

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 628 351**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/58** (2006.01)

**G01N 33/543** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.10.2011 PCT/EP2011/067894**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.04.2012 WO12049251**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.10.2011 E 11776729 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.03.2017 EP 2628007**

54 Título: **Método para recubrir nanopartículas**

30 Prioridad:

**10.03.2011 GB 201104081**

**13.10.2010 US 392529 P**

**13.10.2010 GB 201017251**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**02.08.2017**

73 Titular/es:

**PHARMA DIAGNOSTICS NV (100.0%)**

**Z1 Research Park 310**

**1731 Zellik, BE**

72 Inventor/es:

**VAN HOONACKER, ANNE;**

**ROSKAMP, MEIKE y**

**ENGLEBIENNE, PATRICK**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 628 351 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

Método para recubrir nanopartículas

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a un método para recubrir nanopartículas con una pareja de unión, mediante lo cual se requiere una cantidad reducida de pareja de unión. En realizaciones específicas, la invención proporciona métodos para recubrir nanopartículas con una única capa de una pareja de unión tal como una proteína. En particular, la invención se refiere a un método para recubrir nanopartículas con una única capa de proteína, en el que solo se requieren bajas cantidades de proteína.

**Antecedentes de la invención**

10 Las nanopartículas se usan ampliamente hoy en día en muchas aplicaciones en las ciencias médicas y biomédicas tales como para administración de fármacos, para terapia y para diagnóstico. Para muchas de estas aplicaciones, se recubren nanopartículas con proteínas. Las nanopartículas recubiertas con proteínas tales como anticuerpos contra células cancerosas pueden usarse, por ejemplo, para localizar células cancerosas en el cuerpo. De manera similar, para la detección de analitos *in vitro*, se unen sondas tales como anticuerpos a nanopartículas, mediante lo cual se detecta la unión del analito al anticuerpo en la nanopartícula.

15 Más en particular, pueden usarse nanopartículas de metal recubiertas con proteínas para transducir acontecimientos de unión mediante cambios en su absorción al menos en el espectro de luz visible. Este fenómeno de resonancia de plasmones de superficie localizados (RPSL) permite el examen de interacciones de biomoléculas. Por tanto, pueden usarse nanopartículas de metal recubiertas con proteínas en la detección de interacciones anticuerpo-ligando, interacciones receptor-ligando, unión enzima-ligando y cinética de asociación-disociación anticuerpo-antígeno.

20 Se han descrito en la técnica nanopartículas recubiertas con parejas de unión tales como proteínas, así como métodos para recubrir nanopartículas. Por ejemplo, el documento US 2010/0029902 describe un método para recubrir nanopartículas que comprende mezclar las nanopartículas y uno o más tipos de proteína con una disolución dispersada, en el que las proteínas se adsorben en superficies completas de las nanopartículas con el fin de controlar e impedir la agregación de las nanopartículas. El documento WO0189820 da a conocer composiciones y métodos para recubrir un sustrato, que proporcionan un buen contacto de adhesión entre un sustrato y una capa de recubrimiento dura, en los que el sustrato recubierto incluye un sustrato, una primera capa que comprende partículas de relleno inorgánicas dispersas en al menos un silano hidrolizable, y una segunda capa que comprende al menos un agente de compatibilización. El documento WO0188540 da a conocer nanopartículas recubiertas con sílice y un procedimiento para producir tales nanopartículas recubiertas con sílice. También se dan a conocer métodos para funcionalizar nanopartículas recubiertas con sílice. El documento WO2010002479 da a conocer nanosensores o transductores magnéticos que permiten la medición de un parámetro físico en un analito mediante mediciones de resonancia magnética, en particular de ensayos sin aglomeración. Más particularmente, el documento WO2010002479 da a conocer diseños de reactivos de nanopartícula y nanopartículas magnéticas recubiertas con polímero sensible. El documento WO2010007857 da a conocer un método para mantener la reactividad de micropartículas que tienen una sustancia reactiva unida a las mismas en una dispersión de las micropartículas durante un largo periodo mediante la estabilización de las micropartículas en la dispersión de las micropartículas. Específicamente se da a conocer un método para estabilizar micropartículas que tienen una sustancia reactiva unida a las mismas, que implica una etapa de permitir que coexista un aminoácido que contiene azufre o un derivado del mismo en una dispersión de las micropartículas. El método del documento WO2010007857 es particularmente adecuado cuando se pretende que coexista una sustancia de inhibición de la precipitación tal como un polianión o dextrano en la dispersión. El documento WO2010052665 da a conocer una nanopartícula de oro recubierta con desde dos hasta cinco capas de una combinación de un polielectrolito que tiene funcionalidad amino y un polielectrolito que tiene funcionalidad de tipo sulfónico, o con una única capa de dicho polielectrolito que tiene funcionalidad amino, en la que dicha nanopartícula comprende una capa exterior de albúmina. El documento WO2010006201 da a conocer un método de reducción de las interacciones no específicas de especies interferentes presentes en una muestra en ensayos basados en nanopartículas metálicas, aumentando de ese modo la sensibilidad de estos ensayos. En particular, los métodos del documento WO2010006201 conllevan neutralizar la reactividad química de grupos funcionales presentes en especies interferentes mediante la adición de un agente de neutralización, tal como un agente de alquilación o ion de metal pesado.

Una desventaja de los métodos de la técnica anterior es el requisito de altas cantidades de la pareja de unión para recubrir por completo las nanopartículas. A menudo, solo se dispone de bajas cantidades de la pareja de unión de interés.

55 Además, como algunos de estos métodos de la técnica anterior dan como resultado nanopartículas recubiertas con múltiples capas de la pareja de unión, la interacción de la proteína unida con otro compuesto se produce a una distancia aumentada desde la superficie de la nanopartícula, lo que afecta a la intensidad de la señal en métodos de detección.

Sigue habiendo la necesidad en la técnica de proporcionar métodos para recubrir nanopartículas con parejas de

unión tales como proteínas en los que solo se requieran bajas cantidades de la pareja de unión y, para realizaciones particulares, en los que puede lograrse el recubrimiento con una única capa de la pareja de unión.

### Sumario de la invención

5 Los presentes inventores han hallado un método para recubrir nanopartículas que implica el uso de una cantidad limitada de pareja de unión. Además, los inventores han hallado métodos que permite, cuando resulta de interés, el recubrimiento con una única capa de la pareja de unión. Por tanto, los métodos de la superan uno o más de los problemas mencionados anteriormente de la técnica anterior.

10 En un primer aspecto, la invención se refiere a métodos para recubrir nanopartículas coloidales con una pareja de unión, en los que los métodos comprenden concentrar la pareja de unión sobre la superficie de la nanopartícula. En realizaciones particulares, el método implica garantizar una concentración del agente de unión cerca de la nanopartícula. En realizaciones particulares de la invención, los métodos implican garantizar una interacción electrostática entre la nanopartícula y el agente de unión.

15 La invención se refiere a métodos para recubrir nanopartículas con una pareja de unión, en los que los métodos comprenden poner en contacto dichas nanopartículas con un detergente no iónico, catiónico y/o zwitteriónico antes de o tras poner en contacto las nanopartículas con una disolución de dicha pareja de unión.

20 Los inventores han hallado que los métodos descritos en el presente documento permiten el recubrimiento de nanopartículas con una cantidad limitada de la pareja de unión y permiten obtener nanopartículas estables en forma coloidal. Además, en realizaciones particulares los métodos pueden usarse para obtener una única capa de un agente de unión, tal como una proteína usando bajas cantidades del agente de unión. Por tanto, estos métodos son ventajosos porque a menudo por ejemplo solo se dispone de pequeñas cantidades de la proteína de interés. Además, en realizaciones particulares, los métodos de la presente invención permiten controlar el grosor de capa de proteína sobre las nanopartículas. Por ejemplo, los métodos permiten la producción de nanopartículas estables recubiertas con solo una capa de proteína sobre la superficie de la nanopartícula. Esto es de particular interés, por ejemplo cuando se pretende un recubrimiento adicional de las nanopartículas con otra molécula, ya que se reduce la distancia de esta molécula a la superficie de la nanopartícula. Además, si va a estudiarse la interacción entre la proteína recubierta y otro compuesto, se reduce la distancia de esta interacción a la superficie de la nanopartícula, mejorando de ese modo la detección óptica de la interacción.

30 Además, en realizaciones particulares, los métodos de la presente invención son ventajosos cuando se requiere un recubrimiento a altos valores de pH. En ausencia de un detergente no iónico, catiónico y/o zwitteriónico, el ajuste a altos valores de pH podría conducir a aglutinación de las nanopartículas. Realizaciones particulares de los métodos descritos anteriormente también pueden ser ventajosas cuando es necesario tamponar la disolución del agente de unión. En ausencia de un detergente no iónico, catiónico y/o zwitteriónico, incluso pequeñas concentraciones de sal en la disolución podrían conducir a aglutinación de las nanopartículas, más particularmente cuando el agente de unión es una proteína. Si las nanopartículas se ponen en contacto con un detergente no iónico, catiónico y/o zwitteriónico antes de (y opcionalmente durante) el recubrimiento, no se produce aglutinación, ni siquiera en presencia de concentraciones de sal moderadas. Aún otra ventaja de realizaciones particulares de los métodos de la presente invención es que puede garantizarse un recubrimiento homogéneo, incluso cuando la proteína es una proteína o un péptido pequeño en baja cantidad. Además, realizaciones particulares del método descrito anteriormente también pueden ser ventajosas cuando el agente de unión es una proteína que se agrega antes del recubrimiento. La incubación de la proteína con un detergente no iónico, catiónico y/o zwitteriónico antes del recubrimiento ayudará a estabilizar la proteína en forma no agregada, mejorando de ese modo el resultado de recubrimiento.

45 La presente invención se refiere a métodos que comprenden la etapa de mezclar una disolución que comprende las nanopartículas con una disolución que comprende el agente de unión, en los que dicha disolución que comprende las nanopartículas y/o dicha disolución que comprende el agente de unión comprenden dicho detergente no iónico, catiónico y/o zwitteriónico, en los que la concentración de dicho detergente no iónico, catiónico y/o zwitteriónico oscila entre el 0,0001 y el 1% volumen/volumen. Los métodos de la presente invención comprenden además poner en contacto entre sí la disolución que comprende las nanopartículas con la disolución que comprende el agente de unión de modo que se garantice una interacción entre dicho agente de unión y dicha nanopartícula. En realizaciones particulares adicionales, los métodos según la invención comprenden además una etapa de garantizar la unión de dicha nanopartícula con dichos agentes de unión.

55 En realizaciones particulares, la etapa de poner en contacto la disolución que comprende la nanopartícula con la disolución que comprende el agente de unión garantiza la unión de dicha nanopartícula con dicho agente de unión. En realizaciones particulares, el agente de unión es una proteína y dicho método implica poner en contacto dicha nanopartícula con dicha proteína en presencia de una disolución que comprende las nanopartículas y/o dicha disolución que comprende las proteínas comprenden dicho detergente no iónico, catiónico y/o zwitteriónico, permitiendo de ese modo que la proteína forme una única capa sobre la superficie de dichas nanopartículas.

La presente invención proporciona métodos que comprenden además, antes del recubrimiento de dichas

nanopartículas, la etapa de determinar la cantidad mínima de proteína requerida para obtener nanopartículas estables en forma coloidal, recubiertas con una única capa de agentes de unión, mediante la valoración de la concentración, en los que dicha determinación de la cantidad mínima de agentes de unión se realiza en presencia de dicho detergente no iónico, catiónico y/o zwitteriónico.

5 En realizaciones particulares, la presente invención se refiere a métodos tal como se describieron anteriormente, en los que dicho detergente no iónico se selecciona del grupo que comprende polisorbatos, etoxilatos de octilfenol, glucaminas, Lubrol, Brij®, Nonidet®, Pluronic®, Genapol® e Igepal®.

En realizaciones particulares, la presente invención proporciona métodos tal como se describieron anteriormente, en los que dicho detergente catiónico se selecciona de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) o bromuro de trimetil(tetradecil)amonio (TTAB).

10 En realizaciones particulares, la presente invención se refiere a métodos tal como se describieron anteriormente, en los que dicho detergente zwitteriónico se selecciona del grupo que comprende amidosulfobetainas, alquilbetainas y propanosulfonatos de amonio.

15 En realizaciones particulares, la presente invención se refiere a métodos tal como se describieron anteriormente, en los que la cantidad de proteína usada en el recubrimiento es mayor que la cantidad mínima de proteína requerida para obtener nanopartículas estables.

En realizaciones particulares, la presente invención proporciona métodos tal como se describieron anteriormente, en los que dichas nanopartículas comprenden un coloide de polímero conductor, un coloide de metal noble, un coloide de material compuesto de polímero conductor, sílice o látex.

20 En realizaciones particulares, la presente invención se refiere a métodos tal como se describieron anteriormente, en los que dichas nanopartículas comprenden un metal de transición seleccionado del grupo que comprende Au, Ag, Cu, Ta, Pt, Pd y Rh y preferiblemente en los que dicho metal de transición es oro, plata o cobre.

En realizaciones particulares, la presente invención se refiere a composiciones de nanopartículas que comprenden nanopartículas que pueden obtenerse mediante uno o más de los métodos tal como se describieron anteriormente.

25 En realizaciones particulares, la presente invención se refiere al uso de kits para recubrir nanopartículas con una única capa de un agente de unión para obtener nanopartículas estables en forma coloidal, en el que dichos kits comprenden nanopartículas e instrucciones para recubrir dichas nanopartículas con cualquiera de los métodos tal como se describieron anteriormente.

