

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 797 257**

51 Int. Cl.:

A61K 9/127 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.08.2017 PCT/EP2017/071043**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.02.2018 WO18033647**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.08.2017 E 17755497 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.03.2020 EP 3463303**

54 Título: **Partículas de lipoproteína saposina y bibliotecas procedentes de membranas en bruto**

30 Prioridad:

19.08.2016 EP 16184843

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

01.12.2020

73 Titular/es:

**SALIPRO BIOTECH AB (100.0%)
Greenhouse Labs Teknikringen 38A
114 28 Stockholm, SE**

72 Inventor/es:

**FRAUENFELD, JENS y
LÖVING, ROBIN**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 797 257 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 de lipoproteína saposina y bibliotecas procedentes de membranas en bruto

- 5 La invención se refiere a procesos para preparar una biblioteca de partículas de lipoproteína de membranas celulares u organulares y purificar partículas de lipoproteína a partir de las mismas, así como a una biblioteca de partículas de lipoproteína y partículas de lipoproteína purificadas por sí mismas y sus usos.

Antecedentes de la invención

- 10 En la última década, la investigación en las ciencias biosanitarias y en particular el descubrimiento de fármacos ha cambiado rápidamente. Los avances en la biología molecular, la computación, la genómica, la proteómica y la lipidómica, han permitido el desarrollo de nuevos métodos de investigación y de descubrimiento de fármacos.

- 15 En este área de investigación, las bibliotecas de genoma de una célula o de un orgánulo celular, de proteoma o de lipidoma han resultado ser muy útiles a la hora de estudiar las funciones génicas, de proteínas o de lípidos así como para descubrir dianas farmacológicas de genes, proteínas o lípidos. Aunque el campo de la genómica y las bibliotecas de ADN está bien avanzado, sigue habiendo una procedente necesidad de desarrollar métodos mejorados para preparar bibliotecas de proteoma y/o lipidoma de membrana.

- 20 El descubrimiento de fármacos se basa en el descubrimiento, la selección y el desarrollo adicional de moléculas de partida que tienen una actividad fisiológica concreta en ciertas enfermedades y/o, en caso de que se disponga de una biblioteca de compuestos, la identificación de nuevas dianas farmacológicas en las células que están implicadas en la enfermedad. A menudo, las dianas farmacológicas son lípidos, dominios de lípidos o proteínas de membrana, por ejemplo, receptores o transportadores, incluidos en las membranas celulares u organulares de las células diana. Por lo tanto, en la investigación de las ciencias biosanitarias en general y particularmente en el desarrollo de nuevas medicinas, es altamente deseable dilucidar la estructura y función de lípidos, dominios de lípidos y las proteínas de membrana incluidas en su ambiente de membrana natural, así como la posibilidad de detectar sistemáticamente un compuesto o una biblioteca de compuestos frente a una biblioteca compleja de posibles dianas de lípidos y proteínas de membrana.

- 35 Para las proteínas solubles de una célula u orgánulo, es fácilmente posible preparar una biblioteca del proteoma soluble celular u organular simplemente aislando la fracción de proteína soluble. Desafortunadamente, las membranas (y sus proteínas de membrana y los lípidos contenidos en las mismas) no son solubles en los sistemas sin detergente que normalmente se usan en los procedimientos de cribado de fármacos y la mayoría de ensayos funcionales empleados en la investigación de ciencias biosanitarias. Por lo tanto, las actuales bibliotecas de proteoma o lipidoma de membrana se encuentran principalmente en un estado solubilizado con detergente o en un estado desnaturalizado. Esto último puede ser útil para las técnicas de identificación de proteínas o lípidos, tales como espectrometría de masas, pero es incompatible con los análisis funcionales de proteínas o lípidos de membrana en su ambiente natural, un requisito previo para tener éxito en la investigación y el desarrollo de fármacos en este área.

- 40 Estas dificultades en la purificación, el aislamiento y en el análisis funcional han retrasado la investigación en los lipidomas de membrana y los proteomas de membrana.

- 45 La lipidómica es el estudio a gran escala de las vías, las composiciones y las redes de lípidos celulares en los sistemas biológicos e implica la identificación y cuantificación de especies moleculares de lípidos celulares y sus interacciones con otros lípidos, proteínas y otros metabolitos. El término "lipidoma" se usa para describir la suma de todos los lípidos y/o el perfil lipídico de una célula, tejido, organismo o ecosistema y es un subconjunto del "metaboloma", que también incluye otras clases principales de moléculas biológicas: proteínas, aminoácidos, azúcares y ácidos nucleicos. La lipidómica es un campo de investigación relativamente nuevo que ha propiciado rápidos avances en tecnologías tales como espectrometría de masas, espectroscopía por resonancia magnética nuclear (RMN), espectroscopía de fluorescencia y métodos computacionales, emparejados con el reconocimiento del papel de los lípidos en muchas enfermedades metabólicas, tales como obesidad, aterosclerosis, ictus, hipertensión y diabetes. Este campo en rápida expansión complementa a los enormes progresos logrados en la genómica y la proteómica, que en conjunto forman la familia de la biología de sistemas.

- 60 El lipidoma es extremadamente complejo y los lípidos tienen papeles esenciales en la dinámica de la membrana, el metabolismo de la energía y la señalización, donde la estructura lipídica es un determinante clave de los efectos biológicos. Los métodos analíticos tales como la lipidómica son esenciales para aumentar el conocimiento biológico actual de lípidos biológicamente relevantes en la investigación de base y en el descubrimiento y desarrollo de fármacos. Con este fin, es deseable tener la capacidad de proporcionar bibliotecas de lipidoma en las que los lípidos se mantienen en un estado lo más parecido a su ambiente natural en la membrana celular u organular.

- 65 Puede aplicarse una estrategia de investigación lipidómica a todas las áreas terapéuticas, incluyendo enfermedades cardiovasculares, diabetes, cáncer, enfermedades neurológicas y enfermedades tanto autoinmunitarias como

inflamatorias. Un requisito básico de un estudio de lipidómica exitoso es una muestra preanalítica adecuada, preferentemente una biblioteca de lipidoma que posibilite una rápida producción, una manipulación conveniente y cortos tiempos de almacenamiento, ya que algunos lípidos y dominios lipídicos de origen natural pueden ser inestables.

5 Los lípidos también pueden ser prometedores para nuevas soluciones de biomarcadores en muchas áreas. Además, también pueden servir como potenciales lecturas farmacodinámicas para terapias experimentales o existentes. Por lo tanto, los lípidos también pueden reforzar el desarrollo de diagnósticos complementarios y, por lo tanto, respaldar estrategias de tratamiento más personalizadas. También a este respecto, es deseable proporcionar métodos
10 convenientes y robustos para preparar bibliotecas de lipidoma. La lipidómica también puede usarse para estudiar diversos modelos de enfermedad experimentales y esto podría proporcionar un gran refuerzo a la investigación médica aplicable.

Por otra parte, la proteómica es el estudio a gran escala de proteínas, en particular de sus estructuras y funciones.
15 Las proteínas son partes vitales de los organismos vivos, ya que son los principales componentes de las vías metabólicas fisiológicas y de señalización de las células. El proteoma es el conjunto de proteínas producidas y comprendidas en un organismo, célula, orgánulo o sistema. El proteoma de membrana es el conjunto de proteínas de membrana y asociadas a membrana producidas y comprendidas en un organismo, célula, orgánulo o membrana de sistema. El proteoma puede variar con el paso del tiempo y con las condiciones o al estrés al que se somete o
20 experimenta una célula, por ejemplo, en una enfermedad.

El proteoma de membrana es un objeto de investigación particularmente interesante debido a las muchas funciones que ejercen las proteínas de membrana en los sistemas celulares y las enfermedades. Al ser rica en potenciales dianas farmacológicas, podría ser altamente deseable para los procesos de cribado una biblioteca que abarque el
25 proteoma de membrana de una membrana celular u organular concreta. Además, el aislamiento e identificación de proteínas de membrana desconocidas ofrece la posibilidad de descubrir nuevas dianas farmacológicas y de identificar receptores bioquímicos clave. Como se ha descrito anteriormente, la preparación y el posterior uso de bibliotecas de proteoma de membrana se ha visto hasta ahora impedida por la insolubilidad de las membranas y los componentes de membrana en sistemas sin detergente. Las interacciones entre las dianas de proteína de
30 membrana y los ligandos solubles son difíciles de estudiar *in vitro* debido a la insolubilidad de las proteínas de membrana en sistemas sin detergente.

Los compuestos hidrófobos, tales como las proteínas y lípidos de membrana son notablemente difíciles de manipular y representan dos de las principales dificultades para la investigación y aplicaciones farmacéuticas o de ciencias
35 biosanitarias: (i) hacer que los compuestos hidrófobos insolubles, tales como los lípidos o proteínas de membrana sean solubles en soluciones acuosas y (ii) la manipulación y administración de dicha materia hidrófoba como agentes terapéuticos, de investigación o de diagnóstico.

Las proteínas de membrana están codificadas por aproximadamente un 30 % de todos los ORF (Wallin y von Heijne, Protein Science 1998 Abr; 7 (4):1029-38) y representan una clase importante de dianas farmacológicas, ya que la mayoría de fármacos, es decir, más de un 60 %, de hecho se dirigen a esta clase de proteínas (Overington et al., Nature Reviews Drug Discovery 5, 993-996 (Diciembre de 2006)). Las proteínas de membrana desempeñan papeles
40 esenciales en muchos procesos biológicos, tales como la transducción de señales, el transporte de moléculas y de energía, el reconocimiento y la comunicación entre células. No obstante, las proteínas de membrana son difíciles de estudiar debido a su insolubilidad y tendencia a la agregación cuando se extraen de su ambiente de bicapa lipídica natural. A fin de mantener la integridad de las proteínas de membrana, se necesita un ambiente hidrófobo artificial. En este caso, se emplean principalmente micelas de detergente que, sin embargo, pueden tener un impacto negativo en la biocompatibilidad, pueden tener efectos adversos en la actividad de proteínas de membrana y pueden
45 interferir con las condiciones experimentales para los ensayos.

Otra complicación farmacológica principal está representada por la administración y el suministro de proteínas y/o lípidos hidrófobos como agentes terapéuticos o de diagnóstico. Debido a la solubilidad limitada de estos agentes hidrófobos, son propensos a la agregación, lo que da lugar a partículas de fármaco localmente altamente
50 concentradas que pueden causar una alta toxicidad, respuestas inmunitarias no deseadas y hacer que se inactive el fármaco (Allen y Cullis, SCIENCE, 303 (5665): 1818-1822, 19 de marzo de 2004).

Por lo tanto, son altamente deseables las aplicaciones que incorporan agentes hidrófobos, tales como proteínas o lípidos de membrana, en partículas solubles. Los métodos actuales que abordan estas dos complicaciones implican, entre otros, liposomas y partículas de lipoproteína de alta densidad reconstituidas (rHDL) (Chan y Boxer, Current
60 Opinion in chemical Biology 11:1-7, 2007).

El documento EP 1 596 828 B1 describe partículas en forma de disco de suministro de agentes bioactivos que comprenden una apolipoproteína que rodean estrechamente a una bicapa lipídica a modo de una doble cincha. El interior de dichas partículas se forma por la región hidrófoba de la bicapa lipídica. Esto contrasta con los liposomas, que son envolturas de bicapa lipídica cerradas que contienen un interior acuoso. Las partículas en forma de disco de
65 suministro de agentes bioactivos descritas en el documento EP 1 596 828 B1 tienen un diámetro de Stokes de

aproximadamente 10 nm y se propone su uso como vehículos de suministro para fármacos hidrófobos, tales como anfotericina B o camptotecina.

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 altura de aproximadamente 5,5 nm. Las partículas tienen una forma de disco y están compuestas de (i) una proteína de armazón de membrana artificial, (ii) una bicapa de fosfolípidos y (iii) al menos una proteína de membrana hidrófoba o parcialmente hidrófoba. Véase la figura 1a más adelante en el presente documento. Dicha proteína de armazón de membrana rodea nuevamente la bicapa lipídica a modo de una doble cincha y es un derivado de una forma truncada de apolipoproteína A-1 humana, carece del dominio globular N-terminal de la apolipoproteína A-1 humana, es anfipática y forma al menos una α -hélice y, en un ambiente acuoso, se autoensambla con un fosfolípido o una mezcla de fosfolípidos en una partícula a escala nanométrica con esta forma discoide. Dicha proteína de armazón de membrana (MSP) modificada por ingeniería genética proporcionará estabilidad, homogeneidad de tamaño y funcionalidades útiles a la partícula de lipoproteína discoide a escala nanométrica.

Sin embargo, esta tecnología de nanodiscos actualmente disponible tiene varios inconvenientes, ya que, por ejemplo, se necesita retirar el disolvente durante el ensamblaje de las partículas. Además, la homogeneidad de tamaño proporcionada por el ajuste a modo de doble cincha de la MSP procedente de apolipoproteína parece ir a expensas de un tamaño mínimo de partícula fijo y una limitación en cuanto a los diámetros máximos obtenibles con los métodos de la técnica anterior.

Recientemente, se han sugerido nuevas tecnologías de nanopartículas que implican a la familia de proteínas de unión a lípidos de la familia de saposina (véase Qi et al. (2009) Clin Cancer Res 15(18):5840-5851, Popovic et al., PNAS, Vol. 109, n.º 8 (2012) 2908-2912, documentos WO 2014/095576 A1 y WO 2015/036549 A1).

La familia de saposina comprende 4 proteínas pequeñas (~ 80 aminoácidos), saposina A a D, que se unen a y/o interactúan con lípidos y funcionan como cofactores esenciales para diversas enzimas lisosómicas en el catabolismo de esfingolípidos (véase 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 un pH bajo, que muestran actividades notablemente elevadas a pH ácido, con un punto óptimo de pH en el pH dentro del lisosoma de 4,75. Saposina A, B, C y D se hidrolizan proteolíticamente a partir de una sola proteína precursora de gran tamaño, prosaposina. Se han comunicado las secuencias de aminoácidos completas de las saposinas A, B, C y D, así como la organización genómica y la secuencia de ADNc de prosaposina (O'Brien et al. (1988) Science 241, 1098-1101; Furst et al (1992) Biochim Biophys Acta 1126: 1-16).

La saposina C tiene la capacidad de inducir la fusión de membrana de vesículas que contienen fosfolípidos en un ambiente ácido (Archives of Biochemistry and Biophysics, 1 de julio de 2003; 415(1): 43-53), una característica que no muestran las demás saposinas. Qi et al. (2009) Clin Cancer Res 15(18):5840-5851 han informado acerca 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 muestran actividad de direccionamiento a tumores *in vivo*. En las SapC-DOPS, la saposina C o un péptido derivado de la misma actúa como péptido de asentamiento para el liposoma al que está unida. La saposina C dirige posteriormente el liposoma a células cancerosas que exponen fosfatidilserina en la cara externa de la membrana celular. Los autores creen que un microambiente ácido único alrededor de las células cancerosas debido a la filtración extracelular de las enzimas lisosómicas hacen que el tejido tumoral sea una diana óptima para la saposina C. De acuerdo con Qi et al., los liposomas de SapC-DOPS se preparan secando los fosfolípidos purificados disueltos en disolvente en atmósfera de N₂ (g), dispersando los fosfolípidos en tampón ácido (pH 5) que contienen saposina C purificada, diluyendo la mezcla 50 x en una solución acuosa fisiológica y facilitando el ensamblaje de nanovesículas mediante tratamiento con ondas sonoras.

Popovic et al., PNAS, Vol. 109, n.º 8 (2012) 2908-2912 han informado acerca de discos de saposina A-detergente. La saposina A existe en un estado soluble y uno unido lípido/detergente. En ausencia de lípido, la saposina A adopta una conformación apo monomérica cerrada. Por el contrario, la estructura de saposina A-detergente comunicada por Popovic et al. revela dos cadenas de saposina A en una conformación abierta que encapsula 40 moléculas unidas internamente a detergente organizadas en un núcleo hidrófobo similar a una bicapa altamente ordenado.

Aparte de la cristalización de discos de saposina A-detergente, Popovic et al. también describen la preparación de complejos solubles de lípido-saposina A a pH 4,75 mediante un método que requiere múltiples etapas. En primer lugar, se prepara una fracción uniforme de vesículas liposómicas unilamelares de gran tamaño secando lípidos purificados disueltos en cloroformo en atmósfera de N₂ (g), se dispersan los lípidos secos mezclando vorticialmente en tampón ácido (acetato de sodio 50 mM a pH 4,8, NaCl 150 mM), se somete la suspensión a 10 ciclos de congelación y descongelación, mezclando en una mezcladora vorticial durante 5 min y extruyendo la mezcla a través de un filtro de 200 nm. El mezclado de las grandes vesículas liposómicas artificiales unilamelares preparadas de este modo con saposina A purificada en tampón ácido dieron como resultado partículas de lípido-saposina A solubles. La partícula mostró una granulometría restringida alrededor de un radio hidrodinámico medio (de Stokes) de 3,2 nm y que contenía aproximadamente una relación 5:1 de moléculas de lípido por cadena de saposina A. El tamaño exacto de las partículas se vio tan solo moderadamente afectado por la relación molar de lípido a proteína y

la composición de los liposomas. Los autores observaron partículas de 3,2 nm similares independientemente de que estuviesen presentes o no fosfolípidos aniónicos, colesterol o glucoesfingolípidos en las mezclas liposomales. En todos los casos, se observó un solo pico en el intervalo de tamaños de un radio de Stokes de 3,2 nm, lo que indica una distribución de especies relativamente estrecha. Por tanto, la tecnología de dicha publicación se limita a un valor de pH de 4,75, al tamaño anteriormente mencionado de las partículas e incluye una laboriosa etapa previa de preparación de liposomas.

El documento WO 2014/095576 A1 demostró por primera vez que es posible incorporar moléculas de carga hidrófobas, purificadas y solubilizadas con detergente o proteínas de membrana purificadas, solubilizadas con detergente en partículas de saposina-lípido usando lípidos solubilizados con detergente y purificados (véase la figura 1b más adelante en el presente documento). Por tanto, el método descrito en el documento WO 2014/095576 A1 empleó componentes solubilizados con detergente purificados y debido a esto contrasta con los liposomas sintéticos que se prepararon a partir de lípidos purificados en el método de Popovic et al.

El documento WO 2015/036549 A1 expandió el método descrito en el documento WO 2014/095576 A1 incorporando moléculas de antígeno solubilizadas (mostradas para proteínas de membrana víricas) procedentes de partículas similares al virus VIH-1 bien definidas y purificadas (VLP). De acuerdo con los ejemplos del documento WO 2015/036549 A1, las VLP prepurificadas se lisan, se solubiliza la proteína spike de membrana del VIH-1 con detergente y después se pone en contacto con saposina A. En términos generales, El documento WO 2015/036549 A1 también sugiere que en principio, podrían usarse moléculas de antígeno purificadas de bacterias, hongos, protozoos, parásitos o de un tumor/neoplasia humana o animal, aunque no se proporcionan detalles experimentales. Además, nuevamente, solo se usan componentes purificados en un estado solubilizado con detergente, es decir, sin que se mantenga el contexto nativo de membrana.

Una gran variedad de agentes hidrófobos, tales como proteínas o lípidos de membrana, podrían beneficiarse potencialmente de la tecnología de nanodiscos derivados de apolipoproteína o saposina descrita en la técnica anterior. Puede imaginarse fácilmente que la preparación de una biblioteca de lipidoma y proteoma de membrana podría necesitar que las partículas de nanodisco sean extremadamente flexibles con respecto al tamaño y la compatibilidad de la carga. Sin embargo, debido a la limitación de tamaño de 3,2 nm de las partículas derivadas de saposina A comunicadas en Popovic e tal., parece ser que, como mucho, solo pueden incorporarse moléculas pequeñas en dichas partículas al pH ácido divulgado en el mismo. Mientras que pueden incorporarse compuestos hidrófobos voluminosos y grandes biomoléculas, tales como proteínas de membrana (oligoméricas) en los nanodiscos derivados de apolipoproteína A de la técnica anterior, el diámetro máximo posible sigue estando limitado por el perímetro de apolipoproteína A similar a una doble cincha de estas partículas. Además, los nanodiscos derivados de apolipoproteína A de 10 nm pueden ser demasiado grandes para ciertas aplicaciones.

Además, los métodos descritos en toda la técnica anterior relacionada con apolipoproteína o saposina anteriores son sofisticados en cuanto a su nivel de detalle experimental y se basan en sistemas bien definidos de componentes purificados solubilizados con detergente. Por lo tanto, no se espera que funcionen cuando se emplean directamente como material de partida membranas en bruto, que se caracterizan por una estructura y composición altamente complejas. Si en primer lugar se purifica y solubiliza el lipidoma y el proteoma de membrana a partir de una membrana celular u organular, se podría, sin embargo, eliminar las proteínas de membrana y los lípidos de su ambiente y contexto natural, lo que puede ocasionar una pérdida de función, pérdida de contenido, complejidad y el sesgo correspondiente en la composición de la biblioteca. Además, dicho proceso podría ser complicado y elaborado debido a que no todas las proteínas de membrana y lípidos de membrana tienen los mismos requisitos en relación con la manipulación, la solubilización con detergente y la estabilidad.

Asimismo, los procesos anteriormente descritos de la técnica anterior que muestran incorporación de proteínas de membrana bacterianas o eucariotas, usan lípidos sintéticos o purificados para reconstituir las partículas de lipoproteína. Por tanto, los lípidos y las proteínas de membrana presentes en las partículas de lipoproteína proceden de diferentes fuentes y no reflejan el ambiente de origen natural. Sin embargo, es altamente deseable la imitación del ambiente de origen natural para obtener bibliotecas que proporcionen resultados significativos en investigación y cribado, potenciando la posibilidad de que pueda transferirse y verificarse en su contexto celular y posiblemente de enfermedad.

En resumen, los métodos de la técnica anterior usados para incorporar componentes de membrana de procariontes o eucariotas, tales como proteínas y lípidos, en estructuras de nanopartículas incluye principalmente la extracción de componentes, su solubilización y su reensamblaje en partículas, especialmente en donde se usan lípidos sintéticos o lípidos purificados de una fuente completamente diferente. Estas partículas no se asemejan a la membrana de origen natural de la que se obtuvieron. Esto hace que sea imposible la investigación del ambiente de membrana de origen natural. Además, estos procedimientos conocidos comportan el riesgo de desestabilización de lípidos y dominios lipídicos durante la purificación y la extracción. Además, no puede excluirse que las proteínas y/o lípidos pierdan su estructura y función nativa cuando se separan definitivamente de su ambiente natural.

La técnica anterior relacionada con saposina enseña únicamente la incorporación de proteínas de membrana purificadas con detergente y/o solubilizadas con detergente de origen procarionte o eucariota o de partículas de

similares a virus artificiales purificadas. Estos enfoques proporcionan una población de nanodiscos altamente homogénea que contiene la proteína de membrana de interés purificada reensamblada en un ambiente lipídico que está bien definido, pero que normalmente es completamente diferente a las membranas de origen natural de organismos procariotas, eucariotas y arqueas.

5 Por el contrario, estas membranas de origen natural de organismos procariotas, eucariotas y arqueas son altamente complejas y contienen una serie altamente diversa de proteínas y lípidos que interactúan para formar una superestructura compleja con la capacidad para regular diversos procesos celulares. La manipulación e
10 incorporación de dichas membranas complejas sin las etapas de solubilización con detergente y purificación enseñadas en los métodos de la técnica anterior parece imposible de llevar a cabo ya que no se espera que las complejas estructuras de membrana naturales sean tan fáciles de manipular como los componentes purificados. En particular, las membranas naturales también contienen mezclas complejas y dominios de diversos componentes lipídicos que consisten principalmente en diferentes tipos de fosfolípidos, incluyendo POPC (1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfolina), POPS (1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfo-L-serina) y esfingomielina y otros lípidos,
15 incluyendo colesterol. Además, las membranas forman dominios, tales como balsas lipídicas que pueden, por ejemplo, contener un porcentaje de colesterol y esfingomielina significativamente mayor que el de la membrana plasmática convencional que ayudan en la señalización de proteínas. Una proteína de membrana dada podría funcionar de manera adecuada solo en su contexto dado de membrana natural.

20 En conjunto, las membranas de organismos procariotas, eucariotas y arqueas muestran un alto grado de complejidad, que surge de la intrincada interacción entre las proteínas de membrana y varios lípidos que los rodean en su contexto nativo.

25 La técnica anterior no contempla y de hecho no enseña o sugiere, una propuesta factible para preparar bibliotecas de proteoma y lipidoma de membrana en estado nativo en forma de partículas derivadas de saposina.

Sin embargo, como se ha descrito anteriormente, dichas bibliotecas, en las que los componentes de proteoma o lipidoma de membrana se conservan en su ambiente natural son altamente deseables. Por ejemplo, la dilucidación de la estructura, la función y las interacciones de las proteínas de membrana *in vitro* en su ambiente de origen
30 natural, es decir, incluidas en los lípidos de la membrana en la que están presentes y activas *in vivo*, podría ser útil para identificar dianas farmacológicas y comprender los mecanismos y las reacciones subyacentes que se producen al nivel de las membranas celulares y organulares. Por lo tanto, es necesario desarrollar nuevos métodos para preparar bibliotecas a partir de membranas celulares u organulares que permitan conservar los lípidos de membrana y las proteínas de membrana en su ambiente natural, de tal forma que mantienen sus respectivas estructuras y funciones. El suministro de una biblioteca que refleja la composición de lípidos y proteínas de la membrana en bruto
35 podría posibilitar estudios del lipidoma, proteoma o la estructura de membrana de una cierta célula, orgánulo u organismo a un nivel hasta ahora inalcanzable.

40 Sumario de la invención

Con estos antecedentes, el problema que subyace a la invención puede observarse como el suministro de partículas de lipoproteína mejoradas y bibliotecas mejoradas de partículas de lipoproteína y métodos para su producción.

45 Este problema se resuelve mediante los procesos de acuerdo con la invención que emplean vesículas de membrana en bruto como material de partida para preparar una biblioteca de partículas de lipoproteína que comprenden un polipéptido de unión a lípidos y al menos partes o componentes de una membrana celular u organular, en donde el polipéptido de unión a lípidos es una proteína similar a saposina o un derivado o una forma truncada de la misma.

50 La invención proporciona un proceso para preparar una biblioteca de partículas de lipoproteína de saposina, en donde las partículas comprenden componentes de membrana procedentes de una membrana celular u organular y un polipéptido de unión a lípidos que es una proteína similar a saposina que pertenece a la familia SAPLIP de proteínas de interacción con lípidos o una forma derivada de las mismas, en donde el proceso comprende las etapas de

55 a) proporcionar una mezcla de vesículas de membrana en bruto obtenidas de una membrana celular u organular;
b) poner en contacto la mezcla de la etapa a) con el polipéptido de unión a lípidos en un ambiente líquido;
c) permitir el autoensamblaje de las partículas.

60 El proceso de la invención puede extenderse a un proceso de purificación para un tipo particular de partícula de lipoproteína de saposina, comprendiendo entonces dicho proceso las etapas de preparar una biblioteca de acuerdo con el proceso anteriormente descrito y la etapa adicional de
f) purificar al menos un tipo de partícula de lipoproteína de saposina de la biblioteca.

65 Las partículas de lipoproteína de saposina descritas en el presente documento comprenden componentes de membrana, en particular, lípidos de membrana y, opcionalmente, también proteínas de membrana, todas procedentes de una membrana celular o de un orgánulo. Las partículas de lipoproteína de saposina descritas en el

presente documento comprenden además un polipéptido de unión a lípido que es una proteína similar a saposina (SAPLIP) que pertenece a la familia SAPLIP de proteínas que interactúan con lípidos o una forma derivada de las mismas que puede obtenerse mediante los métodos de la invención. Estas partículas de lipoproteína de saposina descritas en el presente documento también se citan en el presente documento como "partículas de Salipro", "partículas de lipoproteína de saposina" o "partículas de la invención". Las bibliotecas obtenibles mediante el método de la invención y que comprenden una mezcla de diferentes partículas de Salipro también se denominan en el presente documento "bibliotecas de partículas de Salipro".

Este proceso de acuerdo con la invención tiene la ventaja de que es relativamente fácil de llevar a cabo y sorprendentemente proporciona bibliotecas de partículas de Salipro que reflejan la diversidad y complejidad de la membrana en bruto usada como material de partida e incorporan y conservan los componentes lipídicos y proteínicos de membrana contenidos en las mismas en su ambiente de membrana natural. Puede usarse una gran variedad de membranas en el proceso de acuerdo con la invención. Las vesículas de membrana en bruto usadas en la etapa a) se preparan a partir de membranas en bruto de células u orgánulos. Pueden usarse vesículas de membrana en bruto obtenidas de membranas celulares y/u orgánulos de muchos organismos. Resultó sorprendente que las partículas de Salipro también se pudieron obtener cuando se emplearon membranas complejas de células eucariotas, procariotas o arqueas como material de partida en lugar de los materiales de partida altamente purificados solubilizados con detergente necesarios en los métodos de preparación de la técnica anterior.

Las partículas de Salipro presentes en la biblioteca obtenida con el proceso de acuerdo con la invención varían en cuanto a su tamaño y composición y contienen diferentes mezclas de componentes de membrana, reflejando el lipidoma y proteoma de membrana de la membrana en bruto usada como material de partida. Asimismo, los componentes de las membranas en bruto obtenidas de orgánulos celulares pueden incorporarse en las partículas de Salipro.

El experto sabe que las membranas obtenidas de células y orgánulos presentan una mezcla compleja y muy heterogénea de componentes que se espera que también interactúen con el polipéptido de unión a lípidos y otros reactivos usados en el proceso de preparación de partículas de lipoproteína. Se esperaba que esto diese lugar a poco producto, a producto de baja calidad o a productos altamente indefinidos. Con estos antecedentes, resultó sorprendente que pueda usarse la compleja membrana en bruto y que pueda incorporarse fácilmente su diversa serie de componentes en las partículas de Salipro para formar bibliotecas de proteoma/lipidoma de membrana correspondiente. A diferencia del proceso de acuerdo con la invención, que emplea vesículas de membrana en bruto, los procesos de la técnica anterior que emplean proteínas similares a Saposina junto con proteínas de membrana eucariotas o procariotas usan predominantemente lípidos purificados o sintéticos que se reensamblan con proteínas altamente purificadas o de tal forma que se proporcionan condiciones controladas.

El proceso de acuerdo con la invención proporciona bibliotecas que capturan eficientemente componentes de membrana, en particular, lípidos de membrana y proteínas de membrana, directamente de membranas celulares complejas. Ya que el proceso de acuerdo con la invención usa vesículas de membrana en bruto, es decir, partes y/o componentes de membranas fisiológicas intactas que no se extrajeron o purificaron como en los métodos de la técnica anterior y que siguen conteniendo tanto sus lípidos naturales como su repertorio de proteínas de membrana naturales, las bibliotecas con partículas de Salipro obtenidas mediante el proceso de acuerdo con la invención comprenden una serie compleja de componentes de membrana. Esto permite la posibilidad de proporcionar una biblioteca que representa un lipidoma y/o proteoma de membrana de una célula u orgánulo particular.

En particular, el proceso de acuerdo con la invención permite la preparación de una biblioteca que comprende una mezcla heterogénea de partículas de Salipro con diferentes composiciones de lípidos de membrana y opcionalmente proteínas de membrana. Como se ha descrito anteriormente, el suministro de dicha biblioteca que comprende una serie de partículas de Salipro formada por una serie heterogénea de componentes de membrana, es decir, lípidos de membrana y/o proteínas de membrana incluidas en su ambiente natural, es una herramienta muy útil en aplicaciones de descubrimiento de fármacos, generación de anticuerpos, investigación de membranas (proteínas o lípidos), lipidómica, proteómica o médicas, cosméticas y de diagnóstico.

Los experimentos prácticos revelaron que el tamaño de las partículas de Salipro se autoajusta a la naturaleza del componente de membrana incorporado, por ejemplo, al tamaño de la proteína de membrana incorporada. Las partículas de Salipro son sorprendentemente flexibles en cuanto a su tamaño y por tanto, a diferencia de las proteínas de armazón y los agentes empleados en la actual tecnología de bibliotecas de membrana, permiten que la biblioteca imite aún más flexibilidad y/o variación de diferentes especificidades de lípidos (y opcionalmente de membrana) en el lipidoma o proteoma de membrana.

