(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad Intelectual
Oficina internacional

(43) Fecha de publicación internacional
8 de julio de 2010 (08.07.2010)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2010/076361 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
C12P 21/02 (2006.01) *C07K 14/00* (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2009/070616

(22) Fecha de presentación internacional:
22 de diciembre de 2009 (22.12.2009)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P200900045
30 de diciembre de 2008 (30.12.2008) ES

(71) Solicitantes *(para todos los Estados designados salvo US)*: **CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS** [ES/ES]; C. de Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES). **UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA** [ES/ES]; Edifici A - Campus Universitari, E-08193 Bellaterra, Bercelona (ES). **CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA EN RED EN BIOINGENIERIA, BIOMATERIALES Y NANOMEDICINA** [ES/ES]; C. Maria de Luna, 11, Mòdulo 3, E-50018 Zaragoza (ES).

(72) Inventores; e
(75) Inventores/Solicitantes *(para US solamente)*: **VECIANA MIRO, Jaume** [ES/ES]; C. de Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES). **RATERA BASTARDAS, Inmaculada** [ES/ES]; C. de Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES). **DÍEZ GIL, César** [ES/ES]; C. de Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES). **VILLAVERDE CORRALES, Antonio Pedro** [ES/ES]; Campus UAB, E-08193 Bellaterra, Barcelona (ES). **VÁZQUEZ GÓMEZ, Esther** [ES/ES]; Campus UAB, E-08193 Bellaterra, Barcelona (ES). **GARCÍA FRUITÓS, Elena** [ES/ES]; C. Maria de Luna, 11, Módulo 3, E-50018 Zaragoza (ES).

(74) Mandatario: **PONTI SALES, Adelaida**; C. Consell de Cent, 322, E-08007 Barcelona (ES).

(81) Estados designados *(a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados *(a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declaraciónes según la Regla 4.17:

— *sobre la identidad del inventor (Regla 4.17(i))*

— *sobre el derecho del solicitante para solicitar y que le sea concedida una patente (Regla 4.17(ii))*

— *sobre la calidad de inventor (Regla 4.17(iv))*

Publicada:

— *con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))*

(54) **Title**: INCLUSION BODIES, BACTERIAL CELLS AND COMPOSITIONS CONTAINING THEM AND USES THEREOF

(54) **Título** : CUERPOS DE INCLUSIÓN, CÉLULAS BACTERIANAS Y COMPOSICIONES QUE LOS CONTIENEN Y SUS USOS

(57) **Abstract**: The present invention relates to an isolated inclusion body comprising a polypeptide, characterised in that such inclusion body is in particulate form. The present invention also refers to a bacterial cell comprising said inclusion body. The present invention additionally refers to a composition comprising said inclusion body and a eukaryotic cell. The present invention moreover refers to a composition comprising said inclusion body and animal or plant tissue. The present invention furthermore refers to the uses of said inclusion body as medicaments and cell-proliferation stimulators and tissue regenerators.

(57) **Resumen**: La presente invención se refiere a un cuerpo de inclusión aislado que comprende un polipéptido caracterizado porque el cuerpo de inclusión está en forma particulada. La presente invención también se refiere a una célula bacteriana que comprende dicho cuerpo de inclusión. La presente invención se refiere además a una composición que comprende dicho cuerpo de inclusión y una célula eucariota. La presente invención se refiere también a una composición que comprende dicho cuerpo de inclusión y un tejido de animal o planta. La presente invención se refiere también a los usos de dicho cuerpo de inclusión como medicamentos y estimuladores de la proliferación celular y regeneradores de tejido.

WO 2010/076361 A1

CUERPOS DE INCLUSIÓN, CÉLULAS BACTERIANAS Y COMPOSICIONES QUE LOS CONTIENEN Y SUS USOS

Campo de la invención

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

Antecedentes de la invención

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

manera significativa la proliferación de células de mamífero, demostrando el potencial de los IBs en la manipulación de tejidos y la medicina regenerativa entre otras aplicaciones biomédicas prometedoras.

Muchos polipéptidos recombinantes producidos en bacterias modificadas genéticamente agregan como IBs. Estos depósitos de proteínas aparecen como partículas altamente hidratadas que se encuentran en el citoplasma bacteriano[2] o, en algunos casos, en el periplasma[3]. Los IBs son químicamente puros, ya que la propia proteína recombinante es el componente principal – hasta alrededor de un 95% de la proteína total – [2,4,5]. Otras moléculas celulares, tales como ARN, ADN y lípidos resultan atrapados durante la formación de IB y están presentes en cantidades menores[6]. La formación de IBs es un proceso rápido y eficaz, tal como se observa después de unos minutos de la inducción de la expresión génica. Varias horas más tarde, pueden representar fácilmente alrededor del 50% de la biomasa celular total[5]. Aunque en el pasado se creía que los IBs estaban formados por cadenas polipeptídicas no plegadas o ampliamente mal plegadas y, por lo tanto, biológicamente inertes, recientes observaciones, presentan estas partículas como constituidas por especies de proteínas que se pliegan correctamente y que, por tanto, son biofuncionales[8]. La estructura molecular de IBs se basa en una organización particular de tipo amiloide [9,10] que permite interacciones de lámina beta cruzada que coexisten con dominios de proteínas correctamente plegadas[11]. Por lo tanto, los IBs formados por enzimas pueden ser catalizadores útiles en diferentes tipos de bioprocesos tal como se ha observado recientemente para la β-galactosidasa, D-aminoácido oxidasa, maltodextrina fosforilasa, ácido siálico aldolasa y polifosfato quinasa[11-15], entre otras. Por otro lado, su formación in vivo, que implica la deposición de proteínas

dependiente de la secuencia alrededor de centros de nucleación, está regulada por varios genes celulares (que codifican principalmente proteasas y chaperones que actúan como una red funcional, lo que permite la manipulación de sus propiedades a nanoescala)[16,17]. En la presente invención se determinan las características más relevantes de IB como nanopartículas y prueba que pueden diseñarse mediante una manipulación genética y del proceso apropiada de las bacterias productoras. Al ser materiales totalmente biocompatibles y mecánicamente estables, se ha utilizado además los IBs como nanopartículas para modificar la rugosidad de las superficies para la estimulación de la proliferación de células de mamífero. Dado que esencialmente cualquier especie de proteína se puede producir como IBs bacterianos y sus propiedades a nanoescala se pueden ajustar fácilmente, las posibilidades funcionales de estos materiales novedosos ofrecen un espectro inusual de aplicaciones biomédicas adicionales aparte de las mostradas aquí en el contexto de la manipulación de tejidos.

Descripción resumida de la invención

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

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

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

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

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

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

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Caracterización morfológica y funcional de IBs. A. Imágenes de microscopía confocal de células bacterianas salvajes que producen IBs formados por una proteína GFP de fusión. De arriba abajo, muestras de células tomadas a 1 hora, 2 horas y 3 horas después de la inducción de la producción de IB. **B.** Imágenes de microscopía confocal utilizando una paleta Metamorf de células bacterianas salvajes, IbpAB$^-$, ClpA$^-$, ClpP$^-$ y DnaK$^-$ que producen IBs formados por una GFP de fusión de 2 horas de formación(parte superior). Imágenes de microscopía confocal de IBs de 3 horas de formación purificados de estas cepas (parte inferior). Las barras en A y B indican 1 μm. **C.** Curvas de distribución del tamaño de partícula medidas mediante dispersión de luz dinámica de IBs de 3 horas de formación producidos por diferentes cepas bacterianas. Los IBs de células deficientes en IbpAB se excluyeron de este estudio debido a su particular

tendencia por agregarse como complejos supraparticulados (resultados no mostrados). Las curvas se representan en términos del porcentaje en volumen de partícula. Las distribuciones del tamaño volumétrico de partícula se describen mediante D[v,0,5], que es el diámetro de partícula (nm) por debajo del cual existe un 50% del volumen total del sistema. D[v,0,5] es el diámetro medio de partícula en volumen (nm). El índice de polidispersidad (PdI) se define como [D(v,0,1)/D(v,0,9)]·100. **D.** Fluorescencia emitida por IBS analizada mediante citometría de flujo, para partículas purificadas de las cepas de E. coli IbpAB$^-$, ClpA$^-$, ClpP$^-$ y DnaK$^-$.