30 En realizaciones particulares, la presente invención proporciona kits tal como se describieron anteriormente, que comprenden además un detergente no iónico, catiónico y/o zwitteriónico o una disolución que comprende un detergente no iónico, catiónico y/o zwitteriónico.

35 En realizaciones particulares, la presente invención proporciona métodos para la detección por resonancia de plasmones de superficie localizados de la interacción de un compuesto con una proteína unido a una nanopartícula, método que comprende recubrir dicha nanopartícula con un agente de unión tal como, pero sin limitarse a, una proteína con cualquiera de los métodos tal como se describieron anteriormente.

### Breve descripción de los dibujos

La invención se describirá a continuación, entre otras cosas, con referencia a las figuras adjuntas, que se proporcionan a modo de ejemplo únicamente y no debe considerarse que limitan el alcance de la presente invención.

40 Las figuras 1 y 2 demuestran el efecto del detergente no iónico Tween 20 sobre la cantidad de proteína G requerida para estabilizar nanopartículas de oro (GNP, *gold nanoparticles*), según una realización particular de la invención.

La figura 1 demuestra los resultados de la valoración de la concentración de proteína G en ausencia de Tween 20. La flecha indica la menor cantidad de proteína G que estabiliza la GNP. La figura 1A representa un gráfico de  $\lambda_{\text{máx}}$  frente a la cantidad de proteína G por ml de GNP. La figura 1B representa un gráfico de  $\text{DO}(600)/\text{DO}(\lambda_{\text{máx}})$  frente a la cantidad de proteína G por ml de GNP. La figura 1C representa un gráfico de  $\text{DO}(\lambda_{\text{máx}})$  frente a la cantidad de proteína G por ml de GNP.

La figura 2 demuestra los resultados de la valoración de la concentración de proteína G en presencia de Tween 20. La flecha indica la menor cantidad de proteína G que estabiliza la GNP. La figura 2A representa un gráfico de  $\lambda_{\text{máx}}$  frente a la cantidad de proteína G por ml de GNP. La figura 2B representa un gráfico de  $\text{DO}(600)/\text{DO}(\lambda_{\text{máx}})$  frente a la cantidad de proteína G por ml de GNP. La figura 2C representa un gráfico de  $\text{DO}(\lambda_{\text{máx}})$  frente a la cantidad de proteína G por ml de GNP. La figura 2D representa un gráfico del diámetro hidrodinámico de la GNP frente a la cantidad de proteína G por ml de GNP.

Las figuras 3 y 4 demuestran el efecto de Tween 20 sobre la cantidad de estreptavidina requerida para estabilizar

nanopartículas de oro (GNP), según una realización particular de la invención.

La figura 3 demuestra los resultados de la valoración de la concentración de estreptavidina en ausencia de Tween 20. La flecha indica la menor cantidad de estreptavidina que estabiliza la GNP. La figura 3A representa un gráfico de  $\lambda_{\text{máx}}$  frente a la cantidad de estreptavidina por ml de GNP. La figura 3B representa un gráfico de  $\text{DO}(600)/\text{DO}(\lambda_{\text{máx}})$  frente a la cantidad de estreptavidina por ml de GNP. La figura 3C representa un gráfico de  $\text{DO}(\lambda_{\text{máx}})$  frente a la cantidad de estreptavidina por ml de GNP.

La figura 4 muestra los resultados de la valoración de la concentración de estreptavidina en presencia de Tween 20. La flecha indica la menor cantidad de estreptavidina que estabiliza la GNP en presencia de Tween 20. La figura 4A representa un gráfico de  $\lambda_{\text{máx}}$  frente a la cantidad de estreptavidina por ml de GNP. La figura 4B representa un gráfico de  $\text{DO}(600)/\text{DO}(\lambda_{\text{máx}})$  frente a la cantidad de estreptavidina por ml de GNP. La figura 4C representa un gráfico de  $\text{DO}(\lambda_{\text{máx}})$  frente a la cantidad de estreptavidina por ml de GNP. La figura 4D representa un gráfico del diámetro hidrodinámico de la GNP frente a la cantidad de estreptavidina por ml de GNP.

La figura 5 muestra los resultados de la valoración con proteína G de la concentración de GNP recubiertas con Tween 20, según una realización particular de la invención. La flecha indica la menor cantidad de proteína G que estabiliza GNP recubiertas con Tween 20. La figura 5A representa un gráfico de  $\lambda_{\text{máx}}$  frente a la cantidad de proteína G por ml de GNP. La figura 5B representa un gráfico de  $\text{DO}(600)/\text{DO}(\lambda_{\text{máx}})$  frente a la cantidad de proteína G por ml de GNP. La figura 5C representa un gráfico de  $\text{DO}(\lambda_{\text{máx}})$  frente a la cantidad de proteína G por ml de GNP.

La figura 6 muestra los resultados de la valoración con proteína A de la concentración de GNP recubiertas con Tween 20, según una realización particular de la invención. La flecha indica la menor cantidad de proteína A que estabiliza GNP recubiertas con Tween 20. La figura 6A representa un gráfico de  $\lambda_{\text{máx}}$  frente a la cantidad de proteína A por ml de GNP. La figura 6B representa un gráfico de  $\text{DO}(600)/\text{DO}(\lambda_{\text{máx}})$  frente a la cantidad de proteína A por ml de GNP. La figura 6C representa un gráfico de  $\text{DO}(\lambda_{\text{máx}})$  frente a la cantidad de proteína A por ml de GNP.

#### Descripción detallada de la invención

En los siguientes párrafos, se describen diferentes aspectos de la invención con más detalle. Cada aspecto así descrito puede combinarse con cualquier otro aspecto o aspectos a menos que se indique claramente lo contrario. En particular, cualquier característica indicada como preferida o ventajosa puede combinarse con cualquier otra característica o características indicadas como preferidas o ventajosas.

En el contexto de la presente invención, los términos usados han de interpretarse según las siguientes definiciones, a menos que el contexto dicte otra cosa.

Tal como se usa en el presente documento, las formas en singular “un(o)”, “una” y “el/la” incluyen referentes tanto en singular como en plural a menos que el contexto dicte claramente otra cosa.

Los términos “que comprende”, “comprende” y “se compone de” tal como se usan en el presente documento son sinónimos de “que incluye”, “incluye” o “que contiene”, “contiene”, y son inclusivos o abiertos y no excluyen miembros, elementos o etapas de método adicionales, no citados. Cuando se hace referencia a que las realizaciones “comprenden” características, elementos o etapas particulares, esto pretende incluir específicamente realizaciones que consisten en las características, elementos o etapas enumerados.

La indicación de intervalos numéricos mediante sus extremos incluye todos los números y fracciones incluidos dentro de los intervalos respectivos, así como los extremos citados.

El término “aproximadamente” tal como se usa en el presente documento cuando se refiere a un valor medible tal como un parámetro, una cantidad, una duración temporal, y similares, pretende englobar variaciones de +/-10% o menos, preferiblemente +/-5% o menos, más preferiblemente +/-1% o menos, y todavía más preferiblemente +/-0,1% o menos de y desde el valor especificado, en la medida en que tales variaciones sean apropiadas de realizar en la invención dada a conocer. Se entiende que el valor al que se refiere el modificador “aproximadamente” se da a conocer a su vez también específicamente, y de manera preferible.

La presente invención se refiere a métodos para recubrir nanopartículas con un agente de unión en los que se requiere una cantidad reducida de agentes de unión. Más particularmente, la invención proporciona métodos en los que se garantiza una interacción entre la nanopartícula y el agente de unión antes de o durante la etapa de recubrimiento. En realizaciones particulares, la interacción garantiza un recubrimiento eficaz de la nanopartícula. En realizaciones adicionales, los métodos pueden implicar la unión covalente del agente de unión a la nanopartícula después de la concentración del agente de unión en la superficie de la nanopartícula.

El término agente de unión tal como se usa en el presente documento se refiere a una molécula de interés que va a recubrirse sobre una nanopartícula y que puede garantizar a su vez la unión a otra entidad. Normalmente, la pareja de unión es un miembro de un par de unión específico conocido o previsto tal como antígeno-anticuerpo, receptor-ligando, enzima-ligando, azúcar-lectina, receptor-agente de unión a receptor, proteína-oligonucleótido, etc. En realizaciones particulares, la pareja de unión es una proteína o un péptido. En realizaciones particulares adicionales,

la pareja de unión contiene al menos 5 aminoácidos, más particularmente al menos 10 aminoácidos, al menos 20, al menos 50 o más.

En un aspecto, la invención proporciona métodos para recubrir nanopartículas, en los que solo se requieren bajas cantidades de proteína, y a nanopartículas de una única capa obtenidas mediante estos métodos.

- 5 Según este aspecto, la invención se refiere a métodos para recubrir nanopartículas con una proteína, en los que los métodos comprenden poner en contacto dichas nanopartículas con un detergente no iónico, catiónico y/o zwitteriónico antes de o tras poner en contacto las nanopartículas con una disolución de dicha proteína.

El término “detergente no iónico” tal como se usa en el presente documento se refiere a un detergente que no tiene ningún grupo iónico. En realizaciones de los métodos de la invención, el detergente no iónico se selecciona del grupo que comprende polisorbatos, etoxilatos de octilfenol, glucaminas, Lubrol, Brij®, Nonidet®, Pluronic®, Genapol® e Igepal®. En realizaciones particulares, el polisorbato se elige del grupo que comprende polisorbato 20, polisorbato 40, polisorbato 60, polisorbato 65, polisorbato 80 y polisorbato 85. En realizaciones particulares, el etoxilato de octilfenol se selecciona del grupo que comprende TRITON® X-15, TRITON® X-35, TRITON® X-45, TRITON® X-100, TRITON® X-102, TRITON® X-114, TRITON X-165 (70%), TRITON® X-305 (70%), TRITON® X-405 (70%) y TRITON® X-705 (70%). En realizaciones particulares, la glucamina se selecciona del grupo que comprende de N-octanoil-N-metilglucamina (MEGA-8), N-nonanoil-N-metilglucamina (MEGA-9) y N-decanoil-N-metilglucamina (MEGA-10).

El término “detergente catiónico” tal como se usa en el presente documento se refiere a un detergente con una carga iónica positiva. En realizaciones de los métodos de la invención, el detergente catiónico se selecciona de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) o bromuro de trimetil(tetradecil)amonio (TTAB).

El término “detergente zwitteriónico” tal como se usa en el presente documento se refiere a un detergente que tiene grupos iónicos, pero sin carga neta. En realizaciones de los métodos de la invención, el detergente zwitteriónico se selecciona del grupo que comprende amidosulfobetainas, alquilbetainas y propanosulfonatos de amonio. En realizaciones preferidas, el detergente zwitteriónico se selecciona del grupo que comprende amidosulfobetaina-14, amidosulfobetaina-16, 1-propanosulfonato de 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio] (CHAPS), 2-hidroxi-1-propanosulfonato de 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio] (CHAPSO), propanosulfonato de 3-(4-heptil)fenil-3-hidroxiopropil)dimetilamonio (C7BzO), EMPIGEN® BB, sal interna de propanosulfonato de 3-(N,N-dimetiloctilamonio), sal interna de propanosulfonato de 3-(decildimetilamonio), sal interna de propanosulfonato de 3-(dodecildimetilamonio), sal interna de propanosulfonato de 3-(N,N-dimetilmiristilamonio), sal interna de propanosulfonato de 3-(N,N-dimetilpalmitilamonio), sal interna de propanosulfonato de 3-(N,N-dimetiloctadecilamonio).

El experto entenderá que la referencia en el presente documento al uso de un detergente no iónico, catiónico y/o zwitteriónico incluye el uso de combinaciones de diferentes detergentes no iónicos, catiónicos y/o zwitteriónicos.

En realizaciones particulares de los métodos de la invención, el detergente es un detergente no iónico.

- 35 Los métodos de la presente invención se caracterizan por que las nanopartículas se ponen en contacto con el detergente no iónico, catiónico y/o zwitteriónico antes de o durante el recubrimiento con la proteína de interés. En efecto, se han usado detergentes no iónicos, catiónicos y/o zwitteriónicos en la técnica anterior en tampones con la manipulación de nanopartículas recubiertas. Sin embargo, según los métodos de la presente invención, las nanopartículas se ponen en contacto con un detergente no iónico, catiónico y/o zwitteriónico antes de o durante el procedimiento de recubrimiento, tal como para mejorar el procedimiento de recubrimiento.

La concentración de detergente no iónico, catiónico y/o zwitteriónico usada no es crítica, pero normalmente oscila entre el 0,0001 y el 1% volumen/volumen. Particularmente, el detergente no iónico, catiónico y/o zwitteriónico puede usarse en una concentración que oscila entre el 0,005 y el 0,5% volumen/volumen. Preferiblemente, el detergente no iónico, catiónico y/o zwitteriónico puede usarse en una concentración que oscila entre el 0,001 y el 0,1% volumen/volumen. Más preferiblemente, la concentración del detergente no iónico, catiónico y/o zwitteriónico puede ser del 0,001, el 0,002, el 0,005, el 0,01, el 0,02, el 0,03, el 0,04, el 0,05, el 0,06, el 0,07, el 0,08, el 0,09 o el 0,1% volumen/volumen, o un valor en el intervalo entre dos cualesquiera de los valores mencionados anteriormente.

