



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 357 547**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/04 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

G01N 33/542 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06011717 .3**

96 Fecha de presentación : **02.09.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1762626**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.03.2007**

54 Título: **Amplificación de señal usando un zimógeno sintético.**

30 Prioridad: **02.09.2003 US 499846 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.04.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.04.2011

73 Titular/es:
SYSTAGENIX WOUND MANAGEMENT IP Co. B.V.
Wtc, Tower B, 11th Floor, Strawinskylaan 1135
1077 XX Amsterdam, NL

72 Inventor/es: **Colpas, Gerard J.;**
Sebastian, Shite y
Sanders, Mitchell C.

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 357 547 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

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

5 Mediante la amplificación de señales químicas, puede detectarse un proceso que experimenta una reacción química, incluso a concentraciones muy bajas. Dicho proceso de amplificación tiene la posibilidad de proporcionar una gran utilidad en cualquier campo que requiera detección sensible y/o rápida de reacciones químicas. Por ejemplo, dicho proceso podría usarse para detectar microorganismos que provocan infección y enfermedad, agentes químicos o de guerra biológica o contaminantes ambientales.

10 En la actualidad, no existen procedimientos que proporcionen una detección sensible y rápida de reacciones químicas. Los procedimientos actuales son demasiado lentos o no son suficientemente sensibles. Por ejemplo, algunos procedimientos de detección pueden detectar la presencia de bacterias nocivas a lo largo de unas pocas horas. Sin embargo, con frecuencia es crítico detectar patógenos en un periodo de unos pocos minutos para determinar que un paciente tendrá una infección. La capacidad de detectar la presencia de bacterias nocivas antes de la aparición de la infección permitiría que la curación de heridas y quemaduras se produjera de forma más rápida y con menos complicaciones. Además, después de dar el alta a los pacientes del hospital, éstos pasan a ser responsables de controlar sus propios cuidados sanitarios y los síntomas de la infección podrían no resultar evidentes para el paciente no experto. La rápida identificación de cepas bacterianas peligrosas permitiría la prescripción del tratamiento más apropiado y evitaría el abuso de antibióticos de amplio espectro dando como resultado consecuencias mejoradas para el paciente y una reducción en el desarrollo de cepas de bacterias resistentes a antibióticos.

25 Las quemaduras graves son un motivo principal para la admisión en unidades de cuidados intensivos. Actualmente, los pacientes con quemaduras totales por encima del 20% de la superficie corporal tienen una tasa de mortalidad del 22%. Aunque la terapia antimicrobiana moderna ha mejorado los resultados para pacientes con quemaduras serias, las infecciones siguen siendo una causa principal de morbilidad y mortalidad en pacientes que sobreviven a la fase de choque de una lesión térmica. A pesar de terapias de antibióticos y asepsia mejorada, con frecuencia el control de la infección no es completamente exitoso. La infección también es una de las principales causas del padecimiento del paciente, escasa curación de heridas, destrucción de tejido amplia y complicaciones locales y sistémicas serias. Por lo tanto, el control de una infección en un paciente gravemente quemado desempeña un papel importante en el pronóstico, debido a que la aparición de infecciones serias pueden conducir a la muerte del paciente, directamente o a través de mecanismos relacionados (por ejemplo, el aplazamiento de la cirugía debido a condiciones generales negativas).

35 Las infecciones intrahospitalarias son una preocupación seria para los hospitales, puesto que muchos pacientes son débiles o tienen el sistema inmune comprometido y son susceptibles a morbilidad y mortalidad significativas. Las tasas de colonización son significativamente más altas en el ambiente hospitalario, tanto entre trabajadores de los cuidados sanitarios como entre pacientes. Además, los organismos colonizadores en el ambiente hospitalario son probablemente resistentes a muchas formas de terapia antimicrobiana, debido a la fuerte presión selectiva que existe en el ambiente nosocomial, en el que se usan con frecuencia antibióticos. Se estima que existen más de 2 millones de infecciones adquiridas en hospitales cada año que podrían haberse evitado mediante un lavado de manos apropiado y sistemas de detección rápidos para patógenos microbianos. Estas infecciones pueden ser mortales para muchos pacientes. Por ejemplo, pacientes mayores que desarrollan una infección transmitida por la sangre debido a implantación de catéteres tienen más de una tasa de mortalidad de más del 50%. Desafortunadamente, muchos síntomas sólo resultan evidentes después de que la infección se haya establecido.

50 La posibilidad de que se encuentren patógenos alimentarios o transmitidos por el agua en países del tercer mundo o se liberen en un ataque de bioterrorismo es problemática debido al estado de la tecnología actual. Muchas causas habituales de enfermedad son capaces de infectar a gente muy joven o a los mayores a través de agua o comida contaminadas, incluso a concentraciones muy bajas (tan poco como de 10 a 100 células de *Shigella*, *Salmonella* o *E. coli O157:H7* pueden provocar enfermedad o muerte). Un procedimiento que posibilite una detección temprana de dichos contaminantes sería beneficioso puesto que los procedimientos actuales requieren un tiempo de muestreo y recogida largos para detectar de forma apropiada la presencia e identidad de los patógenos. La detección temprana reduciría el número de retiradas de alimento e identificación escasa de marcas (por ejemplo, cuando una planta de procesado se cierra por la USDA).

55 En esta época de bacterias resistentes y armas biológicas, la detección e identificación rápida de

patógenos humanos y toxinas biológicas es crucial para que se pueda implementar la respuesta médica más apropiada. Una detección temprana requiere algún procedimiento de amplificación de señal, puesto que los agentes biológicos pueden infectar en cantidades tan pequeñas que los agentes pueden no detectarse por otras técnicas no amplificadas. Resultaría útil tener un procedimiento de amplificación de señal que supere los sistemas de detección e identificación existentes en su velocidad y simplicidad.

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a zimógenos y su uso en dispositivos de detección.

La presente solicitud también describe procedimientos para detectar la modificación de un péptido. En una realización, el procedimiento comprende las etapas de exponer un zimógeno a una muestra y detectar la modificación o una ausencia de la modificación. El zimógeno incluye un péptido exógeno y una enzima señal que se inhibe por el péptido exógeno. La exposición se produce en condiciones que facilitarían una modificación del péptido exógeno. La modificación incluye escindir el péptido exógeno y la escisión da como resultado la activación de la enzima señal y una señal detectable. Algunos ejemplos de enzimas señal adecuadas incluyen proteína verde fluorescente (GFP), luciferasa, lacasa (CotA) y peroxidasa de rábano rusticano (HRP).

En un ejemplo adicional descrito en el presente documento, el procedimiento comprende las etapas de exponer una estructura a una muestra y detectar la modificación o ausencia de la modificación. La estructura incluye un péptido exógeno y al menos un cofactor. La exposición se produce en condiciones que facilitarían una modificación del péptido exógeno. La modificación incluye escindir el péptido exógeno y la escisión da como resultado que el cofactor active un zimógeno para producir una enzima señal. La escisión también dará como resultado una señal detectable.

En un ejemplo adicional descrito en el presente documento, el procedimiento comprende las etapas de exponer un péptido exógeno a una muestra y detectar la modificación o una ausencia de la modificación. El péptido exógeno se une al menos a dos enzimas y el péptido exógeno inhibe las enzimas. La exposición se produce en condiciones que facilitarían una modificación del péptido exógeno. La modificación incluye escisión del péptido exógeno y la escisión da como resultado la activación de las enzimas y una señal detectable.

En un ejemplo descrito en el presente documento, el procedimiento comprende las etapas de exponer un complejo a una muestra y detectar la modificación o una ausencia de la modificación. El complejo incluye al menos un péptido exógeno y al menos dos enzimas que se inhiben por el péptido exógeno. La exposición se produce en condiciones que facilitarían una modificación del péptido exógeno. La modificación incluye escindir el péptido exógeno y la escisión da como resultado una señal detectable.

En un ejemplo descrito en el presente documento, el procedimiento comprende las etapas de exponer un zimógeno a una muestra líquida y detectar la modificación o una ausencia de la modificación. El zimógeno incluye un péptido exógeno y una enzima señal que se inhibe por el péptido exógeno. El zimógeno se une a una superficie sólida en un punto de unión y la exposición se produce en condiciones que facilitarían una modificación del péptido exógeno. La modificación incluye escindir el péptido exógeno y la escisión da como resultado la activación de la enzima señal, la separación de la enzima señal de la superficie sólida y una señal detectable.

En un ejemplo descrito en el presente documento, es un zimógeno sintético que comprende una enzima unida covalentemente a un péptido exógeno de modo que el péptido exógeno inhibe una actividad enzimática de la enzima. El péptido exógeno incluye una diana de una enzima producida por un microorganismo.

Como se usa en el presente documento, una "diana" es una proteína, péptido o parte de una proteína o péptido que actúa como un sustrato. Es decir, una diana es un péptido, proteína o parte de los mismos al que se une y/o sobre el que actúa una enzima.

En un ejemplo descrito en el presente documento, es un complejo de zimógeno que comprende al menos dos enzimas, cada una unida covalentemente a un péptido exógeno, inhibiendo el péptido exógeno una actividad enzimática de cada enzima.

En una realización, la presente invención presenta dispositivos de ensayo. En una realización, el dispositivo de ensayo comprende una membrana, al menos un péptido unido a la membrana, una enzima señal unida al péptido y al menos un sustrato marcado de forma detectable unido a la membrana en una segunda localización. El péptido comprende un sustrato para una enzima producida por un microorganismo y el sustrato marcado de forma detectable comprende una diana para la enzima señal.

Como se describe en el presente documento, el dispositivo de ensayo comprende una superficie sólida, un sustrato peptídico unido a la superficie sólida y un zimógeno unido al sustrato peptídico. El zimógeno incluye una enzima señal que se inhibe por el sustrato peptídico.

5 Como se describe en el presente documento, el dispositivo de ensayo puede presentar un zimógeno sintético que comprende *CotA* de *Bacillus subtilis* con un péptido exógeno (péptido no nativo) insertado en el sitio activo (sitio catalítico) del zimógeno, en el que el péptido insertado inhibe la actividad enzimática del zimógeno. El péptido insertado también puede comprender un sustrato peptídico diana específico para una enzima producida por un microorganismo de interés (a detectar en una muestra). El
10 microorganismo de interés es un microorganismo seleccionado del grupo constituido por: bacterias, virus, hongos y moho.

También se describe en el presente documento un mutante de *CotA* (variante) de *Bacillus subtilis* que comprende *CotA* con un péptido exógeno que está constituido por el bucle lateral reactivo del inhibidor de proteinasa alfa-1 en el que el péptido inhibe la actividad lacasa.

15 También se describe en el presente documento un sensor para la detección de un microorganismo que comprende un zimógeno sintético.

También se describe en el presente documento un procedimiento para detectar una señal de una reacción que comprende el uso de un zimógeno sintético, en el que la reacción comprende la degradación de un péptido exógeno insertado en el zimógeno y en el que tras la degradación del péptido insertado la actividad enzimática del zimógeno se reactiva dando como resultado la catálisis de un sustrato específico de zimógeno y la generación de una señal detectable. La reactivación del zimógeno puede dar como resultado múltiples reacciones catalíticas de sustrato específico de zimógeno y de este modo multiplicar (ampliar) la señal generada de la degradación del péptido exógeno insertado. La señal detectable puede ser, por ejemplo, una señal colorimétrica o fluorescente.

