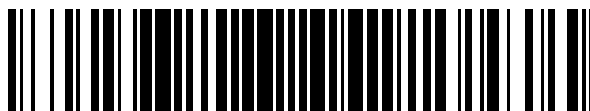


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 391 908**

51 Int. Cl.:
C30B 29/58 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07761071 .5**
96 Fecha de presentación: **20.04.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2029799**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **04.03.2009**

54 Título: **Proteínas termoestables y procedimientos de obtención y uso de las mismas**

30 Prioridad:
20.04.2006 US 745277 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
30.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
30.11.2012

73 Titular/es:
BECTON,DICKINSON AND COMPANY (100.0%)
1 BECTON DRIVE
FRANKLIN LAKES, NJ 07417, US

72 Inventor/es:
AMISS, TERRY;
GILL, ERIN y
SHERMAN, DOUGLAS

74 Agente/Representante:
CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 391 908 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).

DESCRIPCION

Proteínas termoestables y procedimientos de obtención y uso de las mismas

Antecedentes de la invención**Campo de la invención**

- 5 La presente invención se refiere a proteínas de unión de glucosa-galactosa modificadas (GGBPs), funcionales, que tienen una temperatura de fusión (T_m) mayor que una GGBP de referencia. La presente invención se refiere igualmente a ácidos nucleicos que codifican estas GGBPs termoestables, así como a procedimientos de uso de estas GGBPs termoestables.

Antecedentes de la invención

- 10 Un área de rápido avance en el desarrollo de biosensores es el uso de proteínas de unión periplásmicas (PBPs), para determinar con exactitud concentraciones de analito, por ejemplo, glucosa, en muestras biológicas. En particular, las proteínas de unión de glucosa-galactosa (GGBPs) están siendo usadas como biosensores para medir cantidades de analito en escenarios fisiológicos farmacológicos e industriales. Las PBPs se consideran que son "no reactivos" y pueden usarse en una diversidad de escenarios incluyendo la medición de glucosa en la monitorización de la diabetes, medición de aminoácidos en otras enfermedades metabólicas, tal como deficiencia de histidasa, así como la medición de arabinosa durante la producción de etanol a partir de maíz. Sin embargo, las GGBPs de tipo salvaje, no pueden ser los candidatos los más ideales para la medición o determinación de concentraciones de analito por una diversidad de razones. Los biosensores que comprenden GGBPs tendrían que ser preferiblemente físicamente estables bajo las condiciones de uso para generar una señal cuantificable durante la unión de la glucosa. Cuando el fin deseado es monitorizar *in vivo* las concentraciones de glucosa en diabéticos, las proteínas tendrían que ser preferiblemente estables a las temperaturas fisiológicas. Adicionalmente, las GGBPs deberían tener preferiblemente estabilidad potenciada en la fabricación, transporte y almacenamiento del sensor, que pudiera potencialmente facilitar y posibilitar el fabricar a temperatura ambiente la proteína y los materiales sensores. Este procedimiento de fabricación podría incluir procedimientos de esterilización a alta temperatura para uso en un escenario clínico. Sin embargo, la exposición a altas temperaturas puede desnaturalizar la proteína, volviendo inservibles a las GGBPs para su fin deseado. De acuerdo con ello, existe una necesidad de GGBPs que sean capaces de resistir temperaturas superiores al mismo tiempo que se mantengan activas, de manera tal que puedan unirse el analito y usarse en biosensores en una diversidad de escenarios de temperatura superior.

Sumario de la invención

- 30 La presente invención se refiere a una proteína de unión de glucosa-galactosa modificada (GGBPs), funcional, que es una proteína GGBP de la SEC ID NO:4, que comprende las sustituciones N39I, G82E, Q83K, N84D, Q175E, Q177H, L178M, N259E y N260S, y que tiene una temperatura de fusión superior que la GGBP de la SEC ID N:4 que tiene una temperatura de fusión (T_m) mayor que una GGBP de referencia de la SEC ID NO:4.

La presente invención se refiere igualmente a ácidos nucleicos que codifican GGBPs termoestables.

- 35 La presente invención se refiere igualmente a GGBPs modificadas, funcionales, en las que la GGBP modificada, funcional, tiene una temperatura de fusión mayor que una GGBP de referencia y en la que la GGBP modificada comprende además al menos un marcador.

Breve descripción de las secuencias en el Listado de Secuencias

La SEC ID NO:1 es la secuencia de aminoácidos de GGBP (*E. coli*) de tipo salvaje (GenBank Acceso No. 2GBP).

- 40 La SEC ID NO:2 es la secuencia de aminoácidos de GGBP (*E. coli*) de tipo salvaje (GenBank Acceso No. POAEE5).

La SEC ID NO:3 es la secuencia de aminoácidos de 3M-GGBP, la cual tiene las sustituciones de restos siguientes en comparación con la GGBP de tipo salvaje (SEC ID NO:1): E149C, A213R, y L238S.

La SEC ID NO:4 es la secuencia de aminoácidos de W183C-GGBP, la cual tiene una sustitución del resto W183C en comparación con la GGBP de tipo salvaje.

- 45 La SEC ID NO:5 es el aminoácido de un aminoácido etiqueta, útil para la purificación de péptidos, que puede agregarse a la N'-terminación de un polipéptido de interés.

La SEC ID NO:6 es el aminoácido de un aminoácido etiqueta, útil para la purificación de péptidos, que puede agregarse a la C'-terminación de un polipéptido de interés.

Breve descripción de los dibujos

La FIGURA 1 representa las curvas de estabilidad térmica de una proteína GGBP de referencia y de dos GGBPs termoestables modificadas.

5 La FIGURA 2 representa el espectro de emisión de la 3M-GGBP termoestable modificada en concentraciones crecientes de glucosa.

La FIGURA 3 representa aminoácidos representativos que pueden ser dirigidos para sustitución.

Descripción detallada de la invención

10 La presente invención se refiere a una proteína de unión periplásmica modificada, funcional (GGBPs), que es una proteína GGBP de la SEC ID NO:4, que comprende las sustituciones N39I, G82E, Q83K, N84D, Q175E, Q177H, L178M, N259E y N260S, y que tiene una temperatura de fusión superior que la GGBP de la SEC ID N:4 que tiene una temperatura de fusión (T_m) mayor que una GGBP de referencia de la SEC ID NO:4.

15 La proteína de unión de glucosa-galactosa es un elemento de la clase bien conocida de proteínas de unión periplásmicas, en el que estas proteínas se caracterizan por su configuración tridimensional (estructura terciaria), en lugar de por la secuencia de aminoácidos (estructura primaria) de la proteína. Cada elemento de la clase posee un motivo lóbulo-bisagra-lóbulo característico. Véase Dwyer, M.A. y Hellinga, H.W., *Curr. Opin. Struc. Biol.*, vol. 14, págs. 495-504, (2004). Normalmente, las PBPs se unirá a un analito específicamente en la región de hendidura entre los lóbulos de la PBP. Además, la unión de un analito en la región de hendidura dará lugar posteriormente a un cambio en la conformación de la PBP que permite que sea posible la detección del analito. En general, los cambios en la conformación de la PBP tras la unión al analito específico se caracterizan por las dos regiones lóbulo que se pliegan una con dirección a la otra alrededor y a través de la región bisagra. Véase Quiocho, F.A. y Ledvina, P.S., *Mol. Microbiol.*, vol. 20, págs. 17-25, (1996). Los ejemplos de PBPs incluyen proteína de unión de glucosa-galactosa (GGBP), proteína de unión de maltosa (MBP), proteína de unión de ribosa (RBP), proteína de unión de arabinosa (ABP), proteína de unión de dipéptido (DPBP), proteína de unión de glutamato (GluBP), proteína de unión de hierro (FeBP), proteína de unión de histidina (HBP), proteína de unión de fosfato (PhosBP), proteína de unión de glutamina (QBP), proteína de unión de leucina (LBP), proteína de unión de leucina-isoleucina-valina (LIVBP), proteína de unión de oligopéptido (OppA), o derivados de las mismas, así como otras proteínas que pertenecen a las familias de proteínas conocidas como proteína de unión periplásmica tipo I (PBP-tipo I) y proteína de unión periplásmica tipo II (PBP-tipo II).

20 Para los fines de la presente invención, una proteína de unión de glucosa-galactosa (GGBP) incluye cualquier proteína que posea estas características estructurales descritas en la presente invención y que pueda unirse específicamente a glucosa y/o galactosa.

25 En particular, la invención se refiere a la modificación de GGBPs. Una "proteína modificada" se usa para indicar que una proteína puede crearse por sustitución de uno o más aminoácidos en la estructura primaria (secuencia de aminoácidos) de una proteína o polipéptido de referencia. Los términos "proteína" y "polipéptido" se usan de manera intercambiable en la presente invención. La proteína de referencia no necesita ser una proteína de tipo salvaje, sino que puede ser cualquier proteína que esté dirigida para modificación para los fines de incrementar la estabilidad térmica. De acuerdo con ello, la proteína de referencia puede ser una proteína cuya secuencia haya sido previamente modificada con respecto a la proteína de tipo salvaje. Por supuesto, la proteína de referencia puede ser o no la proteína de tipo salvaje procedente de un organismo particular. Además, el término "proteína de tipo salvaje" incluye la proteína de tipo salvaje con o sin una "secuencia líder".

30 Las GGBPs modificadas de la presente invención son funcionales y termoestables. Tal como se usa en la presente invención, una GGBP modificada, funcional, es capaz de unión específicamente a un analito de interés. En particular, la unión del analito a la GGBP modificada debería causar los "movimientos de unión bisagra mediados por ligandos" característicos, similares a los observados cuando una GGBP de tipo salvaje se une al analito, es decir, la unión de las dos regiones lóbulo una con dirección a la otra a través de la región bisagra. Dwyer, M.A. y Hellinga, H.W., *Curr. Opin. Struc. Biol.*, vol. 14, págs. 495-504, (2004). No obstante el grado de movimiento de las regiones lóbulo no necesita ser el mismo que en la GGBP de tipo salvaje.

35 En realizaciones adicionales, los aminoácidos son dirigidos para su mutación en base a la desamidación o potencial desamidación de restos en un péptido o proteína. Tal como es sabido por un experto en la técnica, la desamidación es una reacción química en la que un grupo amida es alterado. En relación con los péptidos, la desamidación puede potencialmente degradar o destruir la funcionalidad de la proteína o péptido que contiene aminoácidos que contienen amidas. Los ejemplos de aminoácidos que contienen amidas incluyen asparagina y glutamina. En general, la desaminación ocurrirá más rápidamente al incrementarse la temperatura y el pH. De acuerdo con ello, el proceso de desaminación hace a los péptidos y proteínas susceptibles a inactivación por calor. Véase Xie, M. y Schowen, R.L., *J. Pharm. Sci.*, vol. 88, (nº. 1), págs. 8-13, (1999). En consecuencia, en una realización, los aminoácidos propensos a desaminación son dirigidos para sustitución o delección. Los procedimientos usados para determinar los aminoácidos propensos a desaminación no deberían limitar el ámbito de la presente invención. En una realización especifi-

ca, puede usarse la espectroscopia de masas por transformada de Fourier (FTMS) para medir la desaminación relativa en restos susceptibles tales como restos de asparagina.

Tal como se usa en la presente invención, los términos “corresponde(n) a” y “correspondiente a”, referidos al alineamiento de secuencias, pretenden indicar posiciones enumeradas dentro de la proteína de referencia, por ejemplo, GGBP de *E. coli* de tipo salvaje, y aquellas posiciones en la GGBP modificada que se alinean con las posiciones sobre la proteína de referencia. De acuerdo con ello, cuando la secuencia de aminoácidos de una GGBP sujeto está alineada con la secuencia de aminoácidos de una GGBP de referencia, por ejemplo, la SEC ID NO:1, los aminoácidos en la secuencia de GGBP sujeto que “corresponden a” ciertas posiciones enumeradas de la secuencia de GGBP de referencia, son aquellas que se alinean con estas posiciones de la secuencia de GGBP de referencia, pero no necesariamente en estas posiciones numéricas exactas de la secuencia de GGBP de referencia. Los procedimientos para el alineamiento de secuencias para la determinación de los aminoácidos correspondientes entre secuencias se describen más adelante.

La GGBP modificada de la presente invención es una GGBP previamente modificada que tiene una única sustitución de aminoácido de triptófano 183 a cisteína (W183C), en comparación con la GGPB (*E. coli*) de tipo salvaje, a la cual se denomina “W183C-GGBP” o “W183”. De acuerdo con ello, en esta realización, la proteína de referencia para la GGBP modificada es la W183C-GGBP que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO:4, a continuación.

```

1   ADTRIGVTIY KYDDNFMSVV RKAIEQDAKA APDVQLLMND SQNDQSKQND
5   51  QIDVLLAKGV KALAINLVDP AAAGTVIEKA RGQNVVVFV NKEPSRKALD
10  101 SYDKAYVGT  DSKESGIIQG DLIAKHWAAN QGWDLNKDGQ IQFVLLKGEP
15  151 GHPDAEARTT YVIKELNDKG IKTEQLQLDT AMCDTAQAKD KMDAWLSGPN
20  201 ANKIEVVIAN NDAMAMGAVE ALKAHNKLSI PVFGVDASPE ALALVKSGAL
25  251 AGTVLNDANN QAKATFDLAK NLADGKGAAD GTNWKIDNKV VRVPYGVGDK
30  301  DNLAEFSSK      (SEC ID NO:4)

```

La GGBP modificada comprende sustituciones en las posiciones que corresponden a los restos siguientes de la SEC ID NO:4: asparagina 39 (N39), glicina 82 (G82), glutamina 83 (Q83), asparagina 84 (N84), glutamina 175 (Q175), glutamina 177 (Q177), leucina 178 (L178), asparagina 259 (N259) y asparagina 260 (N260).

En la presente invención, cada aminoácido dirigido para modificación sobre la proteína de tipo salvaje o de referencia está modificado mediante la sustitución de un único aminoácido en el sitio dirigido, de manera tal que la una o más sustituciones ocurren de una forma de 1 en 1. Por ejemplo, una asparagina en la posición 39 de la (SEC ID NO:4) se modifica mediante la sustitución de un aminoácido diferente, por ejemplo, isoleucina.

Tal como se usa en la presente invención, la “identidad” es una medida de la identidad de secuencias de nucleótidos o de secuencias de aminoácidos comparada con una secuencia de nucleótido o de aminoácido de referencia. En general, las secuencias están alineadas de manera tal que se obtiene el orden más alto de apareamiento. La “identidad” *per se* tiene un significado reconocido en la técnica y puede calcularse usando técnicas publicadas. (Véanse, por ejemplo, *Computational Molecular Biology*, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York (1988); *Biocomputing: Informatics and Genoma Projects*, Smith, D.W., ed. Academic press, New York (1993); *Computer Analysis of Sequence Data, Part I*, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds. Human Press, New Jersey (1994); von Heinje, G., *Sequence Analysis in Molecular Biology*, Academic Press (1987); y *Sequence Analysis Primer*, Gribskov, M. y Devereux, J., eds. ; Stockton Press, New York (1991)). Aunque existen diversos procedimientos para medir la identidad entre dos secuencias de polinucleótidos o de polipéptidos, el término “identidad” es bien conocido entre los técnicos expertos (Carillo, H. y Lipton, D., *Siam J. Applied Math.* vol. 48, pág. 1073, (1988)). Los procedimientos comúnmente usados para determinar la identidad o similitud entre dos secuencias incluyen los divulgados en la *Guide to Huge Computers*, Martin J. Bishop, ed. Academic Press, San Diego (1994) y Carillo, H. y Lipton, D. *Siam J. Applied Math.* vol. 48, pág. 1073, (1988)). Igualmente, los programas de ordenador pueden contener procedimientos y algoritmos que calculan la identidad y similitud. Los ejemplos de procedimientos de programas de ordenador para determinar la identidad y similitud entre dos secuencias incluyen el paquete del programa GCG (Devereux, J., y otros, *Nucleic Acids Research*, vol. 12(i), pág. 387, (1984)), BLASTP, ExPASy, BLASTN, FASTA (Atschul, S.F., y otros, *J. Molec. Biol.*, vol. 215, pág. 403, (1990)) y FASTDB. Los ejemplos de procedimientos para determinar la identidad y similitud están expuestos por Michaels, G. y Garlan, R., en *Current Protocols in Protein Science*, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc. ((2000). En una realización de la presente invención, el algoritmo usado para determinar la identidad entre dos o más polipéptidos es BLASTP.