En realizaciones particulares, el agente de unión es una proteína y la invención proporciona métodos que permiten el recubrimiento de una nanopartícula con una única capa de proteína y las nanopartículas estables en forma coloidal que pueden obtenerse mediante estos métodos. En particular, en estas realizaciones, la invención proporciona métodos para recubrir nanopartículas con una única capa de proteína. En estas realizaciones, los métodos comprenden la etapa de mezclar una disolución que comprende nanopartículas con una disolución que comprende proteínas, permitiendo de ese modo que las proteínas formen una única capa sobre la superficie de dichas nanopartículas, en los que dicha disolución que comprende nanopartículas y/o dicha disolución que comprende proteínas comprenden dicho detergente no iónico, catiónico y/o zwitteriónico.

En los métodos de la presente invención, se prevé que las nanopartículas puedan ponerse en contacto con el detergente no iónico, catiónico y/o zwitteriónico antes de poner en contacto las nanopartículas con la proteína, o

simultáneamente. Por consiguiente, en una realización, la invención proporciona métodos en los que la disolución que comprende la proteína comprende el detergente no iónico, catiónico y/o zwitteriónico. En realizaciones particulares, esto puede tener la ventaja de que se estabilizan las proteínas. Después de eso, las nanopartículas se ponen en contacto con la disolución o suspensión que comprende las proteínas y el detergente no iónico, catiónico y/o zwitteriónico.

En otras realizaciones, los métodos de la invención comprenden preparar una disolución que comprende las nanopartículas y añadir un detergente no iónico, catiónico y/o zwitteriónico a la misma. En estas realizaciones, las nanopartículas se ponen en contacto con el detergente no iónico, catiónico y/o zwitteriónico antes de ponerlas en contacto con la disolución de proteína. Los métodos comprenden entonces mezclar la disolución que comprende las proteínas con la disolución que comprende las nanopartículas y el detergente no iónico, catiónico y/o zwitteriónico.

Se prevén estas realizaciones de los métodos de la presente invención para mejorar generalmente el recubrimiento de nanopartículas con proteínas. La naturaleza de la proteína no es crítica para este aspecto de la invención y, por tanto, puede tener cualquier tamaño e incluye, pero no se limita a, anticuerpos o fragmentos de la misma, antígenos, enzimas o sustratos, receptores o ligandos, etc. El término proteínas incluye por tanto péptidos.

Los inventores han hallado que en este aspecto de la invención, los métodos son de particular interés para el recubrimiento de nanopartículas con proteínas que son susceptibles de interacciones hidrófobas y/o proteínas que se agregarán fácilmente con baja fuerza iónica. Más particularmente, los métodos de la presente invención son ventajosos para el recubrimiento de proteínas que son susceptibles de interacciones hidrófobas a concentraciones de sal menores de 10 mM o para el recubrimiento de proteínas que no soportan una fuerza iónica tan baja y deben conjugarse a mayor fuerza iónica para mantener su actividad y/o conformación. Normalmente, las proteínas susceptibles de interacciones hidrófobas comprenden grupos apolares que repelen mutuamente el agua y otros grupos polares, dando como resultado una atracción neta de los grupos apolares entre sí. Se sabe que las proteínas que comprenden grupos alquilo hidrocarbonados en Ala, Val, Leu e Ile y/o anillos de benceno (aromáticos) en Phe y Tyr son a menudo susceptibles de interacciones hidrófobas. Ejemplos de tales proteínas son proteínas asociadas con la membrana celular y proteínas implicadas en funciones de transporte. La invención se ilustra en el presente documento con estreptavidina, proteína G y proteína A. Por consiguiente, en realizaciones particulares, las proteínas tal como se usan en los métodos de la presente invención son proteínas susceptibles de interacciones hidrófobas a bajas concentraciones de sal. Por consiguiente, realizaciones particulares de los métodos para recubrir nanopartículas con una proteína comprenden una etapa de recubrimiento realizada en presencia de mayor concentración de sal. Aunque el término mayor concentraciones de sal depende normalmente de la proteína de interés, esto implica normalmente concentraciones de sal mayores de 10 mM, más particularmente mayores de 50 mM, lo más particularmente mayores de 100mM. En realizaciones particulares adicionales, los métodos de la presente invención implican el recubrimiento de proteínas que tienen un pI de 9 o más, preferiblemente de 10 o más. El término "pI" se refiere en este caso al punto isoeléctrico de la proteína, que es el pH al que la proteína o su superficie no porta una carga eléctrica neta.

En realizaciones particulares, los métodos de la presente invención comprenden la etapa de determinar la hidrofobicidad de la proteína antes de mezclar la disolución que comprende las nanopartículas con la disolución que comprende las proteínas. La hidrofobicidad de una proteína puede determinarse calculando un gráfico de hidropaticidad en función de la secuencia de aminoácidos de la proteína o mediante cromatografía de interacción hidrófoba o cromatografía de fase inversa.

En realizaciones alternativas, los métodos de la presente invención incluyen la etapa de poner en contacto el agente de unión con la nanopartícula en presencia de un detergente no iónico, catiónico y/o zwitteriónico, de modo que se garantice una concentración del agente de unión en la superficie de la nanopartícula y una etapa de garantizar la unión del agente de unión a la superficie de la nanopartícula. En realizaciones particulares adicionales, la etapa de garantizar la unión del agente de unión a la superficie de la nanopartícula se realiza mediante la activación de grupos funcionales (por ejemplo, grupos carboxilo) en las nanopartículas, haciendo de ese modo que sean reactivos frente a la pareja de unión (por ejemplo, aminas). En realizaciones particulares, el ligando es una molécula que contiene amina tal como una proteína o un péptido y la unión a la nanopartícula se garantiza mediante la activación de un grupo carboxilo en la nanopartícula.

Se prevé que los métodos de la presente invención son de particular interés cuando el agente de unión es una proteína. Esto se ilustrará a continuación en el presente documento.

Se prevé que realizaciones particulares de los métodos de la presente invención son de interés cuando se requiere el recubrimiento de la proteína a altos valores de pH. En ausencia de un detergente no iónico, catiónico y/o zwitteriónico, el ajuste a altos valores de pH podría conducir a aglutinación de las nanopartículas. Según realizaciones particulares, los métodos de la presente invención comprenden recubrir la proteína en detergente no iónico, catiónico y/o zwitteriónico a alto pH, y ajustar el pH después del recubrimiento.

Se prevé además que realizaciones particulares de los métodos de la presente invención son de particular interés cuando es necesario tamponar la disolución de proteína, pero es susceptible de aglutinación incluso a bajas concentraciones de sal. Según realizaciones particulares, los métodos de la presente invención comprenden poner

en contacto las nanopartículas con la disolución de proteína en presencia de concentraciones de sal moderadas y un detergente no iónico, catiónico y/o zwitteriónico.

Con el fin de garantizar un recubrimiento óptimo en los métodos de la presente invención puede ser de interés poner en contacto las nanopartículas con cantidades específicas de la proteína de interés. Tal como se indicó anteriormente, los métodos de la presente invención son particularmente ventajosos porque permiten el recubrimiento con una cantidad mínima de proteína. No obstante, en realizaciones particulares se prevé que ha de determinarse la cantidad de proteína requerida para recubrir las superficies de las nanopartículas.

Por consiguiente, en realizaciones particulares, la invención proporciona métodos para recubrir nanopartículas, en los que el método comprende además, antes del recubrimiento de dichas nanopartículas, la etapa de determinar la cantidad mínima de proteína requerida para obtener nanopartículas estables en forma coloidal en presencia de dicho detergente no iónico, catiónico y/o zwitteriónico. La etapa de determinar la cantidad óptima de proteína para recubrir la superficie de las nanopartículas se realiza normalmente mediante una valoración de la concentración. Las nanopartículas se mezclan con diferentes cantidades de proteína y se registran los espectros de absorción. Por ejemplo, en realizaciones particulares, se mezclan nanopartículas con cantidades crecientes de proteína normalmente en el intervalo desde 0 hasta 1000  $\mu\text{g}$  de proteína por ml de nanopartículas.

En realizaciones particulares, la etapa de determinar la valoración de la concentración engloba que después de un tiempo de incubación de 10 min normalmente, se añade una sal (por ejemplo NaCl, 1 M) y después de 10 min más, se registran los espectros de absorción de estas muestras entre 350 y 900 nm. La cantidad mínima de proteína necesaria para estabilizar las nanopartículas puede determinarse usando gráficos de  $\lambda_{\text{máx}}$ ,  $\text{DO}(\lambda_{\text{máx}})$  y/o la razón  $\text{DO}(600)/\text{DO}(\lambda_{\text{máx}})$  frente a la cantidad de proteína por ml de nanopartículas. La menor cantidad de proteína, donde todos los gráficos muestran la mayor similitud con el blanco, es la cantidad de proteína necesaria para estabilizar las partículas. En realizaciones alternativas, la etapa de valoración de la concentración engloba añadir la proteína a las nanopartículas en diferentes concentraciones directamente (sin adición de sal) mediante lo cual se lee el espectro, por ejemplo, después de 30 min.

En realizaciones particulares, los métodos de la presente invención pueden comprender la etapa de determinar la cantidad óptima de proteína para el recubrimiento de las nanopartículas. En general, la cantidad óptima de proteína (habitualmente expresada como concentración de proteína, por ejemplo  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) para el recubrimiento de las nanopartículas dependerá de la estructura y del peso molecular de la proteína. Para proteínas más grandes, disminuirá el peso relativo de proteína frente a las partículas. En realizaciones particulares, la cantidad de proteínas usada es mayor que dicha cantidad mínima de proteína requerida para obtener nanopartículas estables. En una realización adicional, la cantidad de proteínas usada es mayor que la cantidad de proteína que puede adsorberse en las superficies completas de las nanopartículas.

Los métodos de la presente invención permiten además controlar el recubrimiento mediante una cantidad discreta de proteína de interés (es decir, la proteína destinada para el recubrimiento y usada en aplicaciones adicionales, por ejemplo para la interacción con otro compuesto, véase a continuación). Esto puede lograrse, entre otros, realizando los métodos de la presente invención y usando o bien composiciones que comprenden solo la proteína de interés o bien composiciones de la proteína combinadas con una proteína que no es reactiva para los fines pretendidos (en la aplicación adicional de la nanopartícula recubierta).

En la presente solicitud, la referencia a "proteína" o "proteínas" pretende referirse generalmente a la proteína de interés. Sin embargo, en realizaciones particulares esto se refiere a una combinación de proteína de interés y proteína no reactiva, más particularmente en proporciones bien definidas. En estas realizaciones, es posible reducir adicionalmente y controlar la cantidad de proteína de interés recubierta sobre la nanopartícula.

En realizaciones particulares, los métodos de la presente invención pueden comprender además una etapa de controlar la adsorción y/o la unión de las proteínas a las nanopartículas. Esto puede realizarse mediante diferentes métodos de detección, incluyendo pero sin limitarse a métodos ópticos de detección. En realizaciones particulares, la unión de la proteína a la nanopartícula se verifica detectando un desplazamiento en la longitud de onda de la resonancia de plasmones de superficie localizados (RPSL). Tal como se usa en el presente documento, el término "resonancia de plasmones de superficie localizados" o "RPSL" se refiere a métodos que detectan cambios ópticos en la superficie de nanopartículas compuesta por metales nobles. Cuando las superficies de metal de las nanopartículas se excitan mediante radiación electromagnética, presentan oscilaciones colectivas de sus electrones de conducción, conocidas como plasmones de superficie localizados (PSL). Cuando se excitan de este modo, las nanopartículas actúan como antenas a nanoescala, que concentran el campo electromagnético en volúmenes muy pequeños adyacentes a las nanopartículas. Puede obtenerse una potenciación excepcionalmente grande de la intensidad electromagnética de este modo. Las nanopartículas usadas en la RPSL permiten la aparición de las oscilaciones de resonancia. El término "absorbancia" se refiere al grado en que una muestra absorbe luz. En RPSL, pueden medirse cambios en la absorbancia proporcionando una indicación de cambios a través de monitorización en el índice de refracción. Puede detectarse la intensidad y longitud de onda de la absorbancia máxima para la banda de extinción de RPSL.

Los métodos de la presente invención son aplicables generalmente al recubrimiento de nanopartículas coloidales,

que pueden ser de cualquier material o forma adecuados, tal como por ejemplo, pero sin limitarse a, nanopartículas, nanopérlas, nanoesferas, nanopirámides, nanohilos, nanoprismas, nanocubos, nanovarillas, malla, etc. Un experto en la técnica apreciará que otras nanoestructuras también pueden ser útiles en la presente invención. En realizaciones particulares, las nanopartículas son nanoestructuras redondas. En realizaciones particulares adicionales, las nanopartículas tienen un diámetro que oscila entre 1 y 1000 nm, particularmente entre 25 y 750 nm, más particularmente entre 50 y 500 nm. El diámetro de las nanopartículas puede ser, por ejemplo, de 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 ó 500 nm, o cualquier valor en el intervalo entre dos cualesquiera de los valores mencionados anteriormente. En realizaciones particulares, las nanopartículas son nanovarillas. En realizaciones adicionales, las nanovarillas tienen una relación de aspecto (es decir, longitud dividida entre anchura) que oscila entre 1,1 y 10, más particularmente entre 1,5 y 5. En determinadas realizaciones, las nanovarillas tienen una anchura o un diámetro de entre 2 y 10 nm. En realizaciones particulares, las nanovarillas tienen una longitud de entre 4 y 45 nm.

