

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 733 974**

51 Int. Cl.:

G01N 33/72 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/533 (2006.01)

G06F 17/10 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.08.2012 PCT/US2012/052395**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.03.2013 WO13032953**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.08.2012 E 12827317 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2019 EP 2748615**

54 Título: **Desarrollo y utilización de sondas fluorescentes de bilirubina no enlazada**

30 Prioridad:

26.08.2011 US 201161527849 P

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

03.12.2019

73 Titular/es:

KLEINFELD, ALAN M. (100.0%)

6777 Via Estrada

La Jolla, CA 92037, US

72 Inventor/es:

HUBER, ANDREW, HENRY;

KAMPF, JAMES, PATRICK;

KWAN, THOMAS y

ZHU, BAOLONG

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 733 974 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Desarrollo y utilización de sondas fluorescentes de bilirubina no enlazada

5 Campo de la invención

[0001] El campo de la invención se refiere a la identificación y uso de sondas de bilirubina no enlazada que se etiquetan con fluorescencia las proteínas que se someten a un cambio en la fluorescencia tras la bilirubina de enlace y que las sondas se utilizan para medir los niveles de bilirubina no enlazada. Estas sondas no se enlazan significativamente ni experimentan un cambio fluorescente significativo en la presencia de otros analitos generalmente presentes en los fluidos en los que se determinan los niveles de bilirubina no enlazada. Estas sondas de bilirubina no enlazada se pueden usar en el diagnóstico y tratamiento de la hiperbilirrubinemia y las enfermedades que causan hiperbilirrubinemia.

15 Antecedentes de la invención

[0002] La bilirubina es un producto del recambio de hemoglobina que es poco soluble en agua y, por lo tanto, se asocia en gran medida con la albúmina en el plasma. Sin embargo, una pequeña fracción de la bilirubina plasmática total es soluble en la fase acuosa. Esta fracción no unida o libre es capaz de penetrar la barrera hematoencefálica y, a niveles elevados, es neurotóxica [Ahlfors CE, Wennberg RP, Ostrow JD y Tiribelli C. Bilirubina no enlazada (libre): mejora el paradigma para evaluar la ictericia neonatal. Clin Chem 55: 1288-1299, 2009]. En condiciones normales, la bilirubina sérica total se mantiene en niveles bajos mediante un equilibrio regulado entre la producción y la excreción de bilirubina. Sin embargo, en los recién nacidos los mecanismos de regulación pueden no estar lo suficientemente maduros como para que el balance de excreción de la producción a menudo favorezca la acumulación, dando lugar al color amarillo de la ictericia en aproximadamente el 60% de los recién nacidos [Maisels MJ y McDonagh AF. Fototerapia para la ictericia neonatal. N Engl J Med 358: 920-928, 2008]. En la mayoría de los casos, este desequilibrio es benigno o, de hecho, puede ser beneficioso y para la mayoría de los recién nacidos se resuelve espontáneamente [Wennberg RP, Ahlfors CE, Bhutani VK, Johnson LH y Shapiro SM. Hacia la comprensión del kernicterus: un desafío para mejorar el manejo de los recién nacidos con ictericia. Pediatrics 117: 474-485, 2006; Gopinathan V, Miller NJ, Milner A_D y Rice-Evans CA. Bilirubina y ascorbato de actividad antioxidante en plasma neonatal. FEBS Lett 349: 197-200, 1994]. Sin embargo, las concentraciones de bilirubina no enlazada pueden elevarse a niveles neurotóxicos, lo que da lugar a déficits que van desde defectos auditivos reversibles hasta secuelas neurológicas más graves del kernicterus que, en raras ocasiones, incluyen la muerte [Ahlfors CE, Wennberg RP, Ostrow JD y Tiribelli C. Bilirubina no enlazada (libre): mejora el paradigma para evaluar la ictericia neonatal. Clin Chem 55: 1288-1299, 2009].

[0003] La intervención temprana usando fototerapia o transfusión de cambio puede tratar bilirubina mediada por neurotoxicidad en recién nacidos [Maisels MJ y McDonagh AF. Fototerapia para la ictericia neonatal. N Engl J Med 358: 920-928, 2008; Morris BH, Oh W, Tyson JE, Stevenson DK, Phelps DL, O'Shean TM, McDavid GE, Perritt RL, Van Meurs KP, Vohr BR, Grisby C, Yao Q, Pedroza C, Das A, Poole WK, Carlo WA, Duara S, Laptook AR, Salhab WA, Shankaran S, Poindexter BB, Fanaroff AA, Walsh MC, Rasmussen MR, Stoll BJ, Cotten CM, Donovan EF, Ehrenkranz RA, Guillet R y Higgins RD. Fototerapia agresiva versus conservadora para lactantes con bajo peso al nacer. N Engl J Med 359: 1885-1896, 2008; Kuzniewicz MW, Escobar GJ y Newman TB. Impacto de la detección universal de bilirubina en el uso de hiperbilirrubinemia grave y fototerapia. Pediatría 124: 1031-1039, 2009]. Las pautas de intervención dependen principalmente de los niveles totales de bilirubina, teniendo en cuenta la edad gestacional y los factores de riesgo [Bhutani VK, Johnson L y Sivieri EM. Capacidad predictiva de una bilirubina sérica específica por hora para el período previo al alta para la posterior hiperbilirrubinemia significativa en recién nacidos a término sanos y a corto plazo. Pediatría 103: 6-14, 1999]. Sin embargo, la evidencia bioquímica fundamental y cada vez mayor evidencia clínica predice que la bilirubina no enlazada en lugar de la bilirubina total debe correlacionarse más precisamente con la neurotoxicidad mediada por bilirubina [Ahlfors CE, Wennberg RP, Ostrow JD y Tiribelli C. Sin consolidar (gratis) bilirubina: mejorar el paradigma para evaluar la ictericia neonatal. Clin Chem 55: 1288-1299, 2009; Wennberg RP, Ahlfors CE y Aravkin AY. Pautas de intervención para la hiperbilirrubinemia neonatal: un atolladero basado en la evidencia. Curr Pharm Des 15: 2939-2945, 2009; Ahlfors CE, Amin SB y Parker AE. La bilirubina no consolidada predice una respuesta auditiva anormal automatizada del tronco cerebral en una población neonatal diversa. J Perinatol 29: 305-309, 2009; Oh W, Stevenson DK, Tyson JE, Morris BH, Ahlfors CE, Bender GJ, Wong RJ, Perritt R, Vohr BR, Van Meurs KP, Vreman HJ, Das A, Phelps DL, O'Shea TM e Higgins RD. Influencia del estado clínico en la asociación entre plasma total y bilirubina no enlazada y muerte o resultados adversos del desarrollo neurológico en lactantes de peso extremadamente bajo al nacer. Acta Paediatr 99: 673-678, 2010]. Por lo tanto, la bilirubina no enlazada debe ser superior a la bilirubina total para identificar neonatos con riesgo de neurotoxicidad por bilirubina [Ahlfors CE. Predicción de la neurotoxicidad de la bilirubina en recién nacidos con ictericia. Curr Opin Pediatr 22: 129-133, 2010].

[0004] La fototerapia agresiva en los bebés prematuros está diseñada para mantener la bilirubina total por debajo de 5 mg/dl [Morris BH, Oh W, Tyson JE, Stevenson DK, Phelps DL, O'Shea TM, McDavid GE, Perritt RL, Van Meurs KP, Vohr BR, Grisby C, Yao Q, Pedroza C, Das A, Poole WK, Carlo WA, Duara S, Laptook AR, Salhab WA, Shankaran S, Poindexter BB, Fanaroff AA, Walsh MC, Rasmussen MR, Stoll BJ, Cotten CM, Donovan EF, Ehrenkranz R^A, Guillet R

y Higgins RD. Fototerapia agresiva versus conservadora para lactantes con bajo peso al nacer. *N Engl J Med* 359: 1885-1896, 2008]. Sin embargo, Morris et al no encontraron diferencias en el resultado (muerte y deterioro del desarrollo neurológico) en los pacientes tratados para mantener la bilirrubina total a menos de 5 mg/dL y los mantenidos a menos de 8 mg/dL. Sin embargo, un estudio de seguimiento realizado por estos investigadores encontró que los resultados estaban bien correlacionados con la bilirrubina no enlazada pero no con la bilirrubina total [Oh W, Stevenson DK, Tyson JE, Morris BH, Ahlfors CE, Bender GJ, Wong RJ, Perritt R, Vohr BR, Van Meurs KP, Vreman HJ, Das A, Phelps DL, O'Shea TM y Higgins RD. Influencia del estado clínico en la asociación entre plasma total y bilirrubina no enlazada y muerte o resultados adversos del desarrollo neurológico en lactantes de peso extremadamente bajo al nacer. *Acta Paediatr* 99: 673-678, 2010]. Esto sugiere que el uso de la bilirrubina total para determinar cuándo administrar la fototerapia puede haber sido engañoso porque los niveles de bilirrubina total no se acoplaron a la bilirrubina no enlazada, la fracción tóxica de la bilirrubina. El desacoplamiento de la bilirrubina total y la bilirrubina no enlazada puede resultar de la presencia de moléculas que interfieren significativamente con la unión de la bilirrubina a la albúmina. Por ejemplo, incluso si la bilirrubina total fuera tan baja como 1 mg/dL, el desplazamiento de solo el 0,2% de la bilirrubina total por moléculas interferentes daría lugar a una bilirrubina no enlazada = 34 nM. Este es un nivel de bilirrubina no enlazada que supera el que se considera tóxico para los recién nacidos a término y generalmente se piensa que los niveles de bilirrubina no enlazada mucho más bajos serían tóxicos para los bebés prematuros, como los del ensayo de Morris y otros [Morris BH, Oh W, Tyson JE, Stevenson DK, Phelps DL, O'Shea TM, McDavid GE, Perritt RL, Van Meurs KP, Vohr BR, Grisby C, Yao Q, Pedroza C, Das A, Poole WK, Carlo WA, Duara S, Lupton AR, Salhab WA, Shankaran S, Poindexter BB, Fanaroff AA, Walsh MC, Rasmussen MR, Stoll BJ, Cotten CM, Donovan EF, Ehrenkranz RA, Guillet R y Higgins RD. Fototerapia agresiva versus conservadora para lactantes con bajo peso al nacer. *N Engl J Med* 359: 1885-1896, 2008].

[0005] Muchos fármacos y metabolitos pueden unirse a la albúmina y, como resultado, la bilirrubina se desplaza de su estado de enlace en albúmina y de ese modo se aumenta la concentración no unida de la bilirrubina si la concentración de bilirrubina total aumenta o no [Lanza ml, Stahl GE, Paul MH, Egler JM, Pereira GR y Polin RA. El efecto de las infusiones de grasa de 15 horas de dosis variables en la unión de bilirrubina a la albúmina. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 9:144-147, 1985; Amin SB. Efecto de los ácidos grasos libres en la afinidad de unión bilirrubina-albúmina y bilirrubina no enlazada en bebés prematuros. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 34: 414-420, 2010]. Los metabolitos desplazadores de bilirrubina de especial importancia son los ácidos grasos libres (AGF). Los FFA siempre están presentes, pero se mantienen en niveles bajos y no tienen un efecto significativo en los recién nacidos a término sanos. Sin embargo, bajo condiciones de estrés, como por ejemplo debido a la sepsis, los niveles de FFA pueden aumentar significativamente [Nogueira AC, Kawabata V, Biselli P, Lins MH, Valeri C, Seckler M, Hoshino W, Junior LG, Bernik MM, Andrade Machado JB, Martínez MB, Lotufo PA, Caldini EG, Martins E, Curi R y Soriano FG. Los cambios en los niveles de ácidos grasos libres en plasma en pacientes sépticos se asocian con daño cardíaco y reducción en la variabilidad de la frecuencia cardíaca. *Choc* 29: 342-348, 2008]. Además de la enfermedad y el estrés, los bebés prematuros en la UCIN pueden producir aumentos extremadamente grandes en los niveles de FFA como consecuencia de recibir por nutrición parenteral una emulsión de aceite como Intralipid® [Spear ML, Stahl GE, Paul MH, Egler JM, Pereira GR y Polin RA. El efecto de las infusiones de grasa de 15 horas de dosis variables en la unión de bilirrubina a la albúmina. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 9:144-147, 1985; Amin SB. Efecto de los ácidos grasos libres en la afinidad de unión bilirrubina-albúmina y bilirrubina no enlazada en bebés prematuros. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 34: 414-420, 2010]. FFA se enlazan a la albúmina con afinidades altas similares a la bilirrubina. A diferencia de la bilirrubina, los FFA tienen múltiples sitios de unión de alta afinidad, de modo que solo cuando una fracción apreciable de los sitios de unión a la albúmina están ocupados por los FFA, el desplazamiento de la bilirrubina se vuelve significativo [Spear ML, Stahl GE, Paul MH, Egler JM, Pereira GR y Polin RA. El efecto de las infusiones de grasa de 15 horas de dosis variables en la unión de bilirrubina a la albúmina. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 9:144-147, 1985; Amin SB. Efecto de los ácidos grasos libres en la afinidad de unión bilirrubina-albúmina y bilirrubina no enlazada en bebés prematuros. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 34: 414-420, 2010]. Los recién nacidos que reciben Intralipid® producirán cantidades suficientemente grandes de FFA no se pueden predecir fácilmente porque dependen de la edad gestacional y de factores como la actividad enzimática, la adiposidad y otros [Spear ML, Stahl GE, Paul MH, Egler JM, Pereira GR y Polin RA. El efecto de las infusiones de grasa de 15 horas de dosis variables en la unión de bilirrubina a la albúmina. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 9:144-147, 1985; Amin SB. Efecto de los ácidos grasos libres en la afinidad de unión bilirrubina-albúmina y bilirrubina no enlazada en bebés prematuros. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 34: 414-420, 2010]. Es crítico monitorear la concentración no unida de FFA (FFAu) durante la infusión de lípidos porque los niveles elevados de FFAu pueden causar supresión inmune, daño cardíaco y reducción en la variabilidad de la frecuencia cardíaca y niveles elevados de bilirrubina no enlazada. Además, debido a que los niveles no unidos de estos metabolitos dependen de muchos factores específicos del paciente, solo con la monitorización directa de la bilirrubina no enlazada durante la infusión de Intralipid® se pueden identificar aquellos lactantes con riesgo de neurotoxicidad por bilirrubina. Esto es particularmente cierto para la bilirrubina porque los niveles plasmáticos elevados de FFA causados por el aumento de las concentraciones de Intralipid® producen concentraciones elevadas de bilirrubina no enlazadas sin cambiar la concentración total de bilirrubina.

[0006] Proteínas de enlace de lípidos intracelulares (iLBP) son una familia de polipéptidos de cadena simple de bajo peso molecular. Hay cuatro subfamilias reconocidas. La subfamilia I contiene proteínas específicas para los derivados de la vitamina A, como el ácido retinoico y el retinol. La subfamilia II contiene proteínas con especificidades para ácidos biliares, eicosanoides y hemo. La subfamilia III contiene proteínas de unión a ácidos grasos de tipo intestinal (FABP) y la subfamilia IV contiene todos los otros tipos de proteínas de unión a ácidos grasos [Hauerland NH y Spener F.

Proteínas de unión a ácidos grasos: conocimientos de manipulaciones genéticas. Prog Lipid Res 43: 328-349, 2004] que incluye un FABP que se une a la bilirrubina con baja afinidad [Di Pietro SM y Santome JA. Aislamiento, caracterización y propiedades de unión de dos isoformas de proteína de unión a ácido graso de hígado de rata. Biochim Biophys Acta 1478: 186-200, 2000]. Toda la familia se caracteriza por un pliegue tridimensional común. Las propiedades de unión al ligando de las diferentes subfamilias se superponen considerablemente. Las proteínas de tipo silvestre de la subfamilia I [Richieri GV, Ogata RT, Zimmerman AW, Veerkamp JH y Kleinfeld AM. Las proteínas de unión a ácidos grasos de diferentes tejidos muestran distintos patrones de interacciones de ácidos grasos. BioChemistry 39: 7197-7204, 2000] y la subfamilia II se enlazan tanto a los ácidos grasos como a sus ligandos nativos. Además, las sustituciones de aminoácidos individuales pueden interconvertir las propiedades de unión al ligando de las proteínas de las subfamilias I y II [Jakoby MG, Miller KR, Toner JJ, Bauman A, Cheng L, Li E y Cistola DP. Las interacciones electrostáticas ligando-proteína gobiernan la especificidad de las proteínas de unión a retinol y ácidos grasos. Biochemistry 32: 872-878, 1993].

[0007] Patente de EE.UU. N^{os} 5,470,714, US 6,444,432, US 7,601,510 y la publicación de EE.UU. 2010/0298162, describe métodos para la generación de sondas y las sondas para la determinación de analitos no unidos. Estas sondas se construyeron utilizando formas nativas o mutantes de proteínas de la familia iLBP. Como se mencionó anteriormente, esta familia incluye FABPs [Banaszak L, Winter N, Xu Z, Bernlohr DA, Cowan S y Jones TA. Proteínas de unión a lípidos Una familia de proteínas transportadoras de ácidos grasos y retinoides. Adv Protein Chem 45: 89-151, 1994; Bernlohr DA, Simpson MA, Hertzell AV y Banaszak LJ. Proteínas de unión a lípidos intracelulares y sus genes. Annu Rev Nutr 17: 277-303, 1997]. Las FABP son proteínas intracelulares de aproximadamente 15 kDa de peso molecular y tienen un sitio de unión que en las proteínas de tipo silvestre se une a 1 o 2 FFA, así como a otros metabolitos.

[0008] El documento WO 2009/092047 describe sondas fluorescentes marcadas con cisteína y, a este respecto, enseña una respuesta a dos longitudes de onda diferentes, estando el segundo fluoróforo unido a la misma proteína que el primer fluoróforo.

[0009] El documento WO 2008/060841 describe la sonda L24P19C7 pero no enseña una respuesta en dos longitudes de onda diferentes usando dos fluoróforos diferentes, de los cuales solo uno está unido a la sonda.

Resumen de la invención

[0010] Se describe en este documento la identificación de sondas que son altamente específicas para bilirrubina no enlazada y métodos para usar estas sondas para determinar concentraciones de bilirrubina no enlazadas en muestras que van desde soluciones acuosas simples hasta muestras biológicas complejas que incluyen fluidos humanos (sangre, csf, orina, intersticial) que incluye uno o más de los siguientes pasos:

generando las sondas utilizando los métodos de US 7,601,510 y la publicación US 2010/0298162 y el método de generar las sondas de bilirrubina mediante el uso de un segundo fluoróforo libre o un segundo fluoróforo unido o incrustado en un sustrato sólido o polímero, como una proteína, poldextrano, o poliestireno, por ejemplo, y la calibración de las sondas para determinar la constante de disociación mediante las ecuaciones (1 a 3),

identificando métodos para vincular sondas a sustratos sólidos y describiendo las propiedades de dichas sondas en dispositivos y describiendo métodos para la determinación precisa de los niveles de bilirrubina no enlazada en tales dispositivos [las propiedades a determinarse incluyen: efectos sobre disociación de sonda, tampón de albúmina, enlace a bilirrubina para enlazar y no sondear, tasas de equilibrio de perlas en comparación con la solución, relación de solución a medidas sólidas],

refinando la especificidad de la sonda de bilirrubina mediante una combinación de pruebas en soluciones acuosas definidas contra un panel de posibles agentes interferentes que incluyen metabolitos comunes, medicamentos, fotoisómeros de bilirrubina y bilirrubina conjugada y otras proteínas para lograr una especificidad consistente con otras contribuciones de analitos equivalentes a menos de 1 nM bilirrubina o algún nivel médicamente adecuado,

ensayando la cuantificación mediante la medición de bilirrubina no enlazada en plasma humano definido enriquecido con bilirrubina para asegurar la especificidad de la bilirrubina no enlazada en muestras de sangre humana,

utilizando sondas en solución o unidas a superficies sólidas y calculando concentraciones de bilirrubina no enlazadas como se describe en las ecuaciones (4 y 5).

