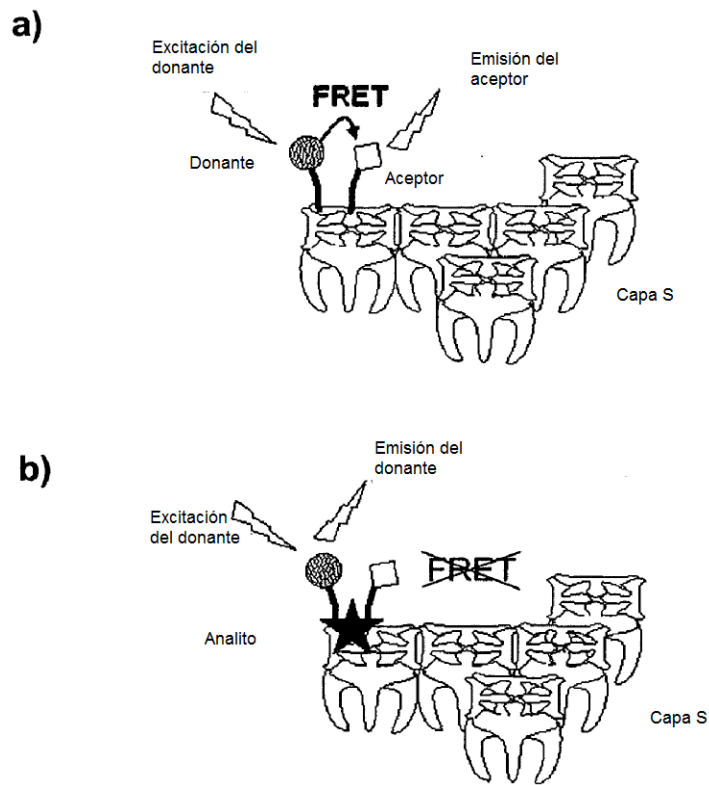
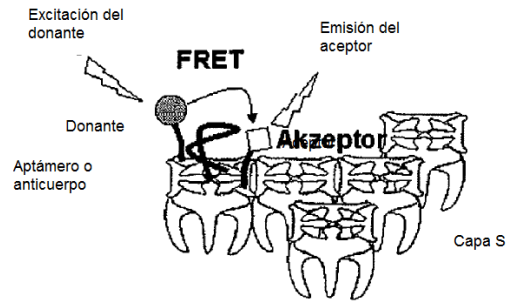


Fig. 2

a)



b)