El método de presente invención puede realizarse con cualquier tipo de partículas coloidales que pueden recubrirse mediante interacciones electrostáticas. En realizaciones particulares, las nanopartículas usadas en el contexto de la presente invención comprenden un metal, un coloide de polímero conductor, un coloide de metal noble, un coloide de material compuesto de polímero conductor, sílice o látex.

El término "coloide", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una composición fluida de nanopartículas microscópicas en suspensión en un medio líquido. El término "polímero conductor" se refiere a un material polimérico eléctricamente conductor. En una realización, polímeros conductores son polímeros orgánicos, o polímeros orgánicos conjugados con PI. Por ejemplo, los polímeros conductores pueden ser polipirroles tales como polipirrol, poli(pirrol N-sustituido), poli(pirrol 3-sustituido) y poli(pirrol 3,4-disustituido); politiofenos tales como politiofeno, poli(tiofeno 3-sustituido), poli(tiofeno 3,4-disustituido) y polibenzotiofeno; poliisotianaftenos tales como poliisotianafteno; politienilenvinilenos tales como politienilenvinileno; poli(p-fenilenvinilenos) tales como poli(p-fenilenvinileno); polianilinas tales como polianilina, poli(anilina N-sustituida), poli(anilina 3-sustituida) y poli(anilina 2,3-sustituida); poliacetilenos tales como poliacetileno; polidiacetilenos tales como polidiacetileno; poliazulenos tales como poliazuleno; polipirenos tales como polipireno; policarbazoles tales como policarbazol y poli(carbazol N-sustituido), poliselenofenos tales como poliselenofeno; polifuranos tales como polifurano y polibenzofurano; poli(p-fenilenos) tales como poli(p-fenileno); poliindoles tales como poliindol; polipiridazinas tales como polipiridazina; poliácenos tales como naftaceno, pentaceno, hexaceno, heptaceno, dibenzopentaceno, tetrabenzopentaceno, pireno, dibenzopireno, criseno, perileno, coroneno, terileno, ovaleno, cuarterileno y circumantraceno; derivados (tales como trifenodioxazina, trifenoditiazina, hexaceno-6,15-quinona) que se preparan sustituyendo algunos de los átomos de carbono de poliácenos por átomos tales como N, S y O, o un grupo funcional tal como un grupo carbonilo; polímeros tales como polivinilcarbazoles, poli(sulfuro de fenileno) y poli(sulfuro de vinileno). En una realización particular, polímeros conductores son polipirrol, politiofeno, polianilina o sus derivados.

Tal como se conoce en la técnica, el polímero conductor puede doparse incorporando en el polímero, materiales que tienen un grupo funcional tal como un grupo dimetilamino, un grupo ciano, un grupo carboxilo y un grupo nitro, materiales tales como derivados de benzoquinona y tetracianoetileno así como tetracianoquinodimetano, y derivados del mismo, que actúan como aceptor que acepta electrones, o, por ejemplo, materiales que tienen un grupo funcional tal como un grupo amino, un grupo alquilo, un grupo hidroxilo, un grupo alcoxilo y un grupo fenilo; aminas sustituidas tales como fenilendiamina; antraceno, benzoantraceno, benzoantracenos sustituidos, pireno, pireno sustituido, carbazol y derivados del mismo y tetratriafulvaleno y derivados de mismo, que actúan como donador que es un donador de electrones. El término "dopado", tal como se usa en el presente documento, significa que se incorporan moléculas que aceptan electrones (aceptores) o moléculas que donan electrones (donadores) en la cadena del polímero. Cuando el agente de dopado es un grupo sustituyente para el monómero usado para sintetizar el polímero, el se usa término polímero de autodopado. En otros casos, el agente de dopado es externo y se incluye después de la síntesis en la cadena del polímero (habitualmente como película), tal como vapor de yodo. En la presente invención, pueden emplearse tanto aceptores como donadores como agentes de dopado.

El término "coloide de metal", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un coloide en el que las nanopartículas microscópicas en suspensión son nanopartículas de metal. El término "metal noble" se refiere a metales del grupo VIII de la tabla periódica incluyendo, pero sin limitarse a: platino, iridio, paladio y similares, así como oro, plata, etc.

El término "coloide de material compuesto de polímero conductor/metal", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un coloide que se compone de nanopartículas de metal que tienen un polímero conductor presente en una superficie de las mismas. En realizaciones particulares, las nanopartículas usadas en el contexto de la presente invención comprenden uno o más metales seleccionados de Sc, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Y, Zr, Nb, Mo, Tc, Ru, Rh, Pd, Ag, Cd, La, Hf, Ta, W, Re, Os, Ir, Pt, Au y/o Ac. Un experto en la técnica apreciará que los metales de transición descritos anteriormente pueden adoptar cada uno diferentes estados de oxidación, todos los cuales son útiles en la presente invención. En algunos casos, se forma el estado de oxidación más estable, pero otros estados de oxidación son útiles en la presente invención. Además, los metales de transición de la presente invención pueden ser óxidos de metal. En una realización, la invención se refiere a un método, en el que dichas nanopartículas comprenden un metal de transición seleccionado del grupo que comprende Au, Ag, Cu, Ta, Pt, Pd y Rh y preferiblemente en el que dicho metal de transición es oro, plata o cobre.

Tal como se detalló anteriormente en realizaciones particulares, los métodos de recubrimiento según la invención se basan en interacciones electrostáticas entre los agentes de unión, más particularmente las moléculas de proteína, y las nanopartículas. Sin embargo, para determinadas aplicaciones pueden requerirse conjugados de proteína-nanopartícula más estables. Tales conjugados estables pueden obtenerse mediante acoplamiento covalente entre moléculas de proteína y las nanopartículas. Con el fin de garantizar tal acoplamiento covalente, la superficie de las nanopartículas se dota habitualmente de grupos funcionales, tales como por ejemplo grupos carboxilo o amina o péptidos, o azidas o alquenos, etc. En un protocolo típico para la unión covalente según la técnica anterior, una primera etapa en el acoplamiento covalente es la activación de los grupos funcionales, por ejemplo grupos carboxilo, en las nanopartículas, haciendo de ese modo que sean reactivas frente a la pareja de unión, por ejemplo una proteína. Entonces se añade la pareja de unión. Normalmente, es necesario un exceso de la pareja de unión para lograr la cobertura completa del nanomaterial con la pareja de unión. Después de completarse la reacción de acoplamiento, se retira el exceso de pareja de unión mediante purificación.

Sin embargo, según realizaciones particulares de la presente invención se proporcionan métodos de recubrimiento optimizados que implican la unión covalente de proteínas a nanopartículas. En efecto, en realizaciones particulares, el método de recubrimiento según la presente invención garantiza la formación de una monocapa de proteína alrededor de las nanopartículas, proporcionando de ese modo un estrecho contacto entre la proteína y cualquier grupo funcional (activado) en las nanopartículas, concentrando por tanto la proteína en la superficie de la nanopartícula y acelerando la formación del enlace covalente. A diferencia de los métodos para la unión covalente conocidos en la técnica está el hecho de que con el método según la presente invención, se requiere un pequeño exceso o ninguno de la proteína.

Por consiguiente, en realizaciones particulares, la superficie de las nanopartículas se funcionaliza con uno o más grupos funcionales. El experto conoce bien métodos para la funcionalización de nanopartículas, y pueden implicar por ejemplo la unión de ligandos a la superficie de la nanopartícula, en los que dichos ligandos comprenden al menos un agente enlazante que tienen una primera parte enlazada a la nanopartícula y una segunda parte que es un grupo funcional que puede enlazarse a una molécula de afinidad, por ejemplo una proteína. En realizaciones particulares, la superficie de las nanopartículas se funcionaliza con uno o más grupos funcionales seleccionados del grupo que consiste en un carboxilo, una amina, polietilenglicol, un péptido, ADN y ARN. Los grupos carboxilo son especialmente útiles para la unión a proteínas, porque el grupo carboxilo puede reaccionar con un resto de amina de una proteína, formándose de ese modo un enlace amida. Por consiguiente, en realizaciones específicas, los grupos funcionales comprenden grupos carboxilo. En realizaciones particulares, los grupos funcionales se activan antes de o tras poner en contacto las nanopartículas con una disolución que comprende la proteína. El experto conoce bien la activación de grupos funcionales. Si el grupo funcional es un carboxilo, el carboxilo puede activarse usando uno o más grupos de activación de carboxilo. Los ejemplos de grupos de activación de carboxilo útiles incluyen, pero no se limitan a, reactivos de carbodiimida, reactivos de fosfonio tales como hexafluorofosfato de benzotriazoliloxi-tris-(dimetilamino)fosfonio (BOP) y similares, reactivos de uronio o carbonio tales como hexafluorofosfato de O-(benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (HBTU), N-hidroxi-succinimida (NHS), hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitripirrolidinofosfonio (Py-BOP) y similares; 1-etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinolina (EEDQ); yoduro de 1-metil-2-cloropiridinio (reactivo de Mukaiyama) y similares.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a una composición de nanopartículas que comprende nanopartículas que pueden obtenerse mediante uno o más de los métodos de la presente invención.

En efecto, en realizaciones particulares, los métodos de la presente invención proporcionan un modo único de obtener nanopartículas que se recubren con una única capa de proteína. El grosor de capa de proteína puede determinarse midiendo el diámetro hidrodinámico de las partículas a través de mediciones de dispersión dinámica de luz (DLS). Un aumento del diámetro hidrodinámico es equivalente a un aumento del grosor de capa de proteína. Nanopartículas recubiertas con una única capa de proteína proporcionan varias ventajas. Se mejora el recubrimiento de nanopartículas de proteína recubiertas con otro compuesto, porque se reduce la distancia de este compuesto a la superficie de la nanopartícula. Además, si va a estudiarse la interacción entre la proteína recubierta y otro compuesto, se reduce la distancia a la superficie de la nanopartícula, mejorando de ese modo la detección óptica de las interacciones proteicas mediante RPSL. Según realizaciones particulares, la invención proporciona composiciones de nanopartículas que comprenden nanopartículas recubiertas con una o más proteínas, en las que la una o más proteínas se recubren como una única capa sobre la nanopartícula.

En un aspecto adicional, la invención proporciona kits que comprenden nanopartículas y el uso de los mismos, comprendiendo además dichos kits componentes y/o instrucciones para el recubrimiento de las nanopartículas con proteína según uno o más de los métodos de la presente invención. En realizaciones particulares, los kits según la presente invención comprenden nanopartículas en disolución, en los que dicha disolución comprende un detergente no iónico, catiónico y/o zwitteriónico. Adicional o alternativamente, los kits según la presente invención comprenden nanopartículas y un detergente no iónico, catiónico y/o zwitteriónico independiente o una disolución independiente que comprende un detergente no iónico, catiónico y/o zwitteriónico. En realizaciones particulares, los kits comprenden instrucciones para recubrir las nanopartículas según los métodos de la presente invención.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere al uso de las nanopartículas recubiertas obtenidas según la presente invención en diferentes aplicaciones. En efecto, las nanopartículas obtenidas mediante los métodos de

recubrimiento de la presente invención pueden usarse en todas las aplicaciones de la técnica anterior conocidas que implican nanopartículas recubiertas con proteína, incluyendo, pero sin limitarse a la administración de fármacos, terapia, diagnóstico, métodos de detección de analitos, métodos de direccionamiento, etc.

5 Además se ha hallado que las nanopartículas obtenidas mediante realizaciones particulares de los métodos de la presente invención tienen ventajas particulares en aplicaciones específicas. En efecto se observa que para la detección óptica de interacciones de una primera proteína con un segundo compuesto (incluyendo una segunda proteína) usando nanopartículas, es de interés que la interacción se produzca lo más cerca posible de la superficie de la nanopartícula. Por tanto, el recubrimiento de la primera proteína en una única capa sobre la superficie de la nanopartícula garantiza una detección óptima de la interacción de dicha proteína con otro compuesto o proteína. En realizaciones particulares, las nanopartículas recubiertas de la presente invención se usan en métodos de detección de analitos. En realizaciones particulares, los métodos de recubrimiento son métodos ópticos de detección, más particularmente métodos que implican la detección de la dispersión de luz por la nanopartícula. En realizaciones particulares adicionales, las nanopartículas que pueden obtenerse u obtenidas mediante los métodos de la presente invención se usan en métodos de detección por RPSL.

15 Los métodos de detección por RPSL se usan normalmente en el contexto de la medición de interacciones entre un primer y un segundo compuestos, en el contexto de la determinación de propiedades específicas de uno o los dos compuestos o propiedades específicas de la interacción entre ambos compuestos. En los métodos de la presente invención, el primer compuesto, que se une a la nanopartícula es una proteína. En realizaciones particulares, los compuesto primero y segundo son un miembro de un par de unión específico conocido o previsto. Por tanto, el segundo compuesto (o posible ligando relacionado) se refiere a un compuesto que puede interactuar posiblemente con el primer compuesto acoplado a la nanopartícula. Normalmente, los compuestos primero y segundo son ambos restos de detección que son miembros del par de unión tal como antígeno-anticuerpo, receptor-ligando, enzima-ligando, azúcar-lectina, receptor-agente de unión al receptor, y otros. En estas realizaciones, los métodos de detección por RPSL pueden servir para detectar la interacción entre los dos miembros del par de unión.

