

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 608 857**

51 Int. Cl.:

A61K 9/127 (2006.01)

A61K 9/51 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2012** **E 12197904 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.09.2016** **EP 2745834**

54 Título: **Partículas Salipro**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.04.2017

73 Titular/es:

SALIPRO BIOTECH AG (100.0%)
Ekhagsvägen 2
11418 Stockholm, SE

72 Inventor/es:

FRAUENFELD, JENS

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones :

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

ES 2 608 857 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

Partículas Salipro

5 **Campo técnico de la invención**

La invención se refiere a partículas de lipoproteína, su uso como un sistema de suministro o vehículo para agentes hidrófobos, tales como fármacos hidrófobos o proteínas de membrana, y a un proceso para la fabricación de dichas lipoproteínas tipo disco.

10

Antecedentes de la invención

Las proteínas de membrana y los compuestos hidrófobos son notoriamente difíciles de manejar y representan dos de los desafíos principales para la investigación y aplicaciones farmacéuticas y de las ciencias biológicas:

15

- (i) hacer que los compuestos insolubles hidrófobos o las proteínas de membrana sean solubles en soluciones acuosas y
- (ii) administrar dicho material hidrófobo como agentes terapéuticos y diagnósticos.

20

Las proteínas de membrana las codifica aproximadamente un 30 % de toda la ORF (Wallin y von Heijne, Protein Science 1998 Abr; 7 (4):1029-38) y representan una clase importante de dianas farmacológicas, es decir, más del 60 %, se dirigen de hecho a esta clase de proteínas (Overington et al., Nature Reviews Drug Discovery 5, 993-996 (Diciembre 2006)). Las proteínas de membrana tienen papeles esenciales en muchos procesos biológicos, tales como la transducción de la señal, el transporte de moléculas y energía, el reconocimiento y la comunicación célula a célula. Además, las proteínas de membrana son difíciles de estudiar debido a su insolubilidad y la tendencia a agregarse cuando se extraen de su ambiente de bicapa lipídica natural. Con el fin de mantener la integridad de las proteínas de membrana, se necesita un ambiente hidrófobo. Aquí, se emplean muy habitualmente micelas detergentes que, sin embargo, impactando negativamente en la biocompatibilidad, pueden tener efectos adversos sobre la actividad de la proteína de membrana y pueden interferir en las condiciones experimentales de los ensayos.

25

30

Otro desafío farmacológico principal está representado por la administración y suministro de compuestos hidrófobos y/o proteínas hidrófobas como agentes terapéuticos y diagnósticos. Debido a la solubilidad limitada de estos agentes hidrófobos, tienen tendencia a la agregación, dando lugar a partículas de fármaco localmente altamente concentradas que pueden producir una alta toxicidad, respuestas inmunitarias no deseadas e inactivar el fármaco (Allen y Cullis, SCIENCE, 303 (5665): 1818-1822, MAR 19, 2004).

35

Por lo tanto, las aplicaciones que incorporan agentes hidrófobos tales como las proteínas de membrana, compuestos farmacológicos o diagnósticos en partículas solubles son altamente deseables. Los métodos actuales que afrontan estos dos desafíos implican entre otros los liposomas y partículas lipoproteicas de alta densidad reconstituidas (rHDL) (Chan y Boxer, Current Opinion in chemical Biology 11:1-7, 2007).

40

El documento EP 1 596 828 B1 describe partículas de suministro de un agente bioactivo en forma de disco que comprenden una apolipoproteína que rodea estrechamente una bicapa lipídica en una manera tipo un cinturón doble. El interior de dichas partículas está formado por la región hidrófoba de la bicapa lipídica. Esto es, al contrario que los liposomas, que están cerrados por cubiertas esféricas bicapa que contienen un interior acuoso. las partículas de suministro de agentes bioactivos en forma de disco descritas en el documento EP 1 596 828 B1 tienen un diámetro de Stokes de aproximadamente 10 nm y se han propuesto para su uso como vehículos de suministro para fármacos farmacéuticos hidrófobos tales como la anfotericina B o la camptotecina.

45

El documento EP 1 345 959 B1 describe un tipo similar de partícula a escala nanométrica con un diámetro de aproximadamente 10 nm y una longitud de aproximadamente 5,5 nm. Las partículas tienen forma de disco y están compuestas por (i) una proteína estructural de membrana artificial, (ii) una bicapa de fosfolípidos y (iii) al menos una proteína de membrana hidrófoba o parcialmente hidrófoba. Dicha proteína de estructura de la membrana de nuevo rodea la bicapa lipídica de una manera tipo doble cinturón y es una forma derivada o trucada de apolipoproteína A-1 humana, que carece del dominio globular del extremo N de la apolipoproteína A-1 humana, es anfipática y forma al menos una hélice alfa, y, en un ambiente acuoso, se auto-ensambla con un fosfolípido o mezcla de fosfolípidos en una partícula a escala nanométrica de esta forma discoidal. Dicha proteína de estructura de membrana modificada (MSP) proporcionará estabilidad, homogeneidad de tamaño funcionalidades útiles a la partícula de lipoproteína discoidal a escala nanométrica.

50

55

Sin embargo, hay bastantes obstáculos con esta tecnología de nanodiscos disponibles actualmente ya que, por ejemplo, se necesita un detergente de eliminación durante el ensamblaje de las partículas. Además, la homogeneidad de tamaño proporcionada por el fuerte ajuste tipo doble cinturón de las MSP derivadas de apolipoproteína parece que se produce a expensas de un mínimo tamaño de partícula fijo y hay una limitación en cuanto a los diámetros máximos que se pueden obtener con los métodos de la técnica anterior.

60

65

La familia de las saposinas comprende 4 proteínas pequeñas (~ 80 aminoácidos), las saposinas A a D, que se unen y/o interactúan con los lípidos y funcionan como cofactores esenciales para varias enzimas lisosómicas del catabolismo de los esfingolípidos (cf. Bruhn, *Biochem J.* (2005) 389, 249-257 y las referencias citadas en el mismo). Se ha descrito que las saposinas prefieren lípidos cargados negativamente y a bajo pH, presentando un aumento de actividad espectacular a pH ácido, con un pH óptimo a pH intralisosómico de 4,75. Las Saposinas A, B, C y D se hidrolizan proteolíticamente a partir de un único precursor proteico más grande, la pro-saposina. Las secuencias completas de aminoácidos de las saposinas A, B, C y D se han expuesto así como la organización genómica y la secuencia de ADNc de la pro-saposina (O'Brien et al. (1988) *Science* 241, 1098- 1101; Furst et al (1992) *Biochim Biophys Acta* 1126: 1-16).

La saposina C es capaz de inducir la fusión en membrana de vesículas que contienen fosfolípidos en un ambiente ácido (*Archives of Biochemistry and Biophysics* 2003 Jul 1; 415(1): 43-53), una característica que no presentan las otras saposinas. Qi et al. (2009) *Clin Cancer Res* 15(18):5840-5851 informan de nanovesículas de dioleoilfosfatidilserina acopladas a saposina C (SapC-DOPS) que contienen un interior acuoso, que tienen un diámetro medio de aproximadamente 190 nm y presentan una actividad dirigida a tumores in vivo. En las SapC-DOPS, la saposina C o un péptido derivado de la misma actúan como un péptido buscador del liposoma al que se une. La saposina entonces dirige al liposoma a las células cancerosas exponiendo la fosfatidilserina en la hoja externa de la membrana celular. Los autores creen que un único microambiente ácido alrededor de las células cancerosas debido a la filtración extracelular de enzimas lisosómicas hace que el tejido tumoral sea una diana óptima para la saposina C. De acuerdo con Qi et al., los liposomas SapC-DOPS se preparan secando fosfolípidos disueltos en un disolvente bajo N₂ (g), dispersando los fosfolípidos secos en tampón ácido (pH 5) que contiene saposina C purificada, diluyendo la mezcla 50 x en una solución acuosa fisiológica y facilitando que la nanovesícula se ensamble por sonicación posterior.

El documento WO 2012/154825 A1 (inventores: Qi, Xiaoyang y Flick, Matthew J.) se refiere a un método para formar imágenes de un sitio de artritis en un animal, en el que se utiliza la nanovesícula que comprende una proteína lisosómica asociada a la membrana (saposina C) que está incorporada en un fosfolípido que se ha descrito que tienen una alta afinidad fusogénica por los dominios ricos en fosfatidilserina de las superficies de las membranas celulares diana. Como se establece en el Ejemplo 3 del documento WO 2012/154825 A1, las nanovesículas de Saposina C se preparan como se describe en Qi et al. (véase anteriormente).

El documento WO 2008/051818 A2 (inventor: Qi, Xiaoyang) se refiere a composiciones y métodos que se describen como útiles para la formación espontánea de liposomas en la que la composición comprende lípidos de cadena larga aniónicos en combinación con lípidos de cadena corta y una proteína derivada de pro-saposina o un polipéptido tal como Saposina C.

Popovic et al., *PNAS*, Vol. 109, N° 8 (2012) 2908-2912 exponen discos de detergente en la estructura de saposina A. La Saposina A existe en un estado soluble y estado unido a lípido/detergente. En ausencia de lípido, la saposina A adopta una conformación apo cerrada monomérica. Por el contrario, la estructura en disco de detergente de saposina A expuesta por Popovic et al. revela dos cadenas de saposina A una conformación abierta que encapsula 40 moléculas de detergente unidas internamente organizadas en un núcleo hidrofóbico ordenado altamente tipo bicapa.

Además de la cristalización de los discos de detergente saposina A, Popovic et al. describe también la preparación de complejos de saposina A-lípido solubles a pH 4,75 por un método que necesita múltiples etapas. Primero, una fracción uniforme de vesículas de liposomas unilaminares grandes se prepara secando lípidos disueltos en cloroformo bajo N₂ (g), se dispersan los lípidos secos por mezclado con agitado en tampón ácido (50 mM de acetato sódico pH 4,8, 150 mM de NaCl), someter la suspensión a 10 ciclos de congelación y descongelación, mezclar en un mezclador con agitado durante 5 min y extrusionar la mezcla a través de un filtro de 200 nm. Mezclar las vesículas de liposoma unilaminares grandes preparadas de esta manera con saposina A purificada en tampón ácido dando como resultado partículas de saposina A-lípido solubles. La partícula presenta una distribución de tamaño estrecho alrededor de un radio medio hidrodinámico (Stokes) de 3,2 nm y contenía aproximadamente 5:1 moléculas de lípido por cadena de saposina A. El tamaño exacto de las partículas solo se afectaba moderadamente por la relación molar proteína respecto a lípido y la composición de los liposomas. Los autores observaron partículas similares de 3,2 nm independientemente de si estaban presentes fosfolípidos aniónicos, colesterol, o glucoesfingolípidos o no en las mezclas de liposomas. En todos los casos, se observaba un único pico en el intervalo de tamaño de un radio de Stokes de 3,2 nm, indicando una distribución relativamente estrecha de especies. Por lo tanto, la tecnología de esta publicación se limitaba a un valor de pH de 4,75, para el tamaño de partículas mencionado anteriormente, e incluye una etapa de preparación de liposomas corriente arriba laboriosa.

Contra este escenario, existe la necesidad de llevar a cabo un método fácil y fiable para generar composiciones de partículas de lipoproteína definidas estables para la solubilización de proteínas de membrana y otros compuestos hidrofobos. Esto es particularmente cierto a la vista de los procesos multi-etapa y elaborados desvelados en la técnica anterior para preparar partículas de lipoproteína discoidales.

Se han descrito en la técnica anterior una amplia variedad de agentes hidrófobos que podrían beneficiarse potencialmente de la tecnología de nanodiscos derivados de saposina A o apolipoproteína. Sin embargo, debido a la limitación de tamaño de 3,2 nm de las partículas derivadas de la saposina A, parece que –si acaso– solo se pueden incorporar moléculas pequeñas en dichas partículas al pH ácido desvelado en los mismos. Aunque muchos

5 compuestos hidrófobos masivos y grandes biomoléculas tales como proteínas de membrana (oligoméricas) se pueden incorporar en los nanodiscos derivados de Apolipoproteína A de la técnica anterior, aún está limitado el diámetro máximo posible por el perímetro de Apolipoproteína A tipo doble cinturón de estas partículas. Además, los nanodiscos de 10 nm derivados de Apolipoproteína A pueden ser demasiado grandes para algunas aplicaciones.

10 Por lo tanto, existe la necesidad de una tecnología de nanodiscos avanzada y partículas de lipoproteína superiores con intervalos de tamaño controlable y flexible que actúe para adaptarse al tamaño respectivo del agente hidrófobo que se va a incorporar en las partículas de lipoproteína. Dichas partículas permitirán la integración simple de proteínas de membrana y otros componentes hidrófobos que, por ejemplo, pueden ser compuestos farmacéuticos o biológicamente activos o compuestos de diagnóstico.

15 **Sumario de la invención**

El problema subyacente de la invención se ve en la provisión de partículas de lipoproteínas a escala nanométrica, cuyo tamaño se pueda controlar y/o cuyo tamaño se pueda ajustar a la naturaleza de las moléculas que se incorporan y que sean fáciles de producir y mantener con un tamaño uniforme, calidad y composición durante el tiempo.

20 Este problema se resuelve mediante una partícula con forma de disco que comprende un polipéptido de unión a un lípido, lípidos y un agente hidrófobo, en el que la partícula no comprende un núcleo hidrófilo o acuoso, en el que el agente hidrófobo no es ni un lípido ni un detergente, y en el que el polipéptido de unión a un lípido es

(a) una proteína tipo saposina (SAPLIP) que pertenece a la familia SAPLIP de proteínas que interactúan con lípidos, o

30 (b) una forma derivada de la misma, en la que el derivado es

(i) una proteína que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con la secuencia de longitud completa de SEQ ID NO. 1, 2, 3, 4, 5 o 6;

35 (ii) una proteína que tiene al menos un 40 % de identidad de secuencia con la secuencia de longitud completa de SEQ ID NO. 1, 2, 3, 4, 5 o 6, en la que dicha proteína es anfipática, forma al menos una hélice alfa, y es capaz de auto-ensamblarse junto con lípidos solubilizados en partículas de lipoproteína cuando se emplean en el método de la reivindicación 10; o

40 (iii) una proteína que comprende la secuencia de SEQ ID NO. 1, 2, 3, 4, 5 o 6 en la que 1 a 50 aminoácidos se han eliminado, añadido, insertado y/o sustituido.

La invención también proporciona una composición diagnóstica o farmacéutica que comprende las partículas de la invención.

45 La invención proporciona adicionalmente un proceso para preparar una partícula con forma de disco que comprende un polipéptido de unión a un lípido y lípidos, en el que el polipéptido de unión a lípidos es una proteína tipo saposina (SAPLIP) como se describe en el punto a) anterior o una forma derivada de la misma como se describe en el punto B) anterior, y en el que la partícula no comprende un núcleo hidrófilo o acuoso, el proceso comprende las etapas de

50 a) poner en contacto el polipéptido de unión a lípidos con lípidos solubilizados en detergente en un ambiente líquido;

b) permitir el auto-ensamblaje de la partícula a un pH de desde 6,0 a 10,0.

55 Finalmente, las partículas de la invención se pueden utilizar como un vehículo de suministro hidrófobo, como una herramienta para el desarrollo de fármacos, la exploración de fármacos, la investigación de proteínas de membrana, y como una formulación vacunal.

60 Sin quedar ligados por esta teoría, parece que la asociación del agente hidrófobo con los lípidos y una proteína tipo saposina o un derivado o truncado de los mismos proporciona una estructura robusta que es estable en soluciones acuosas en un amplio intervalo de pH, en particular un pH fisiológico, y permite partículas mayores que las partículas de lipoproteína derivada de saposina A de 3,2 nm de la técnica anterior. Dichas partículas se pueden obtener por el método de la invención que opera un pH de desde 6,0 a 10, permitiendo de esta manera el auto-ensamblaje de las

65 partículas de la invención.

Las partículas de lipoproteína-proteínas tipo saposina que se puede obtener por el método de la invención (denominadas “partículas Salipro” en el presente documento) se diferencian de las partículas de la técnica anterior en múltiples características, por ejemplo, en su flexibilidad de tamaño inherente y la capacidad para adaptarse al tamaño respectivo del agente hidrófobo que se va a incorporar en las partículas de lipoproteína.

5 Al contrario de lo que se esperaba las partículas de lipoproteína-saposina debería ensamblarse mejor en o cerca del pH óptimo de las saposinas naturales de 4,75, se descubrió que se podían obtener partículas de lipoproteína-saposina con propiedades mejoradas y un espectro de actividad ampliado cuando se mantiene un pH más neutro o básico durante la preparación de las partículas. Sorprendentemente, se descubrió que a un pH de 6,0 a 10 y en presencia de lípidos solubilizados, la proteína tipo saposina o una forma derivada o truncada se auto-ensambla en partículas de lipoproteína estables sin necesidad de una etapa de preparación de liposomas corriente arriba. Este método de preparación simple y fiable fallaba para rendir resultados satisfactorios cuando el ensamblaje en la partícula se intentaba al pH óptimo de 4,75 de las saposinas naturales o en ausencia de lípidos.

15 Las partículas Salipro de la invención han probado que son capaces de la incorporación de varios lípidos, proteínas de membrana y compuestos hidrófobos a un pH fisiológico, dando lugar a complejos a escala nanométrica que son solubles y estables en un ambiente acuoso.

20 Las partículas Salipro de la invención son robustas a la concentración utilizando las unidades de filtro de centrífuga convencionales, congelación y descongelación. Además, los experimentos prácticos revelaron que las partículas Salipro de la invención presentan un cierto grado de termoestabilidad. Además, es posible secarlas por congelación, almacenarlas y re-hidratar las partículas de la invención sin un deterioro importante de la calidad observable.

Descripción detallada de la invención

25 El polipéptido de unión a lípidos es una proteína tipo saposina (SAPLIP) o una forma derivada o truncada de la misma. La expresión “proteína tipo saposina” (SAPLIP) como se utiliza en el presente documento está reconocida en la técnica e incluye todos los miembros de la familia de las proteínas tipo saposina (SAPLIP) de proteínas que interactúan con lípidos. La familia SAPLIP se caracteriza por el plegamiento de saposina, una estructura tridimensional alfa-helicoidales que está estabilizado por enlaces disulfuro intramoleculares altamente conservados (Munford et al. (1995), Journal of Lipid Research, vol. 36, no. 8, 1653-1663 y Bruhn (2005), Biochem J 389 (15): 249-257). Ejemplos de miembros de la familia de proteínas tipo saposina (SAPLIP) de acuerdo con la invención se describen en Munford et al. (1995), Journal of Lipid Research, vol. 36, no. 8, 1653-1663 y Bruhn (2005), Biochem J 389 (15): 249-257.

35 En el estado “cerrado” libre de ligando (es decir, libre de detergente/libre de lípidos), las SAPLIP adoptan una estructura tipo protuberancia de cuatro hélices compacta monomérica, el pliegue saposina. Este pliegue se ejemplifica por la estructura de la forma apo cerrada de la saposina A humana (Banco de datos Proteicos (PDB) ID código: 2DOB, Ahn et al. (2006) Protein Sci. 15: 1849-1857) o las estructuras de saposina C (PDB ID código: 1M12; de Alba et al. (2003) Biochemistry 42, 14729-14740), NK-lisina (PDB ID código: 1NKL; Liepinsh et al. (1997) Nat. Struct. Biol. 4, 793-795), amebaporo A (PDB ID código: 10F9) y granulicina (PDB ID código: 1L9L; Anderson et al. (2003) J. Mol. Biol. 325, 355-365) que son todas casi idénticas y se pueden superponer fácilmente.

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

50 En las partículas de la invención, el polipéptido de unión a lípidos es anfipático, con una parte de su estructura más o menos hidrófila y se encara con el disolvente acuoso y la otra parte más o menos hidrófoba y se encara con el centro hidrófobo de la partícula que comprende los lípidos. El polipéptido de unión a lípidos se caracteriza preferentemente por α -hélices anfipáticas como más restos hidrófobos (tales como A, C, F, G, I, L, M, V, W o Y) predominantemente en una cara de la hélice y restos más polares o cargados (tales como D, E, N, Q, S, T, H, K, o R) en la otra cara de la hélice.

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

65 Al contrario a los nanodiscos derivados de apolipoproteína de la técnica anterior, el polipéptido de unión a lípidos de la invención no encierra los lípidos en una manera tipo doble cinturón (cf. Figura 1) sino, más bien, las partículas de la invención se mantienen juntas por un núcleo que comprende los lípidos que está rodeado por dos o más

polipéptidos de unión a lípidos con forma aproximada de V o bumerang dispuestos en una orientación de cabeza a cola sin contacto sustancialmente directo de proteína-proteína entre los polipéptidos de unión a lípidos de una determinada partícula de la invención (cf. Figuras 2 a 7). Sin querer estar ligado por esta teoría, se cree que esta disposición de polipéptidos de unión a lípidos y los lípidos en las partículas de la invención proporciona la flexibilidad de tamaño que se observa cuando agentes hidrófobos masivos o un aumento de la cantidad de lípidos se incorporan en las partículas inventivas.

Aunque la capacidad para interactuar con los lípidos así como la naturaleza anfipática descrita anteriormente y estructura tridimensional está altamente conservada entre las SAPLIP, tienen una alta diversidad a nivel de secuencia de aminoácidos, con identidades de secuencia por debajo de la zona de umbral habitual del 25-30 % de identidad para definir la homología (cf. comparación de secuencia en la Figura 4A y 4B de Bruhn (2005), *Biochem J* 389 (15): 249-257).

En las partículas de lipoproteína de la invención, el polipéptido de unión a lípidos sirve en primer lugar como una proteína estructural, proporcionando el armazón para la estructura tipo disco de las partículas lipoproteicas de la invención. Por esta razón, las características estructurales, en particular el pliegue de saposina que es característica de las SAPLIP, son más importantes para definir el polipéptido de unión a lípidos de la invención en comparación con los meros determinantes de secuencia.

Los ejemplos de las SAPLIP de acuerdo con la invención son las saposinas A, B, C o D (por ejemplo de *Homo sapiens* [cf. en SEQ ID NO. 1 to 4], *Equus caballus*, *Bos taurus*, *Mus musculus*, *Oryctolagus cuniculus*, *Rattus norvegicus* o *Xenopus laevis*); Proteína tensioactiva B (por ejemplo de *Homo sapiens*, *Canis familiaris*, *Mus musculus*, *Oryctolagus cuniculus*, *Ovis aries* o *Rattus norvegicus*); Granulinsina (por ejemplo de *Homo sapiens*; cf. SEQ ID NO. 5); NK-lisina (por ejemplo de *Sus scrofa*; cf. SEQ ID NO. 6); ortólogos de NK-lisina (por ejemplo de *Equus caballus* o *Bos taurus*); Amebaporos (por ejemplo de *Entamoeba histolytica*); ortólogos de amebaporos (por ejemplo de *Entamoeba dispar* o *Entamoeba invadens*); proteína tipo amebaporo (por ejemplo de *Fasciola hepatica*); *Naegleria* (por ejemplo de *Naegleria fowleri*); Clonorina (por ejemplo de *Clonorchis sinensis*); Prosaposina (por ejemplo de *Homo sapiens*, *Equus caballus*, *Bos taurus*, *Mus musculus*, *Oryctolagus cuniculus*, *Rattus norvegicus* o *Xenopus laevis*) y MSAP (por ejemplo de *Homo sapiens*).

Las secuencias de SAPLIP específicas que se utilizan de acuerdo con la invención se dan en la Figura 4 A y 4 B de Bruhn (2005), *Biochem J* 389 (15): 249-257, cuyas figuras y secuencias especificadas en el mismo se incorporan específicamente por referencia. Las secuencias de SAPLIP particulares que se utilizan de acuerdo con la presente invención se dan en el listado de secuencias de la siguiente manera: 1 Saposina A [*Homo sapiens*]; SEQ ID NO. 2 Saposina B [*Homo sapiens*]; SEQ ID NO. 3 Saposina C [*Homo sapiens*]; SEQ ID NO. 4 Saposina D [*Homo sapiens*]; SEQ ID NO. 5 Granulinsina [*Homo sapiens*]; SEQ ID NO. 6 NK-lisina [*Sus scrofa*].

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

Aunque, a continuación, la invención se describe en más detalle para la saposina A o un derivado o truncado de la misma como polipéptido de unión a lípidos, y aunque la saposina A o un derivado o truncado de la misma como polipéptido de unión a lípidos es una realización preferida, la invención no se limita por esto. Más bien, la invención se extiende explícitamente a la familia de proteínas tipo saposina (SAPLIP) completa como polipéptidos de unión a lípidos de la invención. Debido al alto grado de conservación estructural y funcional entre las SAPLIP, las características y ventajas de la invención de ciertas realizaciones de la invención con saposina A como polipéptido de unión a lípidos se espera que se aplica también a otras realizaciones utilizando otras SAPLIP o formas derivadas o truncadas de la misma como polipéptido de unión a lípidos de la invención.

De acuerdo con una realización preferida, la SAPLIP es saposina A, B, C o D, en particular una saposina seleccionada de entre saposina A, saposina B, saposina C o saposina D de *Homo sapiens*, *Equus caballus*, *Bos taurus*, *Mus musculus*, *Oryctolagus cuniculus*, *Rattus norvegicus* o *Xenopus laevis*.

La saposina C es especial entre las saposinas ya que es capaz de inducir la fusión de la membrana, una característica que no presentan otras saposinas. La actividad de fusión de membrana no siempre puede ser deseable. De acuerdo con una realización particular de la invención el polipéptido de unión a lípidos es una proteína tipo saposina (SAPLIP) o una forma derivada o truncada de la misma, siempre que la SAPLIP no sea saposina C o siempre que la SAPLIP no sea saposina C o una forma derivada o truncada de la misma.

En una realización, la SAPLIP es de origen humano (es decir, SAPLIP de Homo sapiens).

