

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 380 922**

51 Int. Cl.:
C07K 17/00 (2006.01)
C12P 39/00 (2006.01)
C12Q 1/00 (2006.01)
C12Q 1/54 (2006.01)
G01N 27/00 (2006.01)
G01N 31/00 (2006.01)
G01N 31/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **03700680 .6**
96 Fecha de presentación: **06.01.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1458760**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.09.2004**

54 Título: **Proteínas de unión aprisionadas como biosensores**

30 Prioridad:
04.01.2002 US 39833

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
21.05.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
21.05.2012

73 Titular/es:
**BECTON, DICKINSON AND COMPANY
INTELLECTUAL PROPERTY DEPARTMENT, 1
BECTON DRIVE, MAIL CODE 089
FRANKLIN LAKES, NJ 07417-1880, US**

72 Inventor/es:
**ALARCON, Javier;
KNORS, Christopher, J. y
PITNER, J., Bruce**

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

ES 2 380 922 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

Proteínas de unión aprisionadas como biosensores

Antecedentes de la invención**1. Campo de la invención**

- 5 La invención pertenece al campo de la Biotecnología. Específicamente, la invención se dirige a proteínas de unión mutadas aprisionadas, proteínas de unión mutadas que contienen grupos indicadores, composiciones de proteínas de unión mutadas que contienen grupos indicadores en matrices permeables a analitos y a su uso como biosensores de analitos tanto *in vitro* como *in vivo*.

2. Descripción de la técnica relevante

- 10 La monitorización de las concentraciones de glucosa para facilitar el control metabólico adecuado en diabéticos es un objetivo deseable y mejoraría la vida de muchos individuos. Actualmente, la mayoría de los diabéticos usan el procedimiento del "pinchazo en la yema del dedo" para controlar sus niveles de glucosa en sangre, siendo su aceptación problemática por parte del paciente debido al dolor provocado por los frecuentes pinchazos (varias veces al día). Por consiguiente, se han hecho esfuerzos por desarrollar procedimientos no invasivos o mínimamente invasivos
15 *in vivo* e *in vitro* más eficientes para el control frecuente y/o continuo de la glucosa en sangre o de otros fluidos biológicos que contienen glucosa. Algunos de estos procedimientos más prometedores implican el uso de un biosensor. Los biosensores son dispositivos capaces de proporcionar información analítica cuantitativa o semi-cuantitativa específica usando un elemento de reconocimiento biológico combinado con un elemento de transducción (detección).

- 20 El elemento de reconocimiento biológico de un biosensor determina la selectividad, de manera que sólo el compuesto que se desee medir produzca una señal. La selección se puede basar en el reconocimiento bioquímico del ligando, en el que la estructura química del ligando (p. ej., glucosa) permanece invariable, o en la biocatálisis en la que el elemento de reconocimiento biológico cataliza una reacción bioquímica del analito.

- El transductor traduce el reconocimiento del elemento de reconocimiento biológico en una señal semicuantitativa o
25 cuantitativa. Las posibles tecnologías de transductores son óptica, electroquímica, acústica/mecánica o colorimétrica. Las propiedades ópticas que se han aprovechado incluyen la absorbancia, la fluorescencia/fosforescencia, la bio/quimioluminiscencia, la reflectancia, la difusión de la luz y el índice de refracción. Se pueden usar grupos indicadores convencionales, tales como compuestos fluorescentes o, alternativamente, existe la oportunidad de realizar la detección óptica directa sin la necesidad de un marcador.

- 30 Los biosensores específicamente diseñados para la detección de la glucosa que usan elementos biológicos para la transducción de señales usan comúnmente la detección electroquímica o colorimétrica de la actividad de la glucosa oxidasa. El uso de este procedimiento está asociado con dificultades que resultan de la influencia de los niveles de oxígeno, la presencia de inhibidores en la sangre y problemas con electrodos, entre otros. Además, la detección produce el consumo del analito que puede provocar dificultades al medir bajas concentraciones de glucosa.

- 35 Una parte del desarrollo de los biosensores que avanza rápidamente es el uso de proteínas de unión periplásmicas marcadas fluorescentemente. Según lo publicado por Cass (*Anal Chem.* 1994, 66 3840–3847), se demostró la utilidad de una proteína de unión a la maltosa marcada (MBP) como sensor de la maltosa. En este trabajo, se mutó la MBP, que no tiene residuos de cisteína nativos, para proporcionar una proteína con un solo residuo de cisteína en la posición 337 (S337C). La posición de esta mutación se encontraba en la hendidura de la unión a maltosa y experimentó un gran
40 cambio ambiental tras la unión a maltosa. Se estudiaron numerosos fluoróforos, algunos bien bloqueaban la unión a ligandos o interferían en el cambio de configuración de la proteína. Entre los estudiados, el *N*-((2-yodoacetoxi)etil)-*N*-metilamino-7-nitrobenzoxadiazol (IANBD) produjo un aumento sustancial de la intensidad de la fluorescencia (160%) tras la unión a maltosa. Este resultado coincide con el cambio de ubicación del fluoróforo de un medio hidrófilo o expuesto a un disolvente a un medio más hidrófobo, tal y como se habría predicho
45 teóricamente mediante el cierre de la bisagra tras la unión a maltosa. En cualquiera caso, esta proteína mutante y el grupo indicador asociado no se unen diagnósticamente con azúcares importantes en fluidos corporales de mamíferos. Cass también reveló la asociación de esta proteína con superficies de TiO₂. Sin embargo, la proteína unida a la superficie sufrió la reducción de la actividad con el tiempo y requirió una hidratación constante (*Analytical Chemistry* 1998, 70(23), 5111–5113).

- 50 Hellinga, *et al.*, (US 6.277.627) publicaron la ingeniería de un biosensor de glucosa mediante la introducción de un transductor fluorescente en una proteína de unión a galactosa/glucosa (GGBP) mutada para contener un residuo de cisteína, aprovechando los grandes cambios de configuración que tienen lugar tras la unión con glucosa. Hellinga *et al* (US 6.277.627) revelan que se puede aprovechar la transmisión de los cambios de configuración en GGBP mutadas para crear funciones de transducción de señales integradas que conviertan una unión a la glucosa en un cambio en la
55 fluorescencia mediante un mecanismo de acoplamiento alostérico. Se ha publicado que las funciones de transducción fluorescente interfieren mínimamente en las propiedades de unión intrínsecas del bolsillo de unión a azúcar de la GGBP.

Para determinar con exactitud la concentración de glucosa de soluciones biológicas, tales como sangre, fluidos intersticiales, soluciones oculares, transpiraciones, etc., puede ser deseable ajustar la constante de unión de la molécula de detección de un biosensor para que coincida con el intervalo operativo fisiológico y/o patológico de la solución biológica de interés. Sin la constante de unión apropiada, la señal puede quedar fuera del intervalo para una determinada concentración fisiológica y/o patológica. Además, se pueden configurar biosensores usando más de una proteína, cada una con una constante de unión diferente para proporcionar mediciones exactas en un intervalo amplio de concentraciones de glucosa según lo revelado por Lakowicz (US 6.197.534).

A pesar de la utilidad de las GGBP mutadas, han sido pocas de estas proteínas las que se han diseñado y examinado, bien con o sin grupos indicadores. Las mutaciones específicas de los sitios y/o la unión de ciertos grupos indicadores pueden actuar para modificar una constante de unión de un modo impredecible. Además, un biosensor que contenga grupos indicadores puede tener una constante de unión deseable, pero no producir una señal fácilmente detectable tras la unión al analito. Uno de los factores primordiales que determina la sensibilidad de una determinada sonda indicadora unida con una determinada proteína para la detección de un analito específico es la naturaleza de las interacciones específicas entre la sonda seleccionada y los residuos de aminoácido de la proteína. Actualmente, no es posible predecir estas interacciones con proteínas usando procedimientos de cálculo, ni es posible emplear una metodología de un diseño racional para optimizar la elección de las sondas indicadoras. Además, no es posible predecir el efecto ni en la constante de unión ni en la selectividad basadas en la posición de cualquier grupo indicador o sustitución de aminoácido en la proteína (o viceversa).

Para desarrollar biosensores sin reactivos, auto-contenidos y/o implantables y/o reutilizables con el uso de proteínas, el elemento de transducción debe estar en comunicación con un dispositivo de detección para interrogar a la señal que va hacia y procede del elemento de transducción. Los procedimientos más comunes incluyen la colocación de proteínas en o sobre la superficie de fibras ópticas o guías de onda planificadoras empleando estrategias de inmovilización. Tales estrategias de inmovilización incluyen, sin limitaciones, el aprisionamiento de la proteína en membranas semipermeables, matrices de polímeros orgánicos o matrices de polímeros inorgánicos. La estrategia de inmovilización usada puede determinar en última instancia el rendimiento de un biosensor en funcionamiento. La técnica anterior detalla numerosos problemas asociados con la inmovilización de moléculas biológicas. Por ejemplo, muchas proteínas sufren cambios irreversibles de configuración, desnaturalización y pérdida de actividad bioquímica. Las proteínas inmovilizadas pueden existir en una gran selección de posibles orientaciones sobre cualquier superficie en particular, por ejemplo, con algunas proteínas orientadas de modo que sus sitios activos queden expuestos y otras orientadas de modo que sus sitios activos no queden expuestos (y, por tanto, no sean capaces de someterse a reacciones de unión selectiva con el analito). Las proteínas inmovilizadas también están sujetas a la desnaturalización dependiente del tiempo, la desnaturalización durante la inmovilización y la filtración de la proteína aprisionada tras la inmovilización. Esto causa problemas entre los que se incluyen, por ejemplo, la incapacidad para mantener la calibración del dispositivo de detección y el desplazamiento de la señal. En general, las proteínas de unión requieren un control de la orientación para permitir un uso eficaz, por tanto, las estrategias de absorción física y de unión covalente aleatoria o en masa a superficies, o de inmovilización como las mostradas habitualmente en la bibliografía no dan buenos resultados.

Se han publicado varios informes sobre la encapsulación de proteínas y otros sistemas biológicos en matrices de silicio inorgánico simple formadas mediante procedimientos de procesos sol-gel a baja temperatura (p.ej., Brennan, J. D. "Journal of Fluorescence" 1999, 9(4), 295-312 y Flora, K.; Brennan, J. D. *Analytical Chemistry* 1998, 70 (21), 4505-4513). Algunas matrices sol-gel son ópticamente transparentes, haciéndolas útiles en el desarrollo de sensores químicos y bioquímicos basados en la transducción óptica, por ejemplo, los procedimientos espectroscópicos de absorción o fluorescencia. Sin embargo, para que sean funcionales, las proteínas de unión aprisionadas o inmovilizadas deben seguir siendo capaces de sufrir al menos cierto cambio de configuración inducido por el analito. Los cambios de configuración de las proteínas de unión pueden estar sustancialmente restringidos en la mayoría de las matrices sol-gel mostradas en la bibliografía. Se ha publicado que las proteínas aprisionadas en sol-gel pueden presentar constantes de unión espectacularmente modificadas o constantes de unión que cambian durante periodos de tiempo relativamente cortos o en condiciones ambientales variables. Además, se ha publicado que la función de la proteína aprisionada en la matriz sol-gel depende del tiempo, una característica que limita la aplicabilidad general de los sol-geles en biosensores para el uso *in vitro*, así como *in vivo*.

Por lo tanto, existe la necesidad en la técnica de diseñar más proteínas mutadas útiles y proteínas GGBP mutadas que generen señales detectables tras la unión con un analito para su uso como biosensores y, además, existe la necesidad de incorporar estas proteínas en matrices permeables a analitos para servir de interfase entre los elementos transmisores y receptores de señales.

Resumen de la invención

La revelación proporciona proteínas de unión mutadas aprisionadas o encapsuladas y proteínas de unión mutadas que tienen grupos indicadores unidos a las mismas para su uso como biosensores *in vivo* o *in vitro*. Además, la revelación proporciona un biosensor de glucosa que incluye (a) una proteína de unión mutada y, al menos, un grupo indicador unido a la misma, de modo que dicho grupo indicador proporciona una señal detectable cuando dicha proteína de unión mutada se expone a glucosa; y (b) una matriz permeable al analito en la que la proteína de unión a glucosa/galactosa mutada y el grupo indicador son capaces de encapsularse en la matriz.