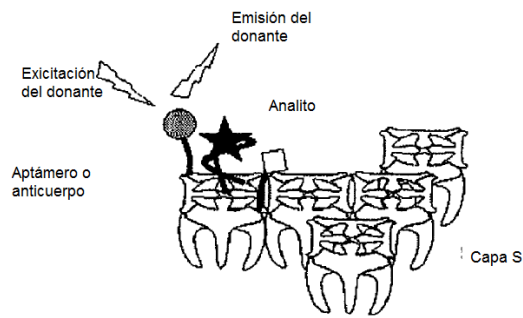


Fig. 3

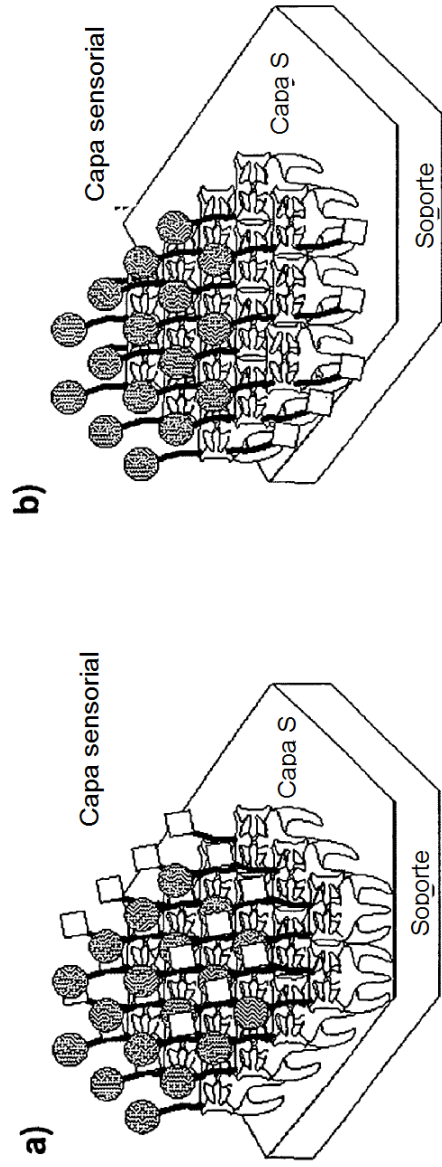


Fig. 4