25 La presente invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos no limitativos.

### Ejemplos

Ejemplo 1: Puesta en contacto de nanopartículas con un detergente no iónico tras el recubrimiento de las nanopartículas con proteína G

30 En primer lugar, va a determinarse la cantidad de proteína G necesaria para estabilizar un determinado volumen de nanopartículas de oro (GNP) en ausencia de cualquier detergente no iónico, catiónico y/o zwitteriónico mediante una valoración de la concentración. Una disolución preparada de GNP de 30 nm de diámetro con una DO de 4 a la longitud de onda máxima contiene  $6 \times 10^{11}$  GNP/ml. Se mezclan las GNP con diferentes cantidades de proteína en un intervalo típico de 0 a 100  $\mu\text{g}$  de proteína por ml de GNP. Después de un tiempo de incubación de 10 min, se añade NaCl (1 M en  $\text{H}_2\text{O}$ ) y después de 10 min más, se registran los espectros de absorción de estas muestras entre 350 y 900 nm. Para identificar la menor cantidad de proteína necesaria para estabilizar las nanopartículas, se realizan tres gráficos; se representan gráficamente  $\lambda_{\text{máx}}$ ,  $\text{DO}(\lambda_{\text{máx}})$  y la razón  $\text{DO}(600)/\text{DO}(\lambda_{\text{máx}})$  frente a la cantidad de proteína por ml de GNP. La menor concentración de proteína, donde los tres gráficos muestran la mayor similitud con el blanco es la cantidad mínima de proteína necesaria para estabilizar las nanopartículas. Particularmente, la razón  $\text{DO}(600)/\text{DO}(\lambda_{\text{máx}})$  debe ser lo más pequeña posible. Puede esperarse un pequeño desplazamiento de  $\lambda_{\text{máx}}$  a mayores longitudes de onda y, de ese modo, un pequeño aumento de  $\text{DO}(600)/\text{DO}(\lambda_{\text{máx}})$  después del recubrimiento con proteína. Principalmente, la  $\text{DO}(\lambda_{\text{máx}})$  también aumenta o disminuye un poco. Mediante la valoración de la concentración, se determinó que una cantidad de proteína de 25  $\mu\text{g}$  de proteína G por ml de GNP era la menor cantidad que estabiliza las nanopartículas (figura 1).

45 Después de determinar la cantidad mínima de proteína necesaria para estabilizar las nanopartículas en ausencia de cualquier detergente no iónico, catiónico y/o zwitteriónico, se realiza una valoración de la concentración en presencia de un detergente no iónico, catiónico y/o zwitteriónico. En los presentes ejemplos, se usa el detergente no iónico Tween 20 a una concentración final del 0,05%. La mayor cantidad de proteína sometida a prueba en la valoración con Tween 20 es la menor cantidad de proteína que estabiliza las nanopartículas en ausencia de cualquier detergente no iónico, catiónico y/o zwitteriónico. Se realiza la valoración de manera similar a la valoración de la concentración en ausencia de cualquier detergente no iónico, catiónico y/o zwitteriónico excepto en que se mezcla la proteína con una cantidad fija de Tween 20 antes de la adición de GNP. Se registran los espectros de absorción de estas muestras y de nuevo se realizan los siguientes tres gráficos; se representan gráficamente  $\lambda_{\text{máx}}$ ,  $\text{DO}(\lambda_{\text{máx}})$  y la razón  $\text{DO}(600)/\text{DO}(\lambda_{\text{máx}})$  frente a la cantidad de proteína por ml de GNP.

55 Debido a Tween 20, todas las muestras son estables después de la adición de NaCl (1 M en  $\text{H}_2\text{O}$ ). Puede monitorizarse la unión de la proteína en la superficie de la nanopartícula mediante el desarrollo de  $\lambda_{\text{máx}}$  con una cantidad creciente de proteína por ml de GNP. Cuanta más proteína se une a la superficie de las nanopartículas, más se desplaza  $\lambda_{\text{máx}}$  a mayores longitudes de onda. Este desarrollo también tiene un efecto sobre el gráfico de  $\text{DO}(600)/\text{DO}(\lambda_{\text{máx}})$ . Con  $\lambda_{\text{máx}}$  creciente, la razón  $\text{DO}(600)/\text{DO}(\lambda_{\text{máx}})$  también aumenta ligeramente.

En la figura 2, se muestran los resultados de la valoración de la concentración en presencia de Tween 20. Además de los espectros de absorción (figuras 2A, 2B, 2C), se realizaron mediciones de dispersión dinámica de luz (DLS) para cada muestra (figura 2D). Una cantidad de 12,5 a 15  $\mu\text{g}$  de proteína G por ml de GNP es suficiente para cubrir las nanopartículas con aproximadamente una capa de proteína G (figura 2, indicado mediante las flechas). Pueden identificarse claramente dos mesetas correspondientes respectivamente a una primera y una segunda capas de proteína sobre las nanopartículas (figura 2D). El uso de 12,5  $\mu\text{g}$  de proteína G por ml de GNP, que es necesario para estabilizar las nanopartículas en presencia de Tween 20, da como resultado nanopartículas con un grosor de capa de proteína de 5 nm. El uso de 25  $\mu\text{g}$  de proteína G por ml de GNP, que es necesario para obtener nanopartículas estables en ausencia de cualquier detergente no iónico, catiónico y/o zwitteriónico, da como resultado nanopartículas con un grosor de capa de 12,5 nm, que es más del doble de grande (figura 2D). El uso de Tween 20 en el procedimiento de recubrimiento permite por tanto producir GNP recubiertas con proteína G estables con solo una capa de proteína sobre la superficie de la nanopartícula. De ese modo, se divide a la mitad la cantidad necesaria de proteína G por ml de GNP y si se pretende un recubrimiento adicional de las nanopartículas con otra molécula, se reduce la distancia de esta molécula a la superficie de la nanopartícula.

La comparación del desarrollo de  $\lambda_{\text{máx}}$  (figura 2A) y el diámetro hidrodinámico (figura 2D) de las nanopartículas con una cantidad creciente de proteína muestra que el desarrollo del grosor de capa de proteína con una cantidad creciente de proteína también puede deducirse a partir del gráfico de  $\lambda_{\text{máx}}$  frente a la cantidad de proteína por ml de GNP. Un aumento del diámetro hidrodinámico, que es equivalente a un aumento del grosor de capa de proteína, da como resultado un ligero desplazamiento al rojo de  $\lambda_{\text{máx}}$ . Dado que las mediciones de DLS llevan mucho tiempo, la oportunidad de usar solo los espectros de absorción para obtener información sobre el grosor de capa de proteína reduce significativamente el tiempo necesario para determinar la cantidad óptima de proteína para el recubrimiento.

Ejemplo 2: Poner en contacto nanopartículas con un detergente no iónico tras el recubrimiento de las nanopartículas con estreptavidina

Mediante la valoración de la concentración, se determinó que una cantidad de proteína de 25  $\mu\text{g}$  de estreptavidina por ml de GNP era la menor cantidad que todavía estabiliza las nanopartículas en ausencia de cualquier detergente no iónico, catiónico y/o zwitteriónico (figura 3). En la figura 4, se muestran los resultados de la valoración de la concentración adyacente de estreptavidina en presencia de Tween 20. Es necesaria una cantidad de 12,5  $\mu\text{g}$  de estreptavidina por ml de GNP para cubrir las nanopartículas con aproximadamente una capa de estreptavidina (figura 4). El uso de 25  $\mu\text{g}$  de estreptavidina por ml de GNP, que es necesario para obtener nanopartículas estables en ausencia de cualquier detergente no iónico, catiónico y/o zwitteriónico, da como resultado nanopartículas con un grosor de capa que es el doble de grande (figura 4D). Las mediciones de DLS presentadas en la figura 4D muestran claramente el desarrollo de dos capas de proteína posteriores que confirman los datos espectroscópicos presentados en las figuras 4A, 4B y 4C. Por tanto, el método de la presente invención divide a la mitad la cantidad necesaria de estreptavidina por ml de GNP.

Ejemplo 3: Puesta en contacto de nanopartículas con un detergente no iónico antes del recubrimiento de las nanopartículas con proteína G

El ejemplo 3 es similar al ejemplo 1 excepto en que se añade Tween 20 a las nanopartículas antes de añadirse la proteína.

En primer lugar, va a determinarse la cantidad mínima de proteína que es necesaria para recubrir un determinado volumen de GNP en ausencia de cualquier detergente no iónico, catiónico y/o zwitteriónico. Tal como se ha descrito ya en el ejemplo 1, se determinó que una cantidad de proteína de 25  $\mu\text{g}$  de proteína G por ml de GNP era la menor cantidad que todavía estabiliza las nanopartículas en ausencia de Tween 20 (figura 1).

Luego se realiza una valoración de la concentración con GNP recubiertas con Tween 20. La mayor cantidad de proteína sometida en esta valoración es de nuevo la menor cantidad de proteína que estabiliza las nanopartículas en ausencia de Tween 20. A diferencia del ejemplo 1, se recubren las GNP con Tween 20 antes de iniciarse la valoración. Se realiza la valoración de manera similar a la valoración de la concentración en ausencia de cualquier detergente no iónico, catiónico y/o zwitteriónico excepto en que se usan nanopartículas estabilizadas con Tween 20 en lugar de GNP recubiertas con citrato. El uso de nanopartículas estabilizadas con Tween 20 permite el reemplazo progresivo del detergente no iónico por la proteína. Esto es ventajoso cuando la proteína que va a recubrirse es un péptido pequeño o está tamponada. Se registraron los espectros de absorción de estas muestras y, en la figura 5, se muestran los resultados de la valoración de la concentración con GNP recubiertas con Tween 20. Es necesaria una cantidad de 7,5 a 15  $\mu\text{g}$  de proteína G por ml de GNP para cubrir las nanopartículas con aproximadamente una capa de proteína G (figura 5). En comparación con los 25  $\mu\text{g}$  de proteína G por ml de GNP que son necesarios para sintetizar GNP recubiertas con proteína G estables en ausencia de Tween 20, esto es de nuevo una reducción significativa de la cantidad de proteína por nanopartícula. Este resultado es comparable al resultado obtenido en el ejemplo 1, considerando que se usó otro lote de coloide para esta valoración.

Ejemplo 4: Puesta en contacto nanopartículas con un detergente no iónico antes del recubrimiento de las nanopartículas con proteína A

En la figura 6, se muestran los resultados de una valoración con proteína A de la concentración de GNP recubiertas con Tween 20. Es necesaria una cantidad de 5 a 7,5  $\mu\text{g}$  de proteína A por ml de GNP para cubrir las nanopartículas con aproximadamente una capa de proteína A.

**REIVINDICACIONES**

1. Método para recubrir nanopartículas coloidales con una única capa de un agente de unión, en el que el método comprende las etapas de:
  - 5 - determinar mediante la valoración de la concentración, antes del recubrimiento de dichas nanopartículas, la cantidad mínima de agentes de unión requerida para obtener una suspensión coloidal estable de nanopartículas recubiertas con una única capa de agentes de unión, en el que dicha determinación de la cantidad mínima de agentes de unión se realiza en presencia de un detergente no iónico, catiónico y/o zwitteriónico; y
  - 10 - mezclar una disolución que comprende las nanopartículas con una disolución que comprende dichos agentes de unión, en el que dicha disolución que comprende las nanopartículas y/o dicha disolución que comprende el agente de unión comprenden un detergente no iónico, catiónico y/o zwitteriónico en el que la concentración de dicho detergente no iónico, catiónico y/o zwitteriónico oscila entre el 0,0001 y el 1% volumen/volumen.
- 15 2. Método según la reivindicación 1, en el que dicho detergente no iónico se selecciona del grupo que comprende polisorbatos, etoxilatos de octilfenol, glucaminas, Lubrol, Brij®, Nonidet®, Pluronic®, Genapol® e Igepal®.
3. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que dicho detergente catiónico se selecciona de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) o bromuro de trimetil(tetradecil)amonio (TTAB).
- 20 4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho detergente zwitteriónico se selecciona del grupo que comprende amidosulfobetainas, alquilbetainas y propanosulfonatos de amonio.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dichas nanopartículas comprenden un coloide de polímero conductor, un coloide de metal noble o un coloide de material compuesto de polímero conductor/metal.
- 25 6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dichas nanopartículas comprenden un metal de transición seleccionado del grupo que comprende Au, Ag, Cu, Ta, Pt, Pd y Rh.
7. Método según la reivindicación 6, en el que dicho metal de transición es oro, plata o cobre.
8. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende además activar un grupo funcional sobre la superficie de dicha nanopartícula, de modo que se garantice la unión covalente de dichos agentes de unión en dicha superficie.
- 30 9. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dichos agentes de unión son una proteína.
10. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, en el que dicho método es un método para la detección por resonancia de plasmones de superficie localizados (RPSL) de la interacción de un compuesto con un agente de unión unido a dicha nanopartícula, que comprende además la etapa de medir la interacción entre dicho agente de unión y dicho compuesto mediante un método de detección por RPSL.
- 35 11. Uso de un kit en un método para recubrir nanopartículas con una única capa de un agente de unión para obtener nanopartículas estables en forma coloidal, en el que dicho kit comprende:
  - 40 - nanopartículas no recubiertas;
  - un detergente no iónico, catiónico y/o zwitteriónico, o una disolución que comprende un detergente no iónico, catiónico y/o zwitteriónico; e
  - instrucciones para recubrir dichas nanopartículas con un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
- 45 12. Uso según la reivindicación 11, en el que dichas nanopartículas comprenden un metal de transición seleccionado del grupo que comprende Au, Ag, Cu, Ta, Pt, Pd y Rh.