La revelación también proporciona composiciones que comprenden una mezcla que incluye (a) al menos una proteína de unión a glucosa/galactosa mutada y al menos un grupo indicador unido a la misma; y (b) un hidrogel, una membrana de diálisis, sol-gel o una combinación de los mismos para proporcionar una matriz permeable al analito, en la que la proteína de unión a glucosa/galactosa mutada y el grupo indicador están encapsulados en la matriz.

- 5 La revelación también proporciona un dispositivo que incluye (a) una proteína de unión a maltosa (MBP) mutada y al menos un grupo indicador unido a la misma, de modo que el grupo indicador proporciona una señal detectable cuando la MBP mutada se une a la maltosa y en el que la MBP incluye una cisteína presente en la posición 337; y (b) una matriz permeable a la maltosa, en la que la MBP mutada y el grupo indicador están encapsulados en la matriz.

- 10 Además, la revelación proporciona un dispositivo y composiciones del mismo adecuados para un uso *in vivo* que incluye (a) una proteína de unión a glucosa/galactosa mutada y, al menos, un grupo indicador unido a la misma, de modo que el grupo indicador proporciona una señal detectable y reversible cuando la proteína de unión a glucosa/galactosa mutada se expone a concentraciones variables de glucosa; y (b) una matriz permeable al analito, en la que la proteína de unión a glucosa/galactosa mutada y el grupo indicador están encapsulados en la matriz.

Breve descripción de las figuras

- 15 La FIG 1 ilustra el cambio en la respuesta de la fluorescencia a la glucosa de la GGBP-H₆ con amida de NBD A213C/L238C en disolución.

La FIG. 2 ilustra el aumento de la señal de proteínas de unión aprisionadas en ausencia y en presencia de analito en comparación con la disolución.

- 20 La FIG. 3 ilustra una proteína de unión aprisionada en ausencia y en presencia de analito en comparación con la disolución.

La FIG. 4 ilustra la señal reversible de una proteína de unión aprisionada de una realización de la presente invención tras la exposición a soluciones de glucosa a las concentraciones indicadas.

Descripción detallada de la invención

- 25 El término "biosensor" se refiere en general a un dispositivo que usa reacciones bioquímicas específicas mediadas por enzimas aisladas, inmunosistemas, tejidos, órganos o células enteras para detectar compuestos químicos, habitualmente, mediante señales eléctricas, térmicas u ópticas. Como se usa en la presente memoria, un "biosensor" se refiere a una proteína capaz de unirse a un analito que se puede usar para detectar el analito o un cambio en la concentración del analito mediante un medio detector como el descrito en la presente memoria. Más específicamente, un biosensor de la invención incluye al menos una proteína de unión a glucosa/galactosa mutada y al menos un grupo
30 indicador unido a la misma y una matriz permeable al analito, en el que la proteína de unión a glucosa/galactosa mutada y el grupo indicador son capaces de estar encapsulados en la matriz.

- La expresión "proteínas de unión" se refiere a proteínas que interactúan con analitos específicos de una manera capaz de transducir o proporcionar una señal detectable y/o reversible que se diferencia bien de una señal en ausencia de analito, de una señal en presencia de concentraciones variables de analito a lo largo del tiempo o en de una manera dependiente de la concentración, por medio de los procedimientos descritos. La transducción incluye procedimientos continuos, programados y episódicos que incluyen aplicaciones desechables o reutilizables. La transducción de señales reversibles puede ser instantánea o depender del tiempo, siempre que se establezca una correlación con la presencia o la concentración del analito. Se prefieren las proteínas de unión mutadas de tal manera para efectuar la transducción.

- 40 La expresión "proteína de unión a galactosa/glucosa" o "GGBP" o "proteína de unión a maltosa" o "MBP", como se usa en la presente memoria, se refiere a un tipo de proteína que se encuentra de manera natural en el compartimento periplásmico de las bacterias. Estas proteínas están implicadas de manera natural en la quimiotaxis y el transporte de moléculas pequeñas (p. ej., azúcares, aminoácidos y péptidos pequeños) en el citoplasma. Por ejemplo, la GGBP es una proteína monocatenaria que consiste en dos dominios α/β globulares que están conectados por tres cadenas para
45 formar una bisagra. El sitio de unión está ubicado en la hendidura entre los dos dominios. Cuando la glucosa entra en el sitio de unión, la GGBP sufre un cambio de configuración, centrado en la bisagra, que une los dos dominios y atrapa a la glucosa en el sitio de unión. Se han determinado estructuras cristalográficas por rayos X para la forma cerrada de la GGBP de *E. coli* (N. K. Vyas, M. N. Vyas, F. A. *Quijocho Science* 1988, 242, 1290–1295) y *S. Typhimurium* (S. L. Mowbray, R. D. Smith, L. B. *Cole Receptor* 1990,1, 41–54) y se encuentran disponibles en el banco de datos de proteínas (<http://www.rcsb.org/pdb/>) como 2GBP y 3GBP, respectivamente. El ADN y la secuencia de aminoácidos de la GGBP de *E. coli* de tipo natural se pueden encontrar en www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/ número de acceso D90885 (clon genómico) y número de acceso 230520 (secuencia de aminoácidos). La GGBP preferida procede de *E. coli*.

- 55 "Proteína de unión mutada" (por ejemplo, "GGBP mutada"), como se usa en la presente memoria, se refiere a proteínas de unión de bacterias que contienen uno o varios aminoácidos que han sido sustituidos con, retirados de o añadidos al o a los aminoácidos presentes en la proteína natural. Preferiblemente, dichas sustituciones, eliminaciones

o inserciones implican menos de 5 residuos de aminoácido, más preferiblemente, uno o dos residuos. La mutación de la proteína de unión incluye la sustitución de un aminoácido no reactivo con un aminoácido reactivo para proporcionar el enlace covalente de grupos indicadores electroquímicos o fotosensibles. Aminoácido "reactivo" pretende significar un aminoácido que se puede modificar con un agente de marcaje análogo al marcaje de cisteína con un colorante reactivo con tiol. Los aminoácidos no reactivos incluyen alanina, leucina, fenilalanina y otros, que poseen cadenas laterales que no se pueden modificar fácilmente una vez se encuentren incorporadas a una proteína (véase Greg T. Hermanson, "Bioconjugate Techniques", *Academic Press*, 1996, San Diego, pp. 4–16 para la clasificación de la reactividad de cadenas laterales de aminoácidos).

Las mutaciones ejemplares de la proteína GGBP incluyen: una cisteína sustituida con una lisina en la posición 11 (K11C); una cisteína sustituida con ácido aspártico en la posición 14 (D14C); una cisteína sustituida con valina en la posición 19 (V19C); una cisteína sustituida con asparagina en la posición 43 (N43C); una cisteína sustituida con una glicina en la posición 74 (G74C); una cisteína sustituida con una tirosina en la posición 107 (Y107C); una cisteína sustituida con treonina en la posición 110 (T110C); una cisteína sustituida con serina en la posición 112 (S112C); un mutante doble que incluye una cisteína sustituida con una serina en la posición 112 y serina sustituida con una leucina en la posición 238 (S112C/L238S); una cisteína sustituida con una lisina en la posición 113 (K113C); una cisteína sustituida con una lisina en la posición 137 (K137C); una cisteína sustituida con ácido glutámico en la posición 149 (E149C); un mutante doble que incluye una cisteína sustituida con un ácido glutámico en la posición 149 y una serina sustituida con leucina en la posición 238 (E149/L238S); un mutante doble que comprende una cisteína sustituida con histidina en la posición 152 y una cisteína sustituida con metionina en la posición 182 (H152C/M182C); un mutante doble que incluye una serina sustituida con una alanina en la posición 213 y una cisteína sustituida con una histidina en la posición 152 (H152C/A213S); una cisteína sustituida con una metionina en la posición 182 (M182C); una cisteína sustituida con una alanina en la posición 213 (A213C); un mutante doble que incluye una cisteína sustituida con una alanina en la posición 213 y una cisteína sustituida con una leucina en la posición 238 (A213C/L238C), una cisteína sustituida con una metionina en la posición 216 (M216C); una cisteína sustituida con ácido aspártico en la posición 236 (D236C); una cisteína sustituida con una leucina en la posición 238 (L238C); una cisteína sustituida con un ácido aspártico en la posición 287 (D287C); una cisteína sustituida con una arginina en la posición 292 (R292C); una cisteína sustituida con una valina en la posición 296 (V296C); un mutante triple que incluye una cisteína sustituida con un ácido glutámico en la posición 149, una alanina sustituida con una serina en la posición 213 y una serina sustituida con leucina en la posición 238 (E149C/A213S/L238S); un mutante triple que incluye una cisteína sustituida con un ácido glutámico en la posición 149, una arginina sustituida con una alanina en la posición 213 y una serina sustituida con leucina en la posición 238 (E149C/A213R/L238S); un mutante cuádruple que incluye una serina en la posición 1, una cisteína en la posición 149, una arginina en la posición 213 y una serina en la posición 238 (A1S/E149C/A213R/L238S); un mutante cuádruple que incluye una serina en la posición 1, una cisteína en la posición 149, una serina en la posición 213 y una serina en la posición 238 (E149C/M182C/A213C/L238S). En la Tabla 2 que figura más adelante en la presente memoria, se encuentran enumerados más ejemplos. Los números de los residuos de aminoácido se refieren a la secuencia publicada de *E. coli* que tiene 309 residuos, como se detalla más adelante, o el correspondiente residuo de aminoácido de cualquier secuencia sustancialmente homóloga de una fuente alternativa (p. ej., proteínas de unión a glucosa/galactosa de *Citrobacter freundii* o *Salmonella typhimurium*, números de acceso de las secuencias P23925 y P23905, respectivamente).

Las proteínas de unión mutadas aprisionadas o encapsuladas de la presente invención se pueden usar en un análisis de analitos *in vitro* o *in vivo* que, por ejemplo, sea capaz de seguir la cinética de las reacciones biológicas en las que participa un analito (p.ej., glucosa), así como ensayos clínicos y prueba industrial de alimentos o bebidas. Es preferible que la concentración de la proteína de unión en la matriz sea inferior a la constante de unión (K_d) de la proteína con su analito.

La mutación puede tener uno o más objetivos diversos. Por ejemplo, es posible mutar una proteína natural para cambiar la estabilidad a largo plazo de la proteína; para conjugar la proteína con una determinada matriz o polímero de encapsulación; para proporcionar sitios de unión para grupos indicadores detectables; para ajustar su constante de unión con respecto a un determinado analito; o cualquier combinación de los mismos.

En la presente invención, el analito y la proteína mutada actúan como parejas de unión. La expresión "se asocia" o "se une", como se usa en la presente memoria, se refiere a parejas de unión que tienen una constante de unión relativa (K_d) suficientemente fuerte para permitir la detección de la unión con la proteína mediante procedimientos de detección. Se puede calcular la K_d como la concentración de analito libre a la que se une la mitad de la proteína, o viceversa. Cuando el analito de interés es glucosa, los valores de K_d para las parejas de unión son, preferiblemente, de entre aproximadamente 0,0001mM y aproximadamente 30mM.

En la presente invención, se ha demostrado que las GGBP mutadas se pueden usar para detectar la unión a glucosa uniéndolas con un grupo indicador que proporcione una señal detectable tras la unión con glucosa. Que "proporciona una señal detectable", como se usa en la presente memoria, se refiere a la capacidad de reconocer un cambio en una propiedad de un grupo indicador de una manera que permita la detección de la unión entre ligando y proteína. Por ejemplo, en una realización, las GGBP mutadas comprenden un grupo indicador detectable cuyas características detectables se alteran tras un cambio en la configuración de la proteína que se produce al unirse a la glucosa. En una

realización preferida, el grupo indicador es un marcador luminiscente que produce una GGBP mutada con una afinidad por la glucosa que presente un cambio detectable en las características de luminiscencia al unirse a la glucosa. El cambio en las características detectables se puede deber a una alteración del medio del marcador unido a la GGBP mutada.