20

25 La solicitud también describe un complejo de zimógeno sintético que comprende uno o más zimógenos sintéticos, en el que los zimógenos se acoplan (unen o enlazan) mediante un péptido que comprende un sustrato peptídico diana específico para un microorganismo de interés y para el zimógeno. La actividad enzimática del zimógeno puede ser, por ejemplo, actividad lacasa, fenol oxidasa u oxidasa de multicobre. En una realización, el complejo de zimógeno sintético comprende *CotA* de *Bacillus subtilis*.

30 La solicitud también describe un sensor para la detección de un microorganismo que comprende un complejo de zimógeno sintético.

35 La solicitud también describe un procedimiento para amplificar una señal a partir de una reacción que comprende el uso de un complejo de zimógeno sintético, en el que la reacción comprende la degradación del péptido de enlace y en el que tras la degradación del péptido de enlace los zimógenos enlazados se liberan entre sí y de forma sustancialmente simultánea la actividad enzimática de los zimógenos liberados se reactiva dando como resultado múltiples reacciones catalíticas de sustrato específico de zimógeno y la amplificación de una señal.

40 La solicitud también describe un zimógeno sintético que comprende una enzima no proteasa con un péptido de proteasa exógena (péptido no nativo) insertado en el sitio activo (sitio catalítico) del zimógeno, en el que el péptido insertado inhibe la actividad enzimática del zimógeno.

La solicitud también describe un procedimiento para fabricar un zimógeno sintético que comprende insertar un péptido de proteasa exógena en el sitio activo (sitio catalítico) de un zimógeno no proteasa, en el que el péptido insertado inhibe la actividad enzimática del zimógeno.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

45 Los anteriores y otros objetos, características y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción más particular de realizaciones preferidas de la invención, como se ilustra en los dibujos adjuntos en los que caracteres de referencia similares se refieren a las mismas partes a través de las diferentes vistas. Los dibujos no están necesariamente a escala, situándose el énfasis en su lugar en la ilustración de los principios de la invención.

50 El archivo de patente o solicitud contiene al menos un dibujo ejecutado en color. Las copias de esta publicación de patente o solicitud de patente con dibujos a color se proporcionarán por la Oficina bajo demanda y pago de la tarifa necesaria.

La Figura 1 ilustra un ejemplo comparativo de los resultados que pueden obtenerse con algunos de

los mecanismos de amplificación de la presente invención.

La Figura 2 ilustra un ejemplo de una representación gráfica del mecanismo general detrás de una realización de una amplificación catalítica.

5

La Figura 3 ilustra un ejemplo de una representación gráfica del mecanismo general detrás de una realización de una amplificación multicatalítica.

La Figura 4 ilustra una estrategia de exploración con zimógeno *in vitro* inicial general.

La Figura 5 ilustra un procedimiento mediante el que pueden identificarse clones individuales usando procedimientos de la presente invención.

La Figura 6 ilustra CotA de *Bacillus subtilis*.

10

La Figura 7 muestra el bucle lateral reactivo de proteinasa alfa-1 (RSL) asociado al extremo N terminal de CotA. La región de RSL de CPI usada en la secuencia peptídica de CPI2 se muestra en amarillo. La misma región asociada con CotA se muestra en blanco (negrita).

La Figura 8 ilustra mutagénesis de CotA, que incluye Mutantes SSM1, Mutantes SSM2, Mutantes SSM3, Mutantes SSM4 y Mutantes T3.

15

La Figura 9 ilustra una fotografía que confirma la inserción natural de 1,7 kb.

La Figura 10 ilustra una fotografía del gel que muestra sobreexpresión de CotA en el clon JS6.

La Figura 11 ilustra una fotografía de un gel de exploración de PCR de mutantes de CotA usando un conjunto de cebadores T7.

20

La Figura 12 ilustra una fotografía de un gel que muestra la sobreexpresión de CotA mutante (SSM1) en el clon JS6.

La Figura 13 ilustra un gráfico que muestra que las variantes de CotA se inhibieron parcialmente por prolongación y modificación de CotA.

La Figura 14 ilustra un gráfico de la reactivación del mutante de CotA SSM4-1.

La Figura 15 ilustra un diagrama de una realización de una membrana de flujo lateral multicanal.

25

La Figura 16 ilustra una fotografía de un gel de ADN (a la izquierda) junto con una fotografía de un gel de proteína (a la derecha).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

30

Sigue una descripción de una realización de referencia. Aunque la presente invención se ha mostrado de forma particular y se ha descrito con referencia a realizaciones preferidas de la misma, se entenderá por los expertos en la materia que pueden realizarse diversos cambios en forma y detalles de la misma sin alejarse del ámbito de la invención abarcada por las reivindicaciones adjuntas.

35

La presente invención se refiere a sistemas de amplificación de señal para sensores que detectan reacciones químicas (por ejemplo, sensores biopatogénicos). Mediante la utilización de una cascada de reacciones catalíticas multietapa, la presente invención posibilita una detección rápida y precisa de reacciones o agentes químicos. Por ejemplo, la presente invención puede usarse para detectar toxinas, proteasas o proteínas producidas por microorganismos (por ejemplo, virus, bacterias u hongos). La señal de una proteína microbiana (por ejemplo, una proteasa u otras enzimas) puede amplificarse y detectarse en segundos con un ensayo de detección (por ejemplo, un ensayo colorimétrico). La presente invención también puede usarse para detectar contaminación y/o infección microbianas. La presente invención posibilita sistemas de detección de fase líquida o sólida (por ejemplo, sensores o sistemas de sensores de patógenos) que superan los sistemas de detección e identificación existentes en su velocidad, precisión y/o sensibilidad. Los sensores y sistemas de sensores pueden usarse también para muestras de aerosol. La invención puede ser útil para aplicaciones médicas y militares.

40

45

Los microorganismos (por ejemplo, bacterias) secretan o producen enzimas y algunas de estas enzimas son específicas o únicas para el microorganismo productor o secretor. Como tal, algunas enzimas producidas por microorganismos pueden actuar como un "identificador" o diana y pueden usarse como un marcador o indicador para ensayos de detección. Algunas de estas dianas se han usado para producir ensayos rápidos y específicos para *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas*

5 *aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* y varias otras. Puesto que una cantidad muy pequeña de enzima puede transformar una gran cantidad de sustrato en condiciones apropiadas, un sensor basado en enzima puede conseguir un nivel de sensibilidad que no es posible con simples técnicas basadas en anticuerpos. Brevemente, estos sensores y ensayos de detección detectan la presencia de
10 microorganismos mediante la interacción con una proteína (por ejemplo, una proteasa u otra enzima) secretada o expresada por un microorganismo (por ejemplo, una bacteria u hongo). Por ejemplo, los sensores pueden incluir un péptido o sustrato que se diseña para interactuar con una enzima que es específica de un microorganismo de interés. Cuando el sustrato del sensor entra en contacto o interactúa con la enzima, el péptido se escinde o modifica de tal modo que se produce una señal detectable.

15 En un ejemplo, el sustrato se marca con dos colorantes diferentes, sirviendo un colorante para inactivar la transferencia resonante de energía de fluorescencia (FRET) al otro cuando las moléculas de colorante están en proximidad estrecha. FRET es el proceso de una interacción de estado excitado dependiente de distancia en la que la emisión de una molécula fluorescente se acopla a la excitación de otra. Un par de aceptor y donador típico para la transferencia resonante de energía consiste en ácido 4-(4-dimetilamino)fenil)azo benzoico (DABCYL) y ácido 5-[(2-aminoetilamino)naftaleno sulfónico (EDANS). EDANS se excita por iluminación con luz a una longitud de onda de aproximadamente 336 nm y emite un fotón con longitud de onda de aproximadamente 490 nm. Si un resto de DABCYL se localiza en un área de 20 angstroms del EDANS, este fotón se absorberá eficazmente. DABCYL y EDANS se unirán en
20 extremos opuestos de un sustrato peptídico. Si el sustrato está intacto, FRET será muy eficaz. Si el péptido se ha escindido por una enzima, los dos colorantes ya no estarán en proximidad estrecha y FRET será ineficaz. La reacción de escisión puede seguirse de la observación de una disminución en fluorescencia de DABCYL o un aumento de la fluorescencia de EDANS (pérdida de inactivación). De esta manera, se detecta la presencia de la enzima específica y por lo tanto la presencia del microorganismo productor de enzima.

25 En otro ejemplo, el sustrato se une a dos componentes colorimétricos. Uno de los componentes colorimétricos puede ser un primer color, por ejemplo, azul y el segundo componente colorimétrico puede ser un segundo color, por ejemplo, amarillo. Cuando están presentes en el mismo sustrato, el sustrato no modificado puede aparecer verde. Si el mismo sustrato se modifica (por ejemplo, mediante escisión enzimática del componente colorimétrico amarillo del sustrato) el sustrato puede aparecer azul. Por lo tanto, la modificación del sustrato se señalaría por un cambio en el color de verde a azul.

30 En otro ejemplo, un sustrato se marca con un componente colorimétrico y se une a un soporte sólido que está coloreado. El componente colorimétrico puede ser un primer color, tal como amarillo, y el soporte sólido puede ser un segundo color, tal como azul. La combinación del soporte sólido con el sustrato no modificado puede aparecer verde. Si el sustrato se modifica (por ejemplo, mediante escisión enzimática del componente colorimétrico amarillo del sustrato), la combinación de soporte sólido y el sustrato modificado aparecerá azul. Por lo tanto, la modificación del sustrato se señalará por un cambio en el color de verde a azul.

35 La realización descrita en el presente documento puede usarse para amplificar o mejorar los sensores y ensayos de detección descritos anteriormente. Sin embargo, los expertos en la materia reconocerán que otros sensores y ensayos de detección también pueden usarse junto con la presente invención. Algunos ejemplos de sensores y ensayos de detección para los que los ejemplos descritos en la presente solicitud pueden aplicarse se describen en la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° US 09/848.781, presentada el 3 de mayo de 2001, publicada el 22 de mayo de 2003, como la publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 2003/0096315 A1, y titulada "Device for Detecting Bacterial Contamination and Method of Use" (Dispositivo para la Detección de Contaminación Bacteriana y Procedimiento de Uso); Solicitud Internacional N° PCT/US03/03172, presentada el 31 de enero de 2003, publicada el 7 de agosto de 2003, como Publicación Internacional N° WO 03/063693 A2, y titulada "Method for Detecting Microorganisms" (Procedimiento para Detectar Microorganismos); Solicitud Internacional N° PCT/US2003/037319, presentada el 21 de noviembre de 2003, publicada el 10 de junio de 2004, como Publicación Internacional N° WO 2004/047614.

40 La solicitud describe la amplificación de una señal usando catálisis para multiplicar o aumentar el número potencial de acontecimientos de renovación catalíticos (es decir, reacciones catalíticas). Algunos ejemplos usan catálisis enzimática para multiplicar cada acontecimiento de renovación de una proteína microbiana (por ejemplo, una toxina o proteasa bacterianas). En otras realizaciones de referencia, la presente invención posibilita una amplificación adicional mediante el uso de un mecanismo multicatalítico o de "reacción en cadena" para aumentar la cantidad de enzima que puede activarse con cada acontecimiento de renovación. La Figura 1 ilustra un ejemplo comparativo de los resultados que pueden obtenerse con estos mecanismos de amplificación. La línea de tendencia marcada "tasa" representa las
45
50
55

renovaciones obtenidas sin el uso de un catalizador de la invención. La línea de tendencia marcada “catalítico” representa las renovaciones obtenidas usando catálisis enzimática para multiplicar cada acontecimiento de renovación. La línea de tendencia marcada “multicatalítico” representa las renovaciones obtenidas mediante el uso de un mecanismo multicatalítico o de “reacción en cadena” para

5

aumentar la cantidad de enzima que puede activarse con cada acontecimiento de renovación.