En otra realización de la presente invención, el algoritmo usado para determinar la identidad entre dos o más polipéptidos es FASTDB, el cual se basa en el algoritmo de Brutlag y otros (*Comp. App. Biosci.*, vol. 6, págs. 237-245, (1990)). En un alineamiento de secuencias FASTDB, las secuencias buscada y sujeto, son secuencias de aminoácidos. El resultado del alineamiento de secuencias es en porcentaje de identidad. Los parámetros que pueden usarse en un alineamiento FASTDB de secuencias de aminoácidos para calcular el porcentaje de identidad, incluyen: Matriz=PAM, k-tupla=2, Penalización por diferencias=1, Penalización por unión=20, Longitud del grupo de aleatoriedad=0, Puntuación por corte=1, Penalización por espaciado=5, Penalización por tamaño del espaciado=0,05, Tamaño de la ventana=500 o la longitud de la secuencia del aminoácido sujeto, lo que sea más corto.

Si la secuencia sujeto es más corta o más larga que la secuencia buscada debido a las adiciones o deleciones del N-terminación o C-terminación, no debido a las adiciones o deleciones internas, puede hacerse una corrección manual, dado que el programa FASTDB no tiene en cuenta los truncamientos o adiciones del N-terminación o C-terminación de la secuencia sujeto cuando se calcula el por ciento de identidad. Para las secuencias sujeto truncadas en los extremos 5' ó 3', con relación a la secuencia buscada, el por ciento de identidad se corrige calculando el número de bases de la secuencia buscada que tienen la N-terminación o C-terminación con la secuencia de referencia que no está apareada/alineada, como un por ciento de las bases totales de la secuencia buscada. Los resultados del alineamiento de secuencias mediante FASTDB determina el apareamiento/alineamiento. A continuación, se resta el por ciento de alineamiento del por ciento de identidad, calculado mediante el programa FASTDB anterior usando los parámetros especificados, para llegar a una puntuación de por ciento de identidad final. Esta puntuación corregida puede usarse para los fines de determinación de cuantos alineamientos "corresponden" entre sí, así como el por ciento de identidad. Los restos de las secuencias buscadas (sujeto) o de la secuencia de referencia que se extienden más allá del N- o C-terminación de la secuencia de referencia o sujeto, respectivamente, pueden considerarse para los fines del ajuste manual de la puntuación del por ciento de identidad. Es decir, los residuos que no están apareados/alineados con la N- o C-terminación de la secuencia de comparación pueden contarse cuando se ajuste manualmente la puntuación de por ciento de identidad o la numeración de alineamientos.

Por ejemplo, una secuencia sujeto de 90 restos de aminoácidos está alineada con una secuencia de referencia de 100 restos para determinar el por ciento de identidad. La deleción se produce en el N-terminación de la secuencia sujeto y, en consecuencia, la alineación FASTDB no muestra un apareamiento/alineamiento de los primeros 10 restos en el N-terminación. Los 10 restos no emparejados representan el 10% de la secuencia (número de restos en las N- y C-terminación no apareados/número total de restos en la secuencia buscada) de manera que el 10% se resta de la puntuación del por ciento de identidad calculada por el programa FASTDB. Si los 90 restos restantes estaban perfectamente apareados, el por ciento de identidad final sería del 90%. En otro ejemplo, se compara una secuencia sujeto de 90 restos con una secuencia de referencia de 100. Este tipo de deleciones son deleciones internas, de modo que no existen restos en la N- o C-terminación de la secuencia sujeto que no estén apareados/alineados con la buscada. En este caso, el por ciento de identidad calculado por FASTDB no se corrige manualmente.

Las GGBPs modificadas de la presente invención tienen características mejoradas, de manera notable, las GGBPs modificadas de la presente invención son termoestables o estables al calor. Los términos "termoestable" o "estable al calor" se usan en la presente invención de manera intercambiable y se usan para indicar que las GGBPs modificadas tienen una temperatura de fusión superior a la GGBP de referencia a partir de la cual se han obtenido las GGBPs modificadas. La temperatura de fusión, como el término relacionado con las proteínas, se usa en la presente invención tal como se usa en la técnica. Fundamentalmente, la temperatura de fusión es la temperatura a la cual las poblaciones de proteína plegada y no plegada en una muestra son iguales. Existen numerosos procedimientos para la determinación de la temperatura de fusión de una proteína, y la invención no debería estar limitada por los procedimientos de determinación de la temperatura de fusión de la proteína. Con la condición de que el procedimiento de determinación de la temperatura de fusión de las proteínas de referencia y modificadas sea el mismo, en ese caso, una proteína termoestable, para los fines de la presente invención, es una proteína que tiene una temperatura de fusión superior a la de la proteína de referencia. Un ejemplo de un procedimiento de medición de la temperatura de fusión de una proteína incluye el dicroísmo circular, el cual es un procedimiento espectrofotométrico que mide diferencialmente la absorción de la luz polarizada circularmente a mano izquierda y a mano derecha para monitorizar la configuración tridimensional de una proteína. Miles, A.J. y Wallace, B.A., en Chem. Soc. Rev., vol. 35, págs. 39-31, (2006), exponen procedimientos de Dicroísmo circular.

En la presente invención, el analito y la proteína de unión de glucosa-galactosa modificada actúan como parejas de unión. El término "se asocia" o "se une" tal como se usa en la presente invención, se refiere a unión específica. La afinidad de la unión específica puede evaluarse calculando una constante de unión relativa, tal como la constante de disociación en equilibrio (Kd). La Kd puede calcularse como la concentración de analito libre a la cual la mitad de la molécula de unión está unida, o viceversa. Cuando el analito de interés es glucosa, por ejemplo, los valores de Kd para las parejas de unión pueden estar entre aproximadamente 0,0001 mM hasta aproximadamente 30 mM. De acuerdo con ello, las proteínas de unión de glucosa-galactosa modificadas de la presente invención pueden usarse en un ensayo de analito *in vitro* o *in vivo*, el cual, por ejemplo, es capaz de seguir las cinéticas de las reacciones biológicas que implican a un analito, tal como glucosa, así como en ensayos clínicos. Una proteína o proteína modificada con una constante de disociación *mayor* que una proteína de referencia, significa que la unión de la proteína o proteína modificada al analito diana es *más débil*, o que la afinidad de unión de la GGBP modificada ha disminuido. Inversamente, una proteína o proteína modificada con una constante de disociación *menor* que una proteína de referencia, significa que la unión de la proteína o proteína modificada al analito diana es *más fuerte*, o que la afinidad de unión de la GGBP modificada ha aumentado. Por ejemplo, una proteína con una Kd de aproximadamente 1 mM se considera que tiene una afinidad de unión "más débil" que una proteína con una Kd de aproximadamente 0,1 mM.

De acuerdo con ello, en una realización de la presente divulgación, la afinidad de unión de la GGBP modificada frente a su pareja de unión de analito, es substancialmente la misma que la afinidad de unión de la GGBP de tipo salvaje frente a la misma pareja de unión de analito. Tal como se usa en la presente invención, el término "substancialmente la misma" comparada con la afinidad de unión, indica que las afinidades de unión medidas de la GGBP modificada y la GGBP de referencia frente a la pareja de unión de analito están dentro de un orden de magnitud de

5 cada una de ellas. Por ejemplo, si la unidad de medida usada para determinar y comparar las afinidades de unión es la constante de disociación, en ese caso, una proteína con una Kd de aproximadamente 1 mM se considera que tiene substancialmente la misma afinidad de unión que una proteína con una Kd de aproximadamente 0,1 mM, incluso teniendo en cuenta que una proteína es mediblemente más débil que la otra proteína. No obstante, a fin de que quede claro, una proteína puede tener una afinidad de unión más débil comparada con otra proteína, pero las dos proteínas tendrían todavía “substancialmente las mismas” afinidades de unión para los fines de la presente invención.

10 En otra realización, la afinidad de unión de la GGBP modificada frente a su pareja de unión se altera en comparación con la afinidad de unión de la GGBP de referencia frente a la misma pareja de unión de analito. Tal como se usa en la presente invención, una afinidad de unión se “altera” cuando las afinidades de la GGBP modificada y la GGBP de referencia frente a la misma pareja de unión de analito no están dentro del orden de magnitud de cada una de ellas. En una realización, la presente divulgación se refiere a procedimientos para la disminución de la afinidad de unión de la GGBP modificada frente a su pareja de unión de analito en comparación con la afinidad de unión de la GGBP de referencia frente al mismo analito. En otra realización, la presente divulgación se refiere a procedimientos para incrementar la afinidad de unión de la GGBP modificada frente a su pareja de analito en comparación con la afinidad de unión de la GGBP de referencia frente al mismo analito

15 Igualmente, un aspecto de la presente divulgación se refiere a procedimientos para la alteración de la afinidad de las moléculas de unión frente a sus dianas, al tiempo que se incrementa igualmente la estabilidad térmica de la GGBP modificada. En una realización, la presente divulgación se refiere a procedimientos para la disminución de la afinidad de unión de la GGBP modificada frente a una pareja de unión de analito, en comparación con la afinidad de unión de la GGBP de referencia frente a la misma pareja de unión. En otra realización, la presente divulgación se refiere a procedimientos para alterar la selectividad de la GGBP modificada, en comparación con la selectividad de la GGBP de referencia.

20 En otra realización, la respuesta a la fluorescencia, relativa, absoluta o en relación métrica, de la GGBP modificada frente a su pareja de unión, se altera en comparación con la respuesta fluorescente que puede ser relativa, absoluta o en una relación métrica de la GGBP de referencia frente a la misma pareja de unión de analito. Los procedimientos para la determinación y medición de la fluorescencia relativa están descritos por Lakowicz, J.R., en Principles of Fluorescence Spectroscopy, Second Edition, págs. 185-210, (1999), Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York. Los procedimientos para la determinación y medición de fluorescencia mediante relaciones métricas están descritos por De Lorimier, R.M., Smith, J.J., Dwyer, M.A., Looger, L.L., Sali, K.M., Paavola, C.D., Rizk, S.S., Sadigov, S., Conrad, D.W., Loew, L., y Hellinga, H.W., en “Construction of a fluorescent biosensor family”, Protein Sci., vol. 11, págs.. 2655-2675, (2002). Tal como se usa en la presente invención, la respuesta fluorescente relativa se “altera” cuando la fluorescencia de la GGBP modificada, tras la unión del analito, está más allá de un orden de magnitud de la fluorescencia de la GGBP de referencia tras la unión del mismo analito. En una realización, la presente divulgación se refiere a procedimientos de disminución de la fluorescencia de la GGBP modificada frente a su pareja de unión de analito, comparada con la fluorescencia de la GGBP de referencia frente al mismo analito. En otra realización, la presente divulgación se refiere a procedimientos para incrementar la afinidad de unión de la GGBP modificada frente a su pareja de unión de analito, comparada con la afinidad de unión de la GGBP de referencia frente al mismo analito.

25 En otra realización específica, las proteínas modificadas pueden modificarse para unir más de un analito de una manera específica. Realmente, las proteínas modificadas pueden poseer especificidad por el mismo ligando que la GGBP de referencia, además de por otro ligando diana.

30 Igualmente, las proteínas modificadas pueden ser capaces de unir únicamente uno o más analitos de los que la proteína de unión de referencia no une. Los procedimientos para la alteración de la selectividad o especificidad de la proteína han sido ya descritos. Por ejemplo, Looger, y otros, (Nature, vol. 423, (6936), págs.. 185-190, (2003)), divulga procedimientos para el re-diseño de sitios de unión dentro de proteínas de unión periplásmicas que proporcionan nuevas propiedades de unión de analitos para las proteínas. Estas proteínas de unión modificadas retienen la capacidad para llevar a cabo un cambio de conformación, el cual puede producir una señal directamente generada tras la unión al analito. Mediante la introducción de entre 5 y 17 cambios de aminoácidos, Looger y otros construyeron diversas proteínas modificadas, cada una con nuevas selectividades por el TNT (trinitrotolueno), L-lactato, o serotonina. Por ejemplo, Looger y otros, generaron proteínas de unión de L-lactato a partir de ABP, GGBP, RBP, HBP y QBP. En una realización, el dispositivo comprende una GGBP termoestable mutada a la cual se la ha realizado la ablación de la especificidad de unión a glucosa y galactosa y, como consecuencia de ello, es capaz ahora de unirse específicamente a L-lactato. En este caso, esta GGBP de referencia estaría, para los fines de la presente invención, mutada para incrementar la estabilidad térmica de la GGBP modificada, específica para L-lactato.

35 Las GGBPs termoestables modificadas pueden no necesitar estar marcadas para detectar o medir analito en una muestra. Los ejemplos de ensayos en los cuales las GGBPs termoestables, modificadas, no marcadas, de la presente invención, incluyen resonancia de plasmón de superficie (SPR) y espectroscopia Raman potenciada de superficie (SERS). En otras realizaciones, las GGBPs de referencia y las GGBPs termoestables modificadas pueden comprender además uno o más restos marcadores. Un “resto marcador”, tal como se usa en la presente invención, está destinado a indicar un compuesto químico o ion que posee o llega a poseer una señal detectable. Los marcadores usados en la presente invención pueden usarse para indicar un cambio de conformación en las regiones lóbulo

de las GGBPs. Los ejemplos de cambios en las regiones lóbulo incluyen cambios de conformación tridimensionales, cambios en la orientación de las cadenas laterales de aminoácidos de dominios de unión proteínáceos, y estados redox de los dominios de unión. Con la adición/substitución de uno o más restos dentro de la estructura primaria de una proteína, algunos de los restos marcadores usados en los procedimientos y composiciones actuales pueden unirse a través de medios químicos, tales como reacciones de reducción, oxidación, conjugación, y condensación. Los ejemplos de restos comúnmente usados para el marcado de proteínas incluyen lisina y cisteína. Por ejemplo, cualquier grupo reactivo tiol puede usarse para unir restos marcadores, por ejemplo, un fluoróforo, a una cisteína manipulada genéticamente o que se produce de manera natural, en la estructura primaria del polipéptido. La Patente de EE.UU. No. 6.855.556 describe diversas mutaciones de cisteína de PBPs. Igualmente, por ejemplo, los restos lisina pueden marcarse usando derivados de éster succinimida de fluoróforos. Véase, Richieri, G.V., y otros, J. Biol. Chem., vol. 267, págs. 23495-501, (1992).

Los restos marcadores de la presente invención pueden ser radioactivos o no radioactivos. Los ejemplos de radio-marcadores incluyen ^3H y ^{32}P , que pueden medirse con dispositivos contadores de radiación. Los ejemplos de mar-cadores no radioactivos incluyen metales de transición, iones lantánidos y otros compuestos químicos. Las señales no radioactivas incluyen pigmentos, colorantes u otros cromóforos de fluorescencia, fosforescencia, bioluminiscen-cia, electroquímicos y quimioluminiscencia que puedan observarse visualmente o medirse con un espectrofotómetro; marcadores de spin que puedan marcarse con un analizador de marcadores de spin; y marcadores fluorescentes (fluoróforos), en los que la señal de salida se genera mediante la excitación de un aducto molecular adecuado y que puede visualizarse mediante excitación con luz que es absorbida por el colorante o puede medirse con sistemas de obtención de imágenes o fluorómetros convencionales. Los ejemplos adicionales de marcadores incluyen un colo-rante fosforescente, un colorante tándem y una partícula. El marcador puede ser una sustancia quimioluminiscente, en la que la señal de salida se genera mediante la modificación química del compuesto señal; una sustancia que contiene metal; o una enzima, en la que se genera una generación de señal secundaria que depende de la enzima, tal como la formación de un producto coloreado a partir de un sustrato incoloro. El término marcador incluye igual-mente una "etiqueta" o hapteno que puede unirse selectivamente a una molécula conjugada de manera tal que la molécula conjugada, cuando se agrega posteriormente conjuntamente con un sustrato, se usa para generar una señal detectable. Por ejemplo, se puede usar biotina como un marcador y posteriormente usar un conjugado de avidina o estreptavidina de peroxidato de rábano picante (HRP) para unir al marcador de biotina y posteriormente usar un sustrato colorimétrico (por ejemplo, tetrametilbencidina (TMB)) o un sustrato fluorogénico tal como el reactivo Amplex Red (Molecular Probes, Inc.) para detectar la presencia de HRP. Numerosos marcadores son conocidos por los expertos en la técnica e incluyen partículas, fluoróforos, haptenos, enzimas y sus sustratos colorimétricos, fluorogénicos y quimioluminiscentes y otros marcadores que están descritos por Richard P. Haugland, en Molecular Probes Handbook Of Fluorescent Probes And Research Products, (9th edition, CD-ROM), Septiembre 2002).