[0011] Las sondas basadas en un iLBP se describen, tal como la proteína de unión a lípidos que corresponde a SEQ ID NO: 3 que incluye una o más sustituciones de aminoácidos y un fluoróforo. La presente invención proporciona una composición que comprende (a) una sonda que se une a la bilirrubina pero que no se une significativamente al ácido graso, la sonda que comprende una mutación de proteína de unión a lípidos intracelular (iLBP) marcada con un primer

floróforo y se selecciona del grupo como se describe en la reivindicación 1, y (b) un segundo fluoróforo, en el que el segundo fluoróforo está libre en solución o unido a una proteína que no se une a la bilirrubina, en el que el primer fluoróforo y el segundo fluoróforo son capaces de excitarse en la misma longitud de onda, en donde el segundo fluoróforo no está unido a la sonda, y en donde la longitud de onda de emisión del primer fluoróforo y el segundo fluoróforo son diferentes, y en donde el segundo fluoróforo no cambia su emisión en respuesta a la unión de la bilirrubina a la muteína de iLBP.

[0012] En una realización preferida, la sonda incluye sustituciones 14R, 18L, 25C, 27A, 38V, 60R, 73 F, 106L, 115R, 117D, opcionalmente en combinación con Rodamina B (BL22P1B11).

[0013] En otra realización preferida, la sonda incluye sustituciones 14R, 18L, 38V, 60R, 73 F, 106C, 115R y 117D, en combinación con Rodamina B (L24P19C7).

[0014] Preferiblemente, una plantilla de polinucleótido codifica muteínas iLBP que tienen una etiqueta de afinidad escindible o no escindible. Más preferiblemente, la plantilla de polinucleótido de plantilla codifica muteínas de iLBP que tienen una etiqueta de afinidad de poli-histidina y la matriz sólida incluye un quelato metálico inmovilizado.

[0015] Las muteínas iLBP pueden marcarse con un solo fluoróforo a un pH de menos de 8 de manera que el fluoróforo reacciona preferentemente con la cadena lateral de cisteína. Preferiblemente, el fluoróforo es acrilodano, dancil aziridina, 4-[N-[(2-yodoacetoxi)etilo]-N-metilamino]-7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol éster (IANBDE), 4-[N-[(2-yodoacetoxi)etilo]-N-metilamino-7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol (IANBDA), Texas Red C2- Maleimida, Lucifer yodoacetamida amarilla, Alexafluor 680 maleimida, Kodak X-Sight 670 LSS, Texas Red, C5-Bromoacetamida, Alexa Fluor 750 C5-maleimida, o BODIPY 577/618,

[0016] Las muteínas iLBP también pueden marcarse con un solo fluoróforo a un pH mayor de 8, de modo que el fluoróforo reacciona preferentemente con una amina, tal como el término amino de proteínas o una cadena lateral de lisina. Preferiblemente, el fluoróforo es acrilodano o un fluoróforo que emite una longitud de onda más larga, como los tintes Alexa Fluor, los tintes Bodipy, los derivados de la fluoresceína, los derivados de rodamina, Texas Red, Biotium CF750 SE, el tinte Kodak X-Sight 670 LSS, el LiCor IRDye 680 LT o el LiCor IRDye 700DX.

[0017] La presente invención proporciona composiciones que tienen una muteína iLBP marcada con un primer fluoróforo según la reivindicación 1. El segundo fluoróforo es libre en solución o unida a una proteína que no se une a la bilirrubina. Preferiblemente, el primer fluoróforo y el segundo fluoróforo son capaces de excitarse en la misma longitud de onda y la longitud de onda de emisión del primer fluoróforo y el segundo fluoróforo son diferentes. Preferiblemente, el segundo fluoróforo no se ve afectado (no cambia su emisión) en respuesta a la unión de la bilirrubina a la muteína iLBP. Preferiblemente, el primer fluoróforo es acrilodano y el segundo fluoróforo se selecciona de rodamina B, NBD, amarillo de Lucifer, rojo de Texas, un colorante Bodipy y un colorante Alexa Fluor. Más preferiblemente, el primer fluoróforo es LiCor 700DX y el segundo fluoróforo es, por ejemplo, Texas Red o un tinte fluorado Alexa, o un tinte Bodipy.

[0018] Un cambio en la relación de índice de fluorescencia se puede medir a dos longitudes de onda diferentes y se usa para determinar la concentración de bilirrubina no enlazada.

[0019] La intensidad de emisión del fluoróforo unido a las sondas descritas en el presente documento puede no ser afectada por la absorbancia de los componentes de la sangre tales como la bilirrubina y la hemoglobina.

[0020] El primer fluoróforo puede estar unido a una cisteína y se selecciona de acrilodan, dancil aziridina, 4-[N-[(2-yodoacetoxi)etilo]-N-metilamino]-7-nitrobenz-2-oxa-1, éster de 3-diazol (IANBDE) y 4-[N-[(2-yodoacetoxi)etilo]-N-metilamino-7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol (IANBDA) y se puede seleccionar el segundo fluoróforo de los tintes Alexa Fluor, Bodipy, derivados de fluoresceína, derivados de rodamina y Texas Red.

[0021] El primer fluoróforo puede también estar unido a una lisina y se selecciona de acrilodan, Biotium CF750SE, Kodak X-Sight 670 tinte LSS, Licor Colorante IR 680 LT y Licor IR tinte 700DX y el segundo fluoróforo se pueden seleccionar de Alexa Fluor tintes, Bodipy, derivados de fluoresceína, derivados de rodamina y Texas Red.

[0022] Un segundo fluoróforo diferente se puede proporcionar como una molécula soluble libre en solución. Dicha sonda responde a la unión de la bilirrubina a la porción de proteína de la sonda con un cambio en la relación de un índice de fluorescencia medido a dos longitudes de onda diferentes. Esto permite que las sondas que no revelan un cambio en el índice de fluorescencia de la relación en respuesta a la unión de la bilirrubina se conviertan fácilmente en una sonda de relación mediante el uso de un segundo fluoróforo no unido que no revela una respuesta significativa a la bilirrubina. El segundo fluoróforo libre puede tener una longitud de onda de emisión más larga o más corta que el primer fluoróforo (unido a proteínas), pero ambos fluoróforos deben tener una longitud de onda de excitación común. Por ejemplo, el primer fluoróforo (unido a proteínas) es acrilodano y los ejemplos del segundo incluyen, pero no se limitan a, rodamina B, NBD, amarillo de lucifer y rojo de Texas libres en solución o unidos o incrustados en otro polímero o sustrato sólido. Esta disposición tiene la ventaja de que la concentración del fluoróforo libre se puede ajustar

de manera que las intensidades de emisión de ambos fluoróforos sean similares, incluso cuando la longitud de onda de excitación máxima para el segundo fluoróforo es diferente de la del primer fluoróforo. Este tipo de sonda de relación que utiliza un segundo fluoróforo diferente no unido a la sonda elimina el problema de la transferencia de energía que apaga uno de los dos fluoróforos por el otro, típicamente cuando ambos fluoróforos están ubicados en la misma macromolécula, como una proteína.

[0023] En algunos casos, el N terminal MAFD puede sustituirse por MGIFD.

[0024] En las sondas, el fluoróforo se une preferiblemente a un residuo de cisteína. Preferiblemente, se selecciona el fluoróforo de acrilodan, dancil aziridina, 4-[N-[(2-yodoacetoxi)etilo]-N-metilamino]-7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol éster (IANBDE), 4-[N-[(2-yodoacetoxi)etilo]-N-metilamino-7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol (IANBDA), Texas Red C2-Maleimida, Lucifer yodoacetamida amarilla, Alexafluor 680 maleimida, Kodak X-Sight 670 LSS colorante, Texas Red C2-maleimida, Texas Red C5-bromoacetamida, Alexa Fluor 750 C5-maleimida y BODIPY 577/618,

[0025] En las sondas el fluoróforo puede también estar unido a un residuo de lisina. Preferiblemente, el fluoróforo se selecciona de acrilodan, tintes Alexa Fluor, Bodipy, derivados de fluoresceína, derivados de rodamina, Texas Red, Biotium CF750 SE, colorante Kodak X-Sight 670 LSS, LiCor IRDye 680 LT y LiCor IRDye 700DX.

[0026] Las sondas pueden incluir dos o más etiquetas en el extremo C o N-terminal de la sonda en combinación con uno o más enlazadores para la fijación a un soporte sólido.

[0027] En algunas realizaciones preferidas, la composición está unida a un soporte sólido usando dos etiquetas His y dos enlazadores.

[0028] Las sondas pueden incluir una o más etiquetas, preferiblemente seleccionadas entre las etiquetas His y las etiquetas PS.

[0029] De acuerdo con otras realizaciones preferidas, el sustrato sólido puede incluir, pero no se limita a, poliestireno o perlas de látex y qué perlas pueden inmovilizarse sobre una superficie. Los ejemplos del uso de dichas partículas inmovilizadas incluyen, entre otros, adheridos a la superficie inferior de placas de múltiples pocillos para mediciones de alto rendimiento o en canales de dispositivos de microfluidos desechables. Los ejemplos de sondas de bilirrubina que están diseñadas para ser inmovilizadas en superficies incluyen las que están vinculadas mediante una reacción química con cisteína o lisina (los dos primeros grupos de la Tabla 8) a grupos apropiados en la superficie de soporte sólido, así como las vinculadas a través de covalentes interacciones (el tercer grupo de la Tabla 8 y los ejemplos 6 y 7). Además, se puede unir o incrustar un segundo fluoróforo dentro de la superficie del soporte sólido, separando así los dos fluoróforos para eliminar la transferencia de energía y obtener así una respuesta de relación a la unión de la bilirrubina. Además, se puede unir un segundo fluoróforo a otra proteína, como un iLBP u otro tipo de polímero, como el dextrano, que no se une o no responde a la bilirrubina.

[0030] Preferiblemente, el sustrato sólido es una perla de poliestireno o látex, perla Ni-agarosa, opcionalmente con núcleo de hierro, y/o un dispositivo de microfluidos o placa de múltiples pocillos. Las sondas seleccionadas para unirse al sustrato sólido pueden contener cualquiera de las modificaciones descritas anteriormente, solas o en combinación, incluidas, entre otras, modificaciones en el extremo N, enlazadores y sustituciones de lisinas de superficie (KR6 y KR14).

[0031] Una sonda se puede etiquetar para su unión al sustrato sólido. Dicha etiqueta incluye uno o más de etiqueta His, biotina, epítipo Flag, epítipo c-myc, etiqueta HA, glutatión-S-transferasa (GST), proteína de unión a maltosa (MBP), un dominio de unión a quitina (CBD), Tiorredoxina, β -galactosidasa, glicoproteína VSV, proteína de unión a la calmodulina, una etiqueta hidrofóbica de poliestireno (PS) y una etiqueta de afinidad metálica.

[0032] El sustrato sólido incluye un segundo fluoróforo. El segundo fluoróforo se puede unir a una proteína que no se une a la bilirrubina.

[0033] Una muteína iLBP que tiene una única cisteína o lisina marcada con un colorante fluorescente también se da a conocer. Preferiblemente, cualquier lisina de superficie o cualquier otra cisteína con actividad de marcaje fluorescente bajo condiciones de marcaje específicas de cisteína/lisina se reemplazan con otro aminoácido, preferiblemente alanina o arginina. Se utiliza una plantilla de muteína iLBP correspondiente a la SEQ ID NO: 3 y la lisina en la posición 27 es altamente reactiva y está mutada, típicamente a la alanina.

[0034] La bilirrubina se puede complejar con una macromolécula portadora tal como albúmina, proteínas de unión a lípidos, vesículas lipídicas o ciclodextrina. El complejo de bilirrubina y la macromolécula portadora amortiguan la concentración de la bilirrubina no enlazada que proporciona la fijación de un nivel de bilirrubina no enlazada. La macromolécula transportadora puede ser albúmina. La albúmina puede ser albúmina sérica humana que tiene una afinidad mayor por la bilirrubina que, por ejemplo, la albúmina sérica bovina y, por lo tanto, es un tampón de albúmina más preferido para la bilirrubina.

[0035] La absorbancia de bilirrubina puede solaparse con la longitud de onda de excitación de fluoróforo de la sonda de la bilirrubina y la calibración se realiza en una cubeta donde la longitud del camino d es suficientemente grande para que la absorbancia de filtro interno sea significativa. En este caso, las intensidades de emisión del fluoróforo deben corregirse para la absorbancia del filtro interno debido a la absorbancia de bilirrubina en la longitud de onda de excitación y posiblemente en la longitud de onda de emisión antes de ajustar la ecuación de calibración a los datos de titulación de la sonda de bilirrubina o al determinar la concentración de bilirrubina (no enlazada) libre $[B_f]$ con ecuaciones 4 o 5. La ecuación para las intensidades de emisión corregidas ($I_{\lambda em}^{Corr}$) es:

$$I_{\lambda em}^{Corr} = I_{\lambda em} 10^{B_T \epsilon(\lambda_{ex}) \frac{d}{2}} \quad (1)$$

donde $I_{\lambda em}$ es la intensidad de emisión de fluorescencia medida en la longitud de onda λ_{em} , B_T es la concentración total de bilirrubina, $\epsilon(\lambda_{ex})$ es el coeficiente de extinción de la bilirrubina en la excitación o longitud de onda de emisión (λ_{ex}) y d es la longitud de trayectoria de cubeta. Ya que la ecuación (1) indica que la corrección del filtro interno requiere el conocimiento de la concentración total de bilirrubina (B_T), que también debe medirse para determinar $[B_f]$. La corrección de la excitación del filtro interno es importante para sondas de bilirrubina de fluoróforo, sin proporción, para las cuales se utiliza la ecuación (2) para la calibración.

[0036] También se describen los métodos para calibrar las sondas de bilirrubina mediante la mezcla de la sonda con una muestra acuosa de la bilirrubina, la medición de la fluorescencia, y la determinación de los parámetros de calibración de la fluorescencia medida por ajuste con las siguientes ecuaciones 1 y 2 o 3:

$$\frac{I_{\lambda em}}{I_o} = 1 - \frac{(K_d + B_t + P_T) \cdot \sqrt{(K_d + B_t + P_T)^2 - 4B_T P_T}}{2P_T} \quad (2)$$

$$R = - \frac{\sqrt{(P_T^2 + (2K_d - 2B_T)P_T + K_d^2 + 2B_T K_d + B_T^2)(rR_o^2 - R_o) + (P_T + K_d - B_T)rR_o^2 + (-P_T + K_d + B_T)R_o}}{2(B_T r^2 R_o^2 - (P_T + K_d + B_T)rR_o + P_T)} \quad (3)$$

donde $I_{\lambda em}$ es la intensidad de fluorescencia de la sonda en la muestra con el blanco restado, I_o es la intensidad de la sonda en ausencia de bilirrubina, P_T es la concentración total de la sonda de bilirrubina, B_T es la concentración total de bilirrubina, R es la relación de fluorescencia medida ($I_{\lambda 1}/I_{\lambda 2}$) donde $I_{\lambda 1}$ es la intensidad de fluorescencia del primer fluoróforo a la longitud de onda λ_1 e $I_{\lambda 2}$ es la intensidad de fluorescencia del segundo fluoróforo a la longitud de onda λ_2 , R_o es la relación en ausencia de bilirrubina, r es la relación $I_{\lambda 2}/I_{\lambda 1}$ de la sonda en ausencia del segundo fluoróforo, y K_d es la constante de disociación.

[0037] También se describen métodos de medición de la concentración de bilirrubina libre $[B_f]$ siguiendo una combinación de los siguientes pasos, que incluyen medir opcionalmente la fluorescencia de la muestra, mezclar la sonda con una muestra y medir la fluorescencia, opcionalmente, restar la muestra de la sonda con fluorescencia de la muestra y extrayendo la concentración de $[B_f]$ de la fluorescencia medida.

[0038] Al menos una de las siguientes ecuaciones 4-6 se pueden usar para calibrar la sonda y/o medir $[B_f]$:

$$[B_f] = K_d \left(\frac{I_o}{I_{\lambda em}} - 1 \right). \quad (4)$$

$$[B_f] = K_d \left(\frac{(R - R_o)}{(RrR_o - R)} \right) \quad (5)$$

donde, $I_{\lambda em}$ es la intensidad de fluorescencia de la sonda en la muestra con el blanco restado, I_o es la intensidad de la sonda en ausencia de bilirrubina, R es la relación de fluorescencia medida ($I_{\lambda 1}/I_{\lambda 2}$) donde $I_{\lambda 1}$ es la intensidad de fluorescencia del primer fluoróforo en longitud de onda λ_1 y $I_{\lambda 2}$ es la intensidad de fluorescencia del segundo fluoróforo en la longitud de onda λ_2 , R_o es la relación en ausencia de bilirrubina, r es la relación $I_{\lambda 2}/I_{\lambda 1}$ de la sonda en ausencia del segundo fluoróforo, K_d es la constante de disociación y I_s es la intensidad de emisión a la saturación de bilirrubina de la sonda.

[0039] Según la invención, una sonda está marcada con un fluoróforo y un segundo fluoróforo es o bien libre en solución o unida a una proteína que no se une a la bilirrubina. Una sonda con un fluoróforo que se une o responde a la bilirrubina se puede unir a un sustrato sólido y el segundo fluoróforo se puede unir a otra proteína que también está unida al sustrato sólido pero que no se une ni responde a la bilirrubina.

5 **[0040]** La muestra puede comprender una macromolécula portadora para la bilirrubina tales como albúmina, proteínas de unión a lípidos, vesículas lipídicas o ciclodextrina.

10 **[0041]** La sonda se puede unir a un soporte sólido. Los microfluidos pueden permitir mediciones de muestras de sangre sin diluir.

15 **[0042]** Preferiblemente, la muestra es de un ser humano, un animal o una planta. La muestra puede ser de sangre entera, plasma en sangre, suero sanguíneo, orina, LCR, saliva, jugos gástricos, líquido intersticial o linfa. La muestra puede ser de pacientes que reciben infusión intravenosa de emulsiones de aceite. La muestra puede ser de pacientes que pueden estar produciendo, a partir de enfermedades o estrés, moléculas que desplazan a la bilirrubina de la albúmina. La muestra puede ser de pacientes sometidos a terapia fotográfica, transfusión u otras terapias que reducen los niveles de bilirrubina.

20 **[0043]** También se describen métodos para medir la concentración de FFA no unido en una muestra de sangre de los pacientes que recibieron infusión intravenosa de una emulsión de aceite por uno o más de los siguientes pasos:

opcionalmente, midiendo la fluorescencia de la muestra

25 mezclando la muestra y una sonda FFAu,

midiendo la fluorescencia de la sonda y

calculando la concentración de FFAu.

30 **[0044]** El riesgo de daño para el paciente en base a la concentración FFAu se puede determinar y se proporciona tratamiento para prevenir, tratar o reducir el riesgo de los daños.

35 **[0045]** Las realizaciones de la invención se dirigen a un kit que puede incluir uno o más dispositivos de recogida para recoger una muestra de un paciente, una composición de acuerdo con la presente invención que comprende las sondas tal como se describió anteriormente en un vehículo adecuado, y opcionalmente, un patrón de referencia que comprende una concentración conocida de bilirrubina no enlazada.

[0046] También se describen las sondas como se define en cualquiera de las Tablas 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 10.