Sin quedar ligados a teoría alguna, parece ser que el proceso de acuerdo con la invención permite que las partículas de Salipro ajusten su tamaño a la naturaleza de los componentes de membrana incorporados. Esto es ventajoso con respecto a la limitación de tamaño de otras partículas de la técnica anterior. Aparentemente, esta flexibilidad también permite incorporar proteínas de membrana en su ambiente natural, por ejemplo, los lípidos de membrana u otros componentes celulares asociados con la proteína de membrana y potencialmente necesarios para mantener la

estructura y/o función de la membrana. También fue sorprendente descubrir que aunque dichas complejas partes de membrana y sus componentes con diversos tamaños y composiciones se incorporaron con éxito en las partículas de Salipro siguiendo el proceso de la invención, las bibliotecas obtenidas de este modo fueron sin embargo estables y se pudieron además procesar, manipular, purificar y/o analizar sin dificultades. Las partículas de Salipro obtenidas con los procesos de acuerdo con la invención son fáciles de producir y pueden mantener una calidad y composición uniforme con el paso del tiempo, ofreciendo de este modo la posibilidad de proporcionar una biblioteca estable y valiosa que pueda someterse a etapas y aplicaciones adicionales.

Sin quedar ligados a teoría alguna, parece ser que la puesta en contacto de las vesículas de membrana en bruto con una proteína similar a saposina o un derivado o una forma truncada de la misma en la etapa b) y el autoensamblaje en la etapa c) del método de la invención proporciona una estructura robusta que es estable en soluciones acuosas frente a un amplio intervalo de pH, en particular, a pH fisiológico y permite la obtención de partículas de mayor tamaño que las partículas de lipoproteína derivadas de saposina A de 3,2 nm obtenidas de liposomas preparados sintéticamente de acuerdo con la enseñanza de la técnica anterior de Popovic et al.

Como se ha descrito en la introducción, la importancia de las proteínas de membrana en los desarrollos terapéuticos necesita el descubrimiento de métodos innovadores para interrogar las proteínas de membrana en medios sin células, preferentemente en un ambiente sin detergente.

Las bibliotecas y partículas de Salipro obtenibles mediante el método de la invención satisfacen este requisito. Las bibliotecas y partículas de Salipro, una vez obtenidas, son estables en medios sin células y ambientes sin detergente. En una realización, el empleo de un detergente no es obligatorio en el proceso.

Las membranas en bruto contienen una plétora de diferentes proteínas de membrana y componentes lipídicos. En contra de lo que sería esperable en ausencia de detergente, las proteínas de membrana no son solubles en sistemas tampón sin detergente y se agregan, dando lugar a la formación de un gran pico vacío en el análisis por SEC, los experimentos prácticos revelaron que, una vez incluidas en las partículas de Salipro, las proteínas de membrana y los componentes lipídicos de membrana siguen siendo solubles en sistemas tampón sin detergente.

En otro aspecto de la invención, la biblioteca de partículas de Salipro puede usarse para purificar adicionalmente un tipo particular de partícula de Salipro, es decir, que contiene una proteína de membrana o composición lipídica particular de interés.

Además, las bibliotecas y partículas obtenibles mediante el método de la invención pueden usarse como herramienta para el desarrollo de fármacos, el cribado de fármacos, el descubrimiento de fármacos, el desarrollo de anticuerpos, el desarrollo de agentes biológicos terapéuticos, para la purificación de membranas o proteínas de membrana, para la expresión de proteínas de membrana, para la investigación de membranas y/o proteínas de membrana, en particular, la lipidómica y la proteómica, preferentemente para el aislamiento, la identificación y/o el estudio de membranas y/o proteínas de membrana o la creación de una base de datos de lipidoma o proteoma.

Finalmente, la biblioteca de partículas de Salipro o la partícula de Salipro puede usarse en medicina, en particular para su uso en la prevención, el tratamiento o la reducción de la gravedad de una enfermedad o para su uso en un método de diagnóstico, un tratamiento cosmético o para su uso como formulación para vacunación.

45 Descripción detallada de la invención

La invención proporciona un proceso para preparar una biblioteca de partículas de lipoproteína de saposina, en donde las partículas comprenden componentes de membrana procedentes de una membrana celular u organular y un polipéptido de unión a lípidos que es una proteína similar a saposina que pertenece a la familia SAPLIP de proteínas de interacción con lípidos o una forma derivada de las mismas, en donde el proceso comprende las etapas de

- a) proporcionar vesículas de membrana en bruto obtenidas de una membrana celular u organular;
- b) poner en contacto la mezcla obtenida después de la etapa a) con el polipéptido de unión a lípidos en un ambiente líquido;
- c) permitir el autoensamblaje de las partículas.

El proceso de acuerdo con la invención, en particular, proporciona una biblioteca de partículas de Salipro, en donde cada partícula de Salipro comprende el polipéptido de unión a lípidos, lípidos de membrana y, opcionalmente, una proteína de membrana. La expresión "proteína de membrana", como se usa en el presente documento no abarca el polipéptido de unión a lípidos de la invención. Los "lípidos de membrana", como se usan en el presente documento, son mezclas de lípidos de membrana, en particular mezclas de origen natural de lípidos de membrana. Los "lípidos de membrana", como se usan en el presente documento, proceden de la membrana celular u organular en bruto a partir de la que se prepararon las vesículas de membrana en bruto. Los lípidos de membrana, como se usan en el presente documento, no abarcan lípidos previamente purificados o mezclas de lípidos.

"Membrana celular u organular en bruto", como se usa en el presente documento, son membranas celulares u organulares o porciones de las mismas que ya no están completamente intactas pero que siguen comprendiendo esencialmente la composición de membrana natural, en particular con respecto a los lípidos de membrana y las proteínas de membrana. Por ejemplo, una fracción de membrana en bruto obtenida después de la homogeneización de las células o la lisis de células u orgánulos es una "membrana celular u organular en bruto" de acuerdo con la invención. Las "membranas celulares u organulares en bruto" comprenden necesariamente los componentes de membrana naturales presentes en la célula y los orgánulos. En particular, Las "membranas celulares u organulares en bruto" comprenden tanto lípidos de membrana como proteínas de membrana. En una realización preferida, los lípidos de membrana y la proteína de membrana presente en una partícula de Salipro de la invención o los lípidos de membrana y las proteínas de membrana presentes en la biblioteca de partículas de Salipro de la invención se obtienen de la misma célula y/o membrana organular celular.

Ya que las membranas celulares u organulares en bruto dejan de ser membranas celulares u organulares completamente intactas, forman espontáneamente vesículas de membrana en bruto debido a las interacciones hidrófobas entre dos sitios de ruptura de membrana dados. Por lo tanto, en una realización, las "membranas celulares u organulares en bruto" comprenden "vesículas de membrana en bruto" o ambas expresiones se usan como sinónimos.

El término "biblioteca" de acuerdo con la invención significa un conjunto (pluralidad compleja) de diferentes partículas de Salipro. En particular, la diferencia puede encontrarse en el tamaño y la composición de las partículas, especialmente en la composición de los componentes de membrana contenidos en las mismas, es decir, lípidos de membrana y, opcionalmente, proteínas de membrana. Normalmente, las bibliotecas son una mezcla de "partículas únicamente lipídicas" (véanse las figuras 2a y 2b) y diferentes tipos de partículas de Salipro que contienen proteínas de membrana (véanse las figuras 2c a 2f). Las partículas en la biblioteca también pueden diferir en cuanto a su contenido y composición de diferentes lípidos de membrana. Preferentemente, algunas partículas en la biblioteca difieren por el hecho de que contengan o no proteínas de membrana y de qué tipo sean.

Los lípidos de membrana y/o las proteínas de membrana en las partículas de Salipro se obtienen de una membrana de una célula determinada, toda la membrana de una célula determinada, una membrana de un orgánulo determinado, toda la membrana de un orgánulo determinado, toda la membrana de un individuo u organismo determinado o cualquier otra posible muestra de membrana que comprenda la membrana de una célula u orgánulo de una célula. Preferentemente, las partículas de Salipro contenidas en la biblioteca difieren en su composición de lípidos de membrana y/o proteínas de membrana. Preferentemente, difieren en su composición de proteína de membrana.

En una realización preferida, las partículas de Salipro tienen forma de disco. En otra realización preferida, las partículas de Salipro no comprenden un núcleo acuoso o hidrófilo. En otra realización más, las partículas de Salipro tienen forma de disco y no comprenden un núcleo acuoso o hidrófilo.

Por consiguiente, la invención también proporciona un proceso para preparar una biblioteca de partículas de lipoproteína de saposina en forma de disco, en donde las partículas comprenden lípidos de membrana y un polipéptido de unión a lípidos que es una proteína similar a saposina que pertenece a la familia SAPLIP de proteínas de interacción con lípidos o una forma derivada de las mismas, en donde las partículas no comprenden un núcleo hidrófilo o acuoso y en donde el proceso comprende las etapas de

- a) proporcionar vesículas de membrana en bruto obtenidas de una membrana celular u organular;
- b) poner en contacto la mezcla obtenida después de la etapa a) con el polipéptido de unión a lípidos en un ambiente líquido;
- c) permitir el autoensamblaje de las partículas, de manera particularmente preferente a un pH de 2,0 a 10,0, en particular de 6,0 a 10,0, preferentemente de 6,0 a 9,0, de manera particularmente preferente de 7,0 a 9,0 y lo más preferentemente, de 7,0 a 8,0.

La partícula de la invención ha demostrado ser capaz de incorporar varios lípidos de membrana y opcionalmente, proteínas de membrana, dando lugar a complejos a escala nanométrica que son solubles y estables en un ambiente acuoso. En particular, las partículas de acuerdo con la invención son partículas a escala nanométrica que comprenden un polipéptido de unión a lípidos, lípidos de membrana y opcionalmente, una proteína de membrana. Los lípidos de membrana y opcionalmente la proteína de membrana se obtienen preferentemente de la misma membrana celular y/u organular, en particular, de la misma pluralidad de una membrana celular y/u organular.

En una realización preferida, las partículas de la invención se consideran generalmente en forma de disco. En particular, pueden tener un radio de Stokes (radio hidrodinámico), R_S , en el intervalo de 2 nm a 200 nm, en particular, de 3 nm a 150 nm, preferentemente de 3 nm a 100 nm. El experto en la materia sabe cómo determinar el radio de Stokes. Esto se efectúa preferentemente mediante filtración en gel analítica (cromatografía de exclusión por tamaños), en comparación con patrones de radios de Stokes conocidos. En particular, las partículas pueden someterse a una etapa de filtración en gel en, por ejemplo, una columna de filtración en gel Superdex 200 HR10 30 y eluirse con un tampón adecuado a pH 7,5 y 0,5 ml/min a temperatura ambiente. La absorbancia se monitoriza a

280 nm para proteínas. La columna se calibra usando una mezcla de patrones de proteína con radios de Stokes conocidos, tales como, por ejemplo, tiroglobulina de 669 kDa (RS = 8,5 nm), ferritina de 440 kDa (RS = 6,1 nm), catalasa de 232 kDa (RS = 4,6 nm), lactato deshidrogenasa de 140 kDa (RS = 4,1 nm), seroalbúmina bovina de 66 kDa (RS = 3,55 nm) y citocromo c de corazón de caballo de 12,4 kDa (RS = 1,8 nm). Las proteínas patrón han de abarcar valores de RS superiores e inferiores al de la partícula de interés. Una curva de calibración se genera representando la posición de elución frente al RS para las proteínas patrón. Esto proporciona generalmente una gráfica aproximadamente lineal, pero por lo demás, es satisfactorio representar líneas entre los puntos y leer el RS de la proteína de interés a partir de su posición de elución en esta curva patrón.

En algunas realizaciones, por ejemplo, cuando hay presencia de agente hidrófobo voluminoso, tal como una proteína de membrana o mayores cantidades de lípidos en las partículas, 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.

Las partículas de la invención también pueden examinarse mediante microscopía electrónica de transmisión o, si las partículas son lo suficientemente grandes, mediante microscopía electrónica de tinción negativa y como partículas individuales.

El análisis estructural ha indicado que en muchos casos, en las partículas de la invención, los lípidos de membrana se ensamblan en una estructura similar a una bicapa discoide con un tamaño diferenciado en el interior de la partícula (véanse las figuras 2a y 2b). El componente de polipéptido de unión a lípidos define generalmente el límite de la bicapa lipídica y proporciona estructura y estabilidad a la partícula. En la mayoría de las realizaciones, el interior de la partícula incluye una región hidrófoba (por ejemplo, formada por cadenas de acilo graso de los lípidos). A diferencia de los liposomas, las partículas de la invención preferentemente no comprenden un núcleo hidrófilo o acuoso. Las partículas son preferentemente en forma de disco, tienen preferentemente una bicapa lipídica plana discoide aproximadamente circular circunscrita por α -hélices anfipáticas proporcionadas por dos o más polipéptidos de unión a lípidos, que se asocian con superficies hidrófobas de la bicapa alrededor de la periferia del disco. Los ejemplos ilustrativos de partículas en forma de disco de la invención se representan esquemáticamente en las figuras 2a a 2f.

En algunas realizaciones, la forma discoide de las partículas puede asemejarse a un cilindro con una relación de la altura máxima 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 discoide es generalmente de al menos 3,5 nm, en particular, al menos 5 nm, determinada mediante microscopía electrónica de transmisión o, si las partículas son lo suficientemente grandes, mediante microscopía electrónica de tinción negativa y análisis de una sola partícula. Preferentemente, la partícula de la invención tiene una parte superior, una parte inferior y una superficie lateral circunferencial, siendo el diámetro máximo (longitud del eje mayor) de la superficie superior e inferior mayor que la altura de la superficie lateral circunferencial. En algunas realizaciones de la partícula de la invención, el polipéptido de unión a lípidos está ubicado al menos parcialmente para rodear la superficie lateral circunferencial 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, determinado mediante microscopía electrónica de transmisión o, si las partículas son lo suficientemente grandes, mediante microscopía electrónica de tinción negativa y análisis de una sola partícula, es de entre 2 nm a 200 nm, en particular, de 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 en forma de disco es de 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 están definidas por una población sustancialmente monodispersa de estructuras de disco, evaluada por el perfil de elución de filtración en gel en, por ejemplo, una columna HiLoad SuperdexTM 200 16/60 GL.

En general, la interacción predominante entre el polipéptido de unión a lípidos y una bicapa lipídica en una partícula es mediante interacciones hidrófobas entre restos en las capas hidrófobas de las α -hélices anfipáticas de las moléculas de polipéptido de unión a lípidos y las superficies hidrófobas de los lípidos, por ejemplo, cadenas de acilo graso de fosfolípidos, en el límite de la bicapa en la periferia de la partícula de suministro de agente bioactivo. Una α -hélice anfipática de la molécula de unión a lípidos incluye tanto una superficie hidrófoba en contacto con una superficie hidrófoba de la bicapa lipídica en la periferia de la partícula como una superficie hidrófila que encara el exterior de la partícula y en contacto con el ambiente acuoso cuando se suspende la partícula en medio acuoso.

En algunas realizaciones, las bibliotecas y partículas de acuerdo con la invención son estables en solución acuosa y pueden liofilizarse para su almacenamiento a largo plazo, seguido de su reconstitución en solución acuosa. "Estabilidad" o "estable", como se usa en el presente documento, significa niveles de bajos a indetectables de fragmentación de partículas, niveles de bajos a indetectables de agregación o deterioro de la calidad durante la preparación, el transporte y el almacenamiento de las partículas.

En una realización preferida, las bibliotecas y partículas de acuerdo con la invención son estables en soluciones

- acuosas a un pH de 2,0 a 10,0, en particular de 6,0 a 10,0, preferentemente de 6,0 a 9,0, de manera particularmente preferente de 7,0 a 9,0 y lo más preferentemente, de 7,0 a 8,0. En otra realización, las bibliotecas y partículas de acuerdo con la invención son estables en soluciones acuosas a una temperatura de -210 °C a 80 °C, en particular, de -210 °C a 40 °C, de -210 °C a 30 °C o de -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, según se determina, por ejemplo, mediante inspección visual (solución transparente y sin precipitados) o filtración en gel analítica (menos de un 50 %, en particular, de un 1 a un 40 % de fragmentación de las partículas). Los experimentos prácticos han demostrado que las partículas de la invención también son estables a temperaturas de 4 °C a 40 °C en soluciones acuosas a un pH de 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 según se determina, por ejemplo, mediante inspección visual (solución transparente y sin precipitados) o filtración en gel analítica (menos de un 50 %, en particular, de un 1 a un 40 % de fragmentación de las partículas). También se ha demostrado que las partículas de la invención son estables en soluciones acuosas a un pH de 5,0 a 8,0 y a una temperatura de 40 °C a 75 °C durante al menos 10 minutos, según se determina, por ejemplo, mediante inspección visual (solución transparente y sin precipitados) o filtración en gel analítica (menos de un 50 %, en particular, de un 1 a un 40 % de fragmentación de las partículas). En algunas realizaciones, las partículas pueden liofilizarse para su almacenamiento a largo plazo, seguido de su reconstitución en solución acuosa. En algunas realizaciones, las partículas de la invención son estables en forma liofilizada a de -210 °C a 80 °C, en particular, de -210 °C a 40 °C, de -210 °C a 30 °C o de -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, según se determina, por ejemplo, mediante filtración en gel analítica después de su reconstitución en un tampón adecuado a pH 7,5 (menos de un 50 %, en particular, menos de un 40 % o de un 1 a un 40 % de fragmentación de las partículas). "Fragmentación", como se usa en el presente documento, significa que en el perfil de elución de filtración en gel, el tamaño del pico (es decir, la altura del pico) correspondiente a la partícula de la invención se ha reducido a expensas del tamaño del pico de SAPLIP libre no unido a lípido y/o lípidos libres y/o agregados, en comparación con el tamaño del pico de la partícula recién preparada de la invención. Por consiguiente, una fragmentación del 40 % significa, por ejemplo, que el tamaño del pico (es decir, la altura del pico en el perfil de elución de filtración en gel) se ha reducido en un 40 % en comparación con el tamaño del pico antes del almacenamiento (100 %).
- 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 libre de detergentes significa que la solución acuosa comprende menos de un 0,001 % (p/v) de detergente basándose en el volumen total de la solución acuosa.
- El polipéptido de unión a lípidos usado de acuerdo con la invención, es decir, las partículas de Salipro, es una proteína similar a saposina (SAPLIP) o un derivado o forma truncada de la misma. La expresión "proteína similar a saposina" (SAPLIP), como se usa en el presente documento, se reconoce en la técnica e incluye todos los miembros de la familia de proteínas similar a saposina (SAPLIP) de proteínas que interactúan con lípidos. La familia SAPLIP se caracteriza por el plegamiento de saposina, una estructura tridimensional alfa-helicoidal conservada que se estabiliza por enlaces disulfuro intramoleculares altamente conservados (Munford et al. (1995), *Journal of Lipid Research*, vol. 36, n.º 8, 1653-1663 y Bruhn (2005), *Biochem J* 389 (15): 249-257). Los ejemplos de miembros de la familia de proteínas similares a saposina (SAPLIP) de acuerdo con la invención se describen en Munford et al. (1995), *Journal of Lipid Research*, vol. 36, n.º 8, 1653-1663 y Bruhn (2005), *Biochem J* 389 (15): 249-257.
- En el estado "cerrado" sin ligando (es decir, sin detergente/sin lípido), las SAPLIP adoptan una estructura monomérica compacta de tipo ovillo de cuatro hélices, el pliegue de saposina. Este plegamiento se ilustra por la estructura de la forma apo cerrada de saposina A humana (código de ID del Protein Data Bank (PDB): 2DOB, Ahn et al. (2006) *Protein Sci.* 15: 1849-1857) o las estructuras de saposina C (código de ID del PDB: 1M12; de Alba et al. (2003) *Biochemistry* 42, 14729-14740), NK-lisina (código de ID del PDB: 1NKL; Liepinsh et al. (1997) *Nat. Struct. Biol.* 4, 793-795), amoebaporo A (código de ID del PDB: 10F9) y granulísina (código de ID del PDB: 1L9L; Anderson et al. (2003) *J. Mol. Biol.* 325, 355-365) que son prácticamente iguales y fácilmente superponibles.
- Las SAPLIP sufren un cambio conformacional tras unirse a ligandos, tales como lípidos o moléculas de detergente. En la conformación "abierta" unida a ligando, las SALIP adoptan una conformación en forma de V o en forma de bumerán con superficies hidrófobas expuestas que entran en contacto con los lípidos unidos. La conformación abierta se ilustra por la estructura de disco de saposina A-detergente de la técnica anterior (código de ID del PDB: 4DDJ; Popovic et al., *PNAS*, Vol. 109, n.º 8 (2012) 2908-2912) y la estructura de saposina C unida a micelas de detergente SDS (código de ID del PDB: 1SN6; Hawkins et al. (2005) *J.Mol.Biol.* 346: 1381-1392).
- En las partículas de la invención, el polipéptido de unión a lípidos es preferentemente anfipático, con una parte de su estructura más o menos hidrófila y orientada hacia el disolvente acuoso y la otra parte más o menos hidrófoba y orientada hacia el centro hidrófobo de la partícula que comprende los lípidos. El polipéptido de unión a lípidos se caracteriza preferentemente por α -hélices anfipáticas con 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.

Las abreviaturas para los restos de aminoácido como se usan 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.

5 Al contrario de los nanodiscos derivados de apolipoproteína de la técnica anterior, el polipéptido de unión a lípidos de la invención no atrapa los lípidos de un modo similar a una doble cincha sino que, en cambio, 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 una forma aproximadamente en V o con una forma de bumerán dispuesto en una orientación de cabeza a cola sustancialmente sin contactos entre proteínas entre los polipéptidos de unión a lípidos individuales en una partícula dada de la invención (véanse las figuras 1a a 1f). Sin desear quedar ligados a esta teoría, se cree que esta disposición de los polipéptidos de unión a lípidos y de los lípidos en las partículas de la invención proporciona la flexibilidad de tamaño que se observa cuando se incorporan agentes hidrófobos o cantidades crecientes de lípidos en las partículas de la invención.

15 Mientras que la capacidad para interactuar con lípidos, así como la naturaleza anfipática anteriormente descrita y la estructura tridimensional se encuentran altamente conservadas entre las SAPLIP, son altamente diversas a nivel de secuencia de aminoácidos, con identidades de secuencia por debajo de la zona umbral habitual de un 25-30 % de identidad para definir la homología (véase la comparación de secuencia en las figuras 4A y 4B de Bruhn (2005), Biochem J 389 (15): 249-257 reproducido en las figuras 12a y 12b más adelante, las secuencias ahí mostradas forman parte de la divulgación de la presente invención).

25 En las partículas de lipoproteína de la invención, el polipéptido de unión a lípidos sirve principalmente como proteína estructural, proporcionando un armazón para la estructura de las partículas de lipoproteína de la invención, por ejemplo, una estructura similar a un disco. Por este motivo, las características estructurales, en particular el pliegue de saposina que es característico de las SAPLIP, son más importantes para definir el polipéptido de unión a lípidos de la invención, en comparación con tan solo determinantes de secuencia.

30 Los ejemplos de SAPLIP de acuerdo con la invención son las saposinas A, B, C o D (por ejemplo, de *Homo sapiens* [véanse las SEQ ID NO. 1 a 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*); granulicina (por ejemplo, de *Homo sapiens*; véase la SEQ ID NO. 5); NK-lisina (por ejemplo, de *Sus scrofa*; véase la SEQ ID NO. 6); ortólogos de NK-lisina (por ejemplo, de *Equus caballus* o *Bos taurus*); amoebaporos (por ejemplo, de *Entamoeba histolytica*); ortólogos de amoebaporo (por ejemplo, de *Entamoeba dispar* o *Entamoeba invadens*); proteína similar a amoebaporo (por ejemplo, de *Fasciola hepatica*); naegleriaporos (por ejemplo, de *Naegleria fowleri*); clornorina (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*).

40 Las secuencias de SAPLIP específicas usadas de acuerdo con la invención se proporcionan en las figuras 4 A y 4 B de Bruhn (2005), Biochem J 389 (15): 249-257, formando parte de la divulgación de la presente invención dichas figuras y secuencias especificadas en el mismo y por lo tanto, se reproducen de manera idéntica en las figuras 12a y 12b más adelante. Las secuencias de SAPLIP particulares usadas de acuerdo con la invención se proporcionan en el listado de secuencias como se expone a continuación: SEQ ID NO. 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 granulicina [*Homo sapiens*]; SEQ ID NO. 6 NK-lisina [*Sus scrofa*].

50 Una SAPLIP usada de acuerdo con la invención también puede ser un polipéptido que comprende el pliegue de saposina como parte de una proteína multidominio. Este es el caso, por ejemplo, en la 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 proteasas aspárticas vegetales (de *Viridiplantae*). Una SAPLIP adicional usada de acuerdo con la invención puede ser bacteriocina AS-48. La bacteriocina AS-48 muestra actividad antimicrobiana, también es capaz de unirse a lípidos y posee el mismo pliegue que los demás miembros de la familia de SAPLIP, pero está desprovista de cualquier puente disulfuro.

60 Mientras tanto, a continuación, la invención se describe en más detalle para saposina A o un derivado o una forma truncada de la misma como polipéptido de unión a lípidos y mientras que la saposina A o un derivado o una forma truncada de la misma como polipéptido de unión a lípidos es una realización preferida, la invención no ha de limitarse de este modo. En cambio, la invención se extiende explícitamente a la familia completa de proteínas similares a saposina (SAPLIP) como polipéptidos de unión a lípidos de la invención. Debido al algo grado de conservación estructural y funcional entre las SAPLIP, se espera que las características y ventajas de ciertas realizaciones de la invención con saposina A como polipéptido de unión a lípidos también se apliquen a otras realizaciones que usan otras SAPLIP o derivados o formas truncadas de las mismas como polipéptido de unión a lípidos de la invención.

65

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

La saposina C es especial entre las saposinas en tanto que es capaz de inducir la fusión de la membrana, una característica que no muestran las demás saposinas. La actividad de fusión de membranas puede no ser siempre deseable. De acuerdo con una realización particular de la invención, el polipéptido de unión a lípidos es una proteína similar a saposina (SAPLIP) o un derivado o forma truncada de la misma, a condición de que la SAPLIP no sea saposina C o a condición de que la SAPLIP no sea saposina C o un derivado o forma truncada de la misma.

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

En una realización preferida, la SAPLIP es saposina A, preferentemente, saposina A (*Homo sapiens*, *Equus caballus*, *Bos taurus*, *Mus musculus*, *Oryctolagus cuniculus*, *Rattus norvegicus* o *Xenopus laevis*) y de manera particularmente preferida, saposina A humana, cuya secuencia de aminoácidos se proporciona como la SEQ ID NO. 1. La saposina A es una proteína conocida. Su expresión, purificación y cristalización como complejo de LDAO-detergente se describe, por ejemplo, en PNAS, Vol. 109, n.º 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 comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 20, 30, 40, 50 o 60 %, preferentemente al menos un 75 % de identidad respecto de la secuencia de longitud completa de la SAPLIP respectiva. En particular, el polipéptido de unión a lípidos puede comprender una secuencia que tiene una identidad con respecto de la secuencia de longitud completa de una SAPLIP de al menos un 80 %, 85 %, 90 % o 95 %.

La expresión "identidad de secuencia", como se usa en el presente documento, se refiere a un grado de identidad entre proteínas que puede calcularse mediante alineamiento óptimo de las secuencias usando una matriz de puntuación, 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 usando la matriz de similitud Blosum62 y el algoritmo de Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol. 1970, 48: 443-453) puede llevarse a cabo usando el programa GAP del Genetics Computer Group (GCG, Madison, WI, EE. UU.) usando los parámetros por defecto del programa.

A modo de comparación para alineamientos de aminoácidos, se usa la herramienta *online* del EMBL "EMBOSS Stretcher" (http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_stretcher/), usando la configuración por defecto del programa.

En otra realización, el derivado de una 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 de 1 a 40, preferentemente de 1 a 30 y en particular, de 1 a 20 o de 1 a 15 aminoácidos se han eliminado, añadido, insertado y/o sustituido.

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

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

El término "sustitución", como se usa en el presente documento, se refiere al intercambio de un resto de aminoácido ubicado en una 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 la SEQ ID NO. 1. Los fragmentos preferidos corresponden a las hélices a1, a2, a3 y a4 de saposina A, en donde la hélice a1 se forma por el siguiente tramo continuo de aminoácidos: "SLPCDICKDVVTAAGDMLK"; la hélice a2 se forma por el siguiente tramo continuo de aminoácidos: "ATEEEILVYLEKTCDWL"; la hélice a3 se forma por el siguiente tramo continuo de aminoácidos: "PNMSASCKEIVDSYLPVILDIKGEEMS"; y la hélice a4 se forma 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 seleccionada entre las hélices a1, a2, a3, a4 de saposina A y combinaciones de las mismas, en particular, en donde el polipéptido comprende la secuencia de las hélices a1, a2 y a3 de saposina A. Los fragmentos de saposina A, tales como sus hélices a1, a2, a3, a4, pueden tener una o más eliminaciones, adiciones, inserciones y/o sustituciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos.

Cuando se usa un derivado o una forma truncada de saposina A como polipéptido de unión a lípidos de acuerdo con la invención, dicho derivado o forma truncada debe ser anfipático, formar al menos una hélice alfa y ser capaz de

autoensamblarse junto con lípidos solubilizados en partículas de lipoproteína cuando se emplean en el proceso de preparación de acuerdo con la invención que se describe en detalle a continuación. Como se usa en el presente documento, el término "anfipático" se refiere a polipéptidos o moléculas que tienen regiones tanto hidrófilas como hidrófobas.

5 Preferentemente, en caso de usarse un derivado de una SAPLIP, deben estar presentes los seis restos de cisteína correspondientes a las seis cisteínas en el miembro fundador de SAPLIP, saposina A. A este respecto se hace referencia a las posiciones de las cisteínas en la comparación de secuencia en las figuras 4A y 4B de Bruhn (2005), Biochem J 389 (15): 249-257, reproducidas en las figuras 12a y 12b en el presente documento.

10 El polipéptido de unión a lípidos de acuerdo con la invención también puede incluir uno o más aminoácidos no naturales; análogos de aminoácidos o una estructura peptidomimética, en la que el enlace peptídico se reemplaza por una estructura más resistente a la degradación metabólica.

15 **Etapas a) del proceso de la invención**

En la etapa a) del proceso de acuerdo con la invención, se proporcionan vesículas de membrana en bruto obtenidas de una membrana celular y/u organular. Las vesículas de membrana en bruto son siempre una mezcla de diferentes vesículas de membrana en bruto. Normalmente, las vesículas de membrana en bruto no se obtienen de una sola célula, sino de una pluralidad de un cierto tipo de célula y/u orgánulo celular. Por ejemplo, ciertas células eucariotas, procariontas o de arqueas pueden usarse para obtener las vesículas de membrana en bruto. El término "pluralidad", como se usa en el presente documento, significa al menos dos o más células. También es posible usar una mezcla de diferentes células eucariotas, procariontas o de arqueas para preparar las vesículas de membrana en bruto. Sin embargo, preferentemente, las vesículas de membrana en bruto se obtienen de un tipo de célula u orgánulo. En otra realización, las vesículas de membrana en bruto se obtienen de una célula individual (sinónimo de singular). En esta realización, el proceso puede llevarse a cabo a nivel de una sola célula.

La expresión "en bruto", como se usa en el presente documento, significa que las vesículas de membrana se obtienen de fracciones de membrana en bruto, es decir, sin purificación o extracción adicional. Por tanto, la membrana en bruto sigue conteniendo tanto proteínas de membrana como lípidos de membrana de la membrana celular u organular original de la que se obtuvo. Esto contrasta directamente con los procesos de la técnica anterior, que usan principalmente proteínas o lípidos aislados y/o purificados. Las fracciones de membrana en bruto pueden obtenerse separando los componentes insolubles de los solubles tras la homogeneización o lisis de las células u orgánulos. La fracción insoluble es una forma de fracción de membrana en bruto que puede usarse de acuerdo con la invención.

El término "vesícula" es un término de la técnica para el experto. Normalmente, una vesícula es una estructura circular pequeña que consiste esencialmente en un fluido acuoso atrapado por una bicapa lipídica esférica cerrada. Las vesículas de membrana en bruto, sin embargo, son normalmente muy diversas y heterogéneas en cuanto a su tamaño y contenido. Se pueden preparar de manera específica o pueden formarse espontáneamente tras la homogeneización o lisis de células/orgánulos. Las vesículas proporcionadas en la etapa a) del proceso se obtienen de una membrana celular u organular. Por lo tanto, las vesículas comprenden normalmente una membrana celular u organular, en particular, una mezcla de lípidos de membrana y opcionalmente, una proteína de membrana de la célula o la pluralidad de células usadas.