Un fluoróforo de la presente invención es cualquier resto químico que muestra un máximo de absorción en o más allá de los 280 nm, y que cuando se une de manera covalente a una proteína, u otro reactivo, retiene sus propieda-des espectrales. Los fluoróforos de la presente invención incluyen, sin limitación, un pireno (incluyendo cualquiera de los compuestos derivados correspondientes divulgados en la Patente de EE.UU. 5.132.432), un antraceno, un nafta-leno, una acridina, un estilbeno, un indol o benzindol, un oxazol o benzoxazol, un tiazol o benzotiazol, un 4-amino-7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol (NBD), una cianina, una carbocianina (incluyendo cualquiera de los compuestos corres-pondientes en las Patentes de EE.UU. Nos. 4.981.977; 5.268.486; 5.569.587; 5.569.766; 5.486.618; 5.627.027; 5.808.044; 5.877.310; 6.002.003; 6.004.536; 6.008.373; 6.043.025; 6.127.134; 6.130.094; 6.133.445; 6.664.047; 6.974.873 y 6.977.305; las WO 02/26891, WO 97/40104, WO 99/51702, WO 01/21624; EP-A-1 065 250), un carbo-sítrilo, una porfirina, un salicilato, un antranilato, un azuleno, un perileno, una piridina, una quinoléina, un borapoli-zaindaceno (incluyendo cualquiera de los compuestos correspondientes divulgados en las Patentes de EE.UU. Nos. 4.774.339; 5.187.288; 5.248.782; 5.274.113; y 5.433.896), un xanteno (incluyendo cualquiera de los compuestos correspondientes divulgados en las Patentes de EE.UU. Nos. 6.162.931; 6.130.101; 6.229.055; 6.339.392; 5.541.343 y 6.716.979), una oxazina (incluyendo cualquiera de los compuestos correspondientes divulgados en la Patente de EE.UU. No. 4.714.763) o una benzoxacina, una carbazina (incluyendo cualquiera de los compuestos correspondientes divulgados en la Patente de EE.UU. No. 4.810.636), una fenalenona, una cumarina (incluyendo cualquiera de los compuestos correspondientes divulgados en las Patentes de EE.UU. Nos. 5.696.157; 5.459.276; 5.501.980 y 5.830.912), un benzofurano (incluyendo cualquiera de los compuestos correspondientes divulgados en las Patentes de EE.UU. Nos. 4.603.209 y 4.849.362) benzfenalenona (incluyendo cualquiera de los compuestos correspondientes divulgados en la Patente de EE.UU. No. 4.812.409) y derivados de los mismos. Tal como se usa en la presente invención, las oxazinas incluyen resorufinas (incluyendo cualquiera de los compuestos correspondien-tes divulgados en la 5.242.805), aminoxazinonas, diaminoxazinonas, y sus análogos benzo-substituidos. Los restos marcadores adicionales incluyen los compuestos que están descritos en la Solicitud Publicada de los EE.UU. No 2006/0280652 y la WO 2006/025887.

Cuando el fluoróforo es un xanteno, el fluoróforo es opcionalmente una fluoresceína, un rodol (incluyendo cualquiera de los compuestos correspondientes divulgados en las Patentes de EE.UU. Nos. 5.227.487 y 5.442.045), o una rodamina (incluyendo cualquiera de los compuestos correspondientes de las Patentes de EE.UU. Nos. 5.798.276; 5.486.737 y 6.562.632). Tal como se usa en la presente invención, la fluoresceína incluye benzo o dibenzofluoresceínas, seminaftofluoresceínas, o naftofluoresceínas. De manera similar, tal como se usa en la presente invención, el rodol incluye seminaftorodafluoros (incluyendo cualquiera de los compuestos correspondientes divulgados en la Patente de EE.UU. No. 4.945.171). Como alternativa, el fluoróforo es un xanteno que se une mediante una unión

que es un enlace covalente sencillo en la posición 9 del xanteno. Los xantenos preferidos incluyen derivados de 3H-xanten-6-ol-3-ona unida en la posición 9, derivados de 6-amino-3H-xanten-3-ona unidos en la posición 9, o derivados de 6-amino-3H-xanten-3-imina unidos en la posición 9.

Los fluoróforos para uso en la presente invención incluyen xanteno (rodol, rodamina, fluoresceína y derivados de los mismos), cumarina, cianina, pireno, oxazina y boropoliazaindaceno. Los más preferidos son xantenos sulfonados, xantenos fluorados, cumarinas sulfonadas, cumarinas fluoradas y cianinas sulfonadas. La elección del fluoróforo determinará la absorción y propiedades de emisión de fluorescencia de la GGBP u otro complejo de reactivo marcador. Las propiedades físicas de un marcador fluoróforo incluyen características espectrales (absorción, emisión y activador de desplazamiento), intensidad de fluorescencia, tiempo de vida, polarización y proporción de fotoblanqueado, todas las cuales pueden usarse para distinguir un fluoróforo de otro.

Típicamente, el fluoróforo contiene uno o más anillos aromáticos o heteroaromáticos, que están opcionalmente sustituidos una o dos veces por una diversidad de sustituyentes, incluyendo pero sin limitación, halógeno, nitro, ciano, alquilo, perfluoroalquilo, alcoxi, alquenoilo, alquinilo, cicloalquilo, arilalquilo, acilo, sistema de anillo arilo o heteroarilo, benzo, u otros sustituyentes típicamente presentes sobre fluoróforos conocidos en la técnica.

Los ejemplos específicos de marcadores fluoróforos están seleccionados entre el grupo que consiste en fluoresceína, cumarinas, rodaminas, 5-TMRIA (tetrametilrodamina-5-yodoacetamida), (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'))diquinolizina-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-ilideno)-1,3-propildienil)-1-etil-3,3-dimetil-5-sulfo-3H-indolio) (CyTM3), N,N'-dimetil-N-(yodoacetil)-N'-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il)etilenodiamina (IANBD amida), N-((2-(yodoacetoxi)etil)-N-(metil)amino-7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol (IANBD éster), 6-acrilolil-2-dimetilaminonaftaleno (acrylodan), pireno, sal del ácido 6-amino-2,3-dihidro-2-(2-((yodoacetil)amino)etil)-1,3-dioxo-1H-benz(de)isoquinoleino-5,8-disulfónico (amarillo Lucifer), 2-(5-(1-(6-(N-(2-maleimidiletil)-amino)-6-oxohexil)-1,3-dihidro-3,3-dimetil-5-sulfo-2H-indol-2-ilideno)-1,3-pentadietil)-1-etil-3,3-dimetil-5-sulfo-3H-indolio (CyTM5), 4-(5-(4-dimetilaminofenil)oxazol-2-il)fenil-N-(2-bromoacetamidoetil)sulfonamida (Dapoxyl[®] (2-bromoacetamidoetil)sulfonamida)), (N-(4,4-difluoro-1,3,5,7-tetrametil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno-2-il)-yodoacetamida (BODIPY[®] 507/545 IA), (N-(4,4-difluoro-5,7-difenil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno-32propionil)-N-yodoacetiletilenodiamina (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). Otro ejemplo de marcador es BODIPY-FL-hidracida. Otros marcadores luminiscentes incluyen lantánidos tal como europio (Eu³⁺) y terbio (Tb³⁺), así como complejos de metal-ligando de rutenio [Ru(II)], renio [Re(I)], u osmio [Os(II)], típicamente en complejos con ligandos diimina tal como fenantrolina. La Solicitud de EE.UU. No. de Serie 11/131.283 divulga fluoróforos adicionales que pueden ser útiles para la presente invención.

Además de los fluoróforos, las enzimas encuentran igualmente uso como marcadores. Las enzimas son marcadores deseables debido a que puede obtenerse amplificación de la señal detectable, dando como resultado un incremento de sensibilidad del ensayo. La propia enzima no produce una señal detectable pero es capaz de generar una señal, por ejemplo, mediante la conversión de un sustrato para producir una señal detectable, tal como una señal fluorescente, colorimétrica o luminiscente. Las enzimas amplifican la señal detectable dado que una enzima sobre un reactivo marcador puede dar como resultado la conversión de múltiples sustratos en una señal detectable. Esto es ventajoso cuando existe una baja cantidad de diana presente en la muestra o no existe un fluoróforo que produzca una señal comparable o más fuerte que la enzima. El sustrato de enzima se selecciona para proporcionar el producto medible, por ejemplo, colorimétrico, fluorescente o quimioluminiscente. Dichos sustratos se usan ampliamente en la técnica, muchos de los cuales se describen en el Molecular Probes Handbook, *supra*.

En una realización específica, una combinación de sustrato colorimétrico o fluorógeno usa oxidoreductasas tal como peroxidasa de rábano picante y un sustrato tal como 3,3'-diaminobencidina (DAB) y 3-amino-9-etilcarbazol (AEC), lo cual proporciona un color distinguible (pardo y rojo, respectivamente). Otros sustratos oxidoreductasa colorimétricos que proporcionan productos detectables incluyen: ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS), o-fenilendiamina(ODP), 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB), o-dianisidina, ácido 5-aminosalicílico, 4-cloro-1-naftol. Los sustratos fluorógenos incluyen ácido homovainílico o ácido 4-hidroxi-3-metoxifenilacético, fenoxacinas reducidas y benzotiacinas reducidas, incluyendo reactivo Ampex[®] Red y sus variantes (Patente de EE.UU. No. 4.384.042) y dihidroxiantenos reducidos, incluyendo dihidrofluoresceínas (Patente de EE.UU. No. 6.162.931) y dihidrorodaminas incluyendo dihidrorodamina 123. Los sustratos de peroxidasa que son tiramidas (Patentes de EE.UU. Nos. 5.196.306; 5.583.001 y 5.731.158) representan una clase única de sustratos de peroxidasa, dado que ellos pueden ser intrínsecamente detectables antes de la acción de la enzima pero están "preparados para actuar" mediante la acción de una peroxidasa en el procedimiento descrito como amplificación de la señal de tiramida (TSA). Estos sustratos son ampliamente usados para marcar dianas en muestras que son células, tejidos o matrices para su posterior detección mediante microscopía, citometría de flujo, escaneado óptico y fluorometría.

Otra combinación de sustrato colorimétrico preferido (y en algunos casos fluorógeno) y enzima usa una enzima fosfatasa tal como una fosfatasa ácida, una fosfatasa alcalina o una versión recombinante de una de dichas fosfatasas en combinación con un sustrato colorimétrico tal como fosfato de 5-bromo-6-cloro-3-indolilo (BCIP), fosfato de 6-cloro-3-indolilo, fosfato de 5-bromo-6-cloro-3-indolilo, fosfato de *p*-nitrofenilo, o fosfato de *o*-nitrofenilo o con un sustrato fluorógeno tal como fosfato de 4-metilumbeliferilo, fosfato de 6,8-difluoro-7-hidroxi-4-metilcumarinilo (DIF-MUP, Patente de EE.UU. No. 5.830.912), difosfato de fluoresceína, fosfato de 3-O-metilfluoresceína, fosfato de reso-

rufina, fosfato de 9H-(1,3-dicloro-9,9-dimetilacridin-2-ona-7-ilo) (DDAO fosfato), o ELF97, ELF39 o fosfatos relacionados (Patentes de EE.UU. Nos. 5.316.906 y 5.443.986).

Las enzimas adicionales incluyen hidrolasas tales como colinesterasas y peptidasas, oxidasas tal como citocromo oxidadas, y reductasas para las cuales se conocen los substratos adecuados. Las realizaciones específicas comprenden enzimas y sus substratos apropiados para producir una señal quimioluminiscente, tal como formas naturales y recombinantes de luciferasas y equorinas. Los substratos que producen quimioluminiscencia para fosfatasas, glucosidasas y oxidasas tales como los que contienen dioxetanos estables, luminol, isoluminol y ésteres de acridinio son adicionalmente útiles.

Las realizaciones adicionales comprenden haptenos tales como biotina. La biotina es útil dado que puede funcionar en un sistema de enzima para amplificar adicionalmente la señal detectable, y puede funcionar como una etiqueta a usar en cromatografía de afinidad para fines de aislamiento. Para fines de detección, se usa un conjugado de enzima que tiene afinidad por la biotina, tal como avidina-HRP. Posteriormente se agrega un substrato de peroxidasa para producir una señal detectable.

Los haptenos incluyen igualmente hormonas, fármacos que se producen de manera natural y sintéticos, polucionantes, alérgenos, moléculas afectoras, factores de crecimiento, quimiocinas, citocinas, linfocinas, aminoácidos, péptidos, productos intermedios químicos y nucleótidos.

Las proteínas fluorescentes pueden igualmente usarse como marcadores para el marcado de reactivos de la presente invención. De acuerdo con ello, en una realización específica, la GGBP de referencia es una proteína de fusión que comprende una GGBP funcional y una proteína fluorescente, en la que la proteína fluorescente actúa como al menos un marcador. Las GGBPs funcionales termoestables modificadas comprenderían, a su vez, una proteína fluorescente. En otra realización, las proteínas modificadas de la presente invención pueden comprender más de dos, tres, cuatro o más proteínas fluorescentes. Si las proteínas de fusión de la presente invención contienen más de una proteína fluorescente, las proteínas fluorescentes pueden ser o no químicamente idénticas. Las proteínas fluorescentes están fácilmente reconocidas en la técnica. Los ejemplos de proteínas fluorescentes que son parte de proteínas de fusión de la presente invención incluyen proteínas fluorescentes verdes (GFP, AcGFP, ZsGreen), GFP enrojecida (rs-GFP), proteínas fluorescentes rojas (RFP, incluyendo DsRed2, HcRed1, deRed-Express), proteínas fluorescentes amarillas (YFP, ZsYellow), proteínas fluorescentes ciano (CFP, AmCyan), una proteína fluorescente azul (BFP) y las ficobiliproteínas, así como las versiones y mutaciones potenciadas de estas proteínas. Para algunas proteínas fluorescentes la potenciación indica optimización de emisión mediante el incremento del brillo de las proteínas o mediante la creación de proteínas que tienen maduración cromófora más rápida. Estas potenciaciones puede lograrse mediante mutaciones por manipulación genética en las proteínas fluorescentes.

Las proteínas fluorescentes, especialmente ficobiliproteína, son particularmente útiles para la creación de reactivos marcadores de marcado con colorante tándem. Por ello, en una realización de la presente invención, la señal medible de la proteína de fusión es realmente una transferencia de energía de excitación (transferencia de energía de resonancia) desde una molécula donante hasta una molécula aceptora. En particular, la transferencia de energía de resonancia está en la forma de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET). Cuando las proteínas modificadas de la presente invención usan FRET para medir o cuantificar analito(s), la proteína de fusión puede ser el donante o el aceptor. Los términos "donante" y "aceptor", cuando se usan en relación con FRET son fácilmente entendidos en la técnica. Fundamentalmente, un donante es la molécula que absorberá un fotón de luz y, posteriormente, inicia la transferencia de energía a la molécula aceptora. La molécula aceptora es la molécula que recibe la transferencia de energía iniciada por el donante y, a su vez, emite un fotón de luz. La eficacia de la FRET depende de la distancia entre las dos parejas fluorescentes y puede expresarse matemáticamente mediante: $E = R_0^6 / (R_0^6 + r^6)$, en la que E es la eficacia de transferencia de energía, r es la distancia (en Angstroms) entre la pareja donante/aceptora fluorescente y R_0 es la distancia Förster (en Angstroms). La distancia Förster, la cual puede determinarse experimentalmente mediante técnicas fácilmente disponibles en la técnica, es la distancia a la cual la FRET es la mitad del valor FRET máximo posible para un par donante/aceptor dado. Una combinación particularmente útil es las ficobiliproteínas divulgadas en las Patentes de EE.UU. Nos. 4.520.110; 4.859.582; 5.055.556 y los fluoróforos de sulforodamina divulgados en la 5.798.276, o los fluoróforos cianino sulfonados divulgados en las Patentes de EE.UU. Nos. 6.977.305 y 6.974.873; o los derivados xanteno sulfonados divulgados en la 6.130.101 y las combinaciones divulgadas en la Patente de EE.UU. 4.542.104.