En algunas realizaciones de referencia, la invención es una amplificación de señal que utiliza catálisis enzimática para multiplicar cada acontecimiento de renovación de una proteína microbiana (por ejemplo, una toxina microbiana, tal como una proteasa u otra enzima producida por un microorganismo). Por ejemplo, un péptido que contiene una secuencia diana de una proteína microbiana de interés se enlaza o une con una enzima señal de modo que la actividad enzimática de la enzima se inhibe. En otras palabras, el péptido se une o incorpora a la enzima señal, produciendo de este modo un zimógeno (es decir, un precursor de enzima inactivo). La inhibición de la enzima señal puede conseguirse mediante, por ejemplo, la unión de una molécula a la enzima señal que bloquea de forma estérica el sitio activo de la enzima señal o provocando que la enzima señal se pliegue en una conformación inactiva. En una realización, una molécula de bloqueo se une a la enzima señal mediante enlaces disulfuro.

10

15

Este complejo inhibido puede reactivarse, por ejemplo, mediante una proteína microbiana (por ejemplo, una proteasa bacteriana) que reconoce la secuencia peptídica como un sustrato. La proteína microbiana escinde la parte peptídica del zimógeno, activando de este modo la enzima señal. La enzima señal puede entonces comenzar a transformar un sustrato marcado (por ejemplo, un sustrato marcado descrito anteriormente) para producir una señal detectable, tal como una señal colorimétrica o fluorescente. De este modo, cada acontecimiento de escisión de péptido individual puede multiplicarse mediante la enzima señal reactivada hasta un gran número de renovaciones en un corto periodo de tiempo.

20

La Figura 2 ilustra un ejemplo de una representación gráfica del mecanismo general detrás de esta amplificación catalítica. A la izquierda, un zimógeno incluye una secuencia peptídica y un inhibidor. El inhibidor está bloqueando de forma estérica un sitio activo, haciendo a la parte de enzima señal del zimógeno inactiva. El zimógeno se encuentra con una proteasa, que escinde la secuencia peptídica. La parte escindida del péptido, junto con la parte de inhibición, se mueve (por ejemplo, migra o difunde) lejos del sitio activo, eliminando de este modo la inhibición y activando la enzima señal. La enzima señal es entonces libre de catalizar un sustrato marcado, produciendo de este modo una señal detectable.

25

30

En otras realizaciones de referencia de la presente invención, se utilizan mecanismos de activación de enzima señal complementarios o alternativos para amplificar una señal para un ensayo de detección o un sensor. Por ejemplo, la actividad enzimática puede regularse mediante el control de la disponibilidad de un cofactor que se requiere por la enzima señal para la catálisis. Éste es un mecanismo adecuado para muchas enzimas señal que pueden producir una señal colorimétrica o fluorescente. En algunas realizaciones, se encierran cofactores de iones metálicos en una estructura que puede liberarse mediante una reacción de escisión peptídica. La escisión del péptido libera los iones metálicos y activa numerosas enzimas. De este modo, muchas enzimas señal pueden activarse a la vez, multiplicando de este modo la señal resultante.

35

En algunas realizaciones de referencia, la presente invención utiliza un mecanismo multicatalítico o de “reacción en cadena” para aumentar el número de enzimas señal que pueden activarse con cada acontecimiento de renovación, produciendo de este modo una señal amplificada a partir de un ensayo de detección o sensor. Por ejemplo, un péptido puede acoplar dos o más enzimas señal de modo que obstaculicen de forma estérica a las enzimas señal mientras que mantienen la disponibilidad del péptido para interactuar con una proteína microbiana (por ejemplo, de modo que pueda escindirse por una proteasa bacteriana). Las enzimas señal acopladas pueden ser la misma, similares o diferentes. En algunas realizaciones de referencia, la secuencia peptídica se diseña para ser un sustrato adecuado para la proteína microbiana y uno o más de las enzimas acopladas.

40

45

La Figura 3 ilustra un ejemplo de una representación gráfica del mecanismo general detrás de esta amplificación multicatalítica. A la izquierda, una secuencia peptídica se acopla con dos proteínas señal inactivas, siendo una proteína señal una enzima inactiva y siendo la otra proteína señal una proteasa inactiva. El péptido que acopla las dos proteínas señal las ha hecho inactivas. Después de que el complejo de zimógeno/péptido se encuentre con un péptido microbiano (por ejemplo, una proteasa bacteriana), la secuencia peptídica se escinde (por ejemplo, a través de hidrólisis), activando de este modo ambas proteínas señal. La enzima ahora activa se libera después para catalizar un sustrato marcado de forma detectable para producir una señal. La proteasa ahora activa es libre de catalizar la escisión de péptidos que están inhibiendo otras proteínas señal, multiplicando de este modo los acontecimientos de renovación aún más. De este modo, la señal detectable del ensayo de detección o

50

55

sensor se amplifica. El resultado es una amplificación de señal que proporcionaría un aumento relativamente mayor en la tasa de amplificación con el tiempo en comparación con ensayos de detección que se basan en un mecanismo en el que una proteína microbiana interacciona solamente o directamente con un sustrato marcado de forma detectable o en comparación con una amplificación catalítica que utiliza una etapa de activación de enzima señal sencilla. Un mecanismo similar puede usarse, por ejemplo, para una enzima hidrolítica con un sustrato fluorescente.

En algunas realizaciones de referencia, se usan uno o más de los procedimientos de amplificación descritos anteriormente junto con y/o con, un ensayo de detección que se basa en un mecanismo en el que una proteína microbiana interacciona directamente con un sustrato marcado de forma detectable. Por ejemplo, en una realización, la presente invención utiliza un complejo de zimógeno/péptido multicatalítico junto con un zimógeno sencillo y/o con un procedimiento de activación de enzima señal que se regula mediante el control de la disponibilidad de un cofactor que es necesario para la enzima señal para la catálisis.

DISEÑO DEL ZIMÓGENO

Al diseñar o seleccionar un zimógeno adecuado para su uso en la presente invención, deben considerarse varios factores, incluyendo:

1. La diferencia en actividad entre el zimógeno y la enzima señal. Preferentemente, la diferencia en actividad es suficientemente grande como para proporcionar la resolución de señal deseada.
2. El tipo de ensayo con el que se utilizará el zimógeno. Preferentemente, el ensayo es económico y no innecesariamente complejo para la aplicación de interés.
3. La sensibilidad del zimógeno. Preferentemente, el zimógeno es suficientemente sensible a la presencia de la proteína microbiana de interés para que el ensayo de detección proporcione una señal adecuada cuando el número de microorganismos que deben producir una señal detectable están presentes.
4. El mecanismo de activación. Preferentemente, el zimógeno se activa mediante el mecanismo deseado (por ejemplo, activación proteolítica).
5. El sitio de activación. Preferentemente, el sitio de activación se configura de modo que le permite interactuar de forma específica con un sustrato marcado de forma detectable u otro medio para producir una señal detectable.

Algunos o todos estos criterios pueden ser importantes, dependiendo de la aplicación específica o el microorganismo a detectar. La construcción o selección de un zimógeno que cumpla éstos u otros criterios puede realizarse mediante mutagénesis de una enzima adecuada para unir las regiones peptídicas y de inhibidor (o proteasa). Una vez que ésta se ha construido, puede usarse mutagénesis aleatoria para refinar las propiedades de inhibición y activación del zimógeno resultante.

Es ventajoso usar un procedimiento de exploración rápido para identificar las mutaciones que serían adecuadas para su uso como un zimógeno en un procedimiento de amplificación de la invención. Por ejemplo, la medición de la actividad puede realizarse de una forma secuencial, primero para la inhibición y otra vez después de la reactivación. La Figura 4 ilustra una estrategia de exploración *in vitro* inicial general, que puede incluir las etapas de

1. Las células se cultivan durante una noche en medio LB a 37°C.
2. Después de la inducción con IPTG 1 mM, las células se lisan y se unen a placas de unión de marcador de epítipo (por ejemplo, placas revestidas con ácido nitrilotriacético o anticuerpo).
3. Las placas se lavan después 3x con solución salina tamponada con fosfato (PBS).
4. Las células se incuban después con proteasas bacterianas para medir la reactivación de los mutantes de zimógeno de CotA.
5. Los mutantes que producen el mayor color reactivado en presencia de un sustrato (por ejemplo, ABTS) se identifican después mediante secuenciación de ADN.

Una reacción enzimática puede considerarse como un interruptor de encendido o interruptor de luz proteico universal que tiene varios usos, incluyendo amplificación de señal, exploración de alto rendimiento y suministro de proteínas. Para amplificación de señal, cualquier proteína o péptido que se

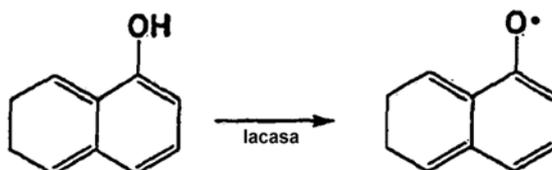
hidroliza mediante una proteasa puede permitir que un inhibidor se difunda lejos del sitio activo y activar la actividad enzimática que puede producir una señal. Para exploración de alto rendimiento, se puede situar una proteína o péptido aleatorios entre la enzima y los restos de inhibidor para explorar con respecto a enzimas nuevas (por ejemplo, proteasas).

5 Por último, para suministro de proteínas, una enzima puede fusionarse con un anticuerpo u otro fármaco basado en proteínas. La enzima fusionada puede usarse para suministrar la proteína en el sitio de enfermedad tal como una infección bacteriana o viral, y/o una célula tumoral. La hidrólisis específica del producto de fusión libera el anticuerpo o fármaco proteico y lo suministra en el sitio del patógeno o célula tumoral. De este modo, el fármaco proteico puede suministrarse de forma más precisa al área de tratamiento. Una vez suministrado, el fármaco proteico puede, por ejemplo, debilitar o matar al patógeno o la célula tumoral. En algunas realizaciones de la invención, un péptido bactericida puede unirse a un zimógeno con un engarce de activación que reacciona específicamente con, o es una diana de, proteínas secretadas o expresadas por un patógeno (por ejemplo, bacteriano). Tras encontrar o entrar en contacto con la bacteria en el torrente sanguíneo, esas proteasas específicas de las bacterias activarían el zimógeno (por ejemplo, reaccionando con un sustrato peptídico que está inhibiendo la enzima) y desencadenarían la liberación del péptido bactericida, que destruiría a continuación las bacterias. Este tipo de suministro dirigido de un agente bactericida puede reducir la posibilidad de que las bacterias desarrollen una resistencia farmacológica para el agente.

20 Un análisis adicional del diseño, fabricación y uso de zimógenos sintéticos se encuentra en la Patente de Estados Unidos N° 5.811.252, concedida a Johan Hendrikus Verheijen el 22 de septiembre de 1998; Verheijen, J.H., y col., "Modified Proenzymes as Artificial Substrates for Proteolytic Enzymes: Colorimetric Assay of Bacterial Collagenase and Matrix Metalloproteinase Activity Using Modified Pro-Urokinase", *Biochem. J.*, 323: 603-609 (1997); Plankum, P., y col., "Creation of a Zymogen", *Nature Struct. Biol.*, 10(2): 115-119 (2003); y Saghatelian, A., y col., "DNA Detection and Signal Amplification Via an Engineered Allosteric Enzyme", *JACS*, 125: 344-345 (2003). Adicionalmente, se encuentran ejemplos de microorganismos, enzimas y sustratos específicos para su uso con la presente invención en la Solicitud de Estados Unidos e Internacional anteriormente mencionada.