Las vesículas proporcionadas en la etapa a) son una pluralidad de diferentes vesículas, es decir, una mezcla. Las vesículas pueden diferir en su estructura, tamaño y/o composición. La estructura de las vesículas puede ser unilamelar o multilamelar. La composición de las vesículas depende de la membrana celular u organular de la que se obtienen y del método usado para su preparación, en caso de usarse alguno.

Aunque pueden emplearse métodos particulares para obtener vesículas a partir de membranas en bruto conocidos por el experto, por ejemplo, tratamiento con ondas sonoras, los inventores han observado que normalmente, se autoensamblan cantidades suficientes de vesículas de membrana en bruto tras la ruptura o lisis de las membranas celulares u organulares de origen natural durante la homogeneización o lisis y preparación de la fracción de membrana en bruto.

La membrana usada en el proceso de acuerdo con la invención se selecciona entre membrana celular y membrana organular. La "membrana", "membrana organular" o "membrana celular" se refiere a cualquier membrana que comprenda una capa de lípidos. Preferentemente, la membrana es una bicapa lipídica. En ocasiones, el término "membrana" se usa en el presente documento indistintamente para "membrana celular" y/o "membrana organular".

Básicamente, la membrana celular es una membrana biológica que separa el interior de las células del ambiente exterior. La estructura compleja y la pluralidad de componentes comprendidos en la membrana celular, tales como lípidos de membrana y proteínas de membrana, también se describen en detalle en Alberts et al., "The Cell", 4.^a edición, Macmillan Magazines Ltd, 2002 en las páginas 583 a 614 y en Campbell et al., "Biologie", 6.^a edición, Spektrum Verlag, 2003 en las páginas 163 a 177. La membrana celular o membrana organular usada para el

suministro de vesículas de membrana en bruto en la etapa a) en el proceso de acuerdo con la invención comprende normalmente una mezcla heterogénea de diferentes lípidos y proteínas de membrana. Por lo tanto, la composición de las vesículas proporcionada en la etapa a) puede diferir en la mezcla de lípidos de membrana y proteínas de membrana y normalmente depende de la membrana particular de las que se obtuvieron.

5 El término "lípidos" o la expresión "lípidos de membrana", como se usa en el presente documento, se reconoce en la técnica y se refiere a una sustancia natural de origen biológico que es soluble o parcialmente soluble en disolventes orgánicos o que se reparte en un ambiente hidrófobo cuando está presente en fase acuosa. En ocasiones, "lípidos" y "lípidos de membrana" se usan indistintamente en el presente documento. El término "lípidos" o la expresión "lípidos de membrana", como se usa en el presente documento, no pretende dar a entender una molécula de lípidos sintética o de un solo tipo en la partícula de la invención. De hecho, se entiende como una pluralidad de al menos dos tipos diferentes de moléculas de lípidos que están presentes en la membrana celular u organular. Los lípidos incorporados en las partículas de Salipro de la invención son lípidos de membrana que se producen de manera natural en la membrana celular u organular. Por lo tanto, la partícula de la invención normalmente comprende una mezcla de lípidos de membrana que se producen de manera natural en la membrana celular u organular de la que se obtienen. En una realización, las partículas obtenidas de acuerdo con la invención comprenden al menos 3, 5, 10 o 20 lípidos diferentes. Normalmente, estos lípidos de membrana forman una bicapa en la que se incluyen las proteínas de membrana. Se incluye una excepción para algunas membranas de arqueas que pueden usarse en el proceso de acuerdo con la invención, ya que algunas arqueas comprenden una monocapa. La estructura de la membrana celular de las arqueas se describe con más detalle más adelante.

La membrana celular o la membrana organular comprende básicamente como lípidos de membrana tres clases de lípidos anfipáticos: fosfolípidos, glucolípidos y esteroides. La cantidad de cada uno depende del tipo de célula, membrana celular o membrana organular. Los fosfolípidos poseen una parte polar que se disuelve en agua (la "cabeza" de fosfato) y una parte hidrófoba no polar que no ("la cola de lípidos"). Estas partes están conectadas por un resto de glicerol. En el agua, los fosfolípidos pueden formar un cúmulo con las cabezas orientadas hacia el agua y las colas orientadas hacia fuera. Las cadenas grasas en los fosfolípidos y glucolípidos normalmente contienen un número par de átomos de carbono, normalmente de entre 16 y 20. Los ácidos grasos de 16 y 18 carbonos son los más comunes. Los ácidos grasos pueden ser saturados o insaturados. La configuración de los dobles enlaces se encuentran normalmente en la denominada configuración *cis*. El isomerismo *cis* y *trans* es un término empleado en química orgánica para hacer referencia al estereoisomerismo engendrado en la orientación relativa de los grupos funcionales en una molécula de acuerdo con Cahn-Ingold-Prelog (CIP; Cahn, R.S. e Ingold, C.K.; Prelog, V., "Specification of Molecular Chirality". *Angewandte Chemie International Edition*, 5 (4), p.385-415, 1966). Normalmente, los ácidos grasos presentes en la membrana celular también se describen en Alberts et al., "The Cell", 4.^a edición, Macmillan Magazines Ltd, 2002 en las páginas 61 y 62. Los ejemplos adicionales de los lípidos de membrana son fosfolípidos, tales como fosfatidilcolina, tal como POPC (1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfolina), fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina, tal como POPS (1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfo-L-serina)fosfatidilinositol y esfingomielina.

Los glucolípidos son lípidos con un carbohidrato unido a los mismos por medio de un enlace glucosídico. Los carbohidratos se encuentran normalmente en la superficie externa de las membranas de células eucariotas. Se extienden desde la bicapa de fosfolípidos hasta el ambiente acuoso fuera de la célula. Los ejemplos de glucolípidos son glicerolípidos, galactolípidos, sulfolípidos, glucoesfingolípidos, glucocerebrósidos, sulfatidas, gangliósidos, globósidos, glucofosfoesfingolípidos y glucofosfatidilinositoides. Los esteroides son un subgrupo de esteroides. Los esteroides, como parte de la membrana, se producen normalmente en membranas de eucariotas, tales como plantas, animales y hongos. Los ejemplos de esteroides son colesterol, campesterol, sitosterol, estigmasterol y ergosterol. De acuerdo con una realización preferida, los lípidos de membrana son lípidos formadores de bicapas lipídicas y/o lípidos biocompatibles. El término "biocompatible", como se usa en el presente documento, indica que es biológicamente compatible sin producir una respuesta tóxica, lesiva o inmunológica en el tejido vivo.

Como se usa en el presente documento, "lípidos formador de bicapa lipídica" se refiere a un lípidos que es capaz de formar una bicapa lipídica con un interior hidrófobo y un exterior hidrófilo. Puede usarse cualquier lípidos formador de bicapa que sea capaz de asociarse con una SAPLIP o una forma derivada o truncada de la misma para ensamblarse en una estructura de partícula de acuerdo con la invención. Los lípidos formadores de bicapas incluyen, pero sin limitación, fosfolípidos, esfingolípidos, glucolípidos, alquilfosfolípidos, éter-lípidos y plasmalógenos. Puede usarse un tipo de lípidos formador de bicapas o una mezcla de dos o más tipos. Las partículas también pueden incluir lípidos que no son lípidos formadores de bicapas. Dichos lípidos incluyen, pero sin limitación, colesterol, cardiolipina, fosfatidiletanolamina (este lípidos puede formar bicapas en ciertas circunstancias), oxisteroides, esteroides vegetales, ergosterol, sitosterol, lípidos catiónicos, cerebrósidos, esfingosina, ceramida, diacilglicerol, monoacilglicerol, triacilglicerol, gangliósidos, éter-lípidos, alquilfosfolípidos, plasmalógenos, prostaglandinas y lisofosfolípidos.

Los lípidos de membrana comprendidos en la partícula de Salipro de la invención pueden ser una mezcla de los lípidos de membrana listados anteriormente, pero no se limitan a los mismos. Normalmente, los lípidos de membrana comprendidos en las partículas de acuerdo con la invención comprenden al menos fosfolípidos, glucolípidos, colesterol y mezclas de los mismos. De acuerdo con una realización preferida, los lípidos de membrana son lípidos de eucariota y/o lípidos de procarionota, en particular, de tal forma que están normalmente presentes en

una cualquiera de las membranas presentes en una célula eucariota o procariota. Los lípidos preferidos, por ejemplo, son fosfolípidos, glucoesfingolípidos, esteroides, fosfatidilcolina, fosfatidilserina (PS), 2-oleoil-1-palmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (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.

En otra realización, los lípidos de membrana comprenden fosfolípidos. Los ejemplos de fosfolípidos adecuados incluyen, pero sin limitación, DMPC, DMPG, POPC, dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), dipalmitoilfosfatidilserina (DPPS), cardiolipina, dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG), diestearoilfosfatidilglicerol (DSPG), fosfatidilcolina de yema de huevo (PC de huevo), fosfatidilcolina de soja, fosfatidilinositol, ácido fosfatídico, esfingomielina y fosfolípidos catiónicos. Los lípidos de membrana en la partícula de acuerdo con la invención son normalmente una mezcla heterogénea de lípidos que se producen en la membrana celular u organular. Sin embargo, también es posible incluir además un lípido en la partícula de la invención que puede ser un lípido modificado que incluye uno o más restos funcionales unidos, tales como un resto de direccionamiento o un resto bioactivo.

Un resto de direccionamiento puede, por ejemplo, servir para dirigir las partículas de la invención a una célula o tipo de tejido particular o a un agente infeccioso. También puede servir para purificar, estudiar o identificar las partículas. En algunas realizaciones, la partícula incluye un resto de direccionamiento unido a un polipéptido de unión a lípidos o a un componente lipídico o a un componente de proteína de membrana.

El resto de direccionamiento puede tener, por ejemplo, propiedades de reconocimiento, de tal forma que las partículas pueden dirigirse a un receptor específico de la superficie celular. Por ejemplo, las partículas de la invención pueden dirigirse a un tipo celular particular conocido por portar un tipo particular de agente infeccioso, por ejemplo, modificando el componente de polipéptido de unión a lípidos de las partículas para hacer que sean capaces de interactuar con un receptor en la superficie del tipo de célula diana. En una realización, el resto de direccionamiento se selecciona entre el grupo que consiste en ligandos naturales o sintéticos, anticuerpos y fragmentos de anticuerpo u otras biomoléculas adecuadas para fines de direccionamiento.

Un resto bioactivo puede seleccionarse, por ejemplo, entre un fármaco, un agente citotóxico, una enzima, un marcador, un fluoróforo, un agente de contraste y un radiomarcador.

También pueden incluirse lípidos adicionales en la partícula de Salipro de la invención aparte de los lípidos de membrana de la membrana celular u organular. Estos pueden seleccionarse entre lípidos de origen natural, lípidos sintéticos, lípidos modificados, grasas, ceras, esteroides, vitaminas liposolubles, monoglicéridos, diglicéridos, triglicéridos, fosfolípidos, ácidos grasos, glicerolípidos, glicerofosfolípidos, esfingolípidos, sacarolípidos, policétidos, lípidos de esteroil y lípidos de prenol o combinaciones de los mismos.

Las partículas de Salipro de acuerdo con la invención pueden carecer de proteínas de membrana, es decir, estar esencialmente comprendidas únicamente por polipéptido de unión a lípidos y lípidos de membrana de las vesículas de membrana en bruto (partículas de Salipro "vacías"). Preferentemente, sin embargo, estas también comprenden una proteína de membrana (partículas de Salipro "rellenas"). Las proteínas de membrana son proteínas que están naturalmente incluidas en una membrana u, opcionalmente, también de tal forma que se asocian únicamente con una membrana. Las proteínas de membrana pueden mostrar varias funciones. Por ejemplo, las proteínas receptoras de membrana transmiten señales entre los ambientes internos y externos de la célula y las proteínas de transporte mueven moléculas e iones a través de la membrana. Las proteínas de membrana también pueden actuar como enzimas que pueden tener diversas actividades, tales como actividad oxidoreductasa, transferasa o hidrolasa. Las proteínas de membrana también pueden ser, por ejemplo, moléculas de adhesión.

De acuerdo con una realización, las partículas de Salipro de la invención o bien no comprenden proteínas de membrana o comprenden un número de 1 a 10 o de 1 a 5 proteínas de membrana por partícula. La biblioteca también puede definirse de acuerdo con una realización como una que comprende partículas en la que el número medio de proteínas de membrana por partícula es de 1 a 10 o de 1 a 5.

Las proteínas de membrana en las partículas de la invención, por ejemplo, pueden seleccionarse entre una proteína de membrana, una proteína transmembrana integral, una proteína integral de membrana monotópica, una proteína periférica de membrana, una proteína anfitrópica en un estado unido a lípido, una proteína anclada a lípidos y una proteína quimérica con un dominio hidrófobo y/o transmembrana fusionado.

Las proteínas integrales de membrana son proteínas de membrana que están permanentemente unidas a la bicapa lipídica y normalmente requieren un detergente o disolvente apolar para que se desplacen de la membrana. Las proteínas transmembrana son proteínas integrales de membrana que atraviesan la membrana al menos una vez. Los ejemplos de proteínas transmembrana que pueden incorporarse en las partículas de la invención son receptores acoplados a proteína G (GPCR), portadores, tales como uniportadores, simportadores o antiportadores, canales, tales como canales de iones o enzimas.

Las proteínas integrales de membrana monotópicas están unidas permanentemente solo a un lado de la membrana

y no atraviesan la membrana. Esta clase incluye proteínas de membrana que están ancladas a la membrana por medio de anclajes transmembrana alfa-helicoidales. Los ejemplos incluyen citocromo P450 oxidasas y glucoforina A.

5 Las proteínas periféricas de membrana están asociadas temporal o indirectamente a la bicapa lipídica o a las proteínas integrales de membrana incorporadas en la misma. Las proteínas periféricas de membrana normalmente se disocian de las membranas después del tratamiento con un reactivo polar con un pH elevado o altas concentraciones de sal. Los ejemplos de proteínas periféricas de membrana incluyen fosfolipasa A2 o C, lipooxigenasas y citocromo c.

10 Las proteínas ancladas a lípidos se unen a la bicapa lipídica a través de restos de aminoácido lipidados, en particular, prenilados o anclados a GPI. Los ejemplos incluyen lipoproteínas bacterianas, proteínas G y ciertas cinasas.

15 Las proteínas anfitrópicas son proteínas que existen en al menos dos estados conformacionales, un estado hidrosoluble sin lípidos y un estado unido a lípidos. Tras la asociación con los lípidos, las proteínas anfitrópicas sufren un cambio conformacional que les permite asociarse a la membrana de manera reversible o irreversible. Los ejemplos de proteínas anfitrópicas son las toxinas formadoras de poros y los péptidos antibacterianos.

20 Las vesículas proporcionadas en la etapa a) pueden obtenerse de una célula y/o un orgánulo celular. El término "un/uno/una" usado en el presente documento significa "uno/una" o "una pluralidad de" un cierto objeto. Por ejemplo, "una célula" significa una célula específica o una pluralidad de la célula específica. Normalmente, se usa una pluralidad de una célula y/o de un orgánulo celular en el proceso de acuerdo con la invención. El proceso de acuerdo con la invención no se limita al empleo de una célula y/u orgánulo celular. También es posible usar una mezcla de diferentes células u orgánulos para la preparación de las vesículas de membrana.

25 En una realización especial de la invención, las vesículas de membrana en bruto de la etapa a) se preparan mediante al menos una, dos, tres o todas las etapas a continuación:

30 a.1) proporcionar una célula y/o un orgánulo celular;
 a.2) lisar u homogeneizar la célula y/o el orgánulo celular;
 a.3) obtener una fracción de membrana en bruto; y
 a.4) preparar vesículas de membrana en bruto a partir de la fracción de membrana en bruto obtenida en la etapa a.3).

35 En la etapa a.1), se proporciona una célula y/o un orgánulo celular. El término "célula", como se usa en el presente documento, se entiende en el sentido normalmente usado en biología. Una célula es la unidad estructural, funcional y biológica básica de todos los organismos vivos. Una célula es la unidad de vida más pequeña que puede replicarse de manera independiente. "Célula", como se usa en el presente documento, incluye eucariotas, procariotas y arqueas. "Célula", como se usa en el presente documento, no incluye un virus.

40 Las células comprenden el citoplasma encerrado por una membrana celular, que comprende biomoléculas, tales como proteínas y lípidos, como se ha explicado anteriormente. Los organismos pueden clasificarse como unicelulares, es decir, consisten en una sola célula, tales como procariotas, o multicelulares, tales como eucariotas, por ejemplo, animales, plantas u hongos.

45 La célula de la que se obtiene la membrana usada en el proceso de acuerdo con la invención no se limita a un cierto tipo de célula. La célula puede ser de origen natural, una célula transfectada, modificada por ingeniería genética o una enferma, por ejemplo, una célula cancerosa. Se ha descubierto que diversos tipos de células son adecuados para el proceso de acuerdo con la invención.

50 Preferentemente, la célula es una arquea, una célula eucariota o una procariota. Los orgánulos celulares preferidos son orgánulos eucariotas.

55 Las membranas celulares de las arqueas, eucariotas y procariotas comprenden cada una lípidos de membrana y opcionalmente proteínas de membrana como se han descrito anteriormente. Sin embargo, el experto en la materia sabe que las arqueas, las células eucariotas y las procariotas difieren entre sí. La estructura, función y diferencias de las arqueas, células eucariotas o procariotas se describen en diversos libros de texto convencionales, tales como Alberts et al., "The Cell", 4.^a edición, Macmillian Magazines Ltd, 2002 o Campbell et al., "Biologie", 6.^a edición, Spektrum Verlag, 2003.

60 Un eucariota es cualquier célula u organismo cuyas células contienen un núcleo y opcionalmente orgánulos adicionales encerrados por membranas. En una realización, la membrana usada en el proceso de acuerdo con la invención es membrana de un eucariota, por ejemplo, la membrana celular y/o la membrana que surge de un orgánulo celular. Los ejemplos de orgánulos son el aparato de Golgi, mitocondrias, peroxisomas, retículo endoplasmático, cloroplastos, núcleo y similares.

65 Los ejemplos de eucariotas son plantas, animales y hongos, tales como levaduras y mohos. Las células eucariotas preferidas que pueden usarse en el proceso de acuerdo con la invención se seleccionan entre el grupo que consiste

en células de mamífero, en particular, células animales y humanas, células de insecto, células aviares, células fúngicas, tales como células de levadura, células vegetales y mezclas de las mismas. La expresión células de mamífero incluye también especialmente células animales y humanas que se mantienen en medio de cultivo.

5 Un procarionta es un organismo unicelular que carece de un núcleo. Las células procariontas son más sencillas y pequeñas que las células eucariotas y carecen de orgánulos de membrana. Los ejemplos de procariontas son las bacterias. Los filos de bacterias a modo de ejemplo son acidobacterias, actinobacterias, acuíficas, armatimonadetes, bacteroidetes, caldiserica, clamidias, chlorobi, chloroflexi, crisiogenetas, cianobacterias, deferribacterias, deinococcus-thermus, dictyoglomi, elusimicrobia, fibrobacterias, firmicutes, fusobacterias, gemmatimonadetes, lenticulas, nitrospira, planctobacterias, proteobacterias, espiroquetas, synergistetes, tenericutes, termodesulfobacterias, termotogas y verrucomicrobios. Las células procariontas preferidas que pueden usarse en el proceso de acuerdo con la invención son bacterias, en particular, bacterias patógenas y mezclas de las mismas.

15 Las arqueas están relacionadas tan solo de manera distante con los procariontas y los eucariotas. Se proporciona una descripción general detallada, por ejemplo, en De Rosa et al., "Structure, Biosynthesis, and Physicochemical Properties of Archaeobacterial Lipids", MICROBIOLOGICAL REVIEWS, p. 70-80 Vol. 50, n.º 1, 1986 o Albers et al., "The archaeal cell envelope", Nature Reviews Microbiology, 9, p. 414-426, 2011.

20 De Rosa et al. comunican que las membranas de las arqueas comprenden moléculas que difieren en gran medida de las de procariontas y eucariotas. Los procariontas y eucariotas comprenden membranas que comprenden principalmente lípidos de glicerol-éster, mientras que las arqueas comprenden membranas que comprenden lípidos de glicerol-éter. Los enlaces éter son químicamente más resistentes que los enlaces éster. Esta estabilidad puede ayudar a las arqueas a sobrevivir a temperaturas extremas y a ambientes muy ácidos o alcalinos. Los procariontas y eucariotas pueden comprender éter-lípidos, pero a diferencia de las arqueas, estos lípidos son un componente tan solo menor o nulo de la membrana.

30 Además, los lípidos de las arqueas están basados en una cadena lateral de isoprenoide. Las cadenas laterales de isoprenoide son cadenas largas que contienen 20, 25 o hasta 40 átomos de carbono, opcionalmente con múltiples ramificaciones laterales. También pueden comprender anillos de ciclopropano o ciclohexano. Esto contrasta con los ácidos grasos encontrados en las membranas de otros organismos como se han descrito anteriormente. Aunque los isoprenoides desempeñan un papel importante en la bioquímica de muchos organismos, solo las arqueas los emplean para producir fosfolípidos. En algunas arqueas, la bicapa lipídica puede estar reemplazada por una monocapa.

35 Los ejemplos de arqueas son las arqueas metanogénicas, las halobacterias y las arqueas termoacidófilas. Las arqueas preferidas que pueden usarse en el proceso de acuerdo con la invención son arqueas extremófilas y mezclas de diferentes arqueas extremófilas.

40 El uso de un virus que pueda comprender lípidos o proteínas de su hospedador no forma parte de la invención, que se refiere únicamente a vesículas y partículas procedentes de membrana celular u organular. El término célula u orgánulo excluye virus. La estructura del virus y los componentes de la membrana del virus, si procede, difieren de las membranas de eucariotas, procariontas y arqueas. Esto se comunica en más detalle en, por ejemplo, Lorizate et al., "Comparative lipidomics analysis of HIV-1 particles and their producer cell membrane in different cell lines", Cellular Microbiology, 15(2), p. 292-304, 2013 y Brügger et al., "The HIV lipidome: A raft with an unusual composition", PNAS, Vol. 103, n.º 8, p. 2641-2646, 2006.

50 Lorizate et al. comunican que varios estudios indicaron que la membrana del VIH-1 difiere de las membranas plasmáticas de células productoras, lo que sugiere que el virus brota de subdominios preexistentes o la inducción mediada por el virus de una membrana de brotación especializada. El análisis de lípidos de las membranas plasmáticas y del VIH-1 purificado de dos líneas celulares diferentes reveló una composición lipídica significativamente diferente de la membrana vírica en comparación con la membrana plasmática de la célula hospedadora, independientemente del tipo celular investigado. Las partículas del virus estaban significativamente enriquecidas en fosfatidilserina, esfingomiélinea, hexosilceramida y especies saturadas de fosfatidilcolina cuando se comparan con la membrana plasmática de la célula hospedadora de las células productoras. Mostraron niveles reducidos de especies insaturadas de fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilinositol. Se observaron diferencias específicas del tipo celular en la composición lipídica de las membranas plasmáticas del VIH-1 y del donante para plasmalógeno-fosfatidiletanolamina y fosfatidilglicerol, que estaban fuertemente enriquecidas únicamente en el VIH-1 procedente de células MT-4. El VIH-1 procedente de células MT-4 también contenía dihidroesfingomiélinea. En conjunto, estos datos comunicados por Lorizate et al. respaldan que el VIH-1 selecciona un ambiente lipídico específico para su morfogénesis y no es idéntico o similar a las membranas celulares de su hospedador. Normalmente, las partículas y bibliotecas de la invención descrita en el presente documento no contienen proteínas víricas y/o membranas víricas.

65 La célula en la etapa a.1) puede, por ejemplo, proporcionarse como una fracción celular purificada o no purificada, tal como en una suspensión celular o medio de cultivo. La célula también puede proporcionarse en forma de un cultivo celular, cuyas células normalmente se cultivan en condiciones controladas, tales como dentro o fuera de su

ambiente natural. El experto en la materia sabe que las células en una línea celular son muy similares, pero que normalmente no son idénticas. Sin embargo, el suministro de una pluralidad de una célula obtenida de una línea celular también se encuentra bajo el significado de suministro de una célula en la etapa a.1). La célula u orgánulo citado en la etapa a.1) también puede formar parte de un grupo de mayor tamaño y más complejo de células y/u orgánulos usados en dicha etapa.

En la etapa a.1), la célula también puede proporcionarse en forma de una muestra biológica en bruto, tal como tejido, órganos o cualquier otra muestra biológica que contenga células. Sin embargo, el experto en la materia también puede aislar una célula, un orgánulo celular o una pluralidad de los mismos de una muestra, tal como un cultivo celular, tejido, suspensión de tejido o cualquier otra muestra biológica.

Pueden usarse varias estrategias para separar diferentes tipos de una suspensión celular mixta. Uno aprovecha las diferencias en las propiedades físicas. Las células de gran tamaño pueden, por ejemplo, separarse de las células pequeñas y las células densas de las células ligeras por centrifugación.

Otra estrategia se basa en la tendencia de algunos tipos celulares a adherirse fuertemente al vidrio o plástico, lo que permite separarlas de las células que se adhieren con menos fuerza. Una técnica de separación celular adicional usa un anticuerpo acoplado a un colorante, etiqueta o marcador que se dirige a células específicas. Las células etiquetadas pueden separarse posteriormente de las no marcadas, por ejemplo, mediante FACS u otros métodos. También pueden obtenerse ciertas células diseccionándolas cuidadosamente de secciones de tejido. Las técnicas de microdisección permiten que las células seleccionadas se aislen de secciones de tejido. Este método puede, por ejemplo, implicar un haz láser para cortar una región de interés y expulsarla a un recipiente y permite el aislamiento incluso de una sola célula de una muestra de tejido.

Pueden usarse diversas técnicas para la separación, purificación o aislamiento de células u orgánulos en el método de la invención. Los métodos descritos anteriormente con respecto a células también son adecuados para obtener un orgánulo celular.

En la etapa a.2), se homogeneiza o lisa al menos una parte de la célula y/u orgánulo celular. El término "lisar" u "homogeneizar" se refiere a romper al menos una parte de la membrana celular u organular. Las células y/u orgánulos celulares pueden lisarse/homogeneizarse por medios químicos o mecánicos. Dependiendo de la técnica de lisis/homogeneización usada, se lisan/homogeneizan la totalidad, algunas o solo una parte de las membranas. Por ejemplo, si tan solo se lisa/homogeneiza la membrana celular, puede usarse centrifugación de gradiente para recoger ciertos orgánulos.

La lisis u homogeneización puede efectuarse por enzimas, agentes químicos o de manera mecánica. La lisis mecánica de una membrana celular u organular, tal como descongelación y descongelación repetida, tratamiento con ondas sonoras, tal como tratamiento con ultrasonidos, presión, ruptura por choque de baja presión osmótica o filtración también puede denominarse lisis. La solución sin procesar inmediatamente después de la lisis, pero antes de cualquier etapa de extracción o purificación, se denomina lisado en bruto. A partir del lisado en bruto, se puede aislar la fracción de membrana en bruto que comprende las membranas presentes en el lisado. Normalmente, esto puede lograrse separando la fracción insoluble (fracción de membrana en bruto) de la fracción soluble del lisado, por ejemplo, por centrifugación. En una realización preferida de la invención, se obtienen las vesículas de membrana en bruto de la fracción de membrana en bruto sin ninguna otra etapa de generación de vesículas, purificación o extracción.

En la etapa a.3), se obtiene una fracción de membrana en bruto. En una realización de la invención, las etapas tanto a.2) como a.3) pueden llevarse a cabo simultáneamente. Esto puede lograrse, por ejemplo, lisando la célula y/u el orgánulo celular y de este modo, proporcionando las vesículas de membrana en bruto.

En la etapa a.4), las membranas de vesícula en bruto se obtienen de la fracción de membrana en bruto después de la etapa a.3) o después de las etapas a.2) y a.3). Las vesículas de membrana en bruto pueden obtenerse solubilizando parcialmente o agitando la fracción de membrana en bruto en un disolvente, tampón, detergente o mezclas de los mismos. Los ejemplos de disolventes acuosos adecuados son agua, tal como agua desionizada, desmineralizada o esterilizada, soluciones salinas, tal como una solución de NaCl y soluciones que comprenden sales de fosfato, acetato, glicina, amonio, calcio, magnesio, potasio o mezclas de las mismas. Los tampones preferidos son tampones fisiológicamente tolerables. Los ejemplos de tampones adecuados son, por ejemplo, tampón fosfato, ACES, PIPES, imidazol/HCl, BES, MOPS, HEPES, TES, TRIS, HEPPS o TRICIN.

En otra realización de la invención, las etapas a.2), a.3) y/o a.4) se llevan a cabo simultáneamente. Al lisar la célula y/o el orgánulo celular, hay presencia en el lisado de una fracción de membrana en bruto. Los inventores han observado que con cierta frecuencia, se forman espontáneamente vesículas de membrana para su uso en el proceso de la invención.

65 **Etapas b) del proceso de la invención**

En la etapa b) del método de la invención, la mezcla obtenida después de la etapa a), es decir, las vesículas de membrana en bruto, se pone en contacto con el polipéptido de unión a lípidos en un ambiente líquido. La etapa b) del método de la invención también puede formularse como "puesta de contacto de las vesículas de membrana en bruto con el polipéptido de unión a lípidos en un ambiente líquido". Las vesículas de membrana en bruto son las obtenidas en la etapa a) y/o a.4).

El polipéptido de unión a lípidos y los lípidos pueden encontrarse en las formas descritas anteriormente.

En ciertas realizaciones, el ambiente líquido es una solución acuosa. El disolvente acuoso puede ser una solución tamponada. El ambiente líquido en la etapa b) puede tener un pH de 2,0 a 10,0, en particular de 6,0 a 10,0, preferentemente de 6,0 a 9,0, de manera particularmente preferente de 7,0 a 9,0 y lo más preferentemente, de 7,0 a 8,0. El ambiente líquido en la etapa b) también puede contener opcionalmente un detergente.

La duración de las etapas b) y/o c) depende en gran medida de la configuración experimental concreta, en particular, los tipos de lípidos y/o proteínas de membrana presentes en las partículas de Salipro y las temperaturas a las que se llevan a cabo estas etapas. Normalmente se obtuvieron buenos resultados, cuando las etapas b) y c) tienen una duración independiente entre sí de 10 s a 24 h, de 10 s a 2 h, de 10 s a 30 min y de 10 s a 15 min. Preferentemente, las etapas b) y/o c) se llevan a cabo a una temperatura de 10 a 60 °C, preferentemente, de 15 a 42 °C, de manera particularmente preferida, de 30 a 40 °C. Sin embargo, cuando se prolonga el tiempo de incubación, también es posible trabajar a temperaturas bajas, por ejemplo, de 2 a 10 °C. Las temperaturas indicadas son las del ambiente líquido en las que se llevan a cabo las etapas.

En una realización particular del proceso de acuerdo con la invención, se ponen en contacto las vesículas de membrana en bruto con un detergente en la etapa a), b) y/o c).

El término "detergente", como se usa en el presente documento, se reconoce en la técnica y no está comprendido en la definición de "lípidos" o de "lípidos de membrana" como se usa en el presente documento.

Aunque muchos lípidos tienen estructuras generales anfífilas similares en comparación con los detergentes, es decir, un grupo de cabeza hidrófilo polar y una cola hidrófoba no polar, los lípidos difieren de los detergentes en la forma de los monómeros, en el tipo de agregados formados en solución y en el intervalo de concentración necesario para la agregación. Los lípidos en general tienen una estructura sustancialmente cilíndrica; el volumen ocupado por la cola hidrófoba es similar al volumen ocupado por el grupo de cabeza polar. Los monómeros de detergente tienen generalmente una forma más cónica; el volumen ocupado por la cola hidrófoba es más pequeño que volumen ocupado por el grupo de cabeza polar. Los detergentes tienden a agregarse en micelas esféricas o elipsoidales que son solubles en agua sin formar estructuras de bicapa en ausencia de lípidos (véase el manual "Detergents and their uses in membrane protein science" de Anatrace, www.anatrace.com). Los detergentes que pueden emplearse en el proceso de acuerdo con la invención pueden ser aniónicos, catiónicos, no iónicos, zwitteriónicos y mezclas de los mismos.

Los detergentes como se usan en el presente documento se seleccionan preferentemente entre el grupo que consiste en alquilbencenosulfonatos o ácidos biliares, detergentes catiónicos y detergentes no iónicos o zwitteriónicos, tales como óxidos de laurildimetilamina (LDAO), Fos-colinas, CHAPS/CHAPSO, glucósidos de alquilo, tales como maltósidos de alquilo de cadena corta, media o larga, en particular, β -D-maltósido de n-dodecilo, glucósidos, anfífilos de maltosa-neopentilglicol (MNG), polímeros anfífilos (anfipoles), oligómeros macrocíclicos o cíclicos a base de un producto de hidroxialquilación de un fenol y un aldehído (calixareno) y mezclas de los mismos.