Otros tipos de proteínas de fusión incluyen fusiones con señales de secreción y otras regiones funcionales heterólogas. Así, por ejemplo, una región de aminoácidos adicionales, particularmente aminoácidos cargados, puede agregarse al N-terminación de la proteína para mejorar la estabilidad y persistencia en la célula huésped, durante la purificación o durante la posterior manipulación y almacenamiento. Igualmente, puede agregarse una región a la proteína para facilitar la purificación. Por ejemplo, la proteína de referencia y/o la proteína termoestable pueden comprender "etiquetas de histidina" (etiquetas his) o "etiquetas de lisina". Los ejemplos de etiquetas de histidina incluyen hexaH, heptaH y hexaHN. Los ejemplos adicionales de etiquetas de purificación están divulgados por Waugh, D.S. en *Trends in Biotechnology*, vol. 23, (nº. 6), págs. 316-320, (Junio 2005), y Gaberc-Porekar V. y Mernart, V., *J. Biochem. Biophys. Methods*, vol. 49, págs. 335-336, (2001). Los ejemplos de etiquetas de lisina incluyen pentaL, heptaL, y FLAG. Los ejemplos adicionales de etiquetas de solubilidad están igualmente divulgados por Waugh, D.S. en *Trends in Biotechnology*, vol. 23, (nº. 6), págs. 316-320, (Junio 2005). Dichas regiones pueden ser separadas antes de la preparación final de la proteína. La adición de restos péptidos a las proteínas, tanto sea para

engendrar la secreción como la excreción, para mejorar la estabilidad y para facilitar la purificación, entre otras, es una técnica familiar y rutinaria en la técnica y puede incluir la modificación de aminoácidos en la terminación a fin de acomodar las etiquetas. Por ejemplo, en la SEC ID Nos: 3 y 4, el aminoácido C-terminación (lisina) puede modificarse, por ejemplo, a arginina y serina, para acomodar una etiqueta. Por supuesto, los restos aminoácidos del N-terminación pueden modificarse igualmente a fin de acomodar las etiquetas. Una proteína de fusión particularmente útil comprende una región heteróloga procedente de inmunoglobulina que puede usarse para solubilizar proteínas. Por ejemplo, el Documento EP-A 0 646 533 divulga proteínas de fusión que comprenden diversas porciones de región constante de moléculas de inmunoglobulina conjuntamente con otra proteína humana o parte de la misma. En muchos casos, la parte Fc en una proteína de fusión es completamente ventajosa para uso en terapia y diagnóstico y, en consecuencia, da como resultado, por ejemplo, propiedades farmacocinéticas mejoradas (Documento EP-A 0 232 262). Por otra parte, para algunos usos, sería deseable ser capaces de eliminar la parte Fc después de que la proteína de fusión ha sido expresada, detectada y purificada de la manera ventajosa descrita.

Las proteínas de fusión pueden recuperarse y purificarse a partir de cultivos de células recombinantes mediante procedimientos bien conocidos, incluyendo precipitación con etanol o sulfato amónico, extracción ácida, cromatografía de intercambio aniónica o catiónica, cromatografía de fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad, por ejemplo, cromatografía de afinidad de metal inmovilizado (IMAC), cromatografía de hidroxilapatito y cromatografía de lecitina. La cromatografía líquida de alta eficacia ("HPLC") puede igualmente usarse para purificación. Pueden usarse técnicas bien conocidas de replegado de proteínas para regenerar una conformación activa cuando la proteína de fusión se ha desnaturalizado durante el aislamiento y/o purificación.

Las proteínas de fusión incluyen productos de procedimientos de síntesis química y productos producidos mediante técnicas recombinantes a partir de un huésped procariótico o eucariótico, incluyendo, por ejemplo, células bacterianas, de levadura, plantas superiores, insectos y mamíferos. Dependiendo del huésped usado en un procedimiento de producción recombinante, las proteínas de fusión pueden ser glucosiladas o pueden ser no glucosiladas. Además, las proteínas de fusión pueden incluir igualmente un resto metionina modificado inicial. En algunos casos, como un resultado de procedimientos mediados por huéspedes.

Igualmente, las GGBPs termoestables modificadas pueden modificarse, tanto por procedimientos naturales, tal como transformación post-traducción, como por técnicas de modificación químicas, las cuales son bien conocidas en la técnica. Dichas técnicas se encuentran bien descritas en textos básicos y más detalladamente en monografías, así como en la voluminosa literatura de investigación. Pueden producirse modificaciones en cualquier parte de la cadena polipéptida, incluyendo la cadena principal péptida, las cadenas laterales de aminoácidos y las terminaciones amino o carboxilo. Es de señalar que el mismo tipo de modificación puede estar presente en el mismo grado o en grados variables en diversos sitios en un polipéptido o proteína dada. Igualmente, una proteína o polipéptido dado puede contener más de una modificación. Los ejemplos de modificaciones incluyen glucosilación, acetilación, acilación, ADP-ribosilación, amidación, unión covalente de flavina, unión covalente de un resto hemo, unión covalente de un nucleótido o derivado de nucleótido, unión covalente de un lípido o derivado lípido, unión covalente de fosfatidilinositol, reticulación, ciclación, formación de enlace disulfuro, desmetilación, formación de reticulaciones covalentes, formación de cisteína, formación de piroglutamato, formilación, gamma-carboxilación, glucosilación, formación de anclaje GPI, hidroxilación, yodación, metilación, miristilación, oxidación, transformación proteolítica, fosforilación, prenilación, racemización, selenolilación, sulfatión, adición mediada por ARN-transfer de aminoácidos a proteínas tal como arginilación, y ubiquinación. Los polipéptidos o proteínas pueden igualmente estar ramificados como un resultado de la ubiquinación, y pueden ser cíclicos, con o sin ramificación. (Véanse, por ejemplo, T.E. Creighton, Proteins-Structure And Molecular Properties, 2nd Ed., W.H. Freeman and Company, New York (1993); Wold, F., "Post-translational Protein Modifications Perspectives and Prospects", en Posttranslational Covalent Modification Of Proteins, B.C. Johnson, Ed. Academic Press, New York (1983); Seifter y otros, Methods in Enzymol., vol. 182, págs. 626-646, (1990) y Rattan y otros, Ann NY Acad. Sci., vol. 663, págs. 48-62, (1992).

Las proteínas de referencia de la presente invención pueden modificarse mediante técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica. Los ejemplos de dichas técnicas incluyen mutagénesis y síntesis directa de las proteínas modificadas.

Las proteínas termoestables modificadas de la presente invención pueden aislarse. Tal como se usa en la presente invención, una "proteína aislada" está destinada a indicar una proteína que ha sido completamente o parcialmente separada de su entorno nativo. Por ejemplo, los polipéptidos que han sido separados o purificados a partir de las células se consideran aislados. Además, las moléculas de polipéptidos producidas de manera recombinante contenidos en células huésped se consideran aisladas para los fines de la presente invención. De manera similar, los que han sintetizados se consideran que son proteínas aisladas.

La invención se refiere igualmente a ácidos nucleicos aislados y a constructos que comprenden estos ácidos nucleicos. Los ácidos nucleicos de la invención pueden ser ADN o ARN, por ejemplo ARNm. Las moléculas de ácido nucleico pueden ser de doble hebra o mono-hebra; el ADN o ARN mono-hebra puede ser la hebra de codificación, o de sentido o la hebra de no codificación, o anti-sentido. En particular, los ácidos nucleicos pueden codificar el polipéptido de la invención. Si se desea, la secuencia de nucleótido del ácido nucleico aislado puede incluir secuencias de no codificación adicionales tales como secuencias 3' y 5' de no codificación (incluyendo secuencias reguladoras, por ejemplo). Adicionalmente, los ácidos nucleicos de la invención pueden usarse como un ácido nucleico que comprende una secuencia marcadora, por ejemplo, una secuencia de nucleótido que codifica un polipéptido para ayudar al

aislamiento o purificación del polipéptido. Las secuencias representativas incluye las que codifican una proteína de fusión glutatona-S-transferasa (GST), una poli-histidina (por ejemplo, His₆), poli-HN, poli-lisina, hemaglutinina, HSV-Tag, por ejemplo.

5 Las moléculas de ácido nucleico de la invención están "aisladas". Tal como se usa en la presente invención, una molécula de ácido nucleico "aislada" o secuencia de nucleótido está destinada a indicar una molécula de ácido nucleico o secuencia de nucleótido que no está flanqueada por secuencias de nucleótidos que normalmente flanquean el gen o secuencia de nucleótido (como en las secuencias genómicas) y/o han sido completamente o parcialmente separadas de su entorno nativo (por ejemplo, célula, tejido). Por ejemplo, un ácido nucleico aislado de la presente invención puede estar substancialmente aislado con respecto al medio celular complejo en el cual se produce de manera natural. En algunos casos, el material aislado formará parte de una composición (por ejemplo, un extracto bruto conteniendo otras substancias), sistema tampón o mezcla de reactivo. En otras circunstancias, el material puede purificarse hasta homogeneidad esencial, por ejemplo determinada mediante PAGE o cromatografía de columna tal como HPLC. Así, una molécula de ácido nucleico aislada o secuencia de nucleótido puede incluir una molécula de ácido nucleico o secuencia de nucleótido que esté químicamente sintetizada, usando tecnología de ADN recombinante o usando cualquier otro procedimiento adecuado. De acuerdo con ello, un ácido nucleico recombinante contenido en un vector está incluido en la definición de "aislado" tal como se usa en la presente invención. Igualmente, las secuencias de nucleótidos aislados incluyen moléculas de ácido nucleico recombinantes (por ejemplo, ADN, ARN) en organismos heterólogos, así como ácido nucleicos parcialmente o substancialmente purificados en solución. Los transcritos de ARN tanto *in vivo* como *in vitro* de una molécula de ADN de la presente invención están igualmente abarcados por las secuencias de nucleótido "aisladas".

La divulgación abarca igualmente variaciones de las secuencias de nucleótidos de la invención, tales como las que codifican fragmentos funcionales o derivados funcionales de los polipéptidos tal como se describen más adelante. Dichas variaciones pueden producirse de manera natural o producirse de manera no natural, tales como las inducidas por diversos mutagenes y procedimientos mutagénicos. Las variaciones a las que se destinan incluyen adición, 25 delección y sustitución de uno o más nucleótidos, lo que puede dar como resultado cambios de aminoácidos conservadores o no conservadores, incluyendo adiciones y delecciones. En un aspecto, las variaciones de las moléculas de ácido nucleico y proteínas comprenden modificaciones dentro del dominio de unión que son silentes o conservadas; es decir, la modificación no altera de manera substancial las características o actividad del polipéptido codificado con relación a las GGBPs termoestables modificadas de la presente invención. En otra realización, las variaciones de las moléculas de ácido nucleico y las proteínas comprenden modificaciones dentro del dominio de unión que no son silentes o conservadas; es decir, la modificación puede alterar de manera substancial las características o actividad del polipéptido codificado con relación a las GGBPs termoestables modificadas de la presente invención.

La divulgación descrita en la presente invención se refiere igualmente a fragmentos de las moléculas de ácido nucleico aisladas descritas en la presente invención. El término "fragmento" pretende abarcar una porción de una secuencia de nucleótido descrita en la presente invención, la cual es desde al menos aproximadamente 25 nucleótidos contiguos hasta al menos aproximadamente 50 nucleótidos contiguos o mayor de longitud. Dichos fragmentos pueden ser útiles como sondas y cebadores. En particular, los cebadores y sondas pueden hibridarse de manera selectiva a la molécula de ácido nucleico que codifica los polipéptidos descritos en la presente invención. Por ejemplo, los 40 fragmentos que codifican polipéptidos que retienen actividad, tal como se describe más adelante, son particularmente útiles.

La divulgación abarca igualmente moléculas de ácido nucleico que se hibridan bajo condiciones de hibridación de alta restricción, tal como hibridación selectiva, a las secuencias de nucleótidos descritas en la presente invención (por ejemplo, moléculas de ácido nucleico que se hibridan específicamente a una secuencia de nucleótido que codifica polipéptidos descritos en la presente invención y codifica una GGBP termoestable). Las sondas de hibridación incluyen oligonucleótidos sintéticos que se unen de una manera específica de la base a una hebra complementaria de ácido nucleico. Las sondas adecuadas incluyen ácidos nucleicos de polipéptidos, tal como se describe por Nielsen y otros, en Science, vol. 254, págs.1497-1500, (1991).

Dichas moléculas de ácido nucleico pueden detectarse y/o aislarse mediante hibridación específica, por ejemplo, bajo condiciones de alta restricción. "Condiciones de restricción" para la hibridación es un término de la técnica que se refiere a las condiciones de incubación y lavado, por ejemplo, condiciones de temperatura y concentración de tampón, que permiten la hibridación de un ácido nucleico particular a un segundo ácido nucleico; el primer ácido nucleico puede ser perfectamente complementario, es decir, 100%, respecto del segundo, o el primero y el segundo pueden compartir algún grado de complementariedad que sea menos que perfecta, por ejemplo, 60%, 75%, 85%, 95% o más. Por ejemplo, pueden usarse ciertas condiciones de restricción que distingan ácidos nucleicos perfectamente complementarios de los de menos complementariedad.

Las "condiciones de alta restricción", "condiciones de moderada restricción" y "condiciones de baja restricción" para hibridaciones de ácido nucleico se encuentran explicadas en Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, (1988). Las condiciones exactas que determinan la restricción de la hibridación dependen no solamente de la fuerza iónica, por ejemplo 0,2 x SSC, 0,1 x SSC de los tampones de lavado, la temperatura, por ejemplo, temperatura ambiente, 42°C, 68°C, y la concentración de los agentes de desestabilización tales como formamida o agentes de desnaturalización tal como SDS, sino además de factores tales como la longitud de la secuencia del ácido nucleico,

la composición base, el por ciento de diferencias entre secuencias de hibridación y la frecuencia de aparición de subconjuntos de dicha secuencia dentro de otras secuencias no idénticas. De acuerdo con ello, las condiciones de alta, moderada o baja restricción pueden determinarse empíricamente.

5 Mediante la variación de las condiciones de hibridación desde un nivel de restricción en el cual no se produce la hibridación hasta un nivel en el cual se observa por primera vez la hibridación, pueden determinarse las condiciones que permitirán a una secuencia dada hibridarse con las secuencias las más similares.

Las condiciones a modo de ejemplo se encuentran descritas por Krause, M.H., y S.A. Aaronson, en Methos in Enzymology, vol. 200, págs. 546-556, (1991). El lavado es la etapa en la cual usualmente se establecen las condiciones con el fin de determinar un nivel mínimo de complementariedad de los híbridos. Generalmente, partiendo de la temperatura la más baja a la cual únicamente se produce la hibridación de homólogos, cada grado (°C) en que se reduce la temperatura de lavado final, al mismo tiempo que se mantiene constante la concentración de SSC, permite un incremento de 1% en la extensión máxima de desapareamiento entre las secuencias que se hibridan. Generalmente, duplicando la concentración de SSC se produce un incremento en T_m. Usando estas directrices, la temperatura de lavado puede determinarse empíricamente para alta, moderada o baja restricción, dependiendo del nivel de desapareamiento pensado. Los ejemplos de condiciones de alta restricción incluyen la hibridación en formamida al 50%, NaCl 1 M, SDS al 1% a 37°C, y un lavado en 0,1 x SSC a 60°C. El ejemplo de condiciones de restricción progresivamente más alta incluye, después de hibridación, el lavado con 0,2 x SSC, y SDS al 0,1% a aproximadamente 42°C (condiciones de moderada restricción); y el lavado con 0,1 x SSC a aproximadamente 68°C (condiciones de alta restricción). El lavado puede llevarse a cabo usando únicamente una de estas condiciones, por ejemplo, condiciones de alta restricción, el lavado puede abarcar dos o más de las condiciones de restricción con el fin de incrementar la restricción. Las condiciones óptimas variarán, dependiendo de la reacción de hibridación particular implicada, y puede determinarse empíricamente.

Pueden determinarse condiciones equivalentes variando uno o más de los parámetros dados como un ejemplo, tal como es sabido en la técnica, al mismo tiempo que se mantiene un grado similar de identidad o de similitud entre la molécula de ácido nucleico diana y el cebador o sonda usada. Las secuencias de nucleótidos hibridables son útiles como sondas y cebadores para la identificación de organismos que comprenden un ácido nucleico de la invención y/o para aislar un ácido nucleico de la invención, por ejemplo. El término "cebador" tal como se usa en la presente invención y como se hace en la técnica, se refiere a un oligonucleótido mono-hebra que actúa como un punto de iniciación de síntesis de ADN dirigido por molde bajo condiciones apropiadas en un tampón apropiado a una temperatura adecuada. La longitud apropiada de un cebador depende del uso al que se destina el cebador, pero típicamente varía desde aproximadamente 15 hasta aproximadamente 30 nucleótidos. Las moléculas de cebador más cortas requieren, generalmente, temperaturas más frías para formar complejos híbridos suficientemente estables con el molde. Un cebador no necesita reflejar la secuencia exacta del molde, pero debe ser lo suficientemente complementaria como para hibridarse con un molde. El término "sitio cebador" se refiere al área del ADN diana al cual se hibrida un cebador. El término "par cebador" se refiere a un conjunto de cebadores que incluyen un cebador 5' (más arriba) que se hibrida con el extremo 5' de la secuencia de ADN a amplificar y un cebador 3' (más abajo) que se hibrida con el complemento del extremo 3' de la secuencia a amplificar.