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

Figura 3. Proliferación de células de mamífero

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

Descripción de la invención

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Materiales y métodos

Células bacterianas, plásmidos y producción de cuerpos de inclusión

Los IBs se produjeron en diferentes cepas de *Escherichia coli*, concretamente MC4100 (cepa salvaje con respecto al plegamiento y degradación de proteínas, araD139 Δ(*argF-lac) U169 rpsL150 relA1 flbB5301 deoC1 ptsF25 rbsR*) [18] y sus derivados JGT4 (deficiente en la co-proteasa ClpA, *clpA::kan*), JGT17 (deficiente en las proteínas de choque térmico pequeñas IbpAB, *Δibp::kan*), JGT19 (deficiente en la co-proteasa ClpP, *clpP::cat*) y JGT20 (deficiente en la chaperona principal DnaK, *dnak756 thr::Tn10*)[19]. Estas cepas productoras se transformaron con el vector de expresión pTVP1GFP (Ap^R) que codifica una proteína verde fluorescente (GFP) fusionada en el extremo amino a VP1, la proteína de la cápside en forma de pentámero del virus de la fiebre aftosa[20]. Esta proteína viral, al ser altamente hidrofóbica, dirige la deposición de proteínas de fusión como IBs[9]. El gen recombinante se expresó bajo el control de un promotor *trc* inducible por isopropil β-D-1-tiogalactopiranósido (IPTG).

Las células bacterianas se cultivaron en medio

rico en LB[18] y el gen de fusión se expresó bajo condiciones estándar tal como se ha descrito anteriormente[17]. Los IBs se detectaron claramente después de 1 h de adición de IPTG (figura 1A).

Purificación de los cuerpos de inclusión

Se centrifugaron muestras de 200 ml de cultivos bacterianos a 4°C a 5000 g durante 5 minutos y se resuspendieron en 50 ml de tampón de lisis (Tris HCl 50 mM pH = 8,1, NaCl 100 mM y EDTA 1 mM). Las muestras envueltas en hielo se sonicaron (durante 25 a 40 minutos) a un 40% de amplitud bajo ciclos de 0,5s. Una vez sonicadas, se añadieron 28 µl de fenilmetanosulfonilfluoruro (PMSF) 100 mM y 23 µl de lisozima 50 mg/ml a muestras que se incubaron a 37°C bajo agitación durante 45 minutos. A continuación, se añadieron 40 µl de Nonidet P40 (NP-40) y la mezcla se mantuvo durante 1 hora a 4°C durante la agitación. Se extrajo el ADN con 120 µl de DNasa 1 mg/ml y 120 µl de Mg_2SO_4 1 M durante 45 minutos a 37°C bajo agitación. Finalmente, las muestras se centrifugaron a 4°C a 15000 g durante 15 minutos y el residuo, que contenía IBs puros, se lavó con tampón de lisis que contenía Triton X-100 al 0,5% y se guardó a -20°C hasta su análisis.

Análisis por microscopio de bacterias e IBs

Se analizaron muestras utilizando un microscopio de fluorescencia confocal Leica TSC SP2 AOBS (Leica Microsystems Heidelberg GMBH, Manheim, Alemania) después de una excitación a una longitud de onda de 488 nm y las imágenes se registraron a longitudes de emisión entre 500 y 600 nm (63X (NA 1,4 aceite) utilizando un objetivo Plan-Apochromat (zoom 8; 1024 por 1024 pixels). Para el análisis de las células bacterianas que producen IBs

fluorescentes, se fijaron muestras tomadas 1, 2 ó 3 horas después de la inducción por IPTG con formaldehído al 0,2% en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se guardaron a 4°C hasta su uso. Los IBs aislados se resuspendieron en 20 ml de PBS. Para la microscopía electrónica de barrido (SEM), se analizaron muestras mediante procedimientos convencionales utilizando un FEG (pistola de emisión de campo)-ESEM (microscopía electrónica de barrido ambiental).

Citometría de flujo

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

Caracterización de microscopía de fuerza atómica

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

Mediciones de dispersión de luz dinámica

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

Preparación de monocapas terminadas en amino

Se utilizaron sustratos de silicio (100) 1x1 cm pulidos por una cara para la preparación de monocapas terminadas en amino. Antes de la formación de la monocapa, los sustratos se trataron con solución RCA1 oxidante ($NH_4OH/H_2O_2/H_2O$ en una proporción 1:1:5) durante 30 minutos a 80°C y se aclararon de manera ligera con agua ultrapura/MilliQ con una conductividad superior a 18,2 MΩ. Posteriormente, los sustratos se introdujeron en solución de piraña durante 15 minutos (H_2SO_4 concentrado (Panreac) y H_2O_2 acuoso al 33% (Aldrich) en una proporción 3:1), se aclararon abundantemente con agua ultrapura y se secaron bajo una corriente de nitrógeno. Este tratamiento proporciona a los sustratos una nueva superficie terminado en hidroxilo para reacciones posteriores. Las monocapas terminadas en amino se formaron mediante la exposición de

los sustratos bajo atmósfera controlada a una solución 5 mM de N-[3-(trimetoxisilil)propil]etilendiamina/(TPEDA) (97% Aldrich) en tolueno anhidro durante 3 horas. Tras la formación de la monocapa, los sustratos se aclararon con tolueno y etanol para eliminar el exceso de silano y se secaron bajo una corriente de nitrógeno. El ángulo de contacto del sustrato terminado en amino se midió con una gota de 3 μl de agua ultrapura (MilliQ con 18,2 MΩ cm) en un Instrumento de Medición del Ángulo de Contacto OCA15+ (Data Physics Instruments GMBH, Alemania), equipado con una cámara CCD y el software SCA20 para la determinación del ángulo. Los espectros XPS se obtuvieron en un instrumento PHI ESCA-500 (Perkin Elmer), equipado con una fuente de rayos X Al Ka monocromática que operaba a 350 W. Los espectros hacían referencia al pico principal C1s observado a 284,8 eV.

Impresión por microcontacto (μCP) de IBs en el sustrato de silicio terminado en amino

La μCP de IBs sobre el sustrato de silicio terminado en amino se realizó utilizando estampaciones de PDMS (Sylgard 184, Dow Corning, Estados Unidos). Las estampaciones se fabricaron mediante la fundición de una mezcla 10:1 (v/v) de PDMS y agente de curación (Sylgard 184, Dow Corning) contra una base de silicio con un patrón fotolitográfico, se curaron durante 1 hora a 60°C y se extrajeron a esta temperatura de curación. Las estampaciones de PDMS se dejaron en el horno a 60°C durante por lo menos 18 horas para asegurar una curación completa. Para los IBs impresos con μCP, las estampaciones de PDMS se impregnaron con una suspensión de tampón PBS con IB (pH 7,5) durante 40 minutos, se secaron bajo una corriente de nitrógeno y se colocaron en una superficie de sustrato limpio de silicio terminado en amino. Después de

un tiempo de contacto de 1 minuto se extrajo la estampación con precaución.

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

Análisis de estabilidad

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

Ensayo de proliferación celular

Los cuerpos de inclusión con GFP aislados tal como se ha descrito anteriormente se esterilizaron después de 3 horas de producción bajo la exposición a una lámpara germicida de luz UV de 253 nm durante 4 horas. A continuación, se resuspendieron en PBS y se utilizaron

diferentes cantidades de proteína IB, concretamente 0,08, 0,8 y 8 μg por pocillo para recubrir placas de poliestireno Falcon 3072 de 96 pocillos tratadas con cultivo de tejido (Becton Dickinson) o placas Costar 3370 no tratadas, durante toda la noche a 4°C. Se utilizó Vitronectina (Calbiochem) como referencia a una concentración de 50 ng/cm^2, siguiendo las instrucciones del fabricante. Los pocillos se lavaron en PBS y se bloquearon con BSA al 3% en PBS durante 1 hora a 37°C. A continuación, se añadieron por pocillo $1,5 \cdot 10^2$ células de una línea celular de riñón de hámster recién nacido (BHK) y se incubaron en Medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) complementado con aminoácidos no esenciales, suero de ternera fetal al 5%, gentamicina y antimicóticos a 37°C a tiempos diferentes. Los pocillos para blancos siguieron exactamente el tratamiento descrito anteriormente, pero se mantuvieron siempre sin IBs.