40 **[0047]** También se describen métodos para determinar el riesgo de la bilirrubina no enlazada y/o toxicidad de FFA no unido en pacientes recibiendo una emulsión grasa (Intralipid®) que incluye uno o más de los siguientes pasos:

45 poner en contacto una muestra obtenida de un paciente con una o más sondas como ADIFAB2, L19CP10C7, L138P1H8N24C, L22P5E11, L61P8B12, L4BP4B9 y L119P3E5 para determinar los niveles de uno o más FFAu,

determinar los niveles de bilirrubina no enlazada, y

50 comparando los niveles de FFAu y bilirrubina no enlazada con los niveles obtenidos de una población normal para determinar el riesgo de toxicidad.

55 **[0048]** También se describe un sustrato sólido, que incluye una sonda tal como un iLBP, donde la proteína de unión de lípidos corresponde a SEQ ID NO: 3 que tiene una o más sustituciones de aminoácidos y un fluoróforo. Preferiblemente, el fluoróforo está unido a un residuo de lisina, el grupo amino del extremo N de la iLBP, o a una sustitución de cisteína. Preferiblemente, la sonda se une al ácido graso y se une al sustrato sólido. Preferiblemente, el sustrato sólido es una perla de poliestireno o látex, perla de Ni-agarosa, opcionalmente con núcleo de hierro, dispositivo microfluídico o placa de múltiples pocillos.

60 **[0049]** La sonda unida al sustrato sólido puede tener un extremo N-terminal modificado en el que MAFD de la sonda está sustituida con MGIFD, MGCFD, o MGGSATGIFD.

65 **[0050]** La sonda unida a los sustratos sólidos pueden tener modificaciones de lisinas superficiales tales como sustituciones 7R 20R 46R 100R125R y 130R (KR6), más preferiblemente las sustituciones 7R 16R 20R 29R 37R 46R 50R 88R 92R 94R 100R 125R 129R y 130R (KR14).

[0051] La sonda unida al sustrato sólido puede incluir al menos un ligador tal como ACSGGG, SAGCGG,

GGGCCG, GSGGCG, DTAGCG, GDCGGG, GCSGAG, GGDGCG, SSNSCG, SDCAYG, DTNCGG, GSGCSG, GCGCGG, ANACGG, GGACGG, GNCGGG, CGGSCG, GSTSCG, DGGCSG, ATSCGG, ASCGYG, DGACGG, GSGSGSGG, GGGSGGGSGGGTGGGSGGGRRADAA, SRAWRHPQFGG, RAFIASRRIRRP, RLLLRRLRR, RIIIRRR, AAS, NDN, PSNTNHNSNSN, SHRATPNTSPH y combinaciones de los mismos.

[0052] La sonda unida al sustrato sólido puede ser etiquetada para su unión al sustrato sólido. Preferiblemente, la etiqueta incluye uno o más de etiqueta His, biotina, epítipo Flag, epítipo c-myc, etiqueta HA, glutatión-S-transferasa (GST), proteína de unión a maltosa (MBP), un dominio de unión a quitina (CBD), Tiorredoxina, β -galactosidasa, glicoproteína VSV, proteína de unión a la calmodulina, una etiqueta hidrofóbica de poliestireno (PS) y una etiqueta de afinidad metálica.

[0053] El sustrato sólido puede incluir un segundo fluoróforo, opcionalmente unido a una proteína que no se une FFAu.

[0054] La sonda unida al sustrato sólido puede incluir una etiqueta y el sustrato sólido tiene un receptor para la etiqueta. Preferiblemente, la etiqueta es una etiqueta de poli-histidina y el sustrato sólido incluye un quelato de metal inmovilizado.

[0055] Otros aspectos, características y ventajas de esta invención resultarán evidentes a partir de la descripción detallada de las realizaciones preferidas que siguen.

Breve descripción de los dibujos

[0056] Estas y otras características de esta invención se describirán ahora con referencia a los dibujos, que están destinados a ilustrar y no a limitar la invención.

La Figura 1A muestra I_{525}/I_0 frente a la concentración de bilirrubina para la sonda L24P19C7, La Figura 1B muestra las concentraciones medidas de bilirrubina libre [Bf] frente a la concentración de oleato para la sonda L24P19C7 en presencia y ausencia de bilirrubina (3 μ m). La Figura 1C muestra las concentraciones de bilirrubina libre [Bf] frente a la concentración creciente de bilirrubina agregada para la sonda L24P19C7.

La Figura 2 muestra I_{525}/I_0 frente a la concentración de bilirrubina para la sonda L24P19C7-Xc, donde Xc denota diferentes posiciones de cisteína individuales marcadas con acrilodan.

La Figura 3 muestra los resultados en suero de adulto con picos. Se muestra I_{525}/I_0 frente a la concentración creciente de bilirrubina agregada para la sonda BL22P1B11,

La Figura 4 muestra la calibración de la sonda BL22P1B11-Rh realizada midiendo la relación I_{525}/I_{575} al aumentar la bilirrubina total. El ajuste de la curva de titulación con la ecuación (3) se utiliza para determinar K_d .

La figura 5 muestra que la unión de ditaurobilirrubina ($K_d = 300$ nM), un modelo para bilirrubina conjugada, a la sonda de bilirrubina BL22P1B11-Rh, es aproximadamente 19 veces más débil que para la unión de bilirrubina no conjugada ($K_d = 16$ nM).

La Figura 6 muestra que BL22P1B11-Rh controla la disminución de la bilirrubina no enlazada al aumentar la exposición de la bilirrubina a una irradiación de 460 nm. Esto implica que BL22P1B11-Rh es insensible a la presencia de productos de fotooxidación y fotoisómeros de bilirrubina que se producen con una radiación de 460 nm y, por lo tanto, debe proporcionar un método para monitorear con precisión la efectividad de la fototerapia para tratar la toxicidad de la bilirrubina.

La Figura 7 muestra las mediciones de [Bf] realizadas con BL22P1B11-Rh en un Fluorolog3 (JY Horiba) (\diamond) usando cubetas de 10X10mm o en un medidor FFAu (FFA Sciences) (o) modificado para medir la bilirrubina no enlazada al reemplazar los filtros de emisión con los centrados a 525 y 580 nm. Las mediciones de [Bf] también se realizaron en las mismas muestras utilizando el método de peroxidasa de [Jacobsen J y Wennberg RP. Determinación de bilirrubina no enlazada en el suero de recién nacidos. Clin Chem 20: 783, 1974] (m). Los resultados indican resultados prácticamente idénticos para las 3 mediciones y una buena concordancia entre los resultados medidos y los pronosticados para la unión de bilirrubina a un solo sitio de albúmina humana con un $K_d = 20$ nM.

La Figura 8 muestra los resultados de la extinción de la bilirrubina para la sonda PS19-1 inmovilizada en perlas de Ni-agarosa inmovilizadas en un "pocillo" de un conjunto de cartuchos desechables de microcanales diseñados para mediciones fluorométricas. Se agregaron muestras de plasma de sangre humana adulta enriquecida con bilirrubina de 20 μ l, sin diluir, a los cartuchos y la extinción de la fluorescencia DX700 por bilirrubina no enlazada se ajustó a los datos mediante la ecuación (5) para determinar la K_d .

La Figura 9 muestra la calibración de la sonda BL22P1B11-Dextran-Texas Red realizada mediante la medición de la relación I_{525}/I_{615} al aumentar la bilirrubina total. El ajuste de la curva de titulación con la ecuación (3) se utiliza para determinar la K_d .

Descripción detallada de la realización preferida

[0057] Para los propósitos de la presente descripción, "analitos" son moléculas cuyo peso molecular es de aproximadamente 2000 Da o menos y analitos no unidos son estas moléculas en solución acuosa. Estos incluyen metabolitos y moléculas fisiológicamente importantes que ocurren naturalmente en el curso de la fisiología o

fisiopatología humana o animal, y moléculas de fármacos y sus productos metabólicos y moléculas de nutrientes y sus productos metabólicos. Dependiendo de su solubilidad, una fracción de cada analito está presente como monómeros en solución acuosa (cargada o neutra). Esta fracción se conoce como la fracción de "analito libre o no unido" e incluye los metabolitos no unidos (METu).

[0058] Para los fines de la presente divulgación bilirrubina es de bilirrubina no conjugada IX α [McDonagh AF, Vreman HJ, Wong RJ y Stevenson DK. Fotoisómeros: ¿factores ofuscantes en las mediciones clínicas de la peroxidasa de la bilirrubina no enlazada? *Pediatría* 123: 67-76, 2009]. La bilirrubina no enlazada es el monómero acuoso de la bilirrubina IX α no conjugada, a diferencia de la bilirrubina que en el plasma sanguíneo generalmente se encuentra unida a la albúmina.

[0059] Para los fines de la presente descripción, el término "lípidos" se toma para tener su significado normal y habitual y define un compuesto químico que es más soluble en un disolvente orgánico, pero tiene algún nivel de solubilidad en la fase acuosa (la fracción que no está unida). Por consiguiente, una "proteína de unión a lípidos" incluye cualquier proteína capaz de unirse a un lípido como lípido como se define aquí.

[0060] Los niveles de moléculas no unidas, como por ejemplo la bilirrubina, los lípidos, incluidos los ácidos grasos, las hormonas y los productos metabólicos, pueden proporcionar información sobre el diagnóstico de la salud y la enfermedad cuando se miden en fluidos humanos o animales apropiados. Cada vez es más evidente que la determinación de la concentración no unida (también conocida como "fase acuosa" o "libre") de tales moléculas proporciona información crítica sobre la homeostasis fisiológica. Muchos metabolitos son moléculas hidrófobas con baja solubilidad acuosa y concentraciones no unidas que son mucho más bajas que su concentración "total", donde la mayor parte del "total" puede estar unida a proteínas o células. En los fluidos biológicos, la concentración de las moléculas no unidas a menudo se regula para mantener una concentración relativamente unida relativamente constante en condiciones fisiológicas normales. Esta regulación se produce a través de la interacción de las moléculas con una proteína transportadora como, por ejemplo, la albúmina. Así, la mayoría de las moléculas están generalmente unidas a la albúmina u otros portadores. Sin embargo, una pequeña fracción de las moléculas puede disociarse (y volver a unirse) de la albúmina a la fase acuosa y estas son las moléculas no unidas.

[0061] Para los propósitos de la divulgación presentes "sondas de bilirrubina" son iLBPs que están etiquetados con fluorescencia en uno o más residuos de cisteína o lisina y que experimentan un cambio en un índice de fluorescencia tras la bilirrubina de enlace. Una sonda de bilirrubina también puede ser un iLBP marcado con fluorescencia en un residuo de cisteína con un fluoróforo y en un residuo diferente, preferiblemente lisina, con un fluoróforo diferente, de modo que, si la fluorescencia de solo uno de los fluoróforos cambia al unirse a la bilirrubina, la relación de los índices de fluorescencia en 2 longitudes de onda será diferente. Una sonda de bilirrubina también puede comprender un iLBP marcado con fluorescencia en un residuo de cisteína o lisina con fluorescencia adicional proporcionada por un segundo fluoróforo que no está unido a la proteína sonda. En este caso, si la fluorescencia de solo uno de los fluoróforos cambia al unirse a la bilirrubina, la proporción de los índices de fluorescencia en 2 longitudes de onda será diferente. El segundo fluoróforo puede ser una molécula fluorescente libre en solución acuosa o puede unirse a una molécula más grande, como un iLBP, que no responde y/o no se une a la bilirrubina o el segundo fluoróforo puede unirse a una superficie o la molécula no sensible unida al segundo fluoróforo, puede unirse a la superficie. Dichas sondas se pueden usar para determinar específicamente la concentración acuosa de bilirrubina no enlazada, que de otro modo es difícil debido a sus pobres propiedades de solubilidad en soluciones acuosas y debido a la presencia de otros metabolitos, especialmente ácidos grasos libres. Un cambio en la relación de la respuesta de fluorescencia es especialmente importante para la determinación precisa de las concentraciones intracelulares de la bilirrubina no enlazada y es importante para mejorar la precisión de la determinación de las concentraciones extracelulares de la bilirrubina no enlazada.

[0062] Desafortunadamente, a pesar de la disponibilidad de estructuras de proteínas y estructuras co-complejo con ligandos de interés, estado de la técnica de la teoría molecular existente no es suficiente para diseñar sondas con cualquier especificidad de metabolito deseado y sensibilidad de novo. Por lo tanto, típicamente se requiere una extensa experimentación para encontrar sondas de proteínas mutantes que no solo se enlazan con la especificidad deseada, sino que también producen el cambio requerido en la señal indicativa de la unión del ligando. La detección incluso de una proteína única por su afinidad de unión para la bilirrubina y la especificidad para un rango de analitos adicionales requiere un tiempo extenso para la purificación de proteínas, el desarrollo de métodos para medir la unión de diferentes analitos y la medición de las isotermas de unión de cada analito. [La detección sistemática de alto rendimiento de proteínas mutantes no es posible porque, en general, las proteínas mutantes sin un marcador de fluorescencia no producen una señal medible tras la unión del analito.] Una vez que se caracteriza la interacción proteína-analito, se requiere experimentación adicional para la química de la reacción del fluoróforo y la sonda de caracterización de la respuesta de fluorescencia. Además, en general, las propiedades de unión analito-proteína son diferentes a las de la interacción analito-sonda. Por lo tanto, la sonda desarrollada utilizando una proteína, encontrada después de una experimentación extensa para tener la especificidad de unión deseada para la bilirrubina, puede no generar un cambio significativo de fluorescencia tras la unión de la bilirrubina. En su lugar, lo que se necesita son métodos para generar rápidamente y detectar miles de sondas mutantes resultantes.

[0063] La patente de EE.UU. 7,601,510 y la publicación de Estados Unidos 2010/0298162, y [Huber AH, Kampf JP,

Kwan T, Zhu B y Kleinfeld AM. Sondas fluorescentes específicas de ácidos grasos y su uso en la resolución de mezclas de diferentes ácidos grasos libres no unidos en equilibrio con albúmina. *BioChemistry* 45: 14263-14274, 2006] describe métodos para la generación de sondeos de alto rendimiento que permiten el desarrollo de sondas con alta especificidad para la determinación de analitos no unidos. Tanto la patente de EE.UU. 7,601,510 como la publicación de EE.UU. 2010/0298162 describen el desarrollo de sondas específicas de bilirrubina. La presente invención se refiere a mejoras críticas en la tecnología de bilirrubina descrita en la Patente de EE.UU. 7,601,510 y la publicación de EE.UU. 2010/0298162 que mejoran la precisión para la determinación de niveles de bilirrubina no enlazada y que permiten que la tecnología se utilice en diferentes formatos de instrumentación. [De manera importante, estas sondas de bilirrubina anteriores descritas en la patente de EE.UU. 7,601,510 y la publicación de EE.UU. 2010/0298162 no fueron sondas de ratio. La presente invención describe el nuevo método para generar sondas de ratio mediante el uso de un segundo fluoróforo que no está unido a la sonda sensible a la bilirrubina a la que está unido el primer fluoróforo. La presente invención también describe la sorprendente extinción de las sondas de longitud de onda largas por bilirrubina. Además, la invención describe métodos para unir sondas de bilirrubina y FFAu a superficies sólidas y usar tales composiciones para medir bilirrubina no enlazada y FFAu en dispositivos microfluídicos y cartuchos de muestra desechables.

[0064] Las sondas de bilirrubina se utilizan para determinar los niveles de bilirrubina no enlazada en muestras de sangre y los ácidos grasos son el metabolito más abundante en la sangre que tienen propiedades similares a la bilirrubina. Los ácidos grasos compiten con la bilirrubina para unirse a la albúmina y tienen concentraciones no unidas que son similares a la bilirrubina. Las sondas de bilirrubina se desarrollan a partir de mutantes iLBP que generalmente tienen una alta afinidad por los ácidos grasos. Por lo tanto, el primer paso para descubrir las sondas de bilirrubina a partir de las sondas de miteína iLBP es la selección de más de 300.000 de estas sondas con hasta 11 de los ácidos grasos más abundantes para identificar las sondas que no responden significativamente a los ácidos grasos. Más de 10.000 no respondedores de ácidos grasos de este tipo ("biblioteca de no respondedores") han sido identificados por $\Delta R/\Delta R_{ADIFAB2}$ (Patente de EE.UU. 7,601,510) $<0,1$. Este punto de referencia cuantitativo indica que la afinidad de estas sondas por los ácidos grasos es en general al menos 10 veces más pequeña que la de la sonda de referencia ADIFAB2. La selección de estas sondas no respondedoras con bilirrubina identifica las sondas y/o plantillas de bilirrubina potenciales que se utilizan para la generación de nuevas bibliotecas de sondas de miteína mediante la mutagénesis adicional de la proteína plantilla recientemente identificada. Esta nueva biblioteca se analiza para determinar la respuesta a los ácidos grasos y la bilirrubina y las sondas identificadas como las más sensibles a la bilirrubina y las menos sensibles a los ácidos grasos se identifican como sondas de la bilirrubina o pueden usarse para rondas adicionales de mutagénesis y cribado.

[0065] Las sondas de bilirrubina identificadas por estos métodos que tienen propiedades útiles, que incluyen una respuesta significativa a la bilirrubina y una respuesta de cero a baja a los ácidos grasos, se caracterizan adicionalmente. Una sonda que no responde significativamente a FFA significa que la unión a FFA es 10 veces menor que la unión a la bilirrubina. Preferiblemente, la unión a FFA es 100 veces menor que la unión a bilirrubina. Esto incluye la calibración para determinar la afinidad de unión a la bilirrubina de la sonda y las características de fluorescencia, así como el monitoreo de los niveles de bilirrubina no enlazada en soluciones acuosas que contienen bilirrubina y albúmina de suero humano para identificar la competencia potencial con los ácidos grasos. Se pueden generar sondas no sensibles en las que los ácidos grasos se enlazan a la sonda, pero no generan un cambio en la fluorescencia. En este caso, los ácidos grasos en muestras de sangre podrían competir con la bilirrubina para unirse a la sonda y, por lo tanto, dar como resultado una determinación inexacta de los niveles de bilirrubina no enlazada. La competencia con ácidos grasos se evalúa determinando si la respuesta de fluorescencia de una sonda de bilirrubina más bilirrubina se altera mediante la adición de ácidos grasos.

[0066] Se seleccionaron las sondas de bilirrubina por los métodos anteriores para producir concentraciones precisas de bilirrubina en soluciones con bilirrubina y albúmina y que no exhiben una competencia de ácidos grasos detectables para pruebas adicionales en muestras de sangre humana. Las muestras de plasma sanguíneo de donantes individuales, así como las muestras combinadas de fuentes comerciales, se utilizan para determinar si las sondas de bilirrubina proporcionan concentraciones precisas de bilirrubina en plasma no enlazada en muestras que tienen niveles esencialmente desconocidos de analitos comúnmente presentes en muestras de sangre humana. Esto se logra determinando la concentración de albúmina en cada muestra y valorando las muestras de sangre con bilirrubina para obtener una relación de bilirrubina: albúmina bien definida. La concentración de bilirrubina no enlazada se mide luego con la sonda y los resultados se comparan con a) las concentraciones de bilirrubina no enlazada se miden en soluciones acuosas de bilirrubina-albúmina que tienen las mismas proporciones de bilirrubina: albúmina y b) con las concentraciones de bilirrubina no enlazada determinadas usando el ensayo de peroxidasa [Jacobsen J y Wennberg RP. La determinación de bilirrubina no enlazada en el suero de recién nacidos. *Clin Chem* 20: 783, 1974]. La equivalencia de la sonda determinó las concentraciones plasmáticas de bilirrubina no enlazada con aquellas determinadas en las soluciones de bilirrubina-albúmina y con el ensayo de peroxidasa confirma que los componentes sanguíneos distintos de la bilirrubina no enlazada no tienen un efecto detectable en el rendimiento de la sonda.