LACASA (CotA).

30 En una realización de referencia, la enzima señal es una lacasa. Lacasa (difeno oxidasa) es un miembro de la familia multicobre oxidasa de enzimas. Generalmente, estas enzimas requieren oxígeno para oxidar fenoles, aminas aromáticas de polifenoles y otros sustratos no fenólicos mediante un electrón para crear una especie radical. La reacción de oxidación general que cataliza es:



35 La lacasa se encuentra en hongos así como en algunas plantas y bacterias. La función natural de la lacasa parece ajustarse a dos clases: formulación (esporulación o pigmentación) y degradación. La lacasa se usa en la química industrial para decoloración y biorremediación de colorantes y la degradación de lignina. Es una enzima adecuada para la síntesis de un zimógeno en parte debido a su estabilidad y sus propiedades oxidativas. La oxidación de la especie da como resultado un electrón desparejado que genera un cambio de color.

40 La Figura 6 ilustra la CotA de *Bacillus subtilis*, que es un ejemplo de una lacasa bacteriana. La enzima se usa en la construcción de la cubierta de espora durante la esporulación. (Véase, por ejemplo, Enguita, F.J. y col., "Crystal Structure of a Bacterial Endospore Coat Component", *J Biol. Chem.*, 278(21): 19416-19425 (2003), los contenidos completos de la cual se incorporan en el presente documento por referencia). La función natural de CotA parece implicar la pigmentación de esporas para resistencia a UV y H₂O₂. El sitio activo parece aceptar sustratos mayores que las enzimas halladas en hongos y plantas. CotA es altamente termoestable y puede usarse, por ejemplo, en una base de detergente o una base de urea de formalina. No es soluble y puede actuar como una proteína de membrana. Una ventaja de usar CotA u otras lacasas en lugar de un simple enfoque de proteasa es la velocidad. CotA y lacasa son enzimas catalíticas y, por lo tanto, mucho más rápidas en la producción de un cambio de color que un simple ensayo de proteasa (generalmente en segundos en lugar de a lo largo de varios minutos).

La secuencia de CotA es la siguiente:

·MTLEKFVDALPDPDLKPVQSQSKEKTYEVTMEECTHQLHRDLPPTRLWG
 ·YNGLFPGPTIEVKRNENVYVKWMNNLPSTHFLPIDHTIHHSDSQHEEPEVKT
 ·VVHLHGGVTPDDSDGYPEAWFSKDFEQTGPYFKREVYHYPNQQRGAILWY
 HDHAMALTRLNVYAGLVGAYIIHDPKEKRLKLPSEYDVPLLITDRITNEDG
 ·SLFYPSAPENPSPSLPNPSIVPAFCGETILVNGKVWPYLEVEPRKYRFRVINAS
 NRTYNSLSDNGGDFIQIGSDGGLLPRSVKLSNSFLAPAERYDIIDFTA YEGE
 ·SILLANSAGCGGDVNPETDANIMQFRVTKPLAQKDESARKPKYLASYPVQHE
 RIQNRTLKLAGTQDEYGRPVLLLNNKRWHDPVTETPKVGTTEIWSIINPTRG
 THPIHLHLVSFRVLDRRPFDIARYQESGELSYTGA VPPPPSEKGWKDTIQAH
 AGEVLRIAATFGPYSGRYVWHCHILEHEDYDMMRPM DITDPHK

(Secuencia de CotA de *Bacillus subtilis*; también denominada en el presente documento "SEC ID N°: 1").

5 CotA se usó para construir un zimógeno mediante la modificación de la secuencia para generar una forma proenzimática de la proteína. El análisis de la estructura de CotA indica que una extensión de longitud adecuada añadida en el extremo N terminal de CotA puede permitir que un inhibidor añadido se sitúe en el sitio activo de la enzima. El brazo de extensión se basa en la secuencia de péptidos que han demostrado ser dianas de escisión de proteasas de bacterias patógenas. Esto permitirá que el brazo se elimine en presencia de la bacteria. En una realización de referencia, el sustrato peptídico es CPI2 o ECT2. Las secuencias de los sustratos peptídicos CPI2 y ECT2 son las siguientes:

10 CPI2 Edans - EGAUFLEAIPMSIPK-DabcyI
 ECT2 DabcyI-KVSRRRRRGGD- Edans

(la secuencia EGAMFLEAIPMSIPK también se denomina en el presente documento SEC ID N°: 2 y la secuencia KVSRRRRRGGD también se denomina en el presente documento SEC ID N° 3).

15 Al final del brazo de extensión se localiza la región que interactuará con el sitio activo de la enzima. Esta consiste en uno o más restos aminoacídicos que pueden inhibir la actividad de CotA. Esto puede conseguirse mediante la unión con el bolsillo del sitio activo y/o con el cobre del sitio activo o mediante interacción con la estructura de la proteína de modo que provoque un cambio estructural. Se usó análisis de la estructura de rayos X de CotA para determinar la longitud de la cadena de aminoácidos necesaria para conseguir la distancia más corta alrededor de la estructura (~30Å).

20 Se asignaron de forma aleatoria tres restos para permitir la selección de la mejor combinación de inhibidores. La localización de cada uno fue de tres aminoácidos desde el extremo N terminal de la forma mutante. Puede generarse un diseño similar basándose en la secuencia del péptido ECT2 que es específico para la proteasa OmpT de *E. coli*. Este péptido es más corto que CPI2 y es beneficioso añadir restos adicionales (por ejemplo, SAS) para proporcionarle el mismo alcance. Las secuencias de las adiciones al extremo N terminal del mutante de CotA se muestran a continuación:

Mutantes de CPI2 Tipo 1 MASXXXEGAMFLEAIPMSIPKTLEKFVDAL
 Mutantes de CPI2 Tipo 2 MASXXXSASEGAMFLEAIPMSIPKTLEKFVDAL
 Mutantes de CPI2 Tipo 3 MASXXXEGAMFLEAIPMSIPKSASTLEKFVDAL
 Mutantes de ECT2 Tipo 1 MASXXXSASVSRRRRRGGGSASTLEKFVDAL

30 (la secuencia MASXXXEGAMEFLEAIPMSEPKTLEKFVDAL también se denomina en el presente documento SEC ID N°: 4; la secuencia MASXXXSASEGAMFLEAIPMSIPKTLEKFVDAL también se denomina en el presente documento SEC ID N°: 5; la secuencia MASXXXEGAMFLEAIPMSIPKSASTLEKFVDAL también se denomina en el presente documento SEC ID N°: 6; y la secuencia MASXXXSASVSRRRRRGGGSASTLEKFVDAL también se denomina en el presente documento SEC ID N°: 7).

35 El bucle lateral reactivo de proteinasa alfa-1 (RSL) se asoció al extremo N terminal de CotA, como se muestra en la Figura 7. CPI2 se basó en la secuencia del bucle de sitio reactivo (RSL) del inhibidor de proteinasa alfa-1 (también llamado inhibidor de cisteína proteinasa o CPI). También se preparó el mutante de CotA SSM1 que tiene la secuencia: MASSFWEGAMFLEAIPMSIPKTLEKFVDAL (también denominado en el presente documento SEC ID N°: 8).

La Figura 8 ilustra las listas de secuencias generales resultantes de mutagénesis de CotA. En la Figura 8 se incluyen:

1. Una secuencia peptídica general para Mutantes de SSM1, la secuencia general también denominada en el presente documento SEC ID N°: 9.
- 5 2. Una secuencia peptídica general para Mutantes de SSM2, la secuencia general también denominada en el presente documento SEC ID N°: 10.
3. Una secuencia peptídica general para Mutantes de SSM3, la secuencia general también denominada en el presente documento SEC ID N°: 11.
- 10 4. Una secuencia peptídica general para Mutantes de SSM4, la secuencia general también denominada en el presente documento SEC ID N°: 12.
5. Una secuencia peptídica general para Mutantes de T3, la secuencia general también denominada en el presente documento SEC ID N°: 13.

15 Para los mutantes de Tipo 2 y Tipo 3, se insertó una extensión de SAS de tres aminoácidos en la secuencia para proporcionar una mayor flexibilidad y un alcance más largo al brazo añadido. Una o más extensiones de SAS pueden insertarse en diferentes puntos, para crear un engarce flexible. Por ejemplo, pueden insertarse extensiones de SAS antes y/o después del péptido (por ejemplo, el péptido CPI2), como se ilustra por la siguiente secuencia, también denominada en el presente documento "SEC ID N°: 14".

20 SEC ID N°: 14 MASXXSASEGAMFLEAIPMSIPKSASTLEKFVDAL. Un procedimiento similar también puede mostrarse para el péptido ECT2, por ejemplo, con un conjunto de tres aminoácidos distribuidos de forma aleatoria en el extremo de la proteína mutante.

Zimógenos Anclados y su Uso en Detección y Diagnóstico

25 En algunas realizaciones de referencia, la presente invención presenta el uso de una enzima señal anclada a una superficie sólida (por ejemplo, una perla) con un péptido. Algunos ejemplos de enzimas señal adecuadas incluyen proteína verde fluorescente (GFP), luciferasa, lacasa (CotA) y peroxidasa de rábano rusticano (HRP). El péptido funciona como un sustrato para una proteína microbiana (por ejemplo, una enzima bacteriana, tal como una proteasa bacteriana). Cuando el péptido interacciona con la proteína microbiana de interés, el péptido se escinde o hidroliza por la proteína microbiana. Esta interacción libera la enzima señal y la enzima señal es entonces libre de interactuar con un sustrato indicador o marcado de forma detectable y producir una señal detectable que indica la presencia del microbio de interés. Los ejemplos de sustratos indicadores adecuados incluyen ABTS y naftol.

30 En realizaciones de referencia adicionales, el sustrato de enzima señal puede unirse o anclarse a una superficie, tal como una perla o membrana de flujo lateral (por ejemplo, una hecha de nitrocelulosa). Una parte de la membrana puede comprender la enzima señal anclada, mientras que otra parte de la membrana puede comprender un sustrato marcado de forma detectable. Una muestra de ensayo líquida se introduce en la parte de la membrana que comprende la enzima señal anclada. Si la muestra de ensayo líquida incluye la proteína microbiana de interés; la proteína microbiana escinde el péptido y se libera la enzima activada. La enzima activada migra después hacia la parte de la membrana en la que se localiza el sustrato marcado de forma detectable. Una vez que la enzima señal activada alcanza la parte de la membrana que incluye el sustrato marcado de forma detectable, la enzima señal interacciona con el sustrato marcado de forma detectable y produce una señal visible.

35 Pueden detectarse múltiples patógenos de enzimas en series en la misma membrana de flujo lateral mediante la formación de un canal en la membrana con cera u otro material o materiales que hacen al material de membrana impermeable a proteínas y sustratos pero permiten que fluya líquido o tampón. Como un ejemplo, puede disolverse una cera de parafilm en hexano y usarse para repartir la muestra en múltiples cámaras (por ejemplo, canales o carriles). Esto sería una forma poco costosa de tener múltiples ensayos de flujo lateral para detectar la presencia de bacterias patógenas dentro de una membrana de flujo lateral sencilla, reduciendo de este modo el coste de cada ensayo.