- 5 El marcador luminiscente puede ser un marcador fluorescente o un marcador fosforescente. Se prefiere el uso de marcadores fluorescentes que se puede excitar hasta la fluorescencia mediante la exposición a luz con ciertas longitudes de onda.

En una realización, el grupo indicador es un fluoróforo. Como se usa en la presente memoria, "fluoróforo" se refiere a una molécula que absorbe energía y luego emite luz. Los ejemplos no restrictivos de fluoróforos útiles como grupos
 10 indicadores en la presente invención incluyen fluoresceína, cumarinas, rodaminas, 5-TMR1A (tetrametilrodamina-5-yodoacetamida), Quantum Red®, Texas Red®, Cy3, N-((2-yodoacetoxi)etil)-N-metilamino-7-nitrobenzoxadiazol (IANBD), 6-acriloil-2-dimetilamino-naftaleno (acrylodan), pireno, Amarillo Lucifer, -Cy5, Dapoxyl® (2-bromoacetamidoetil)sulfonamida, (N-(4,4-difluoro-1,3,5,7-tetrametil-4-bora-3a,4a-diazas-indaceno-2-il)yodoacetamida (Bodipy507/545 IA),
 15 N-(4,4-difluoro-5,7-difenil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno-3-propionil)-N-yodoacetiletilendiamina (BODIPY® 530/550 IA), ácido 5-(((2-yodoacetil)amino)etil)amino)naftaleno-1-sulfónico (1,5-IAEDANS) y carboxi-X-rodamina, 5/6-yodoacetamida (XRIA 5,6). Preferiblemente, se usa IANBD. Se pueden controlar muchas propiedades intrínsecas detectables de un grupo indicador fluoróforo para detectar la unión con glucosa. Algunas de las propiedades que pueden presentar cambios tras la unión con glucosa incluyen la duración de la fluorescencia, la intensidad de la fluorescencia, la anisotropía o la polarización de la fluorescencia y los cambios espectrales de la emisión de la fluorescencia. Los cambios en estas propiedades de los fluoróforos se pueden provocar mediante cambios en el medio del fluoróforo, tales como los producidos por cambios en la configuración de la proteína. Los colorantes sensibles al medio, tales como IANBD, son particularmente útiles a este respecto. Se pueden generar otros cambios de las propiedades de los fluoróforos mediante interacciones con el propio analito o interacciones con un segundo grupo
 20 indicador, por ejemplo, cuando se usa una FRET (transferencia de energía de resonancia de fluorescencia) para controlar los cambios en la distancia entre dos fluoróforos.

Aunque se prefiere el uso de marcadores fluorescentes, se contempla el uso de otros grupos indicadores. Por ejemplo, se podrían usar grupos indicadores electroquímicos en los que una alteración del medio del indicador diera lugar a un cambio en el estado rédox del mismo. Tal cambio se puede detectar, por ejemplo, mediante el uso de un electrodo.

- 30 Además, se prevé la posibilidad de usar otros marcadores espectroscópicamente detectables, por ejemplo, marcadores detectables mediante RMN (resonancia magnética nuclear).

El grupo indicador se puede unir a la proteína mutada o a las GGBP mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica. Por ejemplo, el grupo indicador se puede unir mediante aminos o residuos de carboxilo con la proteína. Sin embargo, se prefiere especialmente el acoplamiento covalente a través de grupos tiol en los residuos de cisteína. En la
 35 presente invención, por ejemplo, para la GGBP mutada, se prefieren las cisternas ubicadas en la posición 11, posición 14, posición 19, posición 43, posición 74, posición 107, posición 110, posición 112, posición 113, posición 137, posición 149, posición 152, posición 213, posición 216, posición 238, posición 287 y posición 292.

Se puede usar cualquier grupo reactivo con tiol conocido en la técnica para unir los grupos indicadores, tales como fluoróforos, a una cisteína de una proteína diseñada genéticamente o mutada. La iodoacetamida, la bromoacetamida o la maleimida son restos reactivos con tiol ampliamente conocidos que se pueden usar a tal efecto.

Los fluoróforos que funcionan a longitudes de onda de excitación o emisión largas (por ejemplo, a longitudes de onda de excitación o emisión de aproximadamente 600 nm o mayores) se prefieren cuando el sensor molecular se vaya a usar *in vivo*, por ejemplo, incorporado a un dispositivo biosensor implantable (siendo la piel opaca por debajo de 600 nm). Actualmente, hay pocas sondas medioambientalmente sensibles disponibles en esta región del espectro y quizás
 45 ninguna con grupos funcionales reactivos con tiol. Sin embargo, se pueden preparar derivados reactivos con tiol de Cy-5, por ejemplo, según las enseñanzas de H. J. Gruber, *et al*, *Bioconjugate Chem.*, (2000), 11, 161-166. Se pueden rastrear conjugados que contengan estos fluoróforos, por ejemplo, unidos a diversos grupos de cisteína contenidos en GGBP mutadas para identificar cuáles producen el mayor cambio en la fluorescencia tras unirse a la glucosa.

Las GGBP mutadas útiles en la presente invención se pueden diseñar genéticamente o mutar para que tengan un marcador de histidina en el terminal N, terminal C o ambos terminales de la proteína. Las proteínas de fusión con histidina se usan ampliamente en el campo de la Biología molecular como ayuda en la purificación de las proteínas. Los sistemas de marcaje ejemplares producen proteínas con un marcador que contiene aproximadamente seis histidinas y, preferiblemente, dicho marcaje no compromete la actividad de unión de la GGBP mutada.

Como se usa en la presente memoria, "matriz" se refiere a un medio esencialmente tridimensional capaz de
 55 inmovilizar, aprisionar o encapsular al menos una proteína de unión con el fin de medir una señal detectable procedente de una interacción entre ligando y proteína. La relación entre los constituyentes de la matriz y la proteína de unión incluye, pero no se limita a, covalente, iónica e interacciones de Van derWals, y combinaciones de las mismas. La relación espacial entre la matriz y la proteína de unión incluye la distribución heterogénea y homogénea en

y/o sobre cualquier o todo el volumen de la matriz. La matriz puede estar compuesta de material orgánico, inorgánico, de vidrio, de metal, de plástico, o combinaciones de los mismos. La matriz proporciona a la proteína de unión una configuración del elemento de transducción que se puede incorporar, por ejemplo, en el extremo distal de una fibra u otra sonda pequeña mínimamente invasiva que se vaya a insertar en el tejido de un paciente para permitir una lectura episódica, continua o programada del paciente. La información del elemento de transducción del paciente se puede proporcionar, por ejemplo, por telemetría, un medio visual, audio u otro medio conocido en la técnica, por ejemplo, según las enseñanzas de los documentos US 5.517.313, US 5.910.661, US 5.894.351 y US 5.342.789, así como de Beach, R.D., *et al.*, "IEEE Transactions on Instrumentation and Measurement" (1999) 48, 6, p. 1239–1245. La información incluye radiación eléctrica, mecánica y actínica adecuada para obtener la concentración del analito o el cambio en la concentración como sea adecuado.

En un aspecto, el biosensor se usa para detectar el analito *in vivo*. En este aspecto, el biosensor está encapsulado en una matriz que luego se puede usar como dispositivo implantable. La "matriz" puede estar en cualquier forma deseable, entre las que se incluye una o más entre disco, cilindro, parche, nanopartícula, microesfera, polímero poroso, espuma de celdas abiertas, siempre y cuando sea permeable al analito. La matriz además evita la filtración del biosensor. La matriz deja pasar la luz procedente de fuentes ópticas o cualquier otra luz interrogante que vaya hacia o que proceda del grupo indicador a través del biosensor. Cuando se usa en una aplicación *in vivo*, el biosensor se expondrá a un intervalo sustancialmente fisiológico de analito, y sería deseable la determinación o la detección de un cambio en la concentración del analito, considerando que la determinación o la detección incluyen el medio de detección continuo, programado y episódico. Así pues, el biosensor *in vivo* previsto de la presente invención comprende al menos una proteína de unión mutada en una matriz aprisionante o encapsulante permeable al analito, de modo que la proteína de unión mutada proporcione una señal detectable y reversible cuando la proteína de unión mutada se exponga a concentraciones de analito variables, y que la señal detectable y reversible se pueda relacionar con la concentración del analito. Los biosensores implantables se pueden implantar, en algunas realizaciones, en o bajo la piel de una unión dérmica–epidérmica de un mamífero para interactuar con el fluido intersticial, tejido u otros fluidos biológicos. La información obtenida del implante en el paciente se puede proporcionar, por ejemplo, por telemetría, un medio visual, un medio de audio u otro medio conocido en la técnica, según lo expuesto anteriormente.

Preferiblemente, la matriz se prepara con materiales biocompatibles o incorpora materiales capaces de minimizar las reacciones adversas con el cuerpo. Las reacciones adversas de los implantes incluyen inflamación, incrustación proteica, necrosis tisular, respuesta inmune y filtración de materiales tóxicos. Tales materiales o tratamientos son ampliamente conocidos y usados en la técnica, por ejemplo, según las enseñanzas de Quinn, C. P.; Pathak, C. P.; Heller, A.; Hubbell, I. A. "Biomaterials" 1995, 16(5), 3 89–396 y Quinn, C. A. P.; Connor, R. E.; Heller, A. "Biomaterials" 1997, 18(24), 1665–1670.

El biosensor puede estar encapsulado en una matriz obtenida sustancialmente a partir de hidrogel. La parte polimérica del hidrogel puede contener una funcionalidad que sea adecuada para establecer un puente de hidrógeno o un acoplamiento covalente (p. ej., grupos hidroxilo, grupos amino, enlaces de tipo éter, ácidos y ésteres carboxílicos, y similares) bien con la proteína o con el grupo indicador.

En la presente invención, se pueden usar numerosos hidrogeles. Los hidrogeles pueden ser, por ejemplo, polisacáridos, tales como agarosa, dextrano, carragenina, ácido algínico, almidón, celulosa o derivados de estos, tales como, p. ej., derivados de carboximetilo o polímeros orgánicos hidroexpansibles, tales como, p. ej., alcohol polivinílico, ácido poliacrílico, poli(acrilamida), polietilenglicol, copolímeros de estireno y anhídrido maleico, copolímeros de éter vinílico y anhídrido maleico, y sus derivados. Se prefieren los derivados que proporcionan redes reticuladas mediante enlaces covalentes. La síntesis, y las aplicaciones biomédicas y farmacéuticas de hidrogeles en las que se basan, que comprenden polipéptidos, han sido descritas por numerosos investigadores. (Véase, p. ej., "Biosensors Fundamentals and Applications", editado por A. D. F. Turner, I. Karube and G. S. Wilson; publicado en Oxford University Press, en 1988). Una matriz de hidrogel ejemplar derivada de un polímero reticulable por UV hidrosoluble comprende alcohol poli(vinílico), *N*-metil-4(4'-formilestiril)piridinio-metosulfato-acetal (N.º de registro CAS. [107845–59–0]) disponible en PolyScience Warrington, PA.

En una realización del procedimiento de encapsulación, se añaden uno o más hidrogeles en agua a la proteína de unión mutada en una solución de tampón acuoso que tiene un pH en el intervalo de aproximadamente 4 a aproximadamente 10 en función de la proteína. La posterior desecación de la matriz, por ejemplo, la reticulación, le aporta una forma física. Con el uso de esta técnica y de un procedimiento de fabricación convencional (p. ej., la fundición de bloques, la polimerización en emulsión inversa, el rastreo o la impresión por contacto, el revestimiento en lecho fundido o el revestimiento por inmersión o centrifugación), es posible obtener matrices de diversas configuraciones (p. ej., gránulos, nanopartículas, micropartículas, monolitos, y películas gruesas y finas) adecuadas para un uso *in vitro* e *in vivo*.