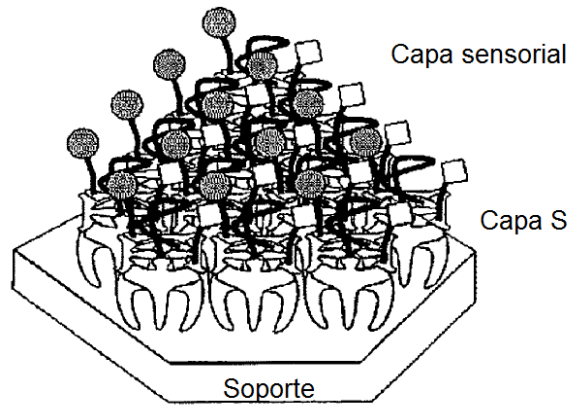


Fig. 5

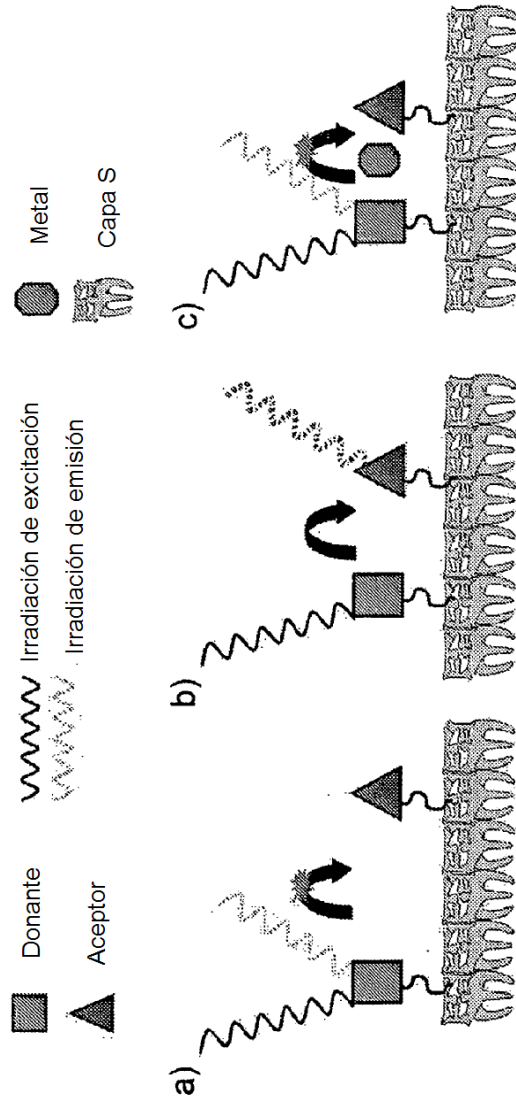


Fig. 6

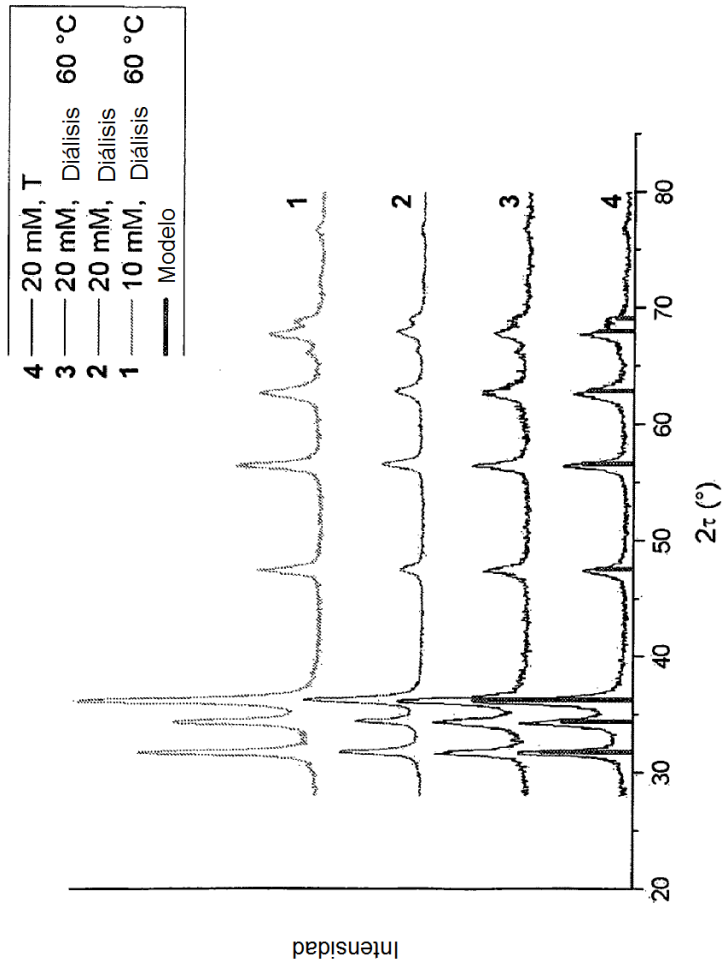