En una realización preferida, la SAPLIP es saposina A, preferentemente saposina a de Homo sapiens, Equus caballus, Bos taurus, Mus musculus, Oryctolagus cuniculus, Rattus norvegicus o Xenopus laevis, y particularmente preferida la saposina A humana, cuya secuencia de aminoácidos se da como SEQ ID NO. 1. La saposina A es una proteína conocida. Su expresión, purificación y cristalización como complejo detergente-LDAO, por ejemplo, se describen en el documento PNAS, Vol. 109, N° 8 (2012) 2908-2912 (Popovic et al.).

De acuerdo con una realización de la invención, el polipéptido de unión a lípidos comprende la secuencia de longitud completa de una SAPLIP. En otra realización, el polipéptido de unión a lípidos es un derivado de una SAPLIP, en particular un polipéptido que comprenden una secuencia de aminoácidos con al menos un 40, 50 o 60 %, preferentemente un 75 % de identidad con la secuencia de longitud completa con la SAPLIP respectiva. En particular el polipéptido de unión a lípidos puede comprender una secuencia que tiene una identidad con la secuencia de longitud completa de SAPLIP de al menos un 80 %, 85 %, 90 % o 95 %.

La expresión "identidad de secuencia" como se utiliza en el presente documento se refiere a un grado de identidad entre proteínas que se puede calcular por alineamiento óptimo de las secuencias utilizando una matriz de valoración tal como la matriz Blosum62 descrita en Henikoff S. y Henikoff JG., P. N. A. S. USA 1992, 89: 10915-10919. El cálculo del porcentaje de identidad y el alineamiento óptimo de dos secuencias utilizando la matriz de similitud Blosum62 y el algoritmo de Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol. 1970, 48: 443-453) se puede llevar a cabo utilizando el programa GAP del Genetics Computer Group (GCG, Madison, WI, USA) utilizando los parámetros por defecto del programa.

Como una comparación para los alineamientos de aminoácidos se utiliza la herramienta en línea EMBL "EMBOSS Stretcher" (http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_stretcher/), utilizando los ajustes por defecto de los programas.

También se describe en el presente documento, un derivado de un SAPLIP es un polipéptido que comprende una secuencia que tiene una o más eliminaciones, adiciones, inserciones y/o sustituciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la SAPLIP respectiva. Por ejemplo, el derivado de SAPLIP puede ser un polipéptido que comprende una secuencia de una SAPLIP particular en la que 1 a 40, preferentemente 1 a 30, y en particular 1 a 20 o 1 a 15 aminoácidos se han eliminado, añadido, insertado y/o sustituido.

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

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

El término "sustitución" como se utiliza en el presente documento se refiere al intercambio de un resto de aminoácido localizado en cierta posición por uno diferente.

De acuerdo con otra realización de la invención el polipéptido de unión a lípidos es un derivado de saposina A que comprende uno o más fragmentos de SEQ ID NO. 1. Los fragmentos preferidos se corresponden con las hélices $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ y $\alpha 4$ de saposina A, en la que la hélice $\alpha 1$ se forma por el siguiente tramo continuo de aminoácidos: "SLPCDICKDVVTAAGDM-LK"; la hélice $\alpha 2$ está formada por el siguiente tramo continuo de aminoácidos: "ATEEEILVYLEKTCDWL"; la hélice $\alpha 3$ está formada por el siguiente tramo continuo de aminoácidos: "PNMSASCKEIVDSYLPVILDIKIGEMS"; y la hélice $\alpha 4$ está formada por el siguiente tramo continuo de aminoácidos: "PGEVCSAL". De acuerdo con una realización particular de la invención, el derivado de saposina A es un polipéptido que comprende una secuencia que se selecciona de entre las hélices $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$ de saposina A y combinaciones de las mismas, en particular en las que el polipéptido comprende las secuencias de hélices $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ y $\alpha 4$ de saposina A. Los fragmentos de saposina A, tal como sus hélices $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, pueden tener una o más eliminaciones, adiciones, inserciones y/o sustituciones en la secuencia de aminoácidos.

Cuando una forma derivada o troncada de saposina A se utiliza como polipéptido de unión a lípidos de acuerdo con la invención, dicha forma derivada o troncada debería ser anfipática, formar al menos una hélice alfa, y ser capaz de auto-ensamblarse con lípidos solubilizados en partículas lipoproteicas cuando se emplean en el proceso de preparación de acuerdo con la invención que se describe en detalle posteriormente. Como se utiliza en el presente documento, el término "anfipático" se refiere a polipéptidos o moléculas que tienen tanto regiones hidrófobas como hidrófilas.

Preferentemente, si se utiliza un derivado de una SAPLIP, deberían estar presentes los seis restos de cisteína, correspondientes a las seis cisteínas de SAPLIP que se encuentran en el miembro saposina A. Se hace referencia a este respecto a las posiciones de cisteína de la comparación de secuencias de la Figura 4 A y 4 B de Bruhn (2005), Biochem J 389 (15): 249-257.

El polipéptido de unión a lípidos de acuerdo con la invención puede incluir uno o más aminoácidos no naturales, análogos de aminoácidos, o una estructura peptidomimética, en la que el péptido unido se sustituyó por una estructura más resistente a la degradación metabólica.

- 5 De acuerdo con otra realización de la invención el polipéptido de unión a lípidos comprende adicionalmente un marcador tal como un marcador His6, marcador Estrep, marcador Avi, marcador Myc, marcador Gst, marcador JS, marcador cisteína, marcador FLAG u otros marcadores conocidos en la técnica en el extremo N o el extremo C.

- 10 El polipéptido de unión a lípidos de la invención también puede ser un polipéptido quimérico. Como se utiliza en el presente documento, "quimérico" se refiere a dos o más moléculas que son capaces de existir separadamente y están unidas juntas para formar una única molécula que tiene la funcionalidad deseada de todas sus moléculas constituyentes. Las moléculas constituyentes de una molécula quimérica se pueden unir sintéticamente por conjugación química, o cuando las moléculas constituyentes son polipéptidos o análogos de los mismos, se pueden fusionar los polinucleótidos que codifican los polipéptidos recombinantemente de manera que se exprese un único polipéptido continuo. Dichas moléculas quiméricas se conocen también como "proteína de fusión". Los distintos constituyentes del polipéptido quimérico se pueden unir directamente entre ellos o se pueden acoplar mediante uno o más enlazadores.

- 20 En una realización, el polipéptido de unión al lípido es un polipéptido quimérico que comprende además un resto funcional tal como un resto marcado o un resto bioactivo.

- 25 Cuando se utilizan las partículas de la invención como vehículos de suministro de fármacos, tal como un resto dirigido pueden servir, por ejemplo, para dirigir las partículas de la invención a un tipo particular de célula o tejido, o al propio agente infeccioso. En algunas realizaciones, la partícula incluye un resto de direccionamiento unido a un polipéptido de unión a lípidos o un componente lipídico. En algunas realizaciones, el agente hidrófobo que se incorpora en la partícula tiene una capacidad de direccionamiento. El resto dirigido puede por ejemplo tener propiedades de reconocimiento del receptor de manera que las partículas se puedan dirigir a un receptor de superficie celular específico. Por ejemplo, las partículas de la invención pueden dirigirse a un tipo celular en particular que se sabe que alberga un tipo particular de agente infeccioso, por ejemplo modificando el componente de polipéptido de unión a lípidos de las partículas para hacer que sea capaz de interactuar con un receptor en la superficie del tipo celular que se va a direccionar. En una realización, el resto dirigido se selecciona de entre el grupo que consiste en ligandos naturales o sintéticos, anticuerpos y fragmentos de anticuerpo u otras biomoléculas adecuadas para los fines de direccionamiento.

- 35 Cuando el polipéptido de unión a lípidos comprende un resto bioactivo, se puede seleccionar, por ejemplo, de entre un fármaco, un agente citotóxico, una enzima, un marcador, un fluoróforo y agente de contraste y un radiomarcador.

- 40 Los lípidos adecuados para los fines de la invención se pueden seleccionar de lípidos de origen natural, lípidos sintéticos, lípidos modificados, grasas, ceras, esteroides, vitaminas liposolubles, monoglicéridos, diglicéridos, triglicéridos, fosfolípidos, ácidos grasos, glicerolípidos, glicerofosfolípidos, esfingolípidos, sacarolípidos, poliquétidos, esterol lípidos y fenol lípidos, o combinaciones de los mismos.

- 45 El término "lípido" como se utiliza en el presente documento se reconoce en la técnica y se refiere a una sustancia de origen biológico o sintético que es soluble o parcialmente soluble en disolventes orgánicos o que se divide en un ambiente hidrófobo cuando está presente en una fase acuosa.

- 50 El término "lípido" como se utiliza en el presente documento no significa una única molécula de lípido en la partícula de la invención. De hecho, significa una pluralidad de las mismas moléculas de lípido o una pluralidad de al menos dos tipos de molécula de lípido diferentes que se presentan en los mismos.

De acuerdo con una realización preferida, los lípidos son lípidos que forman bicapas lipídicas y/o lípidos biocompatibles.

- 55 El término "biocompatible" como se utiliza en el presente documento denota que son biológicamente compatibles porque no producen una respuesta tóxica, perjudicial, o inmunológica en un tejido vivo.

- 60 Como se utiliza en el presente documento "lípido que forma bicapas" se refiere a un lípido que es capaz de formar una bicapa lipídica con un interior hidrófobo y un exterior hidrófilo. Cualquier lípido que forma bicapas es capaz de asociarse con una SAPLIP o una forma derivada o trunca de la misma de la misma para ensamblarse en una estructura con forma de disco se puede utilizar de acuerdo con la invención. Los lípidos formadores de bicapas incluyen pero no se limitan a, fosfolípidos, esfingolípidos, glucolípidos, alquilfosfolípidos, éter lípidos y plasmalógenos. Se puede utilizar un tipo de lípido formador de bicapas o una mezcla de dos o más tipos.

- 65 Las partículas también incluyen lípidos que no son lípidos que forman bicapas. Dichos lípidos incluyen, pero no se limitan a, colesterol, cardiolipina, fosfatidiletanolamina (este lípido puede formar bicapas en ciertas circunstancias), oxisteroides, esteroides vegetales, ergosterol, lípidos catiónicos, cerebrósidos, esfingosina, ceramida, diacilglicerol,

monoacilglicerol, triacilglicerol, gangliósidos, éter lípidos, alquilfosfolípidos, plasmalógenos, prostaglandinas, y lisofosfolípidos.

De acuerdo con una realización preferida, los lípidos son lípidos eucariotas y/o lípidos presentes en la materia gris y blanca del cerebro. Los lípidos preferidos, por ejemplo, son fosfolípidos, glucoesfingolípidos, esteroides, fosfatidilcolina, fosfatidilserina (PS), 2-oleoil-1-palmitoil-sn-glicero-3-fosfolina (POPC), 2-oleoil-1-palmitoil-sn-glicero-3-glicerol (POPG), 2-oleoil-1-palmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (POPE), diacilglicerol, colesterol, esfingomiélna, galactosilceramida, gangliósidos, fosfatidilinositoles y sulfogalactoceramidas o combinaciones de los mismos. Los lípidos preferidos son lípidos eucariotas. La fosfatidilserina (PS) es un lípido particularmente preferido.

En una realización, los lípidos comprenden o consisten en fosfolípidos. Ejemplos de fosfolípidos adecuados incluyen, pero no se limitan a DMPC, DMPG, POPC, dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), dipalmitoilfosfatidilserina (DPPS), cardiolipina, dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG), diesteiroilfosfatidilglicerol (DSPG), fosfatidilcolina de yema de huevo (PC huevo), fosfatidilcolina de soja, fosfatidilinositol, ácido fosfatídico, esfingomiélna, y fosfolípidos catiónicos.

En algunas realizaciones, un lípido comprendido en la partícula de la invención puede ser un lípido modificado que incluye uno o más restos funcionales unidos, tales como un resto de direccionamiento o un resto bioactivo como se ha descrito anteriormente.

El término “detergente” como se utiliza en el presente documento está reconocido en la técnica y no está comprendido en la definición de “lípido” como se utiliza en el presente documento.

Aunque muchos lípidos tienen similarmente la estructura general en comparación con los detergentes, es decir, un grupo hidrófilo polar en la cabeza y una cola hidrófoba no polar- los lípidos se diferencian de los detergentes en la forma de los monómeros, en el tipo de agregado que forman en solución, y en el intervalo de concentración necesario para la agregación. Los lípidos son en general sustancialmente cilíndricos en su estructura; el volumen que ocupa la cola hidrófoba es similar al volumen que ocupa el grupo polar de cabeza. Los detergentes monómeros en general tienen más forma de cono; el volumen que ocupa la cola hidrófoba es menor que el volumen que ocupa el grupo polar de cabeza. Los detergentes tienen a agregarse en micelas esféricas o elipsoidales que son hidrosolubles sin formar estructuras bicapa en ausencia de lípidos (cf. en el manual “Detergents and their uses in membrane protein science” de Anatrace, www.anatrace.com).

Ejemplos de compuestos comprendidos en el término “detergente” como se utilizan en el presente documento incluyen detergentes aniónicos tales como alquilbecenosulfonatos o ácidos biliares, detergentes catiónicos y detergentes no iónicos o zwitteriónicos tales como óxidos de lauril-dimetil-amina (LDAO), Fos-colinas, CHAPS/CHAPSO, alquil glucósidos tales como alquil maltósidos y glucósidos de cadena media y larga.

Las partículas de la invención comprenden además un agente hidrófobo que es diferente de los lípidos que están comprendidos por otra parte en la partícula. El agente hidrófobo de acuerdo con la invención no es ni un lípido ni un detergente.

El agente hidrófobo que se puede incorporar en las partículas de la invención puede ser un compuesto orgánico hidrófobo y/o una biomolécula hidrófoba. Puede ser un agente hidrófobo activo terapéutica o biológicamente o un agente hidrófobo que simplemente estabiliza la forma discoidal de la partícula de la invención. Un agente hidrófobo es un agente, es decir un compuesto y/o biomoléculas, no que penetra completamente o se mantiene soluble en agua y/o que tiende a agregarse y/o crear una parte en un agente hidrófobo cuando está presente en una fase acuosa. Al estar comprendido en la partícula de la invención, el agente hidrófobo se solubiliza eficazmente en el interior hidrófobo de la partícula. De esta manera puede mantener sus funcionalidades nativas tales como, la actividad catalítica o la unión a un ligando.

Los agentes hidrófobos comprendidos en las partículas de la invención en general incluyen al menos una región hidrófoba (por ejemplo, lipófila) capaz de asociarse o integrarse en la parte hidrófoba de una bicapa lipídica. En algunas realizaciones, al menos una parte del agente hidrófobo se intercala entre o penetra en las partes hidrófobas (por ejemplo, cadenas acil grasas) de las moléculas lipídicas del interior de la partícula.

El agente hidrófobo puede ser, por ejemplo un agente activo biológicamente, un fármaco, un principio activo de un fármaco, un principio activo de un producto cosmético, un ingrediente activo de un producto protector de una planta, un suplemento de la dieta y/o nutricional, una sonda diagnóstica, un agente de contraste, un marcador y/o un indicador.

Los fármacos hidrófobos que se pueden incluir en la partícula de la invención y administrarse a un paciente que los necesitan puede ser cualquier fármaco que tenga una baja solubilidad en un entorno acuoso. La baja solubilidad en un entorno acuoso puede ser aparente solo en ciertas condiciones, por ejemplo a cierto pH o intervalos de temperatura o cuando la concentración del agente hidrófobo supera un cierto umbral.

Los fármacos que, por ejemplo, se pueden incluir en la partícula de la invención y administrarse a un paciente que los necesita son los del tratamiento del cáncer, afecciones inflamatorias o infecciosas, enfermedades cardiovasculares, trastornos neurológicos y reumatismo entre otros. El agente hidrófobo puede ser un anti-oxidante, una vitamina, un agente anti-proliferativo, una hormona, un esteroide, o una enzima. Puede ser un compuesto herbicida o fungicida.

Algunos ejemplos específicos de fármacos hidrófobos que se pueden incorporar en las partículas de la invención incluyen: curcumina, sulfonamida, tal como sulfonamida, sulfametoxazol y sulfacetamida; trimetoprim, particularmente en combinación con sulfametoxazol; una quinolina tal como norfloxacin y ciprofloxacina; un compuesto beta-lactámico que incluye una penicilina tal como penicilina G, penicilina V, ampicilina, amoxicilina, y piperacilina, una cefalosporina tal como cefalosporina C, cefalotina, cefoxitina, y ceftacidina, otros antibióticos beta-lactámicos tales como imipenem, y aztreonam; un inhibidor de beta lactamasas tales como ácido clavulánico; un aminoglucósido tal como gentamicina, amikacina, tobramicina, neomicina, kanamicina y netilmicina; una tetraciclina tal como la clortetraciclina y doxiciclina; cloranfenicol; un macrólido tal como la eritromicina; o antibióticos misceláneos tal como clindamicina, polimixina, y bacitracina como antibacterianos, y en algunos casos como antifúngicos para infecciones; un antibiótico polieno tal como anfotericina B, nistatina, y hamicina; flucitosina; un imidazol o un triazol tal como ketoconazol, miconazol, itraconazol, y fluconazol; griseofulvina como anti-fúngico para enfermedades tales como aspergilosis, candidiasis o histoplasmosis; zidovudina, Aciclovir, ganciclovir, vidarabina, idoxiuridina, trifluridina, un interferón (por ejemplo, interferón alfa-2a o interferón alfa-2b) y ribavirina como antivíricos para enfermedades; aspirina, fenilbutazona, fenacetina, acetaminofeno, ibuprofeno, indometacina, sulindac, piroxicam, diclofenaco, antiinflamatorios de oro y esteroides para enfermedades inflamatorias tales como artritis; un inhibidor de la ECA tales como captoprilo, enalaprilo, y lisinoprilo; los órgano nitratos tales como amil nitrito, nitroglicerina y dinitrato de isosorbida; bloqueantes del canal del calcio tales como diltiazem, nifedipina y verapamilo; antagonistas beta adrenérgicos tales como el propanolol para enfermedades cardiovasculares; un diurético tal como una tiazida; por ejemplo, benzotiazida o un diurético del asa tal como al furosemida; un agente simpaticolítico tal como metildopa, clonidina, guanabenz, guanetidina, y reserpina; un vasodilatador tal como hidralazina y minoxidilo; un inhibidor de la ECA tal como captoprilo para el tratamiento de la hipertensión; quinidina, procainamida, lidocaína, encainida, propanolol, esmolol, bretilio y diltiazem para el tratamiento de la arritmia cardíaca; lovostatin, lipitor, clofibrato, colestriamina, probucol y ácido nicotínico para el tratamiento de hipolipoproteinemias; una antraciclina tal como doxorubicina, daunorubicina e idamubicina; un compuesto de unión covalente a ADN, un compuesto de unión covalente a ADN y un compuesto de platino tal como cisplatino y carboplatino, un antagonista de folato, tal como metotrexato y trimetrexato; un antimetabolito y un antagonista de pirimidina tal como fluorouracilo, 5-fluorouracilo y fluorodesoxiuridina, un antimetabolito y un antagonista de la purina tal como mercaptopurina, 6-mercaptopurina y tioguanina; un antimetabolito y un análogo de azúcar modificado tal como citarabina y fludarabina; un antimetabolito y un inhibidor de la ribonucleótido reductasa tal como hidroxiurea; un compuesto de unión covalente a ADN y un compuesto de mostaza nitrogenada tal como ciclofosfamida e ifosfamida; un compuesto de unión covalente a ADN y un alcano sulfonato tal como busulfan; una nitrosourea tal como carmustina; un compuesto de unión covalente a ADN y un agente metilante tal como procarbina; un compuesto de unión covalente a ADN y una aziridina tal como la mitomicina, un compuesto de enlace no covalente a ADN; un compuesto de unión no covalente a ADN tal como etopósido, tenipósido, camptotecina y topotecan; un inhibidor de la función cromatínica y un inhibidor de los microtúbulos tal como alcaloides de la vinca que incluyen vincristina, vinblastina, vindisina, y paclitaxel, taxotere u otro taxano; un compuesto que afecte a la función endocrina tal como prednisona, prednisolona, tamoxifeno, leuprolida, etinil estradiol, un anticuerpo tal como herceptina; un gen tal como el gen p-53, el gen p-16, el gen MIT, y el gen E-caderina; una citocina tal como las interleucinas, particularmente, IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8 e IL-12, los factores de necrosis tumoral tal como el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) y, factor estimulante de colonias de macrófago granulocito (GM-CSF) un interferón tal como el interferón-alfa, interferón-beta 1, interferón-beta 2, e interferón gamma, ácido retinoico totalmente trans y otros retinoides para el tratamiento del cáncer, un agente inmunosupresor tal como: ciclosporina, una inmunoglobulina, y sulfasacina, metoxsalen y talidomida; insulina y glucagón para la diabetes; calcitonina y alendronato sódico para la osteoporosis, hipercalcemia y enfermedad de Paget; morfina y opioides relacionados; meperidina o un congénere; metadona o un congénere, un antagonista opioide tal como nalorfina; un agente antitusivo central activo tal como dextrometorfano, tetrahidrocannabinol, o marinol, lidocaína y bupicaína para el manejo del dolor; clorpromacina, proclorperacina; un cannabinoide tal como tetrahidrocannabinol, una butirofenona tal como droperidol; una benzamida tal como metoclopramida para el tratamiento de la náusea y vómito; heparina, cumarina, estreptoquinasa, factor activador de plasminógeno tisular (t-PA) como fármacos anticoagulantes, antitrombóticos o antiplaquetas; heparina, sulfasalacina, nicotina y esteroides y factor-alfa de necrosis tumoral para el tratamiento de enfermedad inflamatoria intestinal; nicotina para el tratamiento de la adicción del fumador; hormona de crecimiento, hormona luteinizante, corticotropina, y somatotropina para la terapia hormonal; y adrenalina para anafilaxia general.

El beneficio de incluir agentes hidrófobos en las partículas de la invención es que se solubilizan eficazmente en I estructura estable de las partículas, que de esta manera sirven como depósito y/o vehículo de suministro para agentes hidrófobos en ambientes acuosos, los cuales están presentes, por ejemplo, en la mayoría de los fluidos corporales y tejidos. En comparación con los medios de solubilización clásicos por medio de detergentes o disolventes orgánicos, las partículas de la invención ofrecen las ventajas de que en la parte exterior son hidrófilas

mientras que el agente hidrófobo está disuelto eficazmente en el interior hidrófobo de la partícula, por cuyo medio el agente hidrófobo puede mantener sus funcionalidades nativas tal como por ejemplo, la actividad catalítica o unión al ligando. Además, al contrario que la mayoría de detergentes o disolventes orgánicos, las partículas de la invención parece que son biocompatibles.

5 Además de los compuestos hidrófobos orgánicos, las partículas lipoproteicas de la invención han probado ser también capaces de incorporar establemente biomoléculas hidrófobas tales como, por ejemplo, una proteína que comprende un resto hidrófobo. De acuerdo con la invención, las proteínas que comprenden un medio hidrófobo, se pueden seleccionar, por ejemplo, de una proteína de membrana, una proteína integral transmembrana, una proteína
10 de membrana monotópica integral, una proteína de membrana periférica, una proteína anfitrópica en un estado unido a lípidos, una proteína anclada a lípidos, y una proteína quimérica con un dominio transmembrana y/o hidrofóbico.

15 Las proteínas de membrana integrales son proteínas de membrana que están unidas permanentemente a la bicapa lipídica y habitualmente necesita un detergente o disolvente apolar para ser desplazada de la membrana. Las proteínas transmembrana son proteínas transmembrana que atraviesan la membrana al menos una vez.

Ejemplos de proteínas de transmembrana que se pueden incorporar en las partículas de la invención son receptores acoplados a proteínas G (GPCR), portadores tales como uniportadores, simportadores o antiportadores, canales
20 tales como canales iónicos o enzimas.

25 Las proteínas integrales monotópicas están fijadas permanente a la membrana solo en un lado y no atraviesan la membrana. Esta clase incluye proteínas de membrana que están unidas a la membrana por medio de anclas transmembrana alfa-helicoides. Ejemplos incluyen las citocromo 450 oxidasas y glucoforina A.

30 Las proteínas de membrana periféricas solo están asociadas temporalmente o indirectamente con la bicapa lipídica o proteínas integrales de membrana que se incorporan en la misma. Las proteínas de membrana periféricas habitualmente se disocian de las membranas siguiendo el tratamiento con un reactivo polar con un pH elevado o altas concentraciones de sal. Ejemplos de proteínas de membrana periféricas incluyen fosfolipasa A2 o C, lipooxigenasas y citocromo C.

Las proteínas ancladas a lípido se unen a la bicapa lipídica por medio de restos de aminoácidos lipidados, en particular prenilados o anclados a GPI. Ejemplos incluyen lipoproteínas bacterianas, proteínas G y ciertas cinasas.

35 Las proteínas anfitrópicas son proteínas que existen al menos en dos estados conformacionales, un estado libre de lípidos, hidrosoluble y en un estado unido a lípidos. Al asociarse con lípidos, las proteínas anfitrópicas sufren un cambio conformacional que las permite llegar a asociarse reversible o irreversiblemente a la membrana. Ejemplos de proteínas anfitrópicas son toxinas formadoras de poros y péptidos antibacterianos.