FIG 1A

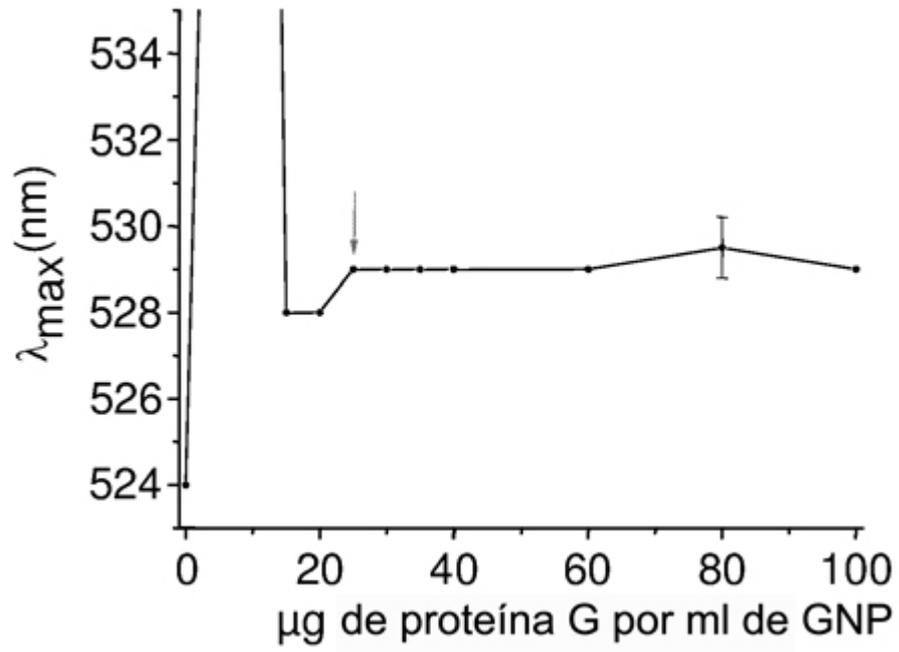


FIG 1B

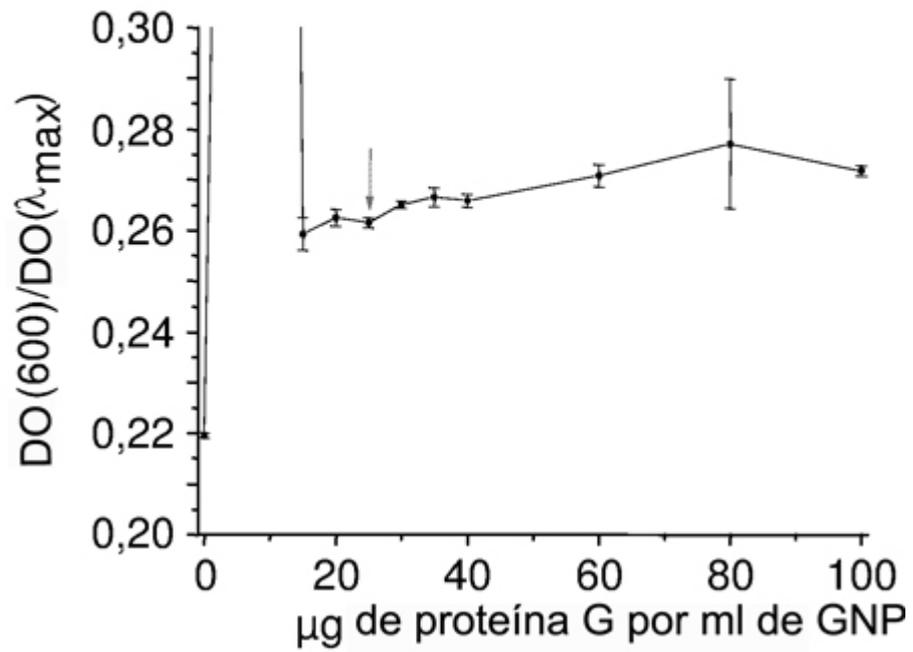


FIG 1C

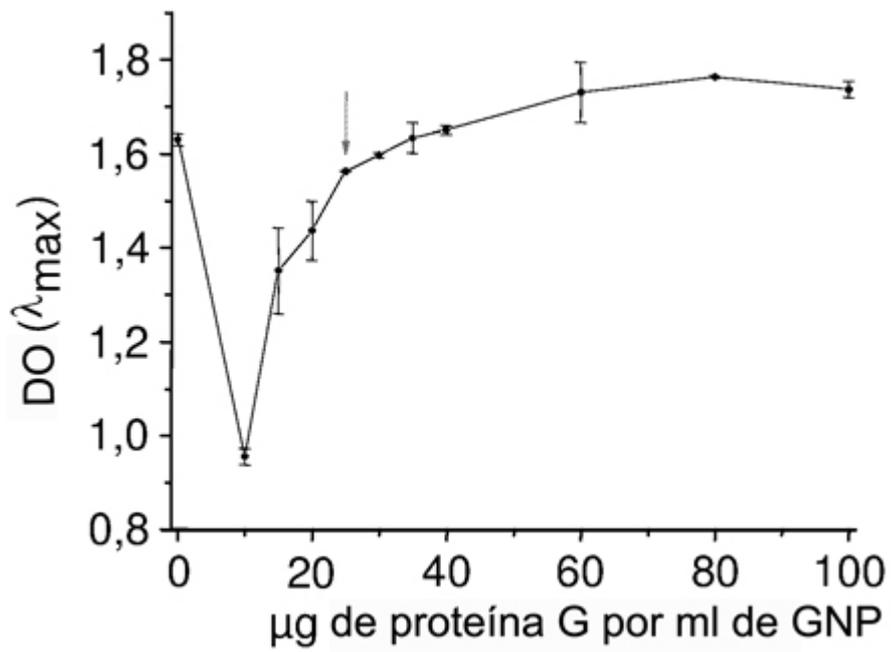


FIG 2A

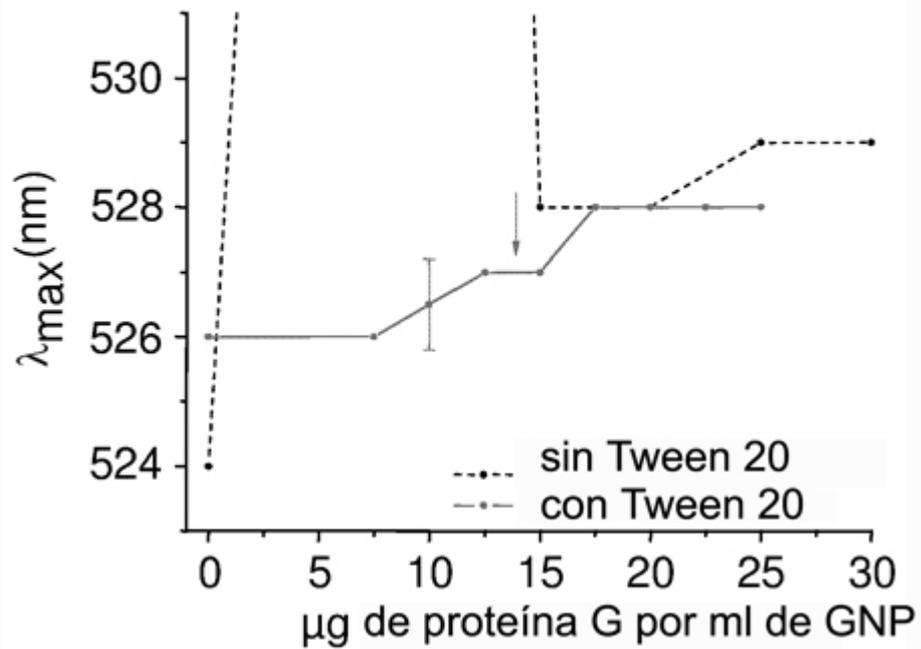


FIG 2B

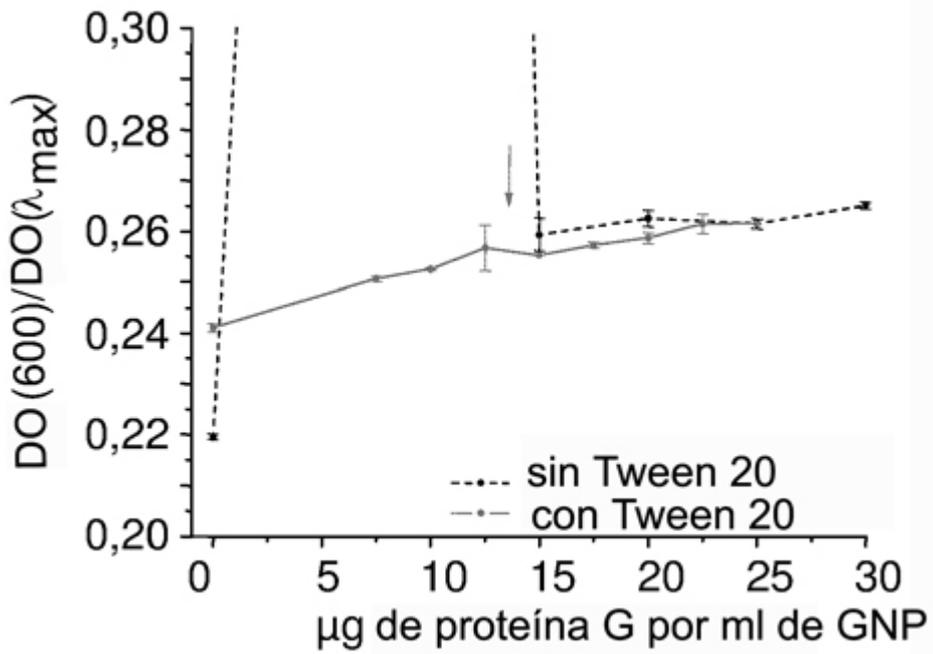


FIG 2C

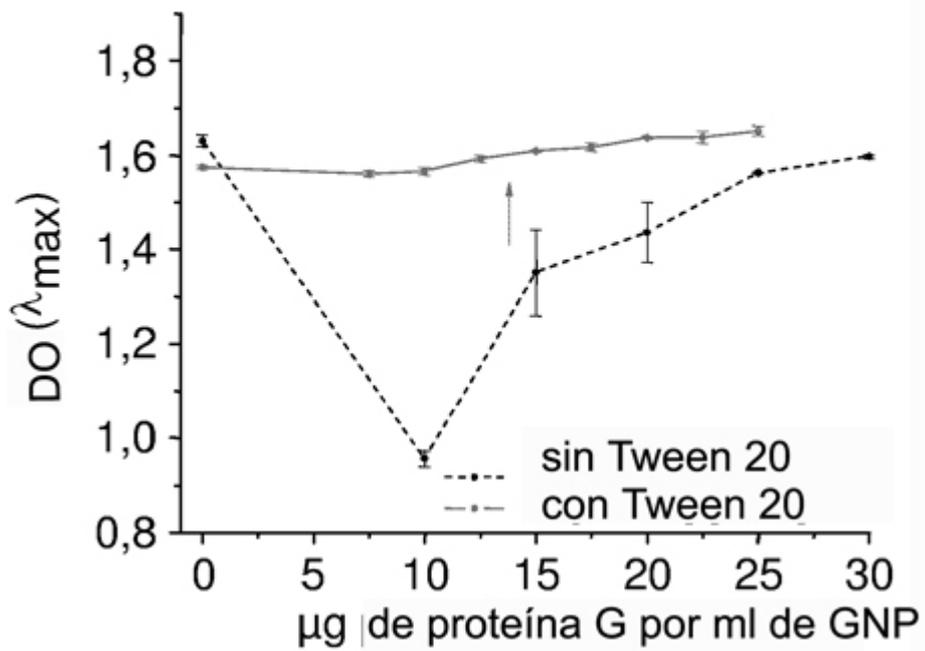


FIG 2D