Los detergentes aniónicos típicos son alquilbencenosulfonatos. La porción alquilbenceno de estos aniones es lipófila y el sulfonato es hidrófilo. Los detergentes aniónicos pueden, por ejemplo, comprender grupos alquilo ramificados o grupos alquilo lineales. Los ejemplos de detergentes aniónicos adecuados son ácidos biliares, tales como el ácido desoxicólico (DOC), alquilbencenosulfonatos, tales como dodecilbencenosulfonato de sodio ramificado, dodecilbencenosulfonato de sodio lineal y mezclas de los mismos.

Los detergentes catiónicos son similares a los aniónicos, con un componente hidrófobo, pero, en lugar del grupo sulfonato aniónico, los tensioactivos catiónicos tienen amonio cuaternario como el extremo polar. El centro de amonio está cargado positivamente.

Los detergentes no iónicos se caracterizan por sus grupos de cabeza hidrófilos no cargados. Los detergentes no iónicos típicos están basados, por ejemplo, en polioxietileno o un glucósido. Los ejemplos comunes de este último incluyen las series Tween, Triton y Brij. Estos materiales se conocen también como etoxilatos o PEG-ilatos y sus metabolitos, nonilfenol. Los glucósidos tienen un azúcar como grupo de cabeza hidrófilo no cargado. Los ejemplos incluyen tioglucósido de octilo y maltósidos. Los detergentes de las series HEGA y MEGA son similares, poseyendo un alcohol de azúcar como grupo de cabeza. Los ejemplos de detergentes no iónicos adecuados que pueden usarse en el proceso de acuerdo con la invención son glucósidos de alquilo, tales como maltósidos de alquilo de cadena corta, media o larga, tales como n-dodecil- β -maltósido (DDM), decanoil-N-hidroxietilglucamida (HEGA), n-decanoil-N-metil-D-glucamida (MEGA) y mezclas de los mismos.

Los detergentes zwitteriónicos poseen una carga neta cero que surge de la presencia de números iguales de grupos químicos con carga opuesta, es decir, en la suma, el número de cargas negativas y cargas positivas son iguales, de tal forma que la carga general neta es cero. Los ejemplos incluyen Fos-colinas, CHAPS/CHAPSO, óxidos de laurildimetilamina (LDAO) y mezclas de los mismos.

Los experimentos prácticos han demostrado que es ventajoso usar detergentes con colas hidrófobas de cadena corta a media. Esto es particularmente cierto si se incorpora una proteína de membrana como agente hidrófobo. "Colas hidrófobas de cadena corta", como se usa en el presente documento, significa de C2 a C9, tal como, por ejemplo, n-nonil-β-maltósido (NM); "colas hidrófobas de cadena media", como se usa en el presente documento, significa de C10 a C15, tal como, por ejemplo, en n-decil-β-maltósido (DM) o n-dodecil-β-maltósido (DDM). En una realización, el detergente usado para la purificación y/o solubilización del agente hidrófobo tiene de 2 a 12 átomos de carbono en su cola hidrófoba, preferentemente de 2 a 10 y lo más preferentemente, de 2 a 9 átomos de carbono en su cola hidrófoba.

Las vesículas de membrana en una cualquiera de las etapas a) o a.1), a.2), a.3) y/o a.4) pueden encontrarse en un estado solubilizado con detergente. Los experimentos prácticos han demostrado que puede usarse una gran variedad de detergentes para solubilizar adicionalmente las vesículas de membrana en bruto para su empleo en el proceso de acuerdo con la invención. Por ejemplo, el proceso de acuerdo con la invención funciona muy bien con vesículas de membrana en bruto presentes en soluciones que comprenden de un 0,01 a un 5,0 %, en particular de un 0,1 a un 1,0 % de glucósidos de alquilo, tales como maltósidos y glucósidos de alquilo de cadena corta o más larga. Sin embargo, dependiendo del tipo de membrana o vesícula de membrana en bruto empleado, pueden usarse también otros detergentes adecuados. La capacidad de un detergente dado para solubilizar una membrana concreta o vesículas de membrana en bruto puede inspeccionarse visualmente con facilidad por la formación de una solución transparente desprovista de agregados, precipitados o separación de fases. Sin quedar ligados a teoría alguna, parece ser que la adición de un detergente afloja la estructura de la membrana y ayuda al autoensamblaje de las partículas, es decir, la incorporación de componentes de membrana en bruto en las partículas de Salipro.

En una realización de la invención, el detergente usado para solubilizar la mezcla en la etapa b) no se traslada en cantidades sustanciales a las partículas terminadas de la invención. En particular, la cantidad de detergente en las partículas obtenibles mediante el proceso de acuerdo con la invención puede ser de baja a indetectable. En una realización, la partícula de la invención no comprende cantidades sustanciales de detergente, en particular, menos de un 0,1 % en peso, preferentemente, menos de un 0,01 % en peso, de manera particularmente preferente, menos de un 0,001 % en peso de detergente basándose en el peso de la partícula. La cantidad de detergente presente en las partículas puede determinarse, por ejemplo, mediante espectrometría de masas.

Los experimentos prácticos han demostrado que los polipéptidos de unión a lípidos de la invención en general no requieren detergentes u otros disolventes durante la purificación, el almacenamiento o la manipulación. Opcionalmente, sin embargo, el polipéptido de unión a lípidos usado en la etapa b) también puede encontrarse en un estado solubilizado con detergente.

En algunas realizaciones, la relación molar de polipéptido de unión a lípidos a vesículas de membrana en la etapa b) es al menos 1:1, preferentemente al menos 2:1 o al menos 5:1, de manera particularmente preferida, al menos 10:1. En otra realización, la relación molar de polipéptido de unión a lípidos a vesículas de membrana en la etapa b) es de 1:1 a 1.000.000:1, en particular, de 1:1 a 100.000:1 o de 10.000:1 a 500:1.

En algunas realizaciones, la relación en peso de polipéptido de unión a lípidos a vesículas de membrana en la etapa b) es al menos 1:1, preferentemente al menos 2:1 o al menos 5:1, de manera particularmente preferida, al menos 10:1. En otra realización, la relación en peso de polipéptido de unión a lípidos a vesículas de membrana en la etapa b) es de 1:1 a 1.000.000:1, en particular, de 1:1 a 100.000:1 o de 10.000:1 a 500:1.

En una realización, el polipéptido de unión a lípidos en la etapa b) se encuentra en exceso molar en comparación con las vesículas de membrana en bruto. En otra realización, la cantidad de polipéptido de unión a lípidos en la etapa b) se encuentra en exceso en comparación con las vesículas de membrana en bruto (en cada caso, el % en peso está basado en el peso total de la mezcla en la etapa b).

Para la mayoría de proteínas de membrana que se van a incorporar en partículas de la invención, se logran resultados óptimos si la relación molar de lípidos a proteínas de membrana en la etapa b) es de 100.000:1 a 1000:1, en particular, de 100:1 a 1:1.

En una realización del proceso de acuerdo con la invención, la relación molar de polipéptido de unión a lípidos a vesículas de membrana en la etapa b) es al menos 1:1, en particular, al menos 3:3, preferentemente, al menos 5:1 o 10:1. En otra realización del proceso de acuerdo con la invención, la relación en peso de polipéptido de unión a lípidos a vesículas de membrana en la etapa b) es al menos 1:1, en particular, al menos 3:3, preferentemente, al menos 5:1 o 10:1.

En otra realización, las etapas a) y b) se llevan a cabo de manera simultánea. En una realización adicional, a, menos una de las etapas a.1) a a.4) se lleva a cabo de manera simultánea con la etapa b). En esta realización, también es posible llevar a cabo al menos dos etapas de las etapas a.1) a a.4) y la etapa b) de manera simultánea. En una realización especial, todas las etapas a.1) a a.4) y la etapa b) se llevan a cabo de manera simultánea. En una realización preferida, las etapas a.3), a.4) y b) se llevan a cabo simultáneamente.

En una realización adicional de la invención, el proceso comprende además entre las etapas a) y b) las etapas de b.1) poner en contacto las vesículas de membrana en bruto con un detergente en un ambiente líquido. El detergente puede ser como se ha definido anteriormente.

En caso de que se lleve a cabo la etapa b.1), la mezcla obtenida después de la etapa b.1), es decir, la mezcla de vesículas de membrana en bruto y detergente, se pone en contacto con el polipéptido de unión a lípidos en la etapa c). Opcionalmente, también puede haber una etapa b.2) entre la etapa b.1) y la etapa b), en donde la mezcla de vesículas de membrana en bruto y detergente obtenida en la etapa b.1) se purifica antes de ponerse en contacto con el polipéptido de unión a lípidos en la etapa b). Dicha purificación se describe con más detalle a continuación y puede implicar, por ejemplo, la retirada del detergente, en particular, el exceso o sustancialmente todo el detergente o la retirada de componentes no vesiculares. Un ejemplo de dicha purificación es la retirada de restos y/o agregados de proteína mediante ultracentrifugación. En caso de que se lleve a cabo la etapa b.2), la mezcla obtenida después de la etapa b.2), es decir, la mezcla purificada de vesículas de membrana en bruto, se pone en contacto con el polipéptido de unión a lípidos en la etapa c).

Dicha etapa de purificación también puede producirse como la etapa c.1) entre las etapas b) y c), en donde la mezcla obtenida después de la etapa a) y b) está purificada.

Las etapas a), b) y/o c) pueden llevarse a cabo en presencia de un detergente. Preferentemente, el detergente se selecciona entre los detergentes descritos anteriormente. El detergente puede añadirse en una forma adecuada, tal como en un estado líquido, sólido o líquido-sólido.

En una realización, la mezcla obtenida después de la etapa a), a.4), b) o b.1) se purifica opcionalmente. Dichas etapas de purificación se describen, por ejemplo, como las etapas b.2) y c.1) anteriores.

Los métodos de purificación adecuados son métodos cromatográficos, en particular, cromatografía de exclusión por tamaños, ultracentrifugación, diálisis, puesta en contacto con bioperlas de unión a detergente, uso de concentradores, cromatografía de afinidad, perlas magnéticas y/o membranas/filtros para retirar los lípidos no unidos/no incorporados y/o compuestos hidrófobos. El experto en la materia tiene la capacidad de seleccionar un método de purificación adecuado dependiendo del objetivo de purificación que se vaya a lograr.

Etapa c) del proceso de la invención

En la etapa c) del proceso de acuerdo con la invención, se produce el autoensamblaje de las partículas. La etapa c) no es necesariamente una etapa separada, también puede producirse de manera simultánea con la etapa b). Normalmente, el autoensamblaje de las partículas se produce directamente tras poner en contacto la membrana en bruto con el polipéptido de unión a lípidos de la invención. La etapa c) se lleva a cabo normalmente en un ambiente líquido, que puede ser igual o diferente al ambiente líquido usado en la etapa b).

El autoensamblaje de las partículas en la etapa b) también puede denominarse fragmentación de las membranas en bruto o las vesículas de membrana en bruto en las partículas de Salipro de la invención. Esta fragmentación o autoensamblaje se desencadena tras la puesta en contacto con el polipéptido de unión a lípidos de la invención.

Preferentemente, la etapa c) de la invención comprende permitir el autoensamblaje de las partículas a un pH de 2,0 a 10,0, en particular de 6,0 a 10,0, preferentemente de 6,0 a 9,0, de manera particularmente preferente de 7,0 a 9,0 y lo más preferentemente, de 7,0 a 8,0. Estos intervalos de pH también se aplican a la etapa b) descrita anteriormente, independientemente del pH aplicado en la etapa c). Los intervalos de pH descritos el presente documento permiten que los componentes puestos en contacto entre sí en la etapa b) se autoensamblen de una manera particularmente eficiente en las partículas de la invención en la etapa c).

Aunque cabe esperar que las partículas de Salipro se ensamblen mejor a o cerca del pH óptimo natural de las saposinas de 4,75, por el contrario, se observó que las bibliotecas con partículas de Salipro que muestran propiedades mejoradas y un espectro de aplicación extendido también pueden obtenerse cuando se mantiene un pH más neutro o básico durante el autoensamblaje de las partículas. Sorprendentemente, se observó que a un pH de 5,0 a 10 (en particular, de 6,0 a 10, más preferentemente de 6,0 a 8,5 y lo más preferentemente, de 7,0 a 8,0) y en presencia de vesículas de membrana en bruto, la proteína similar a saposina purificada o un derivado o forma truncada de la misma puede autoensamblarse en partículas de lipoproteína estables sin necesidad de un laborioso proceso de purificación aguas arriba relativo al componente lipídico o de proteína de membrana que se vaya a incorporar.

La etapa c) del proceso de acuerdo con la invención puede comprender o consistir en diluir la mezcla obtenida en la etapa b) con un líquido, en particular, uno que no contenga o que contenga cantidades menores de detergente que la mezcla obtenida en la etapa b). Los experimentos prácticos han demostrado que dicha etapa de dilución incluye además y facilita el autoensamblaje de las partículas de la invención. Sin desear quedar ligados a esta teoría, se cree que dicha etapa de dilución retira eficazmente las impurezas, el disolvente y/o las moléculas de detergente de las superficies hidrófobas del polipéptido de unión a lípidos y las vesículas de membrana en bruto, facilitando además de este modo el proceso de autoensamblaje de la partícula de acuerdo con la invención mediante interacciones hidrófobas potenciadas de los componentes.

- 5
- 10 Aunque el autoensamblaje de las partículas en la etapa c) puede producirse exactamente en la misma composición a la preparada en la etapa b), la etapa c) también puede comprender o consistir en una adición de disolvente orgánico, una retirada de detergente, una purificación o una etapa de dilución. La etapa c) puede, por ejemplo, ser una etapa de filtración en gel. En ese caso, la mezcla obtenida después de la etapa b), en la etapa c) se purifica y se diluye con el tampón de filtración en gel usado. En ciertas realizaciones, se somete la mezcla obtenida en la etapa b) a una etapa de filtración en gel, en la que el tampón de filtración en gel u otra solución es un líquido que no contiene detergente o que contiene menores cantidades de detergente que la mezcla obtenida en la etapa b).
- 15

De acuerdo con una realización particular, las etapas descritas anteriormente, en particular las etapas a), b) y/o c) y/o una de sus respectivas subetapas descritas a.1) a a.4), b.1) a b.2) y/o c.1) se llevan a cabo a una temperatura de 4 °C a 85 °C, en particular, de 20 °C a 70 °C, de manera particularmente preferida, a de 30 °C a 70 °C. Una temperatura de entre 30 °C a 40 °C es suficiente para la mayoría de aplicaciones. Sin embargo, mediante los métodos enseñados en el presente documento, el experto puede determinar la temperatura de incubación óptima con respecto a la estabilidad de temperatura de las membranas, los compuestos, los lípidos y las proteínas usados.

- 20
- 25 En una realización adicional, el proceso comprende en la etapa c) o como una etapa d) posterior, la purificación de las partículas mediante al menos la retirada parcial de lípidos de membrana libres, proteínas de membrana libres, polipéptido de unión a lípidos libre, materia insoluble o agregada y/o detergente, en donde, opcionalmente, la purificación se lleva a cabo mediante cromatografía, en particular, cromatografía de exclusión por tamaños; ultracentrifugación; diálisis; puesta en contacto con bioperlas de unión a detergente; uso de concentradores; métodos de purificación por afinidad que incluyen, pero sin limitación, cromatografía, perlas magnéticas, inmunopurificación y/o membranas/filtros para retirar los lípidos no unidos/no incorporados y/o compuestos hidrófobos.
- 30

Los procesos descritos anteriormente proporcionan bibliotecas de partículas de Salipro de acuerdo con la invención. Estas reflejan y contienen la totalidad o parte de, preferentemente una parte sustancial de, el proteoma y lipidoma de membrana de las vesículas de membrana en bruto que se usaron como material de partida en la etapa a), es decir, el proteoma y lipidoma de membrana de la célula u orgánulo a partir del que se prepararon estas vesículas de membrana en bruto. Las bibliotecas de partículas de Salipro son directamente útiles en sí, por ejemplo, en investigación de ciencias biosanitarias, en biología de sistemas, para estudiar el proteoma y/o lipidoma de membrana de una célula u orgánulo determinado, en desarrollo de fármacos, en particular, procesos de cribado de fármacos, en el desarrollo de anticuerpos y diversas aplicaciones médicas o cosméticas.

- 35
- 40
- 45 Las bibliotecas obtenidas mediante el método de la invención son, sin embargo, también particularmente útiles para servir como material de partida a partir del cual puede purificarse una selección particular o un tipo particular de partícula de Salipro.

Por consiguiente, la invención también proporciona un proceso para preparar partículas de lipoproteína de saposina purificadas que comprende las etapas de preparar una biblioteca de acuerdo con el proceso como se ha descrito anteriormente y la etapa adicional de f) purificar al menos un tipo de partícula de lipoproteína de saposina de la biblioteca.

- 50

La purificación del al menos un tipo de partícula de Salipro en la etapa f) puede llevarse mediante cualquier método de purificación, extracción o separación, preferentemente mediante los descritos en el presente documento.

- 55
- 60 La purificación del al menos un tipo de partícula de lipoproteína de saposina de la biblioteca puede llevarse a cabo mediante purificación por afinidad, incluyendo, pero sin limitación, cromatografía de afinidad y/o inmunopurificación, en particular, usando un antígeno o etiqueta en una proteína de membrana presente en la partícula que se va a purificar. Además o como alternativa, la purificación puede llevarse a cabo mediante cromatografía, en particular, cromatografía de exclusión por tamaños; ultracentrifugación; diálisis; puesta en contacto con bioperlas de unión a detergente; o uso de concentradores.

Preferentemente, la purificación del al menos un tipo de partícula de Salipro en la etapa f) se lleva a cabo mediante purificación por afinidad, tal como cromatografía de afinidad. Preferentemente, un antígeno o marcador (también denominado en el presente documento "marcador de afinidad") está presente en una proteína o lípido de membrana presente en la al menos una partícula de Salipro que se va a purificar. Preferentemente, el antígeno o el marcador está presente en una proteína de membrana en la al menos una partícula de Salipro que se va a purificar. El

- 65

marcador o el antígeno usado para la purificación puede, sin embargo, también estar presente en el polipéptido de unión a lípidos en las partículas de Salipro. De esta forma, se purifica por afinidad la biblioteca completa en la etapa f).

- 5 Preferentemente, se usa una entidad de reconocimiento en la purificación por afinidad, en donde la entidad de reconocimiento se une al antígeno o al marcador de afinidad presente en la partícula de Salipro.

10 Como sabrá el experto en la materia, la purificación por afinidad implica un antígeno o marcador de afinidad en el componente (por ejemplo, la partícula de Salipro) que se va a purificar y una entidad de reconocimiento correspondiente (por ejemplo, un anticuerpo en el caso de un antígeno o una entidad de Ni-NTA en el caso de un marcador de His) usada para purificar el componente a partir de una mezcla. Básicamente, pueden usarse diversos pares de antígeno o marcador de afinidad/entidad de reconocimiento conocidos por los expertos en la materia entre las técnicas de purificación por afinidad de proteínas para purificar el al menos un tipo de partícula de Salipro de acuerdo con la invención en la etapa f).

15 Las interacciones entre el par de marcador de afinidad/entidad de reconocimiento se desarrollaron para ayudar en la purificación e inmovilización de proteínas. Las proteínas pueden modificarse a nivel genético con ciertas secuencias de péptido, conocidas como marcadores de afinidad, que se unen a entidades de reconocimiento conocidas. Los marcadores de afinidad generalmente se asignan a tres categorías: a) secuencias peptídicas que se unen a moléculas pequeñas;

20 b) proteínas de fusión que se unen a moléculas pequeñas; y c) marcadores peptídicos o proteínas de fusión que se unen a anticuerpos. Un marcador de afinidad también puede ser una molécula pequeña que tiene un compañero de unión conveniente. El marcador de afinidad puede unirse covalentemente a una proteína, péptido o lípido diana presente en las vesículas de membrana en bruto usadas en la etapa a) del método de la invención. De esta manera,

25 las partículas de Salipro marcadas por afinidad pueden inmovilizarse sobre, por ejemplo, una matriz de resina que porta un compañero de unión o una entidad de reconocimiento, para la etiqueta de afinidad. Por ejemplo, el ácido nitrilo triacético, cuando se compleja con Ni^{2+} (NTA- Ni^{2+}), define una entidad de reconocimiento que se une a proteínas modificadas con un tramo de histidinas, conocido como un marcador de histidina, definiendo un marcador de afinidad.

30 Al "marcador de afinidad" se le otorga su significado convencional en la técnica. Un marcador de afinidad es cualquier material biológico o químico que pueda unirse fácilmente a un material biológico o químico diana. Los marcadores de afinidad pueden unirse a una molécula biológica o química diana mediante cualquier método adecuado. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el marcador de afinidad puede unirse a la molécula diana usando métodos genéticos. Por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico que codifica el marcador de afinidad puede insertarse cerca de una secuencia que codifica una molécula biológica presente en las vesículas de membrana en bruto; la secuencia puede ubicarse en cualquier parte dentro del ácido nucleico que permita la expresión del marcador de afinidad con la molécula biológica, por ejemplo, dentro, adyacente a o cerca. En otras realizaciones, el marcador de afinidad también puede unirse a la molécula biológica o química diana después de haberse producido

35 (por ejemplo, expresado o sintetizado) la molécula. Como ejemplo, un marcador de afinidad, tal como biotina, puede acoplarse químicamente, por ejemplo, covalentemente, a una proteína o péptido diana para facilitar la unión de la diana a estreptavidina.

40 Los marcadores de afinidad incluyen, por ejemplo, marcadores de unión a metal, tales como marcadores de histidina, GST (en la unión de glutatión/GST), estreptavidina (en la unión de biotina/estreptavidina). Otros marcadores de afinidad incluyen Myc o Max en un par de Myc/Max o poliaminoácidos, tales como polihistidinas. En diversos sitios en el presente documento, se describen marcadores de afinidad específicos en relación con las interacciones de unión. La molécula con la que interactúa el marcador de afinidad (por ejemplo, a la que se une), que puede ser un compañero de unión biológico o químico conocido, es la "entidad de reconocimiento". Ha de entenderse que la invención implica, en cualquier realización que emplee un marcador de afinidad, una serie de realizaciones individuales en donde cada una implica la selección de cualquiera de los marcadores de afinidad descritos en el presente documento.

45 Una entidad de reconocimiento puede ser cualquier material químico o biológico que sea capaz de unirse a un marcador de afinidad. Una entidad de reconocimiento puede ser, por ejemplo, una molécula pequeña, tal como maltosa (que se une a MBP o proteína de unión a maltosa), glutatión, NTA/ Ni^{2+} , biotina (que puede unirse a estreptavidina) o un anticuerpo. Una interacción de marcador de afinidad/entidad de reconocimiento puede facilitar la unión de la molécula diana, por ejemplo, a otro material biológico o químico o a un sustrato. Los ejemplos de interacciones de marcador de afinidad/entidad de reconocimiento incluyen polihistidina/NTA/ Ni^{2+} , glutatión S transferasa/glutatión, proteína de unión a maltosa/maltosa, estreptavidina/biotina, biotina/estreptavidina, antígeno (o un fragmento de un antígeno)/anticuerpo (o un fragmento de un anticuerpo) y similares.

60

65 Los pares de marcador de afinidad o antígeno/entidad de reconocimiento útiles en la etapa f) de la invención son, por ejemplo, una interacción de anticuerpo/péptido, una interacción de anticuerpo/antígeno, una interacción de fragmento de un anticuerpo/antígeno, una interacción de ácido nucleico/ácido nucleico, una interacción de proteína/ácido nucleico, una interacción de péptido/péptido, una interacción de proteína/proteína, una interacción de

molécula pequeña/proteína, una interacción de glutatión/GST, una interacción de maltosa/proteína de unión a maltosa, una interacción de carbohidrato/proteína, una interacción de derivado de carbohidrato/proteína, una interacción de marcador peptídico/ion metálico-quelato de metal, una interacción de péptido/NTA-Ni, una interacción de marcador epitópico (por ejemplo, marcador V5, marcador Myc, marcador FLAG o marcador HA)/anticuerpo, una interacción de proteína A/anticuerpo, una interacción de proteína G/anticuerpo, una interacción de proteína L/anticuerpo, una interacción de proteína fluorescente (por ejemplo, GFP)/anticuerpo, una interacción de receptor de Fc/anticuerpo, una interacción de biotina/avidina, una interacción de biotina/estreptavidina, una interacción de dedo de cinc/ácido nucleico, una interacción de molécula pequeña/péptido, una interacción de molécula pequeña/diana y una interacción de ion metálico/agente quelante/poliaminoácido.

Cualquiera de los marcadores de afinidad anteriormente mencionados puede estar presente en una proteína de membrana, lípido o el polipéptido de unión a lípidos en la partícula de Salipro de la invención, en particular, el tipo de partícula de Salipro que se va a purificar en la etapa f). Puede usarse cualquiera de las entidades de reconocimiento anteriormente mencionadas para purificar la partícula de Salipro en la etapa f).

En una realización de la invención, el marcador es un marcador fluorescente. En particular, las partículas de Salipro o un tipo de partícula de Salipro presente en la biblioteca de partículas de Salipro obtenidas mediante el método de la invención pueden portar un marcador fluorescente. En una realización preferida, un lípido, proteína de membrana o el polipéptido de unión a lípidos presente en la partícula de Salipro porta el marcador fluorescente. Dichos marcadores fluorescentes son útiles para detectar y hacer un seguimiento de una proteína de membrana particular o un tipo (especie) particular de partícula de Salipro durante su generación (y opcionalmente purificación) en los métodos de la invención. GFP y sus variantes son los marcadores fluorescentes más comúnmente usados. Además, los estudios prácticos revelaron que es posible marcar proteínas de membrana específicas en membranas en bruto o vesículas de membrana en bruto, que después se usan en la etapa a) para la preparación de la biblioteca de acuerdo con la invención. Este marcaje se produce preferencialmente a nivel genético, por ejemplo, modificando por ingeniería genética o insertando un vector que porta un transgén marcado en la célula u orgánulo de la que se obtienen las vesículas de membrana en bruto.

Usando las técnicas descritas anteriormente, la invención proporciona un proceso para preparar una partícula de Salipro que comprende una proteína de membrana particular de interés que contiene un antígeno o un marcador de afinidad.

Este procedimiento se describe de manera ilustrativa a continuación para membranas celulares en bruto que contienen una fusión con GFP de la proteína de membrana GLUT5, pero la invención no se limita de este modo. Brevemente, se puso en contacto una fracción de membrana en bruto que comprende vesículas de membrana en bruto que contienen GFP-GLUT5 (etapa a) del proceso de acuerdo con la invención (con o sin detergente) con saposina A en un ambiente líquido (etapa b) y parcialmente también c) del proceso de acuerdo con la invención, seguido de una retirada de las micelas de detergente usando cromatografía de filtración en gel/cromatografía de exclusión por tamaños en tampón sin detergente (etapa c) del proceso de acuerdo con la invención, forzando de este modo a que los restos hidrófobos de la mezcla inicial se autoensamblen en nanopartículas de Salipro. Dada la complejidad de la membrana en bruto usada como material de partida, este proceso proporciona una biblioteca heterogénea de partículas de Salipro que incluyen una plétora de diferentes proteínas de membrana. Algunas partículas de Salipro en la biblioteca contendrán la proteína de membrana GFP-GLUT5 marcada fluorescentemente, otras partículas de Salipro contendrán otras proteínas de membrana y algunas partículas de Salipro estarán desprovistas de proteínas de membrana y solo contienen lípidos de membrana procedentes de la membrana en bruto, como se indica en la figura 4b más adelante.

El proceso de acuerdo con la invención, en una realización, proporciona una biblioteca de partículas de Salipro, en donde cada partícula de Salipro consiste esencialmente en al menos un polipéptido de unión a lípidos y componentes de la membrana celular u organular en bruto, en particular, en donde cada partícula de Salipro consiste en el al menos un polipéptido de unión a lípidos y lípidos de membrana y, opcionalmente, proteínas de membrana de la membrana celular u organular en bruto.

El término "esencialmente" usado en el presente documento significa que también puede haber presencia de trazas de componentes adicionales usados en el proceso de acuerdo con la invención en las partículas de Salipro, tales como componentes adicionales de las membranas en bruto o agentes usados en el proceso, tales como detergentes. Que la partícula de Salipro consista esencialmente en el al menos un polipéptido de unión a lípidos y componentes de la membrana obtenidos de la membrana celular u organular debe, sin embargo, significar particularmente que no se añaden lípidos y/o proteínas adicionales. En particular, no se añaden lípidos y/o proteínas sintéticos, purificados y/o exógenos adicionales en el proceso de acuerdo con la invención.

En una realización preferida de la invención, no se añaden lípidos adicionales aparte de los componentes lipídicos de las vesículas de membrana en bruto en el proceso de acuerdo con la invención. En una realización preferida adicional de la invención, no se añaden proteínas de membrana adicionales aparte de los componentes de proteína de las vesículas de membrana en bruto en el proceso de acuerdo con la invención.

La invención proporciona una biblioteca de partículas de lipoproteína de saposina y/o una partícula de Salipro que puede obtenerse de acuerdo con cualquiera de los procesos descritos anteriormente.

5 Las partículas de Salipro obtenibles mediante el proceso de acuerdo con la invención e incluidas en las bibliotecas de partículas de Salipro de la invención difieren de las partículas de la técnica anterior en múltiples características. Por ejemplo, comprenden componentes de membranas celulares y organulares en bruto. En particular, comprenden proteínas de membrana de membranas celulares y organulares, en particular, de tal forma que se siguen manteniendo en su contexto de lípido de membrana celular u organular nativa. En una realización preferida, las partículas de Salipro de la invención comprenden como componente de proteína de membrana y componente
10 lipídico únicamente lípidos de membrana y, opcionalmente, proteínas de membrana procedentes de un tipo específico de membrana celular u organular. En una realización particularmente preferida, las partículas de Salipro de la invención comprenden como componente de proteína de membrana, en caso de haberlo y como componente lipídico únicamente proteínas de membrana y lípidos de la misma membrana celular u organular.

15 Además, las partículas de Salipro de la invención se caracterizan por su flexibilidad de tamaño inherente y la capacidad para adaptarse al tamaño respectivo del componente de membrana que se va a incorporar en las partículas de lipoproteína. Esto permite que se incorpore una gran variedad de proteínas de membrana, complejos de las mismas, dominios de membrana y componentes de membrana en las partículas de Salipro de la biblioteca. Las bibliotecas de la invención no solo son heterogéneas con respecto al contenido de cada partícula de Salipro individual, sino también con respecto al tamaño de cada partícula de Salipro individual. Las partículas de Salipro "vacías", es decir, con solo lípido, serán más pequeñas que aquellas que portan una proteína de membrana dada, que nuevamente, serán más pequeñas que aquellas que portan un complejo de proteína de membrana multimérico. Mediante esta flexibilidad de tamaño, las bibliotecas de partículas de Salipro permiten capturar una serie no sesgada del proteoma y el lipidoma de membrana de células u orgánulos en su contexto nativo.

25 Normalmente, las partículas en las bibliotecas de partículas de Salipro difieren en su composición de proteínas. También pueden diferir en su composición lipídica, reflejando las diferentes composiciones lipídicas de los dominios de membrana en la membrana celular u organular usada como material de partida. Ventajosamente, la biblioteca obtenida de acuerdo con la invención puede proporcionar partículas que comprenden partes o componentes de la membrana. Otra ventaja es que se mantiene el ambiente natural de los lípidos de membrana y opcionalmente la proteína de membrana en las partículas de Salipro de la invención.

30 La biblioteca de partículas de Salipro o la partícula de Salipro obtenible de acuerdo con los métodos de la invención también se proporcionan para su uso en medicina, en particular para su uso en la prevención, el tratamiento o la reducción de la gravedad de una enfermedad o para su uso en un método de diagnóstico, un tratamiento cosmético o para su uso como formulación para vacunación.

35 Por ejemplo, la partículas de Salipro de la invención puede incluirse en una composición farmacéutica para suministrar una o más proteínas de membrana y/o lípidos a un individuo que lo necesite, en donde la composición comprende partículas de la invención como se ha descrito anteriormente.