40 Las partículas de la invención tienen forma de disco. Pueden tener un radio de Stokes (radio hidrodinámico) R_s en el intervalo de desde 2 nm a 200 nm, en particular de 3 nm a 150 nm, preferentemente de 3 nm a 100 nm. El experto sabe cómo determinar el radio de Stokes. Se hace preferentemente por filtración analítica en gel (cromatografía de exclusión en gel), en comparación con referencias de radios Stokes conocidos. En particular, las partículas se pueden someter a una etapa de filtración en gel, por ejemplo, una columna de filtración en gel Superdex 200 HR10
45 30 y eluido con un tampón adecuado a pH 7,5 y 0,5 ml/min a temperatura ambiente. Se controla la absorbancia a 280 nm para la proteína. La columna se calibra utilizando una mezcla de proteínas de referencia de radios de Stokes conocidos como por ejemplo, tiroglobulina 669 kDa ($RS = 8,5$ nm), ferritina 440 kDa ($RS = 6,1$ nm), catalasa 232 kDa ($Rs = 4,6$ nm), lactato deshidrogenasa 140 kDa ($RS = 4,1$ nm), seroalbúmina felina 66 kDa ($RS = 3,55$ nm) y citocromo C de corazón equino 12,4 kDa ($RS = 1,8$ nm). Las proteínas de referencia deberían abarcar valores de RS por encima y por debajo de la partícula de interés. Se genera una curva de calibración representando la posición de elución frente a RS de las proteínas de referencia. Esto en general da un gráfico aproximadamente lineal, pero de otra manera, es satisfactorio dibujar líneas entre los puntos y lectura de RS de la proteína de interés a partir de su posición de elución en esta curva de referencia.

55 En algunas realizaciones, por ejemplo cuando están presentes en las partículas un agente hidrófobo masivo o altas cantidades de lípidos, el radio de Stokes será mayor de 3,2 nm, en particular al menos 3,5 nm, al menos 5,0 nm o al menos 10,0 nm.

60 Las partículas de la invención, y en particular la forma sustancialmente tipo disco de la misma, también se puede examinar por medio de microscopía electrónica de transmisión o, si las partículas son lo suficientemente grandes por medio de microscopía electrónica de tinción negativa y análisis de partícula única como se describe en el Ejemplo 12 posteriormente.

65 El análisis estructural ha indicado que en las partículas de la invención, los lípidos se ensamblan en la estructura bicapa discoidal de tamaño determinado en el interior de la partícula. El componente polipeptídico de unión a lípidos define en general el límite de la bicapa discoidal y proporciona la estructura y estabilidad a la partícula. El interior de

la partícula incluye una región hidrófoba (por ejemplo, que comprende cadenas lipídicas acil grasas). Al contrario que los liposomas, las partículas de la invención no comprenden un núcleo acuoso o hidrófilo. Las partículas tienen forma de disco, teniendo en general una bicapa lipídica plana, discoidal, más o menos circular circunscrita por α -hélices anfipáticas proporcionadas por dos o más polipéptidos de unión a lípidos, que se asocian con las superficies hidrófobas de la bicapa alrededor de la periferia del disco. Ejemplos ilustrativos de partículas con forma de disco de la invención se representan esquemáticamente en las Figuras 2 a 7.

La forma discoidal de las partículas de la invención pueden aproximarse a un cilindro con una relación de la altura máxima respecto al diámetro máximo (longitud del eje mayor) de al menos 1,0:1,1, en particular 1,0:1,5 o 1,0:2,0. La altura máxima de la partícula discoidal generalmente es al menos de 3,5 nm, en particular al menos 5 nm, como se determina por microscopía electrónica de transmisión o, si las partículas son suficientemente grandes, por medio de microscopía electrónica de tinción negativa y análisis de partícula única. La partícula de la invención tiene una parte superior, una parte inferior y una superficie lateral en forma de circunferencia, con el diámetro máximo (longitud del eje principal) desde la parte superior y siendo la superficie inferior mayor que la longitud de la superficie lateral circunferencial. En algunas realizaciones de la partícula de la invención, el polipéptido de unión a lípidos está al menos parcialmente localizado rodeando la superficie lateral en forma de circunferencia de la partícula.

En algunas realizaciones de la invención, el diámetro máximo (longitud del eje mayor) de la partícula en forma de disco de la invención, según se determina por microscopía electrónica de transmisión o, si las partículas son lo suficientemente grandes, por medio de microscopía electrónica de tinción negativa y un análisis de partícula única es desde 2 nm a 200 nm, en particular desde 3 nm a 150 nm, preferentemente de 3 nm a 100 nm. En otra realización, el diámetro máximo (longitud del eje mayor) de la partícula con forma de disco es desde 3 nm a 80 nm, en particular de 3 nm a 60 nm. Los experimentos prácticos han demostrado que las partículas que tienen un diámetro máximo (longitud del eje mayor) de 3 nm a 20 nm son particularmente fáciles de obtener con el método de la invención.

En realizaciones preferidas de la invención, las partículas se definen por una población sustancialmente monodispersa de estructuras en forma de disco, como se evalúa por el perfil de elución de la filtración en gel en, por ejemplo, en una columna HiLoad Superdex™ 200 16/60 GL.

En general, la interacción predominante entre el polipéptido de unión a lípido y la bicapa lipídica en una partícula es por medio de interacciones hidrófobas entre los restos de las superficies hidrófobas de las α -hélices de las moléculas del péptido de unión a lípidos y las superficies hidrófobas de los lípidos, por ejemplo, las cadenas acil grasas de fosfolípidos, al final de la bicapa en la periferia de la partícula de suministro del agente bioactivo. Una α -hélice anfipática de la molécula del polipéptido de unión a lípidos incluyen tanto una superficie hidrófoba en contacto con una superficie hidrófoba de la bicapa lipídica en la periferia de la partícula, y una superficie hidrófila de cara al exterior de la partícula y en contacto con el ambiente acuoso cuando la partícula está suspendida en un medio acuoso.

En algunas realizaciones, las partículas son estables en solución acuosa y se pueden liofilizar para el almacenamiento a largo plazo, seguido por la reconstitución en solución acuosa. "Estabilidad" o "estable" como se utiliza en el presente documento significa disminuir hasta niveles no detectables de fragmentación de partículas, disminución hasta niveles indetectables de agregación o deterioro de la calidad durante la preparación, transporte, y almacenamiento de las partículas.

En una realización preferida, las partículas de acuerdo con la invención son estables en soluciones acuosas a un pH desde 5,0 a 8,0 y a una temperatura de desde -210 °C a 4 °C durante al menos 1 día, al menos 2 días, al menos 7 días, al menos 2 semanas, al menos 1 mes, al menos 6 meses o al menos 12 meses, como se determina, por ejemplo, por inspección visual (solución transparente y libre de precipitados) o filtración analítica en gel (menos del 50 %, en particular de 1 a 40 % de fragmentación de las partículas). Los experimentos prácticos han demostrado que las partículas de la invención son estables también a temperaturas de 4 °C a 40 °C en soluciones acuosas a un pH de desde 5,0 a 8,0 durante al menos 1 día, al menos 2 días, al menos 7 días, al menos 2 semanas, al menos 1 mes o al menos 3 meses, como se determina, por ejemplo, por inspección visual (solución transparente o libre de precipitados) o filtración analítica en gel (menos del 50 %, en particular desde el 1 al 49 % de fragmentación de las partículas). Las partículas de la invención también han probado ser estables en soluciones acuosas a un pH de desde 5,0 a 8,0 y una temperatura de desde 40 °C a 75 °C durante al menos 10 minutos, como se determina por ejemplo, por inspección visual (solución transparente y libre de precipitados) o filtración analítica en gel (menor del 50 %, en particular desde el 1 al 40 % de fragmentación de las partículas). En algunas realizaciones, las partículas se pueden liofilizar para el almacenamiento a largo plazo, seguido por la reconstitución en solución acuosa. En algunas realizaciones, las partículas de la invención son estables en forma liofilizada desde -210 °C a 40 °C, en particular desde -210 °C a 25 °C durante al menos 1 día, al menos 2 días, al menos 7 días, al menos 2 semanas, al menos 1 mes, al menos 6 meses o al menos 12 meses, como se determina, por ejemplo, por filtración analítica en gel después de la reconstitución en un tampón apropiado a pH 7,5 (menos del 50 %, en particular menos del 40 % o desde el 1 al 40 % de fragmentación de partículas). "Fragmentación" como se utiliza en el presente documento significa que en el perfil de elución del gel de filtración, el tamaño del pico (es decir, la altura del pico) correspondiente a la partícula de la invención ha disminuido con respecto al tamaño del pico de la SAPLIP no unida

a lípidos y/o los lípidos libres y/o agregados, según se compara con el tamaño del pico de partículas recién preparadas de la invención. En consecuencia, una fragmentación del 40 % significa, por ejemplo, que el tamaño del pico (es decir, la altura del pico en el perfil de elución del gen de filtración) ha disminuido un 40 % en comparación con el tamaño del pico antes del almacenamiento (100 %).

5 Los experimentos prácticos han demostrado que las partículas de la invención son particularmente estables también en soluciones acuosas que están sustancialmente libres de detergentes. Sustancialmente libres de detergentes significa que la solución acuosa comprende menos del 0,001 % (p/v) de detergentes basándose en el volumen total de solución acuosa.

10 La invención proporciona además un proceso para preparar una partícula con forma de disco que comprende un polipéptido de unión a lípidos y lípidos, en el que el polipéptido de unión a lípidos es una proteína tipo saposina (SAPLIP) como se describe para la partícula con forma de disco de acuerdo con la invención anterior o una forma derivada de la misma como se describe para la partícula con forma de disco de acuerdo con la invención anterior, y en la que la partícula no comprende un núcleo acuoso hidrófilo, comprendiendo el proceso las etapas de

a) poner en contacto el polipéptido de unión a lípidos con los lípidos solubilizados en detergente en un ambiente líquido;

20 b) permitir el auto-ensamblaje de las partículas a un pH de desde 6,0 a 10.

También se describe en el presente documento el auto-ensamblaje de partículas a un pH de desde 5,0 a 10 o 5,0 a 8,5; en particular de 6,0 a 8,0 y más preferentemente de 7,0 a 8,0.

25 En algunas realizaciones del proceso, el polipéptido de unión a lípidos y los lípidos son según se ha descrito anteriormente.

30 En la etapa a), el polipéptido de unión a lípidos se pone en contacto con lípidos estabilizados por detergente en un ambiente lipídico. En una realización del proceso de la invención, el polipéptido de unión a lípidos se pone en contacto en la etapa (a) con los lípidos solubilizados en un líquido acuoso. También se describe en el presente documento que el líquido acuoso es una solución tampón a un pH de desde 5,0 a 10,0 o desde 5,0 a 8,5; en particular desde 6,0 a 8,0 y más preferentemente desde 7,0 a 8,0.

35 En una realización particular de la presente divulgación, los lípidos se han solubilizado por medio de un disolvente orgánico o un detergente. De acuerdo con la invención los lípidos que se utilizan en la etapa (a) están en un estado solubilizado por detergente. Los experimentos prácticos han demostrado que se puede utilizar una amplia variedad de detergentes para solubilizar los lípidos para emplearse en el proceso de la invención. Por ejemplo, el proceso de la invención funciona muy bien con lípidos solubilizados en soluciones que comprenden de un 0,0 a un 50 %, en particular de un 0,1 a 1,0 % de alquil glucósidos tales como alquil maltósidos de cadena larga o corta y glucósidos. Sin embargo, dependiendo del tipo de lípidos que se emplee, se pueden utilizar también otros detergentes adecuados. La capacidad de un determinado detergente para solubilizar un determinado lípido o mezcla de lípidos se puede fácilmente inspeccionar visualmente en cuanto a la formación de una solución transparente carente de agregados, precipitados o separación de fases.

45 Al contrario que con el proceso de la técnica anterior, los lípidos se pueden emplear en el proceso de la invención directamente sin necesidad de una etapa corriente arriba de preparación de liposomas. Esto es ventajoso ya que simplifica el proceso de fabricación de las partículas de lipoproteínas SAPLIP. En vista de la naturaleza solubilizada de los lípidos que se utilicen como material de partida para la etapa (a) del proceso de la invención, se cree que los lípidos no están sustancialmente en forma de liposomas.

50 Los experimentos prácticos han demostrado que los polipéptidos de unión a lípidos de la invención no necesitan detergentes u otros disolventes durante la purificación, almacenamiento o manejo. Sin embargo, el polipéptido de unión a lípidos en la etapa (a) puede estar en un estado solubilizado en un detergente.

55 En una realización del proceso de la invención, la relación molar de polipéptido de unión a lípidos con respecto a los lípidos en la etapa (a) es al menos de 1:1, en particular al menos de 1:3, preferentemente al menos de 1:5 a 1:10.

60 En la etapa (b) del proceso de la invención, un pH de 6,0 a 10,0, preferentemente de 6,0 a 8,5 permite que los componentes que se ponen en contacto entre ellos en la etapa (a) que se auto-ensamblen en la partícula de la invención. Contrariamente a lo esperado basándose en la técnica anterior las partículas de lipoproteínas SAPLIP que se debían ensamblar mejor a o cerca del pH óptimo de 4,75 natural de las saposinas, se descubrió que las partículas de lipoproteína SAPLIP se pueden obtener por un proceso simplificado y fiable si se mantiene un pH más neutro o básico durante la preparación de las partículas. Sorprendentemente, se descubrió que a un pH de desde 6,0 a 10 y en presencia de lípidos solubilizados, las proteínas tipo saposina purificada o una forma derivada o troncada de las mismas se auto-ensamblaba en partículas de lipoproteína estables sin necesidad de una etapa corriente arriba de preparación de liposomas. Este método simple y fiable de preparación fallaba de dar un

rendimiento de resultados satisfactorios cuando el ensamblaje de la partícula se intentaba al pH óptimo de 4,75 natural de la saposina o en ausencia de lípidos.

5 La etapa (b) del proceso de la invención puede comprender la dilución de la mezcla obtenida en la etapa (a) con un líquido que contiene menos cantidades de detergente que la mezcla obtenida en la etapa (a). Los experimentos prácticos han demostrado que dicha etapa de dilución induce adicionalmente y facilita el auto-ensamblaje de las partículas de la invención. Sin querer quedar ligados por esta teoría, ese cree que dicha etapa de dilución elimina eficazmente las moléculas de disolvente o detergente de las superficies hidrófobas del polipéptido de unión a lípidos y los lípidos, desencadenando de esta manera el proceso de auto-ensamblaje de la partícula de la invención
10 mediante el aumento de las interacciones hidrófobas de los componentes.

Aunque la etapa (b) de auto-ensamblaje de la partícula puede tener lugar exactamente en la misma composición que se prepara en la etapa (a), los experimentos prácticos han demostrado que preferentemente la etapa (b) comprende una eliminación del disolvente orgánico/detergente o etapa de dilución. La etapa (b) puede ser, por ejemplo, una etapa de filtración en gel. En ciertas realizaciones, la mezcla obtenida en la etapa (a) se somete a una etapa de filtración en gel, por lo que el tampón de filtración en gel u otra solución es un líquido que contiene menos cantidades de detergente que la mezcla obtenida en la etapa (a).
15

En el proceso de la invención la etapa (a) y/o la etapa (b) se llevan a cabo preferentemente a una temperatura de desde 1 °C a 95 °C, en particular desde 15 °C a 80 °C, particularmente preferido a 30 °C a 40 °C, y/o cerca de la temperatura de transición de la fase gel a líquido cristalino de los lípidos que se utilizan. La temperatura de transición de fase de los lípidos que se utilizan se puede encontrar fácilmente en la bibliografía o se determina por calorimetría.
20

De acuerdo con una realización del proceso de la invención en la etapa (b) o en una etapa opcional posterior (c) se lleva a cabo una purificación de las partículas de la invención por al menos la eliminación parcial de los lípidos libres y/o el polipéptido de unión a lípidos libre. Los métodos adecuados de purificación son métodos cromatográficos, en particular cromatografía de exclusión por tamaño, ultracentrifugación, diálisis, poner en contacto con bioperlas de unión a detergente, utilización de concentradores, cromatografía de afinidad, perlas magnéticas y/o membranas/filtros para retirar los lípidos y/o compuesto hidrófobos no unidos/no incorporados.
25
30

Los productos del proceso de la invención son partículas que comprenden el polipéptido de unión a lípidos y el componente lipídico. Se hace referencia a estas partículas de la invención como partículas Salipro en la descripción adicional de la invención y en ciertas realizaciones pueden tener cualquiera o todas las características descritas anteriormente para las partículas Salipro que comprenden un polipéptido de unión a lípidos, lípidos y un agente hidrófobo.
35

El proceso de la invención se puede utilizar también para incorporar un agente hidrófobo en las partículas Salipro, por lo que resulta en partículas producidas que comprenden un polipéptido de unión a lípidos, lípidos y un agente hidrófobo. El agente hidrófobo puede tener cualquiera o todas las características descritas anteriormente para los distintos agentes hidrófobos que pueden estar comprendidos en las partículas de la invención.
40

Si se van a preparar partículas Salipro con un agente hidrófobo incorporado, la etapa a) del proceso de la invención se modifica simplemente en que el polipéptido de unión al lípido se pone en contacto con lípidos en un ambiente líquido que comprende el agente hidrófobo que va a ser incorporado a la partícula. Los experimentos prácticos han demostrado que el proceso de la invención permite la incorporación estable de compuestos orgánicos hidrófobos, tales como, por ejemplo, curcumina, así como proteínas de membrana monoméricas u oligoméricas en las partículas de la invención.
45

En una realización el agente hidrófobo se ha solubilizado por medio de un disolvente orgánico adecuado (tal como por ejemplo, DMSO, metanol y/o cloroformo) o un detergente antes de emplearse en la etapa (a). Preferentemente, el agente hidrófobo que se utiliza en la etapa (a) está en un estado solubilizado en detergente. El detergente puede ser el mismo o diferente del que se utiliza para solubilizar los lípidos.
50

En una realización, el detergente que se utiliza para solubilizar los lípidos y/o el agente hidrófobo que se emplea(n) en la etapa (a) no se vehicula en cantidades sustanciales en las partículas terminadas de la invención. En particular, la cantidad de detergente en las partículas que se obtienen por el proceso de la invención puede ser baja o indetectable. En una realización las partículas de la invención no comprenden cantidades sustanciales de detergente, en particular menos de 0,1 % pp, preferentemente menos de 0,01 % pp, particularmente preferido menos de 0,001 % por peso de detergente basándose en el peso de la partícula. La cantidad de detergente presente en las partículas se puede determinar, por ejemplo, por espectrometría de masas.
55
60

Si el agente hidrófobo que se utiliza en la etapa (a) está en estado solubilizado en un detergente, los experimentos prácticos han demostrado que es ventajoso utilizar detergentes para la purificación y/o la solubilización del agente con colas hidrófobas de cadena corta o media. Esto es particularmente verdad si se incorpora una proteína de membrana como agente hidrófobo. "colas hidrófobas de cadena corta" como se utiliza en el presente documento significa de C2 a C9, tal como, por ejemplo, en la n-nonil-β-maltósido (NM); "colas hidrófobas de cadena media"
65

como se utilizan en el presente documento dignifica C10 a C15, tal como, por ejemplo, en n-decil- β -maltósido (DM) o n-dodecil- β -maltósido (DDM). En una realización, el detergente que se utiliza para la purificación y/o la solubilización del agente hidrófobo tiene desde 2 a 12 átomos de carbono en su cola hidrófoba, preferentemente desde 2 a 10 y más preferida desde 2 a 9 átomos de carbono en su cola hidrófoba.

5 En algunas realizaciones, la relación molar del polipéptido de unión a lípidos respecto al agente hidrófobo en la etapa (a) es al menos de 1: 0,5, preferentemente al menos de 1:2 o al menos de 1:5, particularmente preferido es de al menos 1:10. En otra realización, la relación molar del polipéptido de unión a lípidos respecto al agente hidrófobo en la etapa (a) es desde 1:0,5 a 1:10000, en particular desde 1:0,5 y 1:1000 o desde 1:0,5 a 1:500. Los
10 experimentos prácticos han demostrados que la estequiometría de los componentes y el tamaño de las partículas resultantes se pueden controlar ajustando la relación de los componentes de partida en consecuencia.

La invención se refiere también a la partícula que se puede obtener por el proceso de la invención descrito anteriormente, es decir, independientemente del proceso que se utiliza actualmente para preparar la partícula. Las
15 partículas que se pueden obtener por el proceso de la invención se diferencian de las partículas de la técnica anterior por múltiples características, por ejemplo, por su flexibilidad inherente de tamaño y la capacidad de adaptarse al tamaño respectivo del agente hidrófobo que se incorpora en las partículas de lipoproteína.

La invención también proporciona una composición farmacéutica para el suministro de un agente hidrófobo a un individuo que lo necesita, en el que la composición comprende partículas de la invención y en el que el agente
20 hidrófobo es un principio activo y/o en el que además del agente hidrófobo está presente un principio activo.

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

25 Cuando las partículas de la invención son para su uso en una composición farmacéutica, los componentes individuales de las partículas de la composición farmacéutica deberían ser farmacéuticamente aceptables. Como se utiliza en el presente documento "farmacéuticamente aceptables" se refiere a los componentes, compuestos o agentes que son, en el ámbito del buen juicio médico, adecuados para su uso de ponerlos en contacto con los tejidos de seres humanos y animales inferiores sin una toxicidad, irritación, respuestas alérgicas y similares innecesarias, y son proporcionados con una relación riesgo/beneficio razonable.

En otro aspecto más, la invención proporciona un método de tratamiento de un individuo que necesita el mismo, con una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica descrita anteriormente. Una "cantidad
35 terapéuticamente eficaz" de la composición farmacéutica, como se utiliza en el presente documento, es una cantidad eficaz para tratar o disminuir la gravedad de la enfermedad o afección que se va a tratar. El término "individuo" como se utiliza en el presente documento, significa un animal, por ejemplo, un mamífero, y más específicamente un ser humano.

40 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden administrar a seres humanos y los otros animales por vía oral, rectal, parenteral, intracisternal, intravaginal, intraperitoneal, tópica (como por polvos, ungüentos o gotas), bucal, como un aerosol, un pulverizador oral o nasal, o similares, dependiendo de la gravedad de la enfermedad o afección que se va a tratar. En particular, la composición farmacéutica se puede formular para administración enteral, parenteral y/o tópica. Se puede administrar como una cápsula, infusión o inyección, una
45 composición una composición cepillable o potable o como un aerosol. En algunas realizaciones de la composición farmacéutica de la invención, las partículas de la invención están presentes en forma sólida, como una dispersión o en solución.

Las partículas de la invención también son útiles para aplicaciones de diagnóstico y/o cosméticas. Por ejemplo, las
50 partículas que comprenden sustancias detectables, tales como marcas, marcadores o indicadores, se pueden utilizar como agentes de diagnóstico y se aplican para fines diagnósticos. Las marcas, marcadores o indicadores pueden estar comprendidos en los mismos o formados por el agente hidrófobo, sin embargo también se pueden unir al polipéptido de unión a lípidos o los componentes lipídicos de la partícula. Ejemplos de herramientas diagnósticos y de investigación de ciencias biológicas de acuerdo con la invención incluyen partículas con proteínas hidrófobas
55 marcadas incorporadas, polipéptidos de unión a lípidos marcados, lípidos marcados, fluoróforos incorporados o agentes de contraste (por ejemplo imagen MR). El marcador puede ser un marcador por ejemplo fluorescente.

Además, las partículas de la invención son útiles como herramientas para el desarrollo de fármacos, exploración de fármacos y/o investigación de proteínas de membrana.

60 Por ejemplo, se puede incorporar un fármaco dirigido a la proteína de membrana, tal como un receptor de superficie celular o un canal iónico, en las partículas de la invención y por esto se solubilizan. Dichas partículas se pueden emplear entonces en ensayos para el estudio de la actividad del fármaco dirigido a una proteína de membrana en su ambiente bicapa lipídica nativo o usarse en exploración de fármacos para identificar nuevos fármacos.

65 Además, las partículas de la invención también se pueden fijar en un soporte sólido que los hace útiles para

aplicaciones tales como resonancia de plasmones superficiales (SPR) o aplicaciones de biosensor.

Las partículas de la invención generalmente son útiles para hacer de otra manera que las proteínas de membrana insolubles se vuelvan solubles en soluciones acuosas en un microambiente bicapa tipo nativo. Por lo tanto, la invención proporciona una amplia variedad de nuevas aplicaciones en la investigación de las proteínas de membrana. Por ejemplo, las partículas de la invención permiten el estudio de las proteínas de membrana en las partículas de la invención por métodos tales como la resonancia magnética nuclear (NMR), cristalografía por rayos X, microscopía electrónica (EM), espectrometría de masas, calorimetría de titulación isotérmica (ITC), dispersión diferencial de luz, dispersión de rayos X de ángulo pequeño (SAXS) y similares.

En otro aspecto, las partículas de la invención son útiles en una formulación vacunal, como vehículo de la misma o como vehículo de suministro del fármaco. Muchos antígenos patógenos que pueden ser particularmente potentes en las vacunas se exponen en la superficie y/o están comprendidos en la membrana celular externa de los agentes patógenos, es decir, se derivan de lípidos patogénicos, otras biomoléculas hidrófobas o proteínas de membrana. Por ejemplo, los antígenos principales de los virus de influenza están presentes en la proteína de membrana integral Hemaglutinina. Con las partículas de la invención, dichas biomoléculas hidrófobas patogénicas se pueden incorporar eficazmente en las partículas que entonces se pueden utilizar como vehículos de suministro de presentación de antígenos en las formulaciones vacunales. A lo largo de estas líneas, las partículas de la invención también son útiles para funcionar como vehículos presentadores de antígenos para generar anticuerpos contra los agentes hidrófobos o las biomoléculas en animales huésped adecuados tal como, por ejemplo, conejos, cabras o llamas.

Además, la partícula de la invención se puede utilizar en cosméticos, en particular en los que la partícula de la invención incluye agentes fortalecedores y/o nutritivos, tales como las proteínas y/o antioxidantes.