[0067] Un aspecto importante de la patente de EE.UU. 7,601,510 y la publicación de EE.UU. 2010/0298162 es que permiten el paso anteriormente necesario y exigente de caracterización de la unión de bilirrubina a la proteína que se omite; sólo se caracteriza la propia sonda. Esto es importante no solo para evitar el paso de caracterización de proteínas, sino también porque las propiedades de la sonda a menudo no son predecibles a partir de las características

de unión ligando-proteína. Por ejemplo, diferentes proteínas pueden tener afinidades de unión muy similares, pero la respuesta de fluorescencia de sus sondas derivadas puede ser bastante diferente.

5 **[0068]** Las sondas de bilirrubina descritas anteriormente se marcaron solo con acrilodan, principalmente en la lisina 27 de la SEQ 3: (Patente de EE.UU. 7,601,510). Se marcaron sondas de bilirrubina adicionales con dos fluoróforos diferentes, acrilodan en la lisina 27 de la SEQ 3: y maleimida Texas red en la cisteína de un aducto MGCFD N terminal en dos versiones, una sin y otra con la sustitución KR14 ("KR14" es una abreviatura de se refiere a la mutación de las siguientes 14 lisinas superficiales a arginina en la SEQ. SEQ 3: 7R 16R 20R 29R 37R 46R 50R 88R 92R 94R 100R 10 125R) que reduce el etiquetado de acrilodan múltiple (publicación de EE.UU. 2010/0298162). Estas sondas tienen buenas afinidades y respuestas a la bilirrubina y no fueron afectadas significativamente por los metabolitos no bilirrubinos en muestras de sangre humana. Sin embargo, las sondas de acrilodán solo pueden verse afectadas negativamente por el efecto de filtro interno de excitación mediada por bilirrubina en muestras con altas concentraciones de bilirrubina, una afección en hiperbilirrubinemia neonatal grave [Bhutani VK y Johnson L. The Jaundiced Newborn in Emergency Department: Prevention of Kernicterus. Clin Ped Emerg Med 9:149-159, 2008], y 15 por la presencia de hemoglobina en la muestra de sangre. Las sondas doble marcadas con acrilodán más un fluoróforo de longitud de onda más larga, como Texas Red, pueden tener intensidades de fluorescencia de acrilodano severamente reducidas debido a la transferencia de energía entre el acrilodán y el fluoroscopio secundario.

20 **[0069]** Para superar estas deficiencias y para ampliar el espectro de instrumentos sobre los que se pueden utilizar las sondas de bilirrubina, la presente invención describe nuevas sondas y nuevas formas del ensayo para la determinación de los niveles de bilirrubina no enlazada. Se identificaron nuevas bibliotecas de muteína en las que el fluoróforo inactivado por bilirrubina marca una cadena lateral de cisteína o lisina y se considera que la posición de esta cadena lateral es importante para optimizar el cambio de fluorescencia en la unión de bilirrubina. También se identifican las sondas de bilirrubina en las que el fluoróforo inactivado por la bilirrubina marca una o más cadenas laterales de cisteína 25 o lisina, pero se encuentra que la posición de una de las cadenas laterales es importante para optimizar el cambio de fluorescencia en la unión de la bilirrubina. También se han descubierto fluoróforos que pueden apagarse con bilirrubina y que se absorben y emiten en longitudes de onda largas donde no debería ocurrir la extinción de bilirrubina por transferencia de energía de tipo Förster. La unión de bilirrubina produce una extinción prácticamente completa de acrilodán y otros fluoróforos cuya emisión se produce en el rango de aproximadamente 380 nm a 550 nm, lo que se espera debido al alto grado de transferencia de energía de tipo Förster debido a la gran superposición de acrilodano y las emisiones de otros fluoróforos con absorbancia de bilirrubina. Totalmente inesperado fue el descubrimiento de la extinción de la fluorescencia por bilirrubina de fluoróforos de longitud de onda muy larga, incluidos los que se extienden en el infrarrojo (TABLAS 5 y 7). Debido a su larga longitud de onda, la absorbancia y la fluorescencia, dichos fluoróforos no se ven afectados por la absorbancia de la bilirrubina o la hemoglobina o de prácticamente cualquier otro 30 cromóforo potencialmente presente en las muestras de sangre.

35 **[0070]** También se describen métodos para generar sondas de relación de bilirrubina que se generan con un único fluoróforo en la proteína y con un segundo fluoróforo diferente o bien (a) libre en solución, (b) unido a una molécula más grande, tal como un polímero, que no responde y/o no se une a la bilirrubina, (c) incrustado en resina o polímero, o (d) unido, directa o indirectamente, a una superficie. Dicha sonda responde a la unión de la bilirrubina a la porción de proteína de la sonda con un cambio en la relación de un índice de fluorescencia medido a dos longitudes de onda diferentes. Esto también permite que las sondas que no revelan un cambio en el índice de fluorescencia de la relación en respuesta a la unión de la bilirrubina se conviertan fácilmente en una sonda de relación mediante el uso de un segundo fluoróforo no unido que no revela una respuesta significativa a la bilirrubina. Este tipo de sonda de relación, una que usa un segundo fluoróforo independiente, elimina el problema de la transferencia de energía entre los fluoróforos que se observan normalmente cuando ambos fluoróforos se encuentran en la misma macromolécula, como una proteína. Este enfriamiento reduce en gran medida la intensidad de la señal y, por lo tanto, disminuye la precisión y la precisión de la medición de la concentración de bilirrubina no enlazada. Esta evitación de la transferencia de energía se logra al no unir ambos fluoróforos a la misma molécula de sonda. De lo contrario, la evitación de la transferencia de energía tendría que lograrse restringiendo espacialmente los fluoróforos cuando el segundo fluoróforo está unido a la misma proteína pequeña.

40 **[0071]** También se describen sondas de bilirrubina que pueden unirse a sustratos sólidos, tales como poliestireno o perlas de látex y que los granos se pueden inmovilizar sobre una superficie para su uso en dispositivos de microfluidos desechables. Adicionalmente, se puede unir o incrustar un segundo fluoróforo dentro de las perlas, separando así los dos fluoróforos para eliminar la transferencia de energía y obtener así una respuesta de relación a la unión de la bilirrubina. Alternativamente, el segundo fluoróforo se puede unir a un iLBP o cualquier otro polímero que no responda y/o no se una a la bilirrubina y cuyo iLBP u otro polímero se una al sustrato sólido para que los dos fluoróforos permanezcan lo suficientemente separados para que la transferencia de energía no sea significativa.

50 **[0072]** También se describen métodos analíticos/matemáticos para la calibración y el uso de las sondas de bilirrubina. Sondas de bilirrubina se calibran para determinar su afinidad de unión para la bilirrubina (constante de disociación K_d) en condiciones, tales como temperatura, pH y composición de la solución, que corresponden a las muestras en las que se desea conocer la concentración de bilirrubina no enlazada. Las isotermas de unión se realizan en un tampón acuoso midiendo el cambio en la fluorescencia de las sondas de bilirrubina en respuesta al aumento de las concentraciones de bilirrubina ("datos de titulación"). El conjunto de respuestas de fluorescencia en cada 60

concentración de bilirrubina está equipado con una ecuación apropiada ("ecuación de calibración") que describe correctamente la respuesta de fluorescencia en función de la concentración de bilirrubina, la concentración de la sonda, las características espectroscópicas específicas y la K_d .

5 **[0073]** La absorbancia de bilirrubina puede solaparse con la longitud de onda de excitación de fluoróforo de la sonda de la bilirrubina y la calibración se realiza en una cubeta donde la longitud del camino d es suficientemente grande para que la absorbancia de filtro interno sea significativa. En este caso, las intensidades de emisión del fluoróforo deben corregirse para la absorbancia del filtro interno debido a la absorbancia de bilirrubina en la longitud de onda de excitación y posiblemente en la longitud de onda de emisión antes de ajustar la ecuación de calibración a los datos de
10 titulación de la sonda de bilirrubina. La ecuación para las intensidades de emisión corregidas ($I_{\lambda em}^{Corr}$) es:

$$15 \quad I_{\lambda em}^{Corr} = I_{\lambda em} 10^{B_T \epsilon(\lambda_{ex}) \frac{d}{2}} \quad (1)$$

donde $I_{\lambda em}$ es la intensidad de emisión de fluorescencia medida en la longitud de onda λ_{em} , B_T es la concentración total de bilirrubina, $\epsilon(\lambda_{ex})$ es el coeficiente de extinción de la bilirrubina en la excitación o longitud de onda de emisión (λ_{ex}) y d es la longitud de trayectoria de la cubeta. Al indicar la ecuación (1) el filtro interno, la corrección requiere el conocimiento de la concentración total de bilirrubina (B_T), que también debe medirse para determinar $[B_f]$.

25 **[0074]** La corrección de excitación del filtro interior es importante para solo fluoróforo, no ratio, sondas de bilirrubina para que la ecuación de calibración es:

$$30 \quad \frac{I_{\lambda em}}{I_o} = 1 - \frac{(K_d + B_t + P_T) - \sqrt{(K_d + B_t + P_T)^2 - 4B_T P_T}}{2P_T} \quad (2)$$

donde $I_{\lambda em}$ es la intensidad de fluorescencia de la sonda en la muestra con blanco (muestra sin sonda de bilirrubina) restada, y si la absorbancia del filtro interno es significativa $I_{\lambda em}^{Corr}$ de la ecuación (1) debe sustituirse por $I_{\lambda em}$ en la ecuación (2), I_o es la intensidad de la sonda en ausencia de bilirrubina, P_T es la concentración total de la sonda de bilirrubina y B_T es la concentración de bilirrubina total.

35 **[0075]** La corrección de excitación del filtro interior es importante para las sondas de fluoróforos individuales pero no afecta a la respuesta de las sondas de bilirrubina de relación, que responden a la bilirrubina por un cambio en la relación de emisiones de fluorescencia ($L_{\lambda 1}/\lambda 2$) en dos longitudes de onda $\lambda 1$ y $\lambda 2$. La relación, o valor de R , es igual a $I_{\lambda 1}/I_{\lambda 2}$. La valoración de bilirrubina de la sonda de relación para determinar la K_d , está bien descrita por la siguiente ecuación de calibración (3):

$$40 \quad R = - \frac{\sqrt{(P_T^2 + (2K_d - 2B_T)P_T + K_d^2 + 2B_T K_d + B_T^2)(rR_o^2 - R_o) + (P_T + K_d - B_T)rR_o^2 + (-P_T + K_d + B_T)R_o}}{2(B_T r^2 R_o^2 - (P_T + K_d + B_T)rR_o + P_T)} \quad (3)$$

donde R es la relación de fluorescencia medida ($I_{\lambda 1}/I_{\lambda 2}$), R_o es la relación en ausencia de bilirrubina, r es la relación ($I_{\lambda 2}/I_{\lambda 1}$) de la sonda en ausencia de segundo fluoróforo, B_T , P_T , y K_d son los mismos que en la ecuación (2).

50 **[0076]** concentraciones de bilirrubina libre ($[B_f]$) se determinan en muestras en las que $[B_f]$ está tamponada por el equilibrio de unión HSA y, por lo tanto, no se ve perturbado por la presencia de la sonda de bilirrubina. Las siguientes ecuaciones son para sondas de fluoróforo (5) y ratio (4) individuales respectivamente:

$$55 \quad [B_f] = K_d \left(\frac{I_o}{I_{\lambda em}} - 1 \right). \quad (4)$$

y

$$60 \quad [B_f] = K_d \left(\frac{(R - R_o)}{(RrR_o - R)} \right) \quad (5)$$

[0077] También se describe el desarrollo de moléculas de proteínas fluorescentes que se pueden utilizar para

determinar la concentración de analitos no unidos. Más particularmente, se describen 1) Identificación de las sondas de bilirrubina generadas por los métodos de la patente de EE.UU. 7,601,510 y la publicación de EE.UU. 2010/0298162 y también se describen las modificaciones de estos métodos, 2) el uso de dichas sondas para medicina clínica y ciencia básica, 3) Ejemplos de estas sondas para la determinación de la concentración de bilirrubina no enlazada en diferentes fluidos.

[0078] Las sondas de bilirrubina son proteínas iLBP que se han "marcado" mediante la adición covalente de una molécula fluorescente (fluoróforo) que muestra un cambio en un índice fluorescente al unirse a la bilirrubina. La sonda puede contener una sola cisteína o una única lisina accesible a la que se une covalentemente un fluoróforo.

[0079] La proteína puede ser "etiquetada" de modo que se une a un soporte sólido con alta afinidad. Esto incluye, entre otros, el etiquetado con biotina, epítipo Flag o epítipo c-myc o etiqueta HA, glutatión-S-transferasa (GST), proteína de unión a maltosa (MBP), un dominio de unión a quitina (CDB), tiorredoxina, β -galactosidasa, glicoproteína VSV, la proteína de unión a la calmodulina, una etiqueta hidrofóbica de poliestireno (PS) o una etiqueta de afinidad metálica, como una etiqueta His 6X. La asociación específica de la etiqueta de afinidad con el material de soporte sólido facilita las mediciones de bilirrubina sin unir en configuraciones de superficie plana que incluyen, entre otras, placas de múltiples pocillos y dispositivos de microfluidos. En virtud de su unión a soportes sólidos, las sondas pueden concentrarse en una región restringida y efectivamente bidimensional. Esto permite que las mediciones de bilirrubina no enlazada dentro de capas delgadas de soluciones de muestra puedan fluir a través de las sondas, que se limitan a la región de dos dimensiones efectiva. Esto permite de manera efectiva mediciones de fluorescencia en la superficie frontal, lo que reduce la absorbancia debido a la bilirrubina y la hemoglobina y facilita las mediciones en sangre total. Esta configuración también permite la posibilidad de muestras repetidas, alternadas con un bolo de lavado, o mediciones continuas de bilirrubina no enlazada haciendo fluir la muestra continuamente a través de las dos sondas limitadas dimensionalmente. La etiqueta de afinidad puede fusionarse en cualquiera de los terminales NH₂- o COOH- o en ambos terminales de forma simultánea, como se muestra por ejemplo en la Tabla 8. Una etiqueta de histidina A 6X puede fusionarse ya sea a los terminales FABP NH₂ - o COOH- o en ambos terminales simultáneamente sin cambiar significativamente las propiedades de unión de la bilirrubina de la proteína. El péptido de fusión puede estar compuesto por dos regiones de histidina separadas en el extremo COOH de la sonda. Las sondas pueden inmovilizarse sobre un soporte sólido que incluye, entre otros, perlas de poliestireno de Ni con o sin núcleos de hierro. Los núcleos de hierro facilitan la concentración magnética de las perlas de las sondas en las regiones de dos dimensiones efectivas de las placas de múltiples pocillos, hornos de microfluidos u otros dispositivos compatibles con las mediciones de fluorescencia de las regiones de dos dimensiones efectivas.

[0080] La sonda de bilirrubina inmovilizada sobre una proteína de soporte sólido puede ser una combinación de dos proteínas marcadas con diferentes fluoróforos que excitan en la misma longitud de onda, pero emiten en dos longitudes de onda diferentes. Una de las dos proteínas responde a la unión de bilirrubina, es decir, demuestra un cambio en el índice de fluorescencia al unirse la bilirrubina a la proteína. La segunda proteína marcada con un fluoróforo diferente puede ser sensible a la unión de la bilirrubina, pero no es necesario que la segunda proteína responda a la unión de la bilirrubina. El fluoróforo de la segunda proteína proporciona un punto de referencia para que se observe una diferencia en la relación de fluorescencia en dos longitudes de onda diferentes al unirse a la bilirrubina. La primera proteína, sensible a la bilirrubina, se puede marcar con 700DX y la segunda proteína insensible a la bilirrubina se puede marcar con tintes Texas Red, Bodipy Dyes o Alexa Fluor.

Usando las sondas

[0081] La muestra utilizada para la determinación de la bilirrubina no enlazada puede ser una muestra de fluido derivada de un ser humano, un animal o una planta. Preferiblemente, el fluido es sangre total, plasma sanguíneo, suero sanguíneo, orina, LCR, saliva, jugos gástricos, fluido intersticial o linfa. La determinación de la bilirrubina no enlazada se puede realizar dentro del citoplasma de una célula mediante microinyección o, de otro modo, transfectar la sonda en la célula o se realiza en el medio extracelular de las células.

[0082] Un rango normal para la bilirrubina no enlazada se determina a partir de una población sana y las desviaciones de este rango normal pueden indicar enfermedad.

[0083] Las sondas de bilirrubina no enlazada se calibran y se usan para las mediciones de [B_i] usando las ecuaciones 1-5 y como se describe en [Huber AH, Zhu B, Kwan T, Kampf JP, Hegyi T y Kleinfeld AM. Sensor de fluorescencia para la cuantificación de concentraciones de bilirrubina no enlazada. Clin Chem 58: 869-876, 2012].

[0084] Las sondas de bilirrubina no enlazada se utilizan para medir [B_i] en pacientes con riesgo de toxicidad mediada por bilirrubina, como el 60% de los recién nacidos que tienen una función hepática insuficiente para eliminar el exceso de bilirrubina [Maisels MJ y McDonagh AF. Fototerapia para la ictericia neonatal. N Engl J Med 358: 920-928, 2008].

[0085] Las sondas de bilirrubina no enlazada se utilizan para medir [B_i] en pacientes que reciben infusiones intravenosas de emulsiones de aceite, así como en pacientes con enfermedades que pueden aumentar [B_i] al disminuir la afinidad de unión de la bilirrubina por albúmina, como la sepsis, que es común en recién nacidos prematuros y aumenta los niveles de FFA [Nogueira AC, Kawabata V, Biselli P, Lins MH, Valeri C, Seckler M, Hoshino W, Junior

LG, Bernik MM, Andrade Machado JB, Martínez MB, Lotufo PA, Caldini EG, Martins E, Curi R y Soriano FG. Los cambios en los niveles de ácidos grasos libres en plasma en pacientes sépticos se asocian con daño cardíaco y reducción en la variabilidad de la frecuencia cardíaca. Choque 29: 342-348, 2008].

5 **[0086]** Las sondas de bilirrubina no enlazada se utilizan para medir [B_i] en pacientes que reciben fototerapia, transfusión u otras terapias diseñadas para reducir la toxicidad de la bilirrubina.

10 **[0087]** Dado que la bilirrubina no enlazada y no la bilirrubina total es tóxica, la bilirrubina no enlazada y no la bilirrubina total deben ser monitoreadas durante la fototerapia para asegurar que la bilirrubina no enlazada disminuye significativamente. Aunque se ha demostrado que la bilirrubina total disminuye en respuesta a la fototerapia, en presencia de moléculas que desplazan a la bilirrubina como el FFA, la bilirrubina total y la bilirrubina no enlazada se pueden desacoplar casi por completo. En estas condiciones, podría requerirse la destrucción prácticamente completa de la bilirrubina total para reducir los niveles de bilirrubina no enlazada a los que se consideran no tóxicos. Por lo tanto, se requerirían niveles totales de bilirrubina que son mucho más bajos que los alcanzados actualmente incluso para una terapia agresiva. Además, el ensayo de peroxidasa no se puede usar para monitorear la bilirrubina no enlazada durante la fototerapia porque esta prueba no distingue entre los fotoproductos (y la bilirrubina conjugada) y el isómero IX- α no conjugado "nativo". En contraste, la bilirrubina no enlazada medida con las sondas descritas en esta solicitud es específica para el IX- α no conjugado nativo.