Los ácidos nucleicos descritos en la presente invención pueden amplificarse mediante procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la amplificación puede llevarse a cabo mediante la reacción de cadena de la polimerasa (PCR). Véase, PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification (ed. H.A. Erlich, Freeman Press, NY, N.Y., 1992); PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (eds. Innis, et al. Academic Press, San Diego, Calif., 1990); Mattila y otros, Nucleic Acids Res., vol. 19, pág. 4967, (1991); Eckert y otros, PCR Methods and Applications, vol. 1, pág. 17, (1991); PCR (eds. McPherson et al., IRL Press, Oxford); y Patente de EE.UU. No. 4.683.202. Otros procedimientos de amplificación adecuados incluyen la reacción de cadena de ligasa (LCR) (véase, Wu y Wallace, Genomics, vol. 4, pág. 560, (1989), Landegren y otros, Science, vol. 241, pág. 1077, (1988)), amplificación por transcripción (Kwoh y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 86, pág. 1173, (1989)), replicación de secuencias auto-sostenidas (Guatelli y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 87, pág. 1874, (1990)) y amplificación de secuencias a base de ácido nucleico (NASBA).

La presente invención se refiere igualmente a vectores que incluyen moléculas de ADN de la presente invención, células huéspedes que están manipuladas genéticamente con vectores de la invención y la producción de proteínas de la invención mediante técnicas recombinantes.

De acuerdo con este aspecto de la invención, el vector puede ser, por ejemplo, un vector plásmido, un vector fago mono-hebra o de doble hebra, o un vector vírico de ADN o ARN mono o doble hebra. Dichos vectores pueden introducirse dentro de las células como polinucleótidos, preferiblemente ADN, mediante técnicas bien conocidas para la introducción de ADN o ARN dentro de células. Los vectores víricos pueden ser competentes para replicación o defectuosos para replicación. En este último caso, la propagación vírica se producirá generalmente únicamente en células huéspedes de complementarias.

Entre los vectores preferidos, en ciertos aspectos, se encuentran los usados para la expresión de polinucleótidos y proteínas de la presente invención. Generalmente, dichos vectores comprenden regiones de control de actuación cis eficaces para expresión en un huésped operativamente ligado al polinucleótido a expresar. Los factores de actuación trans apropiados son suministrados por el huésped, suministrados por un vector complementario o suministrados por el propio vector tras la introducción dentro del huésped.

Pueden usarse una gran diversidad de vectores de expresión para expresar las proteínas de la invención. Dichos vectores incluyen vectores cromosómicos, episómicos y obtenidos de virus, por ejemplo, vectores obtenidos de plásmidos bacterianos, de bacteriófago, de episomas de levadura, de elementos cromosómicos de levadura, de virus tales como virus adeno-asociados, lentivirus, baculovirus, papovavirus, tal como SV40, virus vaccinia, virus de epiteloma contagioso, virus de la pseudo-rabia y retrovirus, y vectores obtenidos de combinaciones de los mismos, tales como los obtenidos de elementos genéticos de plásmido y bacteriófago, tales como cósmidos y fagémidos. Todos pueden usarse para expresión de acuerdo con este aspecto de la presente invención. Generalmente, a este respecto puede usarse cualquier vector adecuado para mantener, propagar o expresar polinucleótidos o proteínas en un huésped.

La secuencia de ADN en el vector de expresión está ligada de manera operativa a la secuencia(s) de control de expresión apropiada, por ejemplo, un promotor para dirigir la transcripción de ARNm. Los ejemplos representativos de dichos promotores incluyen el fago promotor lambda PL, los promotores *E. coli* lac, trp y tac, promotores de VIH, los promotores temprano y tardío de SV40 y los promotores de LTRs retrovíricos, por citar únicamente unos pocos promotores bien conocidos. En general, los constructos de expresión contendrán sitios para la transcripción, iniciación y terminación y, en la región transcrita, un sitio de unión de ribosoma para traducción. La porción de codificación de los transcritos maduros expresados por los constructos incluirán un AUG de iniciación de traducción al comienzo y un codón de terminación (UAA, UGA o UAG) apropiadamente posicionado al final del polipéptido a traducir.

Además, los constructos pueden contener regiones de control que regulan, así como engendran la expresión. Generalmente, dichas regiones operarán controlando la transcripción, tal como sitios de unión del represor y potenciadores, entre otros.

Los vectores para propagación y expresión generalmente incluirán marcadores seleccionables. Dichos marcadores pueden ser igualmente adecuados para amplificación o los vectores pueden contener marcadores adicionales para este fin. A este respecto, los vectores de expresión contienen preferiblemente uno o más genes marcadores seleccionables para proporcionar un rasgo fenotípico para la selección de células huéspedes transformadas. Los marcadores preferidos incluyen dihidrofolato reductasa o de resistencia a la neomicina para el cultivo de células eucarióticas, y genes de resistencia a tetraciclina, kanamicina o ampicilina para el cultivo de *E. coli* y otras bacterias.

El vector que contiene la secuencia de ADN apropiada, así como un promotor apropiado, y otras secuencias de control apropiadas, puede introducirse dentro de un huésped apropiado usando una diversidad de técnicas bien conocidas adecuadas para la expresión en él de un polipéptido deseado. Los ejemplos representativos de huéspedes apropiados incluyen células bacterianas, tales como células de *E. coli*, *Streptomyces* y *Salmonella typhimurium*; células de hongos, tales como células de levadura; células de insectos tales como células de *Drosophila S2* y *Spo-optera Sf9*; células de animales tales como células CHO, COS y melanoma de Bowes; y células de plantas. Los huéspedes para una gran diversidad de constructos de expresión son bien conocidos, y los expertos en la técnica estarán capacitados mediante la presente divulgación para seleccionar un huésped apropiado para la expresión de una de las proteínas de la presente invención.

Los ejemplos de vectores para uso en bacterias incluyen pQE70, pQE60 y pQE-9, disponibles de Qiagen (Valencia, CA); pVEXK-HN-K6 disponible de Nature Technologies Corp (Lincoln, NE), vectores pBS, vectores Phagescript, vectores Bluescript, pNHSa, pNH16a, pNH18A, pNH46A, disponibles de Stratagene (La Jolla, CA); pTrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 disponibles de Amersham-Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ); y pEGFP-C1, pEYFP-C1, pDsRed2-C1, pDsRed2-Express-C1, y pAcGFP1, pAcGFP-C1, pZsYellow-C1, disponibles de Clontech (Palo Alto, CA). Los ejemplos de vectores eucarióticos incluyen pW-LNEO, pSVCAT, pOG44, pXT1 y pSG disponibles de Stratagene; pSVK3, pBPV, pMSG y pSVL disponibles de Pharmacia; y pCMVDsRed-Express, pIRS2DsRed2, pDsRed2-Mito, pCMV-EGFP disponibles de Clontech. Muchos otros vectores comercialmente disponibles y bien conocidos se encuentran disponibles para los expertos en la técnica. La selección de los vectores y promotores apropiados para expresión en una célula huésped es un procedimiento bien conocido y las técnicas requeridas para la construcción del vector de expresión, introducción del vector dentro de la célula y expresión en el huésped son rutinas para los expertos en la técnica.

La presente invención se refiere igualmente a células huéspedes que contienen los constructos anteriormente descritos. La célula huésped puede ser una célula eucariótica superior, tal como una célula de mamífero, o una célula eucariótica inferior, tal como una célula de levadura, o la célula huésped puede ser una célula procariótica, tal como una célula bacteriana. La célula huésped puede ser transfectada de manera estable o transitoria con el constructo. Los polinucleótidos pueden introducirse solos o con otros polinucleótidos. Dichos otros polinucleótidos pueden introducirse independientemente, co-introducirse o introducirse unidos a los polinucleótidos de la invención.

La introducción de un constructo dentro de una célula huésped puede efectuarse mediante transfección con fosfato cálcico, transfección mediada por DEAE-dextrano, transfección mediada por lípido catiónico, electroporación, transducción, infección u otros procedimientos. Dichos procedimientos están descritos en muchos manuales de laboratorio convencionales, tales como Davis y otros, Basic Methods in Molecular Biology, (1986).

La presente invención se refiere igualmente a procedimientos de producción de una GGBP termoestable modificada que comprende el cultivo de las células huéspedes de la invención bajo condiciones tales que la GGBP termoestable modificada sea expresada, y la recuperación de dicha proteína. Las condiciones de cultivo requeridas para expresar

las proteínas de la presente invención dependen de las células huésped que albergan los polinucleótidos de la presente invención. Las condiciones de cultivo para cada tipo de célula son bien conocidas en la técnica y pueden ser fácilmente optimizadas, si es necesario. Por ejemplo, un ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención, o un constructo que comprende dicho ácido nucleico, puede introducirse dentro de una célula huésped adecuada mediante un procedimiento apropiado para la célula huésped seleccionada, por ejemplo, transformación, transfección, electroporación, infección, de manera tal que el ácido nucleico esté ligado de manera operable al uno o más elementos de control de expresión tal como se describen en la presente invención. Las células huéspedes pueden mantenerse bajo condiciones adecuadas para expresión *in vitro* o *in vivo*, produciéndose, de esta forma, el polipéptido codificado. Por ejemplo, las células huéspedes pueden mantenerse en la presencia de un inductor, en medio adecuado suplementado con las sales apropiadas, factores de crecimiento, antibiótico, suplementos nutritivos, los cuales pueden facilitar la expresión de la proteína. En realizaciones adicionales, las GGBPs termoestables modificadas de la invención pueden producirse mediante traducción *in vitro* de un ácido nucleico que codifica la GGBP termoestable modificada, mediante síntesis química o mediante cualquier otro procedimiento adecuado. Si se desea, la GGBP termoestable modificada puede aislarse a partir de la célula huésped o de otro entorno en el cual se ha producido o secretado la proteína. En consecuencia, debería resaltarse que el procedimiento de producción de las GGBPs termoestables modificadas abarca la expresión del polipéptido en una célula huésped de una planta o animal transgénico. Véase, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. Nos. 6.013.857, 5.990.385, y 5.994.616.

Las GGBPs termoestables modificadas de la presente invención son útiles en una diversidad de aplicaciones, tales como procedimientos industriales, y como componentes de biosensores para detectar, monitorizar o medir cantidades de analito en una muestra. Los biosensores son dispositivos capaces de proporcionar información analítica cuantitativa o semi-cuantitativa específica usando un elemento de reconocimiento biológico, tal como una GGBP o una GGBP modificada, la cual se combina con un elemento de transducción (detección). Los ejemplos de análisis incluyen carbohidratos tales como monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos y polisacáridos, proteínas, péptidos y aminoácidos, incluyendo oligopéptidos, polipéptidos y proteínas maduras, ácidos nucleicos, oligonucleótidos, polinucleótidos, lípidos, ácidos grasos, lipoproteínas, proteoglicanos, glucoproteínas, compuestos orgánicos, compuestos inorgánicos, iones, y polímeros naturales y sintéticos. En una realización, el analito es un carbohidrato. En particular, el analito carbohidrato puede ser un azúcar, tal como glucosa, galactosa o ribosa. Más particularmente, el analito puede ser glucosa.

El analito se mide en una muestra. Tal como se usa en la presente invención, una muestra puede ser cualquier entorno que pueda ser sospechoso de contener el analito a medir. Así, una muestra incluye una solución, una célula, un fluido corporal, un tejido o porción del mismo, y un órgano o porción del mismo. Cuando una muestra incluye una célula, la célula puede ser una célula procariótica o eucariótica, por ejemplo, una célula animal. Los ejemplos de células animales incluyen insectos, aves, y mamíferos tales como, por ejemplo, bovino, equino, porcino, canino, felino, humano y primates no humanos. El ámbito de la invención no debería limitarse por el tipo de célula ensayada. Los ejemplos de fluidos biológicos a ensayar incluyen sangre, orina, saliva, fluido sinovial, fluido intersticial, fluido cerebrospinal, fluidos linfáticos, bilis y fluido amniótico. El ámbito de los procedimientos de la de la presente invención no debería limitarse por el tipo de fluido corporal a ensayar. Los términos "sujeto" y "paciente" se usan de manera indistinta en la presente invención y se usan para indicar un animal, particularmente un mamífero, más particularmente un ser humano o primate no humano.

Las muestras pueden o no haber sido retiradas de su entorno nativo. Así, la porción de la muestra ensayada no necesita separarse o retirarse del resto de la muestra o proceder de un sujeto que pueda contener la muestra. Por ejemplo, la sangre de un sujeto puede ensayarse para determinar la glucosa sin separar nada de la sangre del paciente. Por supuesto, la muestra puede también separarse de su entorno nativo. Además, la muestra puede tratarse antes de ser ensayada. Por ejemplo, la muestra puede diluirse o concentrarse; la muestra puede purificarse y/o puede agregarse a la muestra al menos un compuesto, tal como un patrón interno. La muestra puede ser también físicamente alterada (por ejemplo, centrifugación, separación por afinidad) o químicamente alterada (por ejemplo, mediante la adición de un ácido, base o tampón, calentamiento) antes y o conjuntamente con los procedimientos de la presente invención. El tratamiento incluye igualmente la congelación y/o conservación de la muestra antes de ser ensayada.

Otra realización se refiere a procedimientos de esterilización de GGBPs. Los procedimientos de esterilización de proteínas de unión periplásmicas (PBPs) se encuentran descritos en la WO 2007/022485 publicada el 22 de Febrero de 2007. Específicamente, los procedimientos de esterilización comprenden la exposición de las GGBPs termoestables de la presente invención a al menos una fuente de radiación.

En una realización de la presente divulgación, las GGBPs termoestables se colocan en la presencia de al menos un purificador de radicales libres antes de la exposición a la radiación. Los purificadores de radicales libres son bien conocidos en la técnica, y la divulgación no está limitada a la identidad del purificador al cual se expone la GGBP termoestable. Los ejemplos de purificadores de radicales libres incluyen ácido ascórbico, glutatión, tocoferoles y tocotrienoles. Los ejemplos adicionales de purificadores de radicales libres incluyen enzimas tal como super óxido dismutasa, catalasas y peroxidasas. En una realización específica, el purificador de radicales libres es ascorbato sódico. En realizaciones más específicas, el ascorbato sódico está presente en concentraciones de al menos aproximadamente 5 mM, 10 mM, 15 mM, 25 mM, 35 mM, 50 mM, 75 mM, 100 mM, 125 mM, 150 mM, 175 mM, 200 mM, 250 mM, 300 mM o más. Por ejemplo, pueden prepararse soluciones de una GGBP termoestable marcada con acrylodan de la invención (100 μ M) en solución salina tamponada con fosfato conteniendo sal sódica de ácido L(+)-

ascórbico 0, 25, o 200 mM. A continuación, puede realizarse la esterilización con radiación con haz de electrones o gamma (por ejemplo, ~10 a ~20 kGy).

Las GGBPs termoestables pueden colocarse igualmente dentro de dispositivos, tales como biosensores. En una realización, los biosensores comprenden una matriz que ocluye las GGBPs termoestables. Tal como se usa en la presente invención, "matriz" se refiere a esencialmente un entorno tridimensional que tiene al menos una molécula de unión inmovilizada dentro de él con el fin de medir una señal detectable a partir de la interacción ligando-proteína. Los ejemplos de matrices que son capaces de ocluir las GGBPs termoestables están divulgados en la Solicitud Publicada de EE.UU. No. 2005/0923155, publicada el 25 de Octubre de 2005. La relación entre los constituyentes de la matriz y las GGBPs termoestables incluyen interacciones covalentes, iónicas, y de van der Waals y combinaciones de las mismas. La relación espacial entre la matriz y las GGBPs termoestables incluye la distribución homogénea y heterogénea dentro y en cualquiera parte o la totalidad del volumen de la matriz. La matriz puede estar comprendida por material orgánico, inorgánico, vidrio, metal, plástico, o combinaciones de los mismos. Igualmente, la matriz permite que el biosensor está incorporado en el extremo distal de una fibra u otra sonda mínimamente invasiva a insertar dentro del tejido de un paciente, a fin de hacer posible una lectura episódica, continua, o programada, del paciente. La información desde el biosensor al paciente puede proporcionarse, por ejemplo, mediante telemetría, visual, audio, u otros medios conocidos en la técnica, por ejemplo, tal como se expone en las Patentes de EE.UU. 5.517.313, 5.910.661, 5.894.351, y 5.342.789, así como la Publicación de EE.UU. No. 2005/0113658 y en Beach, R.D. y otros, IEEE Transactions on Instrumentation and Measurement, vol. 48, no.6, págs. 1239-1245, (1999). La información incluye radiación eléctrica, mecánica, y actínica adecuada para la obtención de la concentración del analito o cambio en la concentración, según sea lo adecuado.