25 Breve descripción de los dibujos

Características y ventajas adicionales de la invención aparecerán a partir de la siguiente descripción detallada de algunas de sus realizaciones que se muestran por medio de los ejemplos no limitantes y los dibujos adjuntos, en los que:

- 30 Figura 1 es una ilustración esquemática de la forma y organización molecular de la Apolipoproteína A-1 que contiene partículas de nanodiscos de la técnica anterior (por ejemplo, EP 1 596 828 B1 que se trató anteriormente).
- 35 Figura 2 es una ilustración esquemática de las partículas Salipro de acuerdo con la invención que comprende compuestos orgánicos hidrófobos y su preparación; representada en a) en su vista lateral y en b) como su vista superior.
- 40 Figura 3 es una ilustración esquemática de partículas Salipro de acuerdo con la invención que comprende proteínas de membrana y su preparación; se representa en a) la vista lateral y en b) la vista superior.
- Figura 4 es una ilustración esquemática de partículas Salipro de acuerdo con la invención que comprende una proteína de membrana y compuestos orgánicos hidrófobos y su preparación; se representa en a) la vista lateral y en b) la vista superior.
- 45 Figura 5 es una ilustración esquemática de partículas Salipro de acuerdo con la invención que comprende una proteína de membrana oligomérica; se representa en a) la vista lateral y en b) la vista superior.
- Figura 6 es una ilustración esquemática de partículas Salipro de acuerdo con la invención que comprende un componente dirigido tal como un anticuerpo y compuestos orgánicos hidrófobos y su preparación.
- 50 Figura 7 es una ilustración esquemática de partículas Salipro de acuerdo con la invención y su preparación, se representa en a) la vista lateral y en b) la vista superior.
- 55 Figura 8 es un perfil de elución de filtración en gel de las partículas Salipro ("Saposina + Lípidos pH 7,5") de acuerdo con la invención y experimentos de comparación ("Saposina + Lípidos pH 4,75"; "Saposina pH 7,5") como se describe en el Ejemplo 2.
- Figura 9 es un perfil de elución de filtración en gel de las partículas Salipro ("Saposina + LDAO + Lípidos pH 7,5") de acuerdo con la invención y experimentos de comparación ("Saposina + LDAO pH 7,5"; "Saposina + LDAO pH 4,75, Saposina + LDAO + lípidos pH 4,75") como se describe en el Ejemplo 3.
- 60 Figura 10 es un perfil de elución de filtración en gel de las partículas Salipro de acuerdo con la invención utilizando varios lípidos diferentes como se describe en el Ejemplo 4.
- 65 Figura 11 es un perfil de elución de filtración en gel de las partículas Salipro que comprende la proteína de

membrana YbgH ("Saposina + Detergente + Lípidos + MemProt YbgH pH 7,5") de acuerdo con la invención y experimentos de comparación ("Saposina + Detergente + Lípidos + MemProt YbgH pH 4,75"; "Saposina + Detergente + MemProt YbgH pH 7,5"; "Saposina + Detergente + MemProt YbgH pH 4,75") como se describe en el Ejemplo 5.

- 5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55
 60
 65
- Figura 12 es un perfil de elución de filtración en gel de las partículas Salipro ("Saposina + Detergente + Lípidos") y partículas Salipro que comprenden la proteína de membrana MATE ("Saposina + Detergente + Lípidos + MemProt MATE") de acuerdo con la invención y experimentos de comparación ("Saposina"; "Saposina + Detergente + MemProt MATE") como se describe en el Ejemplo 6.
- Figura 13 es un perfil de elución de filtración en gel de las partículas Salipro ("Saposina + Lípidos") o partículas Salipro que comprenden la proteína de membrana homotetramérica POT1 ("Saposina + Lípidos + MemProt POT1") de acuerdo con la invención como se describe en el Ejemplo 7.
- Figura 14 es un perfil de elución de filtración en gel de las partículas Salipro ("Saposina + Lípidos") o las partículas Salipro que comprenden la proteína de membrana humana Sinaptofisina ("Saposina + Lípidos + MemProt SYP") de acuerdo con la invención como se describe en el Ejemplo 8.
- Figura 15 es un perfil de elución de filtración en gel de las partículas Salipro ("Salipro solamente con lípidos") o partículas Salipro que comprenden el fármaco lipófilo Curcumina ("Salipro-Curcumina") de acuerdo con la invención como se describe en el Ejemplo 9.
- Figura 16 es un perfil de elución de filtración en gel de las partículas Salipro ("Salipro solamente con lípidos") de acuerdo con la invención que se prepararon con varias cantidades de lípidos como se describe en el Ejemplo 10.
- Figura 17 es un perfil de elución de filtración en gel de las partículas Salipro ("Salipro solamente con lípidos") y partículas Salipro que comprenden POT1 o Sinaptofisina ("Saposina + POT1"; "Saposina-SYP") de acuerdo con la invención como se describe en el Ejemplo 11.
- Figura 18 muestra el análisis de partículas únicas de las partículas Salipro-POT1 con microscopía electrónica de tinción negativa como se describe en el Ejemplo 12, en el que a) representa una micrografía electrónica y b) las medias de clase de partículas Salipro-POT1. Las entradas c) y d) muestran la superficie a que da lugar la reconstrucción 3D de Salipro-POT1 en vista desde superior y lateral, respectivamente.
- Figura 19 es un perfil de elución de filtración en gel de las partículas Salipro de acuerdo con la invención que se sometieron a diferentes tratamientos con calor como se describe en el Ejemplo 13.
- La Figura 1 representa – de forma esquemática – la forma y organización molecular de la Apolipoproteína A1 que contiene partículas de nanodiscos 10 de la técnica anterior (por ejemplo, del documento EP 1 596 828 B1 comentado anteriormente). La partícula 10 de la técnica anterior tiene una forma de disco que comprende una proteína de armazón 11 que rodea estrechamente una bicapa lipídica formada por los lípidos 3 en una forma tipo cinturón doble. El interior de dichas partículas está formado por la región hidrófoba de los lípidos 3 en la bicapa lipídica. El diámetro de Stokes de la partícula 10 está en el intervalo de 10 nm.
- La Figura 2 representa – de forma esquemática - la preparación así como la forma y organización molecular de partículas Salipro 1 de acuerdo con la invención que comprende compuestos orgánicos 4 hidrófobos, representados en a) en vista lateral y en b) como vista superior.
- La partícula 1 de la invención se prepara mezclando polipéptido de unión a lípidos 2 con los lípidos 3 y los compuestos orgánicos 4 hidrófobos que se van a incorporar y permitiendo el auto-ensamblaje de la partícula 1 a un pH de desde aproximadamente 6,0 a aproximadamente 10,0. El polipéptido de unión a lípidos 2 es una proteína tipo saposina (SAPLIP) y comprende 4 hélices anfipáticas que se representan como cilindros. Los lípidos 3 son anfifílicos que comprenden un grupo de cabeza hidrófilo (representado como un círculo) y colas hidrófobas tales como cadenas acil grasas (representadas como una línea en zigzag). Como es el caso en las siguientes figuras 3 a 6, una descripción detallada de las características estructurales generales de la partícula 1 y sus lípidos 3 y los componentes SAPLIP 2 se pueden encontrar en la descripción de partícula Salipro solamente con lípidos básica de la invención posterior que se representa en la Figura 7.
- En la partícula 1, los compuestos orgánicos 4 hidrófobos se embeben en la porción hidrófoba de la bicapa lipídica formada por los lípidos 3. El compuesto orgánico 4 hidrófobo puede ser, por ejemplo, un agente biológicamente activo, un fármaco, un principio activo de un fármaco, un principio activo de un producto cosmético, un principio activo de un producto protector de plantas, un suplemento de la dieta y/o nutricional, una sonda diagnóstica, un agente de contraste, un marcador y/o un indicador.
- La Figura 3 representa – en forma esquemática – la preparación así como la forma y organización molecular de

partículas Salipro 1 que comprende una proteína de membrana 5 monomérica de acuerdo con la invención, se representa en a) la vista lateral y en b) la vista superior. La proteína de membrana 5 puede ser una proteína transmembrana integral en forma monomérica, como se representa en las Figuras 3 y 4. Sin embargo, también puede estar en estado oligomérico como se representa en la Figura 5 o una proteína de membrana periférica, una

5 proteína anfitrópica en un estado unido a un lípido, una proteína anclada a un lípido o una proteína quimérica con un dominio hidrófobo fusionado y/o transmembrana, todos los cuales pueden estar en un estado monomérico u oligomérico.

La partícula 1 de la invención se prepara mezclando SAPLIP purificada 2 con los lípidos 3 y la proteína de membrana 5 que se va a incorporar y permitir el auto-ensamblaje de la partícula 1 a un pH de desde aproximadamente 6,0 a aproximadamente 10,0. La proteína de membrana 5 se puede asociar con moléculas de detergente 6 y/o lípidos 12. Las moléculas de detergente 6 pueden resultar de la purificación y/o solubilización de la proteína de membrana 5. Los lípidos 12 asociados con la proteína de membrana 5 pueden traerse desde el ambiente lipídico nativo de la proteína de membrana antes de su purificación. En la partícula 1, la proteína de membrana está embebida en la parte hidrófoba de la bicapa lipídica y adopta una conformación similar como su

10 estado unido a la membrana nativo. La partícula 1 puede comprender opcionalmente lípidos 12 y/o moléculas de detergente 6 derivadas de la proteína de membrana 5 purificada. En ciertas realizaciones, la partícula 1 no comprende cantidades sustanciales de moléculas de detergente 6, en particular menos de un 0,1 % pp de moléculas de detergente basándose en el peso de la partícula.

La partícula de la invención 1 es flexible en el tamaño. Las figuras 2 a 7 no están dibujadas a escala. Dependiendo del tamaño de la proteína de membrana 5 que se incorpora en la partícula 1, la partícula representada en la Figura 3 puede ser sustancialmente mayor que la partícula solo lípido representada en la Figura 7 de la partícula comprende solamente compuestos orgánicos 4 hidrófobos de bajo peso molecular como se representa en la Figura 2. En general, un aumento del tamaño de la partícula también se reflejará por el número de moléculas de SAPLIP 2 por

15 partícula, que puede ser más de dos. La partícula de la invención puede comprender, por ejemplo, dos a veinte, en particular de dos a diez moléculas de SAPLIP 2. El tamaño de la partícula 1 puede estar influenciado también por las cantidades de lípidos 3 añadidos en la etapa (a) de esta preparación.

La Figura 4 representa – de forma esquemática – la preparación así como la forma y organización molecular de partículas Salipro 1 que comprende una proteína de membrana 5 monomérica y compuestos orgánicos 4 hidrófobos de acuerdo con la invención, que se representa en a) en vista lateral y en b) en vista superior. La partícula 1 de la invención se prepara mezclando SAPLIP 2 purificada con lípidos 3, la proteína de membrana 5 y los compuestos orgánicos 4 hidrófobos se incorporan y se permite el auto-ensamblaje de la partícula 1 a un pH de desde

20 aproximadamente 6,0 a aproximadamente 10,0.

La Figura 5 es una ilustración esquemática de partículas Salipro 1 de acuerdo con la invención que comprenden una proteína de membrana 7 oligomérica; se representa en a) la vista lateral y en b) la vista superior. La partícula 1 es flexible en tamaño y se adapta al tamaño del agente hidrófobo 7 incorporado en ella. En la realización representada en la Figura 5, la partícula 1 comprende tres moléculas de SAPLIP 2 por partícula que están dispuestas de una manera de cabeza-a-cola. El radio hidrodinámico de una partícula que comprende tres moléculas de SAPLIP está en el intervalo de 5 a 20 nm, dependiendo del agente hidrófobo incorporado en ella.

25

La Figura 6 representa – de manera esquemática – la preparación así como la forma y la organización molecular de partículas Salipro 1 que comprende un componente dirigido tal como un anticuerpo 8 y compuestos orgánicos 4 hidrófobos. El componente dirigido 8 puede estar en forma de una proteína anclada a un lípido como se representa en la Figura 6 o en forma de una proteína quimérica con un dominio hidrófobo fusionado y/o un dominio transmembrana. El componente dirigido también se puede fijar o estar comprendido en el polipéptido de unión a lípidos 2, uno de los lípidos 3 y/o el compuesto hidrófobo 4.

30

La Figura 7 representa – de manera esquemática – la preparación así como la forma y organización molecular de partículas Salipro de acuerdo con la invención. La partícula 1 de la invención se prepara mezclando SAPLIP purificada 2 con lípidos 3 y se permite el auto-ensamblaje de la partícula 1 a un pH de desde aproximadamente 6,0 a aproximadamente 10,0. Los lípidos 3 son anfífilicos que comprenden un grupo de cabeza hidrófilo (representado por un círculo) y colas hidrófobas tales como cadenas acil grasas (representadas como líneas en zigzag). En el estado apo “cerrado” (cf. en Fig. 7a, lado izquierdo) la conformación de la SAPLIP 2 es diferente en comparación con su conformación “abierta” unida a lípidos en la partícula de la invención 1 (cf. en la Fig. 7a, lado derecho). En el estado cerrado, la SAPLIP 2 adopta una estructura tipo ramo de cuatro hélices. En la conformación “abierta” unida a lípidos en la partícula 1, la SAPLIP 2 adopta una conformación en forma de V o forma de bumerang (cf. en Fig. 7b y Fig. 7a, lado derecho) con las partes hidrófobas de sus hélices anfipáticas contactan con la región hidrófoba de los lípidos 3 de la bicapa lipídica.

35

La Figura 7a muestra la partícula 1 y su preparación en vista lateral, la Figura 7b es la vista superior. La partícula de la invención 1 es aproximadamente con forma de disco, que tiene una bicapa lipídica con forma de cuadrado a casi circular, discoidal, plana circunscrita por las α -hélices anfipáticas de dos moléculas de SAPLIP 2. Los lípidos 3 se ensamblan en una estructura tipo bicapa discoidal de tamaño discreto en el interior de la partícula 1. Las SAPLIP 2

40

definen el límite de la bicapa discoidal en la partícula 1, el interior de la cual es hidrófoba, es decir, comprendido por cadenas lipídicas acil grasas y que carecen de un núcleo hidrófilo o acuoso. La partícula 1 se mantiene unida principalmente por las interacciones hidrófobas de los lípidos 3 con el núcleo bicapa de la partícula 1 y las interacciones hidrófobas entre los lípidos 3 y las partes hidrófobas de las hélices anfífilas de las SAPLIP 2 que encaran al interior de la partícula. Las SAPLIP 2 están dispuestas de una manera cabeza-a-cola y no hay sustancialmente contactos intermoleculares proteína-proteína entre las SAPLIP 2 en la partícula 1. En su forma más pequeña, la partícula 1 se cree que contiene dos moléculas de SAPLIP 2 y al menos alrededor de 10 moléculas lipídicas 3. Sin embargo, la partícula de la invención 1 es flexible en tamaño. Dependiendo de su tamaño y la relación molar de componentes que se utiliza en su preparación puede acomodar múltiples, es decir más de dos, moléculas de SAPLIP 2, muchos más lípidos 3 y opcionalmente componentes adicionales. Por ejemplo, la partícula puede contener de dos a veinte, en particular dos a diez moléculas de SAPLIP 2.

La altura máxima de la partícula Salipro 1 en su forma solo lipídica corresponde con la altura de la bicapa lipídica y es aproximadamente de 5 nm. La partícula 2 tiene una parte superior (véase la Fig. 7b), una parte inferior y una circunferencia en la superficie lateral en forma, con un máximo diámetro (longitud del eje mayor) desde la superficie superior a la inferior que es mayor que la altura de la circunferencia de la superficie lateral.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos sirven para explicar adicionalmente la invención con más detalle, específicamente en referencia a ciertas realizaciones y figuras, que, sin embargo no se pretende que limiten la presente divulgación.

I

Abreviaturas

Se utilizarán las siguientes abreviaturas:

30	POT1:	Proteína de Membrana Procariota, Vehículo peptídico
	POT2:	Proteína de Membrana Procariota, Vehículo peptídico
	MATE:	Proteína de Membrana Procariota, Vehículo MATE
	SYP:	Proteína de Membrana Humana
	YbGH	Proteína de Membrana Procariota (de <i>Escherichia coli</i>), Vehículo peptídico (también conocido como DtpD)
35	DDM:	Dodecil-β-D-Maltósido
	LDAO:	N,N-dimetildodecilamina-N-óxido;
	PS:	fosfatidilserina
	POPC:	2-oleoil-1-palmitoil-sn-glicero-3-fosfolina
40	POPG:	2-oleoil-1-palmitoil-sn-glicero-3-glicerol
	TEV:	Virus Etc de Tabaco
	TCEP:	tris(2-carboxietil)fosfina
	RT:	temperatura ambiente
	Saposina A:	1,2 mg/ml de saposina A (human), 20 mM de Hepes pH 7,5, 150 mM de NaCl
45	solución-lípidos cerebrales:	5 mg/ml lípidos cerebrales, 50 mM de Hepes pH 7,5, 150 mM de NaCl, 0,28 % (p/v) DDM
	Lípidos cerebrales:	Sigma-Aldrich, Extracto cerebral de cerebros bovinos, Tipo I, Fracción Folch I; B-1502
	Tampón GF pH 7,5:	50 mM Hepes pH 7.5, 150 mM NaCl)
50	Tampón GF pH 4,75:	50 mM de acetato sódico pH 4,75, 150 mM de NaCl

II

Purificación de saposina A

Ejemplo 1

La saposina A purificada se preparó de la siguiente manera. La expresión proteica de saposina A se llevó a cabo utilizando un vector con la región codificante de la saposina A humana (SEQ ID NO: 1) insertado en un plásmido pNIC-Bsa4 y transformado y expresado en cepas de *E. coli* Rosetta gami-2 (DE3) (Novagen). Las células se cultivaron a 37 °C en medio TB suplementado con tetraciclina, Cloranfenicol y Kanamicina y se indujo con 0,7 mM de IPTG. Tres horas tras la inducción, las células se recolectaron por centrifugación a 12.000 x g durante 15 min. El sobrenadante se desechó, el aglomerado celular se re-suspendió utilizando un tampón de lisis (20 mM Hepes pH 7,5, 150 mM de NaCl, 20 mM de Imidazol) y se destruyeron por sonicación. Los lisados se sometieron a centrifugación a 26.000 x g durante 30 min, el sobrenadante se calentó a 85 °C durante 10 min, seguido por una etapa de centrifugación adicional a 26.000 x g durante 30 min. La purificación IMAC preparativa se llevó a cabo por

adsorción continua del sobrenadante por rotación fin sobre fin con medio de Flujo Rápido NI Sepharose™ 6 durante 60 min. Tras la unión de la saposina A a la resina IMAC, el medio de cromatografía se empaquetó en una columna de flujo por gravedad abierta de 10 mm (i.d.) y las proteínas no unidas se eliminaron por lavado con 15 volúmenes de lecho de tampón de lisis. La resina se lavó con 15 volúmenes de lecho de tampón de lavado WB2 (20 mM de Hepes pH 7,5, 150 mM de NaCl, 40 mM de Imidazol). El eluido se dializó durante una noche contra el tampón de filtración en gel GF pH 7,5 (20 mM de Hepes pH 7,5, 150 mM de NaCl) suplementado con proteasa TEV recombinante. La proteasa TEV contiene un marcador His no escindible se retiró del eluido pasándolo sobre 2 ml de una resina IMAC. Las proteínas diana escindidas se concentraron hasta un volumen de 5 ml utilizando unidades de filtros de centrífuga y se cargaron en una columna HiLoad Superdex™ 200 16/60 GL utilizando un sistema de cromatografía AKTAexplorer™ 10 (ambos de GE Healthcare). Los picos de las fracciones se agruparon y concentraron a 1,2 mg/ml de proteína. La muestra de proteína se congeló instantáneamente en nitrógeno líquido y se almacenó a -80 °C.

III

Generación de partículas Salipro

Ejemplo 2

Para la reconstitución de partículas Salipro (llamadas "Saposina + Lípidos pH 7,5" en la Figura 8), 10 µl de saposina A purificada (1,2 mg/ml, 20 mM de Hepes pH 7,5, 150 mM de NaCl) se mezclaron con 1,6 µl de un 1 % (p/v) de solución de detergente LDAO y 4 µl de una solución de lípidos cerebrales (5 mg/ml de lípidos cerebrales, Sigma-Aldrich; 50 mM de Hepes pH 7,5, 150 mM de NaCl, 0,28 % (p/v) DDM) y se incubó durante 10 min a 37 °C. Posteriormente, se añadieron 49,4 µl de tampón GF pH 7,5 a la mezcla para obtener un volumen de reacción final de 65 µl. Tras 10 min de incubación a temperatura ambiente, la mezcla se sometió a una etapa de filtración en gel sobre una columna de filtración en gel analítica Superdex™ 200 5/150 GL utilizando un sistema de cromatografía AKTAmicro™ (ambos de GE Healthcare) equipado con el Autosampler A-905, que inyectaba automáticamente 25 µl de muestra que contiene proteína. Las ejecuciones de filtración en gel analítica se llevaron a cabo a 4 °C a un caudal de 0,2 ml/min en tampón GF pH 7,5.

Ejemplo comparativo 2

El ejemplo 2 se llevó a cabo de nuevo con la excepción de que, en vez de tampón GF pH 7,5, se utilizó tampón GF pH 4,75 (llamadas "Saposina + Lípidos pH 4,75" en la Figura 8).

Como control negativo (denotado "Saposina pH 7,5 en la Figura 8), se incubaron 10 µl de saposina A purificada durante 10 min a 37 °C. Posteriormente se añadieron 55 µl de tampón GF pH 7,5 a la mezcla para obtener un volumen de reacción final de 65 µl. Tras 10 min de incubación a temperatura ambiente, la mezcla se sometió a una etapa de filtración en gel, como se ha descrito anteriormente.

La incubación de saposina A con lípidos cerebrales a pH 7,5 como en el Ejemplo 2 daba como resultado un cambio en el pico hacia partículas de proteína-lípido estables de mayor peso molecular (cf. "Saposina + Lípidos pH 7,5" de la Figura 8). Por el contrario, se observaron partículas proteína-lípido no estables tras la incubación con lípidos cerebrales a pH 4,75 como en el Ejemplo Comparativo 2 (cf. "Saposina + Lípidos pH 4,75" de la Figura 8).

Ejemplo 3

El objetivo del presente experimento era evaluar la importancia de la presencia de lípidos para el método de acuerdo con la invención.

Se mezclaron 10 µl de saposina A purificada (1,2 mg/ml, 20 mM de Hepes pH 7,5, 150 mM de NaCl) con 1,6 µl de un 1 % (p/v) de solución LDAO-detergente y 4 µl de una solución de lípidos cerebrales (5 mg/ml de lípidos cerebrales, Sigma-Aldrich; 50 mM de Hepes pH 7,5, 150 mM de NaCl, un 0,28 % (p/v) de DDM) y se incubaron durante 10 min a 37 °C. Posteriormente, se añadieron 49,4 µl de tampón GF pH 7,5 a la mezcla para obtener un volumen de reacción final de 65 µl. Tras 10 min de incubación a temperatura ambiente, la mezcla se sometió a una etapa de filtración en gel como anteriormente utilizando un tampón GF 7,5 (cf. "Saposina + LDAO + Lípidos pH 7,5 de la Figura 9).

Ejemplo comparativo 3

Se mezclaron 10 µl de saposina A con 1,6 µl de LDAO-detergente (al 1 %) y 4 µl de una solución de lípidos cerebrales y se incubaron durante 10 min a 37 °C. Posteriormente, se añadieron 49,4 µl de tampón GF pH 4,75 a la mezcla para obtener un volumen de reacción final de 65 µl. Tras 10 min de incubación a temperatura ambiente, la mezcla se sometió a una etapa de filtración en gel como anteriormente, utilizando el tampón GF 4,75 (cf. "Saposina + LDAO + Lípidos pH 4,75" en la Figura 9).

En un intento para generar partículas de saposina A-detergente estables con el método de la invención (denotado

“Saposina + LDAO pH 7,5” en la Figura 9), se mezclaron 15 µl de saposina A purificada (1,2 mg/ml, 20 mM Hepes pH 7,5, 150 mM de NaCl) con 1,6 µl de un 1 % (p/v) de solución LDAO-detergente y se incubaron durante 10 min a 37 °C. Posteriormente, se añadieron 48,4 µl de tampón GF pH 7,5 a la mezcla para obtener un volumen de reacción final de 65 µl. Tras 10 min de incubación a temperatura ambiente, la mezcla se sometió a una etapa de filtración en gel en una columna de filtración analítica en gel Superdex™ 200 5/150 GL utilizando un sistema de cromatografía AKTAmicro™ (ambos de GE Healthcare) equipado con el Autosampler A-905, que inyectaba automáticamente 25 µl de muestra que contenía proteína. Las ejecuciones de filtración analítica en gel se llevaron a cabo a 4 °C a un flujo de 0,2 ml/min en tampón GF pH 7,5.

El experimento se llevó a cabo de nuevo como se describe en los párrafos previos con la excepción de que, en vez de tampón GF pH 7,5, se utilizó tampón GF pH 4,75 (cf. “Saposina + LDAO pH 4,75” en la Figura 9).

Los resultados, que se representan en la Figura 9, demuestran que el proceso para preparar partículas Salipro de acuerdo con la invención necesita la presencia de lípidos (cf. Ejemplo 3 y “Saposina + LDAO + Lípidos pH 7,5” en la Figura 9 y Ejemplo comparativo 3 y “Saposina + LDAO pH 7,5” en la Figura 9) y falla para rendir partículas estables a un pH lisosómico de 4,75 como en el Ejemplo comparativo 3 (cf. “Saposina + LDAO + Lípidos pH 7,5” y “Saposina + LDAO + Lípidos pH 4,75” en la Figura 9). Mientras que la presencia de detergente no dificultaba la formación de partículas Salipro estables, no era posible obtener las partículas de la invención en presencia de detergente solo (cf. Ejemplo 3 y “Saposina + LDAO + Lípidos pH 7,5” en la Figura 9 y Ejemplo comparativo 3 y “Saposina + LDAO pH 7,5” en la Figura 9).