40 La Figura 15 ilustra un diagrama de una realización de una membrana de flujo lateral multicanal. La cera (por ejemplo, cera de parafilm) se disuelve en hexano y se deposita en una membrana de flujo lateral POREX® (disponible de Porex Technologies Corp., Fairburn Georgia) usando una punta de pipeta. Se sitúa una muestra a ensayar en o cerca de los puntos de HRP de 10 ng localizados en el extremo inferior de la membrana. La muestra interacciona con el zimógeno anclado y comienza a fluir hacia la línea de sustrato mediante las líneas de cera o carriles. Si la proteína microbiana de interés está presente en la muestra de

ensayo, la enzima señal se liberará y la enzima ahora activa migrará a la línea de sustrato junto con la muestra de ensayo. Una vez que la enzima señal activa alcanza la línea de sustrato, la enzima interaccionará con el sustrato marcado de forma detectable y producirá una señal visible (por ejemplo, una línea visible).

5 Además del diagnóstico de flujo lateral y de fase líquida, los zimógenos anclados también pueden usarse en una exploración de alto rendimiento (HTS) para dianas de diagnóstico nuevas. Por ejemplo, una exploración puede usar proteína verde fluorescente (por ejemplo, GFP) fusionada de forma sintética con una región de 10 aminoácidos aleatoria unida a un marcador de epítipo C terminal (por ejemplo, polihistidina). El marcador de epítipo permite al sistema indicador anclarse en una superficie hasta que un acontecimiento de hidrólisis de enzima de una proteína microbiana (por ejemplo, una proteasa bacteriana) desencadene la liberación de la enzima indicadora.

10 Usando PCR, se ha amplificado una biblioteca de GFP de péptidos aleatorios y se ha clonado para realizar una exploración de alto rendimiento para detectar la presencia de acontecimientos proteolíticos específicos. La exploración puede usarse para identificar sustratos nuevos para patógenos bacterianos que podrían incorporarse en un diagnóstico inmediato rápido. La Figura 16 ilustra una fotografía de un gel de ADN (a la izquierda) junto con una fotografía de un gel de proteína (a la derecha). El gel de ADN de la izquierda demuestra una muestra de diez clones de la biblioteca que tienen todos GFP y el gel de proteína de la derecha indica que todos los clones están expresando GFP. Puesto que los clones pueden unirse a una resina o a perlas que se unen al marcador de epítipo, estos productos proteicos son adecuados para exploraciones de alto rendimiento usando placas de microtitulación en los formatos de 96, 386 o más pocillos que posibilitan el rápido procesamiento de células.

15 El procedimiento mediante el que se pueden identificar clones individuales usando este procedimiento se ilustra en la Figura 5. Brevemente, las células se cultivan y después se lisan en una placa de microtitulación que contiene 50 µg de lisozima y 100 U de DNAsa I. Los residuos celulares se retiran por centrifugación y se unen los sobrenadantes de GFP a placas que contienen resina de NTA para unirse específicamente a la proteína. Después de lavar la proteína, cada pocillo se incubaba con un cultivo bacteriano y después se centrifuga a través de un filtro de centrifugación para separar la GFP unida de la GFP libre. Las muestras que liberan específicamente la GFP se vuelven a ensayar con otras bacterias para ver si son específicas y después se secuencia su ADN para identificar el clon. Uno de los clones se identifica. El péptido puede sintetizarse y después unirse de forma covalente o introducirse por ingeniería genética en CotA o HRP para el desarrollo de nuevos ensayos de diagnóstico rápidos.

30 Ejemplo 1: Clonación y Expresión de Variantes de CotA Naturales y Mutantes

35 Se diseñaron cebadores oligonucleotídicos (ilustrados en la Tabla 1) para incorporar un sitio de restricción de *NheI* en el extremo 5' y un sitio de *XhoI* en el extremo 3' del gen durante la amplificación de variantes de *CotA* de *Bacillus subtilis* (los sitios de restricción están subrayados en la Tabla 1). El fragmento amplificado por PCR se clonó en el sitio *NheI/XhoI* del vector de expresión pET24a (Novagen, San Diego, Calif.) para generar plásmidos recombinantes de SSM (Tabla 2).

40 Una PCR de colonia empleando un conjunto de cebadores T7 disponibles en el mercado confirmó la presencia del inserto en las construcciones recombinantes de SSM. La Figura 9 ilustra una fotografía del gel de PCR resultante, que confirma la inserción de *CotA* de tipo silvestre de 1,7 kb mediante PCR. El vector es pET24A, el inserto es *CotA* de tipo silvestre y el conjunto de cebadores usado fue un conjunto de cebadores T7 disponibles en el mercado. El carril 7 muestra el Clon JS6, que indica un tamaño de inserto de ~1,542 kb.

Tabla 1: Cebadores oligonucleotídicos

Cebador	Secuencia
CotADir	CATATGGCTAGCACACTTGAAAAATTTGTGGATGCTCTC
CotADIRMutante	CTAGCTAGCNNNNNNNNNGAAGGA GCA ATGTTC CTA GAA GCA ATA CCA ATG TCA ATA CCA AAA ACA CTT GAA AAA TTTGTGGAT GCT CTC
CTAFE1	CTAGCTAGCNNNNNNNNNTCA GCA TCA GAGA GCA ATGTTC CTA GAA GCA ATA CCA ATG TCA ATA CCA

	AAA ACA CTT GAA AAA TTTGTGGAT GCT CTC
CTAFE2	CTAGCTAGCNNNNNNNNNGAAGGAGCAATGTTCTAGA AGCAATACCAATGTCA ATA CCA AAATCAGCA TCA ACA CTT GAA AAATTTGTGGATGCTCTC
CMFNuevo	CTAGCTAGCGAAGGA GCA ATGTTT CTA GAA GCA ATA CCA ATG TCA ATA CCA AAA ACA CTT GAA AAA TTTGTGGAT GCT CTC
CotA Inv.	CCGCTCGAGTTATTTATGGGGATCAGTTATATCC

(CotADir también se denomina en el presente documento "SEC ID N°: 15"; cotADIRMutante también se denomina en el presente documento "SEC ID N°: 16"; CTAFE 1 también se denomina en el presente documento "SEC ID N°: 17"; CTAFE2 también se denomina en el presente documento "SEC ID N°: 18"; CMFNuevo también se denomina en el presente documento "SEC ID N°: 19"; y CotA Inv también se denomina en el presente documento "SEC ID N°: 20").

5

Tabla 2: Plásmidos recombinantes

Plásmidos recombinantes	Descripción
JS6	COTA
SSM1	COTA-CPI2-XXX
SSM2	COTA-CPI2-SAS-XXX
SSM3	COTA-SAS-CPI2-XXX
SSM4	COTA-CPI2

Ejemplo 2: Expresión de Variantes de CotA y de Tipo Silvestre

Para expresar las variantes de CotA, se transformaron las construcciones de SSM en la cepa de expresión de *E. coli* BL21DE3. A una densidad óptica a 550 nm de 0,4, las células se indujeron mediante la adición de isopropil-β-D-tiogalactopiranosido 1 mM (IPTG; Sigma, St. Louis, Mo.) y continuó el crecimiento a 37°C durante 3 horas. Después de la inducción, 1 ml de las células se centrifugó y resuspendió en 50 µl de PSB (tampón de muestra proteica), se hirvió durante 10 min y se sometió a electroforesis a 200 V durante 1 h. La expresión se confirmó mediante la ejecución de una muestra de proteína en un gel de SDS PAGE al 12%. La sobreexpresión de CotA en el clon JS6 también se demostró. La Figura 10 ilustra una fotografía del gel que muestra la sobreexpresión de CotA en el clon JS6.

10

15

La Figura 11 ilustra una fotografía de un gel que demuestra una exploración por PCR de mutantes de CotA usando un conjunto de cebadores T7. La Figura 12 ilustra una fotografía de un gel que muestra la sobreexpresión de CotA mutante usando clones de SSM1.

Ejemplo 3: Ensayo de ABTS de Variantes de Tipo Silvestre y Mutantes de CotA

La actividad de las variantes de tipo de silvestre y mutante de CotA se determinó usando un ensayo de 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato) (ABTS). Brevemente, se incubaron 45 µl de los lisados de CotA natural y mutante con 10 µl de sustrato ABTS (2,0 mM) y 4,5 µl de solución salina tamponada con fosfato 1X (PBS). La reacción se siguió en un lector de placas de microtitulación de 96 pocillos usando una longitud de onda de 415 nm a 37°C. La reacción se controló durante un periodo de 1 hora (h) y se representó usando el software KaleidaGraph. Como se esperaba, el tipo silvestre tuvo la mayor reactividad con el sustrato ABTS en comparación con las variantes de mutante de CotA. La Figura 13 ilustra una gráfica que muestra que las variantes de CotA (SSM4-1, SSM1-1, SSM1-3, SSM2-4 y SSM2-6) se inhibieron parcialmente mediante las extensiones y modificaciones de CotA. En la Figura 13, "wt" se refiere a natural, "1-1" se refiere a SSM1-1, "1-3" se refiere a SSM1-3, "2-4" se refiere a SSM2-4, "2-6" se refiere a SSM2-6, "3-1" se refiere a SSM3-1, "3-2" se refiere a SSM3-2 y "4-1" se refiere a SSM4-1.

20

25

30

La actividad de mutante de CotA, SSM4-1 se inhibió parcialmente como se determinó por el

ensayo de ABTS, como se muestra en el gráfico ilustrado en la Figura 14. Sin embargo, la presencia de sobrenadantes bacterianos de *Streptococcus pyogenes* y *Enterococcus faecalis* en ensayos similares facilitó las reactivaciones del mutante SSM4-1 aproximadamente tres veces. Las proteasas específicas de los sobrenadantes bacterianos escinden el dominio CPI2 del mutante SSM4-1, dando como resultado una desrepresión del fenotipo inhibitor. Los ensayos de ABTS se realizaron como se ha descrito previamente.

5 Brevemente, la mezcla de control consiste en 10 µg de ABTS, CuSO₄ 2 mM, glicerol al 10%, detergente HECAMEG al 0,1% en solución salina tamponada con fosfato 1x. La mezcla de reactivación consiste en 10 µl de ABTS (2,0 mM), 20 µl de sobrenadante bacteriano cultivado, CuSO₄ 0,2 mM, glicerol al 10%, detergente HECAMEG al 0,1% en solución salina tamponada con fosfato 1x. Los cultivos bacterianos (*S. pyogenes* y *E. faecalis*) usados en este ensayo se dejaron crecer durante una noche en caldo de soja triptico (TSB).

10

Ejemplo 4: Anclaje de Zimógenos con Péptidos

Se anclaron o conjugaron enzimas señal en superficies sólidas con una diversidad de péptidos. Los ejemplos de péptidos que se usaron de forma exitosa para anclar las enzimas señal incluyen:

- 15 1. SAP2, que tiene la secuencia: ETKVEENEAIQK (también denominada en el presente documento SEC ID N°: 21)
2. C10, que tiene la secuencia: VTLENTALARC (también denominada en el presente documento SEC ID N°: 22)
- 20 3. PAE8, que tiene la secuencia: QADALHDQASALKC (también denominada en el presente documento SEC ID N°: 23)
4. CPI2, que tiene la secuencia indicada en SEC ID N°: 2
5. T2X, que tiene la secuencia: KVSRRRRRGDKVSRRRRRGD (también denominada en el presente documento SEC ID N°: 24)

25 SAP2 y C10 son específicos de *Staphylococcus*, PAE8 es específico de *Pseudomonas*, T2 es específico de *E. coli* y CPI2 es un péptido que interacciona con un amplio espectro de patógenos. Además, también se usaron de forma exitosa diversos péptidos aleatorios con una secuencia variable de 10 aminoácidos para anclar enzimas señal a superficies sólidas.