Después de la incubación, se determinó la proliferación celular utilizando el kit EZ4U (Biomedica, GMBH) siguiendo las instrucciones del fabricante y se analizó en el lector multimarcaje VICTOR^3 V 1420 (Perkin Elmer). Las absorbancias de lectura fueron 450 nm y 620 nm como referencia y los valores obtenidos se estandarizaron con respecto a los pocillos que contenían sólo medio. Se llevó a cabo un pre-test para seleccionar el tiempo de incubación antes de la saturación con los reactivos del kit; los tiempos óptimos fueron 3 h para cultivos de 24 horas, 2 h para cultivos de 48 horas y 30 min para cultivos de 72 horas. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Los datos se expresaron como la media ± SEM de los valores de los tres experimentos llevados a cabo por cada condición y se evaluaron estadísticamente utilizando un test ANOVA, seguido de análisis post-hoc de Bonferroni. El nivel de significancia fue $p < 0,05$. Para un crecimiento celular en silicio. Las superficies con

injertos de IB se cortaron en los tamaños apropiados, se irradiaron con UV y se depositaron en placas de poliestireno Falcon de 24 pocillos con medio de cultivo tejido donde se inocularon y se cultivaron las células bajo procedimientos convencionales.

Análisis por microscopía confocal de cultivos celulares

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

Resultados y discusión

Los IBs formados por proteína verde fluorescente (GFP) son modelos muy convenientes para un análisis cinético y funcional de su producción biológica, ya que son altamente fluorescentes[20]. Después de la adición en el cultivo bacteriano de IPTG, análogo de la lactosa, los IBs eran claramente visibles mediante microscopía confocal 1 hora después de la inducción de la expresión de gen GFP (figura 1A) y crecieron volumétricamente hasta alrededor de 3 horas durante la síntesis de GFP recombinante, permitiendo la recogida de IBs en un amplio espectro de tamaños. Bajo condiciones estándar de crecimiento bacteriano en el laboratorio sin ningún esfuerzo por mejorar, la producción fue superior a 5 mg/L después de 3 horas (resultado no mostrado), un dato muy prometedor para un escalado práctico. Además, diferentes cepas de *E. coli*, deficientes en chaperonas o proteasas, producen IBs de diferente tamaño (figura 1B) con los mismos rendimientos, debido a la diferente dinámica de la deposición de proteínas *in vivo* en las mismas [16,17]. Aunque los IBs maduros purificados de células naturales mostraron un diámetro promedio de 340 nm (compatible con estimaciones independientes[21]), dicho valor se puede incrementar progresivamente mediante el uso de células mutantes hasta más de 500 nm (en células deficientes Dnak$^-$) (figura 1C), con un índice de polidispersión relativamente bajo en todas las muestras analizadas. La emisión de fluorescencia por partícula también se determinó en IBs purificados mediante citometría de flujo y se observó un intervalo definido desde nanopartículas con fluorescencia baja (cepa natural) hasta nanopartículas con fluorescencia elevada (cepa mutante ClpP$^-$) (figura 1D). A continuación, la combinación apropiada entre el tiempo de recogida durante

el proceso de producción (que determina la etapa de crecimiento de IB) y la cepa productora (que determina tanto la actividad biológica como el límite de tamaño superior) definiría las dimensiones de partícula y fluorescencia concretas que podrían ser más adecuadas para diferentes aplicaciones. Por ejemplo, los IBs obtenidos en Células ClpA$^-$ y ClpP$^-$, con un tamaño de partícula muy similar (0,435 y 0,459 nm, respectivamente), mostraron diferentes niveles de emisión de fluorescencia (71 y 184 unidades FL1 promedio por partícula, respectivamente). Sin embargo, el mapeo de la fluorescencia de IBs con GFP era comparable en todas las cepas, mostrando un patrón fluorescente central homogéneo común (figura 1B).

Para caracterizar adicionalmente la morfología de IBs a nivel de nanoescala, se investigó mediante AFM y SEM. Tal como se observa en la figura 2 A,B,C, la AFM de IBs con GFP naturales muestra la presencia de partículas aisladas de forma esférica o cilíndrica con tamaños promedio de 300 nm de longitud, 170 nm de diámetro y 200 nm de altura. Las mediciones de sección transversal realizadas confirmaron los datos estadísticos obtenidos a partir de las mediciones de DLS (figura 1C). Las observaciones de SEM estaban en la línea de las imágenes de AFM, revelando una superficie de IB rugosa y acentuando la diferencia de tamaño entre IBs obtenidos en células naturales y DnaK$^-$ (figura 2D). Las mediciones de potencial Z realizadas en una suspensión de IB recién preparada mostraron un valor de potencial Z de -9,8 mV que es indicativo de la superficie cargada de forma ligeramente negativa y está de acuerdo con la tendencia de las proteínas de formar agregados. Por otro lado, se investigó la estabilidad de IBs bajo condiciones de almacenamiento utilizadas habitualmente para muestras biológicas. Se observó que los IBs eran completamente estables durante largos periodos de tiempo con respecto tanto a la emisión

de fluorescencia como a la estructura a -80°C, 4°C, 25°C y también a 37°C (figura 2E,F), lo cual permite no sólo la conservación, sino también el uso conveniente y la manipulación de IBs bajo condiciones de ensayo fisiológico. De forma interesante, los IBs eran también mecánica y funcionalmente estables durante la liofilización (y bajo condiciones de almacenamiento diferentes adicionales, figura 2F) y sonicación (no mostrado), expandiendo sus potenciales usos bajo diversas condiciones experimentales.

Dado que los IBs bacterianos muestran una fácil capacidad de manipulación y son materiales totalmente biocompatibles, se investigó su potencial aplicabilidad para fines biomédicos mediante la realización de un ejercicio sencillo. En la generación de tejidos para medicina regenerativa, la unión y proliferación celular se pueden estimular a través de la modificación topográfica de las propiedades de la superficie del material mediante grabado, litografía y procedimientos similares, dependiendo de la naturaleza del propio material. Recientemente, otras estrategias basadas en la funcionalización de superficies con materiales [22,23,24,25] o en su decoración con nanopartículas también permitían un ajuste fino de la textura de la superficie y la rugosidad independientemente de la naturaleza del material utilizado para estimular la unión celular [26,27]. En este contexto, las nanopartículas de sílica y cerámicas de entre 24 y 1500 nm de diámetro afectan a las funciones de crecimiento celular y pueden modular de manera positiva la proliferación celular en superficies decoradas[24,26]. Dado que nos cuestionamos si los IBs bacterianos que aparecen en este intervalo de tamaños podrían también ser útiles para la nanomanipulación de superficies, se ensayó el efecto de IBs con GFP, una vez depositados en placas de poliestireno tratadas con cultivo de tejido (figura 3A), en el

crecimiento de células BHK21 (figura 3B, C). A una densidad de 0,05 partículas/μm^2, los IBs mostraron una rugosidad de raíz media cuadrada (RMS) de 55,9 nm. En dicha superficie modificada, las células BHK21 crecieron íntimamente unidas a los IBs con GFP depositados, tal como se observa mediante la aparición de tinción en la membrana celular (marca roja) y fluorescencia de IB (marca verde), dando lugar a señales amarillentas (figura 3B). Curiosamente, en la superficie de poliestireno, que está ampliamente optimizada para la adhesión y el crecimiento celular, un agente de unión celular convencional, tal como la vitronectina, no presentaba efectos detectables en la proliferación celular (Figura 3D,E). Sin embargo, bajo dichas condiciones favorables, los IBs aún estimulaban de manera significativa la proliferación celular (figura 3 D) dependiendo de la dosis (Figura 3E), hasta más de dos veces. Este efecto era mucho más pronunciado y biológicamente significativo que los ligeros o nulos efectos observados con otras nanopartículas, que a tamaños definidos y para algunas líneas celulares parecen mostrar efectos inhibidores en lugar de efectos estimuladores [26,28,29]. De forma interesante, no se observaron efectos citopáticos ni síntomas de toxicidad en las células cultivadas después de crecer en superficies tratadas con IB. Un análisis 3D de imágenes confocales (figura 3F) mostró IBs unidos a poliestireno totalmente integrados en las membranas celulares, indicando una interacción íntima entre las superficies celulares y las nanopartículas de IB que decoran la superficie del crecimiento celular.

Con el fin de demostrar adicionalmente la validez de los IBs como estimuladores de la proliferación celular, se realizó una microestructuración de los IBs en un sustrato de silicio terminado en amino [30,31] utilizando la técnica de impresión por microcontacto (μCP) que implica la impregnación de una estampación elastomérica con una

suspensión de los IBs. La figura 3G muestra la superficie de silicio estampada con IBs en una densidad de 0,04 Ibs/μm^2 y una rugosidad RMS de 32,4 nm, así como la consecuente estimulación de la proliferación celular en las regiones linealmente decoradas con IBs. Esto indica la preferencia por un crecimiento celular inducido por IBs y la capacidad de estas nanopartículas para estimular la proliferación celular en superficies inicialmente no adecuadas para el crecimiento celular.