Ejemplo 4

Se disolvieron POPG, POPC, lípidos cerebrales y PS (de Sigma-Aldrich o Avanti Polar Lipids, todos en forma de polvo) hasta 20 mg/ml en tampón GF pH 7,5 suplementado con un 1 % (p/v) de DDM, se incubó durante 1 h a 37 °C con mezclado intermedio removiendo y se almacenó a -80 °C. Para su uso, las soluciones de lípido se diluyeron hasta 5 mg/ml con tampón GF pH 7,5 suplementado con un 0,03 % (p/v) de DDM, dando lugar a una composición final de 5 mg/ml de lípidos, 50 mM de Hepes pH 7,5, 150 mM de NaCl, un 0,28 % (p/v) de DDM.

Se mezclaron 10 µl de saposina A purificada (1,2 mg/ml, 20 mM de Hepes pH 7,5, 150 mM de NaCl) con 5 µl de la solución de lípido respectiva (PG, PC, lípidos cerebrales, PS) y se incubaron durante 10 min a 37 °C. Posteriormente, se añadieron 45 µl de tampón GF pH 7,5 suplementado con un 0,03 % (p/v) de DDM a la mezcla para obtener un volumen de reacción final de 65 µl. Tras 10 min de incubación a temperatura ambiente, la mezcla se sometió a una etapa de filtración en gel en una columna Superdex™ 200 5/150 GL utilizando un sistema de cromatografía AKTAmicro™ (ambos de GE Healthcare) equipado con el Autosampler A-905, que inyectaba 25 µl de muestra que comprende la proteína. Las ejecuciones de filtración analítica en gel se llevaron a cabo a 4 °C a un caudal de 0,2 ml/min en tampón GF pH 7,5 (cf. “Saposina + PG”, “Saposina + PC”, “Saposina + lípidos cerebrales” y “Saposina + PS” en la Figura 10).

Como un control negativo, se incubaron 10 µl de saposina A purificada durante 10 min a 37 °C. Posteriormente, se añadieron 55 µl de tampón GF pH 7,5 a la mezcla para obtener un volumen de reacción final de 65 µl. Tras 10 min de incubación a temperatura ambiente, la mezcla se sometió a una etapa de filtración en gel como anteriormente (cf. “Saposina” en la Figura 10).

Los resultados, que se representan en la Figura 10, demuestran que el proceso para preparar partículas Salipro de acuerdo con la invención funciona con varios lípidos diferentes. Se señala que el tamaño de las partículas Salipro es variable y puede estar influenciado, por los lípidos que se utilizan en la preparación de las partículas (cf. Figura 10).

IV

Partículas Salipro que comprenden agentes hidrófobos proteináceos

Para demostrar la capacidad de las partículas Salipro como vehículos de biomoléculas hidrófobas, se incorporaron proteínas de membrana en nanopartículas Salipro de la invención utilizando la misma estrategia descrita anteriormente, es decir, mezclando la saposina A purificada con lípidos y la proteína de membrana que se iba a incorporar a un pH fisiológico seguido por filtración en gel.

Ejemplo 5

Para la reconstitución de partículas Salipro que comprendían la proteína de membrana bacteriana YbgH (Salipro-YbgH, denotado como “Saposina + Detergente + Lípidos + MemProt YbgH pH 7,5” en la Figura 11), se mezclaron 10 µl de saposina A purificada (1,2 mg/ml, 20 mM de Hepes pH 7,5, 150 mM de NaCl) con 1,6 µl de una solución con un 1 % (p/v) LDAO-detergente y 4 µl de una solución de lípidos cerebrales (5 mg/ml de lípidos cerebrales, Sigma-Aldrich; 50 mM de Hepes pH 7,5, 150 mM de NaCl, un 0,28 % (p/v) de DDM) y 2,6 µl de proteína de membrana YbgH purificada (10 mg/ml, 20 mM de Hepes pH 7,5, 150 mM de NaCl, un 5 % de glicerol, un 0,03 % (p/v) de DDM, 0,5 mM de TCEP) y se incubaron durante 10 min a 37 °C. Posteriormente, se añadieron 46,8 µl de tampón GF pH

7,5 a la mezcla para obtener un volumen de reacción de 65 µl. Tras 10 min de incubación a temperatura ambiente, la mezcla se sometió a una etapa de filtración en una columna de filtración analítica en gel Superdex™ 200 5/150 GL utilizando un sistema de cromatografía AKTAmicro™ (ambos de GE Healthcare) equipado con un Autosampler A-905, que inyectaba automáticamente 25 µl de muestra que contenía la proteína. Las ejecuciones de la filtración analítica en gel se llevaron a cabo a 4 °C con un caudal de 0,2 ml/min en tampón GF 7,5.

Ejemplo comparativo 5

El ejemplo 5 se llevó a cabo de nuevo como se ha descrito, con la excepción de que, en vez de tampón GF pH 7,5, se utilizó tampón GF pH 4,75 (cf. "Saposina + Detergente + Lípidos + MemProt YbgH pH 4,75" en la Figura 11).

Además, se mezclaron 10 µl de Saposina A purificada con 1,6 µl de una solución al 1 % (p/v) de LDAO-detergente y 2,6 µl de proteína de membrana YbgH purificada (10 mg/ml, 20 mM de Hepes pH 7,5, 150 mM NaCl, un 5 % de glicerol, un 0,03 % (p/v) de DDM, 0,5 mM de TCEP) y se incubaron durante 10 min a 37 °C. Posteriormente, se añadieron 50,8 µl de tampón GF pH 7,5 a la mezcla para obtener un volumen de reacción final de 65 µl. Tras 10 min de incubación a temperatura ambiente, la mezcla se sometió a una etapa de filtración en gel como anteriormente (cf. "Saposina + Detergente + MemProt YbgH pH 7,5" en la Figura 11).

Finalmente, se mezclaron 10 µl de saposina A purificada con 1,6 µl de una solución al 1 % (p/v) de LDAO-detergente y 2,6 µl de proteína de membrana purificada YbgH (10 mg/ml, 20 mM de Hepes pH 7,5, 150 mM de NaCl, un 5 % de glicerol, un 0,03 % (p/v) de DDM, un 0,5 mM de TCEP) y se incubaron durante 10 min a 37 °C. Posteriormente, se añadieron 50,8 µl de tampón GF pH 4,75 a la mezcla para obtener un volumen de reacción final de 65 µl. Tras 10 min de incubación a temperatura ambiente, la mezcla se sometió a una etapa de filtración en gel como anteriormente, utilizando tampón GF 4,75 (cf. "Saposina+ Detergente+ MemProt YbgH pH 4,75" en la Figura 11).

Los resultados, que se representan en la Figura 11, demuestran que el proceso para producir partículas Salipro de acuerdo con la invención permite la incorporación adicional de proteínas de membrana en las partículas (cf. Ejemplo 5). El perfil de elución de Salipro-YbgH (cf. "Saposina + Detergente + Lípidos + MemProt YbgH pH 7,5 en la Figura 11) presenta dos picos principales, siendo el primer pico a un volumen de elución de 1,5 ml correspondiente con la proteína de membrana incorporada en las partículas Salipro y el segundo pico a ,8 ml correspondiente a las partículas Salipro con solo lípidos, eluyendo al mismo volumen que se había observado anteriormente (cf. Fig. 10, partículas Salipro solo con lípidos). Con el método de acuerdo con la invención la saposina A, los lípidos y la proteína de membrana se auto-ensamblan en partículas hidrosolubles, de proteína-lípido con la proteína de membrana incorporada en ellas.

Además, los resultados demuestran que también el proceso para generar partículas Salipro comprenden agentes hidrófobos de acuerdo con la invención necesita la presencia de lípidos (cf. Ejemplo 5 y "Saposina + Detergente + Lípidos + MemProt YbgH pH 7,5" de la Figura 11 y Ejemplo comparativo 5 y "Saposina + Detergente + MemProt YbgH pH 7,5" de la Figura 11) y falla en hacer que las partículas sean estables a un pH lisosómico de 4,75 (cf. Ejemplo comparativo 5 y "Saposina + Detergente + Lípidos + MemProt YbgH pH 4,75" en la Figura 11). En ausencia de lípidos (cf. Ejemplo comparativo 5 y "Saposina + Detergente + MemProt YbgH pH 7,5" en la Figura 11), el perfil de elución correspondía con el de la saposina A purificada con un hombro ascendente, este último del cual se forma más probablemente por la YbgH sola.

45 Ejemplo 6

Se prepararon partículas Salipro que comprenden otra proteína de membrana de procariotas, el vehículo MATE. (Salipro-MATE, cf. "Saposina + Detergente + Lípidos + MemProt MATE" de la Figura 12).

Se mezclaron 10 µl de saposina A purificada (1,2 mg/ml, 20 mM de Hepes pH 7,5, 150 mM de NaCl) con 2 µl de una solución al 1 % (p/v) de DDM-detergente, 5 µl de una solución de lípidos cerebrales (5 mg/ml de lípidos cerebrales, Sigma-Aldrich; 50 mM de Hepes pH 7,5, 150 mM de NaCl, un 0,28 % (p/v) de DDM) y 7 µl de proteína de membrana MATE purificada (9 mg/ml, 20 mM de Hepes pH 7,5, 50 mM de NaCl, un 5 % de glicerol, un 0,01 % de DMNG, 0,5 mM de TCEP) y se incubaron durante 10 min a 37 °C. Posteriormente se añadieron 41 µl de tampón GF pH 7,5 a la mezcla para obtener un volumen de reacción final de 65 µl. Tras 10 min de incubación a temperatura ambiente, la mezcla se sometió a una etapa de filtración en gel en una columna de filtración analítica en gel Superdex™ 200 5/150 GL utilizando un sistema de cromatografía AKTAmicro™ (ambos de GE Healthcare) equipado con un Autosampler A-905, que inyectaba automáticamente 25 µl de muestra que contenía la proteína. Las ejecuciones de filtración analítica en gel se llevaron a cabo a 4 °C a un caudal de 0,2 ml/min en tampón GF 7,5 (cf. "Saposina + Detergente + Lípidos + MemProt MATE" de la Figura 12).

Ejemplo comparativo 6

5 Se mezclaron 10 µl de saposina A purificada con 2 µl de una solución al 1 % (p/v) de DDM-detergente y 7 µl de proteína de membrana MATE purificada (9 mg/ml, 20 mM Hepes pH 7,5, 150 mM de NaCl, un 5 % de glicerol, un 0,01 % de DMNG, 0,5 mM de TCEP) y se incubaron durante 10 min a 37 °C. Posteriormente se añadieron 46 µl de tampón GF pH 7,5 a la mezcla para obtener un volumen de reacción final de 65 µl. Tras 10 min de incubación a temperatura ambiente, la mezcla se sometió a una etapa de filtración en gel como anteriormente (cf. "Saposina + Detergente + MemProt MATE" de la Figura 12).

10 Como control de partículas de Salipro solamente con lípidos, se mezclaron 10 µl de saposina A purificada con 2 µl de DDM-detergente (al 1 % p/v), 5 µl de una solución de lípidos cerebrales y se incubaron durante 10 min a 37 °C. Posteriormente, se añadieron 48 µl de tampón GF pH 7,5 a la mezcla para obtener un volumen de reacción final de 65 µl. Tras 10 min de incubación a temperatura ambiente, la mezcla se sometió a una etapa de filtración en gel como anteriormente (cf. "Saposina + Detergente + Lípidos" de la Figura 12).

15 Como control negativo, se incubaron 10 µl de saposina A purificada durante 10 min a 37 °C. Posteriormente, se añadieron 55 µl de tampón GF pH 7,5 a la mezcla para obtener un volumen de reacción final de 65 µl. Tras 10 min de incubación a temperatura ambiente, la mezcla se sometió a una etapa de filtración en gel, como anteriormente (cf. "Saposina" en la Figura 12).

20 Los resultados, que se representan en la Figura 12, demuestran que también el transportador de membrana MATE de procariontes se podría incorporar fácilmente en partículas Salipro siguiendo del método de la invención. El perfil de elución de Salipro-MATE (cf. Ejemplo 6 y "Saposina + Detergente + Lípidos + MemProt MATE" de la Figura 12) presenta un pico principal a un volumen de elución de 1,5 ml, que corresponde con la proteína de membrana incorporada en las partículas Salipro y un pico más pequeño de menor peso molecular a un volumen de elución de 1,8 ml, correspondiente con las partículas Salipro solamente con lípidos, que se eluye al mismo volumen que las partículas de Salipro solamente con lípidos (cf. partícula Salipro control solo con lípidos "Saposina + Detergente + Lípidos" y cf. Fig. 10).

Ejemplo 7

30 Se prepararon partículas Salipro que comprendían otra proteína de membrana de procarionte, el péptido transportador de *S. oenidensis*. (Salipro-POT1, cf. "Saposina + Lípidos + MemProt POT1" en la Figura 13).

35 Se incubaron 230 µl de una solución de lípidos cerebrales (5 mg/ml de lípidos cerebrales Sigma-Aldrich; 50 mM de Hepes pH 7,5, 150 mM de NaCl, un 0,28 % (p/v) de DDM) durante 10 min a 37 °C, suplementado con 250 µl de proteína de membrana POT1 purificada (10 mg/ml, 20 mM de Hepes pH 7,5, 150 mM de NaCl, un 5 % de glicerol, un 0,3 % de NM, 0,5 mM de TCEP) y se incubaron durante 30 s a 37 °C. Posteriormente, se añadieron 460 µl de saposina A purificada (1,2 mg/ml, 20 mM de Hepes pH 7,5, 150 mM de NaCl), se incubaron durante 1 min a 37 °C, suplementado con 630 µl de tampón GF pH 7,5. Tras 10 min de incubación a RT, se añadieron 2 ml de tampón GF pH 7,5 y se centrifugó la muestra durante 2 min a 15000 rpm. El sobrenadante se sometió a una etapa de filtración en gel en una columna HiLoad Superdex™ 200 16/60 GL utilizando un sistema de cromatografía AKTAexplorer™ 10 (ambos de GE Healthcare) utilizando tampón GF pH 7,5 (cf. "Saposina + Lípidos + MemProt POT1" de la Figura 13).

45 El experimento se llevó a cabo de nuevo como se ha descrito en el párrafo anterior, con la excepción de que no se añadía POT1 (cf. "Saposina + Lípidos" de la Figura 13).

50 El perfil de elución de Salipro-POT1 presentaba un pico principal que correspondía con la proteína de membrana incorporada en las partículas Salipro y un pico más pequeño de bajo peso molecular que correspondía con las partículas Salipro solamente con lípidos. En consecuencia, la saposina A, lípidos y la proteína de membrana se asociaban de dicha manera para formar partículas hidrosolubles con una proteína de membrana incorporada.

Ejemplo 8

55 Se prepararon partículas Salipro que comprenden una proteína de membrana de eucariotas, Sinaptofisina (SYP) purificada humana. (Salipro-SYP, cf. "Saposina + Lípidos + MemProt SYP" de la Figura 14).

60 Se incubaron 500 µl de una solución de lípidos cerebrales (5 mg/ml de lípidos cerebrales, Sigma-Aldrich; 50 mM de Hepes pH 7,5, 150 mM de NaCl, un 0,28 % (p/v) de DDM) durante 10 min a 37 °C, suplementados con 800 µl de proteína de membrana SYP purificada (4,2 mg/ml, 20 mM de Hepes pH 7,5, 150 mM de NaCl, un 5 % de glicerol, un 0,03 % (p/v) de DDM) y se incubaron durante 5 min a 37 °C. Luego se añadieron 900 µl de saposina A purificada (1,2 mg/ml, 20 mM de Hepes pH 7,5, 150 mM de NaCl), se incubaron durante 1 min a 37 °C, suplementado con 900 µl de tampón GF pH 7,5. Tras una incubación de 10 min a RT, se añadieron 1,9 ml de tampón GF pH 7,5 y se centrifugó la muestra durante 2 min a 14000 rpm. El sobrenadante se sometió a una etapa de filtración en gel en una columna HiLoad Superdex™ 200 16/60 GL utilizando un sistema de cromatografía AKTAexplorer™ 10 (ambos de GE Healthcare) utilizando un tampón GF 7,5 (cf. "Saposina + Lípidos" de la Figura 14).

Se incubaron 230 µl de una solución de lípidos cerebrales (5 mg/ml de lípidos cerebrales, Sigma-Aldrich; 50 mM de Hepes pH 7,5, 150 mM de NaCl, 0,28 % (p/v) de DDM) durante 10 min a 37 °C. Luego, se añadieron 460 µl de saposina A purificada (1,2 mg/ml, 20 mM de Hepes pH 7,5, 150 mM de NaCl), se incubaron durante 1 min a 37 °C, suplementado con 900 µl de tampón GF pH 7,5. Tras 10 min de incubación a RT, se añadieron 2 ml de tampón GF pH 7,5 y la muestra se centrifugó durante 2 min a 14000 rpm. El sobrenadante se sometió a una etapa de filtración en gel en una columna HiLoad Superdex™ 200 16/60 GL utilizando un sistema de cromatografía AKTAexplorer™ 10 (ambos de GE Healthcare) utilizando tampón GR pH 7,5 (cf. "Saposina + Lípidos" de la Figura 14).

Salipro-SYP se eluye en un único pico con un hombro descendente menor que indica la presencia de partículas Salipro solamente con lípidos en esa posición (cf. "Saposina + Lípidos + MemProt SYP" y "Saposina + Lípidos" de la Figura 14).

V

15 Partículas Salipro que comprenden compuestos orgánicos hidrófobos

Con el fin de evaluar la capacidad de las partículas Salipro como vehículos para compuestos hidrófobos, tal como fármacos lipófilos, se evaluó si sería posible incorporar dichos compuestos en partículas Salipro de la invención utilizando la misma estrategia que se ha descrito anteriormente para la incorporación de proteínas de membrana, es decir, mezclando saposina A purificada con lípidos y el compuesto que se va a incorporar a un pH fisiológico con una etapa de filtración en gel posterior.

Ejemplo 9

Se utilizó Curcumina como modelo de fármaco hidrófobo para ensayar la incorporación en partículas Salipro utilizando el método de la invención. Se escogió primariamente la Curcumina por sus distintas implicaciones farmacológicas (tales como anti-cáncer, anti-inflamatorio, anti-oxidante, y actividad anti-proliferativa) y su fluorescencia en ambientes lipídicos. Utilizando su absorbancia UV y las características de fluorescencia (excitación 420 nm, emisión 500 nm) en un ambiente lipídico, se puede seguir fácilmente la incorporación de Curcumina en partículas Salipro.

Se mezcló 1 µl de Curcumina (10 mg/ml, en DMSO) con 60 µl de una solución de lípidos cerebrales (5 mg/ml de lípidos cerebrales, Sigma-Aldrich; 50 mM de Hepes pH 7,5, 150 mM de NaCl, un 0,28 % (p/v) de DDM) y se incubaron durante 15 min a 37 °C. Posteriormente, se añadieron 100 µl de saposina A purificada (1,2 mg/ml, 20 mM de Hepes pH 7,5, 150 mM de NaCl), se incubaron durante 10 min a 37 °C y se añadieron 89 µl de tampón GF pH 7,5, seguido por incubación de la mezcla durante 10 min a RT. Luego, se añadieron 250 µl de tampón GF pH 7,5 y la muestra se sometió a una etapa de filtración en gel en una columna Superdex™ 200 10/300 GL utilizando un sistema de cromatografía AKTAexplorer™ 10 (ambos de GE Healthcare) utilizando tampón 7,5. Se midió la absorbancia UV a 280 nm (proteína) y a 420 nm (Curcumina), cf. "Salipro-Curcumina" de la Figura 15.

El experimento se llevó a cabo de nuevo como se ha descrito en los párrafos previos, con la excepción de que no se añadía Curcumina (cf. "Salipro solamente con lípidos" en la Figura 15).

Los resultados, que se representan en la Figura 15, demuestran que es posible incorporar la Curcumina en partículas Salipro de la invención, como indicaba la presencia de un pico de absorción a 280 nm y un pico de fluorescencia en la posición exacta en la que está presente el pico de absorción de Salipro-proteína, mientras que las partículas Salipro solamente con lípidos presentan solo un pico de fluorescencia mínimo (cf. "Salipro solamente con lípidos" de la Figura 15). Se obtuvieron resultados similares cuando se registró la emisión de Curcumina a 500 nm. A 280 nm, las partículas Salipro-Curcumina purificadas presentan un pico monodisperso que es casi idéntico a las partículas Salipro solamente con lípidos (cf. "Salipro-Curcumina" y "Salipro solamente con lípidos" de la Figura 15).

Experimentos adicionales demuestran que, en ausencia de saposina A, una mezcla que comprende lípidos y Curcumina no es capaz de auto-ensamblarse en complejos lípido-Curcumina soluble. Las partículas Salipro de la invención son capaces de hacer de otra manera a los compuestos lipófilos solubles, por la incorporación en un ambiente lipídico de las partículas Salipro a escala nanométrica.

VI

60 Partículas Salipro que se ajustan al tamaño/naturaleza de las moléculas incorporadas

Ejemplo 10

Los resultados del Ejemplo 4 anterior indicaban que las partículas Salipro que se pueden obtener por el método de la invención son inherentemente flexibles en su tamaño (cf. el efecto de los lípidos diferentes que se utilizan en la preparación de partículas de la figura 10). Esto se podía confirmar en experimentos posteriores utilizando cantidades

crecientes de lípidos en la preparación de partículas Salipro de acuerdo con el método de la invención.

Se incubaron varias cantidades ("Lípidos 5": 1 μ l, "Lípidos 12.5": 2,5 μ l, "Lípidos 25": 5 μ l, "Lípidos 50": 10 μ l, "Lípidos 100": 20 μ l) de una solución de lípidos cerebrales (5 mg/ml de lípidos cerebrales, Sigma-Aldrich; 50 mM de Hepes pH 7,5, 150 mM de NaCl, 0,28 % (p/v) de DDM) durante 10 min a 37 °C. Se añadieron 10 μ l de saposina A purificada, se incubaron durante 1 min a 37 °C y se añadió tampón GFR pH 7,5 hasta un volumen final de 41 μ l. Tras 10 min de incubación a RT, se añadieron 24 μ l de tampón GF pH 7,5 y las muestras se sometieron a una etapa de filtración en gel en una columna de filtración analítica en gel Superdex™ 200 5/150 GL utilizando el sistema de cromatografía ÄKTAmicro™ (ambos de GE Healthcare) equipado con un Autosampler A-905 que inyectaba 25 μ l de muestra que contenía proteína. Las ejecuciones de la filtración en gel se llevaron a cabo a 4 °C con un caudal de 0,2 ml/min en tampón GF 7,5 (cf. "Saposina + Lípidos 5", "Saposina + Lípidos 12,5", "Saposina + Lípidos 25", "Saposina + Lípidos 50", "Saposina + Lípidos 100" de la Figura 16).

Como control negativo, se incubaron 10 μ l de saposina A purificada (1,2 mg/ml, 20 mM de Hepes pH 7,5, 150 mM de NaCl) durante 1 min a 37 °C y se añadieron 31 μ l de tampón GF pH 7,5. Tras 10 min de incubación a RT, se añadieron 24 μ l de tampón GF pH 7,5 y la muestra se sometió a una etapa de filtración en gel en una columna de filtración analítica en gel Superdex™ 200 5/150 GL™ utilizando un sistema de cromatografía ÄKTAmicro™ (ambos de GE Healthcare) equipado con un Autosampler A-905, que inyectaba automáticamente 25 μ l de muestra que contenía la proteína. Las ejecuciones de filtración analítica en gel se llevaron a cabo a 4 °C con un caudal de 0,2 ml/min en tampón GF 7,5 (cf. "Saposina" en la Figura 16).

Los resultados, que se representan en la Figura 16, demuestran que las partículas Salipro que se pueden obtener con el método de la invención son flexibles en tamaño, por lo que se puede controlar el tamaño, por ejemplo, por la cantidad de lípidos que se añaden durante la preparación de las partículas.

Ejemplo 11

La flexibilidad inherente en el tamaño de la partícula Salipro también se vuelve evidente a partir de los experimentos en los que se incorporan proteínas de membrana de distintos tamaños en las partículas Salipro de la invención.

Se prepararon partículas Salipro que comprendían Sinaptofisina humana pequeña (27 kDa) (Saposina-SYP), el vehículo peptídico POT1 de *E. Coli* (Saposina- POT1) y partículas Salipro solamente con lípidos como se ha descrito en los Ejemplos 7 y 8. Las muestras se sometieron a filtración en gel en una columna Superdex™ 200 16/60 GL utilizando un sistema de cromatografía AKTAexplorer™ 10 (ambos de GE Healthcare) con tampón GF 7,5.

Como es evidente a partir de la comparación de los perfiles de elución de la Figura 17, el tamaño de las partículas Salipro de la invención es flexible y parece que se ajusta al tamaño del agente hidrófobo incorporado en ellas. Mientras que las partículas Salipro "vacías" es decir solamente con lípidos tienen un radio hidrodinámico medio de aproximadamente 3 nm, las partículas Salipro que comprenden el vehículo POT1 oligomérico, se expande presentando un radio hidrodinámico medio de aproximadamente 10 nm.

VII

Visualización de partículas Salipro

Las partículas Salipro con el vehículo peptídico bacteriano (Salipro-POT1) se prepararon como se ha descrito en el Ejemplo 7 y se analizaron por microscopía electrónica de tinción negativa.

Ejemplo 12

Las muestras de Salipro-POT1 se aplicó en rejillas de cobre sin brillo revestidas una fina película de carbono y teñidas con formiato de uranilo. Se llevó a cabo la imagen utilizando un microscopio electrónico JEOL JEM2100F con una tensión de aceleración de 200 kV. Se registraron micrografías en una cámara CCD de 4k. Se muestra en la Figura 18 a) una micrografía electrónica de Salipro-POT1 purificada. Salipro-POT1 se parece a una partícula con forma cuadrada en general que adopta diferentes orientaciones en la rejilla, es decir, eran visibles varias vistas laterales o superiores/inferiores de la partícula, permitiendo la reconstrucción en 3D de partículas únicas.