Fig. 7

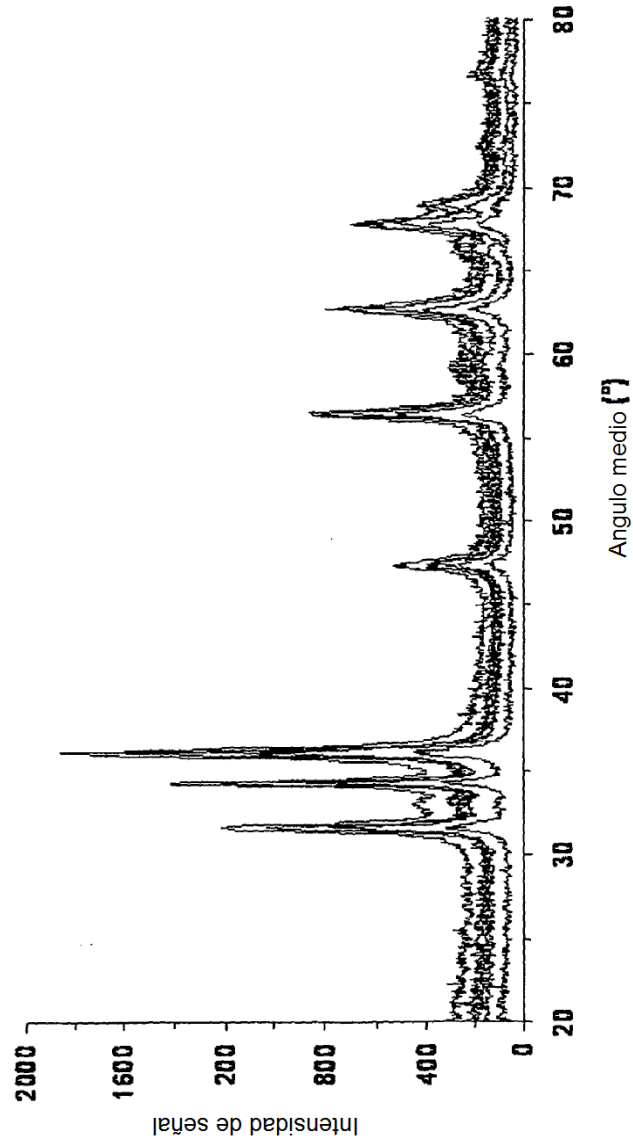


Fig. 8

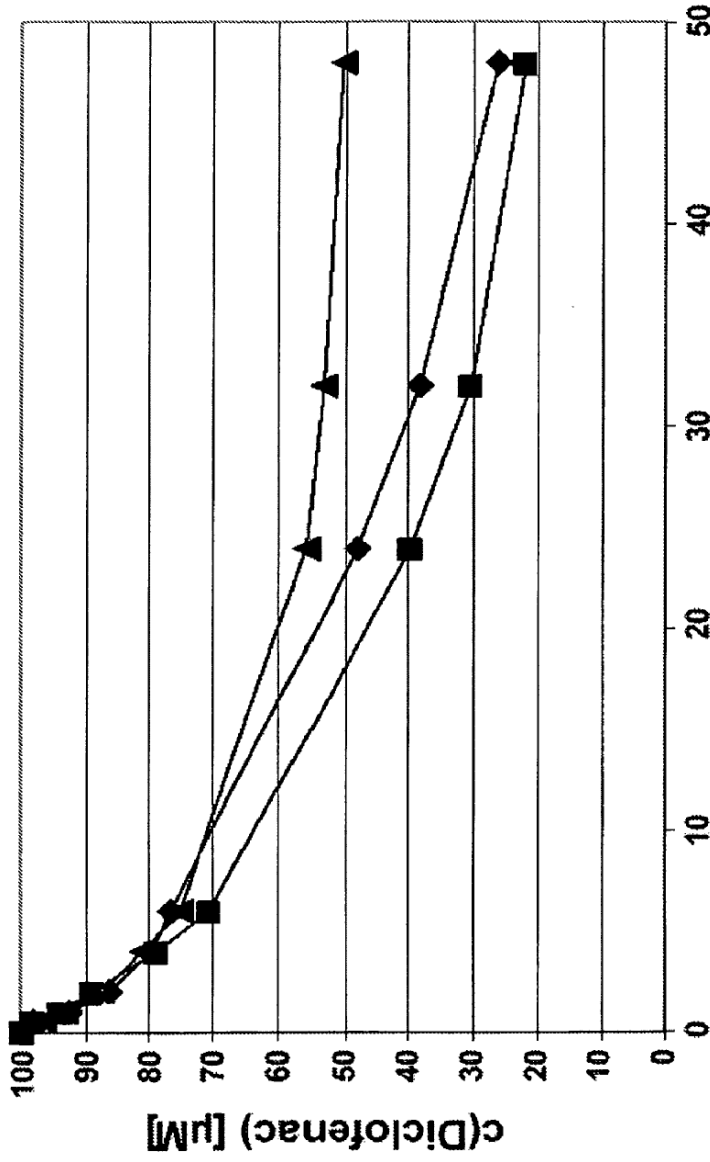