40 Aparte de las partículas de la invención, la composición farmacéutica puede comprender opcionalmente un vehículo, portador o adyuvante farmacéuticamente aceptable (adicional). Cuando las partículas de la invención son para su uso en una composición farmacéutica, los componentes individuales de las partículas y la composición farmacéutica deben ser farmacéuticamente aceptables. Como se usa en el presente documento, la expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a componentes, compuestos o agente que son, dentro del alcance del buen criterio médico, adecuados para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales inferiores sin toxicidad, irritación, respuesta alérgica indebida y similares y son acordes con una relación beneficio/riesgo razonable.

50 En otro aspecto más, la invención proporciona un método de tratamiento de un individuo que lo necesite, con una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica descrita anteriormente. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de la composición farmacéutica, como se usa en el presente documento, es aquella cantidad eficaz para tratar o aliviar la gravedad de la enfermedad o afección que se vaya a tratar. El término "individuo", como se usa en el presente documento, significa un animal, por ejemplo, un mamífero y más específicamente un ser humano.

60 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse a seres humanos y otros animales por vía oral, por vía rectal, por vía parenteral, por vía intracisternal, por vía intravaginal, por vía intraperitoneal, por vía tópica (como mediante polvos, pomadas o gotas), por vía bucal, en forma de un aerosol, en forma de una pulverización oral o nasal o similares, dependiendo de la gravedad de la enfermedad o afección que se esté tratando. En particular, la composición farmacéutica puede formularse para administración entérica, parenteral y/o tópica. Puede administrarse en forma de una cápsula, infusión o inyección, una composición aplicable con brocha o potable o en forma de 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.

65 Las partículas de la invención también son útiles para aplicaciones de diagnóstico y/o cosméticas. Por ejemplo, las

partículas de Salipro que comprenden un antígeno o marcador detectable como se ha descrito, por ejemplo, anteriormente, pueden usarse como agentes de diagnóstico y aplicarse con fines de diagnóstico. El antígeno o marcador puede estar en sí comprendido en o formado por una proteína de membrana presente en la partícula de Salipro, aunque también puede estar unido al polipéptido de unión a lípidos o a los componentes lipídicos de la partícula. Los ejemplos de herramientas de diagnóstico y de investigación en ciencias biosanitarias de acuerdo con la invención incluyen partículas con proteínas de membrana incorporadas marcadas, polipéptido de unión a lípidos marcado, lípidos marcados, fluoróforos incorporados o agentes de contraste (por ejemplo, para obtener imágenes por RM). El marcador puede ser, por ejemplo, un marcador fluorescente.

En otro aspecto, las partículas de la invención son útiles como formulación para vacunación, como portador de la misma o como vehículo de suministro de fármaco. Muchos antígenos patógenos que podrían ser particularmente potentes en las vacunaciones están expuestos en la superficie y/o comprendidos en la membrana celular externa de patógenos eucariotas o procariotas o células enfermas (por ejemplo, células cancerosas) en un paciente. Estos antígenos pueden, por ejemplo, proceder de lípidos patógenos, otras biomoléculas hidrófobas o proteínas de membrana. El término patógeno, como se usa en el presente documento, no comprende virus. Con las partículas de la invención, dichos antígenos pueden incorporarse efectivamente en las partículas que posteriormente pueden usarse como vehículos de administración de presentación de antígenos en formulaciones para vacunación. A este respecto, las partículas de la invención son útiles para servir como vehículos de administración de presentación de antígenos para generar anticuerpos contra lípidos o proteínas de membrana en animales hospedadores adecuados, preferentemente en mamíferos tales como, por ejemplo, conejos, cabras, llamas, ratones y primates.

La invención también proporciona, en un aspecto adicional, el uso de una biblioteca de partículas de Salipro de la invención o la partícula de Salipro de la invención como herramienta para el desarrollo de fármacos, el cribado de fármacos, descubrimiento de fármacos.

Por ejemplo, una diana farmacológica de proteína de membrana particular, tal como un receptor de la superficie celular o canal de iones, puede incorporarse en las partículas de la invención y solubilizarse de este modo en su estado nativo. Después, puede purificarse la partícula de la biblioteca como se ha descrito anteriormente. Posteriormente, dichas partículas pueden emplearse en ensayos para estudiar la actividad de la proteína de membrana diana del fármaco en su ambiente de bicapa lipídica nativo o usarse en detecciones sistemáticas de fármacos para identificar nuevos fármacos.

Por el contrario, la biblioteca de partículas de Salipro completa obtenida de una célula u orgánulo particular que puede ser una diana de enfermedad puede usarse con una finalidad de cribado de fármacos para identificar nuevas dianas farmacológicas moleculares, tales como proteínas de membrana o lípidos presentes en la membrana de la célula u orgánulo diana.

La biblioteca y los métodos descritos en el presente documento también pueden usarse como herramienta para la purificación de proteínas de membrana, la expresión de proteínas de membrana, para la investigación de membranas y/o proteínas de membrana, en particular, la lipidómica y la proteómica, preferentemente para el aislamiento, la identificación y/o el estudio de membranas y/o proteínas de membrana o la creación de una biblioteca o base de datos de lipidoma o proteoma.

Además, las partículas de la invención, ya estén purificadas o como parte de la biblioteca completa, también pueden fijarse a un soporte sólido, haciendo que sean útiles para aplicaciones tales como resonancia de plasmón superficial (SPR) o aplicaciones de biosensor.

Las partículas de la invención son generalmente útiles para hacer que las proteínas de membrana y los dominios o componentes de membrana por lo demás insolubles sean solubles en soluciones acuosas en su microambiente de bicapa de membrana nativa. Por tanto, la invención proporciona una amplia variedad de nuevas aplicaciones en la investigación de proteínas de membrana. Por ejemplo, las partículas de la invención permiten estudiar las proteínas de membrana incorporadas en las partículas de la invención mediante métodos tales como resonancia magnética nuclear (RMN), cristalografía de rayos X, microscopía electrónica (EM), espectrometría de masas, calorimetría de titulación isotérmica (ITC), dispersión de luz diferencial, dispersión de rayos X de ángulo pequeño (SAXS) y similares.

Las bibliotecas de la invención son particularmente útiles para investigación en el campo de la biología de sistemas, especialmente la lipidómica y la proteómica de membrana. Las bibliotecas de la invención pueden ser adecuadas para capturar y solubilizar el lipidoma o el proteoma de una célula u orgánulo celular. Las técnicas analíticas típicas en lipidómica y proteómica son tecnologías tales como espectrometría de masas (EM), espectroscopía por resonancia magnética nuclear (RMN), espectroscopía de fluorescencia y métodos computacionales. La aplicación de estos métodos o técnicas a las partículas de Salipro de la invención permitirán dilucidar adicionalmente el papel de los lípidos naturales y las proteínas de membrana en muchas enfermedades metabólicas, tales como, por ejemplo, cáncer, enfermedades autoinmunitarias, obesidad, aterosclerosis, ictus, hipertensión y diabetes.

La ventaja de la incorporación de la membrana en bruto a las partículas de la biblioteca de la invención es que

posteriormente representan instantáneas de los microdominios y componentes de la membrana real de la que se obtuvieron. A diferencia de esto, las partículas típicas que comprenden Saposina-lípido conocidas de la técnica anterior están compuestas de una mezcla heterogénea de lípidos purificados y opcionalmente proteínas, en donde los lípidos normalmente tienen su origen en una fuente completamente distinta que las proteínas de membrana presentes en las partículas.

Breve descripción de las figuras

La invención se describirá en lo sucesivo haciendo referencia a las figuras, que representan ciertas realizaciones de la invención. La invención, sin embargo, es como se define en las reivindicaciones y como se ha descrito generalmente en el presente documento. No debe limitarse a las realizaciones mostradas con fines ilustrativos en las figuras más adelante.

Fig. 1a) y 1b) representan partículas de lipoproteína de la técnica anterior. La figura 1a es una ilustración esquemática de la forma y la organización molecular de las partículas de nanodisco que contienen apolipoproteína A-1 de la técnica anterior (por ejemplo, el documento EP 1 596 828 B1 analizado anteriormente). La figura 1b es una ilustración esquemática del proceso usado para crear partículas de lipoproteína de Saposina de la técnica anterior (por ejemplo, el documento WO 2014/095576 A1) analizado anteriormente.

Fig. 2a) a 2f) son ilustraciones esquemáticas de partículas de Salipro de acuerdo con la invención. En las figuras 2a) y 2b) se muestra una partícula de Salipro 1c que comprende lípidos de la membrana celular u organular; en a) se representa como una vista lateral y en b) como una vista superior. En las figuras 2c) y 2d), se muestra una partícula de Salipro 1a que comprende lípidos de la membrana celular u organular y una proteína de membrana 4a; en c) se representa como una vista lateral y en d) como una vista superior. En las figuras 2e) y 2f), se muestra una partícula de Salipro 1b que comprende lípidos de la membrana celular u organular y una proteína oligomérica 4b; en e) se representa como una vista lateral y en f) como una vista superior.

Fig. 3a) y 3b) son ilustraciones esquemáticas del proceso para preparar la biblioteca de partículas de Saposina de la invención. Los materiales de partida para la preparación de la biblioteca, es decir, saposina A 2 y vesículas de membrana en bruto 5, 5', se representan en la figura 3a). Las vesículas de membrana 5, 5' comprenden una pluralidad de lípidos de membrana 3 y en el caso de 5, una pluralidad de proteínas de membrana, en este caso ejemplificadas en forma simplificada por 4a, 4b. La biblioteca 7 obtenida se representa esquemáticamente en la figura 3b), ejemplificada en forma simplificada como la mezcla de diferentes partículas de Salipro 1a, 1b y 1c que difieren en al menos uno del contenido de lípido, el contenido de proteína de carga y el tamaño. Las partículas 1a y 1b comprenden proteínas de membrana 4a, 4b. La partícula 1c es una partícula de solo lípido "vacía".

Fig. 4a) y 4b) son ilustraciones esquemáticas del proceso para preparar la biblioteca de partículas de Saposina de la invención, en donde una proteína de membrana 4c presente en las vesículas de membrana en bruto 5 está marcada con un marcador de afinidad 8. Los materiales de partida para la preparación de la biblioteca, es decir, saposina A 2 y vesículas de membrana en bruto 5, se representan en la figura 4a). Las vesículas de membrana 5 comprenden lípidos de membrana 3 y una pluralidad de proteínas de membrana, en este caso ejemplificadas en forma simplificada por 4c, 4b. La biblioteca 7 obtenida se representa esquemáticamente en la figura 4b), ejemplificada en forma simplificada como la mezcla de diferentes partículas de Salipro 1d, 1b y 1c que difieren en al menos uno del contenido de lípido, el contenido de proteína de carga y el tamaño. La partícula 1d comprende la proteína de membrana 4c con el marcador de afinidad 8 unido a la misma. La partícula 1b comprende la proteína de membrana oligomérica 4b. La partícula 1c es una partícula de solo lípido "vacía".

Fig. 5 es una ilustración esquemática de una realización del proceso para preparar una partícula de la invención llevando a cabo la etapa f) como se ha descrito anteriormente. La biblioteca 7' de la figura 4b) se somete a una etapa de purificación usando una columna de afinidad 9. También se muestra una representación esquemática del contenido de 1) el flujo continuo; 2.) lavado; y 3.) las fracciones de elución que salen de la columna 9.

Fig. 6 muestra los resultados del ejemplo 1a. La figura muestra el análisis de cromatografía de exclusión por tamaños de fluorescencia (FSEC) de la incorporación de GFP-GLUT5 fluorescente en las nanopartículas de Salipro de membranas en bruto.

Fig. 7 muestra los resultados del ejemplo 1b. La figura muestra nuevamente el análisis de FSEC de la incorporación de GFP-GLUT5 fluorescente en las nanopartículas de Salipro de membranas en bruto.

- Fig. 8 muestra los resultados del ejemplo 2. La figura muestra el análisis de FSEC de la incorporación de GFP-GLUT5 fluorescente en las nanopartículas de Salipro de membranas en bruto. La "muestra de control de rendimiento" se analiza en la presencia continua de detergente en el tampón, mientras que todas las demás muestras se analizan en un sistema tampón sin detergente.
- Fig. 9 muestra los resultados del ejemplo 3. La figura muestra el análisis SEC con cantidades crecientes de saposina A añadida. En presencia de saposina A, las proteínas de membrana procedentes de membranas en bruto se incorporan en una biblioteca de partículas de Salipro y permanecen solubles en un sistema tampón sin detergente.
- Fig. 10 muestra los resultados del ejemplo 4. La figura muestra el análisis SEC con cantidades crecientes de saposina A añadida. En presencia de saposina A, los lípidos de membrana procedentes de membranas en bruto se incorporan en una biblioteca de partículas de Salipro y permanecen solubles en un sistema tampón sin detergente.
- Fig. 11 muestra resultados adicionales del ejemplo 4. La figura muestra el análisis SEC de saposina A, partículas de Salipro de la técnica anterior y partículas de Salipro preparadas de acuerdo con la invención.
- Fig. 12a) y 12b) son reproducciones idénticas de las figuras 4A y 4B, respectivamente, de Bruhn (2005), *Biochem J* 389 (15): 249-257, formando parte dichas secuencias de la divulgación de la presente invención.
- La figura 1a) representa una partícula A de nanodisco que contiene apolipoproteína A-1 de la técnica anterior (véase, por ejemplo, el documento EP 1 596 828 B1 analizado anteriormente) que comprende lípidos B y apolipoproteína A-1 como polipéptido C de unión a lípidos. Al contrario de los nanodiscos derivados de apolipoproteína de la técnica anterior, el polipéptido de unión a lípidos de la presente invención no encierra los lípidos de un modo similar a una doble cincha (véase C en la figura 1a), sino que, en cambio, las partículas de la invención se mantienen juntas por un núcleo que comprende los lípidos de membrana que está rodeado por dos o más polipéptidos de unión a lípidos con una forma aproximadamente en V o con una forma de bumerán dispuesto en una orientación de cabeza a cola sustancialmente sin contactos entre proteínas entre los polipéptidos de unión a lípidos individuales en una partícula dada de la invención (véanse las figuras 2a a 2f).
- La figura 1b es una ilustración esquemática del proceso usado para crear partículas G de lipoproteína de Saposina de la técnica anterior (por ejemplo, el documento WO 2014/095576 A1 analizado anteriormente). En este caso, se incubaba una SAPLIP D con lípidos E purificados y detergente F solubilizado, proteína de membrana 4a purificada para formar una partícula G. Los lípidos E se purifican y proceden de una fuente distinta que la proteína de membrana 4a. La proteína de membrana 4a no está presente en una membrana o una vesícula, pero se encuentra en un estado artificial solubilizado con detergente (véanse los lípidos E y las moléculas de detergente F que se unen a las superficies hidrófobas de la proteína de membrana 4a en la figura 1b, parte intermedia). Por lo tanto, en la partícula G, la proteína de membrana 4a no está incluida en su ambiente de membrana natural, sino en una mezcla de lípidos E artificiales o exógenos y, posiblemente, también el detergente F.
- Las figuras 2a) a 2f) son ilustraciones esquemáticas de las partículas de Salipro obtenidas de acuerdo con ciertas realizaciones de la invención. Las partículas 1a, 1b y 1c comprenden una pluralidad de diferentes lípidos de membrana 3 y opcionalmente, una proteína de membrana, 4a, 4b. Tanto los lípidos de membrana 3 como las proteínas de membrana 4a y 4b proceden de la misma membrana celular u organular que se usó para preparar las partículas. Los lípidos 3 no son uniformes u homogéneos, sino que difieren entre sí ya que este es el caso típico en una membrana biológica. Además, dependiendo de la fuente de la que se obtienen las vesículas de membrana en bruto 5 (véanse las figuras 3a y 3b), la composición de la membrana variará y, por consiguiente, también la mezcla de lípidos 3 y opcionalmente las proteínas de membrana presentes en las partículas de Salipro. En una realización adicional, que no se muestra, las partículas de Salipro también pueden comprender componentes adicionales que están normalmente presentes en una membrana celular u organular.
- Las partículas 1a a 1c no están representadas a escala. Dependiendo del tamaño de la proteína de membrana 4a, 4b incorporada en las partículas 1a o 1b, la partícula de solo lípido 1c puede ser sustancialmente diferente en cuanto a su tamaño en comparación con las otras partículas 1a, 1b. Asimismo, las partículas 1a y 1b pueden diferir en cuanto a su tamaño, lípidos y composición de proteína de membrana óptima. Asimismo, las partículas 1c pueden diferir en cuanto a su tamaño, por ejemplo, si se incorporan íntegramente pares de balsas lipídicas en una partícula de Salipro. Obsérvese que las partículas de Salipro de la invención tienen un tamaño flexible. Por ejemplo, la partícula 1b que porta una proteína de membrana oligomérica es de mayor tamaño y contiene más subunidades de Saposina 2 en comparación con la partícula 1a, que contiene una proteína de membrana monomérica.
- Las figuras 2a) y 2b) representan, de forma esquemática simplificada, la partícula de Salipro 1c que comprende,

como polipéptido de unión a lípidos 2 una SAPLIP y los lípidos de membrana celular u organular 3; se representa en a) como una vista lateral y en b) como una vista superior. Las figuras 2c) y 2d) representan la partícula de Salipro 1a, que difiere de 1c en que además comprende la proteína de membrana 4a; se representa en c) como una vista lateral y en d) como una vista superior. La proteína de membrana 4a puede ser una proteína transmembrana integral en forma monomérica. Sin embargo, también puede encontrarse en un estado oligomérico, como se representa en la figura 2e) o 2f) o ser una proteína periférica de membrana, una proteína anfitrópica en un estado unido a un lípido, una proteína anclada a lípidos o una proteína química con un dominio hidrófobo y/o transmembrana fusionado, todos los cuales que pueden encontrarse en un estado monomérico u oligomérico.

Las figuras 2e) y 2f) representan la partícula de Salipro 1b, que difiere de 1c en que además comprende la proteína de membrana oligomérica 4b. Se representa en e) como una vista lateral y en f) como una vista superior. La partícula 1b muestra flexibilidad de tamaño y se adapta al tamaño de la proteína de membrana oligomérica 4b incorporada en la misma. En la realización representada en la figura 2e) o 2f), la partícula 1b 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 se encuentra en el intervalo de 5 a 20 nm, dependiendo del agente hidrófobo incorporado en la misma.

Las figuras 3a) y 3b) representan, nuevamente de forma simplificada y esquemática, el proceso de acuerdo con la invención para preparar una biblioteca de partículas de Salipro 7 a partir de vesículas de membrana en bruto 5. En la figura 3b), la biblioteca 7 se representa esquemáticamente como la mezcla de diferentes partículas de Salipro representativas 1a a 1c que difieren en su lípido de membrana 3 y opcionalmente, la proteína de carga 4a, 4b y/o el tamaño. Obviamente, en realidad, la biblioteca 7 abarcará miles de partículas de Salipro diferentes. De manera similar, la mezcla de partida 6 comprenderá un alto número de diferentes vesículas de membrana en bruto.

Como se muestra en la figura 3a), las partículas 1a a 1c de la invención se preparan mezclando SAPLIP purificada 2 con vesículas de membrana en bruto 5, 5' y permitiendo el autoensamblaje X de la partícula 1. La composición 6 que comprende las vesículas de membrana en bruto 5 y 5' pueden ser una fracción de membrana en bruto obtenida directamente después de la lisis de la célula o el orgánulo celular. Las vesículas 5 y 5' se forman normalmente de manera espontánea tras la lisis o ruptura de la membrana. La composición de partida 6 solo se representa esquemáticamente comprendiendo las vesículas 5 y 5' representativas, una de las cuales (5') es pequeña y puede contener únicamente lípidos de membrana, la otra (5) es de mayor tamaño y contiene las proteínas de membrana 4a y 4b, además de los lípidos de membrana 3. Las vesículas de membrana en bruto empleadas como material de partida 6 en el proceso de la invención pueden ser muy heterogéneas en cuanto a su tamaño y contenido. Normalmente no se requiere una etapa de homogeneización o de generación de vesículas particular, pero es posible. Obviamente, también puede usarse como material de partida 6 una composición que comprende vesículas de membrana en bruto más uniformes.

La figura 3a) muestra la preparación de la biblioteca 7 mostrada en la figura 3b). Las partículas 1a a 1c de la invención se preparan mezclando SAPLIP purificada 2 con vesículas de membrana en bruto 5, 5' que comprenden lípidos de membrana 3 y opcionalmente, una o más proteínas de membrana 4a y/o 4b, procediendo ambas de las membranas en bruto. Entonces, se produce el autoensamblaje X de la partícula 1, por ejemplo, a un pH de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 10,0. Las vesículas de membrana en bruto 5, 5' pueden, opcionalmente, comprender o estar asociadas con moléculas de detergente (no representadas en el presente documento). Esto mismo puede ser cierto para las moléculas de saposina 2. Los lípidos de membrana 3 asociados con las proteínas de membrana 4a y/o 4b son preferentemente de manera exclusiva una transferencia del ambiente lipídico nativo de la proteína de membrana en la membrana celular u organular antes de proporcionar las vesículas de membrana en bruto 5, 5'. En las partículas 1a y 1b, la proteína de membrana 4a y 4b se incluye en componentes de la porción hidrófoba de la membrana de la que se obtiene. Preferentemente, la proteína de membrana se encuentra en la misma conformación u otra similar a la de su estado unido a membrana nativo.

La figura 3b) muestra una biblioteca de partículas de Salipro que comprende las partículas representativas 1a, 1b y 1c. Las partículas 1a y 1b comprenden proteínas de membrana 4a, 4b. Las partículas 1a a 1c mostradas como realizaciones particulares de la invención (también representadas en más detalle en las figuras 2a) a 2f)) tienen una forma aproximadamente discoide, que tienen una bicapa lipídica plana, discoide, con forma de vagamente circular a cuadrada circunscrita por las α hélices anfipáticas de dos o tres moléculas de SAPLIP 2. Los lípidos 3 de las vesículas de membrana en bruto 5, 5' se ensamblan en una estructura similar a una bicapa discoide de tamaño diferenciado en el interior de las partículas 1a a 1c. Las SAPLIP 2 definen el límite de la bicapa discoide en las partículas 1a a 1c, cuyo interior es hidrófobo, es decir, está comprendido de cadenas de acilo graso de lípidos y carece de un núcleo hidrófilo o acuoso. Las partículas 1a a 1c se mantienen juntas principalmente por las interacciones hidrófobas de los lípidos 3 de las vesículas de membrana en bruto 5 en el núcleo de la bicapa de las partículas 1a a 1c y las interacciones hidrófobas entre los lípidos 3 de las vesículas de membrana en bruto 5 y las porciones hidrófobas de las hélices anfífilas de las SAPLIP 2 orientadas hacia el interior de la partícula. En su forma más pequeña, se cree que la partícula 1c contiene dos moléculas de SAPLIP 2 y al menos aproximadamente 2-5 moléculas de lípido 3 de las vesículas de membrana en bruto 5, 5'. Sin embargo, las partículas de la invención 1a a 1c tienen un tamaño flexible. Dependiendo del tamaño de la carga que se va a incorporar (por ejemplo, dominios lipídicos, proteínas de membrana, etc.) y la relación molar de los componentes usados en su preparación, puede

acomodar múltiples, es decir, más de dos SAPLIP 2, muchos más lípidos 3 de las vesículas de membrana en bruto 5 y opcionalmente, una o más proteínas de membrana 4a y/o 4b. Por ejemplo, la partícula puede contener de dos a veinte, en particular, de dos a diez SAPLIP 2 y opcionalmente, una o más proteínas de membrana. Dependiendo del tamaño de la proteína de membrana 4a, 4b incorporada en la partícula 1a, 1b, las partículas pueden ser sustancialmente mayores que la partícula de solo lípido 1c. En general, un aumento en el tamaño de partícula también se reflejará por el número de SAPLIP 2 por partícula, que puede ser más de dos. La partícula de la invención puede comprender, por ejemplo, de dos a veinte, en particular de dos a diez moléculas de SAPLIP 2.

Las figuras 4a) y 4b) son básicamente idénticas a las figuras 3a) y 3b) con la diferencia de que una proteína de membrana 4c con un marcador de afinidad 8 está comprendida en la vesícula de membrana en bruto 5 del material de partida 6. Como resultado del autoensamblaje Y después de la puesta en contacto de las vesículas de membrana 5, 5' con SAPLIP 2 purificadas, la biblioteca 7' obtenida comprende la partícula 1d que contiene la proteína de membrana 4c y el marcador de afinidad 8. La descripción de las figuras 3a) y b) anteriores se aplica igualmente a las figuras 4a) y b).

La figura 5 es una ilustración esquemática de una realización para el proceso de acuerdo con la invención para purificar una partícula particular de la biblioteca de la invención llevando a cabo la etapa f) como se ha descrito de manera más general anteriormente. Como material de partida, se usa la biblioteca 7' que puede obtenerse como se muestra en las figuras 4a) y b) anteriores. La biblioteca 7' se somete a una purificación por afinidad, por ejemplo, usando una columna de afinidad 9. La columna 9 contiene una entidad de reconocimiento que se une al marcador de afinidad 8. Por ejemplo, si el marcador de afinidad 8 es un marcador de His, la entidad de reconocimiento en la columna de afinidad 9 es Ni-Nta. Aunque en la figura 5 se muestra una purificación en columna, también son posibles procesos de purificación discontinuos.

El pase de la biblioteca 7' a través de la columna de afinidad 9 da lugar a la unión específica de la partícula 1d mediante su marcador de afinidad 8 a la entidad de reconocimiento en la columna 9. Las partículas 1b y 1c, así como otros componentes o restos de la biblioteca no se unen o se unen de manera tan solo inespecífica a la columna de afinidad 9. Por lo tanto, el flujo discontinuo 1.) obtenido está esencialmente libre de partículas 1d. Algunos componentes residuales de la biblioteca, tales como las partículas 1b y 1c, que pueden unirse inespecíficamente a la columna de afinidad 9 se retiran llevando a cabo al menos una etapa de lavado 2.). Finalmente, puede eluirse la partícula purificada 1d en una etapa de elución 3.) bloqueando la unión entre el marcador de afinidad 8 a la entidad de reconocimiento en la columna de afinidad 9. Dicho bloqueo puede llevarse a cabo mediante un lavado con alta salinidad, mediante escisión enzimática o, en caso de un par de marcador His/marcador de Ni-NTA/entidad de reconocimiento, con imidazol. La fracción de elución obtenida después de 3.) contiene la partícula 1d de la invención en forma purificada.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos sirven para explicar adicionalmente la invención en más detalle, específicamente por referencia a ciertas realizaciones y figuras que, sin embargo, no pretenden limitar la presente divulgación.

Se usarán las siguientes abreviaturas:

GF-tampón, pH 7,5:	HEPES 20 mM, pH 7,4 y NaCl 150 mM
GFP:	Proteína fluorescente verde
Glut5:	Transportador, proteína de membrana
HEPES:	ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico
His:	Histidina
Tampón HN:	HEPES 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4
Tampón HN-D:	Tampón NH que contiene DDM al 0,2 %
M:	molar
TA:	temperatura ambiente
SEC:	cromatografía de exclusión por tamaños
TCEP:	tris(2-carboxietil)fosfina
TEV:	virus del grabado del tabaco
Tris:	Tris(hidroximetil)aminometano

La saposina A purificada usada en los experimentos a continuación se preparó como se expone a continuación. La expresión de proteína de saposina A se llevó a cabo usando un vector con la región codificante para saposina A humana (SEQ ID NO: 1) insertada en un plásmido pNIC-Bsa4 y se transformó y expresó 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 indujeron con IPTG 0,7 mM. Tres horas después de la inducción, las células se recogieron por centrifugación a 12.000 x g durante 15 min. Se desechó el sobrenadante, el sedimento celular se resuspendió

usando tampón de lisis (Hepes 20 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, imidazol 20 mM) y se homogeneizaron mediante tratamiento con ondas sonoras. 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 de una etapa de centrifugación adicional a 26.000 x g durante 30 min. La purificación por IMAC preparativa se llevó a cabo mediante adsorción discontinua del sobrenadante mediante rotación de extremo a extremo con medio Ni Sepharose™ 6 Fast Flow durante 60 min. Después de la unión de saposina A a la resina de IMAC, se empaquetó el medio de cromatografía en una columna abierta de flujo por gravedad de 10 mm (d.i.) y las proteínas no unidas se retiraron 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 (Hepes 20 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, imidazol 40 mM). La saposina A se eluyó mediante la adición de cinco volúmenes de lecho de tampón de elución EB (HEPES 20 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, imidazol 400 mM). El eluato se sometió a diálisis durante una noche frente a tampón de filtración en gel GF, pH 7,5 (HEPES 20 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM) suplementado con proteasa TEV recombinante. La proteasa TEV que contenía un marcador de His no escindible se retiró del eluato haciéndola pasar sobre 2 ml de resina IMAC. Las proteínas diana escindidas se concentraron hasta un volumen de 5 ml usando unidades de filtro de centrifugación y se cargaron en una columna HiLoad Superdex™ 200 16/60 GL usando un sistema de cromatografía AKTAexplorer™ 10 (ambos de GE Healthcare). Las fracciones de pico se reunieron y concentraron hasta 1,2 mg/ml de proteína. La muestra de proteína se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenó a -80 °C.

Ejemplo 1a

Se obtuvieron fracciones de membrana de células de levadura en bruto de células de levadura que expresan GFP-GLUT5. La fracción de membrana, que contenía vesículas de membrana en bruto formadas espontáneamente, se incubó con detergente y saposina A, seguido de la retirada de las micelas de detergente usando cromatografía de filtración en gel/cromatografía de exclusión por tamaños (SEC) en tampón libre de detergente. Esto da lugar al autoensamblaje de los componentes de membrana presentes en la mezcla inicial en una biblioteca de partículas de Salipro a escala nanométrica. En particular, se pudieron identificar en esta biblioteca partículas de Salipro monodispersas que comprenden lípidos de membrana y GFP-GLUT5.

1. Preparación de la membrana

Las membranas de levadura en bruto se obtuvieron de células de levadura que expresan GLUT5 de rata a partir de un vector pDDGFP2 para GFP-His8 2 μ escindible por TEV e inducible por GAL1 conocido en la técnica anterior. El vector se transformó en la cepa de *S. cerevisiae* FGY217 (MATa, ura3-52, lys2Δ201 y pep4Δ) que después sobreexpresó GFP-GLUT5 en su membrana celular.

Para generar membranas en bruto, se recogieron las células de cultivos de *S. cerevisiae* de 12 l, se resuspendieron en tampón que contenía Tris-HCl 50 mM a pH 7,6, EDTA 1 mM, sorbitol 0,6 M y se lisaron mediante homogeneización mecánica. Las membranas se aislaron mediante ultracentrifugación a 195.000 g durante 3 h, se homogeneizaron el Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, sacarosa 0,3 M, CaCl₂ 0,1 mM, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C.

2. Preparación de bibliotecas de partículas de Salipro

Se mezclaron 20 μl de membranas de levadura en bruto que contenían vesículas de membrana en bruto formadas espontáneamente que portaban, *entre otras cosas*, GFP-GLUT5 con 60 μl de tampón HN (HEPES 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4) y 20 μl de tampón HN suplementado con DDM al 5 %, seguido de incubación a 4 °C durante 1 h. Después, se limpiaron los restos y los agregados de proteína del lisado de membrana mediante ultracentrifugación usando un rotor TLA-55 a 47krpm (100.000 g) durante 30 min. Después, se mezclaron 5 μl de la fracción de membrana aclarada con cantidades crecientes (5-10-20-30-40 μl) de saposina A (1,2 mg/ml, tampón HN) y se incubó 5 min a 37 °C para permitir el autoensamblaje de las partículas de Salipro. Los únicos lípidos presentes en la configuración son los procedentes de membranas en bruto y vesículas de membrana en bruto.

Posteriormente, se ajustó el volumen de muestra a 50ul con tampón HN y se centrifugó 10 min a 13 krpm. Se llevó a cabo un análisis por SEC (usando un sistema de HPLC Shimadzu): se inyectaron 35 μl de muestra a una columna de aumento 5/150 Superose6 (GE Healthcare) a un caudal de 0,3 ml/min y se monitorizó en línea la presencia del marcador fluorescente de GFP. El tampón de SEC consistió en tampón NH sin detergente.

Como control negativo, se omitió por completo la saposina A de la configuración experimental (0 ul de SapA), el volumen se ajustó a 50 μl usando tampón NH y después se trató la muestra como se ha descrito anteriormente.