La conjugación de HRP con péptidos se realizó a través del reactivo de entrecruzamiento bifuncional sulfo-SMCC. La reacción es un proceso de dos etapas, que incluye 1) formación de HRP-maleimida, seguida de 2) reacción con un péptido. Los conjugados de péptido-HRP proporcionaron un visible color azul después de hidrolizarse a partir de la superficie anclada. El protocolo general para la conjugación fue:

30

Unión de Péptido a Biodina C

35 1 mg de péptido se disolvió en tampón de conjugación (MES pH 4,5). 125 µl de EDC 10 mg/ml (relación 5:1) se añadió y se permitió que reaccionara con membranas durante 2 horas de rotación a temperatura ambiente. Se realizaron lavados a temperatura ambiente durante 2 minutos con 40 ml de PBS+glicerol al 1% y PBS.

Conjugación de Maleimida con HRP

40 Se disolvieron 2,5 mg de HRP de Roche en 500 µl de fosfato de Na 1 mM (pH de 7,4). Se disolvió Sulfo-SMCC en 50 µl de DMSO y se combinó con la HRP durante 20 minutos a temperatura ambiente. La separación se consiguió mediante filtración en Gel en tampón de conjugación de maleimida.

Conjugación de HRP-Péptido-Membrana

45 Las fracciones que estaban sin sulfo-SMCC (~1 ml) se combinaron con los discos de péptido-Biodyne y reaccionaron a ~4°C durante una noche con rotación. Se realizaron varios lavados, incluyendo dos lavados de 20 minutos con 100 ml de tritón al 0,1% en PBS, seguido de dos lavados de 20 minutos con solución de PEG 5000 al 0,1% y un lavado de 1 h en 250 ml de una solución de sacarosa al 10%, seguido de aplicación de vacío rápido durante una noche.

Ejemplo 5: Ensayo de Zimógenos Anclados

5 Los zimógenos anclados pueden usarse en un enfoque de fase líquida o un enfoque de membrana de flujo lateral. En el enfoque de membrana de flujo lateral, el sustrato marcado de forma detectable o la enzima indicadora se captura o adhiere con nitrocelulosa líquida que se deposita en la superficie de una membrana de flujo lateral para formar una línea visible que sigue la difusión de la enzima indicadora.

10 Una línea de nitrocelulosa altamente purificada al 1% en acetato de amilo (CAT N° 12620-50 de Electron Microscopy Science) mezclada a una relación volumétrica de 1:1 con naftol se depositó en una membrana. La membrana era de aproximadamente 3 centímetros de longitud. La concentración final en la solución antes de la deposición fue de 10 mg/ml de nitrocelulosa y 20 mg/ml de naftol. Tras la liberación de la superficie de péptido anclado, una enzima de CotA y HRP emigró por la superficie de la cámara de flujo lateral. Tras la interacción con el naftol unido a la nitrocelulosa depositada, se formó una línea azul oscuro en solamente unos pocos segundos, lo que indicaba la presencia de un patógeno bacteriano.

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo de ensayo, que comprende:
- a) una membrana;
 - b) al menos un péptido unido a la membrana, comprendiendo el péptido un sustrato para una enzima producida por un microorganismo;
 - c) una enzima señal unida al péptido; y
 - d) al menos un sustrato marcado de forma detectable unido a la membrana en una segunda localización, siendo el sustrato marcado de forma detectable una diana de la enzima señal.
- 5