20 **[0088]** El único método actualmente utilizado para la determinación de bilirrubina no enlazada se basa en la oxidación con peroxidasa de rábano de la bilirrubina [Jacobsen J y Wennberg RP. Determinación de bilirrubina no enlazada en el suero de recién nacidos. Clin Chem 20: 783, 1974]. La implementación del ensayo de peroxidasa está disponible usando un instrumento ensayado por la FDA (Arrows Ltd, Osaka, Japón). La adopción de este método para el examen general de recién nacidos con ictericia ha sido limitada debido a problemas con el método de las flechas que complican las determinaciones precisas de bilirrubina no enlazada [Ahlfors CE. Medición de plasma no unido de bilirrubina no conjugada. Anal Biochem 279: 130-135, 2000; Ahlfors CE, Vreman HJ, Wong RJ, Bender GJ, Oh W, Morris BH y Stevenson DK. Efectos de la dilución de la muestra, la concentración de peroxidasa y el ion cloruro en la medición de bilirrubina no enlazada en recién nacidos prematuros. Clin Biochem 40: 261-267, 2007]. Lo más importante es que se requieran mediciones de volumen de muestra relativamente grande y relativamente grande para determinar la concentración de bilirrubina no enlazada en equilibrio, y se necesitan correcciones para interferentes y diluciones de la muestra, utilizando el método de Arrows.

35 **[0089]** También se describe un nuevo método para la medición de la bilirrubina no enlazada que supera las deficiencias de la peroxidasa - método Arrows. Este nuevo método utiliza proteínas de unión a ácidos grasos marcadas con fluorescencia (sondas de bilirrubina no enlazada) que permiten el monitoreo directo de la concentración de bilirrubina no enlazada en equilibrio. Las sondas son específicas para la bilirrubina no conjugada y se enlazan a la bilirrubina con alta afinidad. Además, las sondas de bilirrubina no enlazada son muy específicas para la bilirrubina no enlazada y no responden o se enlazan significativamente a los ácidos grasos libres (FFA), otros metabolitos y medicamentos presentes en la sangre. Las sondas de bilirrubina no enlazada se utilizan para determinar los niveles de bilirrubina no enlazada en pacientes con ictericia, incluidos los neonatos, para diagnosticar una posible neurotoxicidad de la bilirrubina y, por lo tanto, dirigir el tratamiento con precisión para prevenir las consecuencias de dicha toxicidad.

EJEMPLOS

45 **[0090]** Las siguientes definiciones son con referencia a la SEQ ID NO: 3,

"KR6" se refiere a la mutación de las siguientes 6 lisinas superficiales a arginina: 7R 20R 46R 100R 125R 130R.

50 "KR14" se refiere a la mutación de las siguientes 14 lisinas superficiales a arginina: 7R 16R 20R 29R 37R 46R 50R 88R 92R 94R 100R 125R 129R 130R.

"MGI" se refiere a la mutación de la secuencia del terminal NH₂ de tipo silvestre de MAFD a MGIFD. En cada caso, la metionina N-terminal es eliminada por la célula para generar la proteína madura.

"MGCFD" se refiere a la mutación de la secuencia del terminal NH₂ de tipo silvestre de MAFD a MGCFD. En cada caso, la metionina N-terminal es eliminada por la célula para generar la proteína madura.

55 "MGGSATGIFD" se refiere a la mutación de la secuencia del terminal NH₂ de tipo silvestre de MAFD a MGGSATGIFD. En cada caso, la metionina N-terminal es eliminada por la célula para generar la proteína madura.

EJEMPLO 1 L24P19C7

60 **[0091]** Las sondas de bilirrubina se derivan de una proteína de unión a ácido graso intestinal de rata (rI-FABP) como se describió anteriormente para las sondas de FFA no unido (FFAu) en US 7,601,510, publicación de EE.UU. 2010/0298162 y [Huber AH, Zhu B, Kwan T, Kampf JP, Hegyi T y Kleinfeld AM. Sensor de fluorescencia para la cuantificación de concentraciones de bilirrubina no enlazada. Clin Chem 58: 869-876, 2012; Huber AH, Kampf JP, Kwan T, Zhu B y Kleinfeld AM. Sondas fluorescentes específicas de ácidos grasos y su uso en la resolución de mezclas de diferentes ácidos grasos libres no unidos en equilibrio con albúmina. BioChemistry 45: 14263-14274, 2006]. La

mutagénesis combinatoria se usa primero para generar y seleccionar las sondas mutantes en busca de respuestas a FFAu. Entre estas sondas, aproximadamente el 10% no responde significativamente al FFAu y se analiza aún más por su respuesta a la bilirrubina no conjugada. Los éxitos de esta pantalla se seleccionan para mutagénesis adicional para aumentar la afinidad y selectividad para la bilirrubina no enlazada. Un ejemplo de los resultados de estos métodos es el L24P19C7 marcado con acrilodan, que con respecto a la SEQ 3 tiene las mutaciones: 14R 18L 38V 60R 73F 106C 115R y 117D (Tabla 5). La reacción de acrilodano, a pH 9,3, marca principalmente a L24P19C7 en la cadena lateral K27, L24P19C7 fue calibrado a 22°C con la bilirrubina acuosa y encajando con la ecuación (5) produjo una K_d de 22 nM y el temple prácticamente completo a concentraciones de bilirrubina que se acercan a la saturación (la intensidad fraccional restante (Q_s) = 0,0042) (Figura 1A). L24P19C7 no responde a los ácidos grasos libres (FFA). La valoración de L24P19C7 con oleato no unido en presencia o ausencia de bilirrubina no produce cambios en su fluorescencia o, de manera equivalente, la concentración de bilirrubina no enlazada (Figura 1B). Las concentraciones de FFA en la Figura 1B, de oleato no unido (el FFA más abundante en plasma sanguíneo humano) son más de 10 veces más altas que la concentración en plasma humano. Además de su falta de respuesta al FFA, L24P19C7 tampoco responde a otros metabolitos presentes en el plasma humano. Las mediciones de bilirrubina no enlazada en 6 muestras diferentes de plasma sanguíneo adulto enriquecidas con bilirrubina demuestran que, en ausencia de bilirrubina, la concentración no unida es inferior a 1 nM y que el aumento de la bilirrubina no enlazada sigue el comportamiento previsto para el equilibrio entre la bilirrubina y la albúmina sérica.

EJEMPLO 2 L24P19C7-XC

[0092] Los mutantes de L24P19C7 se sintetizaron en los que una única cisteína fue sustituida en las posiciones de la cadena lateral entre 22 y 30 para generar sondas con sitios estables, esencialmente únicos, de etiquetas de acrilodan y para optimizar la interacción de la bilirrubina con la sonda (Figura 2). Los resultados demuestran que K_d para la unión de bilirrubina varía de 19 a 89 nM y el grado de extinción de la fluorescencia de acrilodán (Q_s) varía de aproximadamente 1,7 a 6%. El rendimiento óptimo de la sonda se obtuvo con cisteína en las posiciones 25 o 26. Esto demuestra que el ajuste del rendimiento de la sonda requiere una experimentación mínima una vez que se ha identificado su estructura básica.

EJEMPLO 3: BL22P1B11

[0093] BL22P1B11 es una sonda de bilirrubina que está marcada con un solo fluoróforo, en este caso acrilodan en la posición 25 en virtud de la eliminación de 14 lisinas superficiales (KR14), la lisina en 27 y, en relación con L24P19C, la cisteína en la 106. Por lo tanto, BL22P1B11 tiene la estructura: MGI-KR14 -14R 18L 25C 27A 38V 60R 73F 106L 115R 117D, relativa a la SEQ 3. Además de poseer una única etiqueta fluorescente única, el BL22P1B11 tiene una afinidad excepcionalmente grande para la bilirrubina (K_d = 16 nM) y revela una extinción prácticamente completa de la fluorescencia de acrilodano (Q_s = 0,006) en la saturación de bilirrubina de la sonda (Figura 3). BL22P1B11 prácticamente no responde a los ácidos grasos, los K_d s para el rango de FFA más abundantes de 3 a 75 μ m (Tabla 1). También de manera similar a L24P19C7, BL22P1B11 detecta solo bilirrubina en plasma humano y $[B_f]$ determinado por BL22P1B11 es consistente con la variación esperada del equilibrio de bilirrubina-albúmina en plasma enriquecido con bilirrubina (ver ejemplo en la Figura 5).

Tabla 1 K_d s para unión a BL22P1B11	K_d (nM)
Bilirrubina	16
Docosahexaenoato 22:6 (n-3)	4300
Araquidonato 20:4 (n-6)	28600
Linolenato 18:3 (n-3)	3460
Linoleato 18:2 (n-6)	3120
Oleato 18:1 (n-9)	2510
Estearato 18:0	75500
Palmitoleato 16:1 (n-7)	3140
Palmitato 16:0	3200
Miristato 14:0	23400

EJEMPLO 4: SONDAS DE RATIO DE BILIRUBINA BL22P1B11-RH Y BL22P1B11-DEXTRAN-TEXAS RED

[0094] El BL22P1B11 proporciona valores precisos de $[B_f]$ en soluciones acuosas que incluyen muestras de sangre humana, para muestras con bajo contenido de bilirrubina total. Sin embargo, al aumentar las concentraciones totales de bilirrubina, la absorción del filtro interno de excitación y emisión debida a la bilirrubina puede aumentar significativamente (ecuación (1)) y, por lo tanto, sin un conocimiento preciso de la concentración total de bilirrubina y la geometría de absorción (" d " en la ecuación (1)), el aparente $[B_f]$ puede ser significativamente en error. Para superar esta fuente de incertidumbre y eliminar la necesidad de determinar la concentración total de bilirrubina, se utiliza una forma de relación de las sondas de longitud de onda única, como BL22P1B11. Esto se logra agregando un segundo fluoróforo que se excita a la misma longitud de onda que la sonda de longitud de onda única y cuya emisión se encuentra en una longitud de onda diferente a la de la sonda de longitud de onda única. Para BL22P1B11 marcado

con acrilodán, un fluoróforo soluble en agua apropiado es la rodamina B, que puede ser excitada a una longitud de onda similar a la del acrilodán, por ejemplo, 375 nm, y cuya emisión es significativamente más larga que la del acrilodano, por lo que la rodamina es fluorescente a 575 nm y contribuye de manera insignificante a la fluorescencia de acrilodán a 525 nm. Por lo tanto, la medida de la relación de intensidades de 1525/1575 se utiliza para determinar [Bf] (ecuación (5)). Debido a que la absorbancia del filtro interno de excitación debido a la bilirrubina es la misma para el acrilodán y la rodamina B y debido a que las intensidades de 1525 y 1575 siempre aparecen como relaciones, la absorbancia del filtro interno de excitación no afecta las mediciones de [Bf], siempre que la absorbancia de la bilirrubina permita una transmisión suficiente, que casi siempre se puede lograr reduciendo la longitud de ruta "d" lo suficiente. Además de eliminar la absorbancia del filtro interno de excitación debido a la bilirrubina, las mediciones de la relación de intensidades a 525 y 575 nm eliminan efectivamente el filtro interno de emisión debido a la hemoglobina y la bilirrubina. Este tipo de sonda de relación se prepara mezclando BL22P1B11 junto con rodamina B en una relación molecular definida y luego liofilizando la mezcla para su almacenamiento a -20°C o menos o se prepara y almacena como una solución a 4°C. En cualquiera de los casos de determinación de R_o , la relación de fluorescencia en ausencia de bilirrubina determina con precisión la relación molecular BL22P1B11/Rodamina B. La calibración de la sonda BL22P1B11-Rh se lleva a cabo midiendo la relación I525/I575 al aumentar la bilirrubina total. El ajuste de la curva de titulación con la ecuación (3) se utiliza para determinar K_d y, como se muestra en la Figura 4, los K_d (16 nM) de la sonda BL22P1B11-Rh son idénticos a los de BL22P1B11, lo que indica que la presencia de rodamina no tiene efecto sobre la interacción de sonda de bilirrubina.

[0095] Una sonda de relación también se generó mezclando BL22P1B11 junto con cantidades definidas de Texas Red® marcado dextrano (Life Technologies, D-3329). La nueva sonda de relación se calibró y liofilizó (FIG. 9) y se calibró después de la resuspensión en tampón HEPES. La calibración se llevó a cabo midiendo la relación I525/I615 al aumentar la bilirrubina total. Como se observa en la FIG. 9, la K_d para la sonda de relación de Rojo de Texas BL22P1B11-Dextrano es 16 nM, que es la misma que para BL22P1B11 y BL22P1B11-Rh. Por lo tanto, un fluoróforo secundario puede estar libre en solución (BL22P1B11-Rh) o unirse a un polímero inerte más grande (BL22P1B11-Dextrano Texas Red) sin alterar significativamente las interacciones de sonda de bilirrubina.

[0096] La interferencia potencial de bilirrubina conjugada con las sondas de bilirrubina se estimó midiendo la afinidad de unión de ditaurobilirrubina para BL22P1B11-Rh. La medición se realizó midiendo el cambio en la respuesta de fluorescencia de BL22P1B11-Rh titulada con concentraciones crecientes de ditaurobilirrubina. Los valores R fueron calculados para todas las concentraciones y la isoterma de unión se ajustaron con la ecuación (3) para obtener una K_d de 301 ± 9 nmol/L para unión de ditaurobilirrubina a BL22P1B11-Rh (Figura 5).

[0097] El efecto de fotoblanqueo (foto-oxidación y/o foto-isomerización) en la determinación de B_f utilizando las sondas de bilirrubina se evaluó midiendo B_f con BL22P1B11-Rh en las muestras a partir de soluciones de bilirrubina que habían sido expuestas a la luz a 460 nm para tiempos crecientes. Los valores B_f se determinaron usando la ecuación (6). Las concentraciones totales de bilirrubina (B_T) se calcularon utilizando los valores R medidos con la ecuación (6).

$$B_T = K_d \left(\frac{(R-R_o)}{(RrR_o-R)} \right) + \frac{P_T K_d \left(\frac{(R-R_o)}{(RrR_o-R)} \right)}{K_d + K_d \left(\frac{(R-R_o)}{(RrR_o-R)} \right)} \quad (6)$$

[0098] Los resultados muestran que B_f disminuyó en un 78% (Figura 6) e indican que BL22P1B11-Rh tiene poca o ninguna sensibilidad a cualquiera de la foto-oxidación o los productos de foto-isomerización más abundantes.

EJEMPLO 5: MEDICIÓN DE [Bf] EN PLASMA HUMANO AGREGADO DE BILIRUBINA CON BL22P1B11-RH.

[0099] plasma humano agrupado (Golden West Biologicals) para los que [albúmina] era 620 μ M, se añadieron con la bilirrubina para generar muestras de plasma con relaciones de bilirrubina/albúmina de aproximadamente de 0 a 0,9. Las mediciones de [Bf] se llevaron a cabo utilizando BL22P1B1-Rh en un Fluorolog3 (JY Horiba) usando cubetas de 10X10 mm o en un medidor FFAu (FFA Sciences) modificado para medir la bilirrubina no enlazada al reemplazar los filtros de emisión por unos centrados a 325 y 380 nm. Las mediciones de [Bf] también se realizaron en las mismas muestras utilizando el método de peroxidasa de Jacobsen y Wennberg [Jacobsen J y Wennberg RP. Determinación de bilirrubina no enlazada en el suero de recién nacidos. Clin Chem 20: 783, 1974]. Los resultados indican resultados prácticamente idénticos para las 3 mediciones y buena concordancia entre los valores medidos y los pronosticados para la unión de bilirrubina a un solo sitio de albúmina humana con un $K_d = 20$ nM (Figura 7). Estos resultados demuestran que la respuesta de las sondas de bilirrubina se debe completamente a la interacción con la bilirrubina, las sondas de bilirrubina no responden a otros metabolitos presentes en muestras de sangre humana. Además, el acuerdo con el método de la peroxidasa y con las predicciones de equilibrio de bilirrubina-albúmina también demuestra que las sondas producen concentraciones de bilirrubina no enlazada precisas.

EJEMPLO 6: EJEMPLOS DE PERLAS DE ETIQUETADO Y DISOCIACIÓN Y EFECTO EN MEDIDAS B_f

[0100] Los mutantes de sonda de bilirrubina se generaron para la optimización de marcaje con Alexa Fluor 680 y LI-COR 700DX y la inmovilización sobre poliestireno o perlas de látex. Los mutantes se derivaron de la sonda de

bilirrubina, BL22P1B11, para marcar con tintes fluorescentes adecuados para usar con un ensayo de bilirrubina de plasma o de sangre total. El tinte Alexa Fluor 680 se ensayó en mutantes que contenían una cisteína única en varias posiciones de marcaje, el etiquetado en la posición 25C mostró una extinción de fluorescencia máxima (~ 40%) con la unión de bilirrubina. Para la inmovilización de la sonda en poliestireno o perlas de látex, se desarrollaron mutantes con residuos de lisina reactivos simples o múltiples opuestos al colorante Alexa Fluor 680 en la posición 25C (Tabla 6). LI-COR 700DX (LI-COR Biosciences), se puede usar para marcar mutantes que contienen una sola lisina en varias posiciones de etiquetado y el etiquetado en la posición 25K mostró una extinción de fluorescencia máxima ($\geq 60\%$) en la unión de bilirrubina (Tabla 6). Para la inmovilización de la sonda en poliestireno o perlas de látex, se desarrollaron mutantes con residuos de cisteína reactivos simples o múltiples opuestos al colorante LI-COR 700DX en la posición 25K. Se logró una mejora adicional para la inmovilización utilizando dos métodos basados en afinidad, dobles etiquetas His y etiquetas PS (péptido de unión de poliestireno) para inmovilizar la sonda de bilirrubina marcada con LI-COR 700DX en perlas de poliestireno o látex (Tabla 8). Se encontró que un mutante (BL22P1B11_25K_C2X) con doble etiqueta Hiss C-terminal separada por un enlazador que consta de 11 residuos de aminoácidos (SRAWRHPQFGG) tiene una alta afinidad de unión al poliestireno Dyna acoplado a Ni o a las perlas de látex (Life Technologies) y una eliminación aceptable por bilirrubina (~ 50%). Otro mutante (BL22P1B11_25K_PS19) con una etiqueta PS (PS19-1, RAFIASRRIRRP) inmediatamente después de la etiqueta His en su extremo C también mostró una afinidad mayor que la plantilla con una etiqueta His única (BL22P1B11_25K). Otras etiquetas PS que produjeron sondas que se unieron a las perlas de poliestireno o látex con alta afinidad incluyeron PS19-6L (RLLLRRLRR) y PS19-6I (RIIIRRRIR) (Tabla 8). Además, la sonda BL22P1B11_25K_PS19 exhibió el mayor grado de bilirrubina tanto en solución libre como en perlas (>60%), probablemente debido a la presencia de la etiqueta PS adicional. Ambas sondas generaron una curva de extinción de bilirrubina similar a la de un fluorómetro estándar.

[0101] Una sonda mutante de bilirrubina fue generada mediante la construcción y selección de una biblioteca enlazadora basada en una plantilla BL22P1B11_25K_C2X marcada con 700DX LI-COR (Tabla 8). La nueva sonda mutante tiene mayor expresión de proteínas; sin etiquetado múltiple, etiquetado con poca o ninguna amina en el extremo N, mayor rendimiento de la sonda y altas afinidades para las perlas de poliestireno o látex. Por ejemplo (Tabla 4), aproximadamente el 12% de la sonda PS19 se disocia de las perlas después de 60 minutos de incubación en un tampón HEPES tal como se describe en [Huber AH, Kampf JP, Kwan T, Zhu B y Kleinfeld AM. Sondas fluorescentes específicas de ácidos grasos y su uso en la resolución de mezclas de diferentes ácidos grasos libres no unidos en equilibrio con albúmina. *BioChemistry* 45: 14263-14274, 2006]. Esta sonda disociada representa aproximadamente el 60% de la intensidad de fluorescencia total (Tabla 4). La sonda C2XFFA3P1H11 tiene un enlazador único de 3 aminoácidos (AAS) que se insertó entre el BL22P1B11_25K y la primera etiqueta His, y un nuevo enlazador de 11 aminoácidos (SHRATPNTSPH) entre la primera y la segunda etiqueta His reemplazó al enlazador original BL22P1B11_25K_C2X. Las pruebas de ambos clones mostraron una mejora significativa con respecto a PS19 y BL22P1B11_25K_C2X (Tablas 2-4). Ambos mutantes tienen las siguientes propiedades que los convierten en la opción ideal para la producción y comercialización de sondas a gran escala. Alto rendimiento de expresión de proteínas, baja reactividad o la accesibilidad de la amina N-terminal por 700DX, alto rendimiento de sonda con ~ 100% eluido de Ni-perlas con EDTA después de etiquetado, equivalente de temple de bilirrubina alta o mejor que PS19, el mismo temple de bilirrubina de sonda de la Fluorescencia 700DX para la sonda inmovilizada en poliestireno o látex como en solución libre, 10 veces más afinidad de perlas que PS-19 (~ 5% de intensidad de la sonda libre vs. ~ 60%) y enlazadores y espaciadores únicos.