En una realización, la matriz puede estar compuesta de sol–geles modificados. Los sol–geles modificados incluyen preparaciones curadas (o gelificadas) al menos parciales compuestas por estructuras vítreas de óxido metálico permeables que contienen, además de los materiales precursores del sol–gel, preferiblemente, uno o más componentes orgánicos que se condensan hidrolíticamente junto con el precursor de sol–gel, de modo que la matriz de sol–gel resultante confiere propiedades adecuadas para, por ejemplo, su implantación. Las propiedades adecuadas incluyen una baja reducción del volumen a lo largo del tiempo, resistencia al agrietamiento y otros defectos físicos,

mantenimiento de la función de la proteína y compatibilidad con la proteína y/o el grupo indicador, y compatibilidad con el animal o el sujeto en el que se puede realizar la implantación. Los materiales orgánicos adecuados incluyen polioles, tales como glicerol, etilenglicol, propilenglicol, polietilenglicol y similares, por ejemplo, según las enseñanzas de Gill y Ballesteros, *Journal of the American Chemical Society*, 1998, 120(34), 8587–8598. Se entiende que los expertos en la técnica pueden apreciar que los atributos descritos, en general, no son predecibles para una determinada combinación de proteína/sol-gel/grupo indicador, por lo que se puede esperar la optimización de los materiales de precursor de sol-gel, componente orgánico y solución de proteína para cualquier par de proteína de unión-indicador dado. Los solicitantes han descubierto que tal optimización puede proporcionar un aumento de la señal inesperado, un cambio de las constantes de unión, mejores atributos de rendimiento físico de la matriz y combinaciones de los mismos frente a otras matrices o soluciones acuosas de las mismas. La optimización de los atributos de rendimiento del par proteína-indicador y los atributos de rendimiento funcional de la matriz encapsulante se puede conseguir, por ejemplo, por medio de procedimientos combinatorios u otros procedimientos estadísticos basados en el diseño que son conocidos en la técnica.

Las matrices sol-gel útiles para la presente invención incluyen el material preparado mediante procedimientos de sol-gel convencionales ampliamente conocidos, e incluyen material inorgánico, material orgánico y material mixto orgánico/inorgánico. Los materiales usados para producir sol-gel pueden incluir, pero sin limitarse a, aluminatos, aluminosilicatos y titanatos. Estos materiales se pueden aumentar con silicatos modificados orgánicamente, (ormosiles) y siloxanos funcionalizados para proporcionar la posibilidad de conferir y manipular la hidrofiliad y la hidrofobicidad, la carga iónica, el enlace covalente de la proteína y similares. Como se usa en la presente memoria, la expresión "siloxano hidrolíticamente condensable" se refiere a precursores sol-gel que tienen un total de cuatro sustituyentes, al menos, uno, preferiblemente, dos y, lo más preferible, tres o cuatro sustituyentes, estando los sustituyentes alcoxilo unidos covalentemente con silicona a través de oxígeno y mezclas de los mismos. En el caso de precursores con tres, dos y un sustituyente de alcoxilo, al menos uno de los sustituyentes restantes está preferiblemente unido mediante enlace covalente con silicona a través de carbono, y el resto de los sustituyentes contiene una funcionalidad orgánica seleccionada entre alquilo, arilo, amina, amida, tiol, ciano, carboxilo, éster, olefínico, epoxi, sililo, nitro y halógeno.

En una realización del procedimiento de encapsulación, se hidrolizan uno o más de los siloxanos hidrolíticamente condensables en agua, bien espontáneamente o bajo una catálisis ácida o básica, formando derivados con un componente de poliol orgánico presente en una cantidad molar con respecto al siloxano hidrolíticamente condensable de hasta aproximadamente 10:1 a 1:10, preferiblemente, hasta de aproximadamente 5:1 a 1:5; y lo más preferible, de hasta aproximadamente 1:1. A esta mezcla, antes de la gelificación final, se añade proteína de unión mutada en una solución tamponadora acuosa que tenga un pH en el intervalo de aproximadamente 4 a aproximadamente 10 en función de la proteína. Las reacciones de condensación al menos parciales dan lugar a las matrices finales.

En otra realización, el siloxano hidrolíticamente condensable hidrolizado en agua, bien espontáneamente o bajo una catálisis ácida o básica para formar derivados con el poliol orgánico, se mezcla con un componente polimérico hidrosoluble. Los polímeros hidrosolubles adecuados incluyen alcohol polivinílico (PVA), sal sodio de poli(ácido maléico-co-olefina) (PMSA), sal sodio de poli(ácido vinilsulfónico) (PVSA) y polivinilpirrolidona (PVP). El poli(ácido maléico-co-olefina) incluye copolímeros de anhídrido maleico con estireno, viniléster y olefinas(C₁-C₈) y sus sales, por ejemplo, de sodio, potasio, amonio, tetraalquilamonio y similares. Preferiblemente, el componente polimérico hidrosoluble es del 0 al aproximadamente 30% en peso de la composición sol-gel.

En otra realización, el siloxano hidrolíticamente condensable hidrolizado en agua, bien espontáneamente o bajo una catálisis ácida o básica para formar derivados con el poliol orgánico, se mezcla con uno o más aditivos de silicona funcionalizada (FSA) en cantidades de proporciones del 0 al aproximadamente 0,6% molar con respecto al siloxano hidrolíticamente condensable. Los FSA ejemplares incluyen derivados de alquilo, por ejemplo, metiltrimetosilano (MTMOS); derivados de amina, por ejemplo, 3-aminopropil-trietoxisilano (ATEOS); y derivados de bis-silano, por ejemplo, óxido (bis(3-metildimetoxisilil)propil)polipropileno (BIS).

En otra realización, tanto el componente polimérico hidrosoluble como el aditivo de silicona funcionalizada se mezclan con el siloxano hidrolíticamente condensable hidrolizado en agua, bien espontáneamente, o bajo catálisis ácida o básica para formar derivados con el poliol orgánico, proporcionando una matriz adecuada para aprisionar o encapsular a la proteína de unión. Con el uso de la técnica sol-gel anteriormente mencionada y de un procedimiento de fabricación convencional (p. ej., la fundición de bloques, la polimerización en emulsión inversa, el rastreo o la impresión por contacto, el revestimiento en lecho fundido o el revestimiento por inmersión o centrifugación), es posible obtener matrices de aerogel o xerogel de diversas configuraciones (p. ej., gránulos, nanopartículas, micropartículas, monolitos, y películas gruesas y finas) adecuadas para un uso *in vitro* e *in vivo*.

En otra realización, la matriz se puede formar a partir de membranas de diálisis. Se pueden producir membranas de diálisis para encapsular o aprisionar físicamente a la proteína. La unión covalente con la membrana se considera dentro del alcance de realización descrita. La elección de la membrana ha de realizarse en base al corte de peso molecular de modo que los analitos de interés pueden pasar fácilmente a través de la membrana mientras que los materiales de alto peso molecular tienen restringida la entrada, o en el caso de las proteínas de unión mutadas, dejan la matriz de membrana. El corte del peso molecular necesario sería tal que cumpliera el requisito anteriormente mencionado y fuera habitual en la técnica. Comúnmente, las membranas que tengan un corte de peso molecular de

entre aproximadamente 1.000 y aproximadamente 25.000 daltons son adecuadas. Con el uso de esta técnica, se pueden preparar matrices de diversas configuraciones y formas adecuadas para su uso *in vitro* e *in vivo*.

También se contempla que las matrices que contengan la proteína de unión y el grupo indicador sean combinaciones de una o más hidrogeles, sol-geles y membranas de diálisis. Por ejemplo, se puede colocar una proteína aprisionada o encapsulada en un hidrogel o un sol-gel en una membrana de diálisis de una forma y tamaño adecuados, así como permitir la implantación en un sujeto o manipular las propiedades de transporte de masas o permeabilidad a los analitos de la matriz.

Los biosensores con proteínas de unión aprisionadas o encapsuladas en matrices son capaces de medir o detectar las concentraciones de analito en el orden micromolar (10^{-6} molar) a molar sin el consumo de reactivo. En algunas realizaciones, su sensibilidad hacia el analito puede permitir el uso de los biosensores para medir bajas concentraciones de analito que se sepan que están presentes en muestras de bajo volumen de fluido intersticial. Los biosensores implantables se pueden implantar, en algunas realizaciones, en o bajo la piel de una unión dérmica-epidérmica de un mamífero para interactuar con el fluido intersticial, tejido u otros fluidos biológicos. Los biosensores de proteínas de unión proporcionan el medio para monitorizar el analito de manera continua, episódica o "a demanda" según lo que el usuario considera apropiado o según el tratamiento de una afección.

En otras realizaciones, la sensibilidad de los biosensores hacia el analito (por ejemplo, hacia la glucosa) es tal que se pueden usar para analizar los niveles de analito en sangre o para determinar la concentración de analito en una solución biológica u otra solución. Como se usa en la presente memoria, una "solución biológica" incluye, pero no se limita a, sangre, transpiración y/o fluido ocular o intersticial, y combinaciones de los mismos.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos ilustran ciertas realizaciones preferidas de la presente invención, pero no pretenden ilustrar todas las realizaciones. Se marcó la proteína de unión a maltosa mutada MBP S337C con la sonda de indicador de fluoróforo NBD usada en la presente memoria según el procedimiento expuesto por Cass, A. *et al.* (*Anal. Chem.* 1994, 66, 3840–3847). Se midieron los espectros de emisión de fluorescencia de la proteína marcada mutada usando un fluorímetro SLM Aminco (Ontario, Canadá) con configuraciones de ranura de 8 y 4 para la excitación y configuraciones de 5 y 5 para el monocromador de emisión MC250, con el fin de comparar el rendimiento de unión al ligando de las proteínas marcadas con fluoróforo aprisionadas en diversas matrices con el rendimiento de las mismas proteínas en disolución. La intensidad de emisión de la fluorescencia inicial se define como I_0 . La proporción relativa del máximo de la intensidad de emisión en presencia del respectivo ligando de la proteína (I_f) con respecto a la ausencia de ligando (I_0) se define como ΔF .

Las constantes de unión se determinaron mediante la valoración de las concentraciones crecientes de glucosa en una solución proteica con mezclado tras cada adición de glucosa. Las configuraciones de ranura fueron las mismas enumeradas anteriormente. La K_d se determinó a partir de las siguientes relaciones adaptadas a partir de Pisarchick y Thompson (1990):

$$F = \frac{F_{inf} + F_0 - F_{inf}}{1 + x/K_d} \quad (1)$$

en la que F es la intensidad de fluorescencia, F_{inf} es la fluorescencia en el infinito, F_0 es la fluorescencia a glucosa cero y x es la concentración libre de glucosa ($[GLC]_{libre}$) determinada por la relación:

$$[GLC]_{libre} = \frac{[GLC]_{tot} - [Prot]_{tot} - K_d + \sqrt{([GLC]_{tot} - [Prot]_{tot} - K_d)^2 + 4 * [GLC]_{tot} * K_d}}{2}$$

en la que $[GLC]_{tot}$ y $[Pro]_{tot}$ son las concentraciones totales de glucosa y proteína, respectivamente.

Ejemplo 1. El presente ejemplo describe el procedimiento para la expresión y la purificación de proteínas mutantes sin marcadores de histidina. La GGBP está codificada por el gen Mg1B-1 de *E. coli*. Se modificó esta proteína introduciendo el aminoácido de cisteína en diversas posiciones mediante mutagénesis de sitio dirigida del gen Mg1B-1. Luego se expresaron estas proteínas en *E. coli* y se purificaron.

La mutagénesis de casetes de Mg1B-1 se realizó de la siguiente manera. Se clonó el gen Mg1B-1 de tipo natural en un vector pTZ18R (Dr. Anthony Cass, Imperial College, Londres, Inglaterra). Se generaron plásmidos mutantes a partir de este plásmido precursor usando mutagénesis de casetes produciendo secuencias de aminoácidos aleatorizadas, esencialmente según lo descrito por Kunkel (1991) y se clonaron en JM109 de *E. coli* (Promega Life Science, Madison, WI). Los plásmidos mutantes se identificaron mediante secuenciación. Se indujo la proteína mutante en JM109 y se purificó según lo descrito a continuación. Se cultivó una colonia de JM109 de *E. coli* que contenía el plásmido mutante durante una noche a 37°C con agitación (220 rpm) en caldo LB que contenía 50 µg/ml de ampicilina (LB/Amp). Se diluyó el crecimiento de la noche a 1:100 en 1 l de LB/Amp recién preparado y se incubó a 37°C con agitación hasta que la OD_{600} del cultivo fue de 0,3–0,5. Se indujo la expresión del mutante mediante la adición de una concentración

final de IPTG 1mM (Life Technologies, Gaithersburg, MD) con una incubación continuada y una agitación a 37°C durante 4–6 horas. Se cosecharon las células por centrifugación (10.000 xg, 10 min, 4°C).