Las partículas únicas Salipro-POT1 se escogieron de entre las micrografías y se procesaron utilizando el paquete EMAN2. Para la reconstrucción 3D, no se utilizó simetría. La Figura 18 b) representa las medias de clase de las partículas y las figuras 18 c) y d) la superficie producida por la reconstrucción en 3D de Salipro-POT1, en vista superior y vista lateral, respectivamente.

La apariencia y las dimensiones del disco Salipro-POT1 de forma cuadrada está de acuerdo con el complejo de proteína de membrana homotetramérico formado por el vehículo peptídico POT1 bacteriano en su ambiente nativo de membrana bacteriana. El grosor del disco es de aproximadamente 5 nm, que es una reminiscencia de las dimensiones de una bicapa lipídica y de acuerdo con las expectativas de la estructura conocida de POT1 que

5 consiste principalmente en hélices transmembrana y carece de grandes dominios citosólicos. Los diámetros y el diámetro máximo (longitud del eje principal) están en el intervalo de 12 nm ± 2 nm. Dado el tamaño y la estequiometría de las partículas Salipro-POT1, cada partícula parece que está compuesta por cuatro proteínas POT1 y cuatro moléculas de saposina A. Esto indica una cierta flexibilidad de saposina A para ensamblarse en complejos de lipoproteína estables y homogéneos, adaptándose al tamaño del agente hidrófobo incorporado.

10 Las partículas Salipro por lo tanto pueden estar compuestas por dos moléculas de saposina A rodeando un núcleo de lípido/detergente en el estado vacío, solo con lípidos o cuando está cargado con agentes hidrófobos monoméricos y/o de bajo peso molecular (cf. Figura 2 a 4 y 6 a 7), así como varias moléculas de saposina A alrededor de ensamblajes lípido/proteína hidrófobos más grandes, como es el caso por ejemplo de la POT1 homotetramérica (cf. Figuras 5 y 18).

VIII

15 Estabilidad de las partículas Salipro

Como se ha demostrado en los Ejemplos anteriores, las partículas Salipro son capaces de incorporar varios lípidos, proteínas de membrana y compuestos hidrófobos a pH fisiológico, dando lugar a complejos a escala nanométrica que son solubles en un ambiente acuoso. Para confirmar la aplicabilidad práctica de las partículas Salipro de la invención, se ensayó su respectiva estabilidad durante el tiempo, temperatura y distintas condiciones de tratamiento.

Ejemplo 13

25 Para evaluar la termoestabilidad, las muestras de partículas Salipro solamente con lípidos (65 µl cada una), que se prepararon como se describe en el Ejemplo 7 anterior, se congelaron instantáneamente, se almacenaron a -80 °C, se descongelaron y se incubaron a 0 °C, 37 °C, 50 °C, 73 °C o 95 °C durante 10 min. Se llevó a cabo el análisis posterior por medio de una etapa de filtración en gel en una columna de filtración analítica en gel Superdex™ 200 5/150 GL utilizando un sistema de cromatografía AKTAmicro™ (ambos de GE Healthcare) equipado con un Autosampler A-905, que inyectaba automáticamente 25 µl de muestra que contenía la proteína. Las ejecuciones de filtración analítica en gel se llevaron a cabo a 4 °C con un caudal de 0,2 ml/min en tampón GF 7,5.

Los resultados, que se representan en la Figura 19, demuestran que las partículas Salipro de la invención presentan cierta termoestabilidad.

35 Experimentos adicionales revelaron que las partículas Salipro de la invención también son robustas sobre la concentración utilizando unidades de filtro de centrifuga convencionales, la congelación y descongelación. Además, es posible secar por congelación, almacenar y re-hidratar las partículas Salipro sin un deterioro significativo de la calidad.

40 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Frauenfeld, Jens

<120> Partículas Salipro

45

<130> 121549EP

<160> 6

50

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 81

<212> PRT

55

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

ES 2 608 857 T3

Ser Leu Pro Cys Asp Ile Cys Lys Asp Val Val Thr Ala Ala Gly Asp
 1 5 10 15

Met Leu Lys Asp Asn Ala Thr Glu Glu Glu Ile Leu Val Tyr Leu Glu
 20 25 30

Lys Thr Cys Asp Trp Leu Pro Lys Pro Asn Met Ser Ala Ser Cys Lys
 35 40 45

Glu Ile Val Asp Ser Tyr Leu Pro Val Ile Leu Asp Ile Ile Lys Gly
 50 55 60

Glu Met Ser Arg Pro Gly Glu Val Cys Ser Ala Leu Asn Leu Cys Glu
 65 70 75 80

Ser

5 <210> 2
 <211> 79
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 2

Gly Asp Val Cys Gln Asp Cys Ile Gln Met Val Thr Asp Ile Gln Thr
 1 5 10 15

Ala Val Arg Thr Asn Ser Thr Phe Val Gln Ala Leu Val Glu His Val
 20 25 30

Lys Glu Glu Cys Asp Arg Leu Gly Pro Gly Met Ala Asp Ile Cys Lys
 35 40 45

Asn Tyr Ile Ser Gln Tyr Ser Glu Ile Ala Ile Gln Met Met Met His
 50 55 60

10 Met Gln Pro Lys Glu Ile Cys Ala Leu Val Gly Phe Cys Asp Glu
 65 70 75

15 <210> 3
 <211> 80
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 3

ES 2 608 857 T3

Asp Val Tyr Cys Glu Val Cys Glu Phe Leu Val Lys Glu Val Thr Lys
1 5 10 15

Leu Ile Asp Asn Asn Lys Thr Glu Lys Glu Ile Leu Asp Ala Phe Asp
20 25 30

Lys Met Cys Ser Lys Leu Pro Lys Ser Leu Ser Glu Glu Cys Gln Glu
35 40 45

Val Val Asp Thr Tyr Gly Ser Ser Ile Leu Ser Ile Leu Leu Glu Glu
50 55 60

Val Ser Pro Glu Leu Val Cys Ser Met Leu His Leu Cys Ser Gly Thr
65 70 75 80

5 <210> 4
<211> 78
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 4

Gly Phe Cys Glu Val Cys Lys Lys Leu Val Gly Tyr Leu Asp Arg Asn
1 5 10 15

Leu Glu Lys Asn Ser Thr Lys Gln Glu Ile Leu Ala Ala Leu Glu Lys
20 25 30

Gly Cys Ser Phe Leu Pro Asp Pro Tyr Gln Lys Gln Cys Asp Gln Phe
35 40 45

Val Ala Glu Tyr Glu Pro Val Leu Ile Glu Ile Leu Val Glu Val Met
50 55 60

10 Asp Pro Ser Phe Val Cys Leu Lys Ile Gly Ala Cys Pro Ser
65 70 75

15 <210> 5
<211> 145
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 5

ES 2 608 857 T3

Met Ala Thr Trp Ala Leu Leu Leu Leu Ala Ala Met Leu Leu Gly Asn
 1 5 10 15

Pro Gly Leu Val Phe Ser Arg Leu Ser Pro Glu Tyr Tyr Asp Leu Ala
 20 25 30

Arg Ala His Leu Arg Asp Glu Glu Lys Ser Cys Pro Cys Leu Ala Gln
 35 40 45

Glu Gly Pro Gln Gly Asp Leu Leu Thr Lys Thr Gln Glu Leu Gly Arg
 50 55 60

Asp Tyr Arg Thr Cys Leu Thr Ile Val Gln Lys Leu Lys Lys Met Val
 65 70 75 80

Asp Lys Pro Thr Gln Arg Ser Val Ser Asn Ala Ala Thr Arg Val Cys
 85 90 95

Arg Thr Gly Arg Ser Arg Trp Arg Asp Val Cys Arg Asn Phe Met Arg
 100 105 110

Arg Tyr Gln Ser Arg Val Thr Gln Gly Leu Val Ala Gly Glu Thr Ala
 115 120 125

Gln Gln Ile Cys Glu Asp Leu Arg Leu Cys Ile Pro Ser Thr Gly Pro
 130 135 140

Leu
 145

<210> 6
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> *Sus scrofa*

5

<400> 6

ES 2 608 857 T3

Pro Gly Leu Ala Phe Ser Gly Leu Thr Pro Glu His Ser Ala Leu Ala
 1 5 10 15
 Arg Ala His Pro Cys Asp Gly Glu Gln Phe Cys Gln Asn Leu Ala Pro
 20 25 30
 Glu Asp Pro Gln Gly Asp Gln Leu Leu Gln Arg Glu Glu Leu Gly Leu
 35 40 45
 Ile Cys Glu Ser Cys Arg Lys Ile Ile Gln Lys Leu Glu Asp Met Val
 50 55 60
 Gly Pro Gln Pro Asn Glu Asp Thr Val Thr Gln Ala Ala Ser Arg Val
 65 70 75 80
 Cys Asp Lys Met Lys Ile Leu Arg Gly Val Cys Lys Lys Ile Met Arg
 85 90 95
 Thr Phe Leu Arg Arg Ile Ser Lys Asp Ile Leu Thr Gly Lys Lys Pro
 100 105 110
 Gln Ala Ile Cys Val Asp Ile Lys Ile Cys Lys Glu Lys Thr Gly Leu
 115 120 125
 Ile

REIVINDICACIONES

1. Una partícula con forma de disco que comprende

- 5 - un polipéptido de unión a lípidos
 - lípidos y
 -un agente hidrófobo,

10 en donde la partícula no comprende un núcleo hidrófilo o acuoso,
 en la que el agente hidrófobo no es un lípido ni un detergente, y
 en la que el polipéptido de unión a lípidos es

15 (a) una proteína tipo saposina (SAPLIP) que pertenece a la familia SAPLIP de proteínas que interactúan con lípidos o

 (b) una forma derivada de las mismas, en la que el derivado es

 (i) una proteína que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con la secuencia de longitud completa de SEQ ID NO. 1, 2, 3, 4, 5 o 6;

20 (ii) una proteína que tiene al menos un 40 % de identidad de secuencia con la secuencia de longitud completa de SEQ ID NO. 1, 2, 3, 4, 5 o 6, en donde dicha proteína es anfipática, forma al menos una hélice alfa y es capaz de auto-ensamblarse junto con lípidos solubilizados en partículas de lipoproteína cuando se emplea en el método de la reivindicación 10; o

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

25 2. Partícula de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la partícula tiene un diámetro máximo de 2 nm a 200 nm, en particular de 3 nm a 150 nm, preferentemente de 3 nm a 100 nm.

30 3. Partícula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el agente hidrófobo se selecciona de entre el grupo que consiste en un compuesto orgánico hidrófobo y una biomolécula hidrófoba.

35 4. Partícula de acuerdo con la reivindicación 3, en la que el compuesto orgánico hidrófobo y/o la biomolécula hidrófoba se seleccionan de entre el grupo que consiste en un agente biológicamente activo, un fármaco, un principio activo de un fármaco, un principio activo de un producto cosmético, un principio activo de un producto protector de plantas, un suplemento de la dieta y/o nutricional, una sonda diagnóstica, un agente de contraste, un marcador y un indicador.

40 5. Partícula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 o 4, en la que la biomolécula hidrófoba es una proteína que comprende un resto hidrófobo, en particular una proteína que se selecciona de entre el grupo que consiste en una proteína de membrana, una proteína transmembrana integral, una proteína de membrana monotópica integral, una proteína de membrana periférica, una proteína anfitrópica en un estado unido a lípidos, una proteína anclada a lípidos y una proteína quimérica que tiene fusionados un dominio hidrófobo y/o de transmembrana.

45 6. Partícula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que los lípidos son lípidos que forman una bicapa lipídica y/o lípidos biocompatibles.

50 7. Partícula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que los lípidos se seleccionan de entre el grupo que consiste en lípidos de eucariotas, fosfolípidos y/o lípidos presentes en las materias blanca y gris del cerebro, en particular en la que los lípidos se seleccionan de entre el grupo que consiste en fosfolípidos, glucoesfingolípidos, esteroides, fosfatidilcolina, fosfatidilserina (PS), 2-oleoil-1-palmitoil-sn-glicero-3-fosfolina (POPC), 2-oleoil-1-palmitoil-sn-glicero-3-glicerol (POPG), 2-oleoil-1-palmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (POPE), diacilglicerol, colesterol, esfingomielina, galactosilceramida, gangliósidos, fosfatidilinositoles y sulfogalactoceramidas o combinaciones de los mismos y particularmente preferido en los que los lípidos comprenden fosfatidilserina (PS).

60 8. Partícula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el polipéptido de unión a lípidos es un polipéptido quimérico que comprende además un resto funcional tal como un resto dirigido o un resto bioactivo.

65 9. Partícula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el polipéptido de unión a lípidos es saposina A o una forma derivada o truncada de la misma, en particular un derivado de saposina A que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 60 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO. 1.

10. Proceso de preparación de una partícula en forma de disco que comprende un polipéptido de unión a lípidos y lípidos, en el que el polipéptido de unión a lípidos es una proteína tipo saposina (SAPLIP) como se describe en el punto a) de la reivindicación 1 anterior o una forma derivada de la misma como se describe en el punto b) de la reivindicación 1 anterior, y en el que la partícula no comprende un núcleo hidrófilo o acuoso, comprendiendo el proceso las etapas de
- 5
- a) poner en contacto en un ambiente líquido el péptido de unión a lípidos con los lípidos solubilizados en detergente;
- 10 b) permitir el auto-ensamblaje de la partícula a un pH desde 6,0 a 10,0.
11. Proceso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que la etapa b) comprende la dilución de la mezcla obtenida en la etapa a) con un líquido que contiene cantidades de detergente menores que la mezcla obtenida en la etapa a).
- 15 12. Proceso de acuerdo con las reivindicaciones 10 u 11, en donde el proceso comprende en la etapa b) o como una etapa c) posterior, la purificación de las partículas mediante al menos la eliminación parcial de los lípidos libres y/o del polipéptido de unión a lípidos libre, en el que opcionalmente la purificación se lleva a cabo por cromatografía, en particular cromatografía de exclusión por tamaño; ultracentrifugación; diálisis; puesta en contacto con bioperlas de unión a detergentes; uso de concentradores; cromatografía de afinidad, perlas magnéticas y/o membranas/filtros para eliminar los lípidos no unidos/no incorporados y/o los compuestos hidrófobos.
- 20
13. Proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en el que la partícula es como se ha definido en la reivindicación 3, los lípidos son como se han definido en las reivindicaciones 6 o 7 y/o el polipéptido de unión a lípidos es como se ha definido en las reivindicaciones 8 o 9.
- 25
14. Proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13 para preparar una partícula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que en la etapa a) el polipéptido de unión a lípidos se pone en contacto con lípidos en un ambiente líquido que comprende el agente hidrófobo que se va a incorporar en la partícula, y opcionalmente, en el que el agente hidrófobo es como se ha definido en las reivindicaciones 3 a 5.
- 30
15. Una partícula que se puede obtener de acuerdo con el proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14.
- 35
16. Una composición farmacéutica para el suministro de un agente hidrófobo a un individuo que lo necesita, que comprende una partícula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o 15 en donde el agente hidrófobo es un principio activo y/o en donde además del agente hidrófobo está presente un principio activo.
- 40
17. Partícula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o 15 para su uso en medicina, en particular para su uso en la prevención, el tratamiento o la disminución de la gravedad de una enfermedad o para su uso en un método diagnóstico o un tratamiento cosmético o para su uso como formulación de vacunación.
- 45
18. Uso de una partícula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o 15 como partícula de suministro de un agente hidrófobo, como una herramienta para el desarrollo de fármacos, el cribado de fármacos o para investigación de las proteínas de membrana.

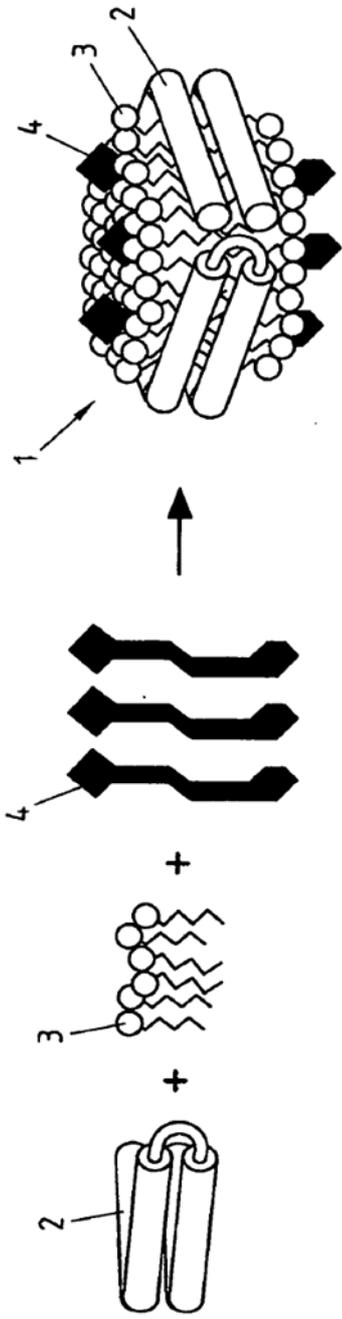


Fig.2a

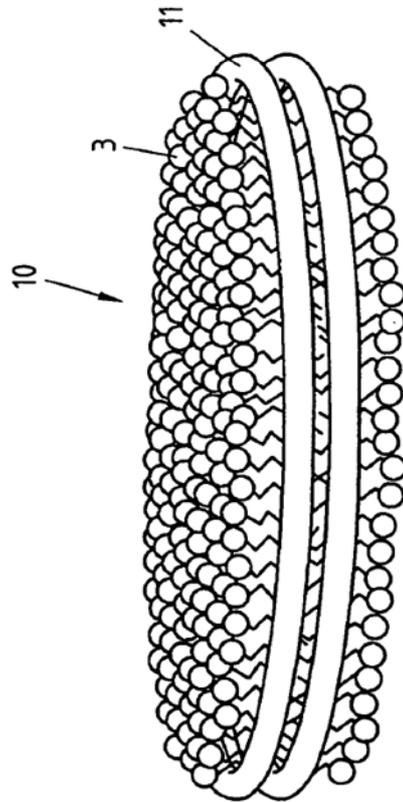


Fig.1 Técnica Anterior

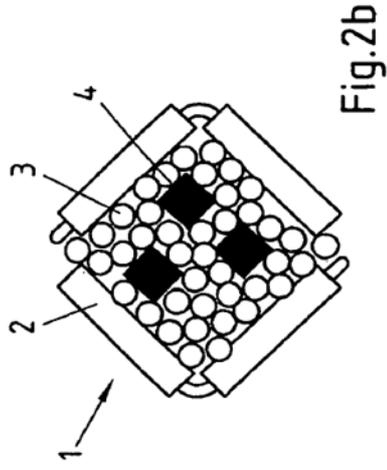


Fig.2b

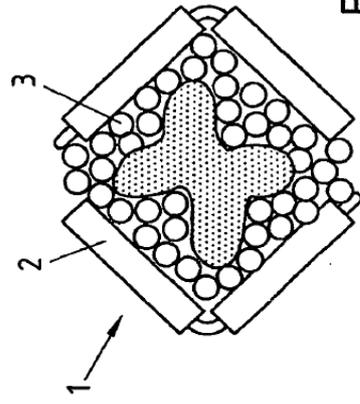
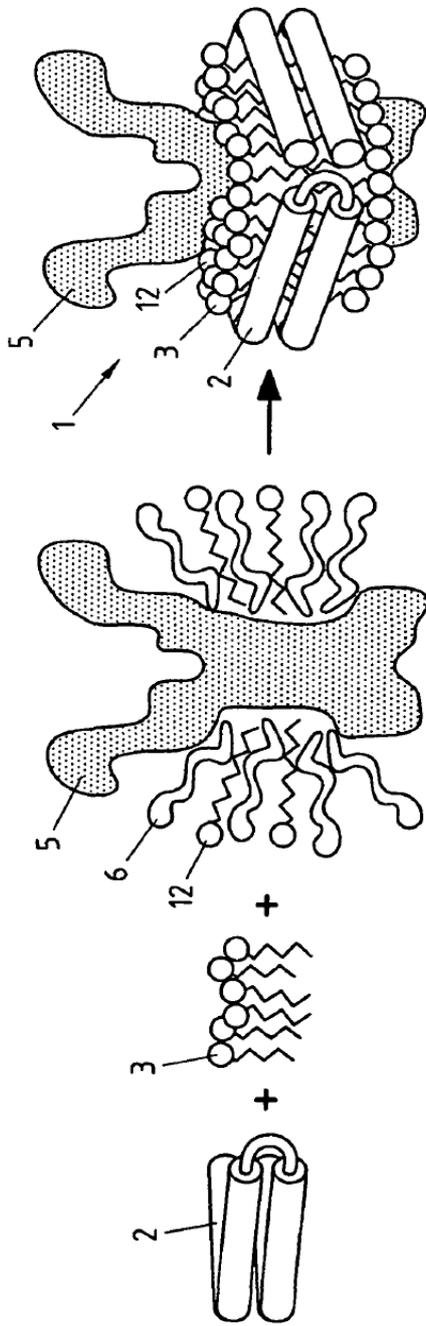


Fig. 3a

Fig. 3b

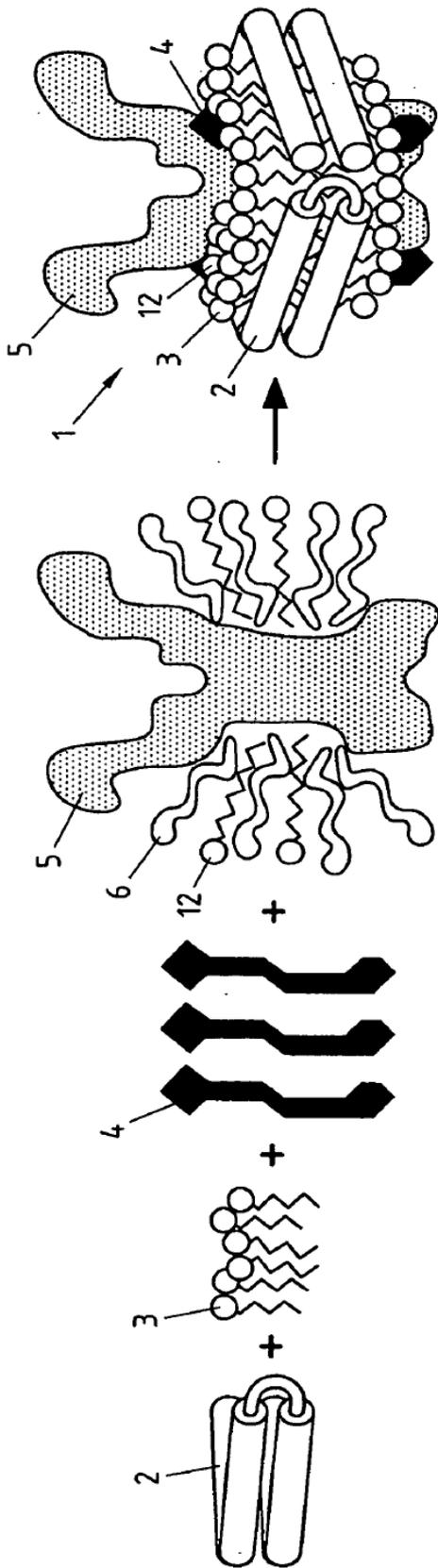


Fig. 4a

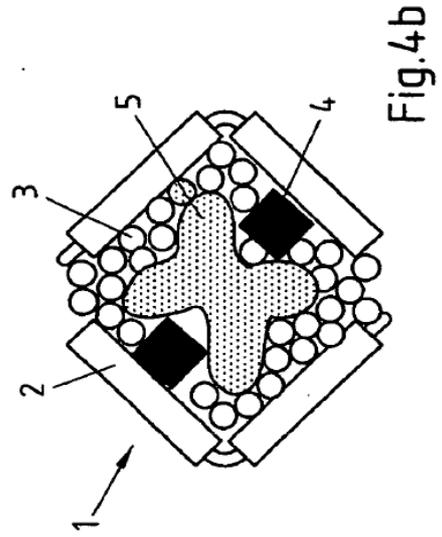
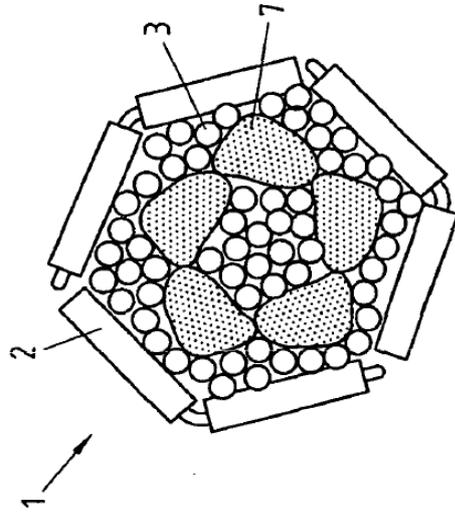
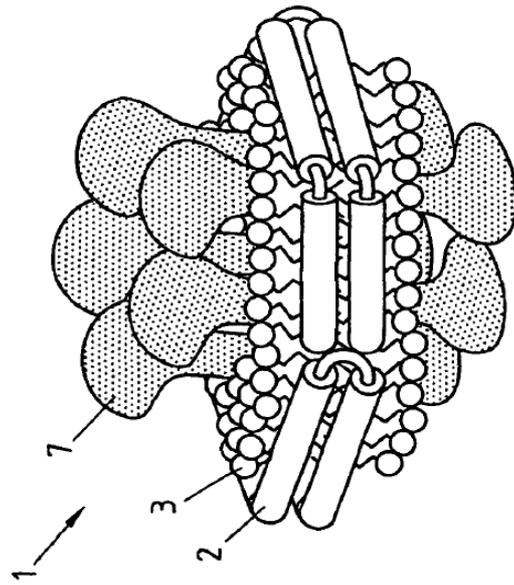