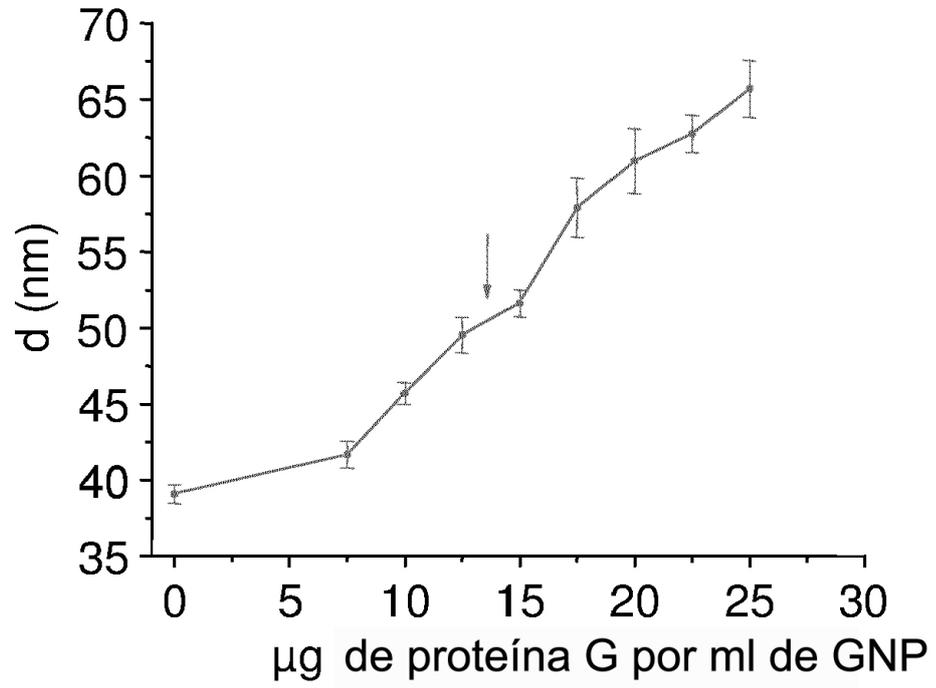


FIG 3A

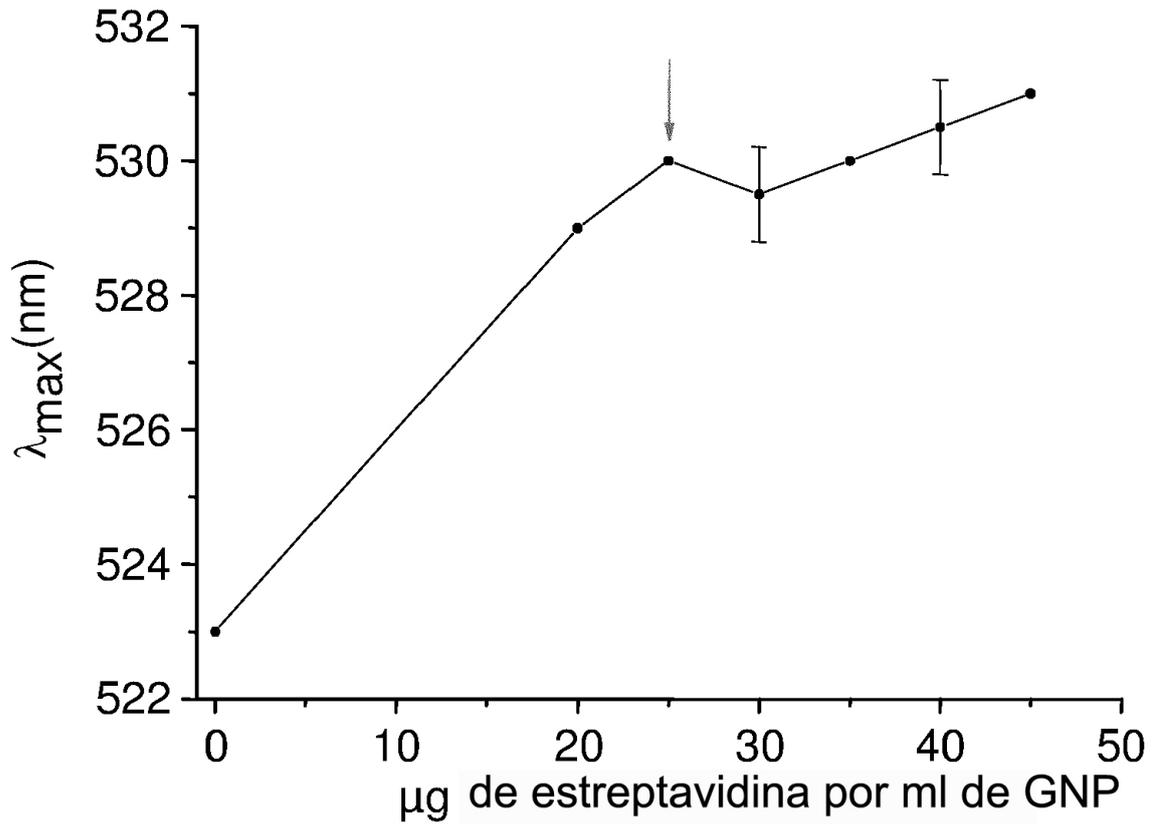


FIG 3B

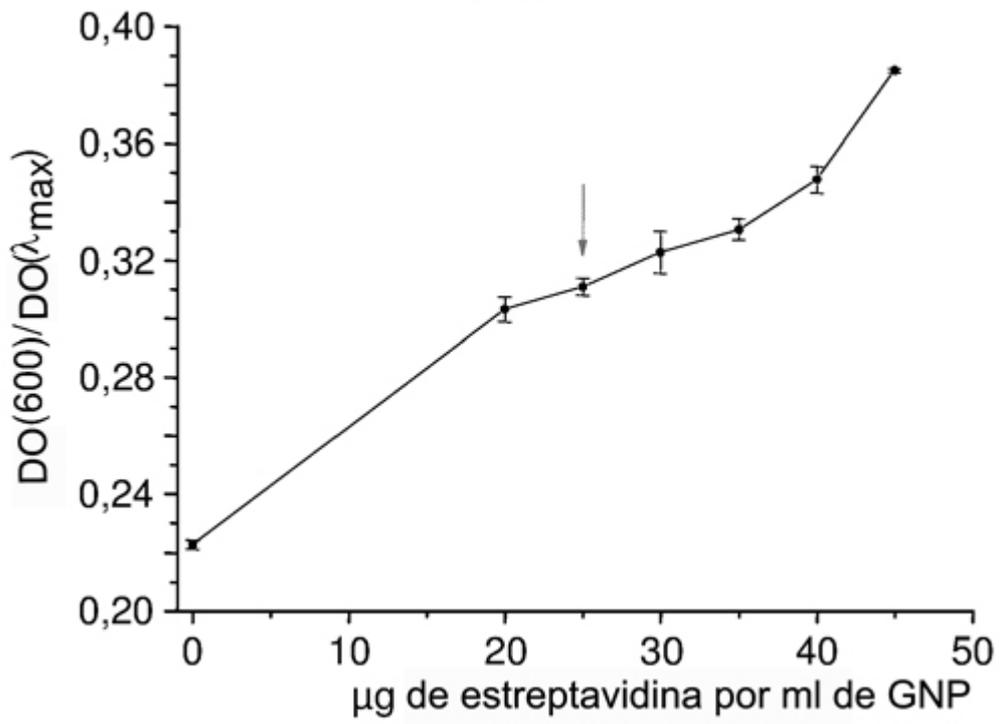


FIG 3C

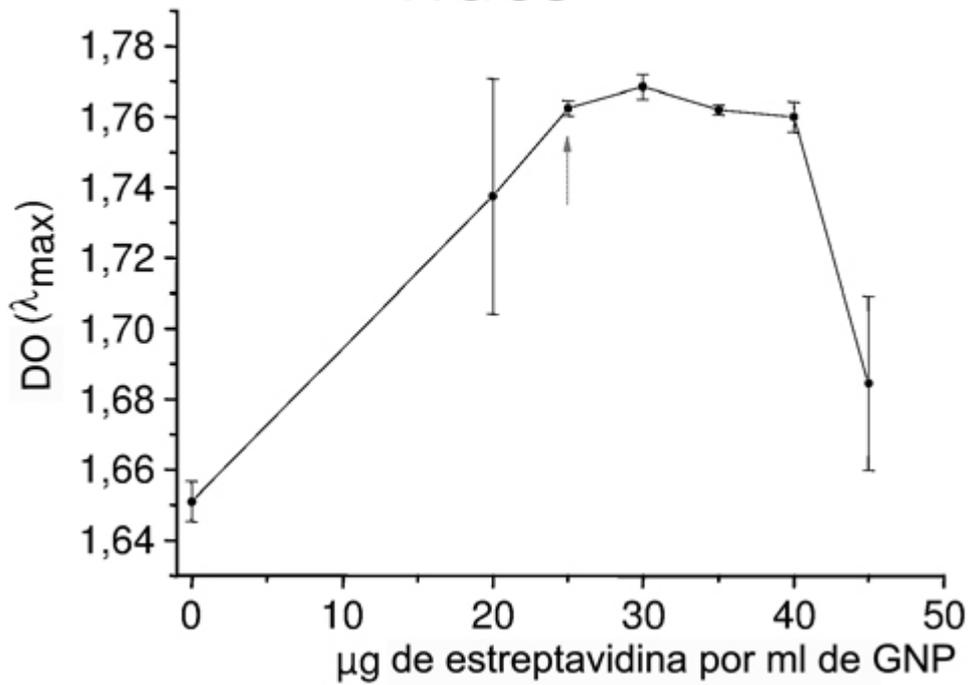


FIG 4A

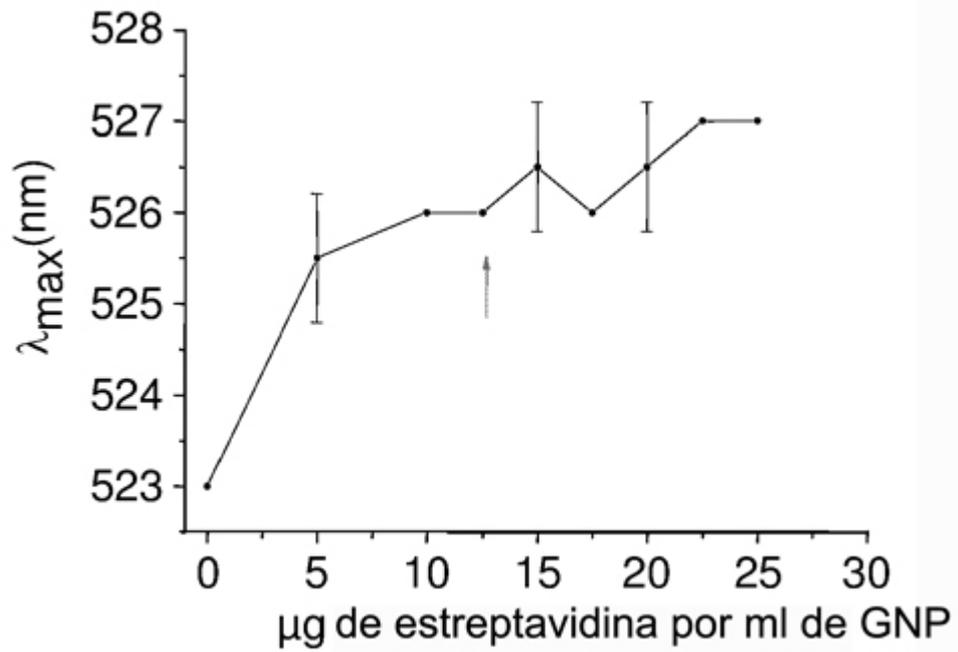


FIG 4B

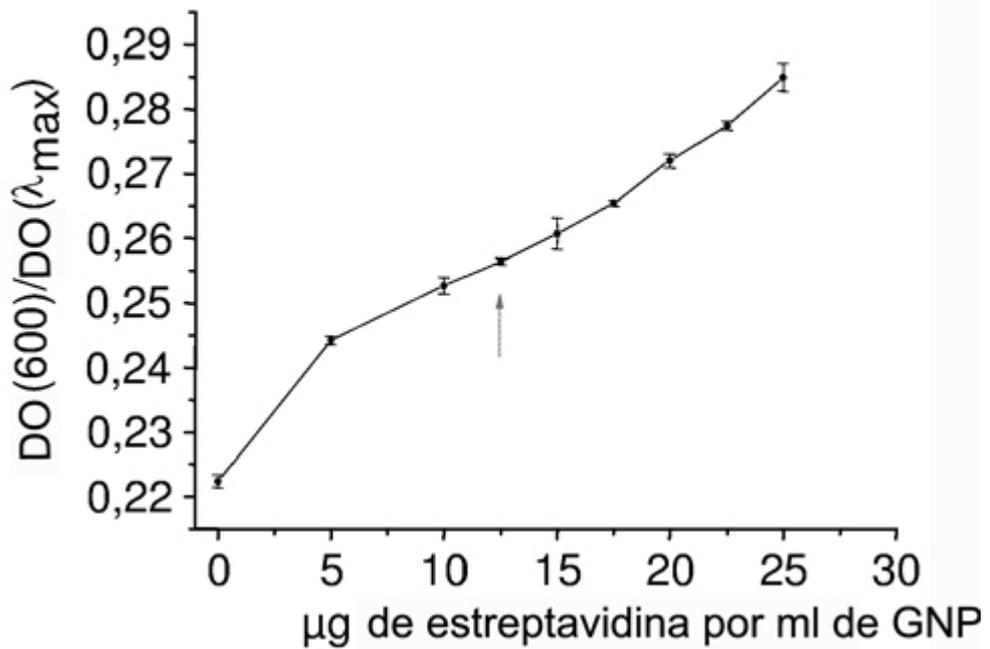


FIG 4C

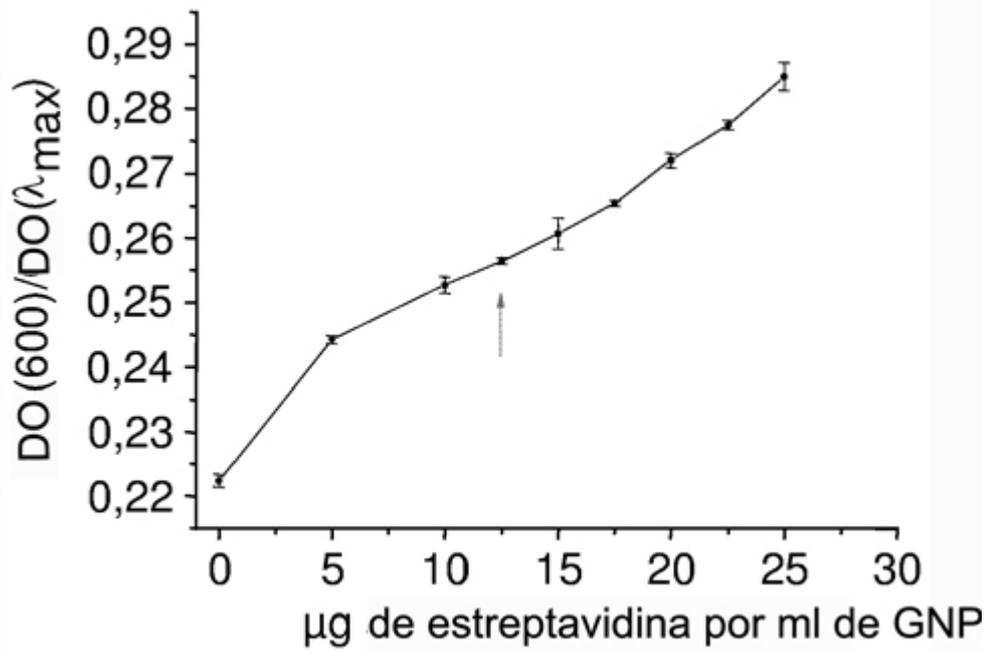