Se cosechó la proteína mutante por choque osmótico y se purificó mediante cromatografía en columna. Se volvió a suspender el sedimento celular en un tampón de sacarosa (Tris-HCl 30mM, pH 8,0, sacarosa al 20%, EDTA 1mM), se incubó a temperatura ambiente durante 10 min y luego se centrifugó (4000 xg, 15 min, 4°C). Se decantó el sobrenadante y se mantuvo sobre hielo. Se volvió a suspender el sedimento celular, y se repitió la adición de 10 ml de H₂O desionizada estéril enfriada con hielo, y se incubó la suspensión sobre hielo y se centrifugó. Se mezcló el sobrenadante restante con otros sobrenadantes recogidos y se volvió a centrifugar una vez (12.000 xg, 10 min, 4°C). Se filtró el producto del choque osmótico mezclado a través de un filtro 0,8 µm y luego de 0,45 µm. Se añadió sulfato de estreptomycin (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), 5% p/v, al producto del choque osmótico y se agitó una vez durante 30 min seguidos de una centrifugación (12.000 x g, 10 min, 4°C). Entonces se concentró el producto del choque osmótico usando filtros Amicon Centriprep 10 (PMCO 10.000) (Charlotte, NC) y se sometió a diálisis durante una noche frente a Tris-HCl 5mM, pH 8,0, MgCl₂ 1mM. Se centrifugó el producto del choque osmótico sometido a diálisis (12.000 xg, 30 min, 4°C). El sobrenadante resultante se usó para una columna de sefarsa de flujo rápido de DEAE preequilibrada (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) a 0,5 ml/min. Se lavó la columna con 5–10 volúmenes de columna. Se aplicó un gradiente lineal de NaCl 0–0,2M a la columna y se recogieron las fracciones. Las fracciones que contenían proteína mutante se identificaron por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS con tinción de azul brillante de Coomassie (PM de aprox. 32 kDa). Se mezclaron las fracciones y se sometieron a diálisis durante una noche (4°C) frente a solución salina tamponada con fosfato (PBS) o bicarbonato de amonio 10mM (pH 7,4), se concentró usando filtros Amicon Centriprep 10 y se almacenó a 4°C o -20°C con glicerol. Se liofilizó la proteína sometida a diálisis con bicarbonato de amonio.

Ejemplo 2. El presente ejemplo describe la expresión y la purificación de GGBP mutantes que contienen marcadores de histidina. Las GGBP mutantes se diseñaron genéticamente bien mediante mutagénesis de sitio dirigida o mediante mutagénesis de casetes. La mutagénesis de sitio dirigida (QuikChange, Stratagene, La Jolla, CA) se realizó para modificar los aminoácidos individuales del vector pQE70 reemplazando un aminoácido por otro, especialmente, el aminoácido seleccionado. El procedimiento de mutagénesis de casetes (Kunkel 1991) se realizó para aleatorizar aminoácidos de una región especificada del gen de GGBP. Entonces se subclonaron los casetes mutados en el vector de expresión pQE70. El plásmido pGGBP-His contenía el gen de GGBP clonado en el vector de expresión pQE70 (Qiagen, Valencia, CA). Este constructo coloca seis residuos de histidina en el terminal C del gen de GGBP. Se usó la cepa de *E. coli* SG13009 para sobreexpresar el GGBP-His mutante siguiendo procedimientos estándar (Qiagen). Tras la sobre-expresión de un cultivo de 250 ml, se recogieron las células mediante centrifugación (6.000 rpm) y se volvieron a suspender en 25 ml de Bugbuster (Novagen, Madison, WI). Se añadió lisozima (25 mg) al lisado y se mezcló suavemente la mezcla a temperatura ambiente (T.A.) durante 30 min. Se produjo un lisado transparente por centrifugación (6.000 rpm) y a éste, se añadieron 0,5 ml de imidazol (1M) y 3 ml de perlas de Ni-NTA (Qiagen). Tras 30 minutos de mezclado suave a T.A., se centrifugó la mezcla (6.000 rpm) y se retiró el lisado. Se lavaron las perlas con 25 ml de solución (NaCl 1M, Tris 10mM, pH 8,0) y se volvieron a centrifugar. Se eluyó el GGBP-His mutante de las perlas añadiendo 5 ml de solución (imidazol 160mM, NaCl 1M, Tris 10mM, pH 8,0) y mezclando durante 15 min. Se filtró la solución de proteína de inmediato a través de un filtro Centriplus YM-100 (Amicon, Charlotte, NC) y luego se concentró hasta 1–3 mg/ml usando un filtro Centriplus YM-10. Se sometió la proteína a diálisis durante una noche frente a 2 l de solución de almacenamiento (NaCl 1M, Tris 10mM, NaPO₄ 50mM, pH 8,0).

Ejemplo 3. El presente ejemplo describe genéricamente el marcaje de la proteína de unión con sonda indicadora. Se trató una alícuota de GGBP mutante que contenía cisteína (4,0 nmol) en PBS con ditiotreitól 2mM (5 µl, 10 nmol) durante 30 min. Se preparó una solución madre de *N,N'*-dimetil-*N*-(yodoacetil)-*N'*-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il)etilendiamina (amida de IANBD, 0,5 mg) en DMSO (100 µl, 11,9mM) y se añadieron 3,36 µl (40 nmol) a la proteína. La reacción continuó a temperatura ambiente durante 4 h en un mezclador rotatorio Dynal en la oscuridad. Se purificó la proteína marcada mediante filtración sobre gel en una columna NAP-5 (Amersham Pharmacia). Se determinaron las proporciones de marcaje usando un coeficiente de extinción estimado (50mM⁻¹ cm⁻¹) para GGBP calculado en GeneWorks 2.45 (IntelliGenetics), ϵ_{478} (amida de IANBD) = 25mM⁻¹cm⁻¹) y una medición de D.O. para una solución estándar de amida de IANBD a 280 nm y 478 nm. Se calculó la concentración de colorante de la proteína como $C_{\text{colorante}} = A_{478} / \epsilon_{478}$. Se calculó la absorbancia de la proteína a 280 nm como $A_{\text{prot}(280)280} = A_{\text{total}(280)} - A_{\text{colorante}(280)}$, en la que $A_{\text{colorante}(280)} = A_{479} \times (A_{280} / A_{478})_{\text{patrón colorante}}$. Por tanto, la concentración de proteína fue $C_{\text{prot}(280)} = A_{\text{prot}(280)} / \epsilon_{280}$. La FIG 1 ilustra el cambio producido en la respuesta de la fluorescencia a la concentración de la glucosa de un ejemplo representativo, GGBP-H₆ con amida de NBD A213C/L238C en disolución. La Tabla 1 resume el cambio en la fluorescencia de diversas GGBP mutantes marcadas con grupos indicadores, entre los que se incluyen los grupos indicadores que tienen bien excitaciones o un máximo de emisión de al menos 600 nanómetros. La Tabla 2 resume el cambio en la fluorescencia y los valores K_d determinados de mutaciones de una, dos, tres y cuatro sustituciones de aminoácido. Estos datos muestran claramente que las mutaciones de la GGBP marcada con un grupo indicador pueden proporcionar atributos deseables como biosensores de la glucosa. Los datos muestran la relación entre la mutación y el grupo indicador de las muestras analizadas.

TABLA 1						
Porcentaje de cambio en la fluorescencia para los mutantes de GGBP ¹						
Colorante	Excitación / emisión (nm)	S112C	M182C	A123C	A213C His ₆	M216C
Amida de IANBD	470/550	0	4	3	51	7
Éster de IANBD	470/550					
IAEDANS	336/490	-7	-8	0		-9
Bodipy 530/550 IA	530/550	7	-10	33		4
XRIA 5,6	575 / 600	-21	-19	-38		-15
Amarillo Lucifer IA	426/530			-14		-3
Bodipy 507/545 IA	507 / 545			25		-3
Cy5	640 / 660	2	0	11		-7
Maleimida de Texas Red®	580/610				-13	
Dapoxil	375/580	15	7	12		2

¹F de glucosa 0 a 1mM a [colorante] = 0,5uM. A no ser que se indique lo contrario, todos los mutantes carecían de marcadores de histidina.

Tabla 2. Resumen de las mutaciones con NBD de GGBP-H6

IDENTIFICACIÓN	Solución		Sol-gel		
	$\Delta F(\%)^1$	Kd(mM) ²	Colorant/ proteína	$\Delta F(\%)$	K _d (mM)
Tipo natural	intrínseca	0,0002			
A1C					
A1S					
A1 S, E149C,A213R,L238S	+21 ³		0,31		
A1S, E149C,A213R,L238S	+480	0,37	0,9		
K11C	10		1,8		
D14C			1,5	21	
V19C	-56	0,0001	0,38	-0,99	
N43C	40	0,0002	0,28		
G74C	-3	0,0009	1,43		
Y107C	-30	0,001	0,93		
T110C	-9				
S112C	220	0,05	1,15		
S112C,L.238S	6		1,5		
K113C	15		0,65		

ES 2 380 922 T3

K137C	-5	0,00004	1,17		
E149C	300	0,0002	0,96	57	
E149C,A213C	+110		0,70		
E149C,A213R	660		1,1		
E149C,A213S	240 ⁴	0,0023	1,1		
E149C,A213T	350		0,6		
E149C,A213L	280	0,1	1,1		
E149C,A213Y	280	0,1	1,1		
E149C,A213C,L238C	+39 ³		1,08		
E149C,A213S,K223N					
E149C,K223N	260	0,003	0,7		
E149C,L238C	260	5	1,6		
E149C,L.238S	660 ⁴	0,08	1,36		
E149C,K223N,N256R					
E149C,N256S	1		0,93		
B149C,N256R	200	742 ⁶	0,9		
E149C,M182C,A213C,L238S	200	216 ⁶	3,2		
E149C,A213S,L238S	480	0,47	0,76		
E149C,A213R,L238S	500	12	1,1		
H152C	210	0,07	1,3	317	0,36
H152C,A213S	100	0,16			
H152C,A213R	-3		1,2		
m52C,K223N)	200	0,003	1		
H152C,M182C					
M182C	11				
A213C	50	0,124	0,68		
A213C,L238C	24, 67 ³	6	1,4	70	1
A213C,L255C	-5		0,98		
M216C	67	0,008	0,91		
D236C	+2 ³		0,43		
L238C	-6,+3 ³	0,003 (SPR)	1,3		
D287C	4		1,1		
R292C	-34	0,0008	1,5		

IDENTIFICACIÓN	(continuación)		Colorant/ proteína	Sol-gel	
	Solución			$\Delta F(\%)$	Kd(mM)
V296C	$\Delta F(\%)^1$	Kd(mM) ²		$\Delta F(\%)$	Kd(mM)
	-10	0,00001 ⁵	1,08		