Tal como se ha mencionado anteriormente, las GGBPs termoestables pueden ser ocluidas dentro de una matriz, tal como un hidrogel, el cual, a continuación, puede usarse como un dispositivo implantable. Tal como se usa en la presente invención, el término "ocluída" y variaciones de la misma, se usa indistintamente con "encapsulada" y se usa para indicar que la molécula de unión está inmovilizada dentro o sobre los constituyentes de la matriz. La matriz puede ser de cualquier forma o conformación deseable incluyendo una o más de entre disco, cilindro, parche, nanopartícula, microesfera, polímero poroso, espuma de célula abierta, y combinaciones de las mismas, siempre y cuando que permita la permeabilidad al analito. De manera adicional, la matriz previene la lixiviación del biosensor. La matriz permite que la luz procedente de fuentes ópticas o cualquier otra luz examinadora o procedente del grupo informador pase a través del biosensor. Cuando se usa en una aplicación *in vivo*, el biosensor estará expuesto a un intervalo substancialmente fisiológico de analito y sería deseable la determinación o detección de un cambio en la concentración del analito considerando que la determinación o detección incluye medios de detección continuos, programados y episódicos. Así, en una realización de la presente invención, el biosensor *in vivo* previsto comprende al menos una proteína de unión mutada en un analito permeable que ocluye o encapsula la matriz, de manera tal que la proteína de unión mutada proporciona una señal detectable y reversible cuando la proteína de unión mutada se expone a concentraciones de analito variables, y la señal detectable y reversible puede relacionarse con la concentración del analito. En algunas realizaciones, los biosensores implantables pueden implantarse dentro o por debajo de la piel de una unión epidérmica-dérmica del mamífero para interactuar con el fluido intersticial, tejido, u otros fluidos biológicos. En una realización específica, el biosensor se implanta en la piel a una profundidad menor de aproximadamente 2 mm. En una realización más específica, el biosensor se implanta en la piel a una profundidad menor de aproximadamente 1 mm. En una realización incluso más específica, el biosensor se implanta en la piel a una profundidad menor de aproximadamente 0,8 mm. La información procedente del implante del paciente puede ser proporcionada, por ejemplo, mediante telemetría, visual, o audio, u otros medios conocidos en la técnica, tal como anteriormente se han establecido.

La matriz puede prepararse a partir de materiales biocompatibles o incorporar materiales capaces de minimizar reacciones adversas con el cuerpo. Las reacciones adversas por implantes incluyen inflamación, mal olor de proteínas, necrosis de tejido, respuesta inmune y lixiviación de materiales tóxicos. Dichos materiales o tratamientos son bien conocidos y practicados en la técnica, por ejemplo, tal como se expone por Quinn, C.P.; Pathak, C.P.; Heller, A.; Hubbell, J.A., en Biomaterials, vol. 16, (no. 5), págs. 389-396, (1995), y por Quinn, C.A.P.; Connor, R.E.; Heller, A. en Biomaterials, vol. 18, (no.24), págs. 1665-1670, (1997).

En un aspecto de la presente invención, las GGBPs termoestables pueden ser ocluidas o encapsuladas dentro de una matriz obtenida substancialmente a partir de un hidrogel. El término "hidrogel" se usa para indicar un material que contiene agua, insoluble en agua.

En la presente invención pueden usarse numerosos hidrogeles. Los hidrogeles pueden ser, por ejemplo, polisacáridos tal como agarosa, dextrano, carrageenano, ácido alginico, almidón, celulosa, o derivados de estos, tales como, por ejemplo, derivados carboximetilo, o un polímero orgánico hinchable en agua tal como, por ejemplo, alcohol polivinílico, ácido poliacrílico, poliacrilamida, polietilenglicol, copolímeros de estireno y anhídrido maleico, copolímeros de vinil éter y anhídrido maleico y derivados de los mismos. Los derivados que proporcionan redes reticuladas covalentemente son los preferidos. La síntesis y aplicaciones biomédicas y farmacéuticas de hidrogeles basados en, o que comprenden polipéptidos, han sido descritos por un cierto número de investigadores. (Véase, por ejemplo, Biosensors Fundamentals and Applications, editado por A.D-F. Turner, I. Karube and G.S. Wilson; publicado por Oxford University Ppress, en 1988). Un ejemplo de matriz de hidrogel obtenida de un polímero reticulable por UV, soluble en agua, comprende poli(alcohol vinílico), N-metil-4(4'-formilestiril)piridinio metasulfato acetal (CAS Reg. No. [107845-59-0]) disponible de PolyScience Warrington, PA.

Los polímeros que han de usarse en las matrices, tales como hidrogeles, usados en la presente invención pueden funcionalizarse. Por supuesto, pueden funcionalizarse también polímeros usados en otras matrices. Es decir, los monómeros o polímeros que comprenden los polímeros deberían poseer grupos reactivos de manera que las matrices polímeras, tales como hidrogeles, estén disponibles para reacciones químicas, por ejemplo, unión covalente. Tal como se usa en la presente invención y en todas partes de la misma, un "grupo reactivo" es un grupo químico que puede reaccionar químicamente con un segundo grupo. El grupo reactivo del polímero o monómeros que comprenden el polímero puede ser él mismo, una entidad química entera o puede ser una porción de una entidad química entera, incluyendo átomos o iones individuales. Además, el segundo grupo con el cual el grupo reactivo es capaz de reaccionar puede ser el mismo o diferente del grupo reactivo del polímero o monómeros que comprenden los polímeros. Los ejemplos de grupos reactivos incluyen halógenos, aminas, amidas, aldehídos, acrilatos, vinilos, hidroxilos y carboxilos. En una realización, los polímeros o monómeros que comprenden los polímeros del hidrogel deberían funcionalizarse con grupos de ácido carboxílico, sulfato, hidroxilo o amina. En otra realización de la presente invención, los polímeros o monómeros que comprenden los polímeros del hidrogel están funcionalizados con uno o más grupos acrilato. En una realización particular, los grupos funcionales acrilato son grupos terminales. Los grupos reactivos de los polímeros o monómeros que comprenden los polímeros de la matriz pueden ser reactivos con cualquier componente de la porción de matriz del biosensor, tal como otro polímero o monómero dentro de la matriz, una proteína de unión y un aditivo.

Una vez formado, el núcleo de cualquiera de los hidrogeles usados en la presente invención debería comprender polímeros para formar un hidrogel polímero. Independientemente de la aplicación, el término "polímero" se usa en la presente invención para referirse a moléculas compuestas de múltiples unidades monómeras. Los polímeros adecuados que pueden usarse en la presente invención incluyen uno o más de los polímeros seleccionados del grupo que consiste en poli(alcohol vinílico), poli(acrilamida), poli(N-vinil pirrolidona), poli(óxido de etileno), (PEO), poli(acrilonitrilo hidrolizado), ácido poliacrílico, ácido polimetacrílico, poli(hidroxietil metacrilato), poliuretano polietileno amina, poli(etileno glicol) (PEG), celulosa, acetato de celulosa, carboxi metil celulosa, ácido alginico, ácido pectínico, ácido hialurónico, heparina, sulfato de heparina, quitosán, carboximetil quitosán, quitina, colágeno, pullulano, gelano, xantano, carboximetil dextrano, sulfato de condroitina, guar catiónico, almidón catiónico así como sales y ésteres de los mismos. Los polímeros de la matriz, tal como un hidrogel, pueden comprender igualmente polímeros de dos o más monómeros distintos. Los monómeros usados para crear copolímeros para uso en las matrices incluyen acrilato, metacrilato, ácido metacrílico, alquilacrilatos, fenilacrilatos, hidroxialquilacrilatos, hidroxialquilmecacrilatos, aminoalquilacrilatos, aminoalquilmecacrilatos, sales alquilo cuaternarias de aminoalquilacrilamidas, sales de alquilo cuaternarias de aminoalquilmecacrilamidas, y combinaciones de las mismas. Por supuesto, los componentes polímeros de la matriz pueden incluir mezclas de otros polímeros. En una realización particular de la presente invención, un hidrogel biosensor comprende una molécula de unión y una matriz, comprendiendo la matriz un hidrogel de copolímeros de (hidroetil metacrilato) y ácido metacrílico. En otra realización particular de la presente invención, un hidrogel biosensor comprende una molécula de unión y una matriz hidrogel de copolímeros de (hidroxietil metacrilato), ácido metacrílico, y sales de alquilo cuaternarias de metacrilamidas.

Los polímeros usados en las matrices pueden modificarse para contener grupos nucleofílicos o electrofílicos. Realmente, los polímeros usados en la presente invención pueden comprender además moléculas pequeñas polifuncionales que no contienen unidades monómeras de repetición pero son funcionales, es decir, que contienen dos o más grupos funcionales nucleofílicos o electrofílicos. Estos grupos polifuncionales pueden incorporarse fácilmente dentro de polímeros convencionales mediante reacciones de formación de enlaces covalentes múltiples. Por ejemplo, el PEG puede modificarse para contener uno o más grupos amino a fin de proporcionar un grupo nucleofílico. Los ejemplos de otros polímeros que contienen uno o más grupos nucleofílicos incluyen poliaminas tales como etilendiamina, tetrametilendiamina, pentametilendiamina, hexametilendiamina, bis-(2-hidroxietil)amina, bis-(2-aminoetil)amina, y tris-(2-aminoetil)amina. Los ejemplos de grupos electrofílicos incluyen ésteres de succinimida, epóxidos, ésteres de hidroxibenzotriazol, oxicarbonilimidazoles, nitrofenil carbonatos, tresilatos, mesilatos, tosilatos, carboxilatos, e isocianatos. En una realización, la composición comprende un poli(etileno glicol) terminado con bisamina.

Los polímeros deberían ser capaces de reticulación, tanto físicamente como químicamente, para formar una matriz, tal como un hidrogel. La reticulación física incluye procedimientos no químicos tales como tratamiento por radiación tal como haces de electrones, rayos gamma, rayos X, luz ultravioleta, tratamientos aniónicos y catiónicos. La reticulación de los polímeros puede comprender igualmente la reticulación química, tal como reticulación covalente. Por ejemplo, un sistema de reticulación química comprende el uso de enzimas, lo cual es bien conocido en la técnica. Otro ejemplo de reticulación covalente química comprende el uso de peróxido. La reticulación química puede producirse cuando un reactivo de reticulación reacciona con al menos dos porciones de un polímero para crear una red tridimensional. La reticulación covalente puede igualmente producirse cuando se usan monómeros multifuncionales durante el procedimiento de reticulación. Por ejemplo, un monómero de acrilato puede ser polimerizado con un monómero de acrilato bifuncional para formar un polímero reticulado. Cualquier reactivo de reticulación sería adecuado para la presente invención, siempre y cuando que el reactivo de reticulación se disolviera al menos parcialmente en agua o un disolvente orgánico y pueda formar el polímero reticulado. Por ejemplo, si el polímero es un PEG terminado en amina, el reactivo de reticulación debería ser capaz de reaccionar con los grupos amina del PEG y ser substancialmente soluble en agua. En otro ejemplo, los monómeros de (hidroxietil metacrilato) y ácido metacrílico pueden polimerizarse con agente de reticulación de poli(etileno glicol)-bis-alquilacrilato en agua o en dimetilformamida para formar hidrogeles polímeros.

Si los polímeros a reticular están funcionalizados con grupos nucleófilos, tal como aminas (primaria, secundaria, terciaria), tioles, tioéteres, ésteres y nitrilos, el reactivo de reticulación puede ser una molécula que contenga un grupo electrófilo. Los ejemplos de grupos electrofilos han sido descritos en la presente invención. Igualmente, si los polímeros a reticular están funcionalizados con grupos electrofílicos, el reactivo de reticulación puede ser una molécula que contenga un grupo nucleófilo. Se da por entendido que un experto en la técnica puede cambiar los grupos funcionales nucleófilos y electrofílicos tal como se ha descrito anteriormente sin desviarse del ámbito de la presente realización. Igualmente, se da por entendido que la molécula de unión puede proporcionar los grupos funcionales nucleófilos y electrofílicos requeridos. Por ejemplo, cuando la molécula de unión es una proteína, los grupos funcionales nucleófilos y electrofílicos pueden estar presentes como aminoácidos que se producen de manera natural en la proteína, o pueden introducirse en la proteína usando técnicas químicas descritas en la presente invención.

Otros procedimientos generales para la preparación o reticulación de polímeros para formar matrices tales como hidrogeles, son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, Ghandehari H., y otros, *J. Macromol. Chem. Phys.*, vol. 197, pág. 965, (1996); y Ishihara K. y otros, *Polymer J.*, vol. 16, pág. 625, (1984), han informado de la formación de hidrogeles. La matriz de hidrogel puede aplicarse a cada punta del sensor, por ejemplo, una aguja, y curarse bajo una lámpara de Hg, con una longitud de onda >360 nm, durante aproximadamente 15 segundos.

Las GGBPs termoestables pueden estar unidas covalentemente u ocluidas o encapsuladas no covalentemente dentro de una matriz, tal como un hidrogel. En una realización de la presente invención, las moléculas de unión están unidas covalentemente, es decir, ocluidas, dentro de un hidrogel. La unión covalente de la molécula de unión con el hidrogel no debería interferir con la unión de la molécula de unión con el ligando diana. Además, la unión covalente de la molécula de unión con el hidrogel debería ser resistente a la degradación. El grupo funcional en una realización, es un polímero u otro componente del hidrogel que sirve para emparejar la molécula de unión con el hidrogel. El emparejamiento de la molécula de unión con el hidrogel puede llevarse a cabo mediante una diversidad de vías. Por ejemplo, las reacciones de emparejamiento entre el hidrogel y la molécula de unión incluyen el emparejamiento con diazonio, emparejamiento con isotiociano, emparejamiento con hidrazida, formación de amida, emparejamiento con disulfuro, emparejamiento con anhídrido maléico, emparejamiento con tiolactona, y emparejamiento con diclorotriazina. Estas reacciones de emparejamiento entre dos grupos funcionales están bien documentadas, y se consideran bien conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, un grupo funcional amino en una molécula de unión puede emparejarse covalentemente con un grupo funcional carboxilo de uno o más componentes de un hidrogel usando agentes de emparejamiento, tales como hidrocloreuro de 1-metil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodimida (EDC) o dicitclohexilcarbodiimida (DCC). Se da por entendido que los grupos funcionales amino y carboxilo de la molécula de unión y uno o más componentes del hidrogel tal como se han descrito anteriormente, pueden intercambiarse sin desviarse del ámbito de la realización.

En una realización, la matriz comprende dimetacrilato de polietilenglicol (PEGDMA) y ácido metacrílico (MAA). La relación de PEGDMA a MAA puede variar entre realizaciones específicas. En una realización, la relación de PEGDMA:MAA puede variar desde aproximadamente 10:90 % en moles hasta aproximadamente 90:10 % en moles. En una realización específica, la relación de PEGDMA:MAA es aproximadamente 20:80 % en moles. En otra realización específica, la relación de PEGDMA:MAA es aproximadamente 21:79 % en moles. En otra realización específica, la relación de PEGDMA:MAA es aproximadamente 23:77 % en moles. En otra realización específica, la relación de PEGDMA:MAA es aproximadamente 25:75 % en moles. En otra realización específica, la relación de PEGDMA:MAA es aproximadamente 27:73 % en moles. En otra realización específica, la relación de PEGDMA:MAA es aproximadamente 29:71 % en moles. En otra realización específica, la relación de PEGDMA:MAA es aproximadamente 30:70 % en moles. En otra realización específica, la relación de PEGDMA:MAA es aproximadamente 35:65 % en moles. En otra realización específica, la relación de PEGDMA:MAA es aproximadamente 40:60 % en moles. En otra realización específica, la relación de PEGDMA:MAA es aproximadamente 42:58 % en moles. En otra realización específica, la relación de PEGDMA:MAA es aproximadamente 44:56 % en moles. En otra realización específica, la relación de PEGDMA:MAA es aproximadamente 46:54 % en moles. En otra realización específica, la relación de PEGDMA:MAA es aproximadamente 48:52 % en moles. En otra realización específica, la relación de PEGDMA:MAA es aproximadamente 50:50 % en moles. Igualmente, pueden estar presentes iniciadores, tal como HMPP, en diversas concentraciones en el hidrogel. Por ejemplo, pueden estar presentes fotoiniciadores en concentraciones desde aproximadamente 0,10% hasta aproximadamente 5% del volumen total. En una realización, el fotoiniciador está presente en concentraciones de desde aproximadamente 0,1% hasta 1%. En una realización específica, el fotoiniciador está presente en al menos aproximadamente 0,20% del volumen total. En una realización específica, el fotoiniciador está presente en al menos aproximadamente 0,25% del volumen total. En una realización específica, el fotoiniciador está presente en al menos aproximadamente 0,30% del volumen total. En una realización específica, el fotoiniciador está presente en al menos aproximadamente 0,35% del volumen total. En una realización específica, el fotoiniciador está presente en al menos aproximadamente 0,40% del volumen total.