FIG 4D

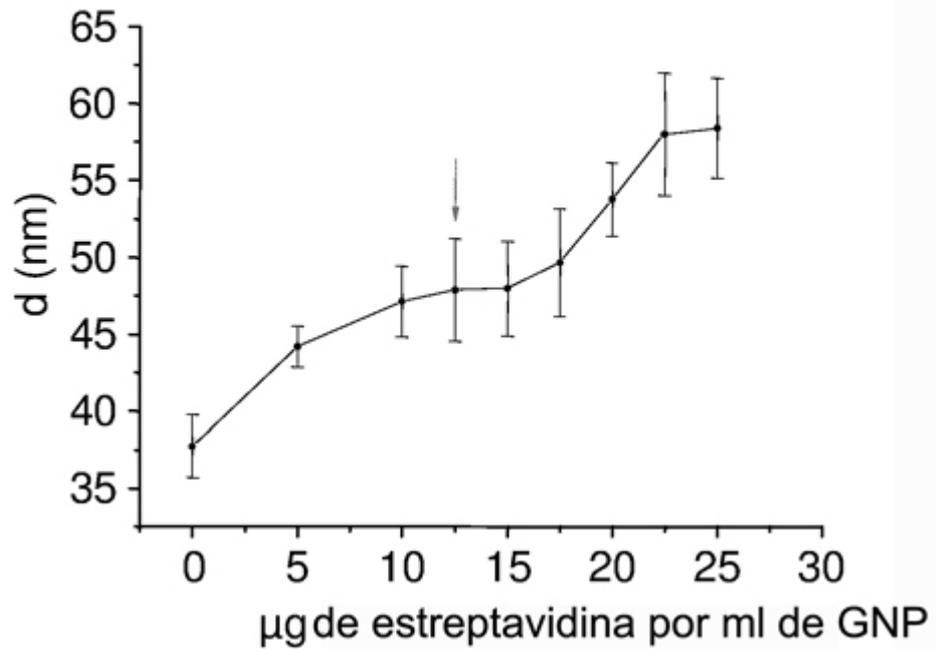


FIG 5A

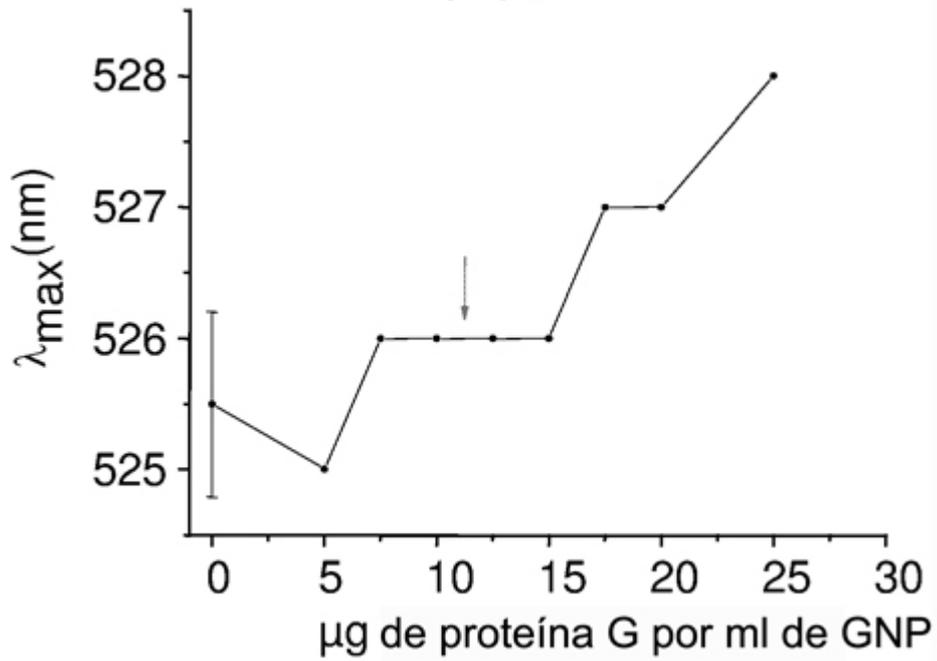


FIG 5B

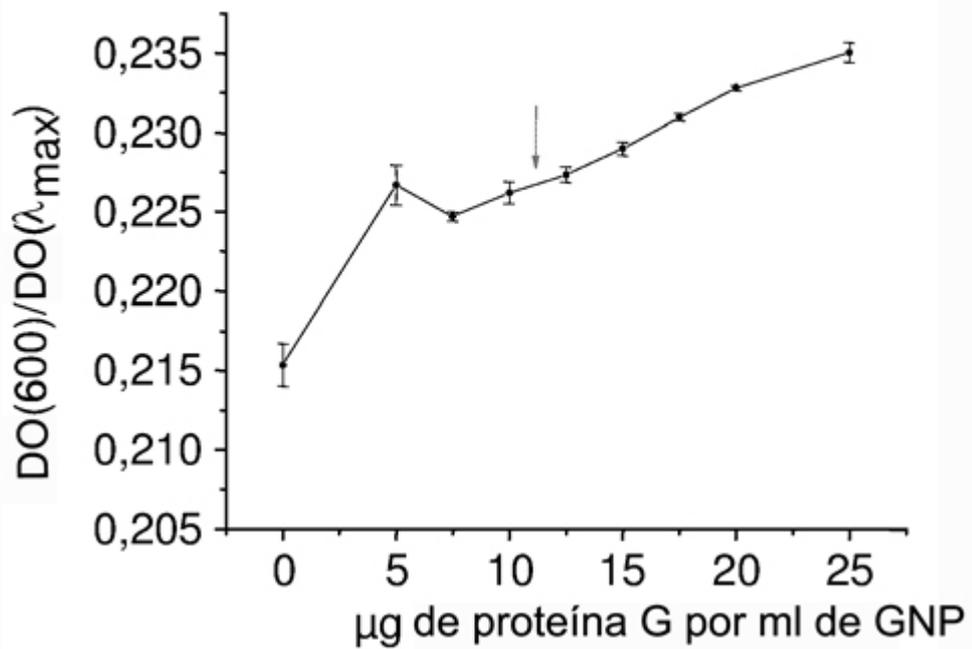


FIG 5C

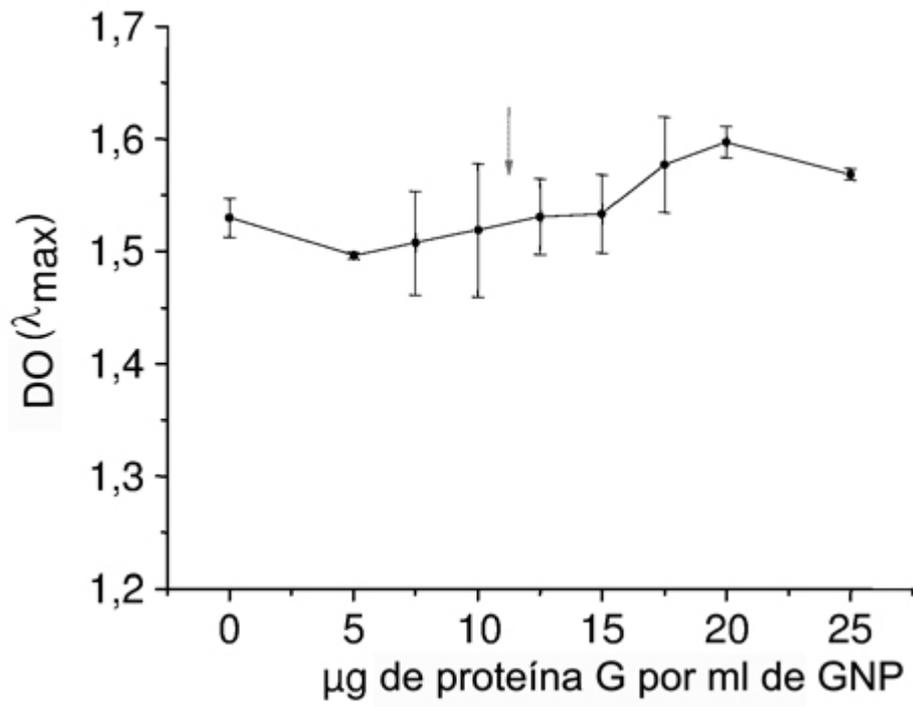


FIG 6A

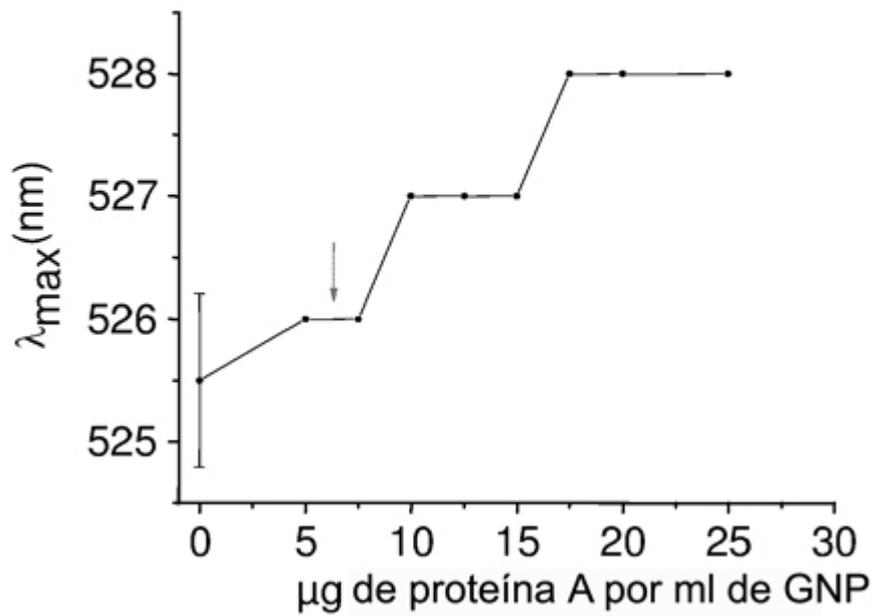


FIG 6B

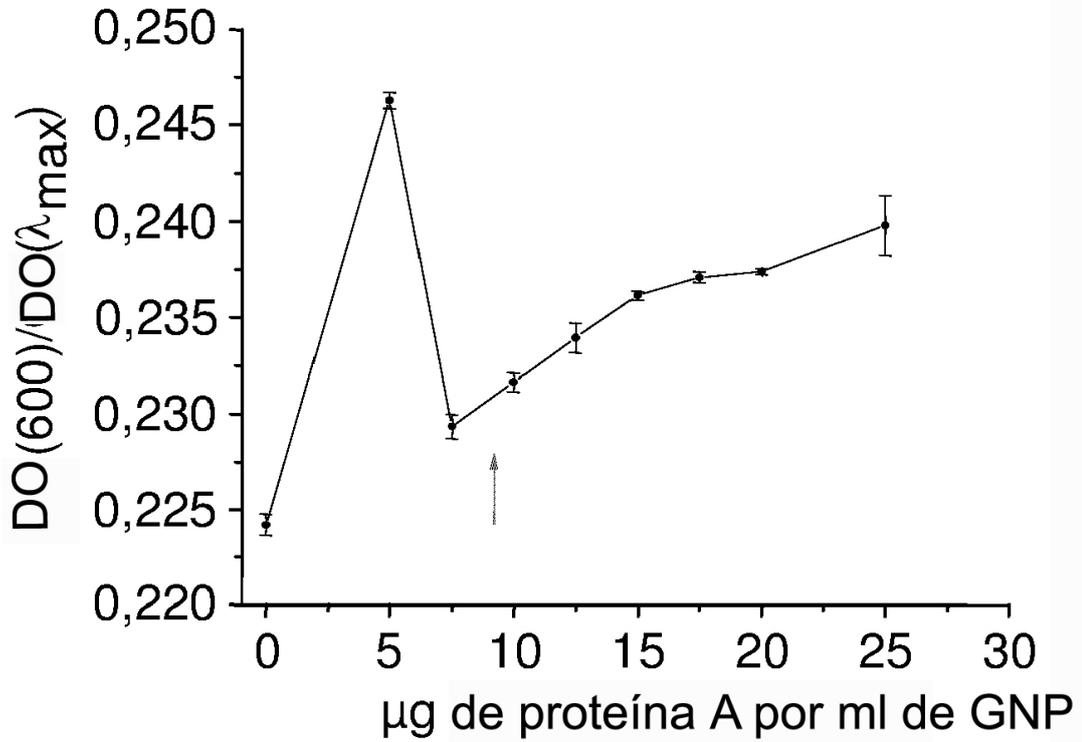


FIG 6C