3. Resultados

Los resultados, que se representan en la figura 6, demuestran que es posible incorporar y estabilizar lípidos de membrana y proteínas de membrana, tales como GFP-GLUT5, a partir de membranas celulares en bruto en partículas de Salipro, mostrando un pico monodisperso. Las cantidades crecientes de saposina mejoran la eficiencia de incorporación y la monodispersidad del pico. Por consiguiente, la Saposina A, los lípidos de las membranas en

bruto y GFP-GLUT5 se asocian de tal modo que forman partículas hidrosolubles con una proteína de membrana incorporada. Aunque solo se monitorizó GFP-GLUT5 en el análisis de SEC mediante su fluorescencia, la biblioteca de partículas de Salipro obtenida también contiene una plétora de otras partículas de Salipro que portan el proteoma y lipidoma de membrana restante de la célula de levadura de la que se obtuvo la fracción de membrana en bruto.

5 Por ejemplo, esto puede confirmarse mediante espectrometría de masas, SDS-PAGE y/o sondando con anticuerpos que se unen a otras proteínas de membrana nativas y a lípidos presentes en la biblioteca de partículas de Salipro obtenida.

10 Como control negativo, en ausencia de saposina en la configuración, GFP-GLUT5 (y, por consiguiente, también el resto de proteínas de membrana) no es soluble y se agrega (véase el pico vacío elevado).

Ejemplo 1b

1. Configuración

15 Se prepararon membranas de levadura en bruto que contenían vesículas de membrana en bruto y GLUT5 de rata como se ha descrito en el ejemplo 1a.

2. Variación del proceso para la formación de la biblioteca de partículas de Salipro.

20 Se evaluaron dos estrategias diferentes para producir las partículas de Salipro-GFP-GLUT5 a partir de extracto de membrana en bruto.

25 Para la primera estrategia, se añadieron 25 μ l de saposina A (0,75 mg/ml) a 1 μ l de extracto de membrana en bruto que contenía vesículas de membrana en bruto y GFP-GLUT5 y se incubaron durante 5 min a 37 °C. Posteriormente, se añadieron 24 μ l de tampón HN-D a la mezcla y se incubó durante 5 min adicionales a 37 °C. Después, se centrifugó la muestra durante 10 min a 13 krpm y se llevó a cabo el análisis de SEC como en el ejemplo 1a.

30 Para la segunda estrategia, 1 μ l de extracto de membrana en bruto que contenía vesículas de membrana en bruto y GFP-GLUT5 se suplementó en primer lugar añadiendo 24 μ l de tampón HN-D, seguido de incubación a 37 °C durante 5 min. Después, la muestra se centrifugó durante 10 min a 13 krpm. Se recogió la suspensión de lisado y se añadieron 25 μ l de saposina A (0,75 mg/ml) y se incubó durante 5 min adicionales a 37 °C. Después, se analizó la muestra mediante SEC como se ha descrito en el ejemplo 1a.

3. Resultados

Los datos mostrados en la figura 7 demuestran que ambas estrategias funcionan para obtener bibliotecas de partículas de Salipro con partículas de Salipro-GFP-GLUT5 solubles, independientemente de si se añadió saposina A antes o después de la incubación de las membranas en bruto con tampón HN-D a 37 °C durante 5 min. En ambos

40 casos, los lípidos naturales de las membranas en bruto siguen presentes. De manera interesante, cuando se añade saposina A directamente a membranas en bruto, solo se observa muy poca agregación de proteína en el volumen vacío. De manera importante, ambos métodos funcionan, lo que otorga cierta flexibilidad al proceso cuando se reconstituyen las bibliotecas de partículas de Salipro a partir de extractos de membrana en bruto complejos.

45

Ejemplo 2

1. Configuración

50 Se prepararon membranas de levadura en bruto que contenían GFP-GLUT5 de rata y vesículas de membrana en bruto como se describe en el ejemplo 1a.

2. Formación de Salipro, titulación

55 Se mezclaron 20 μ l de membranas de levadura en bruto y se solubilizaron con 60 μ l de tampón HN y 20 μ l de tampón HN suplementado con DDM al 5 % a 4 °C durante 1 h. Después, se aclararon los restos y agregados de proteínas del lisado de membrana mediante ultracentrifugación usando un rotor TLA-55 a 47krpm (100.000 g) durante 30 min. 5 μ l del lisado de membrana aclarado, que contenía vesículas de membrana en bruto, se mezcló posteriormente con diferentes volúmenes (12, 20, 30 y 40 μ l) de saposina A (4 mg/ml, tampón HN) y se incubó 5 min a 37 °C. Posteriormente, se ajustaron los volúmenes de muestra a 50 μ l con tampón HN y se centrifugaron 10 min a 60 13 krpm. Se llevó a cabo un análisis por SEC (usando un sistema de HPLC Shimadzu) y se inyectaron 35 μ l de muestra a una columna de aumento 5/150 Superdex 200 (GE Healthcare) con un caudal de 0,3 ml/min y se monitorizó en línea la presencia del marcador fluorescente de GFP. De nuevo, la SEC se llevó a cabo usando tampón HN, en ausencia de detergente, para facilitar la reconstitución de proteínas de membrana en las partículas de Salipro.

65

5 Como control, se mezclaron 5 µl del lisado de membrana aclarado con 45 µl de tampón NH suplementado con DDM al 0,03 % y se centrifugaron 10 min a 13 krpm. Se llevó a cabo un análisis por SEC (usando un sistema de HPLC Shimadzu) en tampón NH que contiene DDM al 0,03 % y se inyectaron 35 µl de muestra a una columna de aumento 5/150 Superdex 200 (GE Healthcare) con un caudal de 0,3 ml/min y se monitorizó en línea la presencia del marcador fluorescente de GFP. El fin de esta muestra de control (muestra de control de rendimiento) fue actuar como punto de referencia para determinar la cantidad de GFP-GLUT5 que podía solubilizarse en la presencia permanente de detergente, a diferencia del rendimiento de GFP-GLUT5 reconstituido en partículas de Salipro en un sistema tampón sin detergente.

10 **3. Resultados**

Los resultados representados en la figura 8 muestran que un aumento de la cantidad de saposina A mejora las cantidades de GFP-GLUT5 reconstituidas en las partículas de Salipro de la biblioteca.

15 Para cuantificar los rendimientos de reconstitución, se comparó el porcentaje del valor del pico de GFP-GLUT5 de la "muestra de control de rendimiento" con los valores del pico de las muestras reconstituidas. Esto mostró que un 36 % de GFP-GLUT5 se reconstituyó para la muestra de 12 µl de SapA, un 57 % para la muestra de 20 µl de SapA, un 65 % para la muestra de 30 µl de SapA y un 74 % para la muestra de 40 µl de SapA. En conjunto, esto demuestra que es posible aumentar la incorporación de proteínas de membrana a partir de membranas en bruto en
20 partículas de Salipro con cantidades crecientes de saposina.

Ejemplo 3:

Se analizó la solubilidad de los componentes de proteína de membrana de Salipro de la biblioteca

25

1. Antecedentes

Las membranas en bruto contienen una plétora de diferentes proteínas de membrana. En el proceso de acuerdo con la invención, no solo GFP-GLUT5 marcado fluorescentemente, sino también las diversas proteínas de membrana de levadura diferentes de las membranas en bruto se incorporan en las partículas de Salipro. En ausencia de detergente, la fracción de proteína de membrana no es soluble y se agrega en sistemas tampón sin detergente, dando lugar a la formación de un gran pico vacío en el análisis por SEC. Sin embargo, una vez incluidas en las partículas de Salipro, se pudo demostrar que las proteínas de membrana presentes en la biblioteca de partículas de Salipro permanecían solubles en sistemas tampón sin detergente.

35

2. Configuración

En la misma configuración experimental que en el ejemplo 1a, en este caso se analizaron las señales de SEC basándose en la absorción UV a 280nm en lugar de la fluorescencia de GFP, enfocándose (ampliación) en el pico vacío, lo que indica proteínas de membrana agregadas.

40

3. Resultados

En ausencia de saposina, las proteínas de membrana de las membranas en bruto se agregan en sistemas tampón sin detergente, como se indica por un gran pico vacío que aparece en el análisis de SEC aproximadamente en el minuto 4 (véase la figura 9, 0 µl de SapA).

45

Por el contrario, al aumentar la cantidad de saposina que se añade al lisado, se reduce de manera correspondiente la cantidad de proteínas de membrana agregadas. Esto indica que las proteínas de membrana permanecían solubles debido a la incorporación en las partículas de Salipro de la biblioteca de proteoma de membrana obtenida. Obsérvese que prácticamente no se detectaron agregados de proteína en la muestra que contenía la mayor cantidad de saposina (figura 9, 40 µl de SapA).

50

En conjunto, estos datos indican que después de someterse al método de la invención, todas las proteínas de membrana de las vesículas de membrana en bruto permanecen solubles tras retirar el detergente en un ambiente sin detergente, debido a la reconstitución con éxito en una biblioteca de nanopartículas de Salipro correspondientes. Por tanto, es posible generar una biblioteca de partícula de Salipro-proteína de membrana/proteoma y/o lípido de membrana/lipidoma procedente de membrana en bruto.

55

60 **Ejemplo 4:**

Se analizó la solubilidad de los componentes lipídicos de membrana de Salipro de la biblioteca

65

1. Configuración

En la misma configuración experimental que en el ejemplo 1a, se llevó a cabo un análisis de SEC diferente

(obsérvese la diferencia en la escala del eje y el punto de corte con el eje en la figura 9 y 10), enfocándose (ampliación) en los picos que proceden a partir de saposina monomérica y partículas de Salipro de solo lípido.

2. Resultados

5 Los resultados representados en la figura 10 indican que la adición de saposina A a las membranas en bruto da lugar a la formación no solo de partículas de Salipro que contienen proteína de membrana, sino también de partículas de Salipro de solo lípido (es decir, "vacías"). Las cantidades crecientes de saposina (5, 10, 20, 30 y 40 µl) también dan lugar a la formación aumentada de partículas de Salipro de solo lípido. El análisis por SEC revela un pico que se origina a partir de partículas de Salipro de solo lípido a los 7,6 min (indicado), mientras que el pico correspondiente de saposina monomérica ("saposina libre") aparece a los 8,2 min (indicado). Los datos indican que los lípidos de membrana en bruto permiten la formación de partículas de Salipro de solo lípido a pH neutro.

15 Como control negativo, se analizó una muestra en ausencia de saposina (0 µl de SapA).

Este experimento usando cantidades crecientes de saposina se llevó a cabo en una columna Superose 6 5/150 (GE Healthcare). Debido a que en la separación por SEC los dos picos relacionados con saposina no están bien separados, se repitió el experimento con una columna Superdex 200 5/150 (GE Healthcare) (figura 11).

20 Una muestra se preparó exactamente como se ha descrito en el ejemplo 2 para la muestra de "12 µl de SapA" (denominada en la figura 11 como "Sap + membrana en bruto"). Esta vez, el análisis por SEC se llevó a cabo usando absorbancia UV a 280 nm. Como primer control, una muestra contenía solo saposina A para indicar la posición de saposina monomérica libre de lípidos en el perfil de SEC. Una segunda muestra de control contenía partículas de saposina A obtenidas mediante el método descrito en el documento WO 2014/095576 A1, es decir, incubando saposina A con lípidos purificados.

Los datos presentados en el presente documento demuestran claramente que tanto el lipidoma como el proteoma de membrana celular pueden incorporarse en partículas de Salipro para formar las respectivas bibliotecas.

30 **Ejemplo 5:**

En este ejemplo, se preparó una biblioteca de partículas de Salipro como se describe en los ejemplos anteriores, sin embargo, solo se usaron tampones HN sin detergente. Este experimento también dio como resultado la incorporación exitosa de GFP-GLUT5 a partir de membranas en bruto en partículas de Salipro.

35

Ejemplo 6: Purificación de partículas de saposina específicas a partir de las bibliotecas

En este ejemplo, se prepara una biblioteca de proteínas de membrana obtenida de acuerdo con el ejemplo 3. Las partículas de Salipro de la biblioteca abarcan esencialmente el proteoma completo de levadura y también incluyen partículas de Salipro que comprenden GFP-GLUT5. Estas últimas partículas se purifican mediante el marcador de GFP-His8 escindible por TEV presente en la construcción de GFP-Glut5.

40

La biblioteca se somete a una purificación por afinidad de Ni-NTA (por ejemplo, Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de las etapas de lavado prescritas, las partículas de Salipro que contienen GFP-GLUT5 se evalúan mediante escisión con proteasa TEV o imidazol.

45

LISTADO DE SECUENCIAS

50 <110> Frauenfeld, Jens
<120> Partículas de Salipro
<130> 161605WO
55 <160> 46
<170> PatentIn versión 3.5
60 <210> 1
<211> 81
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 1

ES 2 797 257 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

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

5

<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

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

10

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

15

<400> 3

ES 2 797 257 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

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

10 <210> 5
 <211> 145
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 5

ES 2 797 257 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

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

ES 2 797 257 T3

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

5 <210> 7
 <211> 77
 <212> PRT
 <213> *Entamoeba histolytica*

<400> 7

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

Asp Leu Val Leu Gly Gly Ala Val Asp Lys Val Thr Asp Tyr Leu Glu
 20 25 30

Thr Leu Cys Ala Lys Ala Asp Gly Leu Val Glu Thr Leu Cys Thr Lys
 35 40 45

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

Gly Ser Ala Lys Leu Ile Cys Gly Leu Ile His Ala Cys
 65 70 75

10 <210> 8
 <211> 75
 <212> PRT
 <213> *Entamoeba dispar*

15 <400> 8

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

ES 2 797 257 T3

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

Cys Ala Lys Ala Asp Gly Val Ile Glu Thr Val Cys Ser Lys Ile Val
 35 40 45

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

Ala Lys Leu Ile Cys Gly Leu Ile His Ala Cys
 65 70 75

<210> 9

<211> 77

5 <212> PRT

<213> *Entamoeba histolytica*

<400> 9

Gly Ala Ile Leu Cys Asn Leu Cys Lys Asp Thr Val Lys Leu Val Glu
 1 5 10 15

Asn Leu Leu Thr Val Asp Gly Ala Gln Ala Val Arg Gln Tyr Ile Asp
 20 25 30

Asn Leu Cys Gly Lys Ala Ser Gly Phe Leu Gly Thr Leu Cys Glu Lys
 35 40 45

Ile Leu Ser Phe Gly Val Asp Glu Leu Val Lys Leu Ile Glu Asn His
 50 55 60

Val Asp Pro Val Val Val Cys Glu Lys Ile His Ala Cys
 65 70 75

10 <210> 10
 <211> 75

<212> PRT

<213> *Entamoeba dispar*

15 <400> 10

Gly Leu Cys Asn Leu Cys Lys Asp Thr Val Asn Leu Ile Glu Asn Leu
 1 5 10 15

Leu Thr Val Asp Gly Ala Gln Ala Val Arg Gln Tyr Ile Asp Asn Leu
 20 25 30

Cys Ala Lys Ala Asp Gly Phe Leu Gly Thr Leu Cys Asn Lys Ile Leu
 35 40 45

Ser Phe Gly Val Asp Glu Leu Val Lys Leu Ile Glu Asn His Val Asp

ES 2 797 257 T3

50

55

60

Pro Val Val Ile Cys Glu Lys Ile His Ala Cys
65 70 75

5
<210> 11
<211> 77
<212> PRT
<213> *Entamoeba histolytica*

<400> 11

Gly Glu Ile Leu Cys Asn Leu Cys Thr Gly Leu Ile Asn Thr Leu Glu
1 5 10 15

Asn Leu Leu Thr Thr Lys Gly Ala Asp Lys Val Lys Asp Tyr Ile Ser
20 25 30

Ser Leu Cys Asn Lys Ala Ser Gly Phe Ile Ala Thr Leu Cys Thr Lys
35 40 45

Val Leu Asp Phe Gly Ile Asp Lys Leu Ile Gln Leu Ile Glu Asp Lys
50 55 60

10
Val Asp Ala Asn Ala Ile Cys Ala Lys Ile His Ala Cys
65 70 75

15
<210> 12
<211> 75
<212> PRT
<213> *Entamoeba dispar*

<400> 12

Ile Val Cys Asn Leu Cys Thr Gly Leu Ile Asn Thr Leu Glu Asn Leu
1 5 10 15

Leu Thr Thr Lys Gly Ala Asp Lys Val Lys Asp Tyr Ile Asp Ser Leu
20 25 30

Cys Asn Lys Ala Ser Gly Phe Ile Ala Thr Leu Cys Thr Lys Val Leu
35 40 45

Asp Phe Gly Val Asp Lys Leu Ile Gln Leu Ile Glu Asp Lys Val Asp
50 55 60

20
Ala Asn Ala Ile Cys Ala Lys Ile His Ala Cys
65 70 75

<210> 13
<211> 83
<212> PRT

ES 2 797 257 T3

<213> Sus scrofa

<400> 13

Gly Leu Ile Cys Glu Ser Cys Arg Lys Ile Ile Gln Lys Leu Glu Asp
1 5 10 15

Met Val Gly Pro Gln Pro Asn Glu Asp Thr Val Thr Gln Ala Ala Ser
20 25 30

Arg Val Cys Asp Lys Met Lys Ile Leu Arg Gly Val Cys Lys Lys Ile
35 40 45

Met Arg Thr Phe Leu Arg Arg Ile Ser Lys Asp Ile Leu Thr Gly Lys
50 55 60

Lys Pro Gln Ala Ile Cys Val Asp Ile Lys Ile Cys Lys Glu Lys Thr
65 70 75 80

5 Gly Leu Ile

<210> 14

<211> 78

<212> PRT

10 <213> Sus scrofa

<400> 14

Gly Tyr Phe Cys Glu Ser Cys Arg Lys Ile Ile Gln Lys Leu Glu Asp
1 5 10 15

Met Val Gly Pro Gln Pro Asn Glu Asp Thr Val Thr Gln Ala Ala Ser
20 25 30

Gln Val Cys Asp Lys Leu Lys Ile Leu Arg Gly Leu Cys Lys Lys Ile
35 40 45

Met Arg Ser Phe Leu Arg Arg Ile Ser Trp Asp Ile Leu Thr Gly Lys
50 55 60

Lys Pro Gln Ala Ile Cys Val Asp Ile Lys Ile Cys Lys Glu
65 70 75

15 <210> 15

<211> 83

<212> PRT

20 <213> Equus caballus

<400> 15

ES 2 797 257 T3

Gly Ile Ala Cys Trp Ser Cys Arg Lys Ile Leu Gln Lys Leu Glu Asp
 1 5 10 15

Leu Val Gly Glu Gln Pro Asn Glu Ala Thr Ile Asn Glu Ala Ala Ser
 20 25 30

Arg Val Cys Arg Asn Leu Gly Leu Leu Arg Gly Ala Cys Lys Lys Ile
 35 40 45

Met Arg Thr Cys Leu Arg Leu Ile Ser Arg Asp Ile Leu Ala Gly Lys
 50 55 60

Lys Pro Gln Glu Val Cys Val Asp Ile Lys Leu Cys Lys His Lys Ala
 65 70 75 80

Gly Leu Ile

5 <210> 16
 <211> 84
 <212> PRT
 <213> Bos taurus
 <400> 16

Gly Leu Leu Cys Gly Ser Cys Gln Arg Ile Ile Gln His Leu Met Asp
 1 5 10 15

Lys Leu Gly Asp Gln Pro Asp Glu Asn Thr Val Ile Glu Ala Ala Ser
 20 25 30

Lys Val Cys Gly Lys Met Gly Pro Leu Lys Gly Leu Cys Lys Ser Ile
 35 40 45

Thr Lys Arg Phe Leu Arg Arg Ile Ala Ala Asp Ile Thr Ala Gly Lys
 50 55 60

Thr Ser Arg Val Val Cys Glu Asp Ile Lys Met Cys Lys Ser Lys Pro
 65 70 75 80

10 Val Gly Phe Ile

15 <210> 17
 <211> 81
 <212> PRT
 <213> *Fasciola hepatica*
 <400> 17

Glu Glu Pro His Leu Asp Ile Ser Leu Cys Glu Ser Cys Thr Asn Thr

ES 2 797 257 T3

Trp Val Glu Ser Asn Asp Thr Ile Met Thr Leu Glu Lys Lys Leu Glu
 20 25 30

Gln Val Cys Ser Val Ile Pro Gly Gln Tyr Ser Ala Leu Cys Thr Tyr
 35 40 45

Ala Val Glu Gln Tyr Leu Pro Ile Phe Ile His Gln Val Glu Lys Gln
 50 55 60

Phe Pro Ala Leu Thr Ile Cys Gln Asp Val His Leu Cys Ser Ser Ala
 65 70 75 80

Gln Ala Ala

<210> 20

<211> 73

5 <212> PRT

<213> *Clonorchis sinensis*

<400> 20

Cys Lys His Cys Lys Thr Leu Val Gly Arg Ile Gln Asp Cys Trp Gln
 1 5 10 15

Lys Gly Arg Ala Lys Ser Phe Val Glu Lys Thr Leu Ile Phe Leu Cys
 20 25 30

Lys Leu Thr Gly His Ser Glu Glu Gln Cys Thr Glu His Ala Glu Glu
 35 40 45

Phe Met Lys His Leu Asp Asp Trp Ile Thr Gly Lys Thr Pro Glu Glu
 50 55 60

Leu Cys Arg Ser Leu His Met Cys Lys
 65 70

10

<210> 21

<211> 83

15 <212> PRT

<213> *Naegleria fowleri*

<400> 21

Pro Ser Glu Phe Cys Asp Val Cys Lys Tyr Ala Val Gln Gln Val Asp
 1 5 10 15

Gln Leu Ala Leu Gln Asn Glu Ala Ala Ile Gln Asn Ala Leu Leu Ala
 20 25 30

ES 2 797 257 T3

Ala Cys Gln Gln Leu Gly Asp Asn Gln Phe Gly Lys Ile Cys Asn Thr
 35 40 45

Val Val Leu Val Tyr Gly Asn Glu Leu Val Asn Ala Leu Val Thr Tyr
 50 55 60

Glu Asn Pro Thr Arg Val Cys Ser Glu Gln Leu Pro Leu Cys Pro Lys
 65 70 75 80

Asn Asn Thr

5 <210> 22
 <211> 88
 <212> PRT
 <213> *Caenorhabditis elegans*
 <400> 22

Asn Pro Ala Asn Pro Leu Asn Leu Lys Lys His His Gly Val Phe Cys
 1 5 10 15

Asp Val Cys Lys Ala Leu Val Glu Gly Gly Glu Lys Val Gly Asp Asp
 20 25 30

Asp Leu Asp Ala Trp Leu Asp Val Asn Ile Gly Thr Leu Cys Trp Thr
 35 40 45

Met Leu Leu Pro Leu His His Glu Cys Glu Glu Glu Leu Lys Lys Val
 50 55 60

Lys Lys Glu Leu Lys Lys Asp Ile Glu Asn Lys Asp Ser Pro Asp Lys
 65 70 75 80

10 Ala Cys Lys Asp Val Asp Leu Cys
 85

15 <210> 23
 <211> 83
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 23

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

ES 2 797 257 T3

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 Leu Gln

5 <210> 24
 <211> 83
 <212> PRT
 <213> Bos taurus
 <400> 24

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

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

Arg 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 Met Ile Lys Gly
 50 55 60

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

10 Ser Leu Gln

15 <210> 25
 <211> 83
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 25

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

Leu Leu Lys Asp Asn Ala Thr Gln Glu Glu Ile Leu His Tyr Leu Glu
 20 25 30

Lys Thr Cys Glu Trp Ile His Asp Ser Ser Leu Ser Ala Ser Cys Lys

ES 2 797 257 T3

35

40

45

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

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

Ser Leu Gln

5

<210> 26
 <211> 83
 <212> PRT
 <213> Gallus gallus

<400> 26

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

Val Leu Lys Asp Asn Gly Thr Glu Asp Glu Ile Arg Ser Tyr Leu Glu
 20 25 30

Lys Thr Cys Glu Phe Leu Pro Asp Gln Gly Leu Ala Ser Glu Cys Lys
 35 40 45

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

Glu Phe Asp Lys Pro Glu Val Val Cys Ser Ala Leu Ser Leu Cys Gln
 65 70 75 80

Ser Leu Gln

10

<210> 27
 <211> 83
 <212> PRT
 <213> Danio rerio

<400> 27

Thr Val Pro Cys Asp Leu Cys Lys Glu Val Leu Val Val Val Glu Gln
 1 5 10 15

Leu Leu Lys Asp Asn Val Thr Glu Ser Glu Leu Leu Gly Tyr Leu Glu
 20 25 30

Lys Ala Cys Gln Leu Ile Pro Asp Glu Gly Leu Ala Asn Gln Cys Lys
 35 40 45

ES 2 797 257 T3

Glu Ile Val Asp Asn Tyr Phe Pro Val Leu Met Gly Ile Ile Gln Gly
 50 55 60

Glu Leu Asp Asp Pro Gly Val Val Cys Gly Ala Leu Gly Leu Cys Val
 65 70 75 80

Ser Gln Gln

5 <210> 28
 <211> 83
 <212> PRT
 <213> *Xenopus laevis*
 <400> 28

Ser Met Pro Cys Asp Phe Cys Lys Glu Val Val Thr Val Leu Gly Asn
 1 5 10 15

Tyr Leu Lys Asp Asn Ile Thr Gln Asp Glu Ile Lys Gln Tyr Leu Asn
 20 25 30

Lys Val Cys Asp Phe Ile Pro Asp Pro Gly Leu Ala Ser Thr Cys Lys
 35 40 45

Gln Glu Val Ser Asp Tyr Phe Thr Ile Val Leu Asn Leu Leu Glu Gln
 50 55 60

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

Ser Leu Gln

10 <210> 29
 <211> 80
 <212> PRT
 15 <213> *Homo sapiens*
 <400> 29

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

ES 2 797 257 T3

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

<210> 30
 <211> 79
 <212> PRT
 <213> Bos taurus

5

<400> 30

Asp Ile Tyr Cys Glu Val Cys Glu Phe Val Val Lys Glu Val Ala Lys
 1 5 10 15

Leu Ile Asp Asn Asn Arg Thr Glu Glu Glu Ile Leu His Ala Leu Asp
 20 25 30

Lys Val Cys Ser Lys Leu Pro Thr Ser Leu Ala Glu Gln Cys Gln Glu
 35 40 45

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

Ala Ser Pro Glu Leu Val Cys Ser Met Leu His Leu Cys Ser Ser
 65 70 75

10

<210> 31
 <211> 79
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

15

<400> 31

Val Ile Leu Cys Gln Thr Cys Gln Phe Val Met Asn Lys Phe Ser Glu
 1 5 10 15

Leu Ile Val Asn Asn Ala Thr Glu Glu Leu Leu Val Lys Gly Leu Ser
 20 25 30

Asn Ala Cys Gly Val Leu Pro Asp Pro Ala Arg Thr Lys Cys Gln Glu
 35 40 45

Val Val Gly Thr Phe Gly Pro Ser Leu Leu Asp Ile Phe Ile His Glu
 50 55 60

Val Asn Pro Ser Ser Leu Cys Gly Val Ile Gly Leu Cys Ala Ala
 65 70 75

20

<210> 32

ES 2 797 257 T3

<211> 80
 <212> PRT
 <213> Gallus gallus

5 <400> 32

Phe Ser Val Cys Glu Ile Cys Glu Thr Met Val Lys Glu Val Thr Gly
 1 5 10 15
 Leu Leu Glu Ser Asn Lys Thr Glu Glu Glu Ile Val His Glu Met Glu
 20 25 30
 Val Val Cys Tyr Leu Leu Pro Ala Ser Val Lys Asp Gln Cys Lys Asp
 35 40 45
 Phe Ile Glu Val Tyr Gly Gln Ala Leu Ile Asp Met Leu Leu Glu Ala
 50 55 60
 Thr Asn Pro Glu Ala Val Cys Val Met Leu Lys Cys Cys Ala Ala Asn
 65 70 75 80

<210> 33
 <211> 79
 <212> PRT
 <213> *Xenopus laevis*

10

<400> 33

15

Asn Val Leu Cys Glu Val Cys Glu Leu Met Val Ser Gln Leu Glu Lys
 1 5 10 15
 Leu Leu Asp Asn Asn Arg Thr Arg Glu Asn Ile Lys His Gly Leu Glu
 20 25 30
 Lys Val Cys Lys Leu Leu Pro Ser Gln Tyr Thr Gln Lys Cys Glu Asp
 35 40 45
 Met Ile Glu Glu Tyr Ser Asp Ala Leu Ile Glu Leu Leu Glu Gln Glu
 50 55 60
 Ala Asn Pro Gln Ala Ile Cys Thr Ala Leu Gly Tyr Cys Ser Gly
 65 70 75

<210> 34
 <211> 79
 <212> PRT
 <213> *Danio rerio*

20

<400> 34

25

Ser Pro Gln Cys Ala Ile Cys Glu Tyr Val Met Lys Glu Ile Glu Asn
 1 5 10 15

ES 2 797 257 T3

Met Ile Gln Asp Gln Thr Ser Glu Ala Glu Ile Val Gln Ala Val Glu
 20 25 30

Lys Val Cys Asn Ile Leu Pro Ser Thr Leu Thr Ala Gln Cys Lys Asp
 35 40 45

Leu Ile Glu Thr Tyr Gly Gln Ala Ile Ile Asp Leu Leu Val Gln Glu
 50 55 60

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

<210> 35
 <211> 81
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 35

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

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

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

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

Met Asp Pro Ser Phe Val Cys Leu Lys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Ala
 65 70 75 80