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

Referencias:

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

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

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

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

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

6. Neubauer, P., Fahnert, B., Lilie, h. & Villaverde, A., pp. 237-2922006).

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

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

9. Carrio, M., Gonzalez-Montalban, N., Vera, A., Villaverde, A. & Ventura, S. Amyloid-like properties

of bacterial inclusion bodies. *J. Mol. Biol.* **347**, 1025-1037 (2005).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

19. Thomas, J. G. & Baneyx, F. Roles of the Escherichia coli small heat shock proteins IbpA and IbpB in thermal stress management: comparison with ClpA, ClpB, and HtpG In vivo. *J Bacteriol* **180**, 5165-5172 (1998).

20. Garcia-Fruitos, E. *et al.* Aggregation as bacterial inclusion bodies does not imply inactivation of enzymes and fluorescent proteins. *Microb. Cell Fact.* **4**, 27 (2005).

21. Margreiter, G., Messner, P., Caldwell, K. D. & Bayer, K. Size characterization of inclusion bodies by sedimentation field-flow fractionation. *J. Biotechnol.* **138**, 67-73 (2008).

22. Suci, P. A., Klem, M. T., Arce, F. T., Douglas, T. & Young, M. Assembly of multilayer films incorporating a viral protein cage architecture. *Langmuir* **22**, 8891-8896 (2006).

23. Ludden, M. J., Mulder, A., Tampe, R., Reinhoudt, D. N. & Huskens, J. Molecular printboards as a general platform for protein immobilization: a supramolecular solution to nonspecific adsorption. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **46**, 4104-4107 (2007).

24. Masaki Uchida, Michael T. Klem, Mark Allen, Peter Suci, Michelle Flenniken, Eric Gillitzer, Zachary Varpness, Lars O. Liepold, Mark Young, and Trevor Douglas, Biological Containers: Protein Cages as Multifunctional Nanoplatforms, *Adv. Mater.*, **19**, 1025-1042 (2007)

25. Dawn M. Yanker and Joshua A. Mauer, Direct printing of trichlorosilanes on glass for selective protein adsorption and cell growth, *Mol. Biosyst.*, **4**, 502-504 (2008).

26. Lipski, A. M., Pino, C. J., Haselton, F. R., Chen, I. W. & Shastri, V. P. The effect of silica nanoparticle-modified surfaces on cell morphology, cytoskeletal organization and function. *Biomaterials* (2008).

27. El-Ghannam, A. R. *et al.* Model surfaces engineered with nanoscale roughness and RGD tripeptides promote osteoblast activity. *J. Biomed. Mater. Res. A* **68**, 615-627 (2004).

28. Dulgar-Tulloch, A. J., Bizios, R. & Siegel, R. W. Human mesenchymal stem cell adhesion and proliferation in response to ceramic chemistry and nanoscale topography. *J. Biomed. Mater. Res. A* (2008).

29. Samaroo, H. D., Lu, J. & Webster, T. J. Enhanced endothelial cell density on NiTi surfaces with sub-micron to nanometer roughness. *Int. J. Nanomedicine.* **3**, 75-82 (2008).

30. Dorota I. Rozkiewicz, Bart Jan Ravoo, and David N. Reinhoudt Reversible Covalent Patterning of Self-Assembled Monolayers on Gold and Silicon Oxide Surfaces *Langmuir*, **21**, 6337-6343 (2005).

31. Shu-Han Hsu, David N. Reinhoudt, Jurrian Huskens, and Aldrik H. Velders, Imidazolide monolayers for reactive microcontact printing, *J. Mater. Chem.*, **18**, 4959-4963 (2008).

32. Kane, R. S., Takayama, S., Ostuni, E., Ingber, D. E. & Whitesides, G. M. Patterning proteins and cells using soft lithography. *Biomaterials* **20**, 2363-2376 (1999).

33. Renault, J. P. *et al.* Fabricating microarrays of functional proteins using affinity contact printing. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **41**, 2320-2323 (2002).

REIVINDICACIONES

1.- Cuerpo de inclusión aislado que comprende un polipéptido caracterizado porque el cuerpo de inclusión está en forma particulada.

2.-Cuerpo de inclusión aislado según la reivindicación 1, en el que la forma particulada tiene un tamaño de partícula entre 24 y 1500 nm.

3.- Cuerpo de inclusión aislado según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que la partícula está en forma amorfa hidratada.

4.- Cuerpo de inclusión aislado según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el polipéptido es un polipéptido quimérico que comprende una proteína viral fusionada de manera traduccional con una proteína informadora.

5.- Cuerpo de inclusión aislado según la reivindicación 4, en el que la proteína viral es una proteína de la cápside.

6.- Cuerpo de inclusión aislado según cualquiera de las reivindicaciones 4-5, en el que la proteína informadora es una proteína fluorescente.

7.- Composición que comprende el cuerpo de inclusión según cualquiera de las reivindicaciones 1-6 y una célula eucariota.

8.- Composición según la reivindicación 7, en la que la célula eucariota es una célula de mamífero.

9.- Composición que comprende el cuerpo de inclusión según cualquiera de las reivindicaciones 1-6 y un tejido de animal o planta.

10.- Cuerpo de inclusión aislado según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el cuerpo de inclusión se deposita sobre una placa tratada con cultivo de tejido.

11.- Cuerpo de inclusión aislado según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el cuerpo de inclusión se deposita sobre un sustrato de silicio.

12.- Cuerpo de inclusión aislado según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el cuerpo de inclusión se incorpora dentro de un andamiaje tridimensional de tipo sintético o natural.

13.- Uso del cuerpo de inclusión aislado según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, 10-12, como estimulador de la proliferación de células eucariotas.

14.- Uso del cuerpo de inclusión aislado según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, 10-12, como regenerador de tejido.

15.- Cuerpo de inclusión aislado según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, 10-12, para su uso como medicamento.

16.- Célula bacteriana que comprende el cuerpo de inclusión tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-6.

17.- Célula bacteriana según la reivindicación 16, en la que la célula bacteriana es Escherichia Coli.

18.- Célula bacteriana según la reivindicación 17, en la que E. coli se selecciona entre E. coli de cepa salvaje o una cepa mutante.