Fig. 9

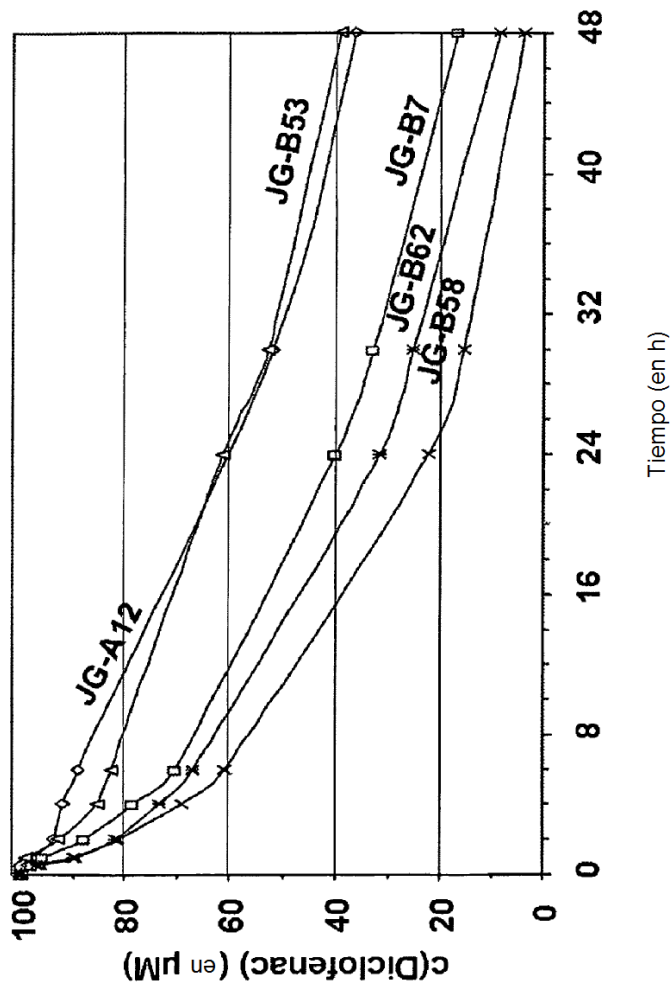


Fig. 10

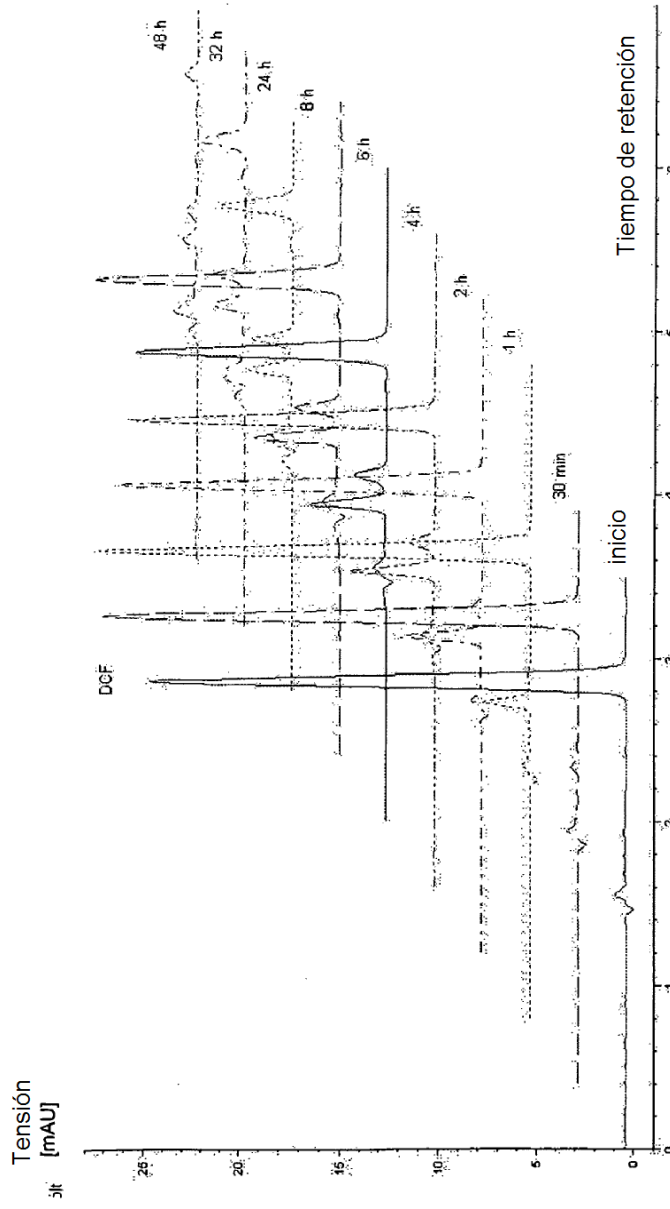


Fig. 11