His

10

<210> 36
 <211> 81
 <212> PRT
 <213> *Bos taurus*

15

<400> 36

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

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

ES 2 797 257 T3

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

Phe Val Thr Glu Tyr Glu Pro Val Leu Ile Glu Ile Leu Val Glu Val
 50 55 60

Met Asp Pro Ser Phe Val Cys Leu Lys Ile Gly Ala Cys Pro Ala Ala
 65 70 75 80

His

5 <210> 37
 <211> 81
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 37

Gly Gly Phe Cys Glu Val Cys Lys Lys Leu Val Leu Tyr Leu Glu His
 1 5 10 15

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

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

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

Met Asp Pro Gly Phe Val Cys Ser Lys Ile Gly Val Cys Pro Ser Ala
 65 70 75 80

Tyr

10
 15 <210> 38
 <211> 81
 <212> PRT
 <213> Gallus gallus

<400> 38

Gly Gly Phe Cys Asp Ile Cys Lys Met Ile Val Ala Tyr Ala Asp Lys
 1 5 10 15

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

ES 2 797 257 T3

Lys Val Cys His Phe Leu Pro Glu Ser Val Ser Asp Gln Cys Val Gln
 35 40 45

Phe Val Glu Gln Tyr Glu Pro Val Val Val Gln Leu Leu Ala Glu Met
 50 55 60

Met Asp Pro Thr Phe Val Cys Thr Lys Leu Gly Val Cys Gly Ala Ala
 65 70 75 80

Lys

5 <210> 39
 <211> 81
 <212> PRT
 <213> Danio rerio
 <400> 39

Gly Gly Phe Cys Asp Val Cys Lys Met Ala Val Arg Tyr Val Asp Gly
 1 5 10 15

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

Lys Val Cys Ser Phe Leu Pro Asp Ala Val Lys Asp Glu Cys Asn Gln
 35 40 45

Leu Ile Glu Gln Tyr Glu Pro Leu Leu Val Gln Leu Leu Leu Gln Thr
 50 55 60

Leu Asp Pro Asp Phe Val Cys Met Lys Leu Gly Ala Cys Pro Glu Ala
 65 70 75 80

10 Val

<210> 40
 <211> 81
 <212> PRT
 15 <213> *Xenopus laevis*
 <400> 40

Gly Asp Tyr Cys Ala Val Cys Lys Met Leu Met Arg Tyr Val Asp Glu
 1 5 10 15

Leu Leu Glu Lys Asn Ala Thr Glu Ile Arg Ile Lys Ala Phe Leu Gly
 20 25 30

Arg Ile Cys Asn Phe Leu Pro Asp Ser Met Gln Asn Glu Cys Ser Ala

ES 2 797 257 T3

35

40

45

Leu Val Asn Glu Tyr Glu Pro Leu Phe Ile Gln Leu Leu Leu Glu Ala
50 55 60

Leu Asp Pro Ser Phe Ile Cys Ile Lys Val Asn Leu Cys Gln Asn Lys
65 70 75 80

Lys

<210> 41
<211> 79
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 41

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

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

10

<210> 42
<211> 79
<212> PRT
<213> *Bos taurus*

15

<400> 42

ES 2 797 257 T3

Gly Asn Val Cys Gln Asp Cys Ile Gln Leu Val Thr Asp Val Gln Glu
 1 5 10 15

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

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

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

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

5 <210> 43
 <211> 83
 <212> PRT
 <213> Gallus gallus
 10 <400> 43

Glu Asp Val Cys Gln Asp Cys Ile Arg Leu Val Thr Asp Val Gln Glu
 1 5 10 15

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

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

Ser Tyr Ile Ser Glu Tyr Ser Asp Leu Ala Ile Gln Met Met Met His
 50 55 60

Met Lys Asp Gln Gln Pro Lys Asp Ile Cys Ala Met Val Gly Phe Cys
 65 70 75 80

Pro Ser Val

15 <210> 44
 <211> 83
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 44

ES 2 797 257 T3

Glu Asp Val Cys Gln Asp Cys Met Lys Leu Val Ser Asp Val Gln Thr
 1 5 10 15

Ala Val Lys Thr Asn Ser Ser Phe Ile Gln Gly Phe Val Asp His Val
 20 25 30

Lys Glu Asp Cys Asp Arg Leu Gly Pro Gly Val Ser Asp Ile Cys Lys
 35 40 45

Asn Tyr Val Asp Gln Tyr Ser Glu Val Cys Val Gln Met Leu Met His
 50 55 60

Met Gln Asp Gln Gln Pro Lys Glu Ile Cys Val Leu Ala Gly Phe Cys
 65 70 75 80

Asn Glu Val

5 <210> 45
 <211> 79
 <212> PRT
 <213> Danio rerio

10 <400> 45

Gly Asp Val Cys Gln Asp Cys Val Thr Phe Ile Ser Asp Thr Gln Asp
 1 5 10 15

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

Glu Asn Gln Cys Glu Leu Leu Gly Pro Gly Met Ser Asp Met Cys Lys
 35 40 45

Glu Tyr Ile Ser Gln Tyr Gly Pro Leu Val Phe Gln Gln Leu Met Ser
 50 55 60

Met Gln Pro Lys Asp Ile Cys Ala Arg Ala Gly Phe Cys Pro Thr
 65 70 75

15 <210> 46
 <211> 79
 <212> PRT
 <213> *Xenopus laevis*

<400> 46

ES 2 797 257 T3

Gly Asp Ile Cys Asn Asp Cys Thr Lys Leu Val Ser Asp Val Gln Asp
1 5 10 15

Ala Leu Arg Ser Asn Ser Ser Phe Ser Lys Lys Leu Val Asp His Phe
20 25 30

Leu Gln Glu Cys Asn Leu Leu Asp Pro Ala Ile Ala Glu Met Cys Lys
35 40 45

Ser Tyr Ile Asn Gln Tyr Ser Asp Ile Ala Ile Gln Val Leu Leu Gln
50 55 60

Met Gln Pro Lys Gln Leu Cys Gly Met Ala Gly Phe Cys Asp Gln
65 70 75

REIVINDICACIONES

1. Proceso para preparar una biblioteca de partículas de lipoproteína de saposina, en donde biblioteca significa un conjunto de diferentes partículas de lipoproteína de saposina que comprenden una mezcla heterogénea de partículas de lipoproteína de saposina con diferentes composiciones de lípido de membrana y de proteína de membrana, en donde las partículas comprenden componentes de membrana procedentes de una membrana celular u organular y un polipéptido de unión a lípidos que es una proteína similar a saposina que pertenece a la familia SAPLIP de proteínas de interacción con lípidos o una forma derivada de las mismas, en donde el proceso comprende las etapas de
- a) proporcionar una mezcla de vesículas de membrana en bruto obtenidas de una membrana celular u organular de una arquea, una célula eucariota o una procariota y en donde las vesículas de membrana en bruto comprenden tanto lípidos de membrana como proteínas de membrana de las membranas celulares u organulares en bruto de las que se obtuvieron;
 - b) poner en contacto la mezcla de la etapa a) con el polipéptido de unión a lípidos en un ambiente líquido;
 - c) permitir el autoensamblaje de las partículas.
2. Proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde las vesículas de membrana en bruto de la etapa a) se preparan mediante al menos una de o todas las etapas a continuación:
- a.1) proporcionar una célula y/o un orgánulo celular;
 - a.2) lisar o romper la célula y/o el orgánulo celular;
 - a.3) obtener una fracción de membrana en bruto; y
 - a.4) preparar vesículas de membrana en bruto a partir de la fracción de membrana en bruto obtenida en la etapa a.3).
3. Proceso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde el proceso comprende además entre las etapas a) y b) las etapas de b.1) poner en contacto las vesículas de membrana en bruto con un detergente en un ambiente líquido; en donde después, en la etapa b), la mezcla obtenida después de la etapa b.1) se pone en contacto con el polipéptido de unión a lípidos en la etapa c) y/o en donde la etapa b) se produce en presencia de un detergente.
4. Proceso de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el detergente se selecciona entre el grupo que consiste en alquilbencenosulfonatos o ácidos biliares, detergentes catiónicos y detergentes no iónicos o zwitteriónicos, tales como óxidos de laurildimetilamina (LDAO), Fos-colinas, CHAPS/CHAPSO, glucósidos de alquilo, tales como maltósidos de alquilo de cadena corta, media o larga, en particular, β -D-maltósido de n-dodecilo, glucósidos, anfífilos de maltosa-neopentilglicol (MNG), polímeros anfífilos (anfipoles), oligómeros macrocíclicos o cíclicos a base de un producto de hidroxialquilación de un fenol y un aldehído (calixareno) y mezclas de los mismos.
5. Proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde
- i) las partículas tienen forma de disco, en particular, en donde las partículas tienen forma de disco y no comprenden un núcleo hidrófilo o acuoso,
 - ii) las partículas tienen generalmente un diámetro máximo de 2 nm a 200 nm, en particular, de 3 nm a 150, preferentemente de 3 nm a 100 nm;
 - iii) el autoensamblaje de la partícula en la etapa c) se lleva a cabo a un pH de 2,0 a 10,0, en particular de 6,0 a 10,0, preferentemente de 6,0 a 9,0, de manera particularmente preferente de 7,0 a 9,0 y lo más preferentemente, de 7,0 a 8,0 y/o
 - iiii) en donde el proceso comprende en la etapa c) o como una etapa d) posterior, la purificación de las partículas mediante al menos la retirada parcial de lípidos de membrana libres, proteínas de membrana libres, polipéptido de unión a lípidos libre, materia insoluble o agregada y/o detergente, en donde, opcionalmente, la purificación se lleva a cabo mediante cromatografía, en particular, cromatografía de exclusión por tamaños; ultracentrifugación; diálisis; puesta en contacto con bioperlas de unión a detergente; uso de concentradores; métodos de purificación por afinidad que incluyen, pero sin limitación, cromatografía, perlas magnéticas, inmunopurificación y/o membranas/filtros para retirar los lípidos no unidos/no incorporados y/o compuestos hidrófobos.
6. Proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la proteína de unión a lípidos es saposina A, saposina B, saposina C, saposina D o un derivado o forma truncada de la misma y en donde, opcionalmente, la forma derivada de la SAPLIP se selecciona entre
- i) una proteína que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia respecto de la secuencia de longitud completa de la SEQ ID NO. 1, 2, 3, 4, 5 o 6;
 - ii) una proteína que tiene al menos un 40 % de identidad de secuencia respecto de la secuencia de longitud completa de la 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 autoensamblarse junto con lípidos solubilizados en partículas de lipoproteína cuando se emplean en el proceso; y

iii) una proteína que comprende la secuencia de la 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.

- 5 7. Proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde las partículas consisten esencialmente en el al menos un polipéptido de unión a lípidos y componentes de la membrana celular u organular, en particular, lípidos de membrana y/o proteínas de membrana, que proceden de la membrana celular u organular citada en la etapa a).
- 10 8. Proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde
 i) las partículas comprenden lípidos de membrana que proceden de la membrana celular u organular citada en la etapa a), en donde los lípidos se seleccionan opcionalmente entre el grupo que consiste en fosfolípidos, glucolípidos, colesterol y mezclas de los mismos y/o en donde
 15 ii) al menos una parte de las partículas comprende proteínas de membrana que proceden de la membrana celular u organular citada en la etapa a) y en donde la proteína de membrana se selecciona opcionalmente entre el grupo que consiste en una proteína transmembrana integral, una proteína integral de membrana monotópica, una proteína periférica de membrana, una proteína anfitrópica en un estado unido a lípido, una proteína anclada a lípidos, una proteína quimérica con un dominio transmembrana hidrófobo fusionado y mezclas de los mismos.
- 20 9. Proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde en el proceso no se añaden lípidos adicionales aparte de los componentes de las vesículas de membrana en bruto.
- 25 10. Proceso para preparar partículas de lipoproteína de saposina purificadas que comprende las etapas de preparar una biblioteca de acuerdo con el proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y la etapa adicional de f) purificar al menos un tipo de partícula de lipoproteína de saposina de la biblioteca, en donde, opcionalmente, la purificación del al menos un tipo de partícula en la etapa f) se lleva a cabo mediante purificación por afinidad, incluyendo, pero sin limitación, cromatografía de afinidad y/o inmunopurificación, en particular, usando un antígeno o una etiqueta en una proteína de membrana presente en la partícula que se va a purificar y/o en donde, opcionalmente, la purificación se lleva a cabo mediante cromatografía, en particular, cromatografía de exclusión por tamaños; ultracentrifugación; diálisis; puesta en contacto con bioperlas de unión a detergente; o uso de concentradores.
- 30 11. Biblioteca de partículas de lipoproteína de saposina obtenible de acuerdo con el proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde las partículas difieren en su composición lipídica y/o proteica, preferentemente en su composición proteica, de manera particularmente preferida en su composición proteica de membrana.
- 35 12. Una partícula de lipoproteína de saposina obtenible mediante el proceso de la reivindicación 10.
- 40 13. Una biblioteca de partículas de acuerdo con la reivindicación 11 o una partícula de acuerdo con la reivindicación 12 para su uso en un método de diagnóstico, un tratamiento cosmético o para su uso como formulación para vacunación.
- 45 14. Uso de una biblioteca de partículas de acuerdo con la reivindicación 11 o una partícula de acuerdo con la reivindicación 12 como una herramienta para el desarrollo de fármacos, el cribado de fármacos, el descubrimiento de fármacos, el desarrollo de anticuerpos, el desarrollo de agentes biológicos terapéuticos, para la purificación de membranas o proteínas de membrana, para la expresión de proteínas de membrana, para la investigación de membranas y/o proteínas de membrana, en particular, la lipidómica y la proteómica, preferentemente para el aislamiento, la identificación y/o el estudio de membranas y/o proteínas de membrana o la creación de una base de datos de lipidoma o proteoma.
- 50