FIGURA 1A

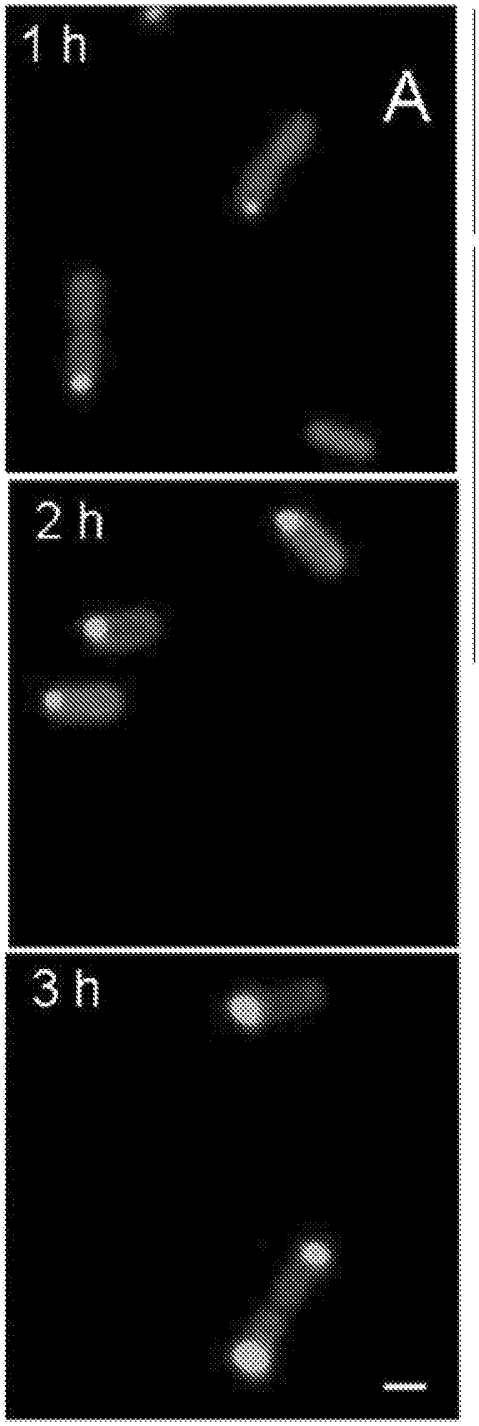


FIGURA 1B

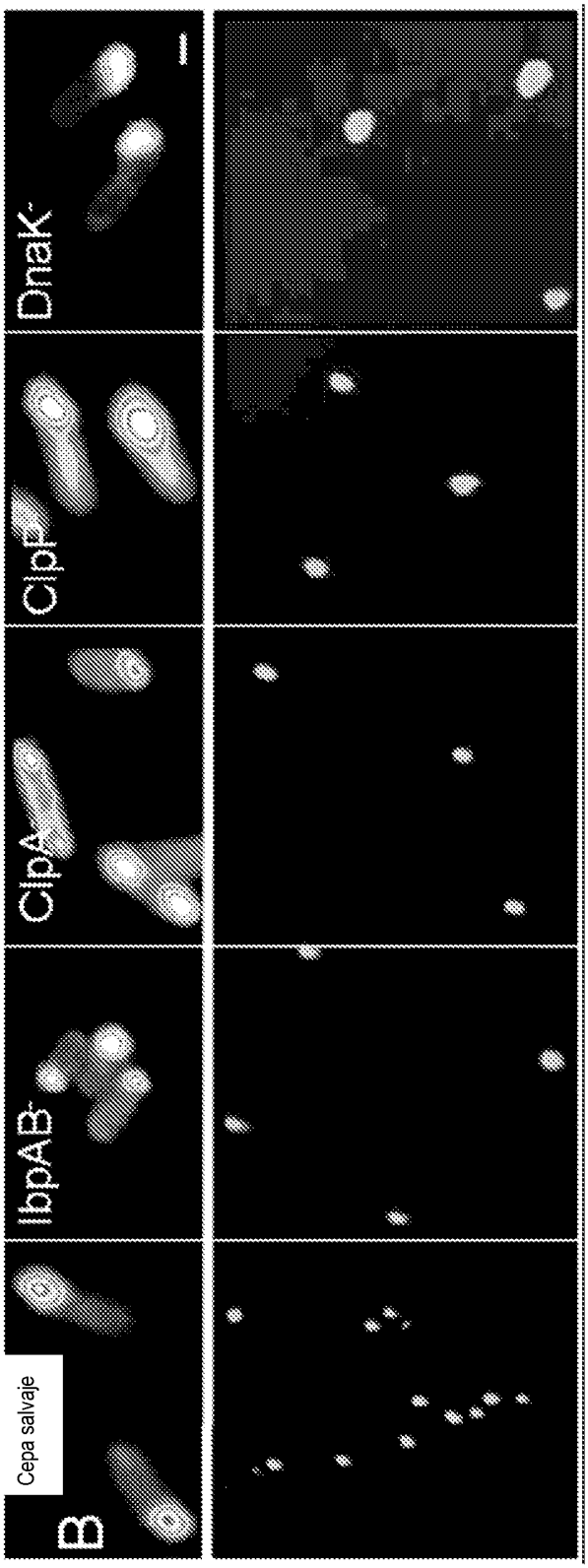


FIGURA 1C

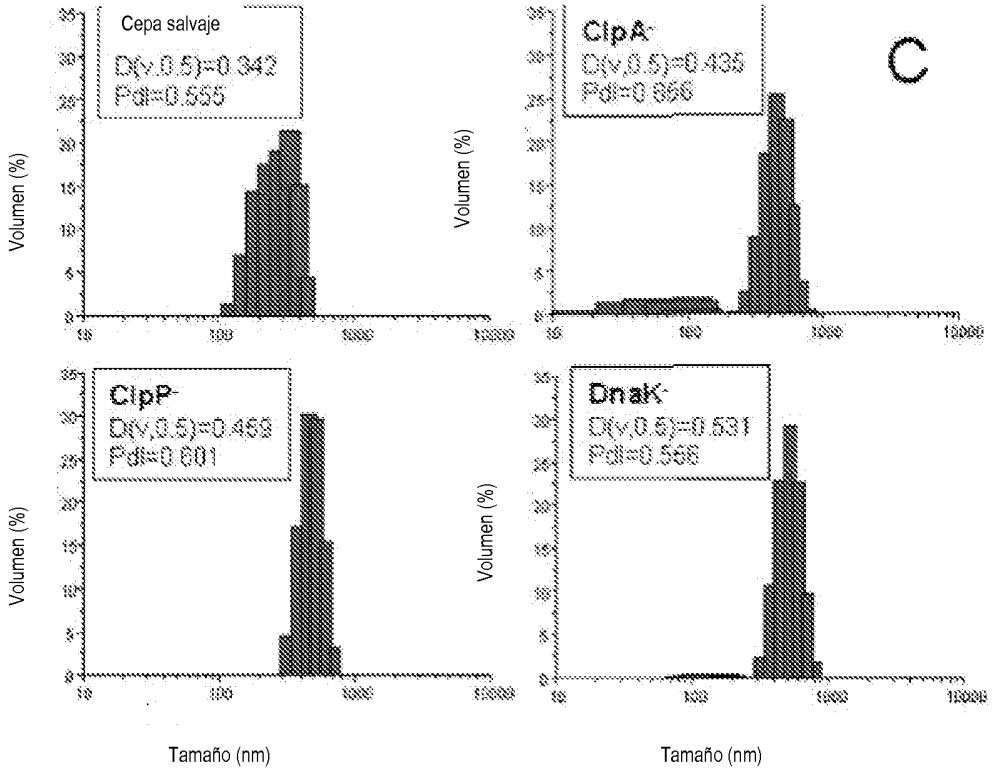
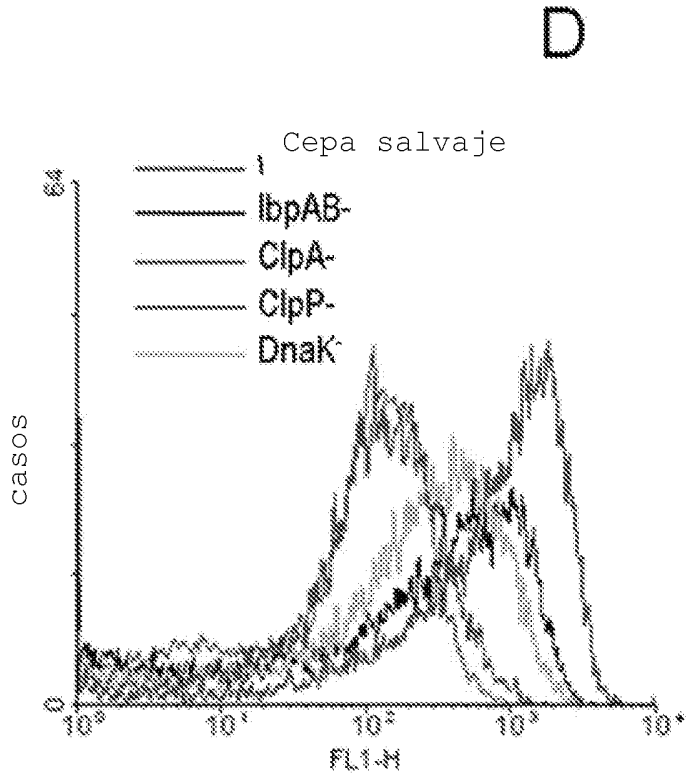

Cepa salvaje
D(v,0.5)=0.342
PdI=0.555
ClpA-
D(v,0.5)=0.435
PdI=0.866
C
ClpP-
D(v,0.5)=0.459
PdI=0.601
DnaK-
D(v,0.5)=0.531
PdI=0.568
Volumen (%)
Volumen (%)
Volumen (%)
Volumen (%)
Tamaño (nm)
Tamaño (nm)