¹ ΔF de Glc 0 a 1mM a [colorante] = 0,5mM

²K_d medida a una [colorante] = 0,1mM

³ ΔF cuando se mide con Glc de 0 a 100mM

⁴ ΔF cuando se mide con Glc de 0 a 10mM

⁵Estimada; el cal. con gráfica Sigma no fue convergente

⁶Estimada; la curva no alcanzó la saturación

Ejemplo 4. El presente ejemplo describe la inmovilización de un biosensor de la presente invención usando condensado de silicato modificado con glicerol (GMSC). Las adiciones del glicerol modificaron el condensado de silicato (GMSC). Las adiciones de glicerol se realizaron directamente tras la hidrólisis con ácido de tetraetoxiortosilicato (TEOS) o tetrametoxiortosilicato (TMOS). Se evaluó un intervalo de tiempos de hidrólisis, niveles de pH, orden de adición de reactivos y proporciones de TEOS:glicerol para determinar las condiciones óptimas para comenzar la reacción de gliceración. Las condiciones preferidas se encontraron con el uso de un intervalo de 10 a 30 minutos entre las hidrólisis y la adición de glicerol, un intervalo de pH de entre 0,5 y 1, y una proporción molar de 1:1 de TEOS con respecto al glicerol. La siguiente información describe un procedimiento modificado de Gill y Ballesteros para una preparación de condensado de silicato modificado con glicerol (GMSC) basado en TEOS, usando las siguientes proporciones de reactivos: TEOS o TMOS:1; H₂O:1, Metanol:4, Glicerol:1. Se añadió TEOS o TMOS en metanol a un matraz y se enfrió hasta 0°C sobre hielo. A continuación, se añadió HCl 0,6M en gotas a la solución. Tras 20 minutos de agitación, se añadió glicerol en gotas. Se calentó la reacción lentamente durante 1–2 horas a 20–25°C. Tras ello, se siguió calentando la cuba de reacción y se mantuvo a un intervalo de temperaturas de 60–70°C bajo nitrógeno durante entre 36 y 42 horas. La duración óptima fue de 40 horas. La observación de una separación de fases indicó la gliceración incompleta para las reacciones detenidas antes de 36 horas. Las reacciones mantenidas más de 42 horas produjeron monolitos sol-gel de GMSC con propiedades físicas enormemente reducidas, por ejemplo, una mayor fragilidad. Tras la reacción de 40 horas a 60–70°C, se redujo el volumen de la solución mediante rotavaporización hasta que se volvió viscosa y transparente, momento en el que se añadió metanol a la solución en una proporción en peso de 4:1. Se demostró que la solución de GMSC era estable, proporcionando resultados consistentes durante varios meses al almacenarse a temperatura de refrigeración. Cuando se fue a usar la solución de GMSC, se retiró el metanol mediante rotavaporización y se añadió agua destilada en una proporción en peso de 1:1 al reactivo de GMSC para catalizar la hidrólisis/gelificación final. Se crearon monolitos, películas finas y polvos con este procedimiento usando un recipiente apropiado a modo de molde. Los monolitos sol-gel de GMSC no resultaron ser frágiles y sufrieron una contracción del aproximadamente 8% tras la desecación a 4°C a una humedad relativa del 50% durante 2 semanas (el % de contracción fue la media de los cambios de diámetro y longitud medidos con un microcalibrador y comparados con las dimensiones originales del molde). Una microscopía electrónica (SEM) ilustró además las mejoras significativas en la fracturación superficial entre los monolitos creados con hidrólisis con TEOS y los monolitos creados mediante el procedimiento de GMSC descrito anteriormente. Este conjunto de experimentos demuestra cómo se pueden producir sol-geles con mejores características físicas según los procedimientos enseñados en la presente invención.

Ejemplo 5. El presente ejemplo describe una mayor optimización de las propiedades físicas mediante sol-geles de GMSC en los que se ha sustituido parcialmente el glicerol bien con etilenglicol (EG) o con polietilenglicol (PEG). Se evaluó el etilenglicol (EG) como sustituto del glicerol en mezclas en las que la proporción entre el glicerol y el EG se había variado, pero la proporción molar entre el glicerol total y el EG se había mantenido constante con relación a otros reactivos. Los monolitos sol-gel se prepararon mediante el procedimiento descrito en el ejemplo anterior; se curaron durante dos semanas a 4°C y una humedad relativa del 50% y se determinó su % de contracción como se muestra en la Tabla 3. El porcentaje de contracción se define como la media de la disminución de la longitud y el diámetro frente a las dimensiones originales. Los monolitos usados para la determinación de la contracción no tenían proteína/fluoróforo. Para las mediciones de la F, se prepararon las muestras enumeradas en la Tabla 1 que contenían NBD de GGBP-H6 H152 (del Ejemplo 3) según lo descrito más adelante.

Tabla 3. % medio de contracción y ΔF de la matriz sol-gel tras 2 semanas

Matriz sol-gel	% medio de contracción	F (Glucosa 10mM)
1. Solución (NBD de GGBP-H6 H152 0,8-1,2 μ M)	No aplicable	1,53
2. TEOS	35,95 +/- 0,24	1,39
3. GMSC-TEAO	8,01 +/- 0,19	1,57
4. GMSC-PMSA al 15% en peso y TEOS; MTMOS al 0,145% molar	3,99 +/- 0,27	-
5. EG/GMSC al 1%-TEOS	3,10 +/- 0,17	1,53
6. EG/GMSC al 5%-TEOS	2,48 +/- 0,15	1,47
7. EG/GMSC al 10%-TEOS	-	1,37
8. EG/GMSC al 20%-TEOS	-	1,34

Se descubrió que los sol-geles de EG/GMSC al 1% y 5% (entradas 5 y 6 respectivamente de la Tabla 3) tienen un % de contracción significativamente inferior al de cualquiera de los sol-geles de solo TEOS o de los sol-geles de TEOS modificados con GMSC (entradas 2 y 3 respectivamente de la Tabla 3 anterior). También se evaluó cualitativamente el polietilenglicol (PEG) como sustituto parcial del glicerol en proporciones similares en sol-geles de GMSC y produjo monolitos con propiedades superficiales favorables y una flexibilidad de tipo caucho. En resumen, la sustitución parcial bien del etilenglicol (EG) o del polietilenglicol (PEG) con glicerol en los sol-geles de GMSC proporciona mejoras en las propiedades físicas, por ejemplo, minimiza la contracción y reduce la fracturación superficial. Se descubrió que estas matrices sol-gel que contienen proteína de unión poseen un rendimiento similar o mejor al de la proteína en disolución.

Ejemplo 6. Aprisionamiento de proteínas de unión en sol-geles de GMSC que contienen aditivos de silicona funcionalizada (FSA) y polímeros. El presente ejemplo describe la adición de aditivos de polímero y de poliol orgánico para optimizar los sol-geles de GMSC para aprisionar proteínas de unión con el fin tanto de mantener como de aumentar sus propiedades espectrales tras la unión a ligandos. Se marcaron las proteínas de unión con un fluoróforo (según lo descrito en el Ejemplo 3). Se añadieron las soluciones de proteínas durante la etapa de hidrólisis/gelificación final descrita anteriormente para producir concentraciones finales de proteína de 2-4 μ M en el sol-gel. Los aditivos de polímero y los aditivos de silicona funcionalizada (FSA) se adquirieron en Sigma-Aldrich Chemicals (St. Louis, MO). Los aditivos poliméricos se evaluaron en cantidades de entre 0 y aproximadamente 30% en peso. Los FSA se evaluaron como aditivos añadidos a los sol-geles de GMSC en cantidades del 0 al 0,6% molar. De este modo, la rotavaporización del reactivo de GMSC para eliminar el metanol de su solución de almacenamiento fue seguida por la reconstitución en agua en una proporción en peso de 1:1. A una alícuota de 400 μ l de esta mezcla, se añadieron 800 μ l de tampón (HEPES, PBS o Tris) con aditivo polimérico hidrosoluble premezclado junto con cualquier GMSC modificado con FSA. Entonces se añadió una proteína de unión mutada en disolución y tras mezclar bien, se colocaron 100 μ l de la mezcla en una microplaca de 96 pocillos (placas de fondo plano blancas de Falcon, producto n.º 35-3941, BD Labware, NJ). Se curaron las microplacas que contenían sol-gel durante 12-18 horas a 4°C y una humedad relativa del 50%. Se preparó el GMSC-BIS mediante el mismo procedimiento que el GMSC basado en TEOS, pero con la sustitución del óxido (bis(3-metildimetoxisilil)propil)polipropileno por TEOS. El GMSC-MTMOS y el GMSC-ATEOS se prepararon de manera similar, a excepción de que la hidrólisis se llevó a cabo bien con un 10% de la cantidad de ácido o sin ácido en la etapa de hidrólisis, respectivamente, en comparación con el procedimiento de GMSC basado en TEOS. La emisión de la fluorescencia se midió con un fluorómetro de rastreo Varian Cary Eclipse con un adaptador para placas de micropocillos (Varian Instruments, Victoria, Australia). La excitación fue a 475 nm y la emisión se registró de 500 a 600 nm, comúnmente, controlando el pico máximo de fluorescencia de la emisión. Los anchos de las ranuras fueron de 5 nm para la excitación y de 10 nm para la emisión. Se hicieron determinaciones de la I_0 individuales para cada pocillo y se añadieron 100 μ l de una solución de ligando (maltosa 1mM en el caso de la MBP S337C) y se obtuvieron lecturas de I_f a partir de las cuales se calcularon los valores de ΔF . Las proteínas aprisionadas en sol-gel modificado mostraron una mayor fluorescencia inicial (I_0) en ausencia de ligando en comparación con concentraciones equivalentes de la misma proteína en disolución. La Figura 2 muestra la emisión de la fluorescencia antes y después de la adición de glucosa para la NBD de GGBP His6 H152 en sol-gel optimizado con H152 y en disolución. Se normalizaron los espectros de I_0 hasta un máximo de 1,0. La figura muestra un aumento de aproximadamente 2-3 veces de la ΔF obtenido para las matrices sol-gel optimizadas que contienen proteína de unión cuando se exponen al analito en comparación con la proteína en disolución. Así pues, tras la optimización de las formulaciones sol-gel de cada proteína, se observó un aumento de la ΔF . Cabe señalar que el máximo de emisión se puede desplazar para las muestras de proteína-grupo indicador aprisionadas en sol-gel en comparación con las que se encuentran en disolución. Además, estas matrices sol-gel modificadas proporcionan mejores propiedades físicas como muestra la entrada 4 de la Tabla 3. La Tabla 4 muestra un intervalo aproximado de componentes de formulaciones que ofrecen una mejor respuesta para cada una de las proteínas individuales evaluadas.

Tabla 4. Formulaciones sol-gel optimizadas para NBD-GGBP His6 H152C, NBD-GGBP His6 A213C/L238C y NBD-MBP-S337C

	NBD-GGBP H152C		NBD-GGBP A213C/L238C		NBD-MBP S337C	
		Intervalo		Intervalo		Intervalo
Aditivo polimérico	PMSA	14–16% en peso	PMSA	4–5% en peso	PMSA	14–16% en peso
Aditivo de FSA	Alquilo	0,13–0,16% molar	Alquilo	0,01–0,03% molar	Amina	0,01–0,03% molar
Tampón	Tris		PBS		PBS	
Intervalo de pH		7,3–7,5		7,4–7,7		7,4–7,7
K_d (mM) [valor en disolución]	0,36 [0,07]		2,2 [6]		–	
ΔF (aumento frente a disolución) [provocación con azúcar]	2,93x [10mM]		2,36x [100mM]		2,53x [0,1mM]	
(GGBP = proteína de unión a glucosa/galactosa; MBP = proteína de unión a maltosa; NBD = N(acetoxi)etil–N–metil)amino–7–nitrobenzoxadiazol)						

5 En los experimentos de optimización de formulaciones descritos anteriormente se usó Design–Expert 6.0.5 (Stat–Ease, Inc., Minneapolis, MN) para crear varios Diseños de Experimentos (DdE). Entra las otras variables de la formulación que se optimizaron en cada DdE se encontraron el tipo de tampón (HEPES, PBS y Tris) y el pH (de 6,6 a 7,8). Sorprendentemente, los constituyentes de las formulaciones y los intervalos de concentración óptimos fueron bastante diferentes para cada proteína. Sin embargo, en todos los casos, se obtuvieron mejoras sustanciales del rendimiento para las formulaciones optimizadas en comparación bien con el rendimiento en disolución o con el rendimiento en sol–geles sin modificar.