Fig. 4b



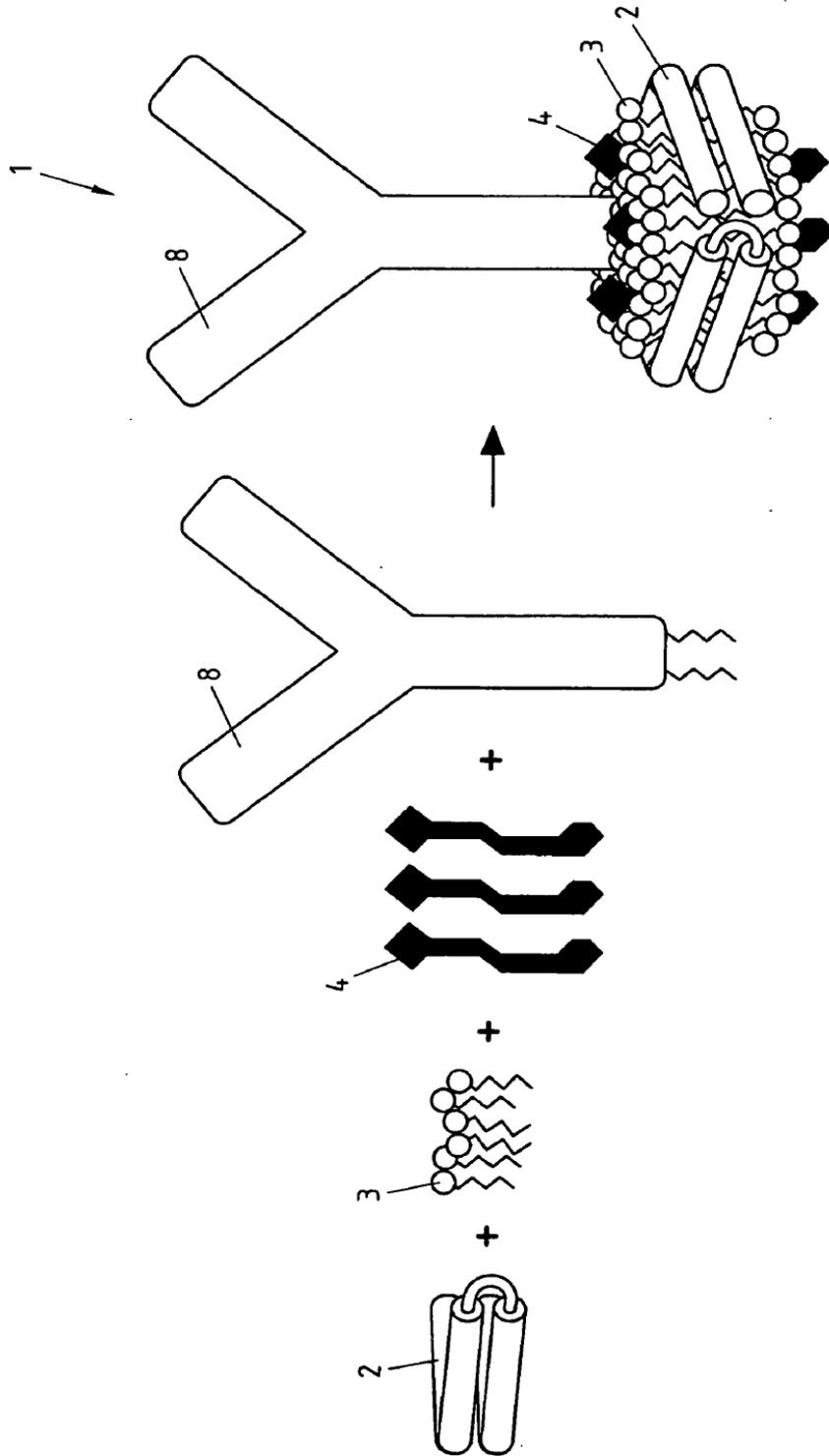


Fig.6

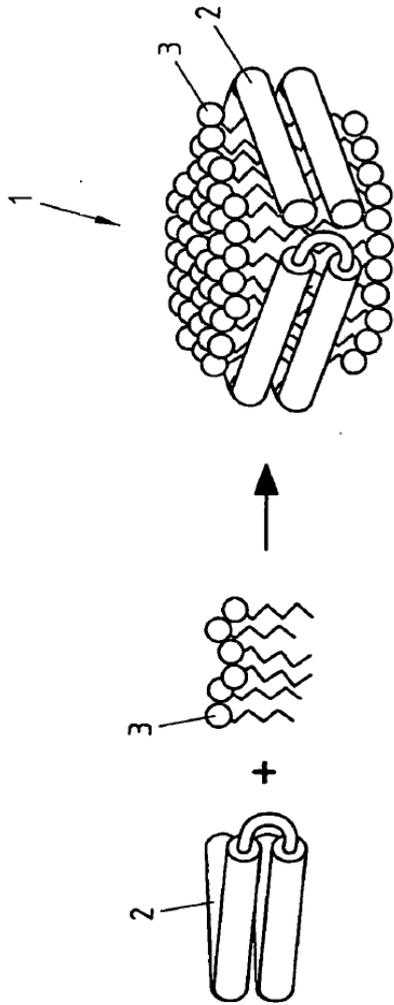


Fig.7a

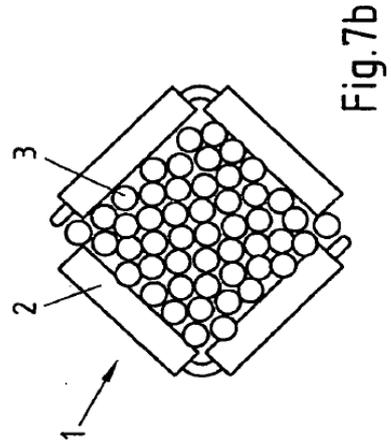


Fig.7b

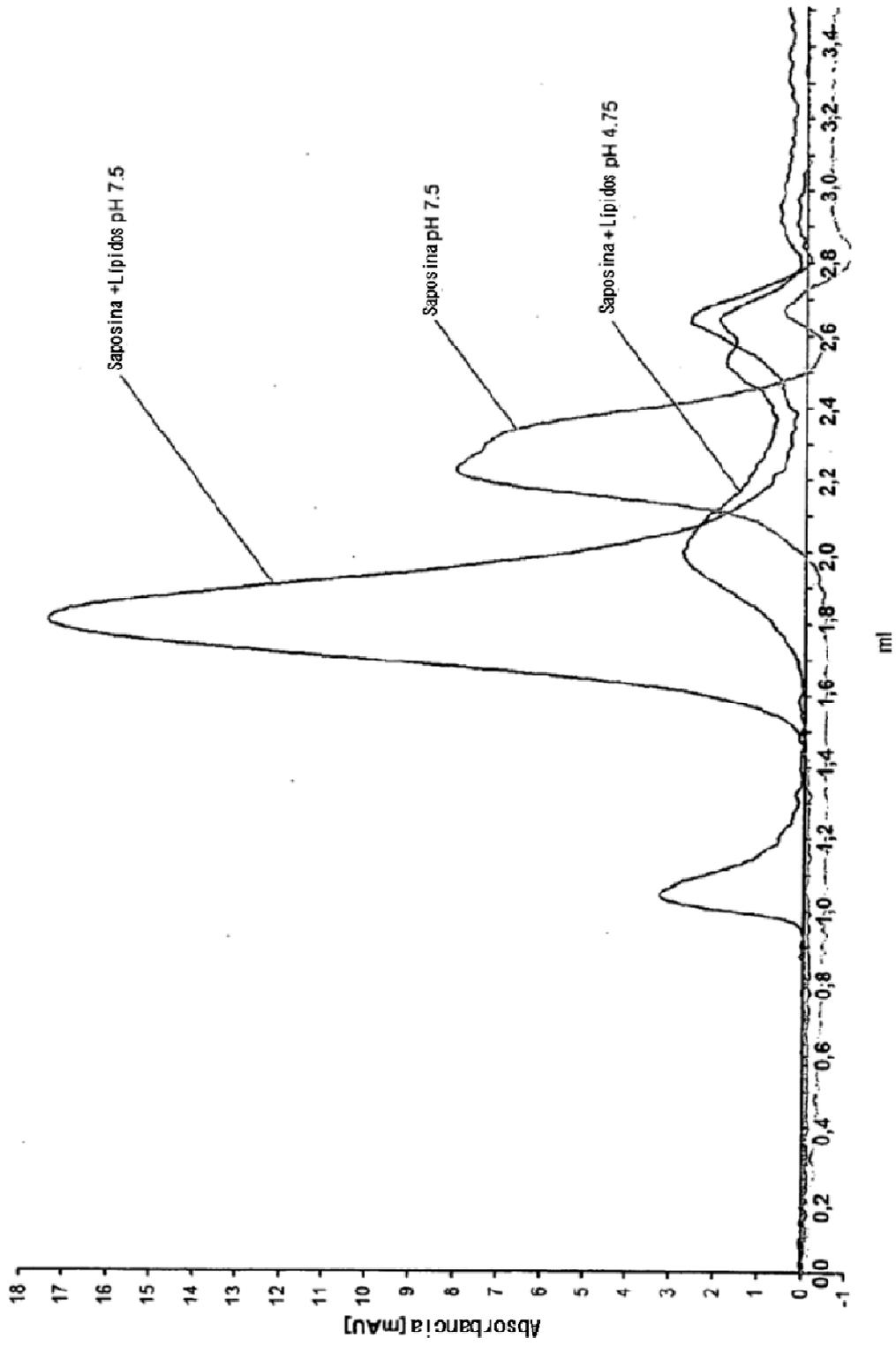


Fig.8

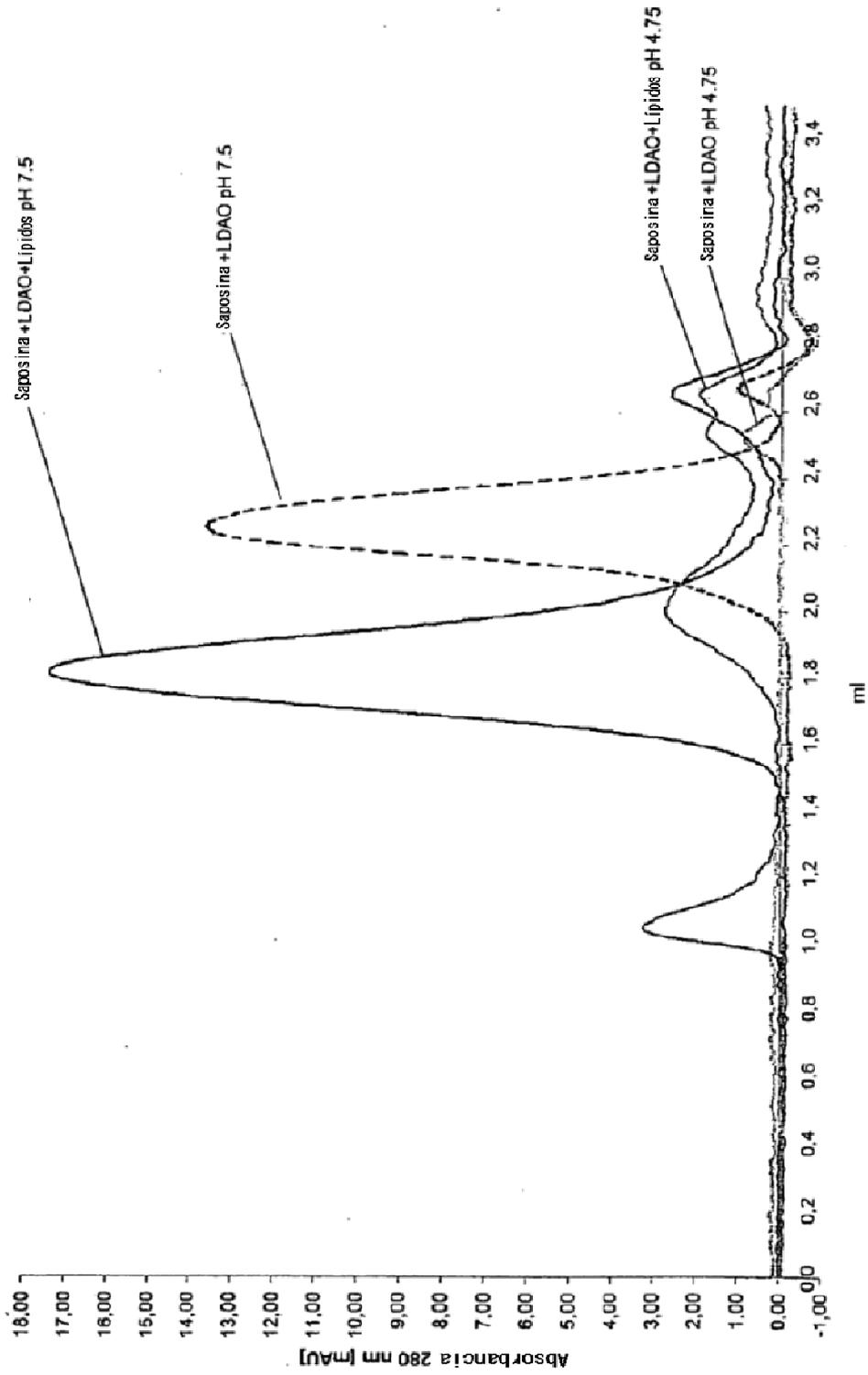


Fig.9

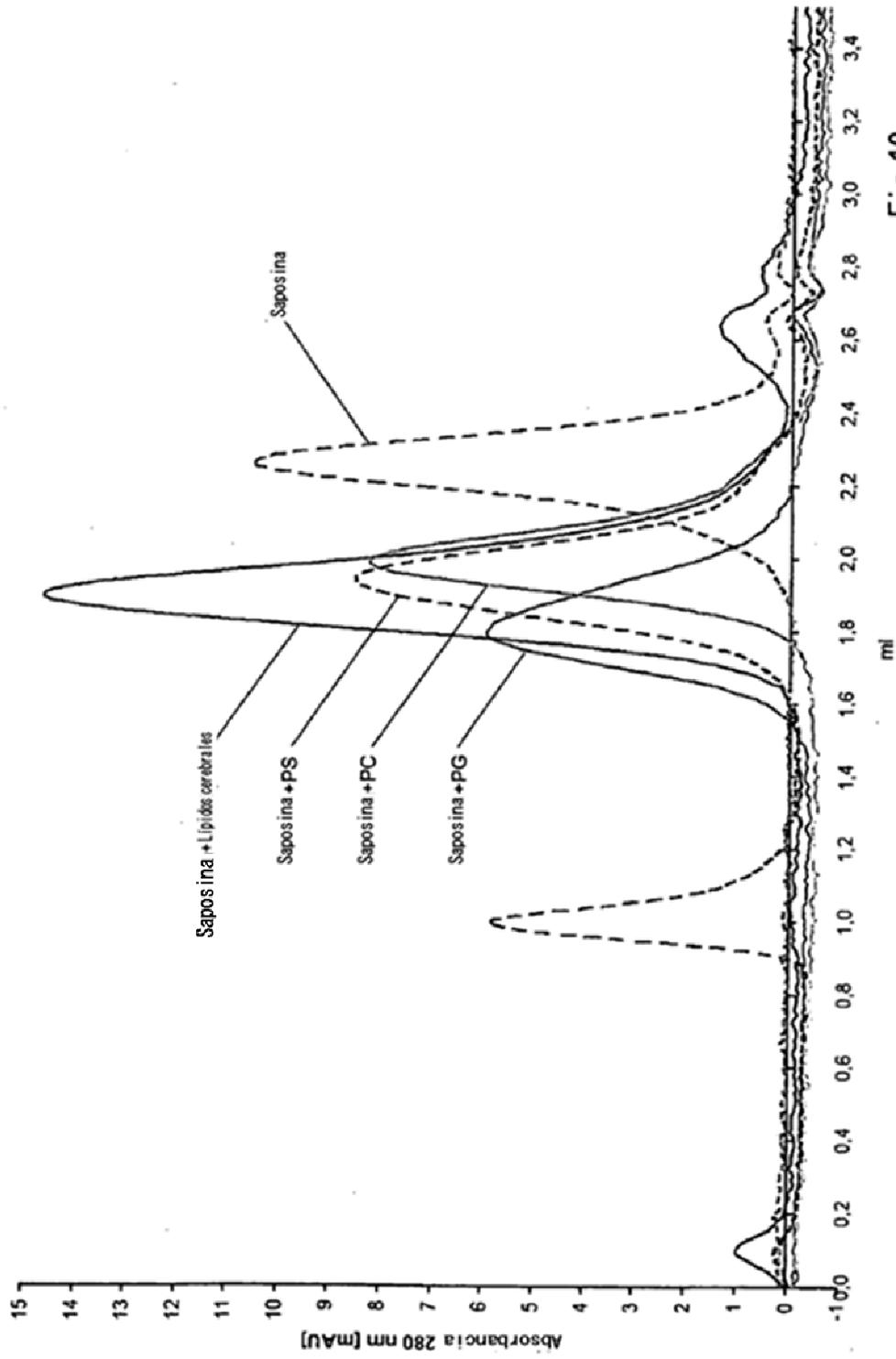


Fig.10

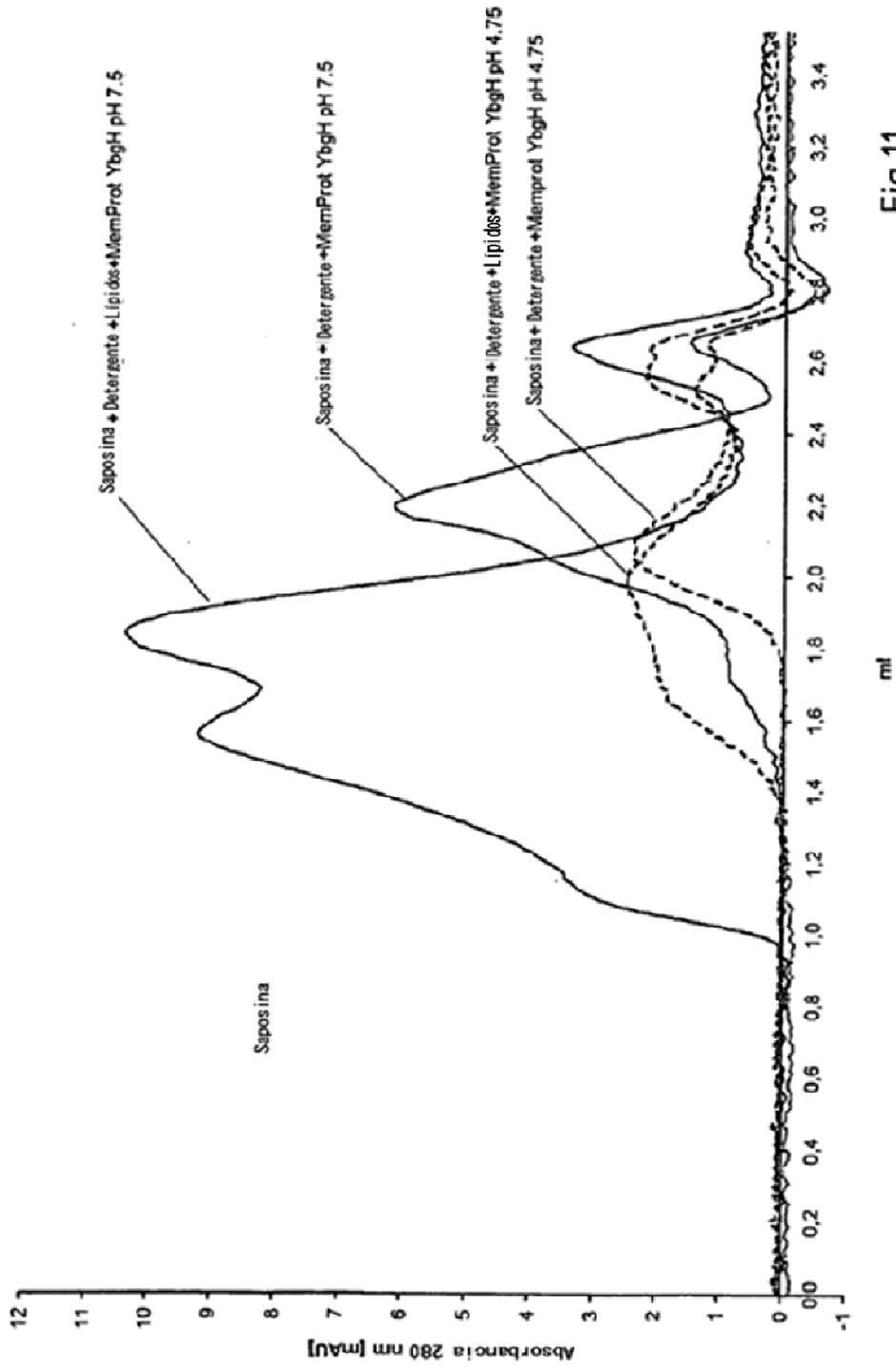


Fig.11