FIGURA 1D


D
Cepa salvaje
IbpAB-
ClpA-
ClpP-
DnaK-
casos
64
0
10⁰
10¹
10²
10³
10⁴
FL1-H

FIGURAS 2A y 2B

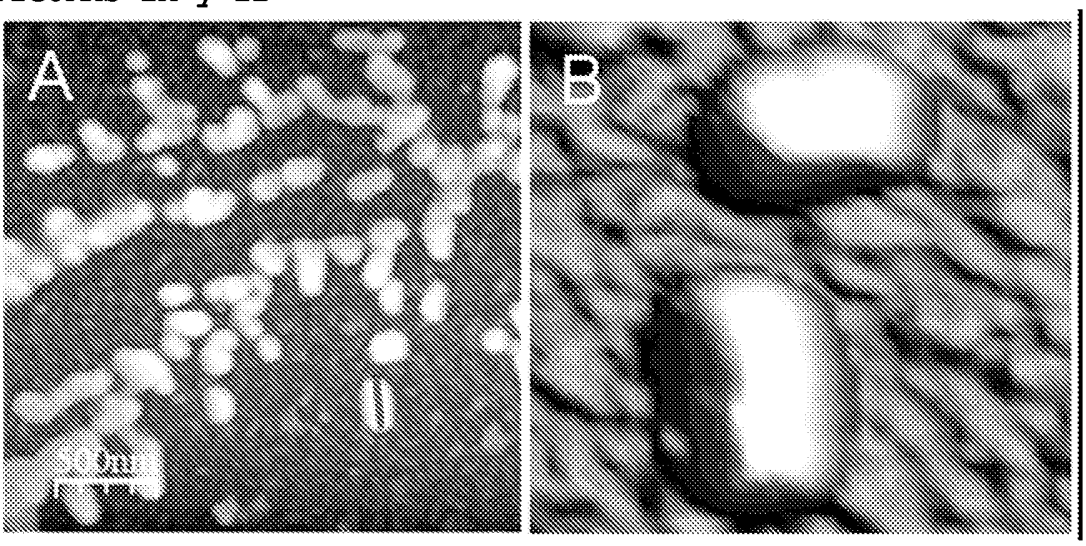


FIGURA 2C

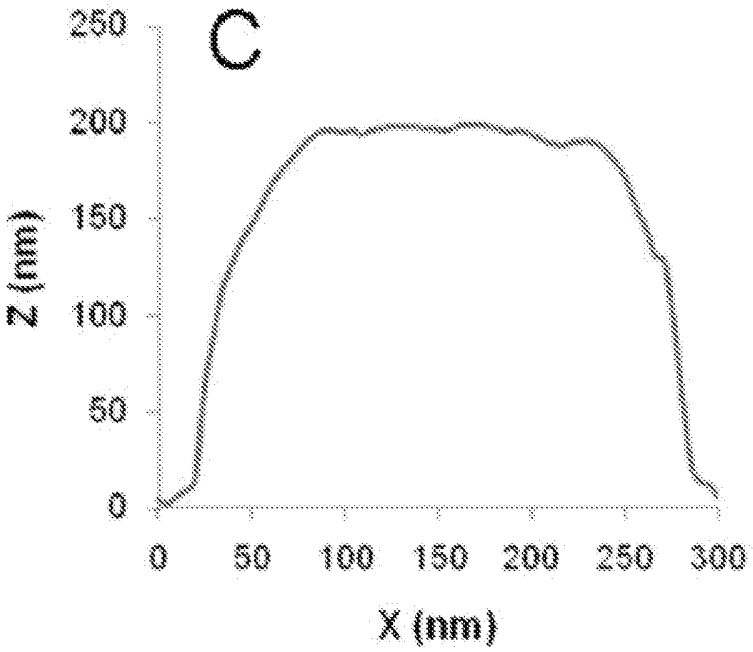


FIGURA 2D

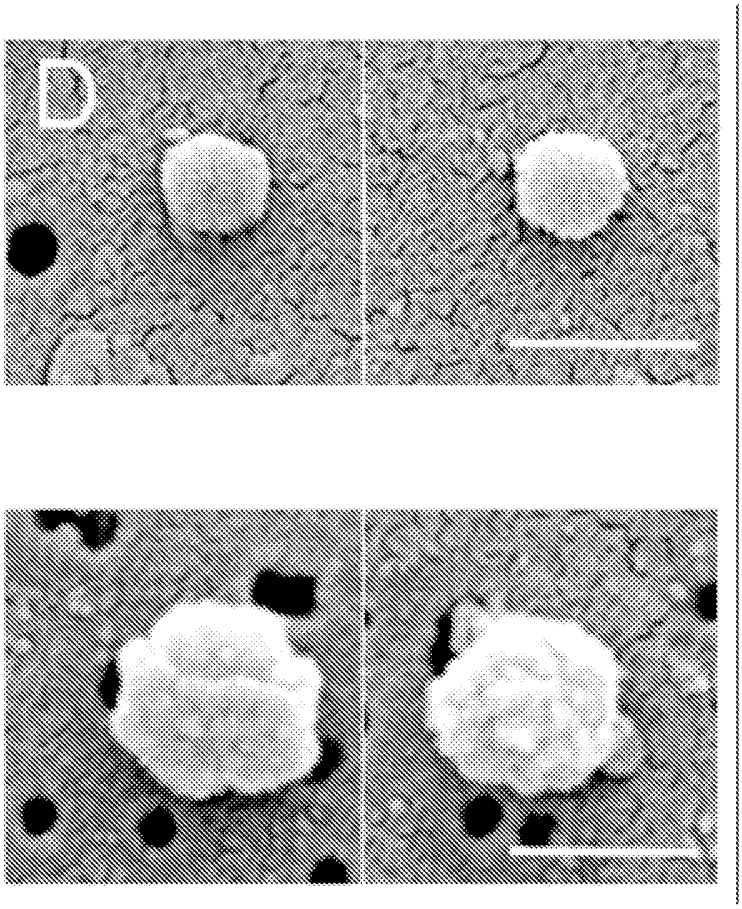


FIGURA 2E

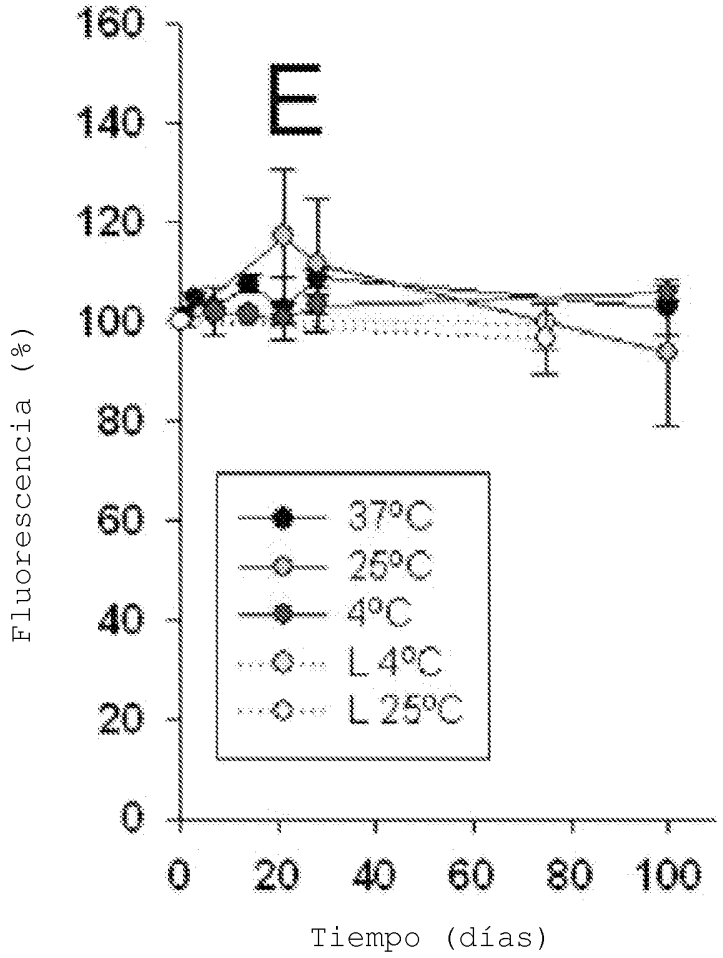
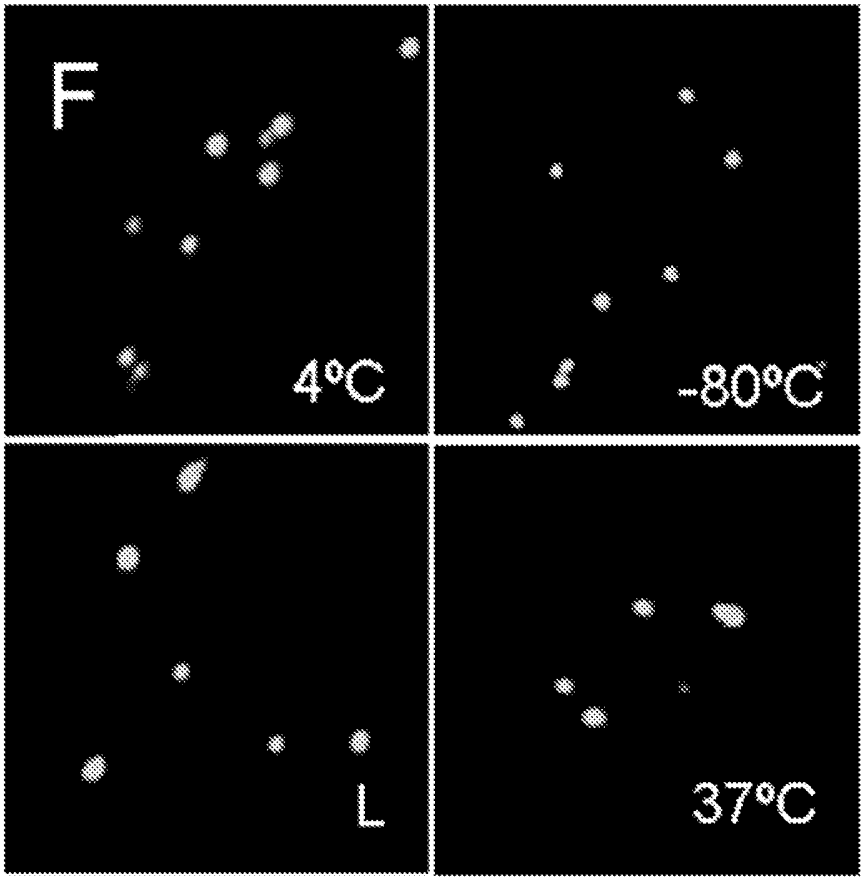