[0102] Los ciclos de tiempo de C2XFFA3H11, C2XFFA3B3 y PS19 inmovilizados en poliestireno Dyna acoplado con Ni o perlas de látex se llevaron a cabo en dos días diferentes y se muestran en las Tablas 2-4 en las cuales la bilirrubina de la fluorescencia del LiCor 700Dx estaba mediada por los complejos de bilirrubina/albumina total de bilirrubina/albumina de aproximadamente 0,9.

Tabla 2: C2XFF3H11-700DX

50

Tiempo (minutos)	%temple	Intensidad supernatante como % de total
C2XFFA3H11		
0	24,21%	
4	49,14%	
8	51,47%	
15	54,60%	
30	56,81%	
60	58,14%	
60S	58,97%	4,6%

60

65

Tabla 3 C2XFFA3B3-700DX

Tiempo (minutos)	%temple	Intensidad supernatante como % de total
C2XFFA3B3		
0	21,14%	
4	42,06%	
8	45,12%	
15	48,67%	
30	50,70%	
60	50,23%	
60S	61,26%	7,8%

Tabla 4 PS19-1-700DX

Tiempo (minutos)	%temple	Intensidad supernatante como % de total
PS19-1		
0	29,46%	
4	47,36%	
8	50,46%	
15	54,06%	
30	53,74%	
60	55,30%	
60S	49,23%	61,5%

EJEMPLO 7 MEDICIONES DE PLASMA AGREGADO CON SONDAS DE BILIRUBINA INMOBILIZADAS EN UN CARTUCHO DESECHABLE

[0103] La sonda PS19-1 que es BL22P1B11_25K marcado con LiCor DX700 y con, además de la etiqueta 6xHis, una etiqueta de PS, RAFIASRRIRRP en el extremo C-terminal (Tabla 8), se inmovilizó sobre perlas de Ni-agarosa. Estas perlas etiquetadas se inmovilizaron a su vez en un "pocillo" de un conjunto de cartuchos desechables de microcanales diseñados para mediciones fluorométricas. Se agregaron muestras de plasma de sangre humana adulta enriquecida con bilirrubina de 20 μ l, sin diluir, a los cartuchos y se determinó la extinción de la fluorescencia DX700 por bilirrubina no enlazada para muestras con valores crecientes de $[B_i]$. Se utilizaron estas mediciones para determinar la K_d de la PS19-1 inmovilizado y para evaluar la reproducibilidad de las sondas de bilirrubina en dichos cartuchos. K_d determinada a partir de estas mediciones es consistente con el valor obtenido de la sonda BL22P1B11-Rh libre (Figura 8) que indica que la inmovilización no afecta al equilibrio entre la sonda y la bilirrubina - interacción albúmina. Además, prácticamente los mismos resultados se obtuvieron utilizando cartuchos que se almacenaron durante más de 2 meses después de la preparación.

EJEMPLO 8: Sondas de cisteína individuales

[0104]

Tabla 5: Todos los números de residuos se refieren a la SEQ ID 3, la secuencia de la plantilla.

	Constructo	Fluor primario	Kd	Is	Mutaciones
5	L2P14F7	Texas Red C2- Maleimida			18G 27C 31M 72A
	L2P14 F7 - K27C	Acridodan	250	0.02	18G 27C 31M 72A
10	L2P14 F7- KR14 - K27C	Acridodan	530	0.16	KR14-18G 27C 31M 72A
	L2P14F7 MGCFD KR14	Acridodan			MGCFD - KR14 -18G 31M 72A
15	L2P14F7 MGCFD KR14	DACIA			MGCFD - KR14 -18G 31M 72A
	L2P14F7 MGCFD KR14	Amarillo Lucifer Yodoacetamida			MGCFD - KR14 -18G 31M 72A
	L2P14F7 MGCFD KR14	Texas Red C2- Maleimida			MGCFD - KR14 -18G 31M 72A
20	L2P14F7-MGCFD	Texas Red C2- Maleimida	400	0.3	MGCFD - 18G 31M 72A
	L2P14F7 MGI KR14 K27C	Acridodan	350	0	MGI - KR14 - 18G 27C 31M 72A
25	L10P9 E6	Acridodan	1432	0.1	14T 18L 73M 117C 72A
	L22P19 B9	Acridodan	400	0	38R 72A 73M 106Q 115C
30	L22P33 A10	Acridodan	245	0.045	38R 72A 73N 106S 115C
	L24P19 C7	Acridodan	35	0.03	14R 18L 38V 60R 73F 106C 115R 117D
	L24P19 C7	Alexa Fluor 680 C2- Maleimida			14R 18L 38V 60R 73F 106C 115R 117D
35	L24P19 C7	Kodak X-Sight 670 LSS tinte			14R 18L 38V 60R 73F 106C 115R 117D
	L24P19 C7	Texas Red C2- Maleimida			14R 18L 38V 60R 73F 106C 115R 117D
40	L24P19C7- K27C	Acridodan	242	0.067	14R 18L 27C 38V 60R 73F 106C 115R 117D
	L24P19C7- K27C - R106A	Acridodan			14R 18L 27C 38V 60R 73F 106A 115R 117D
45	L24P19 C7- KR14	Acridodan			KR14 - 14R 18L 38V 60R 73F 106C 115R 117D
	L24P19C7 - KR14 - K27C	Acridodan			KR14 - 14R 18L 27C 38V 60R 73F 106C 115R 117D
	L24P19 C7 K27A	Acridodan	21	0.011	14R 18L 27A38V 60R 73F 106C 115R 117D
50	L24P19 C7 K27K 22C	Acridodan	71	0.06	14R 18L 22C 38V 60R 73F 106C 115R 117D
	L24P19 C7 K27K 24C	Acridodan	89	0.02	14R 18L 24C 38V 60R 73F 106C 115R 117D
	L24P19 C7 K27K 25C	Acridodan	19	0.02	14R 18L 25C 38V 60R 73F 106C 115R 117D
	L24P19 C7 K27K 26C	Acridodan	19	0.02	14R 18L 26C 38V 60R 73F 106C 115R 117D
55	L24P19 C7 K27K 30C	Acridodan	26	0.03	14R 18L 30C 38V 60R 73F 106C 115R 117D
	L24P19 C7-K27A- MGCFD	Texas Red C2- Maleimida			MGCFD - 14R 18L 27A38V 60R 73F 106C 115R 117D
	L24P19 C7-MGCFD	Texas Red C5- Bromoacetamida			MGCFD - 14R 18L 38V 60R 73F 106C 115R 117D
60	L24P19 C7-MGCFD	Texas Red C2- Maleimida			MGCFD - 14R 18L 38V 60R 73F 106C 115R 117D
	L24P19C7 - KR6	Acridodan			KR6 - 14R 18L 38V 60R 73F 106C 115R 117D

65

(continuado)

	Constructo	Fluor primario	Kd	Is	Mutaciones
5	L45P2 E10	Acridodan			18E 23L 31N 72G 73T 74A 78Y 102C 106W 115W 117L
	BL2P2 B6	Acridodan	137	0.05	14R 18L 31C 38V 60R 73V 106A 115R 117D
10	BL10P10 D10	Acridodan	400	0.15	14F 18L 27C 38M 60Y 73F 106V 115R 117D
	BL10P14 E1	Acridodan			14F 18L 27C 38S 60D 73F 106I 115R 117S
	BL10P19 F8	Acridodan			14M 27C 38F Truncado tras 44
	BL10P23 H9	Acridodan	>50	0.16	14R 27C 38I 60Y 73F 106V 115R 117D
15	BL10P25 E7	Acridodan	35	0.19	14F 18L 27C 60R 73F 106V 115R 117D
	BL10P25E7 - KR14	Acridodan	35	~0	KR14 - 14F 18L 27C 60R 73F 106V 115R 117D
	BL10P25E7 - MGI - KR14	Acridodan	19	0	MGI - KR14 - 14F 18L 27C 60R 73F 106V 115R 117D
20	BL10P8 D3	Acridodan	1033	0	14G 18L 27C 38M 60Y 73F 106I 115R 117D
	BL22P1 B11	Acridodan	16	0	MGI - KR14 - 14R 18L 25C 27A 38V 60R 73F 106L 115R 117D
25	BL22P1 B11	Alexa Fluor 750 C5- Maleimida			MGI - KR14 - 14R 18L 25C 27A 38V 60R 73F 106L 115R 117D
	BL22P1 B11	BODIPY 577/618			MGI - KR14 - 14R 18L 25C 27A 38V 60R 73F 106L 115R 117D
30	BL22P1 B11	Alexa Fluor 680 C2- Maleimida	110	0.37	
	BL22P1 B11 - 130K	Acridodan			MGI - KR14 - 14R 18L 25C 27A 38V 60R 73F 106L 115R 117D 130K
35	BL22P1B11 -7K	Alexa Fluor 680 C2- Maleimida			MGI - KR14 - 7K 14R 18L 25C 27A 38V 60R tinte 73F 106L 115R 117D
	BL22P1B11 -MGGSATGIFD	Acridodan			MGGSATGIFD- KR14 - 14R 18L 25C 27A 38V 60R 73F 106L 115R 117D
40	BL22P1 B11 - 24C	Alexa Fluor 680 C2- Maleimida	72	0.41	MGI - KR14 - 14R 18L 24C 27A 38V 60R 73F 106L 115R 117D
	BL22P1 B11 - 26C	Alexa Fluor 680 C2- Maleimida	197	0.43	MGI - KR14 - Y14R M18L V26C K27A L38V V60R A73F R106L Q115R Y117D
45	BL22P1 B11 - 27C	Alexa Fluor 680 C2- Maleimida	70	0.4	MGI - KR14 - Y14R M18L K27C L38V V60R A73F R106L Q115R Y117D
	BL22P1 B11 - 27C	Alexa Fluor 750 C5- Maleimida	154	0.66	
50	BL22P1 B11 - 29C	Alexa Fluor 680 C2- Maleimida	118	0.65	MGI - KR14 - 14R 18L 27A 29C 38V 60R 73F 106L 115R 117D
	BL22P1 B11 - 30C	Alexa Fluor 680 C2- Maleimida			MGI - KR14 - 14R 18L 27A 30C 38V 60R 73F 106L 115R 117D
	BL22P1 B11 - 33C	Alexa Fluor 680 C2- Maleimida	250	0.45	MGI - KR14 - 14R 18L 27A 33C 38V 60R 73F 106L 115R 117D
55	BL22P1 B11 - 33C	Alexa Fluor 750 C5- Maleimida	120	0.3	
	BL22P1 B11 - 54C	Alexa Fluor 680 C2- Maleimida	160	0.52	MGI - KR14 - 14R 18L 27A 38V 54C 60R 73F 106L 115R 117D
60	BL22P1 B11 - 54C	Alexa Fluor 750 C5- Maleimida			

65

(continuado)

Constructo	Fluor primario	Kd	Is	Mutaciones
BL22P1 B11 - 74C	Alexa Fluor 680 C2- Maleimida	160	0.5	MGI-KR14 - 14R 18L 27A 38V 60R 73F 74C 106L 115R 117D
BL22P1 B11 - 76C	Alexa Fluor 680 C2- Maleimida	150	0.24	MGI-KR14 - 14R 18L 27A 38V 60R 73F 76C 106L 115R 117D
BL22P1 B11 - 76C	Alexa Fluor 750 C5- Maleimida	140	0.55	
BL22P1B11- 97C	Alexa Fluor 680 C2- Maleimida	100	0.5	MGI-KR14 - 14R 18L 27A 38V 60R 73F 97C 106L 115R 117D
BL22P1B11 - 98C	Alexa Fluor 680 C2- Maleimida			MGI-KR14 - 14R 18L 27A 38V 60R 73F 98C 106L 115R 117D
BL22P1 B11 - 27C	Alexa Fluor 750 C5- Maleimida	154	0.66	
BL22P1 B11 - 33C	Alexa Fluor 750 C5- Maleimida	120	0.3	
BL22P1 B11 - 54C	Alexa Fluor 750 C5- Maleimida			
BL22P1 B11 - 76C	Alexa Fluor 750 C5- Maleimida	140	0.55	
BL22P2D4	Acridodan			MGI-14KR-14R 18L 25C 27A 38V 60R 73F 106V 115R 117D
BL22P2F3	Acridodan			MGI-14KR-14R 18L 25C 27A 38V 60R 73F 106V 115R 117D

EJEMPLO 9: SONDAS ÚNICAS DE LISINA ETIQUETADAS FLUORESCENTAMENTE

[0105]

Tabla 6: Todos los números de residuos se refieren a la SEQ ID 3, la secuencia de plantilla

Constructo	Fluor primario	Kd	Is	Mutaciones
L1P1 B4	Acridodan	711.3	0	14I 72W 117W
L1P1 C 12	Acridodan	35.75	0.11	38I 72W 117W
L1P12 E8	Acridodan			14L 38A 72G 117F 114E
L1P14 D6	Acridodan	308.7	0.04	14M 72V 117W
L1P5 H9	Acridodan			14M 72I 117W
L2P14 F7	Acridodan	69.03	0.01	18G 31M 72A
L2P14F7 MGI KR14 K27K	Acridodan	84	0.00	MGI - KR14 - 18G 27K 31M 72A
L2P22 B1	Acridodan			18Y 31V 55V 72A
L5P16 H4	Acridodan	350	0.00	126K 73F 72A
L10P1 H5	Acridodan	432	0.04	14H 18L 31N 73S 11 7A 72A
L10P11 B9	Acridodan	730	0.00	14H 18L 31R 73H 117V 72A
L10P19 C1	Acridodan	471	0.04	14L 18F 31R 72A 73L 131D
L10P20 D8	Acridodan	229	0.09	14A 18F 31L 73V 117L 72A
L14P7 G4	Acridodan	484	0.19	36A 38V 72A 82V 106A 115A 117M
L14P9 G3	Acridodan	667	0.27	36A 38A 72A 82V 106V 115A 117M
L14P10 B11	Acridodan	661	0.09	36V 38V 72A 82V 106V 115A 117A

(continuado)

	Constructo	Fluor primario	Kd	Is	Mutaciones
5	L14P12 G1	Acrilodan	701	0.23	36V 38A 72A 82A 106A 115A 117I
	L14P13 A2	Acrilodan	1086	0.17	36I 38A 72A 82V 106A 115V 117T
	L14P14 E4	Acrilodan	713	0.17	36A 38A 72A 82I 106A 115A 117V
	L14P15 F3	Acrilodan	383	0.23	36V 38A 72A 82V 106A 115T 117V
	L14P18 H7	Acrilodan	484	0.26	36V 38A 72A 82V 106A 115T 117M
10	L14P19 H8	Acrilodan	435	0.15	36A 38V 72A 82M 106A 115A 117M
	L14P20 F5	Acrilodan	1339	0.21	36V 38A 72A 82V 106V 115A 117M
	L24P12 C8	Acrilodan	2	0.04	14R 18L 38V 60R 73F 115M 117D
15	L24P19 C7	Acrilodan	33	0.01	14R 18L 27A 38V 60R 73F 106A 115R 117D
	L24P19 C7	Kodak X-Sight 670 LSS tinte			
20	L43P11 G2	Acrilodan			14Q 18L 23L 31N 72G 73T 74A 104K 106W 115W 117S
	L43P8 H7	Acrilodan			14L 18L 23L 31N 72G 73T 74A 104R 106W 115W 117W
25	L45P5 E5	Acrilodan			18S 23L 31N 72G 73T 74A 78V 106W 115W 117L
	L46P3 A3	Acrilodan			18L 23R 31N 72G 73T 74A 102H 106W 115W 117L
30	BL1P1 F2	Acrilodan			14R 18L 38V 60R 73F 106G 115R 117D
	BL1P2 H2	Acrilodan	40	0.00	14R 18L 38V 60R 73F 106A 115R 117D
	BL8P12 D3	Acrilodan	455	0.02	38A, 60F, 73F, 106V, 115R, 117D
35	BL8P15 G6	Acrilodan	3250	0.34	18L, 38V, 60Y, 73F, 106D, 115R, 117N
	BL8P20 G1	Acrilodan	476	0.10	18L, 38T, 60Y, 73F, 106T, 115R, 117S
	BL8P20 G3	Acrilodan	2308	0.09	18L, 38M, 60F, 73F, 106T, 115R, 117E
	BL8P21 E8	Acrilodan	3216	0.28	18L 38I 60H 73F 106D 115R 117E
	BL8P9 C9	Acrilodan	723	0.00	18L, 38F, 60F, 73F, 106D, 115R, 117R
40	BL8P9 G9	Acrilodan	1050	0.29	18L, 38A, 73F, 106V, 115R, 117D
	BL10P20 G4	Acrilodan			14G 18L 38A 60F 73F 106I 115R 117E
45	BL22P1B11-25K	Biotium CF750 SE	9500	0.19	MGI - KR14 - 14R 18L 25K 27A 38V 60R 73F 106L 115R 117D
	BL22P1B11-26K	Biotium CF750 SE	1225	0.60	MGI - KR14 - 14R 18L 26K 27A 38V 60R 73F 106L 115R 117D
	BL22P1B11-30K	Biotium CF750 SE	1230	0.60	MGI - KR14 - 14R 18L 27A 30K 38V 60R 73F 106L 115R 117D
50	BL22P1B11-25K	Kodak X-Sight 670 LSS tinte	700	0.61	MGI - KR14 - 14R 18L 25K 27A 38V 60R 73F 106L 115R 117D
	BL22P1B11-26K	Kodak X-Sight 670 LSS tinte	260	0.50	MGI - KR14 - 14R 18L 26K 27A 38V 60R 73F 106L 115R 117D
55	BL22P1B11-27K	Kodak X-Sight 670 LSS tinte	5250	0.48	MGI - KR14 - 14R 18L 38V 60R 73F 106L 115R 117D
	BL22P1B11-29K	Kodak X-Sight 670 LSS tinte	640	0.48	MGI - KR14 - 14R 18L 27A 29K 38V 60R 73F 106L 115R 117D

60

65

(Continuado)

Constructo	Fluor primario	Kd	Is	Mutaciones
BL22P1B11-30K	Kodak X-Sight 670 LSS dye	480	0.56	MGI - KR14 - 14R 18L 27A 30K 38V 60R 73F 106L 115R 117D
BL22P1 B11-25K	LiCor IRDye 680 LT	239	0.67	MGI - KR14 - 14R 18L 25K 27A 38V 60R 73F 106L 115R 117D
BL22P1B11-25K	LiCor IRDye 700DX	80	0.14	MGI - KR14 - 14R 18L 25K 27A 38V 60R 73F 106L 115R 117D
BL22P1B11-26K	LiCor IRDye 700DX	109	0.22	MGI - KR14 - 14R 18L 26K 27A 38V 60R 73F 106L 115R 117D

EJEMPLO 10: Dos sondas de bilirrubina de fluoroforos

[0106]

Tabla 7: Todos los números de residuos se refieren a la SEQ ID 3, la secuencia de la plantilla.