Tal como se ha expuesto en la presente invención, los biosensores de la presente invención pueden comprender GGBPs termoestables ocluidas en una matriz polimera, es decir, a su vez, contenidas dentro de la punta de una aguja. Algunos sensores, tales como implantes subcutáneos, demuestran típicamente un tiempo de retardo. En particular, los sensores de mayor calibre, es decir, calibre 21 y 25, son demasiado grandes para leer con precisión pieles de poco espesor. Los niveles de glucosa en tejido de piel de poco espesor parecen tener poco, si es que existe, tiempo de retardo cuando se comparan con el valor de glucosa en sangre. Esta penetración a poca profundidad permite la toma de muestra de fluidos intersticiales para niveles de concentraciones de glucosa exactos, sin casi

tiempo de retardo. Por ello, en una realización, la aguja del biosensor es una aguja de calibre 31 o menor que es capaz de penetrar la piel de un sujeto de poco espesor, por ejemplo, menos de aproximadamente 2 mm, menos de aproximadamente 1 mm, o incluso menos de aproximadamente 0,8 mm, proporcionando lecturas de glucosa exactas con poco o ningún tiempo de retardo.

- 5 La divulgación se refiere igualmente a dispositivos que comprenden las GGBPs termoestables de la presente invención. Los dispositivos, en general, comprenden: (i) un conducto óptico que tiene un extremo próximo y un extremo distal; y (ii) un elemento sensor en proximidad óptica al extremo distal del conducto óptico que comprende al menos una de las GGBPs termoestables de la presente invención y al menos un grupo informador.

10 El conducto óptico, el cual puede variar en longitud desde aproximadamente 0,1 cm hasta 1 metro, empareja la luz dentro y fuera de un sistema óptico y dentro y fuera del elemento sensor. Por ejemplo, el conducto óptico puede ser unas lentes, un canal de reflexión, una aguja, o una fibra óptica. La fibra óptica puede ser o bien una única hebra de fibra óptica (sencilla o multimodo) o un haz de más de una fibra. En una realización, el haz de la fibra está bifurcado. La fibra puede estar afilada o no afilada con el fin de que pueda penetrar la piel de un paciente.

15 Al extremo próximo del conducto óptico puede conectarse un sistema óptico. El sistema óptico consiste en una combinación de una o más fuentes de excitación y uno o más detectores. Este puede consistir igualmente de filtros, elementos dicróicos, una fuente de energía, y elementos electrónicos para la detección y modulación de la señal. El sistema óptico puede incluir opcionalmente un microprocesador.

20 El sistema óptico interroga a la muestra, o bien continuamente o bien intermitentemente, mediante el acoplamiento de una o más longitudes de onda de luz interrogantes dentro del conducto óptico. A continuación, la una o más longitudes de onda interrogantes pasan a través del conducto óptico e iluminan el elemento sensor. Un cambio en la concentración del analito puede dar lugar a un cambio de la longitud de onda, intensidad, tiempo de vida, eficacia de transferencia de energía, y/o polarización de la luminiscencia del grupo informador, el cual es una parte del elemento sensor. La señal de luminiscencia cambiada resultante vuelve a pasar a través del conducto óptico al sistema óptico, en el que es detectado, interpretado, y almacenado y/o mostrado visualmente. En ciertas realizaciones, el sistema óptico comprende múltiples fuentes de excitación. Una o más de estas fuentes pueden modularse a fin de permitir el procesamiento dinámico de la señal detectada, incrementándose, de esta forma, la relación señal-ruido y la sensibilidad de la detección. La modulación puede igualmente usarse para reducir el consumo de energía por el dispositivo o para incrementar el tiempo de vida del elemento sensor mediante la minimización de fenómenos no deseables tales como fotoblanqueo. El sistema óptico puede incluir igualmente uno o más detectores de energía electromagnética que pueden usarse para detectar la señal de luminiscencia procedente de los grupos informador y de referencia opcional, así como para referencia y/o calibrado interno. El consumo de energía total del sistema óptico se mantiene pequeño fin de permitir que el dispositivo pueda ser operado usando la energía de una batería.

Los ejemplos siguientes son ilustrativos de la invención descrita en la presente invención. Los ejemplos no abarcados por el ámbito de las reivindicaciones son para fines ilustrativos.

35 Ejemplos

Ejemplo 1 – Construcción y producción de GGBPs termoestables modificadas

Se seleccionaron restos de aminoácidos de la GGBP denominada “3M-GGBP” (SEC ID NO:3), que incluye diversos restos de asparagina y glutamina, para sustitución basada en una alineación de consenso de secuencias de aminoácidos similares en la GGBP de *E. coli* de tipo salvaje (SEC ID NO:1), determinada mediante una investigación BLASTP. En particular, se seleccionaron los 21 aminoácidos siguientes de 3M-GGBP para sustitución: asparagina 39 (N39), ácido aspártico 50 (D50), glutamina 51 (Q51), glicina 82 (G82), glutamina 83 (Q83), asparagina 84 (N84), asparagina 130 (N130), glutamina 175 (Q175), glutamina 177 (Q177), leucina 178 (L178), glicina 198 (G198), prolina 199 (P199), asparagina 200 (N200), asparagina 226 (N226), asparagina 259 (N259), asparagina 260 (N260), lisina 270 (K270), asparagina 271 (N271), asparagina 283 (N283), triptófano 284 (W284) y asparagina 302 (N302).

45 A continuación, cada uno de los 21 restos seleccionados de 3M-GGBP se substituyeron por separado para crear 13 GGBPs modificadas iniciales. Las alineaciones de proteínas con secuencias de aminoácidos similares a la GGBP de *E. coli* de tipo salvaje (SEC ID NO:1) determinadas mediante investigación BLASTP se usó para determinar la identidad del aminoácido de reemplazo (véase tabla I). Las 3M-GGBPs modificadas se generaron en el constructo 3M-GGBP usando el procedimiento QuikChange™ (Stratagene). Se diseñaron oligonucleótidos para reemplazar restos diana con otros aminoácidos. En algunos casos, los oligonucleótidos se diseñaron para reemplazar hasta tres aminoácidos en un locus particular, por ejemplo, G82, Q83, y N84. Usando una mezcla de reacción patrón, PCR, y los oligonucleótidos diseñados, se realizaron mutaciones en el molde 3M-GGBP plásmido. Después de PCR, el producto se digirió con DpnI y se transformó dentro de *E. coli* de acuerdo con el protocolo de QuikChange. Después de transformación dentro de *E. coli*, el ADN plásmido se purificó y el cambio de secuencias deseado se verificó mediante secuenciación de ADN. Cada una de las trece modificaciones mostradas en la Tabla I más adelante, se generó y verificó de esta manera, creándose un ADN molde para una 3M-GGBP modificada.

60 De una manera similar, pueden modificarse aminoácidos de una GGBP denominada “W183C” (SEC ID NO:4). En particular, se seleccionaron los 21 aminoácidos siguientes de W183C para sustitución: asparagina 39 (N39), ácido aspártico 50 (D50), glutamina 51 (Q51), glicina 82 (G82), glutamina 83 (Q83), asparagina 84 (N84), asparagina 130 (N130), glutamina 175 (Q175), glutamina 177 (Q177), leucina 178 (L178), glicina 198 (G198), prolina 199 (P199),

asparagina 200 (N200), asparagina 226, (N226), asparagina 259 (N259), asparagina 260 (N260), lisina 270 (K270), asparagina 271 (N271), asparagina 283 (N283), triptófano 284 (W284) y asparagina 302 (N302).

5 Las mismas sustituciones que fueron situadas dentro de la 3M-GGBP, anterior, se eligieron como sustituciones para la modificación de W183C. Las W183Cs modificadas se generaron en el constructo W183C usando el procedimiento QuikChange™ (Stratagene). Usando una mezcla de reacción patrón, PCR, y los oligonucleótidos diseñados, se realizaron modificaciones en el molde 3M-GGBP plásmido. Después de PCR, el producto se digirió con DpnI y se transformó dentro de *E. coli* de acuerdo con el protocolo de QuikChange. Después de transformación dentro de *E. coli*, el ADN plásmido se purificó y el cambio de secuencias deseado se verificó mediante secuenciación de ADN.

10 La GGBP modificada se expresaron a partir de la cepa Sg13009 de *E. coli* siguiendo protocolos convencionales (Qiagen). Después de inducción, las bacterias se lisaron usando reactivo de extracción de proteína Bugbuster (Novagen) y se purificaron mediante IMAC usando resina de cobalto²⁺ Talon (Clontech). La proteína purificada en solución se filtró a través de un filtro de 100 kDa de corte y, a continuación, se concentró usando un filtro de 10 kDa de corte (Millipore). La proteína (1-2 mg/ml) se dializó a 4°C en una solución que contenía NaCl 1 M, Tris-HCl 10 mM, y NaPO₄ 50 mM (pH 8) y se almacenó a 4°C. Bajo estas condiciones, la proteína se mantuvo activa durante al menos seis meses. El rendimiento a partir de la purificación fue aproximadamente de 10 mg/ml.

TABLA I

	Modificación(es)
1	N39I
2	D50K, Q51H
3	G82G, Q83K, N84D
4	N130D
5	Q175E, Q177H, L178M
6	Q175I, Q177E
7	G198S, P198S, N200K
8	N226G
9	N226K
10	N259E, N260S
11	K270Y, N271S
12	N283D, W284L
13	N302T

Ejemplo 2 – Determinación de la temperatura de fusión de las GGBPs modificadas

20 Los espectros de dicroísmo circular (CD) se realizaron sobre un JASCO J-810. Las muestras de proteínas marcadas con fluoróforo purificadas se dializaron exhaustivamente en solución salina tamponada (PBS) (que comprendía NaCl 137 mM, fosfato 10 mM, y KCl 2,7 mM, pH 7,4). La pérdida de estructura secundaria de la 3M-GGBP y la W183C-GGBP se observó mediante el registro de la señal de CD a 222 nm como una función de la temperatura. Durante el experimento, la temperatura de la muestra cambió a una velocidad de ~1°C/min entre 20 y 80°C. La temperatura de fusión aparente en el punto medio de la transición (T_m) se obtuvo mediante la representación de los puntos de datos experimentales (señal de CD frente a temperatura) con una función sigmoïdal.

25 La Tabla II a continuación representa los resultados procedentes del estudio de dicroísmo circular de cada una de las trece GGBPs modificadas. Las proteínas modificadas 1, 3, 5 y 10 tuvieron el mayor incremento de T_m sobre la proteína de referencia.

TABLA II

No.	Modificación(es)	+ ΔT_m	- ΔT_m
1	N39I	1	
2	D50K, Q51H	ND	ND
3	G82G, Q83K, N84D	1,5	
4	N130D		5,2

TABLA II (Cont.)

5	Q175E, Q177H, L178M	3	
6	Q175I, Q177E		0,3
7	G198S, P198S, N200K	0,5	
8	N226G	0,9	
9	N226K	0,3	
10	N259E, N260S	3,6	
11	K270Y, N271S		3,5
12	N283D, W284L		3,7
13	N302T		0,2

Ejemplo 3 – Construcción de una GGBP termoestable modificada con sustituciones de aminoácidos múltiples

5 En base a los resultados del Ejemplo 2, se construyeron dos GGBPs modificadas separadas que comprendían los números de sustitución de los restos N39I, G82E, Q83K, N84D, Q175E, Q177H, L178M, N259E y N260S procedentes del ejemplo anterior. En este ejemplo, las dos proteínas de referencia fueron 3M-GGBP y W183C. Ambas proteínas modificadas se construyeron como en el Ejemplo 1. En resumen, se construyó un constructo que codifica un locus sustituido y el ADN se secuenció para verificación. A continuación, los ADNs plásmidos se usaron como
 10 ADNs moldes para agregar el locus sustituido, generándose, de esta forma, unos vectores de ADN plásmido que codifican o bien la proteína 3M-GGBP (SEC ID NO:3), o bien la W183C (SEC ID NO:4), excepto que cada secuencia comprende sustituciones que corresponden a N39I, G82E, Q83K, N84D, Q175E, Q177H, L178M, N259E y N260S.

Ejemplo 4 – Marcado de la GGBP termoestable modificada

15 La proteína SM4, que es W183C con mutaciones 1, 3, 5 y 10 (véase Tabla I) se marcó con una entidad fluorescente (acrylodan), y la 3M-GGBP con mutaciones 1, 3, 5, y 10 procedente de la Tabla I se marcó con una entidad fluorescente (IANBD) usando los procedimientos descritos en la Publicación de Patente de EE.UU. No. 2005/0112685, publicada el 26 de Mayo de 2005, la cual se incorpora por referencia.

20 La SM4 se marcó de la manera siguiente. Se agregó dimetilsulfóxido (DMSO - 6,14 ml) a una solución (100 mg en 60,3 ml de PBS, pH 7,4) de la proteína GGBP modificada del Ejemplo 5 (con las etiquetas de afinidad). A continuación, se agregó a la solución una parte alícuota de 565 µl de acrylodan 12 mM en DMSO. El porcentaje final de DMSO en la solución fue de aproximadamente el 10%. El matraz se envolvió en hoja de aluminio y se agitó durante 4 horas a temperatura ambiente. A continuación, la mezcla de reacción se centrifugó durante 10 minutos a 26.712 FCR (fuerza centrífuga relativa). El sobrenadante se eliminó y se pasó a través de un filtro de 5 µm Supor (Pall Corporation, East Hills, New York, USA).

25 Después del marcado con acrylodan, la SM4 se transfirió a un tampón para almacenamiento congelada. La proteína se dializó frente a una solución de MES 0,01 M, glucosa 30 mM (pH 5,5-5,7) durante 24 horas con tres cambios de tampón. Después de la diálisis, la proteína se cuantificó y se diluyó hasta una solución 100 µM usando el mismo tampón. A continuación, los viales se colocaron directamente dentro un congelador a -70°C para almacenamiento. La proteína es estable durante al menos 3 meses bajo estas condiciones.

30 Para liofilizar la proteína SM4, la solución de proteína se dializó contra bicarbonato amónico (50 mM, pH 7) durante 24 horas con tres cambios de tampón. La proteína se pasó a través de un filtro de 0,2 µm Supor (Pall) y se repartió alícuotamente dentro de viales de color ámbar (2 mg/vial). Los viales se congelaron a -70°C durante 3 horas y, a continuación, la proteína se liofilizó durante 20 horas. El rendimiento final fue de aproximadamente 86 mg de proteína con una relación de colorante/proteína de aproximadamente 0,94. La proteína es estable durante al menos 6
 35 meses bajo estas condiciones. Para el almacenamiento congelado de la proteína, la solución de proteína se dializó nuevamente. La proteína se dializó contra una solución de MES (ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico) 0,01 M, glucosa 30 mM (pH 5,5-5,7) durante 24 horas con tres cambios de tampón. La proteína se congeló y almacenó a -70°C.

Ejemplo 5 – Determinación de la temperatura de fusión de las GGBPs modificadas y marcadas

40 Usando el mismo protocolo que en el Ejemplo 2, se determinaron las temperaturas de fusión de las GGBPs modificadas (3M-GGBP y W183C modificadas) preparadas en el Ejemplo 3. La T_m medida de la W183-GGBP modificada fue aproximadamente 9,4°C mayor que la de la proteína de referencia (W183C) (FIGURA 1). De manera similar, la 3M-GGBP modificada que tenía los números de sustituciones 1, 3, 5 y 10 de la Tabla I anterior mostraron una T_m superior. La Tabla III a continuación muestra el incremento en T_m para las dos GGBPs modificadas de la presente invención.