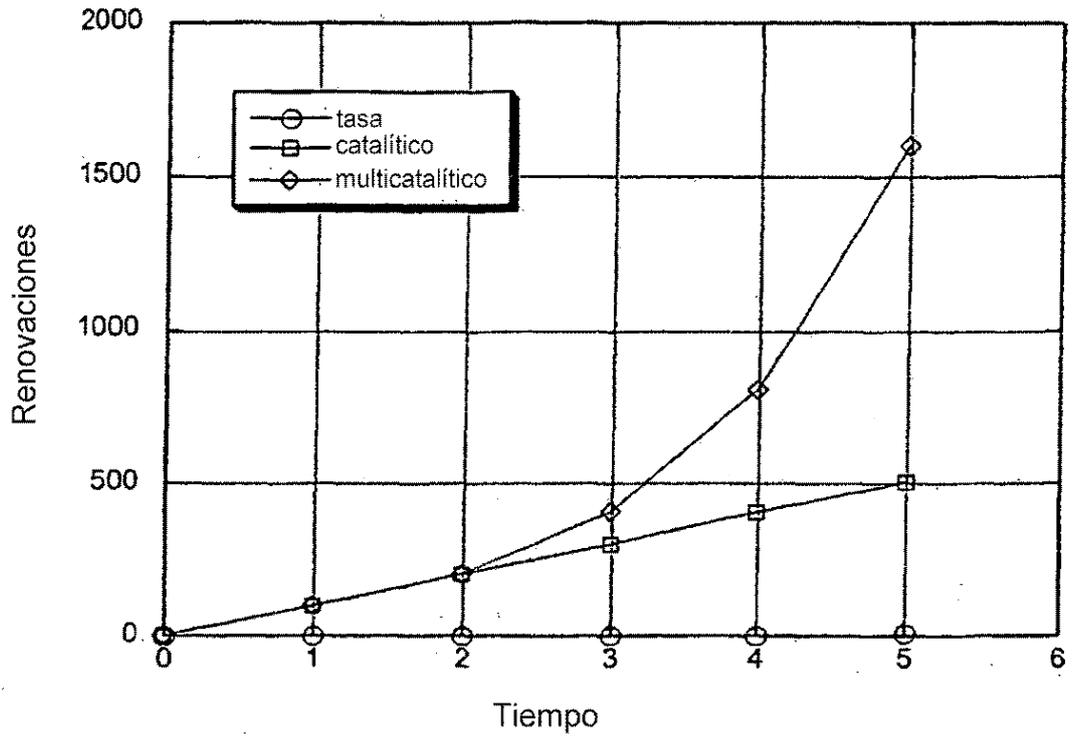


Figura 1

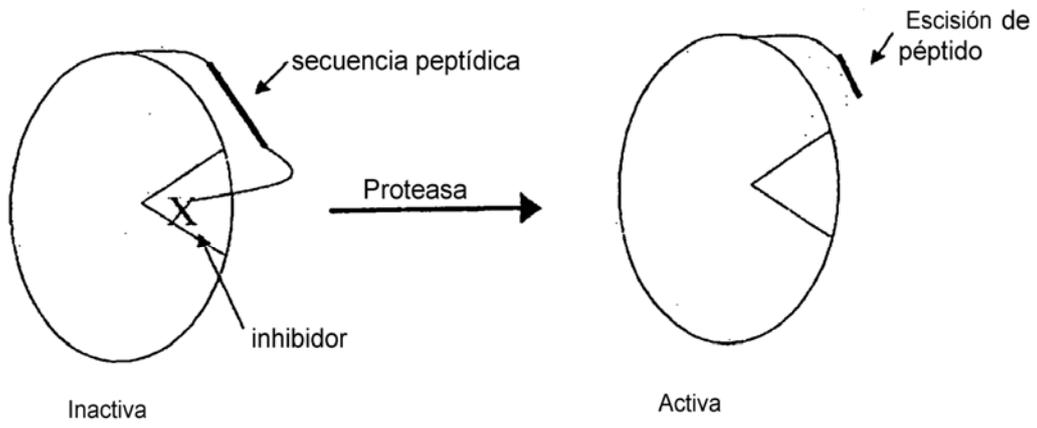


Figura 2

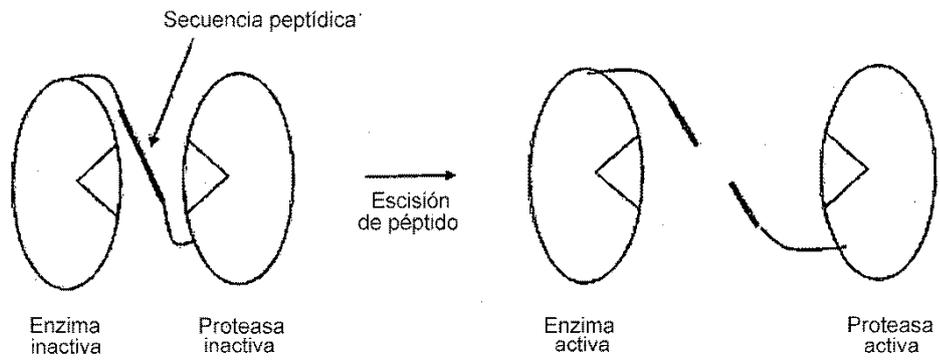


Figura 3

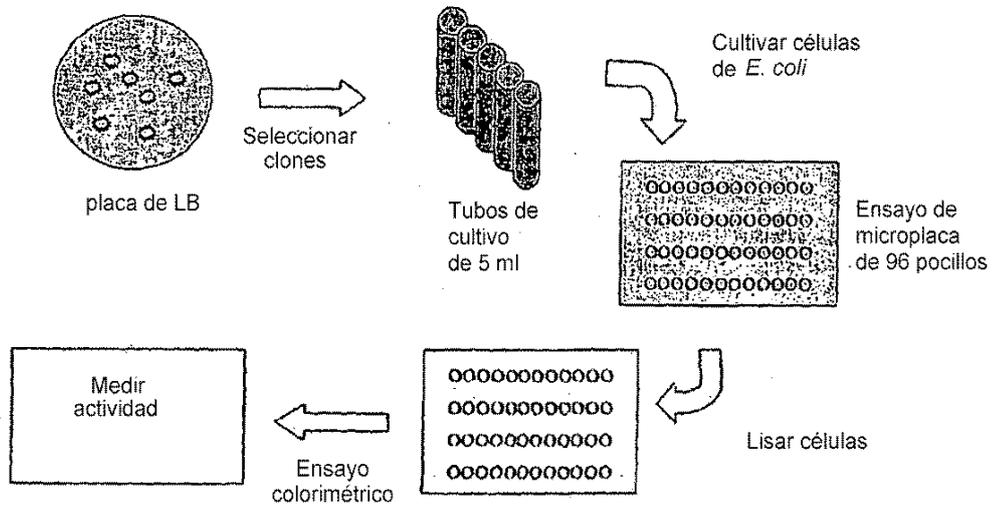


Figura 4

Estrategia de exploración de biblioteca de GFP-Péptido

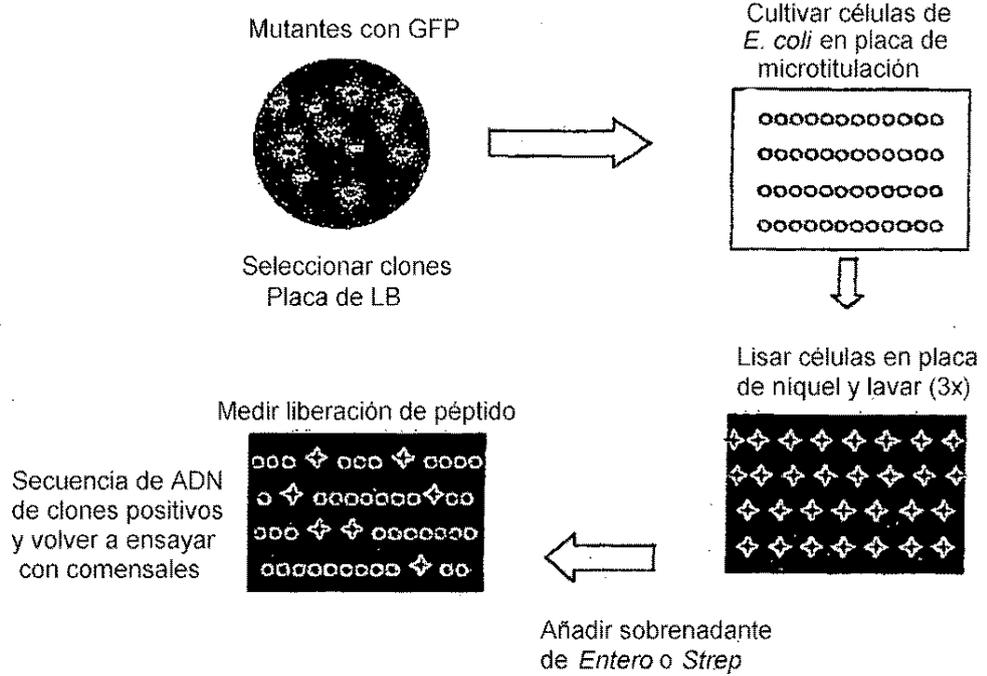


Figura 5

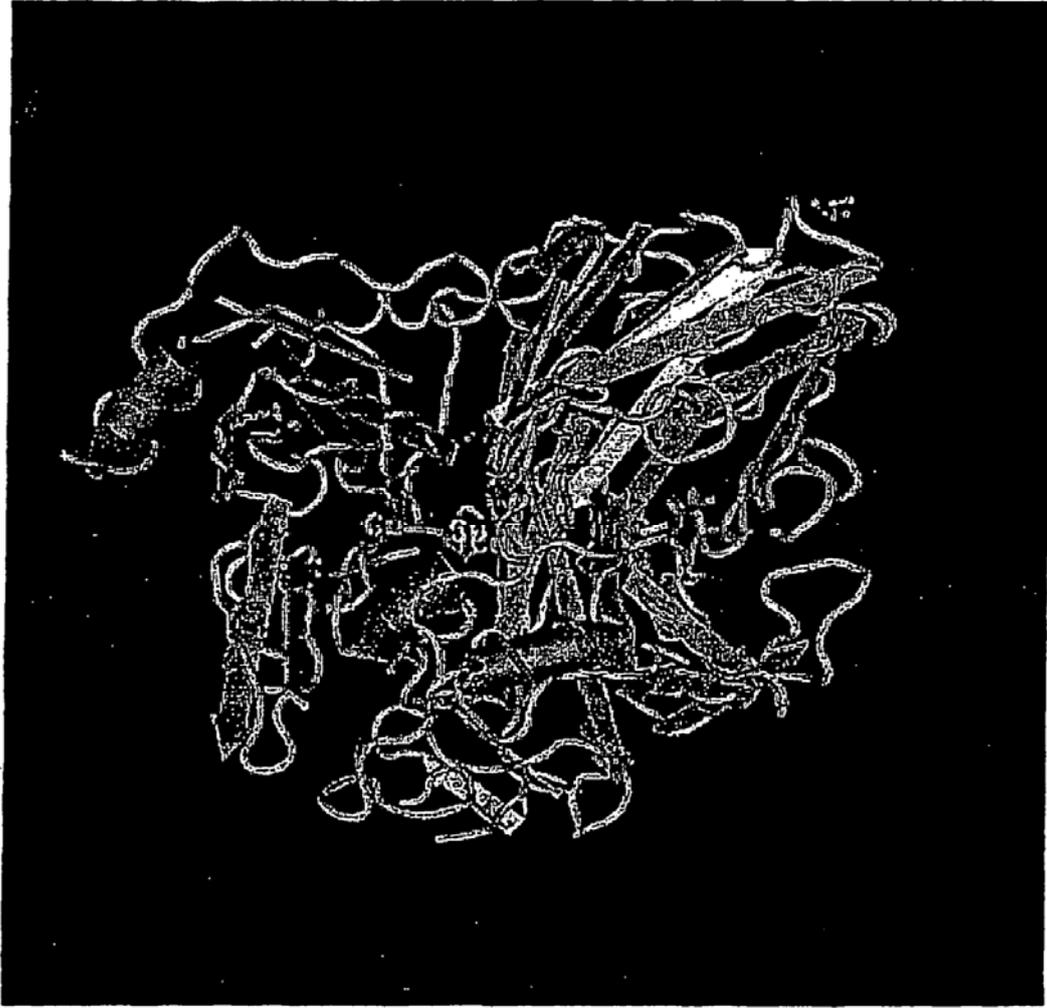


Figura 6

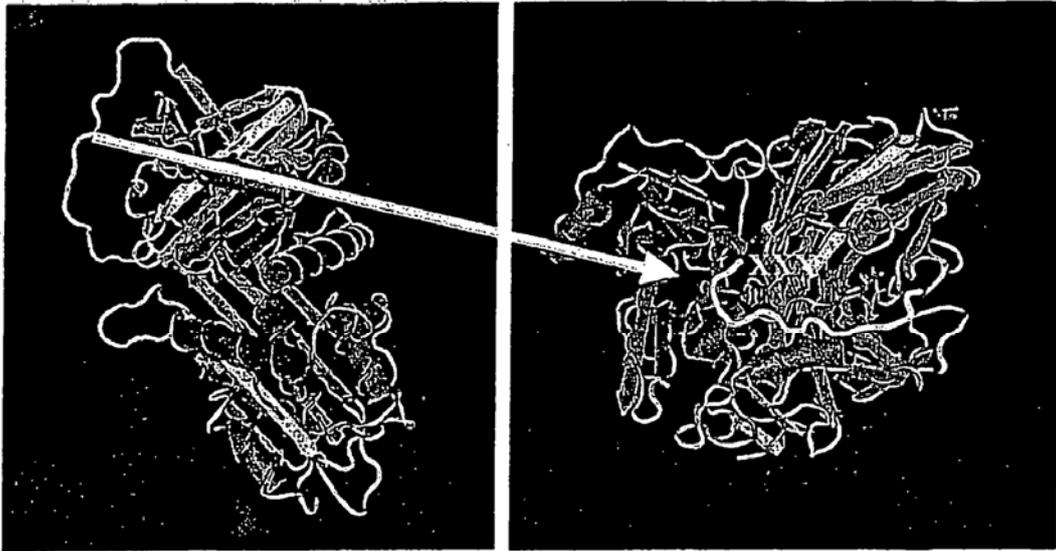


Figura 7

Mutantes SSM1	MASXXXEGAMFLEAIPM SIPKTLEKFVDAL
Mutantes SSM2	MASXXXSASEGAMFLEAI PMSIPKTLEKFVDAL
Mutantes SSM3	MASXXXEGAMFLEAIPM SIPKSASTLEKFVDAL
Mutantes SSM4	MASEGAMFLEAIPMSIPK TLEKFVDAL
Mutantes T3	MASXXXSASVSRRRRRG GSASTLEKFVDAL

Figura 8

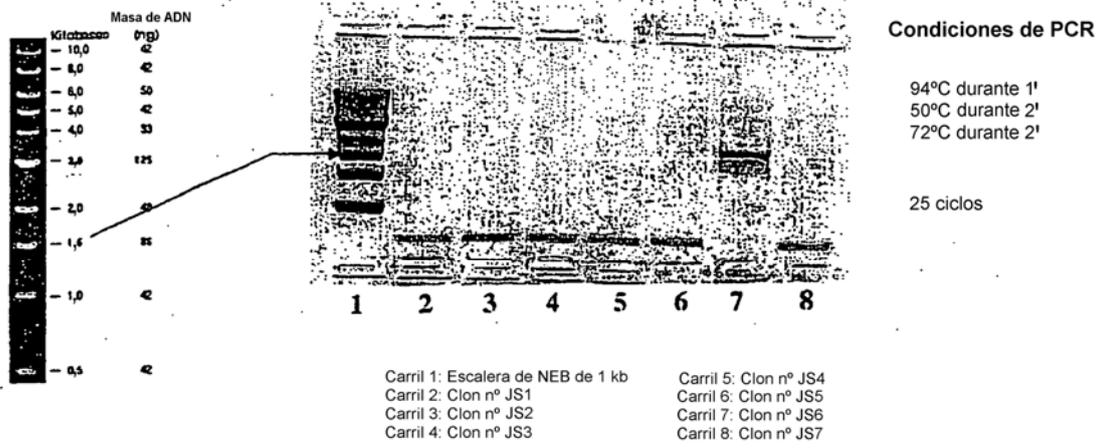
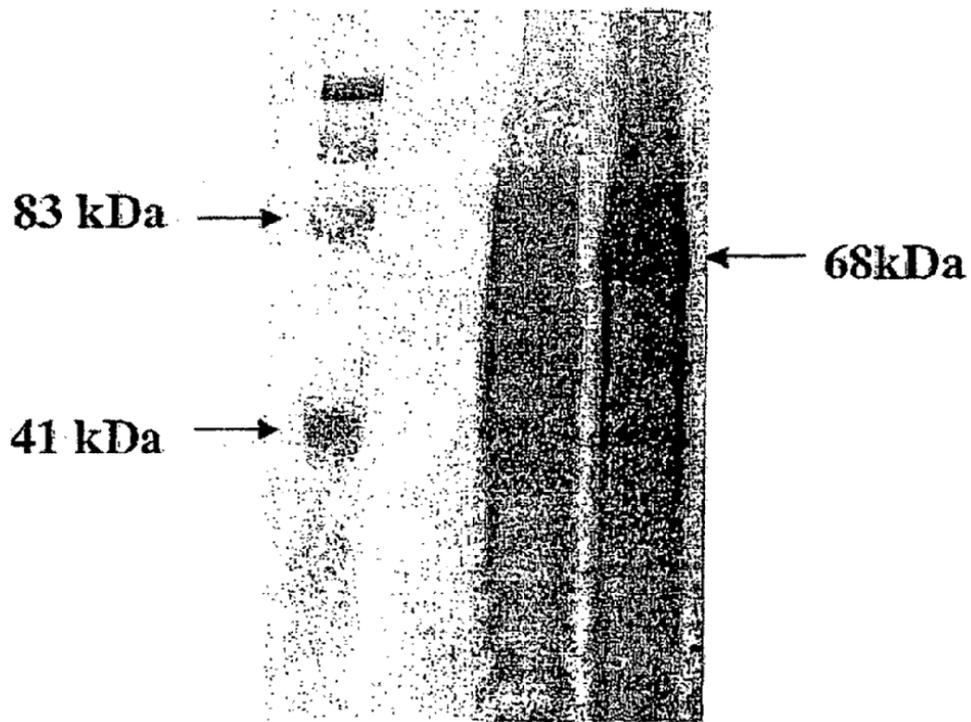


Figura 9



Carril 1: Escalera kaleidoscope
Carril 2: Clon nº JS6 no inducido
Carril 3: Clon nº JS6 inducido