Constructo	Fluor primario	Fluor secundario	Kd	Qs	Mutaciones
Dos fluoroforos covalentemente unidos a la sonda					
L2P14F7	Acrilodan	Texas Red-X SE			18G 31M 72A
L2P14F7 MGCFD KR14	Acrilodan	Alexa Fluor 594			MGCFD - KR14 -18G 31M 72A
L2P14F7 MGCFD KR14	Acrilodan	Alexa Fluor 633			MGCFD - KR14 -18G 31M 72A
L2P14F7 MGCFD KR14	DACIA	Texas Red			MGCFD - KR14 -18G 31M 72A
L2P14F7 MGCFD KR14	Amarillo Lucifer Yodoacetamida	Texas Red			MGCFD - KR14 -18G 31M 72A
L2P14F7-MGCFD	Acrilodan	Texas Red C2- Maleimida			MGCFD - 18G 31M 72A
L24P19 C7-K27A- MGCFD	Acrilodan	Texas Red C2- Maleimida			MGCFD -14R 18L 27A38V 60R 73F 106C 115R 117D
L24P19 C7- MGCFD	Acrilodan	Texas Red C2- Maleimida			MGCFD -14R 18L 38V 60R 73F 106C 115R 117D
BL10P25 E7	Acrilodan	Texas Red-X SE tinte			14F 18L 27C 60R 73F 106V 115R 117D
BL10P25E7 - MGI- KR14	Acrilodan	Texas Red -X SE			MGI - KR14 -14F 18L 27C 60R 73F 106V 115R 117D
BL10P25E7 - MGI- KR14	Acrilodan	Rodamina Red X-SE			MGI - KR14 -14F 18L 27C 60R 73F 106V 115R 117D
BL10P25E7 - MGI- KR14	Acrilodan	Texas Red			MGI- KR14 -14F 18L 27C 60R 73F 106V 115R 117D
BL22P1 B11	Acrilodan	Amarillo cascada'- SE			MGI - KR14 - 14R 18L 25C 27A 38V 60R 73F 106L 115R 117D
BL22P1 B11	Acrilodan	Cloruro de dansilo			MGI - KR14 - 14R 18L 25C 27A 38V 60R 73F 106L 115R 117D
BL22P1 B11	Acrilodan	Dapoxilo - SE			MGI - KR14 - 14R 18L 25C 27A 38V 60R 73F 106L 115R 117D
BL22P1 B11	Acrilodan	Dapoxilo			MGI - KR14 - 14R 18L 25C 27A 38V 60R 73F 106L 115R 117D
BL22P1 B11	Acrilodan	Ácido carboxílico NBD-Cloruro de sulfonilo			MGI - KR14 - 14R 18L 25C 27A 38V 60R 73F 106L 115R 117D

(Continuado)

Constructo	Fluor primario	Fluor secundario	Kd	Qs	Mutaciones
Dos fluoroforos covalentemente unidos a la sonda					
5 BL22P1 B11	Acridodan	Rodamina Isotiocianato			MGI - KR14 - 14R 18L 25C 27A 38V 60R 73F 106L 115R 117D
BL22P1 B11	Acridodan	Rodamina Red X-SE			MGI - KR14 - 14R 18L 25C 27A 38V 60R 73F 106L 115R 117D
10 BL22P1 B11	Acridodan	SPDP + Rodamina Red X-SE			MGI - KR14 - 14R 18L 25C 27A 38V 60R 73F 106L 115R 117D
BL22P1 B11	Acridodan	Texas Red -X SE			MGI - KR14 - 14R 18L 25C 27A 38V 60R 73F 106L 115R 117D
15 BL22P1 B11 - 130K	Acridodan	Rodamina Red X-SE			MGI - KR14 - 14R 18L 25C 27A 38V 60RA73F 106L 115R 117D 130K
BL22P1 B11 - 130K	Acridodan	SPDP + Rodamina: Red X-SE			MGI - KR14 - 14R 18L 25C 27A 38V 60RA73F 106L 115R 117D 130K
20 BL22P1B11 -MGGSATGIFD	Acridodan	Rodamina Red X-SE			MGGSATGIFD- KR14 -14R 18L 25C 27A 38V 60R 73F 106L 115R 117D
BL22P1B11 -MGGSATGIFD	Acridodan	Rodamina: Red X-SE			MGGSATGIFD- KR14 -14R 18L 25C 27A 38V 60R 73F 106L 115R 117D
25 BL22P1B11 - MGGSATGIFD	Acridodan	SPDP + Rodamina Red X-SE			MGGSATGIFD- KR14 -14R 18L 25C 27A 38V 60R 73F 106L 115R 117D
BL22P2D4	Acridodan				MGI-KR14-14R 18L 25C 27A 38V 60R 73F 106V 115R 117D
30 BL22P2F3	Acridodan				MGI-KR14-14R 18L 25C 27A 38V 60R 73F 106A 115R 117D
Segundo fluoroforo (libre) no unido					
35 BL10P25E7	Acridodan	Rodamina B	19	0	MGI - KR14 - 14F 18L 27C 60R 73F 106V 115R 117D
BL22P1 B11	Acridodan	Rodamina B	16	0	MGI - KR14 - 14R 18L 25C 27A 38V 60R 73F 106L 115R 117D

40

45

50

55

60

65

EJEMPLO 11: Sondas de bilirrubina inmovilizadas

[0107]

Tabla 8: Todas las proteínas se basan en la SEQ 3 y, por lo tanto, tienen una etiqueta adicional de 6 His en el extremo C. Las secuencias de modificación N-terminales reemplazan la metionina N-terminal de la secuencia de la plantilla (es decir, la secuencia X cambia de MGIFD a X-GIFD). Las secuencias de modificación C-terminales reemplazan la etiqueta de histidina seis C-terminal de la secuencia de plantilla (es decir, la secuencia Y cambia RRRGGHHHHH a RRRDRG-Y). Los fluoróforos derivados a 25K incluyeron acrilodan, Biotum, Kodak X-Sight, y los tintes LiCor IR de Tabla 3.

Construcoto	Secuencia de modificación N-terminal	Secuencia de modificación C-terminal
ENLACE QUÍMICO A TRAVÉS DE LISINA BL22P1B11_25C-7K BL22P1B11_25C-7K, 37K, 46K, 50K BL22P1B11_25C-7K, 37K, 46K, 50K, 88K, 92K BL22P1B11_25C-7K, 37K, 46K, 50K, 129K, 130K BL22P1B11_25C-7K, 37K, 46K, 50K, 88K, 92K, 129K, 130K		
ENLACE QUÍMICO A TRAVÉS DE CISTEÍNA BL22P1B11_25K_3C BL22P1B11_25K_7C BL22P1B11_25K_46C BL22P1B11_25K_50C BL22P1B11_25K_67C BL22P1B11_25K_83C BL22P1B11_25K_109C		
Los siguiente clones son mutantes N-terminales de BL22P1B11_25K		
BL23P1A8_25K	MGACSGG	
BL23P1B10_25K	MGSAGCG	
BL23P2A7_25K	MGGGGCC	
BL23P2C8_25K	MGGSGGC	
BL23P3A2_25K	MGDTAGC	
BL23P4B2_25K	MGGDCGG	
BL23P4B4_25K	MGGCSGA	
BL23P4B6_25K	MGGGDGC	
BL23P4B7_25K	MGSSNSC	
BL23P4C8_25K	MGSDCAY	
BL23P4E2_25K	MGDTNCG	

(continuado)

Los siguientes clones son mutantes N-terminales de BL22P1B11_25K BL23P4E7_25K MGGSGCS BL23P4G5_25K MGGCGCG BL23P5A4_25K MGANACG BL23P5B7_25K MGGGACG	
Constructo	Secuencia de modificación N-terminal
BL23P5E2_25K BL23P5H12_25K BL23P6B5_25K BL23P6C10_25K BL23P6C5_25K BL23P6D3_25K BL23P6D9_25K	MGGNCGG MGCGGSC MGGSTSC MGDGGCS MGATSCG MGASCGY MGDGACG
ENLACE NO COVALENTE BL22P1B11_25K_N6C6 BL22P1B11_25K_N6C6_GS BL22P1B11_25K_C2X BL22P1B11_25K_C2X_GS BL22P1B11_25K_PS19D5 (PS19-1) BL22P1B11_25K_PS19-6L BL22P1B11_25K_PS19-6I	GGSGSGSGHHHHHH HHHHHHRAWRHPQFGHHHHHH GGGSGGGGGTGGGGGRRADAHHHHHRAWRHPC HHHHHRAFIASRRIRRP HHHHHRLLLRRLRR HHHHHHRIIRRRIRR
Los siguientes clones son mutantes C-terminales de BL22P1B11_25K C2XFFA3H11_25K C2XFFA3B3_25K	AASHHHHHSHRATPNTSPHHHHHHH NDNHHHHHPSNTNHNNSNHHHHHH

EJEMPLO 12

5 [0108] Las mediciones de bilirrubina no enlazada y FFA no unido se realizaron en muestras de sangre, que de lo contrario se descartarían, se obtendrían de 5 recién nacidos de peso extremadamente bajo al nacer (<2000 g) tratados con una emulsión grasa (Intralipid®) de 3 a 3,5 g/kg/día. Las mediciones de bilirrubina no enlazada se realizaron utilizando BL22P1B11-Rh en muestras de plasma diluidas 25 veces en tampón HEPES. Las concentraciones de FFAu se determinaron en plasma diluido 50 veces en tampón HEPES y las mediciones se realizaron como se describe en [Huber AH, Kampf JP, Kwan T, Zhu B y Kleinfeld AM. Sondas fluorescentes específicas de ácidos grasos y su uso en la resolución de mezclas de diferentes ácidos grasos libres no unidos en equilibrio con albúmina. BioChemistry 45: 14263-14274, 2006]. Las intensidades de fluorescencia se midieron utilizando un medidor FFAu como se describe en [Huber AH, Kampf JP, Kwan T, Zhu B y Kleinfeld AM. Sondas fluorescentes específicas de ácidos grasos y su uso en la resolución de mezclas de diferentes ácidos grasos libres no unidos en equilibrio con albúmina. BioChemistry 45: 14263-14274, 2006] para FFAu y el mismo medidor modificado para emisiones a 525 y 575nm para Bf. Las concentraciones de bilirrubina no enlazada se determinaron a partir de las relaciones de fluorescencia de 525/575 nm usando la ecuación (6). Los FFA sin unir se realizaron utilizando ADIFAB2 como se describe en Cantor y col. [Cantor WJ, Hoe Kim H, Jolly S, Moe G, Burstein JM, Mendelsohn A, Kleinfeld AM y Fitchett D. Péptido natriurético tipo B y niveles de ácido graso libre no unido en el suero después de la intervención coronaria percutánea contemporánea. Journal of Invasive Cardiology 20:186-188, 2008]. La distribución de las especies de FFAu se estimó para la infusión de Intralipid® utilizando el método de [Richieri, G y Kleinfeld, AM, niveles de ácidos grasos libres sin consolidar en suero humano. Journal of Lipid Research 36: 229-240, 1995].

TABLA 9

25

Paciente	Bilirrubina no enlazada	FFA no enlazada
nM	nM	
1	33	35
2	9	20
3	94	1270
4	80	600
5	30	54

30

35 [0109] Aunque se sabe que Intralipid® puede aumentar el FFA total y, por lo tanto, aumentar la bilirrubina no enlazada, los resultados del Ejemplo 12 demuestran que el FFA no unido (FFAu) puede aumentar por factores mucho más grandes que el FFA total. Esto se debe a que la proporción de FFA total a albúmina aumenta linealmente (aproximadamente 10 veces en el estudio de Amin [Amin SB. Efecto de los ácidos grasos libres en la afinidad de unión bilirrubina-albúmina y bilirrubina no ligada en bebés prematuros. JPEN J Parenter Enteral Nutr 34: 414-420, 2010] mientras que los FFAu aumentan esencialmente exponencialmente en las proporciones grandes de FFA a albúmina, más de 1000 veces en la Tabla 9, En el Ejemplo 12, dos de los pacientes tenían niveles de FFAu de 600 y 1200 nM, mientras que los niveles normales son 1-2 nM [Apple FS, Kleinfeld AM y Adams JE. Las concentraciones de ácidos grasos libres sin consolidar aumentan en la isquemia cardíaca. Clinical Proteomics 1:41-44, 2004]. A niveles incluso muy inferiores a 600 nM, muchos estudios han demostrado efectos tóxicos del FFA (o FFAu), incluida la toxicidad cardiovascular, el bloqueo de la respuesta inmune y los efectos perjudiciales en muchas funciones celulares [Kleinfeld AM y Okada C. La liberación de ácidos grasos libres del tejido del cáncer de mama humano inhibe la muerte mediada por linfocitos T. J Lipid R 46: 1983-1990, 2005; Oliver MF. Muerte cardíaca súbita: la hipótesis del ácido graso perdido. QJM 99: 701-709, 2006]. Solo mediante el monitoreo de los niveles de FFAu durante la infusión de Intralipid® se pueden identificar aquellos bebés con riesgo de toxicidad por FFAu.

50

55 [0110] Las especies de FFA principales (>75%) generadas a partir de Intralipid® son FFA linoleico, oleico, palmítico y linolénico FFA. Debido a que ADIFAB2 es más específico para el ácido esteárico, para el cual Intralipid® contiene solo entre 1,5 y 5,5%, las sondas FFAu con especificidad para el FFAu linoleico, oleico, palmítico y linolénico brindarán una detección más precisa y sensible del aumento en el FFAu plasmático debido a hidrólisis Intralipid®. Dichas sondas FFAu se han producido (Tabla 10) utilizando los métodos descritos en la Patente de EE.UU. 7,601,510 y la publicación de EE.UU. 2010/0298162 y en [Huber AH, Kampf JP, Kwan T, Zhu B y Kleinfeld AM. Sondas fluorescentes específicas de ácidos grasos y su uso en la resolución de mezclas de diferentes ácidos grasos libres no unidos en equilibrio con albúmina. BioChemistry 45: 14263-14274, 2006]. Las sondas sensibles de FFAu son necesarias para detectar el aumento en los niveles de FFAu del paciente, al inicio de la titulación de Intralipid®, que es fundamental para evitar que la bilirrubina no enlazada y el FFAu alcancen niveles tóxicos.

60

65

Tabla 10: Sondas FFAu para medir los niveles de FFAu en pacientes tratados con Intralipid®

	KD (nM)					
	Clon	Mutaciones	LA	OA	PA	SA
5	ADIFAB2	72A	105,1	21,5	19,5	7,6
	L19CP10C7	MGI- 14R 18L 27C 71173F 117D	0,8	1,2	7,5	1,9
10	L138P1H8 N24C	MGI- 18L 21L 23Y24C 31I 55V 72S 73S 74G 76V 117H 128Y	6,5	7,6	34,2	12,6
	L22P5E11	38R 69T 72A 73K 106A	6,7	3,1	18,3	2,2
15	L61P8 B12	8I 14L 18L 23L 27Y 30C 31V 53I 55W 72G 73T 74A 78V 82V 91Y 93M 102V 106W 115W 117L	25,7	4,3	8,5	15,0
	L4BP4B9	73W 74S	40,8	18,9	2,9	12,6
	L119P3E5	18V 27C 31A 72A 73W	23,0	12,7	4,0	7,4

20 LISTADO DE SECUENCIAS

[0111]

- 25 <110> Kleinfeld, Alan Marc
Huber, Andrew Henry
Kampf, James Patrick
Kwan, Thomas
Zhu, Baolong
- 30 <120> Identificación y uso de sondas fluorescentes de bilirubina no enlazada
- <130> FFASC.073WO
- 35 <140>
<141>
- <150> US 61/527,849
- 40 <151> 2011-08-26
- <160> 32
- <170> FastSEQ for Windows Versión 4.0
- 45 <210> 1
<211> 399
<212> ADN
<213> Rattus norvegicus
- 50 <220>
<221> CDS
<222> (1)...(399)
<223> Secuencia de ADNc de proteína de unión a ácido graso intestinal de rata de tipo silvestre
- 55 <400> 1

60

65

ES 2 733 974 T3

atg gca ttt gat ggc act tgg aaa gta tac cgg aat gag aac tat gaa 48
 Met Ala Phe Asp Gly Thr Trp Lys Val Tyr Arg Asn Glu Asn Tyr Glu
 1 5 10 15
 5
 aag ttc atg gag aaa atg ggc att aac gtg gtg aag agg aag ctt gga 96
 Lys Phe Met Glu Lys Met Gly Ile Asn Val Val Lys Arg Lys Leu Gly
 20 25 30
 10
 gct cat gac aac ttg aaa ctg acg atc aca cag gaa gga aat aaa ttc 144
 Ala His Asp Asn Leu Lys Leu Thr Thr Ile Thr Gln Glu Gly Asn Lys Phe
 35 40 45
 15
 aca gtc aaa gaa tca agc aac ttc cga aac att gat gtt gtg ttt gaa 192
 Thr Val Lys Glu Ser Ser Asn Phe Arg Asn Ile Asp Val Val Phe Glu
 50 55 60
 20
 ctc ggc gtc gac ttt gcc tat agt cta gca gat gga aca gaa ctc act 240
 Leu Gly Val Asp Phe Ala Tyr Ser Leu Ala Asp Gly Thr Glu Leu Thr
 65 70 75 80
 25
 ggg acc ttg acc atg gag gga aat aaa ctt gtt gga aaa ttc aaa cgt 288
 Gly Thr Leu Thr Met Glu Gly Asn Lys Leu Val Gly Lys Phe Lys Arg
 85 90 95
 30
 gta gac aat gga aag gag ctg att gct gtc cga gag att tct ggt aac 336
 Val Asp Asn Gly Lys Glu Leu Ile Ala Val Arg Glu Ile Ser Gly Asn
 100 105 110
 35
 gaa cta atc caa acc tac aca tat gaa gga gtg gag gcc aag cgc atc 384
 Glu Leu Ile Gln Thr Tyr Thr Tyr Glu Gly Val Glu Ala Lys Arg Ile
 115 120 125
 40
 ttt aag aag gaa tag 399
 Phe Lys Lys Glu *
 130

40
 <210> 2
 <211> 131
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus
 45
 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)...(131)
 <223> proteína de unión a ácido graso intestinal de rata de tipo
 50
 <220>
 <221> ACETILACIÓN
 <222> (1)...(1)
 55
 <400> 2

60

65

ES 2 733 974 T3

5 Ala Phe Asp Gly Thr Trp Lys Val Asp Arg Asn Glu Asn Tyr Glu Lys
 1 5 10 15
 Phe Met Glu Lys Met Gly Ile Asn Val Val Lys Arg Lys Leu Gly Ala
 20 25 30
 10 His Asp Asn Leu Lys Leu Thr Ile Thr Gln Glu Gly Asn Lys Phe Thr
 35 40 45
 Val Lys Glu Ser Ser Asn Phe Arg Asn Ile Asp Val Val Phe Glu Leu
 50 55 60
 15 Gly Val Asp Phe Ala Tyr Ser Leu Ala Asp Gly Thr Glu Leu Thr Gly
 65 70 75 80
 Thr Trp Thr Met Glu Gly Asn Lys Leu Val Gly Lys Phe Lys Arg Val
 85 90 95
 20 Asp Asn Gly Lys Glu Leu Ile Ala Val Arg Glu Ile Ser Gly Asn Glu
 100 105 110
 25 Leu Ile Gln Thr Tyr Thr Tyr Glu Gly Val Glu Ala Lys Arg Ile Phe
 115 120 125
 Lys Lys Glu
 130

25

30

<210> 3
 <211> 139
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

35

<220>
 <221> MUTAGEN
 <222> (131)...(131)

40

<223> proteína de unión a ácido graso intestinal de rata con sustitución Glu 131 a Asp.