45

TABLA III - Estabilidad térmica de GGBPs modificadas

Proteína	T _m	K _d	Respuesta fluorescente	Colorante/proteína
W193C-acrylodan	39,8±2%	19,6±10%	3,4±8%	1,1±30%
W193C(1,3,5,10)-acrylodan	49,2±1%	21,7±6%	4,7±5%	1,1±10%
3M-IANBD	45,4±1%	9,6	11	0,9
3M(1,3,5,10)-IANBD	52,9±2%	13,6	12,1	1,0
T _m determinado en PBS				

Ejemplo 6 – GGBPs modificadas con una etiqueta de afinidad

5 La proteína SM4 se clonó dentro de un vector que produce grandes rendimientos de proteína (6-7 g/l). Este vector coloca 30 restos adicionales sobre la proteína W183C(1,3,5,10) para fines de purificación por afinidad y conjugación. El vector agrega la secuencia de aminoácidos MGHNHNHNHNHNGGDDDDK (SEC ID NO:5), en una dirección N-terminación a C-terminación, sobre el N-terminación y la secuencia de aminoácidos GGKKKKKKKEE (SEC ID NO:6), en una dirección N-terminación a C-terminación, sobre el C-terminación del polipéptido. La temperatura de fusión de esta proteína con las adiciones de terminación presentes, se determinó que era de aproximadamente 53°C en PBS (con 0,1 g/l de CaCl₂ (anhidro) y 0,1 g/l de MgCl₂·6H₂O). Por otro lado, la temperatura de fusión de esta proteína, sin estar presentes las adiciones de terminación, se determinó que era de 55,4°C en PBS. La afinidad por glucosa de la SM4 con adiciones de terminación se midió como de 19, mM y la respuesta fluorescente (Q_r) se midió como de 4,8.

Ejemplo 7 – Medición de las concentraciones de analito usando la GGBP termoestable modificada marcada

15 Para las proteínas 3M y W183C termoestables, modificadas, se usó un ensayo de fluorescencia tal como se divulga por Looger, L.L. y otros, en *Nature*, vol. 423, págs. 185-189, (2003) (incorporada por referencia), para verificar la afinidad de unión por glucosa de las proteínas. El emparejamiento colorante-fluoróforo de proteína (N,N-dimetil-N-(yodoacetil)-N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il)etilenodiamina, designado como IANBD) o el emparejamiento con acrylodan se llevó a cabo tal como ha sido descrito por el fabricante (Molecular Probes).

20 En resumen, se trataron 0,5 ml de 3M-GGBP (1-2 mg/ml) con un exceso 2,5 molar de ditiotreitól durante 30 minutos. A continuación, se agregó un exceso molar de 10 veces de solución de IANBD en DMSO (0,5 mg/100 ul). Mientras se protegía de la luz, la proteína y el colorante se mezclaron suavemente durante 4 horas a 25°C antes de retirar el colorante sin reaccionar, mediante cromatografía de columna Nap-5 (Amersham Biosciences).

25 La eficacia del emparejamiento se determinó mediante absorbancia:

$$\frac{A_x}{\epsilon} \times \frac{MW_p}{mg_p / ml} = \frac{mole_d}{mole_p}$$

En la que A_x es el valor de absorbancia del colorante a la longitud de onda máxima de absorción y ε es el coeficiente de extinción molar del colorante al máximo de absorción. MW_p, mg_p/ml, y mole_p son el peso molecular, la concentración, y la cantidad molar de la proteína, respectivamente. La cantidad molar del colorante es mole_d.

30 Las constantes de unión se determinaron mediante valoración de concentraciones crecientes de glucosa en una proteína 0,1 μM en PBS y monitorización del cambio en fluorescencia. La K_d se determinó a partir de la relación siguiente adaptada de Pisarchick y Thomson (Pisarchick, M.L. y Thomson, N.L., *Biophys. J.*, vol. 58, págs. 1235-1249, (1990):

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

35 en la que F es la intensidad de fluorescencia, F_{inf} es la fluorescencia a valor infinito, F₀ es la fluorescencia a valor cero

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

en la que $[Glc]_{libre}$ es la concentración de la glucosa libre y $[Glc]_{tot}$ y $[Prot]_{tot}$ son las concentraciones totales de glucosa y proteína, respectivamente. Para la SM4, se usó la relación del área bajo la curva de fluorescencia desde 510-540 nm con respecto al área bajo la curva a 450-470 nm, en lugar de la intensidad de fluorescencia en las ecuaciones anteriores. Sin embargo, la presente invención no está limitada a la región de fluorescencia de longitud de onda particular cuando se mide la fluorescencia o se evalúan concentraciones de glucosa.

Los resultados de los experimentos de unión han demostrado que la SM4 marcada con acrylodan, producida de acuerdo con el Ejemplo 3, incrementó igualmente la respuesta de fluorescencia en comparación con la W183C-acrylodan de referencia (Véase Tabla III). La Figura 2 muestra el incremento en la intensidad de fluorescencia tras la valoración de 3M-GGBP(1,3,5,10) marcada con IANBD usando concentraciones crecientes de glucosa (0, 5, 10, 30, 50, y 100 mM).

Ejemplo 8 – Cromatografía líquida-Espectroscopia de masa por transformación de Fourier (LC-FTMS) para cuantificar la desaminación en restos seleccionados de GGBP

Con el fin de identificar sitios de desaminación adicionales, se usó la cromatografía líquida-MS por transformación de Fourier (LC-FTMS) para cuantificar la desaminación en los restos de asparagina en W183C y SM4. La W183C y SM4 (procedente del Ejemplo 5) se mantuvieron o bien a 25°C o bien se trataron térmicamente (18 horas a 60°C) antes de digestión con tripsina. A continuación, los péptidos se separaron usando una columna capilar Pep-Map C18 de 15 cm (75 micrómetros de diámetro interior) con un gradiente de 30 minutos de acetonitrilo de desde aproximadamente 5% hasta 95% y se analizaron mediante LC-FTMS. La desaminación condujo a un desplazamiento de masa de aproximadamente 1 dalton. Las muestras se examinaron para determinar dobletes de desaminación y se reportaron como relaciones pico de desaminación relativos, en los que una relación más pequeña indica mayor desaminación de los restos. La Tabla IV muestra los niveles de desaminación relativos de los restos de las secuencias de péptidos, indicando el número menor un nivel mayor de desaminación. La Tabla V muestra las substituciones de aminoácidos potenciales identificadas mediante el procedimiento de desaminación cuantitativo.

TABLA IV – Desaminación cuantificada mediante LC-FTMS

Secuencias de péptidos identificadas mediante FT-MS		Desaminación relativa				Véase - Tabla II	
W183C	W183C(1,3,5,10)	W183C		W183C(1,3,5,10)		Previamente ensayada	
		25°C	60°C	25°C	60°C	No.	ΔTm
AAPDVQLLMN* <u>DSQN</u> *DQSK	AAPDVQLLMN <u>I</u> * <u>DSQN</u> * DQSK	3,20	1,00	7,90	1,92	1	+1
DKMDAWLSGPN*AN*K	DKMDAWLSGPN*AN*K	3,43	0,86		1,16	7	+0,5
HWAAN*QGWDLN*K	HWAAN*QGWDLN*K				6,9	4	-5,2
ATFDLAKN*LADGK	ATFDLAKN*LADGK		1,42				
GAADGTN*WK	GAADGTN*WK				2,5	11	-3,5
YDDN*FMSVVR	YDDN*FMSVVR		11,51	6,01	1,7		
QN*DQIDVLLAK	QN*DQIDVLLAK	3,05	1,09	4,79	5,19	12	-3,7

Nota: Las asparaginas (N) están marcadas con un asterisco, las mutaciones están subrayadas y las mutaciones que reemplazan un resto N está marcadas con un asterisco y subrayadas

TABLA V

W183C(1,3,5,10) Secuencia de péptidos	Mutaciones previamente ensayadas	No	Secuencia de péptidos	Nuevas mutaciones
AAPDVQLLM <u>I</u> * DSQN* <u>DQSK</u>	AAPDVQLLM <u>I</u> * DSQN* <u>DQSK</u>	1	AAPDVQLLM <u>I</u> * D <u>GQG</u> *DQSK AAPDVQLLM <u>I</u> * D <u>GQA</u> *DQSK G198S, P199G	N39I, S41G, N43G N39I, N43A,

TABLA V (Cont.)

DKMDAWLSGPN*AN*K	DKMDAWLSS <u>SK</u> ANK	7	DKMDAWLSSG <u>K</u> AK*D	N200K, N202K, N203K, A128K, N130D, Q131P
HWAAN*QGWDLN*K	HWAAD <u>D</u> QGWD*LN*K	4	HWK <u>AD</u> *PTLDLNK HWK <u>AD</u> *PTLDLNK	G132T, W133L A128K,A129S,N130S Q131E,G132A,W133L, L268F, A269S, K270R
ATFDLAKN*LADGK	ATFDLAYS* <u>S</u> LADGK	11	ATM <u>F</u> SRL*LADGK ATF <u>E</u> LARL*LADGK	N271L D267E, K270R, N271L
GAADGTN*WK YDDN*FMSVVR QN*DQIDVLLAK	GAADGT <u>D</u> *LK	12	GAADGT <u>M</u> *PK FDD <u>T</u> *FMSVVR QI* <u>E</u> QVDVLLAK	N283M, W284P Y12F, N15T N491I, D50E, 152V
Nota: Las esparaginas (N) están marcadas con un asterisco, las mutaciones están subrayadas y las mutaciones que reemplazan un resto N está marcadas con un asterisco y subrayadas				

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de unión de glucosa-galactosa termoestable (GGBP) que es una proteína GGBP de la SEC ID NO:4 que comprende las substituciones N39I, G82E, Q83K, N84D, Q175E, Q177H, L178M, N259E y N260S, y que tiene una temperatura de fusión superior que la GGBP de la SEC ID NO:4.
- 5 2. Un biosensor para la medición de un analito, comprendiendo dicho biosensor la GGPB termoestable modificada de la reivindicación 1.
3. El biosensor de la reivindicación 2, en el que dicha GGBP termoestable comprende además al menos un marcador seleccionado entre el grupo que consiste en un marcador fluorescente, un radio-marcador, un marcador quimio-luminiscente, un marcador fosforescente, un marcador colorimétrico y un marcador difusor de raman de superficie potenciada.
- 10 4. El biosensor de la reivindicación 2 ó 3, en el que dicha GGBP termoestable está ocluida en una matriz polímera.
5. Un procedimiento de medición de la concentración de un analito en una muestra, comprendiendo dicho procedimiento la puesta en contacto del biosensor de las reivindicaciones 2 a 4 con dicha muestra.
- 15 6. Un dispositivo que comprende el biosensor de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en el que dicha GGBP termoestable está en proximidad óptica con un conducto óptico.
7. Un ácido nucleico aislado que codifica la GGBP termoestable modificada de la reivindicación 1.
8. Un vector que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 7.
9. Una célula huésped que comprende el vector de la reivindicación 8.
- 20 10. Un procedimiento de obtención de la GGBP termoestable de la reivindicación 1, comprendiendo dicho procedimiento el cultivo de la célula huésped de la reivindicación 9 en condiciones adecuadas para la expresión de proteína y el aislamiento de dicha proteína.

FIGURA 1

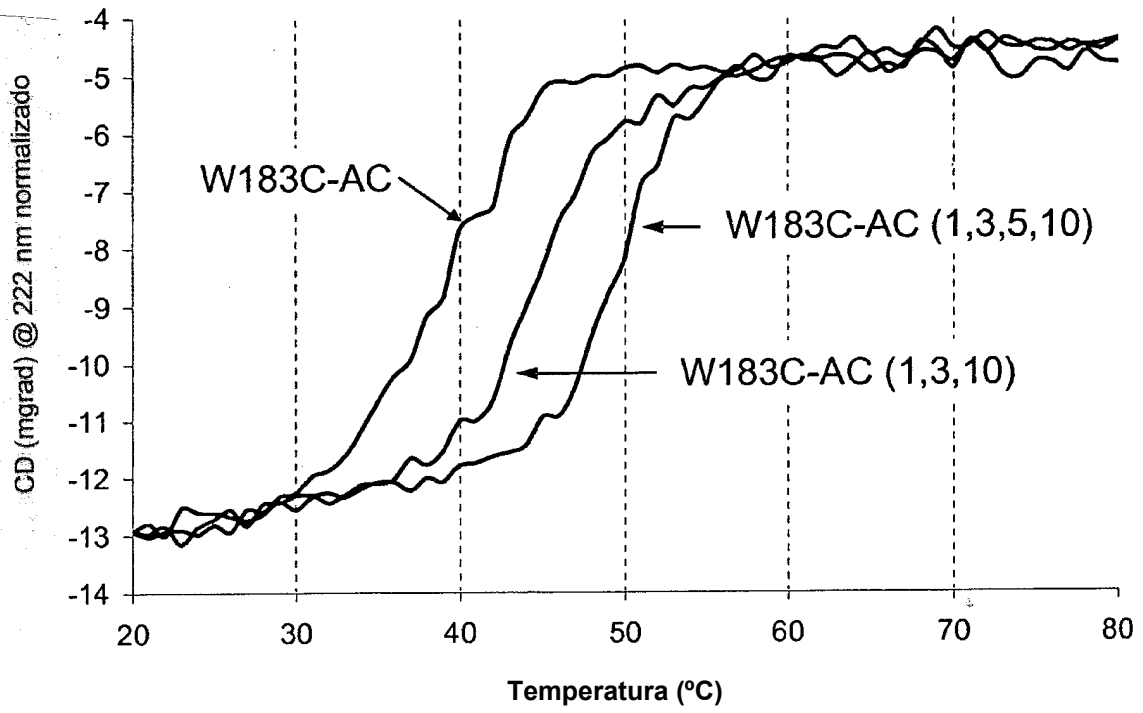


FIGURA 2

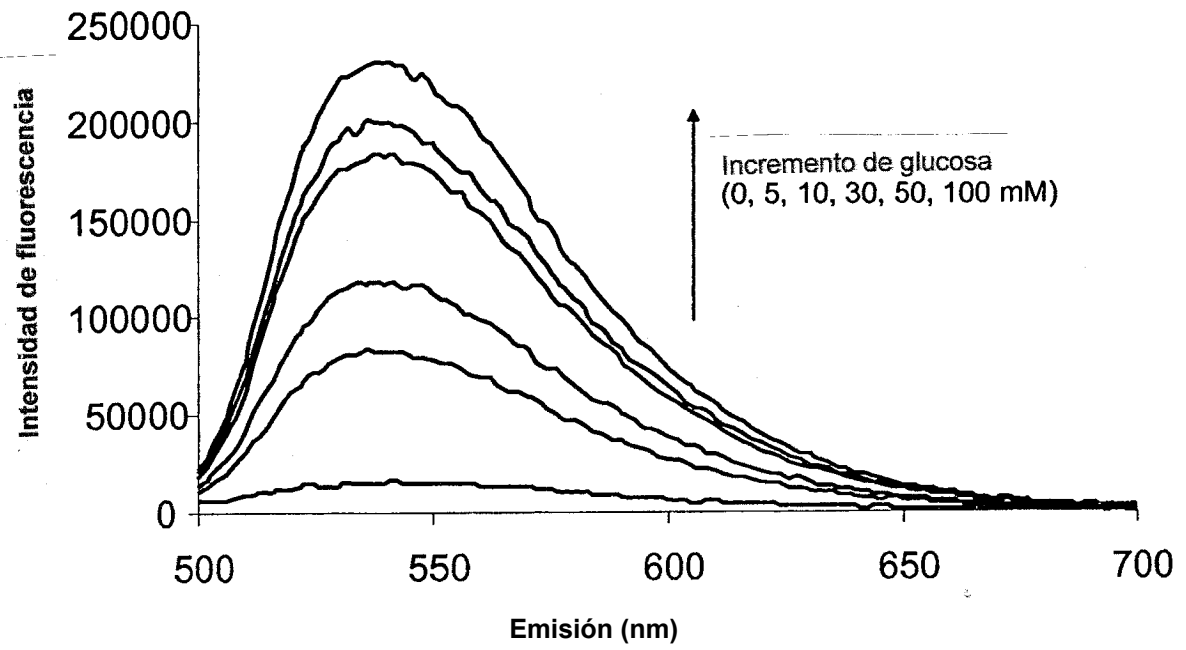


FIGURA 3