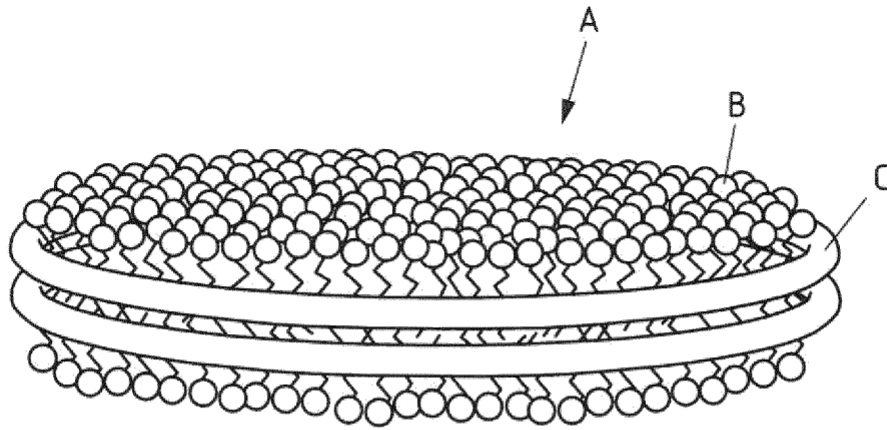


Fig.1a Técnica anterior

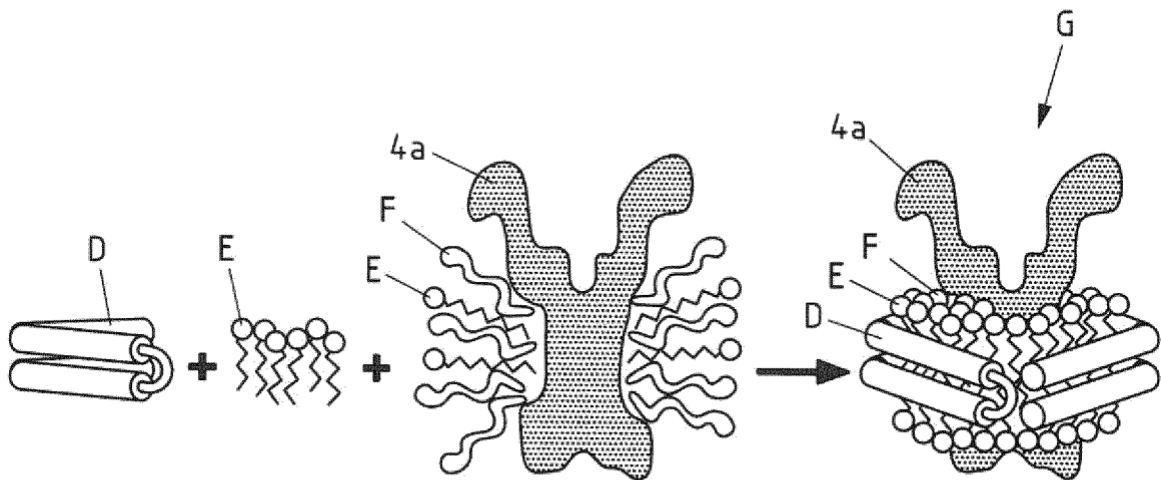


Fig.1b Técnica anterior

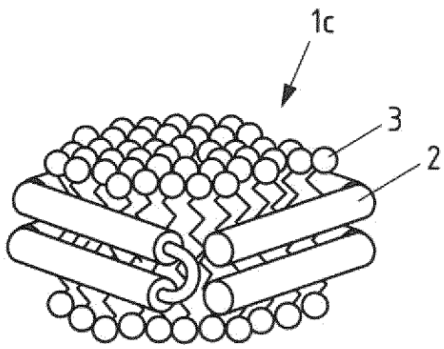


Fig. 2a

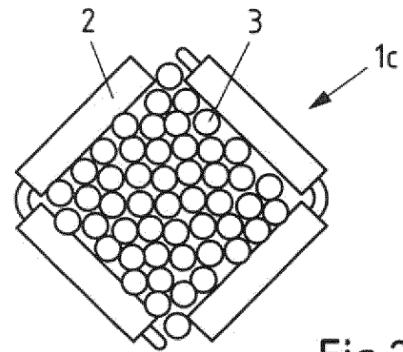


Fig. 2b

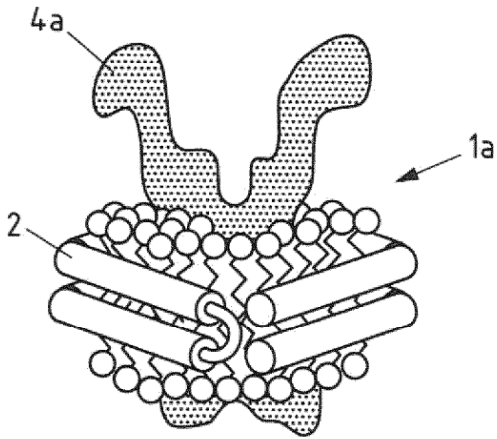


Fig. 2c

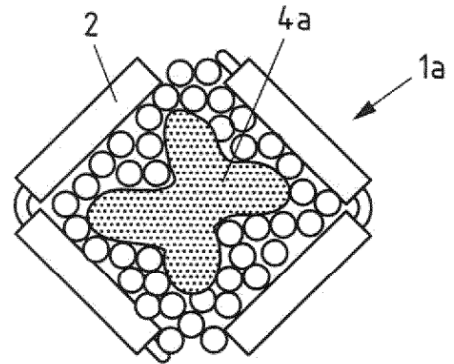


Fig. 2d

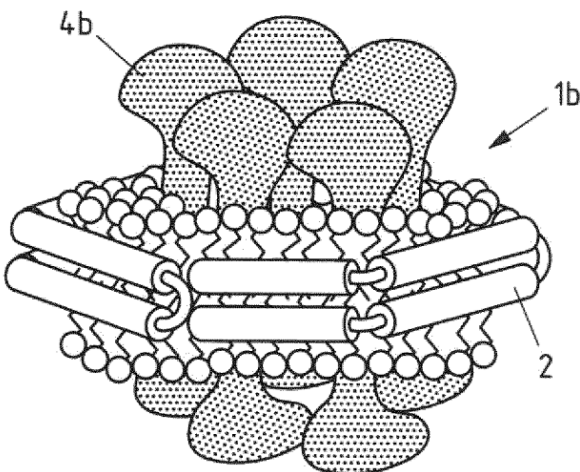


Fig. 2e

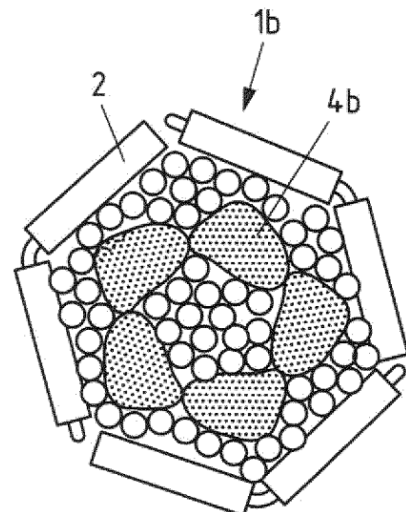


Fig. 2f

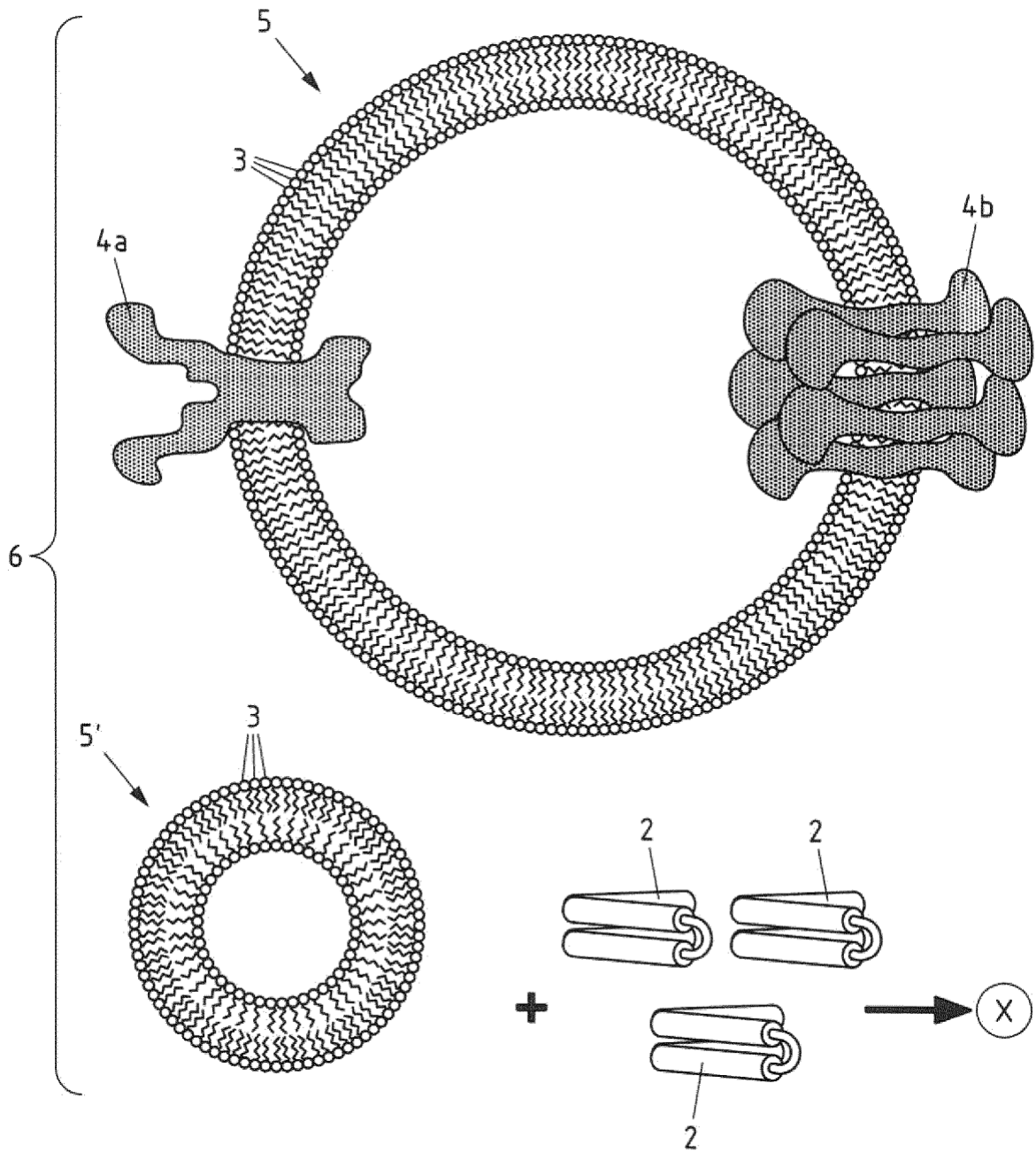


Fig.3a

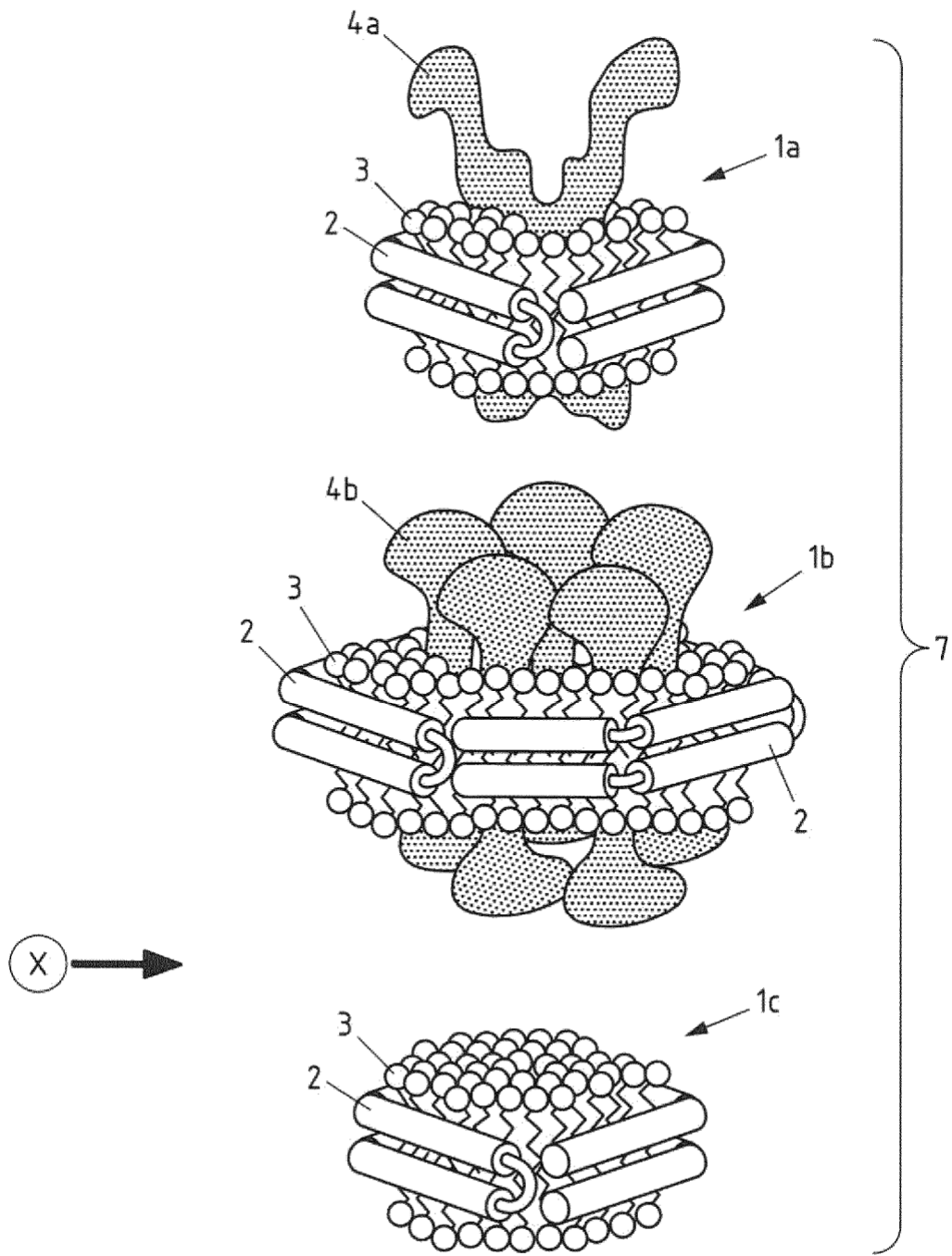


Fig.3b

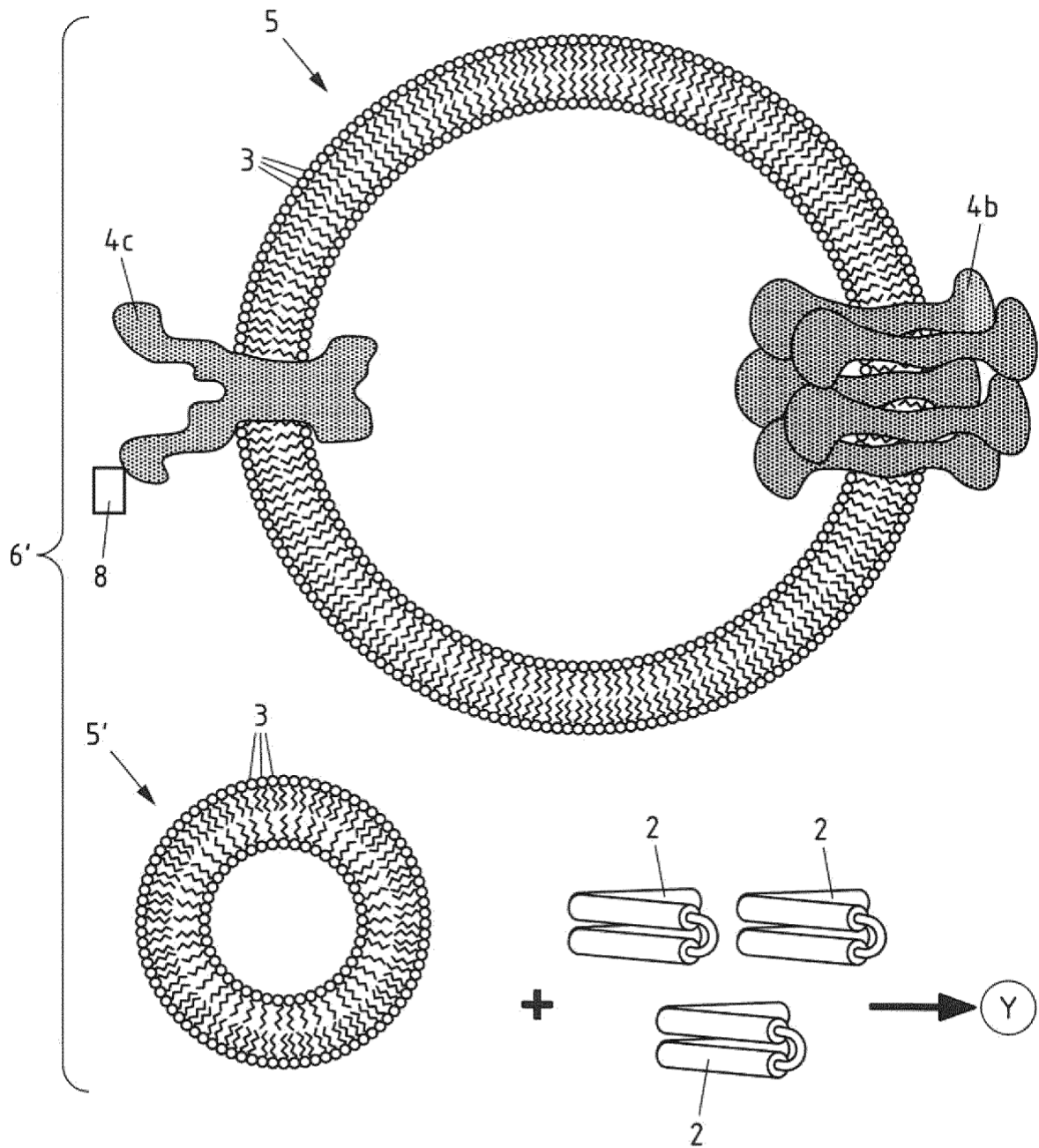


Fig.4a

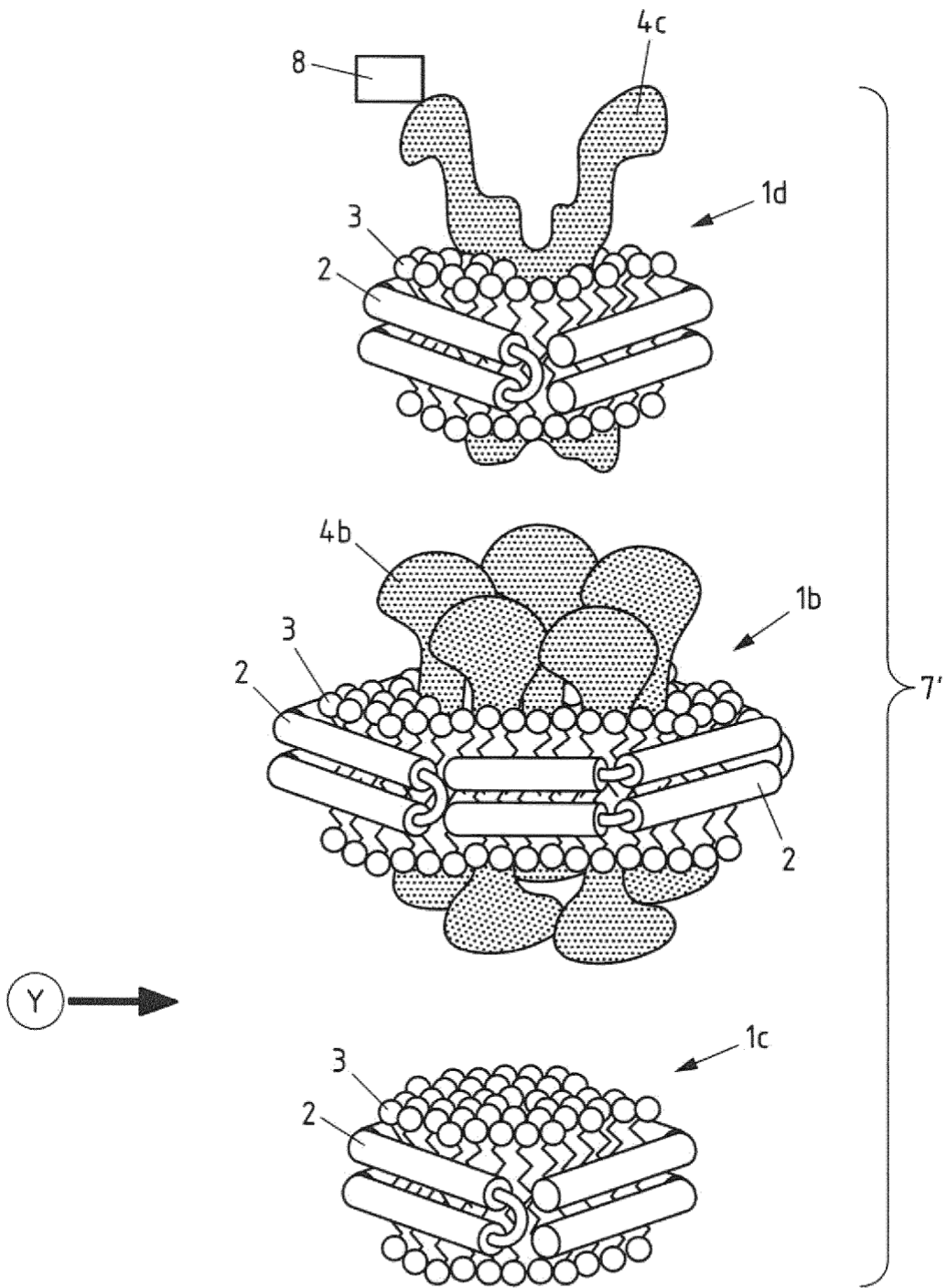


Fig.4b

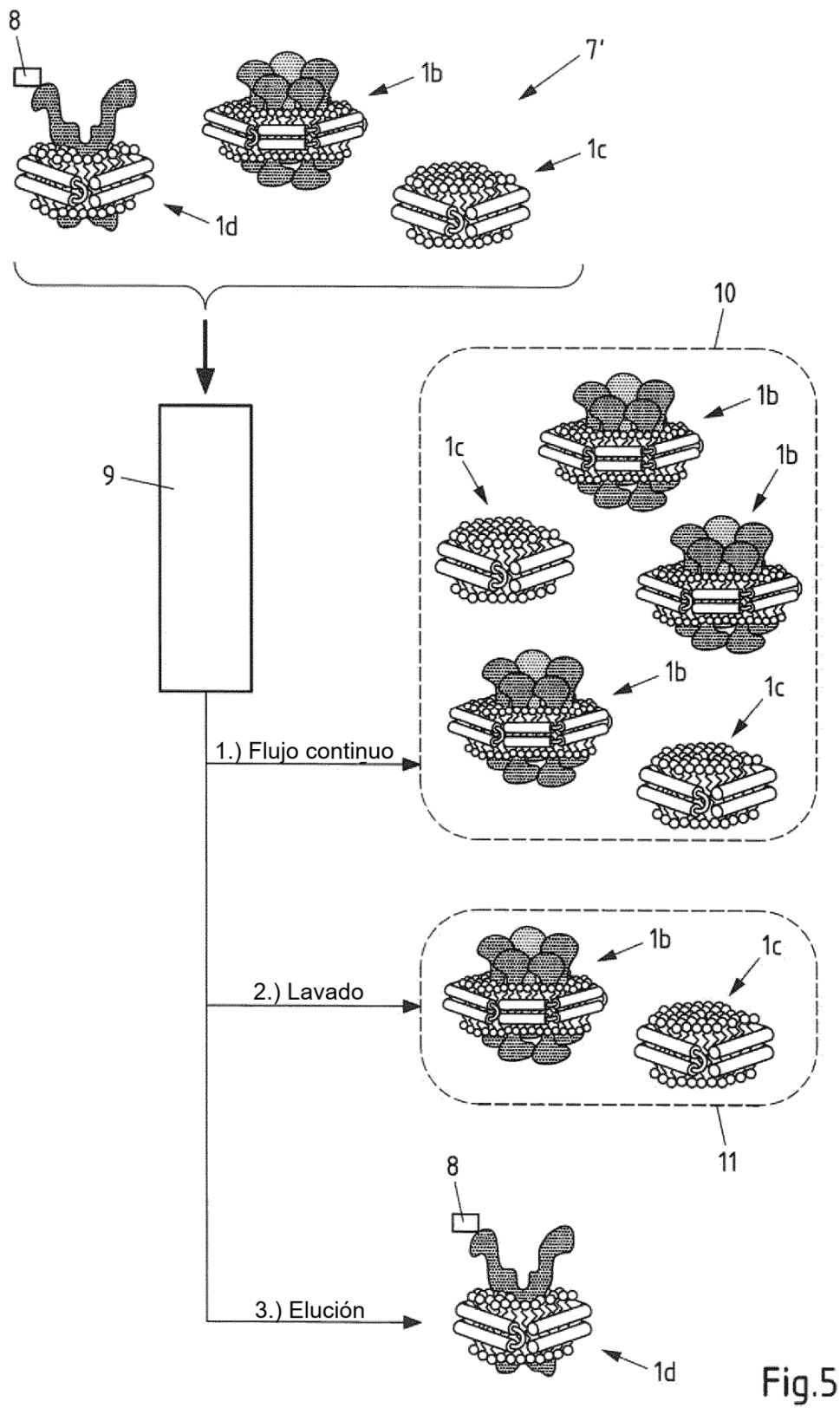


Fig.5

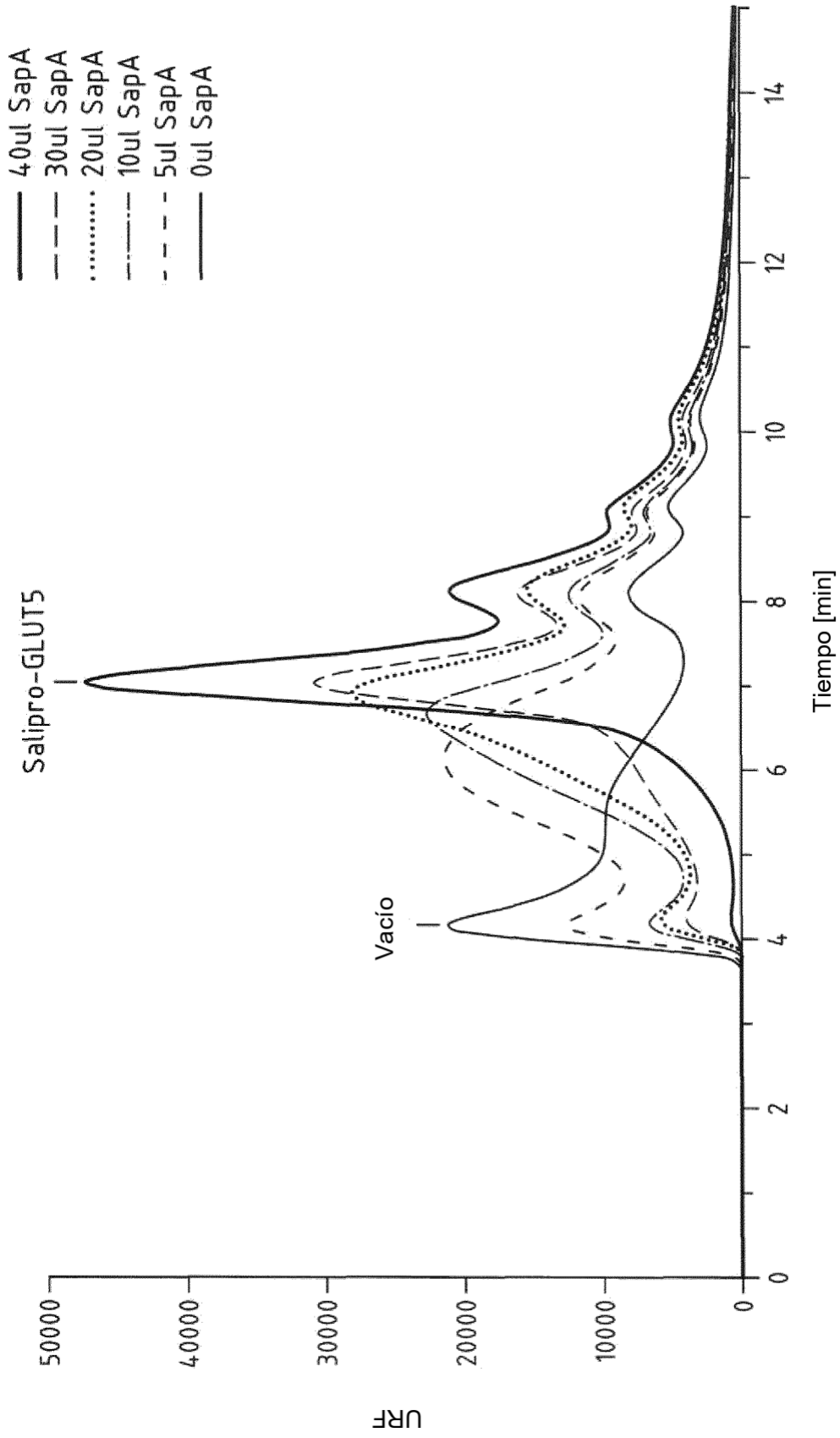


Fig.6

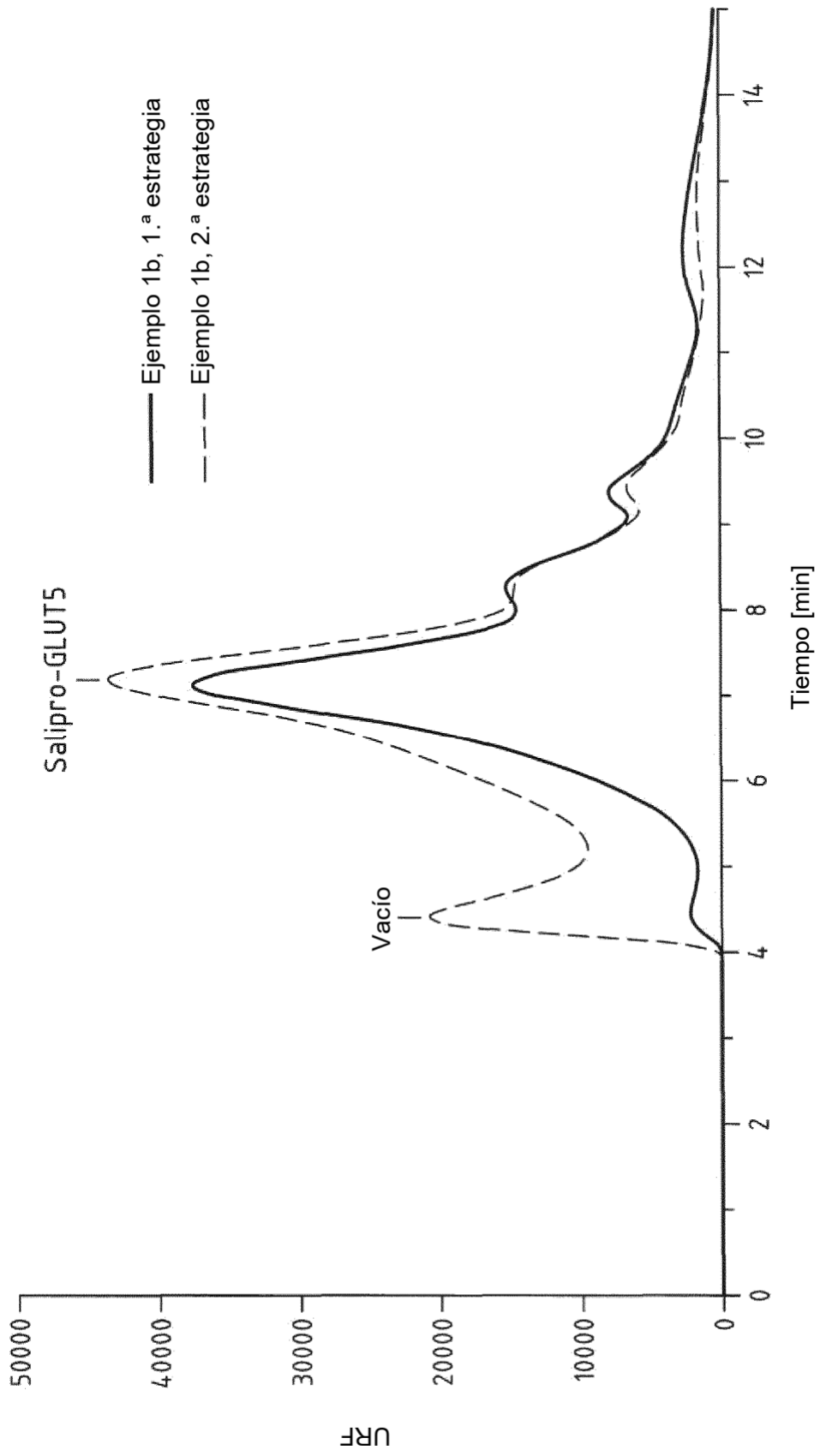


Fig.7

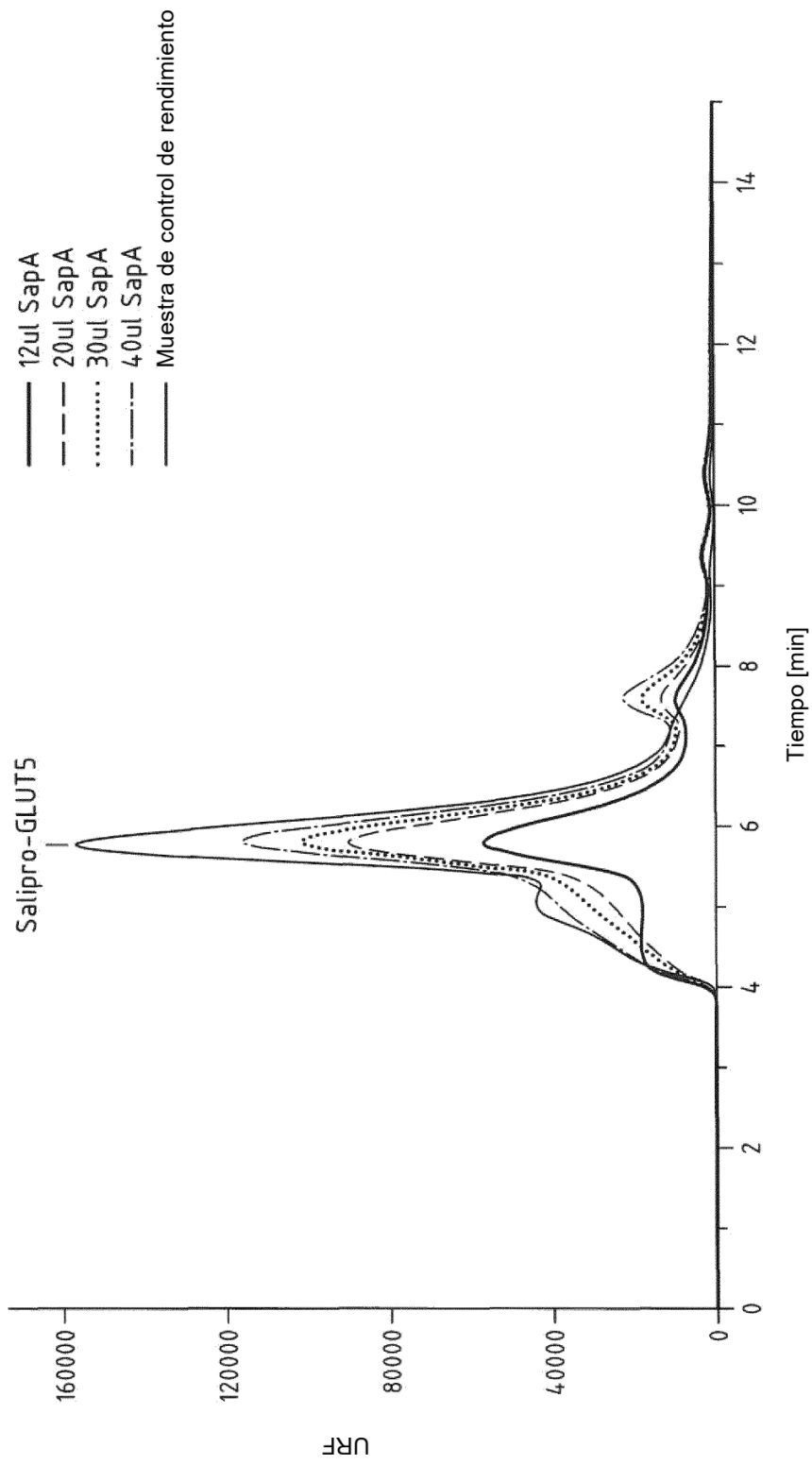


Fig.8

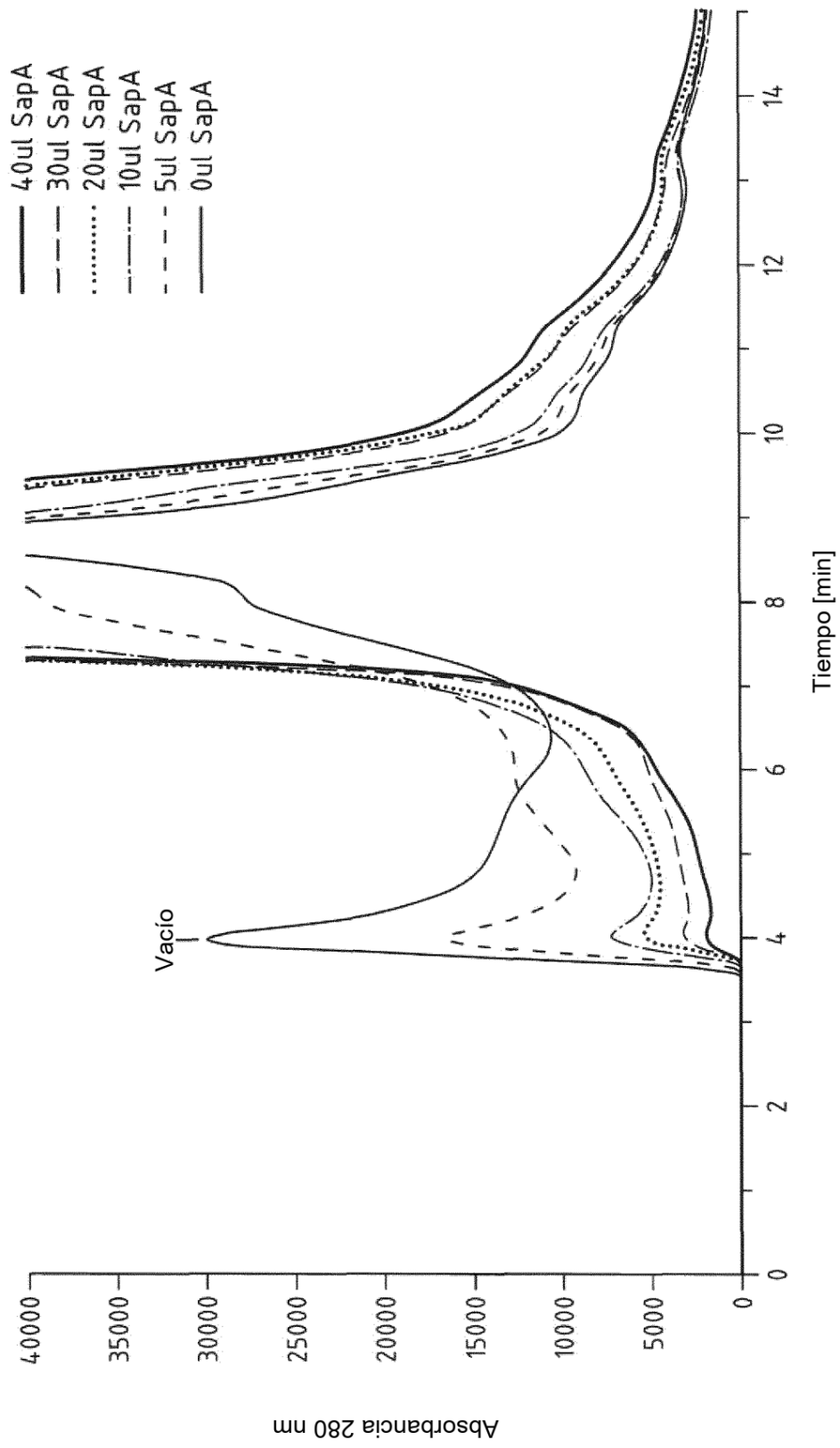


Fig.9

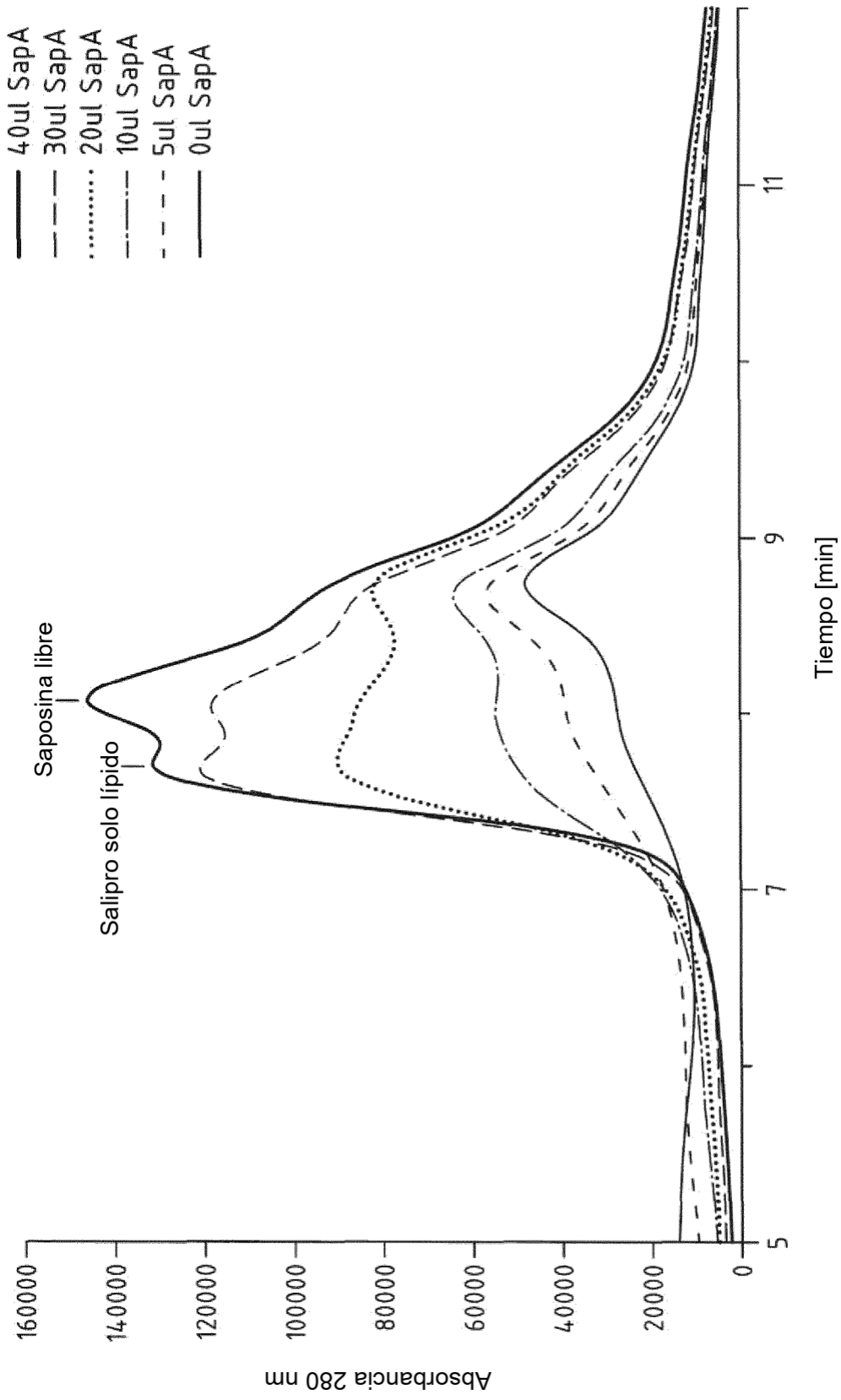


Fig.10

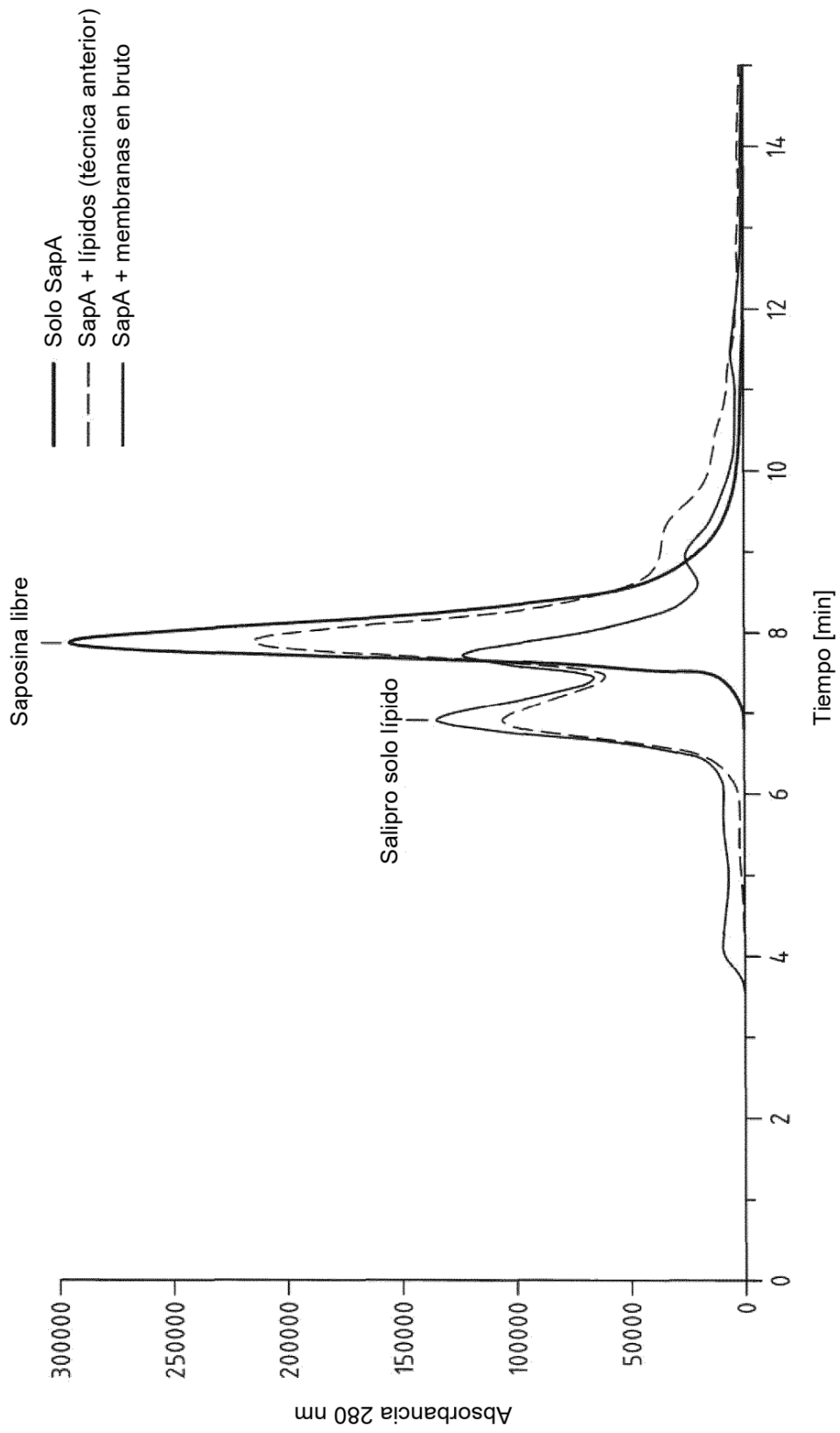


Fig.11

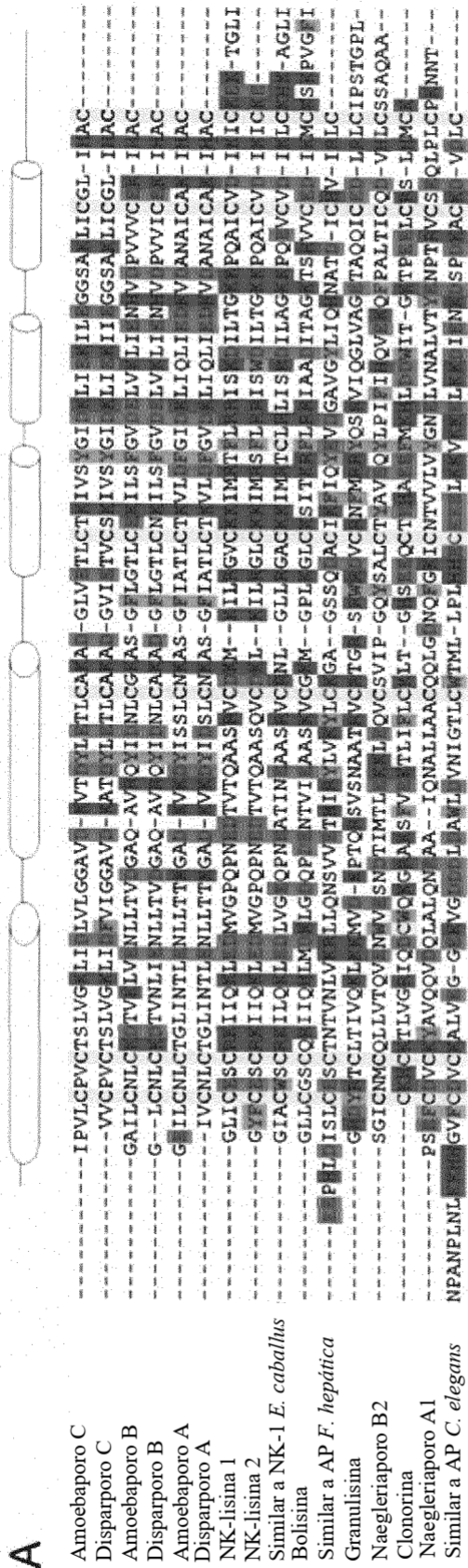


Fig.12a

B

SapA_Homo	SLPC IC VVTAAG ML NA-T ILV L TC LP PNMSASC IV SYLPVIL II G MS -PG VCSALNLC SLQ
Bos	SLPC IC VITAAGNLL NA-T Q ILM L TC LP PNMSASC IV SYLPVIL MI GMS -PG VCSALNLC SLQ
Mus	SLPC IC TVVT AGNLL NA-TQ I L L TC MI SLSASC W SYLPVIL MI G MSN -PG VCSALNLCQSLQ
Gallus	SIPC LC LVTVVG VL NG-T I S L TC FLP QGLAS C IV SYLPVIM MI P -P VVCSALS LCQSLQ
Danio	TVPC LC VLVV QLL NV-T S LLG L ACQLIP GLANQC IV NYFVLMGIQG L -PGVWCGALGLCVSQQ
Xenopus	SMPC FC VTVLGN L NI-TQ I Q LN VC FIP PGLASTC Q VS YFTIVLNLL Q LSN -PGVLCSSLGLCTSLQ
SapC_Homo	VVC VC FLV VT LI NN-T IL A MCS LP S LS CQ W TYGSSILSILL VS -P LVCSML LCSGT-
Bos	IYC VC FVV VA LI NN-T IL AL VCS LPTS-LA QCQ W TYG SILSILL AS -P LVCSML LCSS--
Mus	VILCOTCFVMN FS LIVNNA-T LLV GLSNACGVLP P-A T CQ WGTGPSLL I I VN -PSSLCGVIGLCAA--
Gallus	FSVC IC TMV VTGLL SN-T IV M WCYLLPAS-V OC F I V GOALI MLL ATN -P AVCVML CCAAN-
Xenopus	NVLC VC LMVSQL LL NN-T NI GL VC LLPSQ-YTQ C MI S YS ALI LL Q AN -POAICTALG CSG--
Danio	SPQCAIC TM I NMIO QT-S A IVQAV VCNILPST-LTAQC LI TYGQAIL LLVQ A -P TVCS LALCSG--
SapD_Homo	GGFC VC LVGIL NL NS-T Q ILAAL GCSFLP P-YQ QC QFVA Y PVL I ILV VM -PSFVCL IGACPSA
Bos	GGFC VC LVGIL NL NS-T Q ILAAL GCSFLP Q-Y QC QFT Y PVL I ILV VM -PSFVCL IGACPAA
Mus	GGFC VC LVL L NL NS-T ILAAL GCSFLP P-YQ QC QFVA Y PLLL ILV VM -PGFVCS IGVCPSA
Gallus	GGFC IC MIVAVA L NA-TTT I ALL VC FLP S-VS OCQV Y QY PAVVQLLA MM -PTFVCT LGVCGAA
Danio	GGFC VC MAV V GIL QNA-TQS I AVL VCS LP A-V CNQLI QY PLLVQLLLOTL -P FVCM LGACP AV
Xenopus	G YCAVC MLM V LL NA-T I I AELG ICNLP S-MQN CSALV N Y PLFIQLL LAL -PSFICI VNLQCN
SapB_Homo	G VCC CIQMT IQTAV TNST VQALV V C LGPG-MA IC NYISQYS IAIQMM M - -QP ICALVGFCD - -
Bos	GNVCC CIQLVT VQ AL TNST V ALV A C LGPG-MS MC NYINQYS VAIQVM M - -QP ICVLAGFCD - -
Gallus	VCC CI LVT VQ AV TNAT V SLVA A C LGPG-MS MC SYISYS IAIQMM M QQP ICAMVGF CPSV-
Mus	VCC CM LVS VQTAV TNSS IQGFV V C LGPG-VS IC NV QYS VCVQMLM MQ QQP ICVLAGF CN V-
Danio	G VCC CVT IS TQ A VNSSFINTLIAQV NQC LLGPG-MS MC YISQGPLVQQLMMSMQ - -P ICA AGFCPT - -
Xenopus	G ICN CT LVS VQ AL SNSS S LV LQ CNLL PA-IA MC S INQ S IAIQVLLQMQ - -P QLCGMAG F C Q - -

Fig.12b