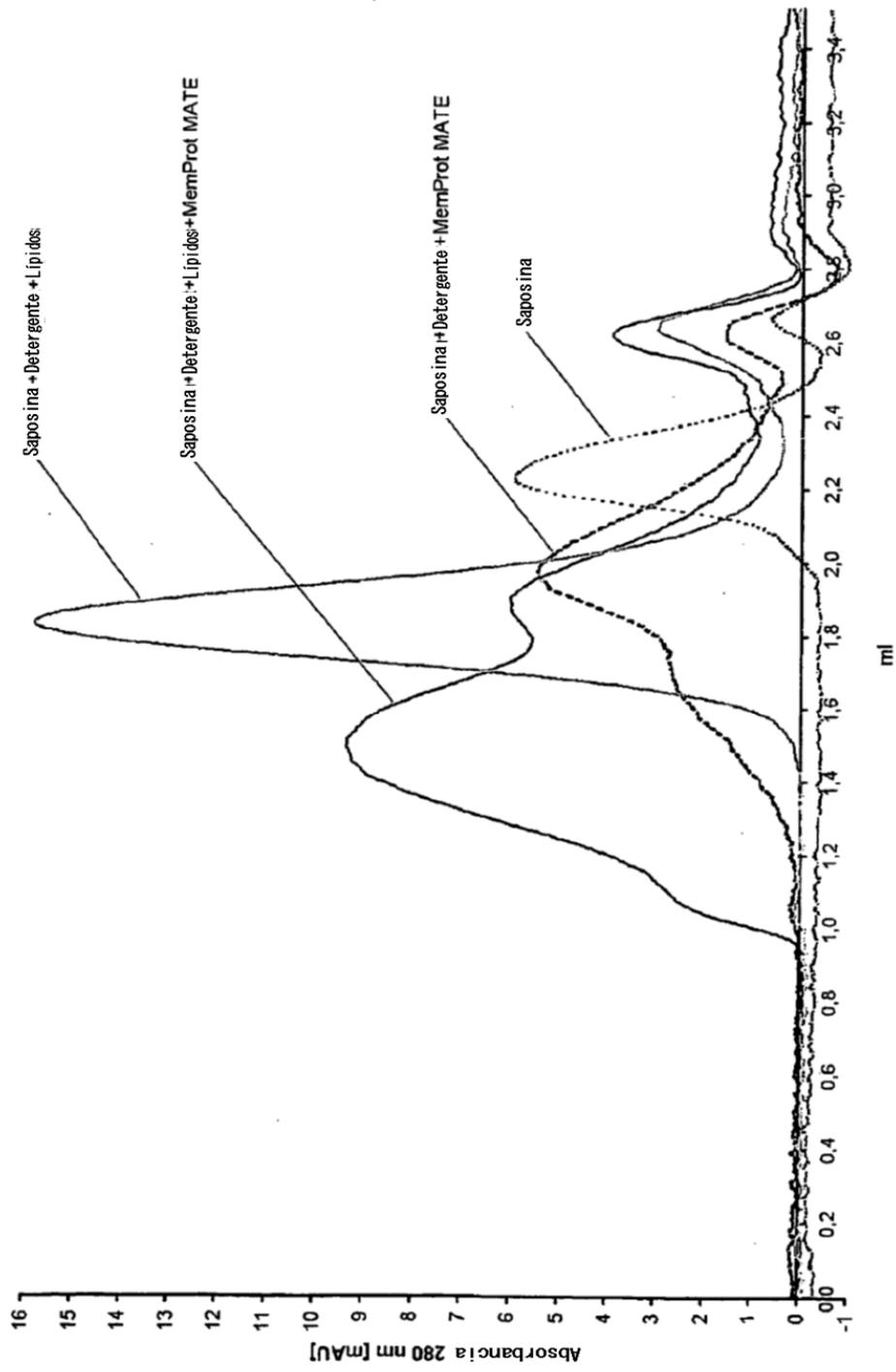


Fig.12

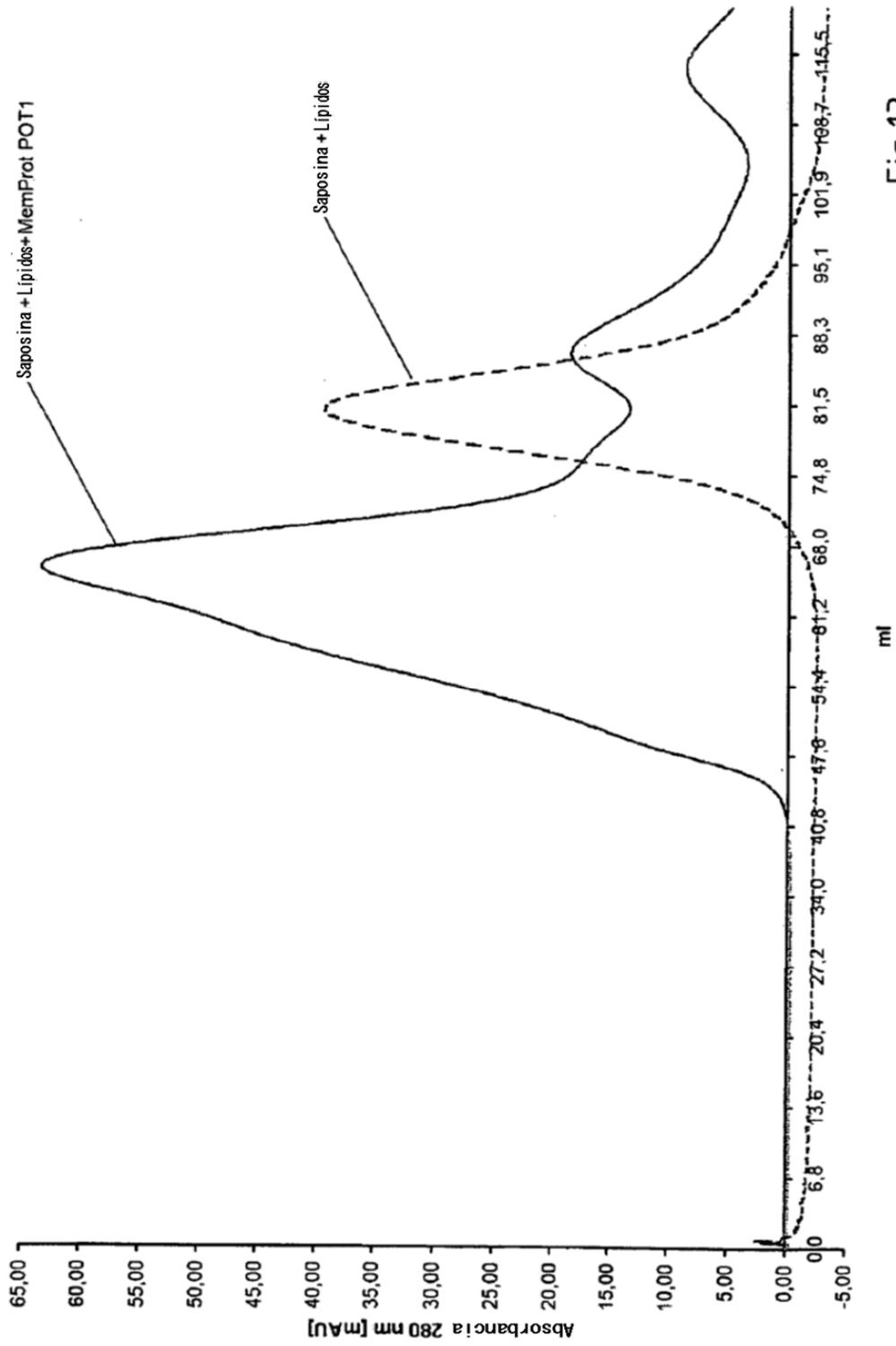


Fig.13

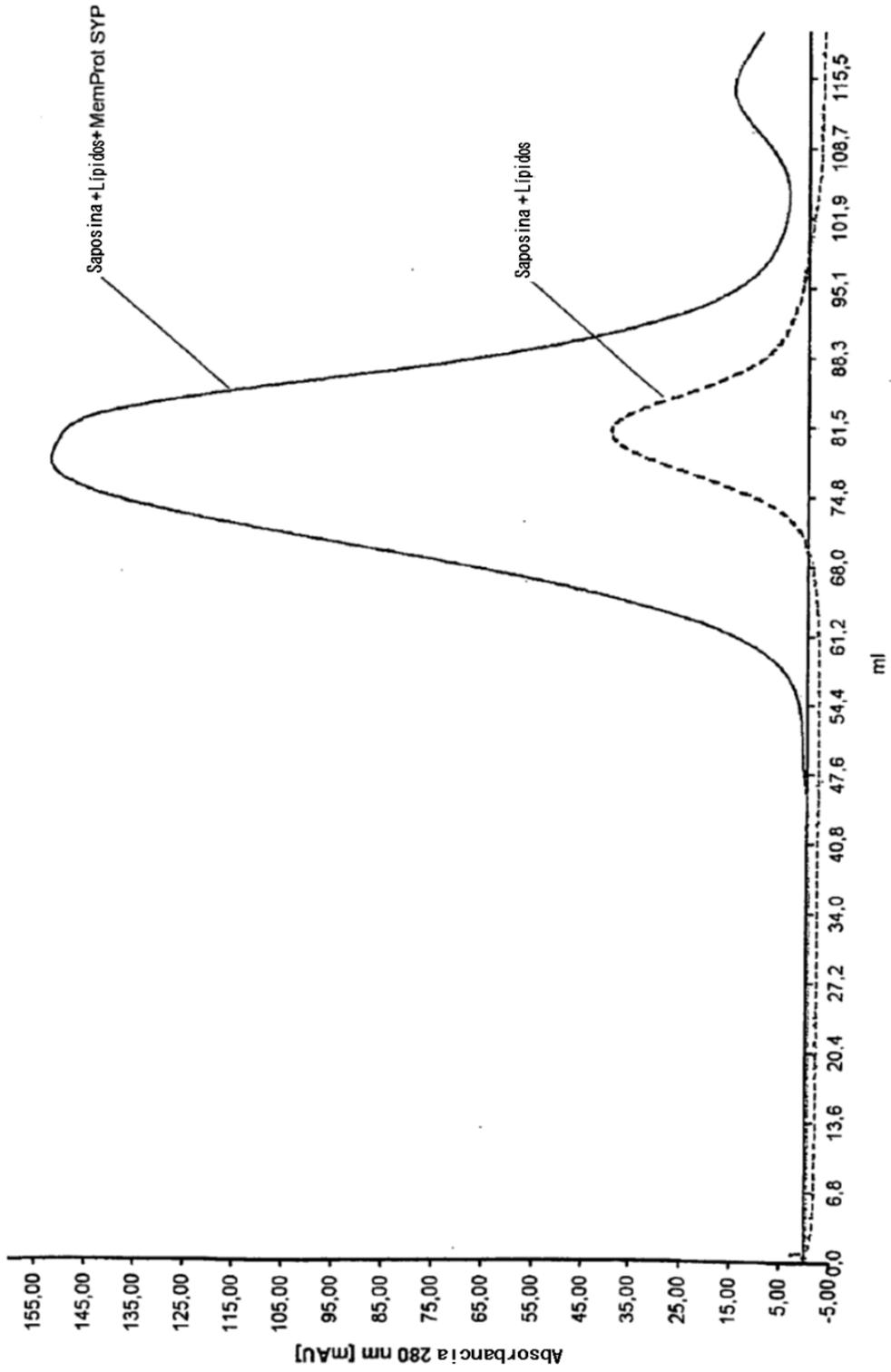


Fig.14

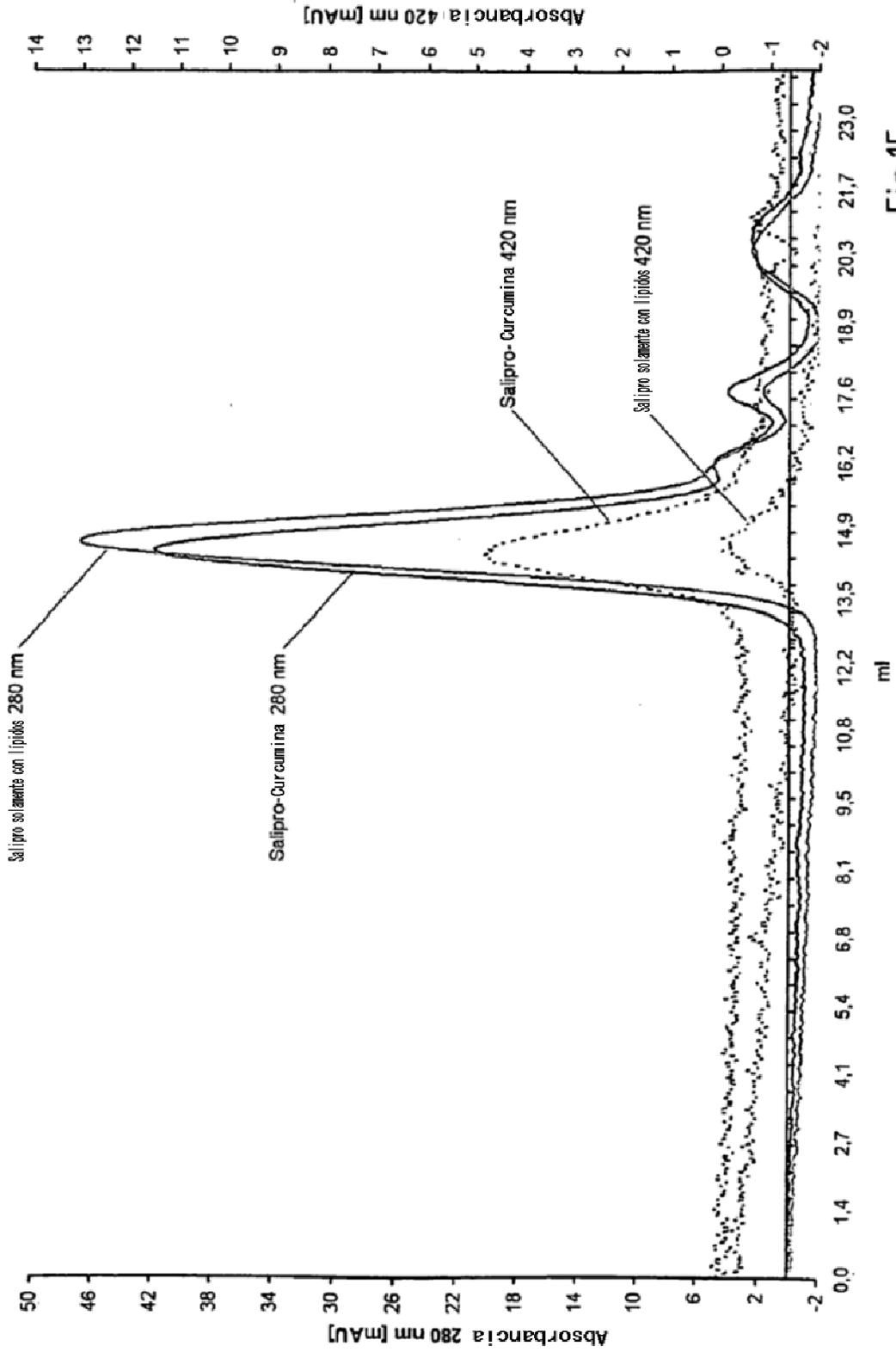


Fig.15

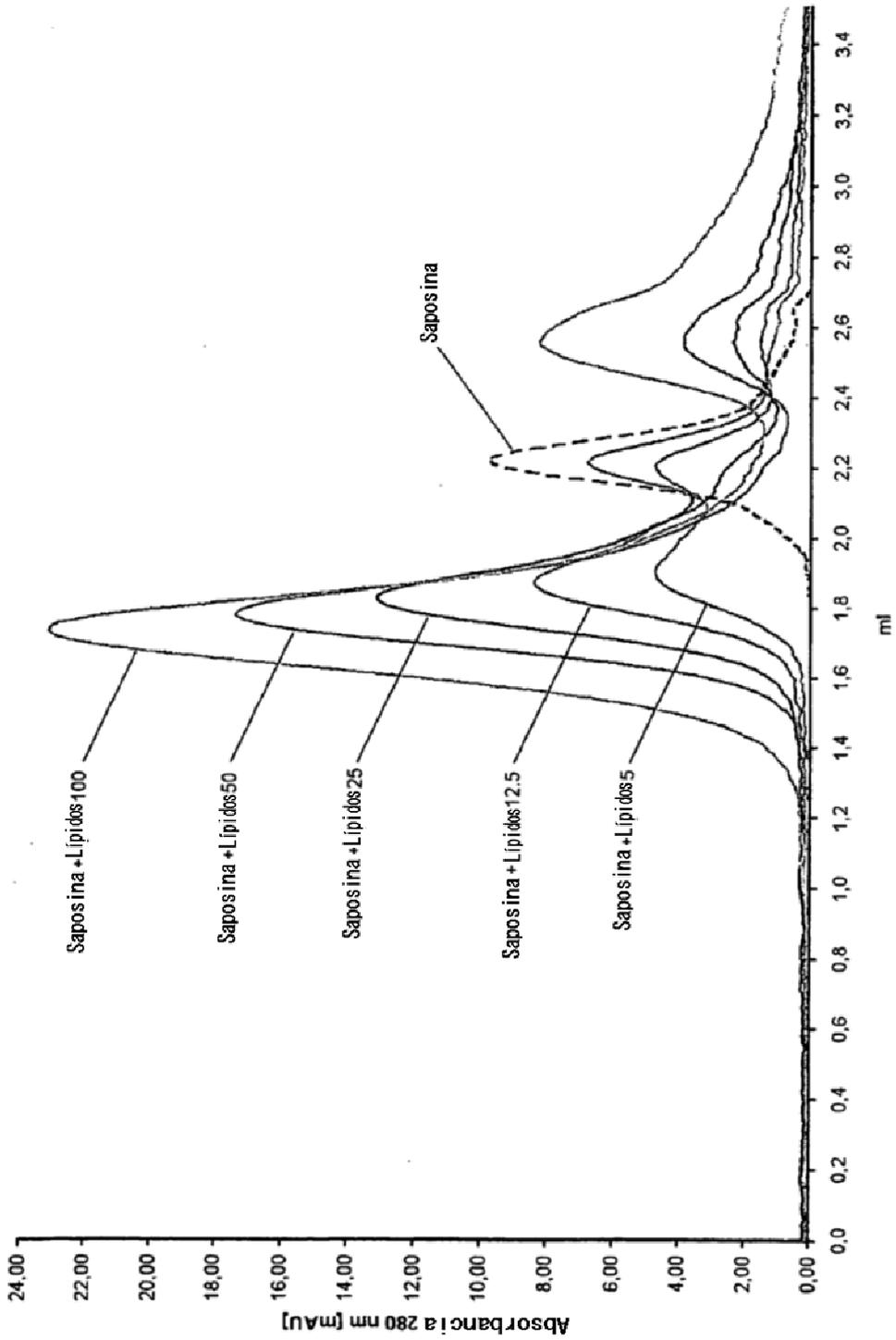


Fig.16

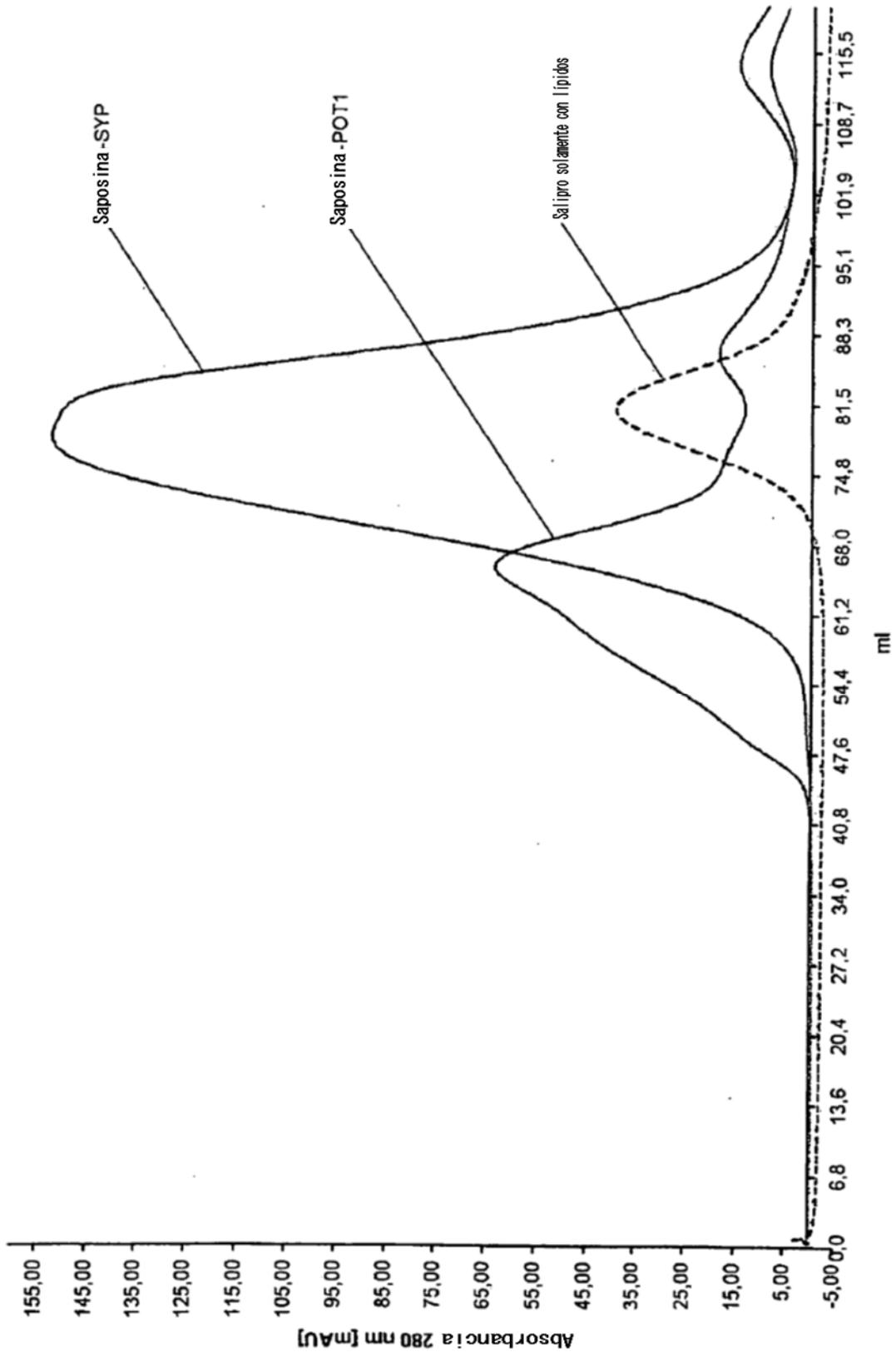


Fig.17

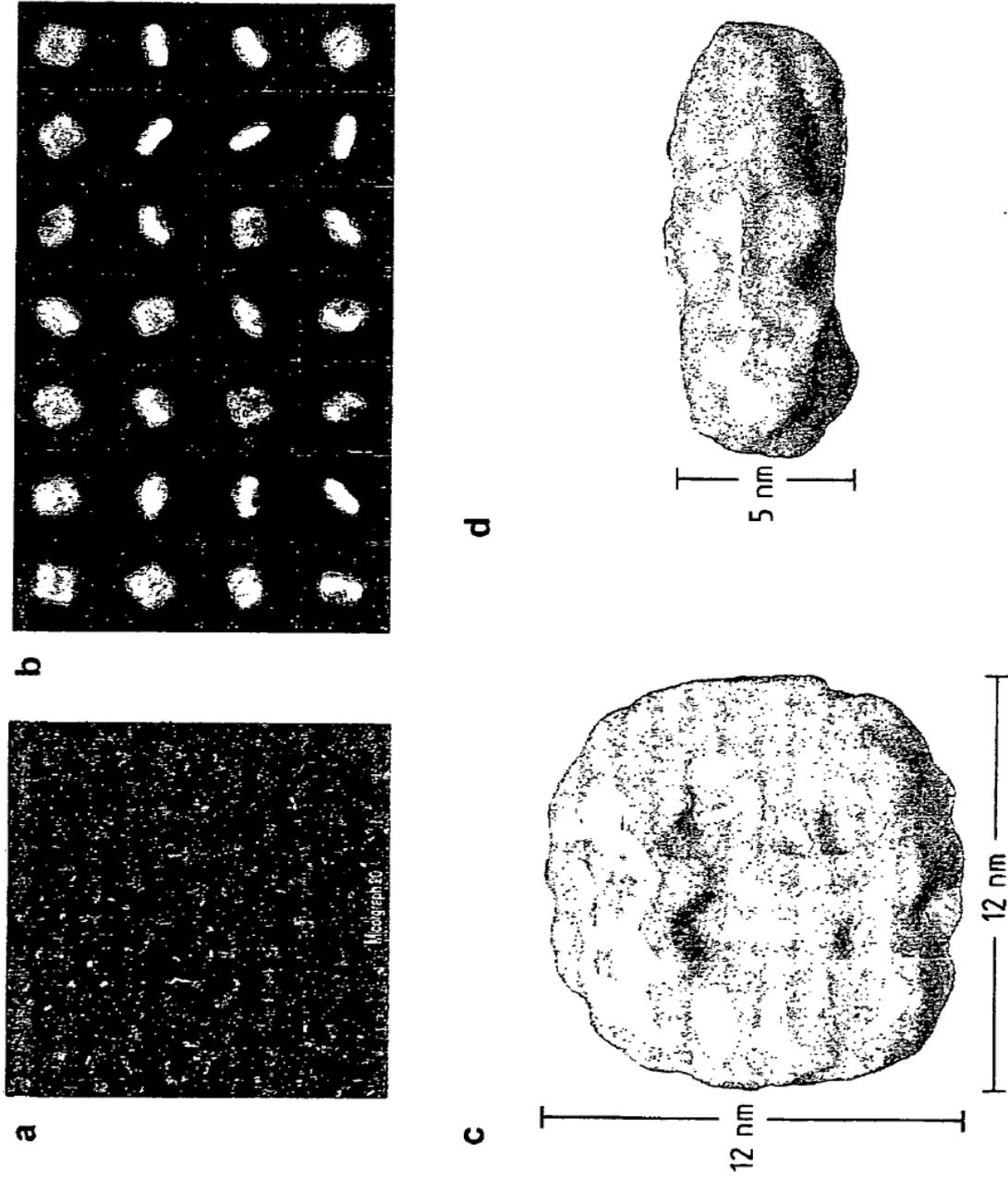


Fig.18

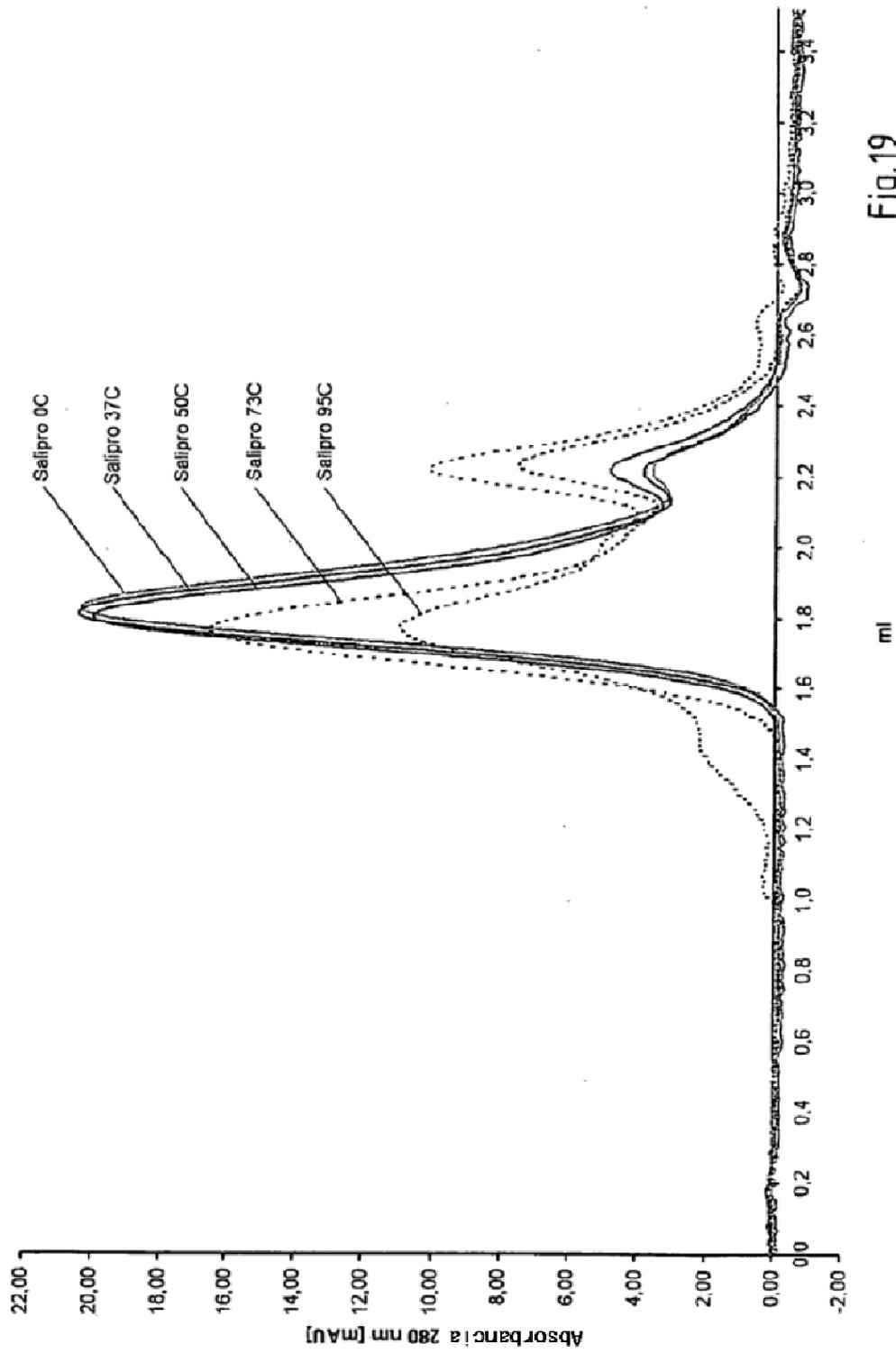


Fig.19