E
160
140
120
100
80
60
40
20
0
Fluorescencia (%)
0
20
40
60
80
100
Tiempo (días)
37ºC
25ºC
4ºC
L 4ºC
L 25ºC

FIGURA 2F



FIGURAS 3A y B

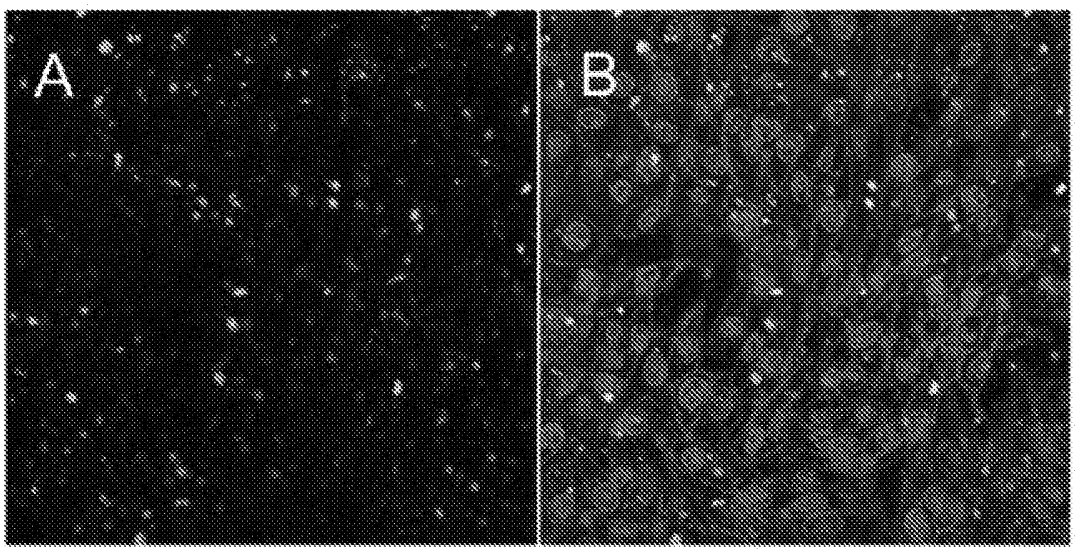


FIGURA 3C

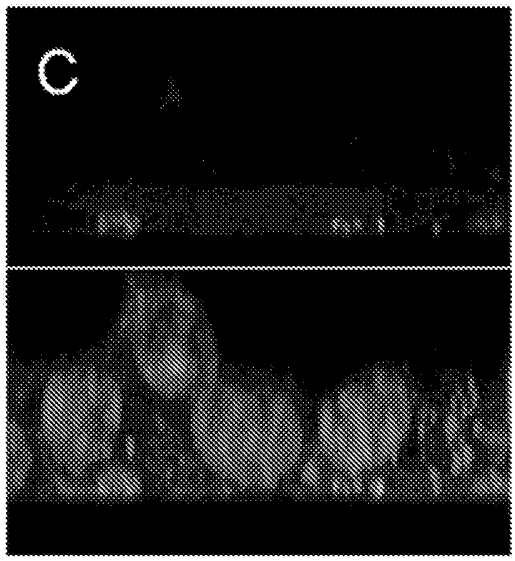


FIGURA 3D

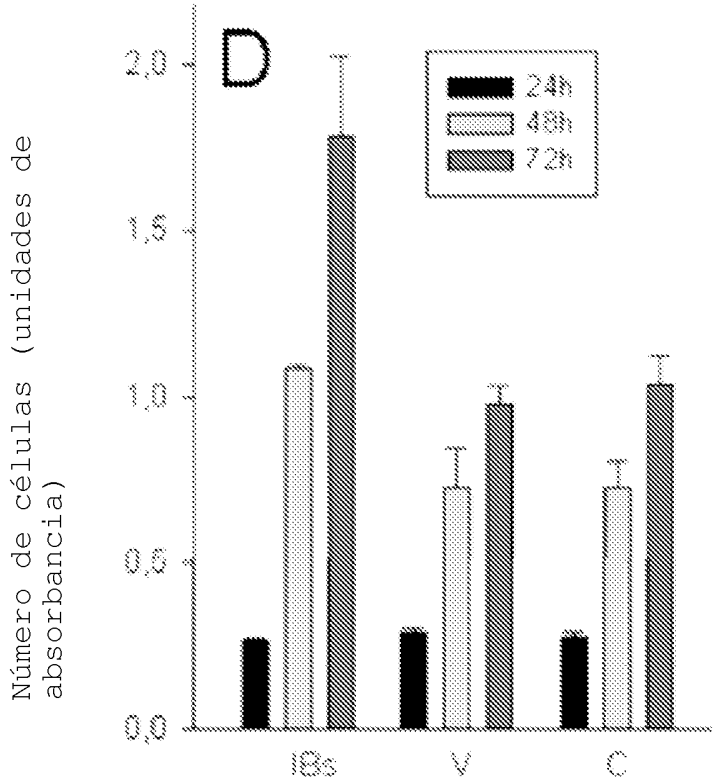

D
24h
48h
72h
Número de células (unidades de absorbancia)
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
IBs
V
C

FIGURA 3E

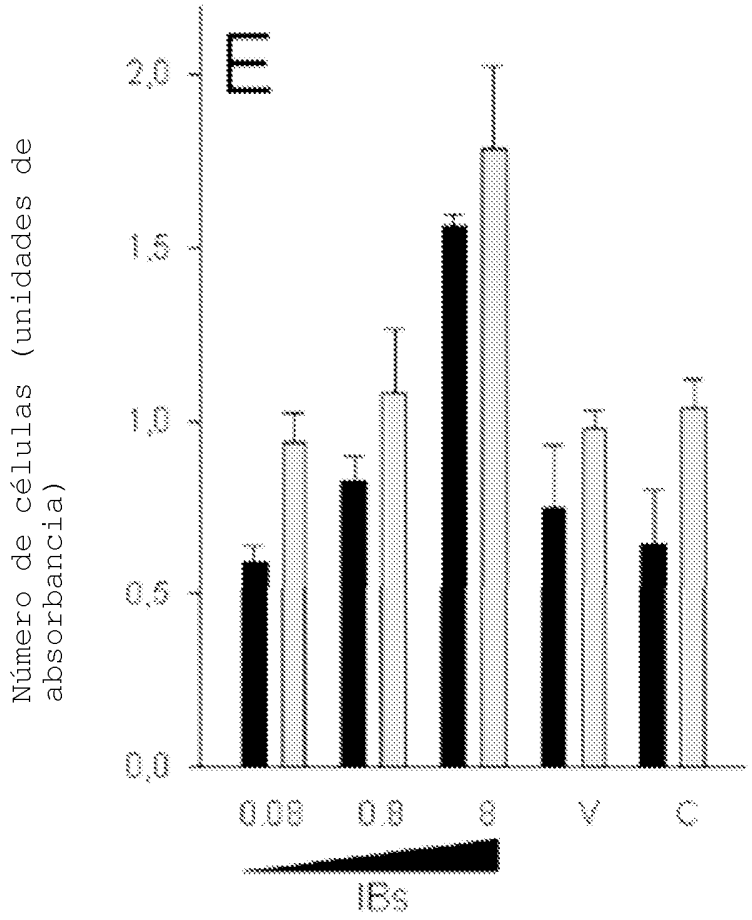

E
Número de células (unidades de absorbancia)
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
0.08
0.8
8
V
C
IBs