15 **Ejemplo 7.** El presente ejemplo describe el aprisionamiento de GGBP H152C en una matriz de hidrogel reticulada por UV y el efecto de la matriz sobre el cambio en la fluorescencia y la afinidad de unión. En este experimento SbQ–PVA de Polysciences Inc., se añadieron 100 ul de tampón de PBS y se mezclaron durante una hora en un mezclador rotatorio. Entonces se mezclaron 80 ul de esta solución con 20 ul de proteína marcada. Se determinó espectroscópicamente la concentración de proteína final en 0,15 mg/ml. Tras mezclar, se colocaron alícuotas en placas de 96 pocillos y se secaron en una cámara mantenida a una humedad del 20% durante 12 h, tras lo que se curaron con luz UV. Se realizó una provocación con 2 μ l de glucosa 10mM en los pocillos que contenían proteína encapsulada en matriz y se compararon con solución de proteína sin matriz que tenía una carga de proteína equivalente. La Figura 3 muestra la capacidad de la matriz proteica mutada para responder al analito de una manera y con una sensibilidad equivalentes a las obtenidas en disolución. La K_d de la proteína aprisionada fue comparable a la obtenida en disolución.

25 **Ejemplo 8.** El presente ejemplo describe la inmovilización de un biosensor de la presente invención en una matriz de membrana de diálisis y la capacidad de la matriz para proporcionar lecturas reversibles y continuas. Con el uso de un fluorímetro Varian Eclipse con una conexión de fibra óptica, se fijó proteína GGBP L238C/A213C (2 μ M en tampón de PBS) aprisionada con una membrana de diálisis que tenía un corte molecular de 3.500 daltons al extremo distal de la fibra. Se prepararon soluciones que contenían tampón de PBS, glucosa 2mM y 20mM en tampón de PBS. Con la sonda en la solución de PBS, se registraron las lecturas a intervalos de 0,02 segundos de la longitud de onda de emisión de 521 nm, tras lo que se insertó la fibra en las soluciones de glucosa. La colocación de la fibra en la solución sólo con tampón produjo de nuevo la señal inicial. La Figura 4 representa múltiples ciclos alternos entre las soluciones de tampón y de glucosa, demostrando el carácter reversible del biosensor aprisionado en una matriz permeable en un intervalo fisiológico. Se observaron resultados similares con las muestras aprisionadas en sol–gel, demostrando una aplicabilidad para un uso continuo.

REIVINDICACIONES

- 1.- Un biosensor de la glucosa que comprende al menos una proteína de unión a glucosa/galactosa mutada (GGBP) y al menos un grupo indicador luminiscente (marcador luminiscente) unido mediante enlace covalente a la mismo, en el que dicho al menos un grupo indicador luminiscente es capaz de proporcionar una señal detectable y reversible como respuesta a la unión con dicha GGBP mutante, y en el que dicha GGBP mutada tiene al menos una sustitución de aminoácido de un aminoácido no reactivo con un aminoácido reactivo que se puede modificar con un agente de marcaje análogo al etiquetado de cisteína con un colorante reactivo al tiol, y dicha GGBP mutada se une a la glucosa y se encapsula en una matriz permeable al analito que comprende sol-geles aumentados con silicatos modificados orgánicamente o con hidrogeles reticulados covalentemente, o con combinaciones de los mismos.
- 2.- El biosensor de la reivindicación 1, en el que el grupo indicador luminiscente es un marcador fluorescente o un marcador fosforescente.
- 3.- El biosensor de la reivindicación 1 ó 2, en el que dicha sustitución de aminoácido se selecciona entre una cisteína en la posición 1, una serina en la posición 1, una cisteína en la posición 11, una cisteína en la posición 14, una cisteína en la posición 19, una cisteína en la posición 43, una cisteína en la posición 74, una cisteína en la posición 107, una cisteína en la posición 110, una cisteína en la posición 112, una cisteína en la posición 113, una cisteína en la posición 137, una cisteína en la posición 149, una cisteína en la posición 213, una cisteína en la posición 216, una cisteína en la posición 238, una cisteína en la posición 287, una cisteína en la posición 292, una cisteína en la posición 152, una cisteína en la posición 182, una cisteína en la posición 236 y una cisteína en la posición 296 correspondiente a las posiciones de aminoácidos de la GGBP de *E. coli*.
- 4.- El biosensor de la reivindicación 3, en el que dicha sustitución de aminoácido se selecciona entre una cisteína en la posición 1, una serina en la posición 1, una cisteína en la posición 11, una cisteína en la posición 14, una cisteína en la posición 19, una cisteína en la posición 43, una cisteína en la posición 74, una cisteína en la posición 107, una cisteína en la posición 110, una cisteína en la posición 112, una cisteína en la posición 113, una cisteína en la posición 137, una cisteína en la posición 149, una cisteína en la posición 213, una cisteína en la posición 216, una cisteína en la posición 238, una cisteína en la posición 287, una cisteína en la posición 292, una cisteína en la posición 152, una cisteína en la posición 182, una cisteína en la posición 236 y una cisteína en la posición 296 de la GGBP de *E. coli*.
- 5.- El biosensor de la reivindicación 3 que comprende al menos dos sustituciones de aminoácidos seleccionadas entre una cisteína en la posición 112 and una serina en la posición 238, una cisteína en la posición 149 y una serina en la posición 238, una cisteína en la posición 152 y una cisteína en la posición 182, una cisteína en la posición 152 y una serina en la posición 213, una cisteína en la posición 213 y una cisteína en la posición 238, una cisteína en la posición 149 y una arginina en la posición 213, una cisteína en la posición 149 y una cisteína en la posición 213, una cisteína en la posición 149 y una treonina en la posición 213, una cisteína en la posición 149 y una leucina en la posición 213, una cisteína en la posición 149 y una tirosina en la posición 213, una cisteína en la posición 149 y una asparagina en la posición 223, una cisteína en la posición 149 y una cisteína en la posición 238, una cisteína en la posición 149 y una serina en la posición 256, una cisteína en la posición 149 y una arginina en la posición 256, una cisteína en la posición 152 y una arginina en la posición 213, una cisteína en la posición 152 y una asparagina en la posición 223, una cisteína en la posición 213 y una cisteína en la posición 255 de la GGBP de *E. coli*.
- 6.- El biosensor de la reivindicación 3 que comprende al menos tres sustituciones de aminoácidos seleccionadas entre una cisteína en la posición 149, una serina en la posición 213 y una serina en la posición 238; una cisteína en la posición 149, una arginina en la posición 213 y una serina en la posición 238; una cisteína en la posición 149, una cisteína en la posición 213 y una cisteína en la posición 238; una cisteína en la posición 149, una serina en la posición 213 y una asparagina en la posición 223; y una cisteína en la posición 149, una asparagina en la en la posición 223 y una arginina en la posición 256 de GGBP de *E. coli*.
- 7.- El biosensor de la reivindicación 3 que comprende al menos cuatro sustituciones de aminoácidos seleccionadas entre una serina en la posición 1, una cisteína en la posición 149, una arginina en la posición 213 y una serina en la posición 238; una serina en la posición 1, una cisteína en la posición 149, una serina en la posición 213 y una serina en la posición 238; y una cisteína en la posición 149, una cisteína en la posición 182, una cisteína en la posición 213 y una serina en la posición 238 de GGBP de *E. coli*.
- 8.- El biosensor de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7, en el que dicha proteína de unión comprende además al menos un marcador de histidina.
- 9.- El biosensor de la reivindicación 1, en el que
- (i) dicho marcador luminiscente tiene una longitud de onda de excitación de más de aproximadamente 600 nanómetros; o
 - (ii) dicho marcador luminiscente tiene una longitud de onda de emisión de más de aproximadamente 600 nanómetros; o

(iii) dicho marcador luminiscente es acoplado covalentemente a dicha al menos una proteína de unión a glucosa/galactosa mediante la reacción con un miembro seleccionado entre fluoresceína, coumarinas, rodaminas, tetrametilrodamina-5-yodoacetamida (5-TMR1A), R-ficoeritrina acoplada a sal 9-(2(ó 4)-(N-(2-maleimidiletil)-sulfonamidil)-4(ó 2)-sulfofenil)-2,3,6,7,12,13,16,17-octahidro-(1H,5H, 11H,15H-xanteno (2,3,4-ij:5,6,7-i'j')diquinolizín-18-io (Quantum Red®), sal 9-(2(ó 4)-(N-(2-maleimidiletil)-sulfonamidil)-4(ó 2)-sulfofenil)-2, 3,5,7, 2,13,16,17-octahidro-(1H,5H,11H, 15H-xanteno (2,3,4-ij:5,6,7-i'j') diquinolizín-18-io (Texas Red®), sal 2-(5-(1-(6-(N-(2-maleimidiletil)-amino)-6-oxohexil)-1,3-dihidro-3,3-dimetil-5-sulfo-2H-indol-2-iliden)-1,3-prop-ildienil)-1-etil-3, 3-dimetil-5-sulfo-3H-indolio (Cy3®), N-((2-yodo-acetoxi)etil)-N-metil)amino-7-nitrobenzoxadiazol (IANBD), 6-acriloil-2-dimetilaminonaftaleno (acrylodan), pireno, sal de ácido 6-amino-2, 3-dihidro-2-(2-((yodoacetil) amino)etil)-1, 3-dioxo-1H-benz(de)isoquinolin-5,8-disulfónico (amarillo Lucifer), sal 2-(5-(1-(6-(N-(2-maleimidiletil)-amino)-6-oxohexil)-1,3-dihidro-3,3-dimetil-5-sulfo-3H-indol-2-iliden)-1,3-pentadienil)-1-etil-3,3-dimetil-5-sulfo-3H-indolio (Cy5®), (2-bromoacetamidoetil)-sulfonamida: 4-(5-(4-dimetilaminofenil) oxazol-2-il) fenil - N-(2-bromoacetamidoetil) sulfonamida (Dapoxyl®) (2-bromoacetamido-etil)fulsulfonamida, (N-(4,4-difluoro-1,3,5,7-tetrametil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno-2-iliodoacetamida (BODIPY® 507/545 IA), N-(4,4-difluoro-5,7-difenil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno-3-propionil)-N-yodoacetil-etilen-diamina (BODIPY® 530/ 550 IA), ácido 5-(((2-yodacetil)-amino)etil)amino)naftalen-1-sulfónico (1,5-IAEDANS) y carboxi-X-rodamina, 5/6-yodoacetamida (XRIA 5,6).

- 10.- El biosensor de la reivindicación 1, en el que dicho analito es glucosa.
- 11.- El biosensor de la reivindicación 1, en el que dicha matriz permeable al analito comprende un hidrogel reticulado covalentemente, siendo preferiblemente dicho hidrogel reticulado covalentemente seleccionado entre polipéptidos, polisacáridos, derivados de polisacárido, alcoholes polivinílicos, ácidos poliacrílicos, poliacrilamida, polietilenglicoles, copolímeros de estireno y anhídrido maleico, copolímeros de olefina y anhídrido maleico y copolímeros de viniléter y anhídrido maleico; siendo el hidrogel reticulado más preferible un alcohol polivinílico que comprende alcohol polivinílico y sales acetal de N-metil-4(4'-formil-estiril)piridinio.
- 12.- El biosensor de la reivindicación 1, en el que dicha matriz permeable al analito comprende sol-gel aumentado con silicatos modificados orgánicamente, preferiblemente, dicha matriz permeable al analito es sol-gel derivado de condensado de silicato modificado con glicerol (GMSC).
- 13.- El biosensor de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que la GGBP encapsulada en la matriz está contenida en una matriz adicional, siendo, preferiblemente, dicha matriz adicional un hidrogel, sol-gel o una membrana de diálisis.
- 14.- El biosensor de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 que es un dispositivo implantable.
- 15.- El biosensor de cualquier reivindicación 1 a 14 para su uso como dispositivo de diagnóstico.
- 16.- Un procedimiento para la detección de la glucosa que comprende:
- a) proporcionar al menos una proteína de unión a glucosa/galactosa mutada (GGBP) que tenga al menos una sustitución de aminoácido de un aminoácido no reactivo con un aminoácido reactivo que se pueda modificar con un agente de marcaje análogo al marcaje de la cisteína con un colorante reactivo al tiol y al menos un grupo indicador luminiscente unido covalentemente a la misma, en el que dicho al menos un grupo indicador luminiscente es capaz de proporcionar una señal detectable y reversible como respuesta a la unión a dicha GGBP mutante, y en el que dicha GGBP mutada se une a glucosa;
- b) atrapar o encapsular dicha proteína de unión a glucosa/galactosa mutada en una matriz permeable al analito que comprende hidrogeles reticulados covalentemente, sol-geles aumentados con silicatos modificados orgánicamente o una combinación de los mismos;
- c) exponer dicha proteína de unión a glucosa/galactosa mutada a concentraciones de glucosa variables; y
- d) detectar una señal procedente de dicho grupo indicador luminiscente.
- 17.- El procedimiento de la reivindicación 16
- (i) que comprende además la etapa de exponer dicho grupo indicador luminiscente a una fuente de energía capaz de excitar dicho grupo indicador para que emita dicha señal; o
- (ii) en el que dicha detección comprende la detección de la señal reversible correspondiente a dichas concentraciones variables de glucosa; o
- (iii) en el que dicha detección es continua, programada, episódica o combinaciones de las mismas.
- 18.- El procedimiento de la reivindicación 16 ó 17, en el que dicha proteína de unión a glucosa/galactosa y/o dicho indicador son como se definen en las reivindicaciones 3 a 9.