Figura 10

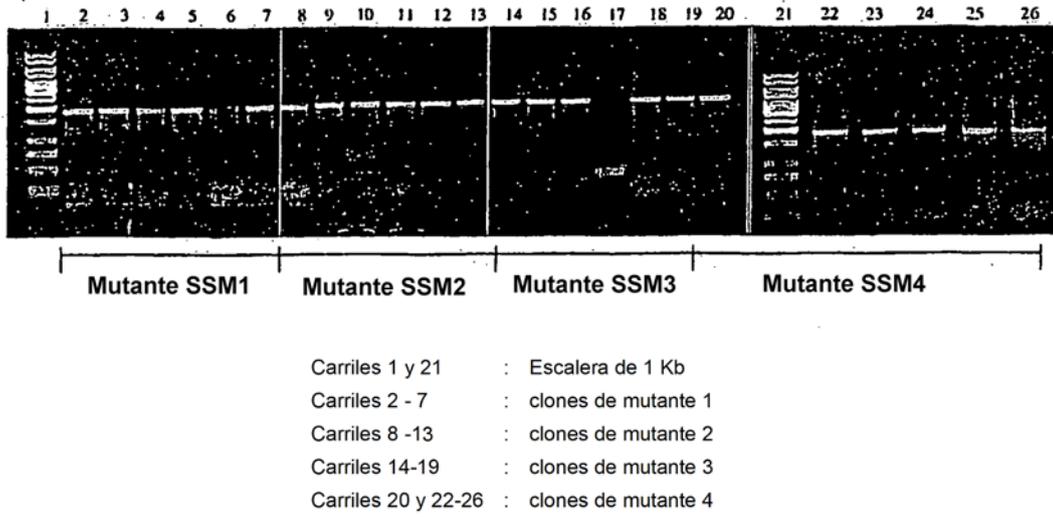
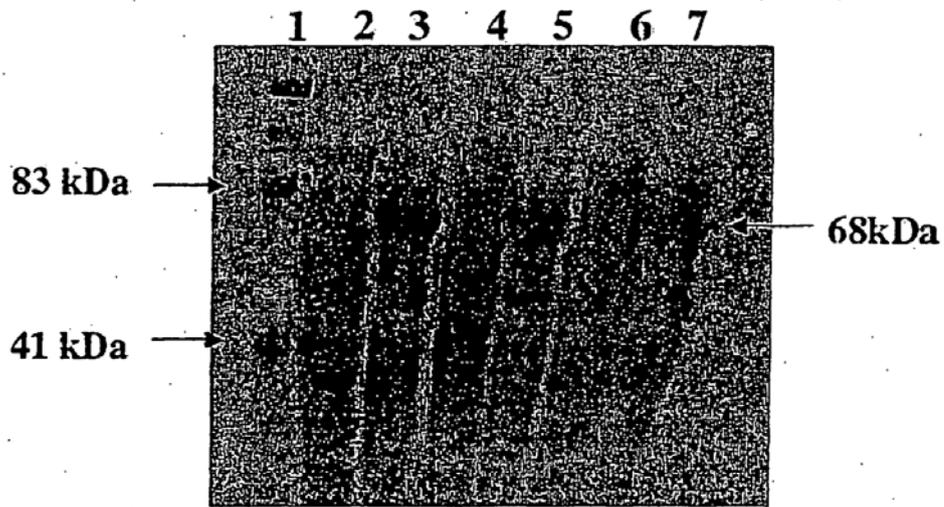


Figura 11



Carril 1: Escalera kaleidoscope

Carril 2: Clon nº SSM1-1 no inducido

Carril 3: Clon nº SSM1-1 inducido

Carril 4: Clon nº SSM1-2 no inducido

Carril 5: Clon nº SSM1-2 inducido

Carril 6: Clon nº SSM1-3 no inducido

Carril 7: Clon nº SSM1-3 inducido

Figura 12

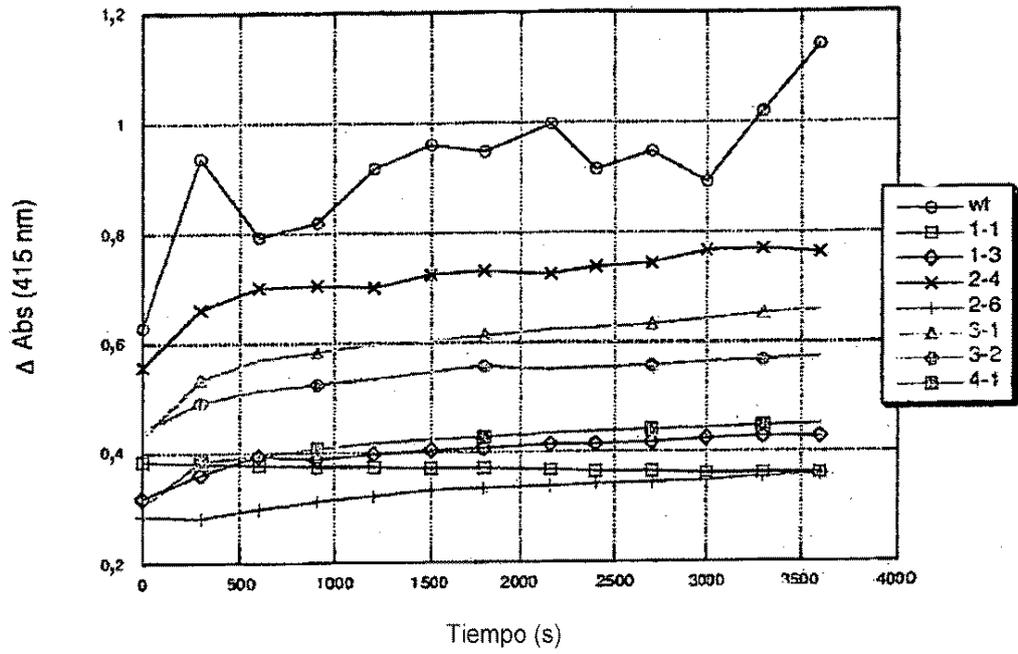


Figura 13

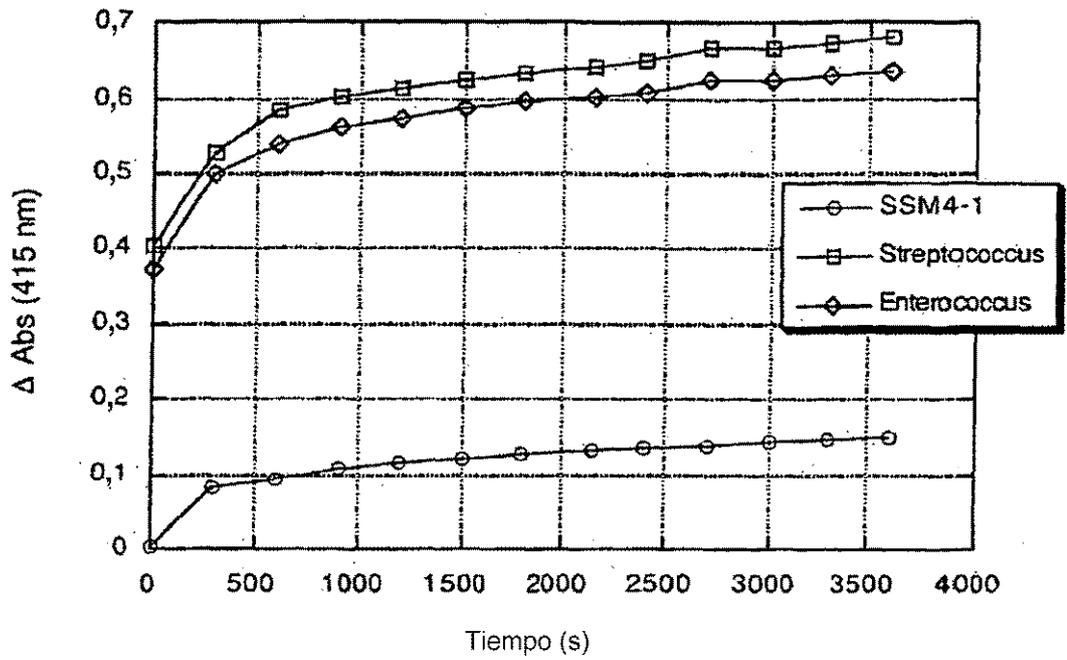


Figura 14

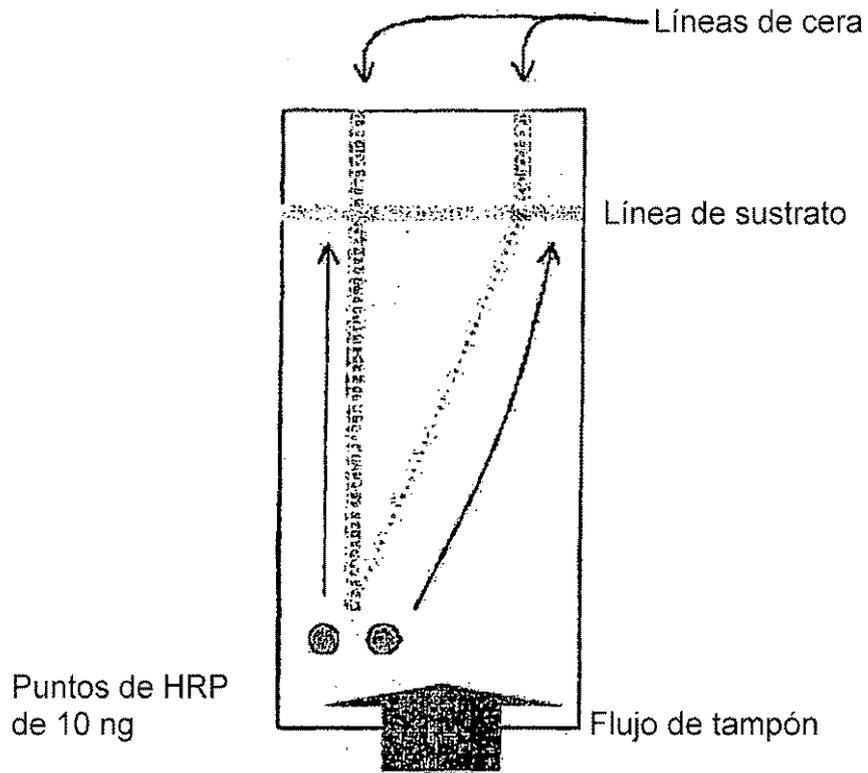
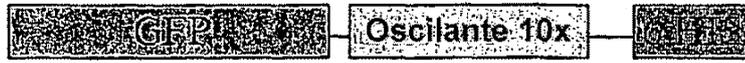


Figura 15

BIBLIOTECA BASADA EN



10^{20} - Posibles combinaciones

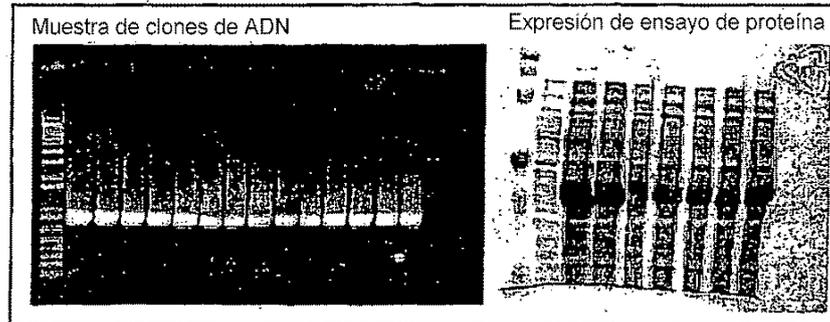


Figura 16