FIGURA 3F

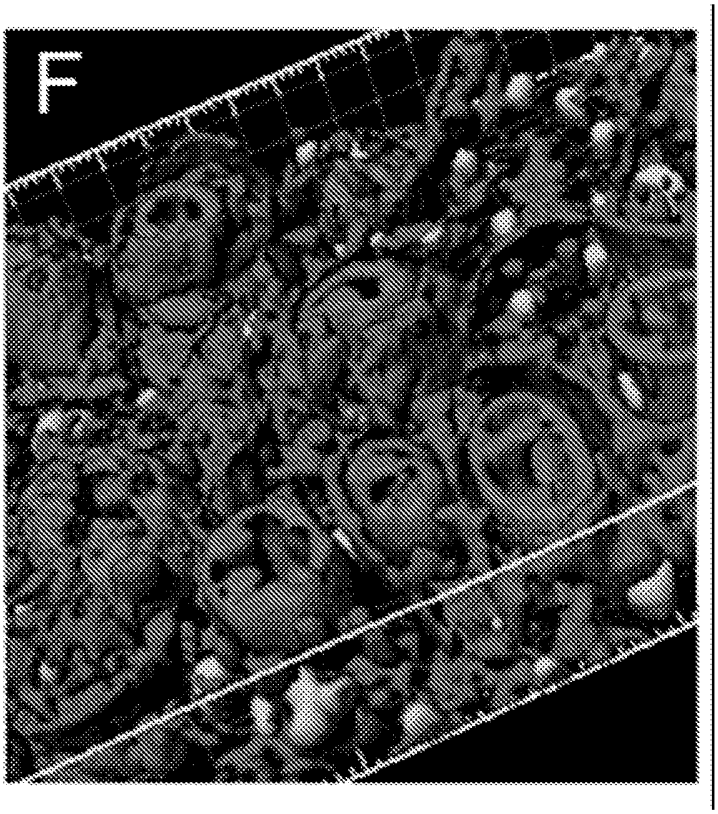
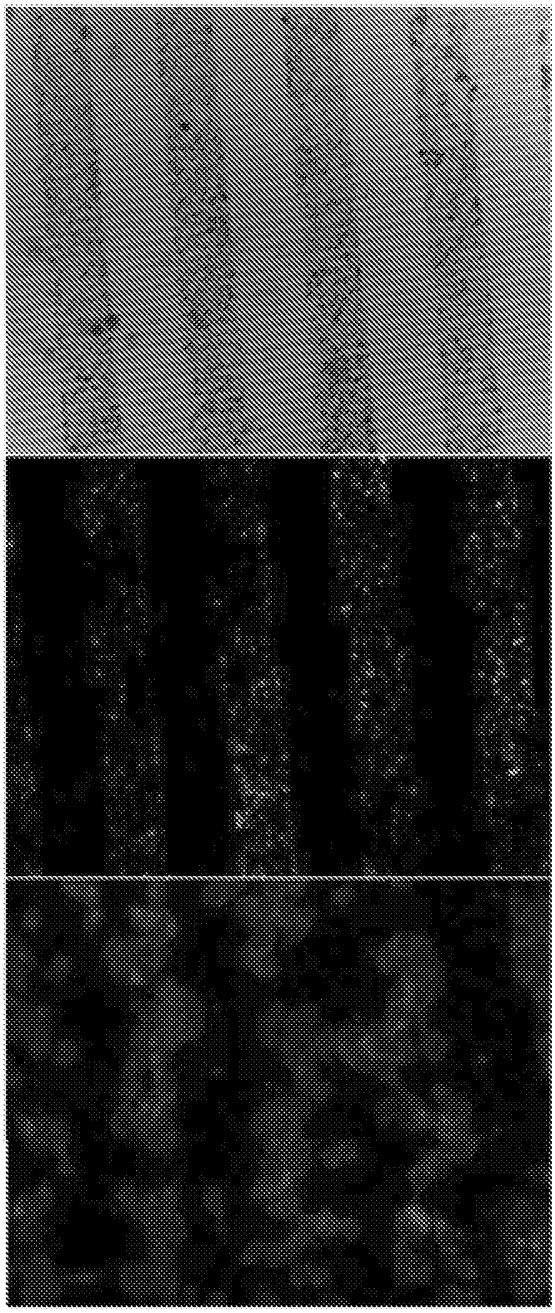


FIGURA 3G

G



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ ES 2009/070616

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

see extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12P21/02, C12N15/62, C07K14/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

INVENES,EPODOC, WPI, NPL, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, XPESP

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JEONG HYUN SEO ET AL "Baculoviral polyhedrin as a novthe fusion partner for formation of inclusion body in Escherichia coli" BIOTECHNOLOGY AND BIOENGIEEREING, vol. 84 no.4 20.11.2003, pages 467-473. Abstract, pages 467-470, 472.	1-6, 10-12, 15-18
A	Page 472.	7-9, 13,14
X	KWANG KOOK LEE ET AL "Abnormal cell division caused by inclusion bodies in E. coli; increased resistance against external stress" MICROBIOLOGICAL RESEARCH. vol. 163. 15.07.2008, pages 394-402. Abstract, page 394-396, 400 and 401.	1-6, 10-12, 15-18
A	Pages 400-401.	7-9, 13, 14

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents , such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
16 April 2010 (16.04.2010)	**(21/04/2010)**
Name and mailing address of the ISA/ O.E.P.M. Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España. Facsimile No. 34 91 3495304	Authorized officer S. González Peñalba Telephone No. +34 91 349 30 25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 2009/070616

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DAVID D. CHOIE ET AL "Cell proliferation in rat kidneys after prolonged treatment with lead" AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY, vol. 68, no. 2, 1972, pages 359-370.Abstract, pages 362, 364-365.	1-18
A	ANNA M. LIPSKI ET AL "The effect of silica nanoparticle-modified surfaces on cell morphology, cytoskeletal organization and function" BIOMATERIALS. vol 29, 01.10.2008, pages 3836-3846. Abstract, pages 3836-3837, 3839, 3841-3843 and 3845.	1-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 2009/070616

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12P 21/02 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
C07K 14/00 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional Nº

PCT/ ES 2009/070616

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver hoja adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

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

C12P21/02, C12N15/62, C07K14/00

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES,EPODOC, WPI, NPL, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, XPESP

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones Nº
X	JEONG HYUN SEO ET AL "Baculoviral polyhedrin as a novel fusion partner for formation of inclusion body in Escherichia coli" BIOTECHNOLOGY AND BIOENGIEEREING, vol. 84 no.4 20.11.2003, páginas 467-473. Resumen, páginas 467-470, 472.	1-6, 10-12, 15-18
A	Página 472.	7-9, 13,14
X	KWANG KOOK LEE ET AL "Abnormal cell division caused by inclusion bodies in E. coli; increased resistance against external stress" MICROBIOLOGICAL RESEARCH. vol. 163. 15.07.2008, páginas 394-402. Resumen, página 394-396, 400 y 401.	1-6, 10-12, 15-18
A	Páginas 400-401.	7-9, 13, 14

☒ En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos ☐ Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

* Categorías especiales de documentos citados:

"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.

"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.

"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).

"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.

"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.

"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.

"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.

"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.	Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional
16 Abril 2010 (16.04.2010)	**21 de Abril de 2010 (21/04/2010)**
Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M. Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España. Nº de fax 34 91 3495304	Funcionario autorizado S. González Peñalba Nº de teléfono +34 91 349 30 25

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional Nº

PCT/ES 2009/070616

C (continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones Nº
A	DAVID D. CHOIE ET AL "Cell proliferation in rat kidneys after prolonged treatment with lead" AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY, vol. 68, no. 2, 1972, páginas 359-370.Resumen, páginas 362, 364-365.	1-18
A	ANNA M. LIPSKI ET AL "The effect of silica nanoparticle-modified surfaces on cell morphology, cytoskeletal organization and function" BIOMATERIALS. vol 29, 01.10.2008, páginas 3836-3846. Resumen, páginas 3836-3837, 3839, 3841-3843 y 3845.	1-18

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional Nº

PCT/ ES 2009/070616

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C12P 21/02 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
C07K 14/00 (2006.01)