19.- Una composición que comprende una mezcla de:

a) una proteína de unión a glucosa/galactosa mutada (GGBP) que tiene al menos una sustitución de aminoácido seleccionada entre una cisteína en la posición 1, una serina en la posición 1, una cisteína en la posición 11, una cisteína en la posición 14, una cisteína en la posición 19, una cisteína en la posición 43, una cisteína en la posición 74, una cisteína en la posición 107, una cisteína en la posición 110, una cisteína en la posición 112, una cisteína en la posición 113, una cisteína en la posición 137, una cisteína en la posición 149, una cisteína en la posición 213, una cisteína en la posición 216, una cisteína en la posición 238, una cisteína en la posición 287, una cisteína en la posición 292, una cisteína en la posición 152, una cisteína en la posición 182, una cisteína en la posición 236 y una cisteína en la posición 296 correspondiente a las posiciones de aminoácidos de la GGBP de *E. coli*, en la que dicha GGBP mutada se une a la glucosa;

b) una matriz permeable al analito que comprende hidrogeles reticulados covalentemente, sol-geles aumentados con silicatos modificados orgánicamente o una combinación de los mismos; y

c) al menos un grupo indicador luminiscente (marcador luminiscente) en el que dicho al menos un grupo indicador luminiscente es capaz de proporcionar una señal detectable y reversible como respuesta a la unión a dicha GGBP mutante.

20.- La composición de la reivindicación 19, en la que dicha proteína de unión comprende al menos una combinación de sustituciones de aminoácidos seleccionada entre una cisteína en la posición 112 y una serina en la posición 238; una cisteína en la posición 149 y una serina en la posición 238; una cisteína en la posición 152 y una cisteína en la posición 182; una cisteína en la posición 152 y una serina en la posición 213; una cisteína en la posición 213 y una cisteína en la posición 238; una cisteína en la posición 149 y an arginina en la posición 213; una cisteína en la posición 149 y una cisteína en la posición 213; una cisteína en la posición 149 y una treonina en la posición 213; una cisteína en la posición 149 y una leucina en la posición 213; una cisteína en la posición 149 y una tirosina en la posición 213; una cisteína en la posición 149 y una asparagina en la posición 223; una cisteína en la posición 149 y una cisteína en la posición 238; una cisteína en la posición 149 y una serina en la posición 256; una cisteína en la posición 149 y una arginina en la posición 256; una cisteína en la posición 152 y una arginina en la posición 213; una cisteína en la posición 152 y una asparagina en la posición 223; una cisteína en la posición 213 y una cisteína en la posición 255; una cisteína en la posición 149, una serina en la posición 213 y una serina en la posición 238; una cisteína en la posición 149, una arginina en la posición 213 y una serina en la posición 238; una cisteína en la posición 149, una cisteína en la posición 213 y una cisteína en la posición 238; una cisteína en la posición 149, una serina en la posición 213 y una asparagina en la posición 223; una cisteína en la posición 149, una asparagina en la posición 223 y una arginina en la posición 256; una serina en la posición 1, una cisteína en la posición 149, una arginina en la posición 213 y una serina en la posición 238; una serina en la posición 1, una cisteína en la posición 149, una serina en la posición 213 y una serina en la posición 238; y una cisteína en la posición 149, una cisteína en la posición 182, una cisteína en la posición 213 y una serina en la posición 238 correspondientes a las posiciones de aminoácidos de la GGBP de *E. coli*.

21.- El biosensor de la reivindicación 19 ó 20, en el que dicha proteína de unión a glucosa/galactosa mutada comprende además al menos un marcador de histidina.

22.- La composición de la reivindicación 19 ó 20, en la que

(i) dicho marcador luminiscente tiene una longitud de onda de excitación de más de aproximadamente 600 nanómetros; o

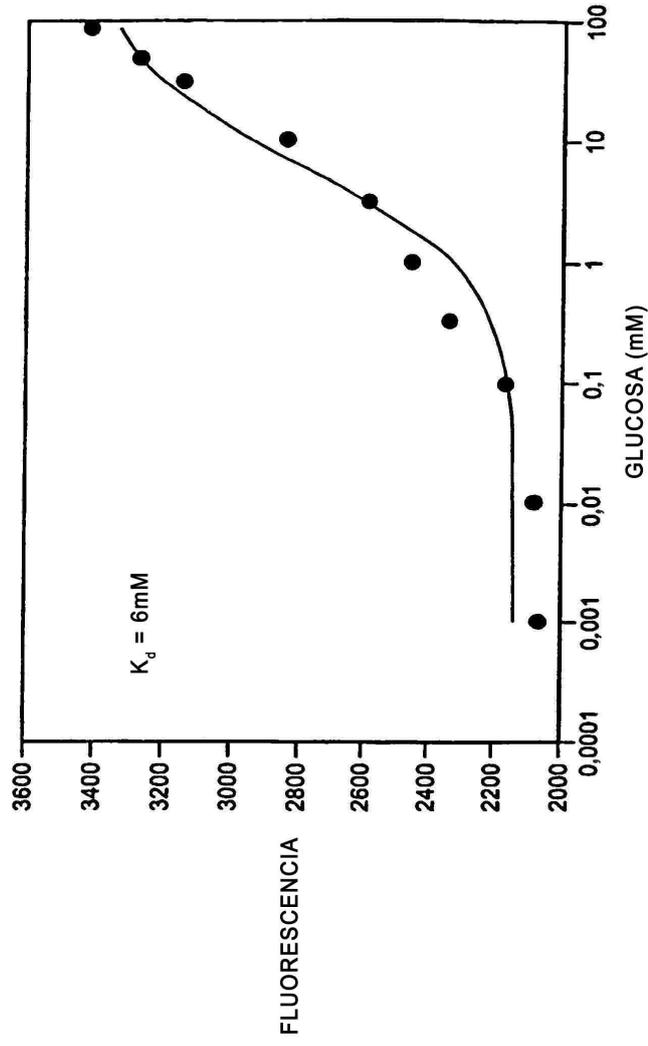
(ii) dicho marcador luminiscente tiene una longitud de onda de emisión de más de aproximadamente 600 nanómetros; o

(iii) dicho marcador luminiscente es acoplado covalentemente a dicha al menos una proteína de unión a glucosa/galactosa mediante la reacción con un miembro seleccionado entre fluoresceína, cumarinas, rodaminas, tetrametilrodamina-5-yodoacetamida (5-TMRIA), R-ficoeritrina acoplada a sal (9-(2(ó 4)-(N-(2-maleimidiletíl)-sulfonamidil)-4(ó 2)-sulfofenil)-2,3,6,7, 12, 13, 16,17-octahidro-(1H,5H,11H,15H-xanteno(2,3,4-ij:5,6,7-i'j)diquinolizín-18-io (Quantum Red®), sal 9-(2(ó 4)-(N-(2-maleimidiletíl)-sulfonamidil)-4(ó 2)-sulfofenil)-2,3,5,7,12,13,16,17-octahidro-(1H, 5H,11H,15H-xanteno(2,3,4-ij:5,6,7-i'j)diquinolizín-18-io (Texas Red®), sal 2-(5-(1-(6-(N-(2-maleimidiletíl)- amino)-6-oxohexil) - 1,3- dihidro - 3,3-dimetil-5-sulfo-2H-indol-2-iliden)-1,3-propildienil)-1-etil-3,3-dimetil-5-sulfo-3H-indolio (Cy3®) N-((2-yodo- acetoxi)etil)- N - metil) amino - 7-nitrobenzoxadiazol (IANBD), 6-acrilolil-2-dimetilaminonaftaleno (acrylodan), pireno, sal de ácido 6- amino - 2, 3-dihidro-2-(2-(yodoacetil) amino)etil)-1,3-dioxo-1H-benz(de)isoquinolin-5,8-disulfónico (amarillo Lucifer), sal 2-(5-(1-(6-(N-(2-maleimidiletíl)-amino)-6-oxohexil)-1,3-dihidro-3,3-dimetil-5-sulfo-3H-indol-2-iliden)-1,3-pentadienil)-1-etil-3,3-dimetil-5-sulfo - 3H - indolio (Cy5®), (2 - bromoacetamidoetil - sulfonamida) 4-(5-(4-dimetilaminofenil)oxazol-2-il) fenil-N-(2-bromoacetamidoetil) sulfonamida (Dapoxyl®) (2-bromoacetamido-etil) fulsfonamida, (N-(4, 4-difluoro-1, 3, 5, 7-tetrametil-4-bora-3a, 4a-diaza-s-indaceno-2-iliodo-acetamida (BODIPY® 507/545 IA), N-(4,4-difluoro-5,7-difenil-4-bora-3a, 4a-diaza-s-indaceno-3-propionil)-N-yodoacetil-etilen-diamina (BODIPY® 530/ 550 IA), ácido

5-(((2-yodacetil)-amino)etil)amino) naftalen-1-sulfónico (1,5-IAEDANS) y carboxi-X-rodamina, 5/6-yodoacetamida (XRIA 5,6).

23.- La composición de la reivindicación 19, en la que dicha matriz permeable al analito es como se define en las reivindicaciones 11 a 12.

FIG. 1



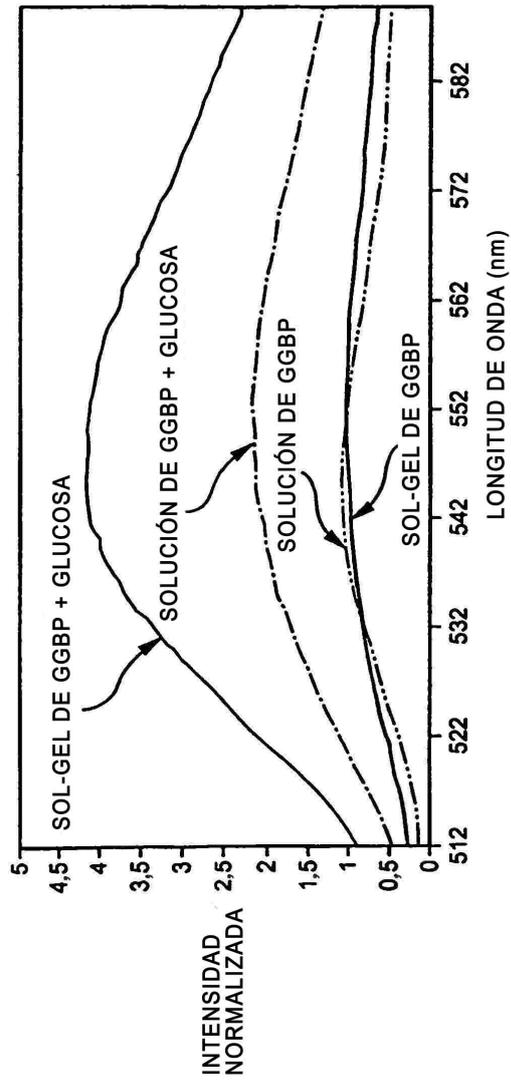


FIG.2

FIG. 3