<223> etiqueta de afinidad de COOH-terminal que comprende Arg132, Gly133 y 6 histidinas

45

<400> 3

Ala Phe Asp Gly Thr Trp Lys Val Asp Arg Asn Glu Asn Tyr Glu Lys
 1 5 10 15
 Phe Met Glu Lys Met Gly Ile Asn Val Val Lys Arg Lys Leu Gly Ala
 20 25 30
 50 His Asp Asn Leu Lys Leu Thr Ile Thr Gln Glu Gly Asn Lys Phe Thr
 35 40 45
 Val Lys Glu Ser Ser Asn Phe Arg Asn Ile Asp Val Val Phe Glu Leu
 50 55 60
 55 Gly Val Asp Phe Ala Tyr Ser Leu Ala Asp Gly Thr Glu Leu Thr Gly
 65 70 75 80
 Thr Trp Thr Met Glu Gly Asn Lys Leu Val Gly Lys Phe Lys Arg Val
 85 90 95
 60 Asp Asn Gly Lys Glu Leu Ile Ala Val Arg Glu Ile Ser Gly Asn Glu
 100 105 110
 Leu Ile Gln Thr Tyr Thr Tyr Glu Gly Val Glu Ala Lys Arg Ile Phe
 115 120 125
 65 Lys Lys Asp Arg Gly His His His His His His
 130 135

ES 2 733 974 T3

5 <210> 4
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> enlazador químicamente sintetizado
 Met Gly Ala Cys Ser Gly Gly <400> 4
 1 5
 10

 <210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> enlazador químicamente sintetizado
 20 <400> 5

 Met Gly Ser Ala Gly Cys Gly
 1 5
 25
 <210> 6
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 30 <223> enlazador químicamente sintetizado

 <400> 6

 Met Gly Gly Gly Gly Cys Cys
 1 5
 35

 <210> 7
 <211> 7
 <212> PRT
 40 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> enlazador químicamente sintetizado
 45 <400> 7

 Met Gly Gly Ser Gly Gly Cys
 1 5
 50
 <210> 8
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> enlazador químicamente sintetizado

 <400> 8
 60

 Met Gly Asp Thr Ala Gly Cys
 1 5
 65

 <210> 9
 <211> 7
 <212> PRT

ES 2 733 974 T3

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> enlazador químicamente sintetizado

5

<400> 9

Met Gly Gly Asp Cys Gly Gly
1 5

10 <210> 10
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> enlazador químicamente sintetizado

<400> 10

20 Met Gly Gly Cys Ser Gly Ala
1 5

<210> 11
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25

<220>
<223> enlazador químicamente sintetizado

30

<400> 11

Met Gly Gly Gly Asp Gly Cys
1 5

35 <210> 12
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40

<220>
<223> enlazador químicamente sintetizado

<400> 12

45 Met Gly Ser Ser Asn Ser Cys
1 5

<210> 13
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50

<220>
<223> enlazador químicamente sintetizado

55

<400> 13

Met Gly Ser Asp Cys Ala Tyr
1 5

60 <210> 14
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

65 <220>
<223> enlazador químicamente sintetizado

ES 2 733 974 T3

<400> 14

5 Met Gly Asp Thr Asn Cys Gly
1 5

<210> 15
<211> 7
<212> PRT
10 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> enlazador químicamente sintetizado

15 <400> 15

Met Gly Gly Ser Gly Cys Ser
1 5

<210> 16
20 <211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
25 <223> enlazador químicamente sintetizado

<400> 16

Met Gly Gly Cys Gly Cys Gly
1 5

30 <210> 17
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> enlazador químicamente sintetizado

<400> 17

40 Met Gly Ala Asn Ala Cys Gly
1 5

<210> 18
45 <211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
50 <223> enlazador químicamente sintetizado

<400> 18

Met Gly Gly Gly Ala Cys Gly
1 5

55 <210> 19
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> enlazador químicamente sintetizado

<400> 19

65 Met Gly Gly Asn Cys Gly Gly
1 5

ES 2 733 974 T3

<210> 20
 <211> 7
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> enlazador químicamente sintetizado
 10 <400> 20

 Met Gly Cys Gly Gly Ser Cys
 1 5
 15 <210> 21
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> enlazador químicamente sintetizado

 <400> 21
 25 <210> 22
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> enlazador químicamente sintetizado
 30 <400> 22

 Met Gly Asp Gly Gly Cys Ser
 1 5
 35 <210> 23
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> enlazador químicamente sintetizado
 40 <400> 23

 Met Gly Ala Thr Ser Cys Gly
 1 5
 45 <210> 24
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> enlazador químicamente sintetizado

 <400> 24
 55 <210> 25
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> enlazador químicamente sintetizado
 60 <400> 25

 Met Gly Ala Ser Cys Gly Tyr
 1 5
 65 <210> 26
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 733 974 T3

<220>
 <223> enlazador químicamente sintetizado

5 <400> 25

Met Gly Asp Gly Ala Cys Gly
 1 5

10 <210> 26
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> enlazador químicamente sintetizado

<400> 26

Met Gly His His His His His His
 1 5

20 <210> 27
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> enlazador químicamente sintetizado

30 <400> 27

Met Gly His His His His His His Gly Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 1 5 10 15

35 <210> 28
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> enlazador químicamente sintetizado

<400> 28

Gly Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly His His His His His His
 1 5 10

45 <210> 29
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> enlazador químicamente sintetizado

55 <400> 29

His His His His His His Ser Arg Ala Trp Arg His Pro Gln Phe Gly
 1 5 10 15
 Gly His His His His His His
 20

60 <210> 30
 <211> 48
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

65 <220>

ES 2 733 974 T3

<223> enlazador químicamente sintetizado

<400> 30

5 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Thr Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15
 Gly Gly Gly Arg Arg Ala Asp Ala Ala His His His His His His Ser
 20 25 30
 Arg Ala Trp Arg His Pro Gln Phe Gly Gly His His His His His His
 35 40 45

10 <210> 31
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> enlazador químicamente sintetizado

<400> 31

20 His His His His His His Arg Ala Phe Ile Ala Ser Arg Arg Ile Arg
 1 5 10 15
 Arg Pro

25 <210> 32
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> enlazador químicamente sintetizado

<400> 32

His His His His His His Arg Leu Leu Leu Arg Arg Leu Arg Arg
 1 5 10 15

35 <210> 33
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> enlazador químicamente sintetizado

<400> 33

45 His His His His His His Arg Ile Ile Ile Arg Arg Ile Arg Arg
 1 5 10 15

50 <210> 34
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> enlazador químicamente sintetizado

<400> 34

Ala Ala Ser His His His His His His Ser His Arg Ala Thr Pro Asn
 1 5 10 15
 Thr Ser Pro His His His His His His His His
 20 25

60 <210> 35
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

65 <220>

ES 2 733 974 T3

<223> enlazador químicamente sintetizado

<400> 35

5 Asn Asp Asn His His His His His His Pro Ser Asn Thr Asn His Asn
 1 5 10
 Ser Asn Ser Asn His His His His His His
 20 25

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende:

5

(a) una sonda que se une a la bilirrubina pero que no se une significativamente al ácido graso, comprendiendo dicha sonda una muteína de la proteína de unión a los lípidos intracelulares (iLBP) marcada con un primer fluoróforo, en donde la sonda se selecciona del grupo que consiste en:

10 L24P19C7 que tiene mutaciones 14R, 18L, 38V, 60R, 73F, 106C, 115R, 117D, marcadas con Acrylodan;

L24P19C7 K27A que tiene mutaciones 14R, 18L, 27A, 38V, 60R, 73F, 106C, 115R, 117D, marcadas con Acrylodan;

15 L24P19C7 K27K 22C que tiene mutaciones 14R, 18L, 22C, 38V, 60R, 73F, 106C, 115R, 117D, marcadas con Acrylodan;

L24P19C7 K27K 24C con mutaciones 14R, 18L, 24C, 38V, 60R, 73F, 106C, 115R, 117D, marcadas con Acrylodan;

20 L24P19C7 K27K 25C con mutaciones 14R, 18L, 25C, 38V, 60R, 73F, 106C, 115R, 117D, marcadas con Acrylodan;

L24P19C7 K27K 26C que tiene mutaciones 14R, 18L, 26C, 38V, 60R, 73F, 106C, 115R, 117D, marcadas con Acrylodan;

25 L24P19C7 K27K 30C con mutaciones 14R, 18L, 30C, 38V, 60R, 73F, 106C, 115R, 117D, marcadas con Acrylodan;

BL22P1B11 con mutaciones MGI, 7R, 14R, 16R, 18L, 20R, 25C, 27A, 29R, 37R, 38V, 46R, 50R, 60R, 73F, 88R, 92R, 94R, 100R, 106L, 115R, 117D, 125R, 129R, 130R, marcados con Acrylodan;

30 BL22P1B11-24C con mutaciones MGI, 7R, 14R, 16R, 18L, 20R, 24C, 27A, 29R, 37R, 38V, 46R, 50R, 60R, 73F, 88R, 92R, 94R, 100R, 106L, 115R, 117D, 125R, 129R, 130R, etiquetados con Alexa Fluor 680 C2-maleimida en una cisteína;

BL22P1B11-27C que tiene mutaciones MGI, 7R, 14R, 16R, 18L, 20R, 27C, 29R, 37R, 38V, 46R, 50R, 60R, 73F, 88R, 92R, 94R, 100R, 106L, 115R, 117D, 125R, 129R, 130R, etiquetados con Alexa Fluor 680 C2-maleimida en una cisteína;

35 BL22P1B11-25K con mutaciones MGI, 7R, 16R, 18L, 20R, 25K, 27A, 29R, 37R, 38V, 46R, 50R, 60R, 73F, 88R, 92R, 94R, 100R, 106L, 115R, 117D, 125R, 129R, 130R, marcados con LiCor IRDye 700 DX en una amina o en lisina en la posición 25,

en donde MGI se refiere a la mutación de la secuencia del extremo NH₂ de tipo salvaje de MAFD a MGIFD, y en donde las mutaciones se refieren a SEQ ID NO: 3;

40 (b) un segundo fluoróforo, en el que el segundo fluoróforo está libre en solución o unido a una proteína que no se unen a la bilirrubina, en donde el primer fluoróforo y el segundo fluoróforo son capaces de excitarse a la misma longitud de onda, en donde el segundo fluoróforo no está unido a la sonda, y en donde la longitud de onda de emisión del primer fluoróforo y el segundo fluoróforo son diferentes, y en el que el segundo fluoróforo no es cambiar su emisión en respuesta a la unión de la bilirrubina a la muteína iLBP.

45 2. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende:

una sonda que comprende una proteína de unión lipídica intracelular (iLBP), en donde el iLBP corresponde a la SEQ ID NO: 3 que comprenden las sustituciones 14R, 18L, 25C, 27A, 38V, 60R, 73F, 106L, 115R, 117D, y un primer y un segundo fluoróforo, en el que el primer fluoróforo está unido a la sustitución de cisteína en la posición 25 y en el que el segundo fluoróforo está libre en solución o está unido a una proteína que no se une a la bilirrubina, en donde la sonda se une a la bilirrubina pero no se une significativamente al ácido graso.

50 3. La composición de la reivindicación 2, en la que el segundo fluoróforo está libre de rodamina B en solución.

55 4. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que el segundo fluoróforo está unido a una proteína que no se une a bilirrubina.

60 5. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 unida a un sustrato sólido, en donde el sustrato sólido es preferiblemente una perla de poliestireno o látex, poliestireno de Ni, perla de Niagarosa, opcionalmente con núcleo de hierro y/o dispositivo microfluídico o placa de múltiples pocillos.

6. Un kit que comprende:

uno o más dispositivos de recolección para recolectar una muestra de un paciente,

una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 5 en un soporte adecuado, y opcionalmente, un estándar de referencia, que comprende una concentración conocida de bilirrubina no

7. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que el sustrato sólido es una perla de poliestireno o látex, poliestireno de Ni, perla de Niagarosa, opcionalmente con núcleo de hierro y/o dispositivo microfluídico o placa de múltiples pocillos.

8. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que el sustrato sólido es una perla de poliestireno o látex, poliestireno de Ni, perla de Niagarosa, opcionalmente con núcleo de hierro y/o dispositivo microfluídico o placa de múltiples pocillos.

9. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que el sustrato sólido es una perla de poliestireno o látex, poliestireno de Ni, perla de Niagarosa, opcionalmente con núcleo de hierro y/o dispositivo microfluídico o placa de múltiples pocillos.

10. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que el sustrato sólido es una perla de poliestireno o látex, poliestireno de Ni, perla de Niagarosa, opcionalmente con núcleo de hierro y/o dispositivo microfluídico o placa de múltiples pocillos.

11. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que el sustrato sólido es una perla de poliestireno o látex, poliestireno de Ni, perla de Niagarosa, opcionalmente con núcleo de hierro y/o dispositivo microfluídico o placa de múltiples pocillos.

12. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que el sustrato sólido es una perla de poliestireno o látex, poliestireno de Ni, perla de Niagarosa, opcionalmente con núcleo de hierro y/o dispositivo microfluídico o placa de múltiples pocillos.

13. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que el sustrato sólido es una perla de poliestireno o látex, poliestireno de Ni, perla de Niagarosa, opcionalmente con núcleo de hierro y/o dispositivo microfluídico o placa de múltiples pocillos.

unida.

7. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el iLBP comprende sustituciones de aminoácidos que comprenden 14R, 18L, 38V, 60R, 73F, 106C, 115R y 117D, y en donde el primer fluoróforo está unido a un residuo de lisina, en donde el segundo fluoróforo es Rodamina B libre en solución.

8. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que la sonda comprende además una o más etiquetas, en la que las etiquetas se seleccionan de entre las etiquetas His y las etiquetas PS.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Figura 1

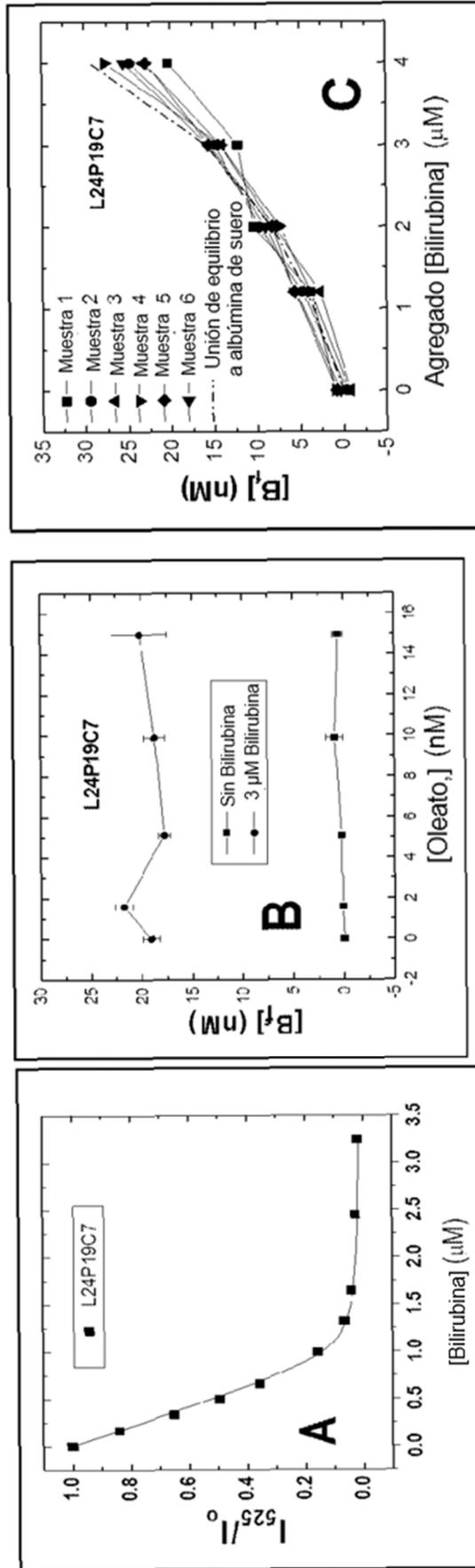


Figura 2

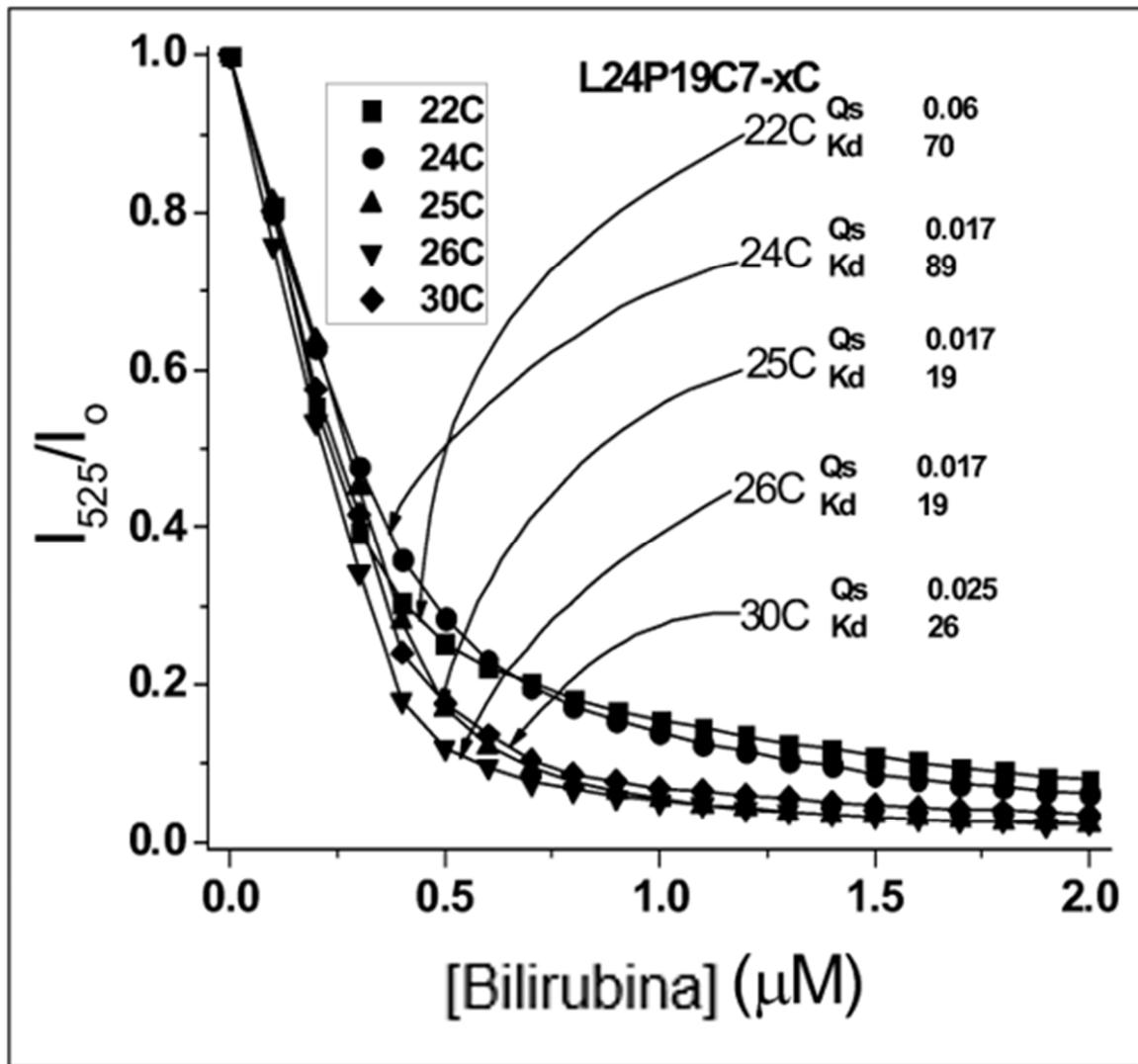


Figura 3

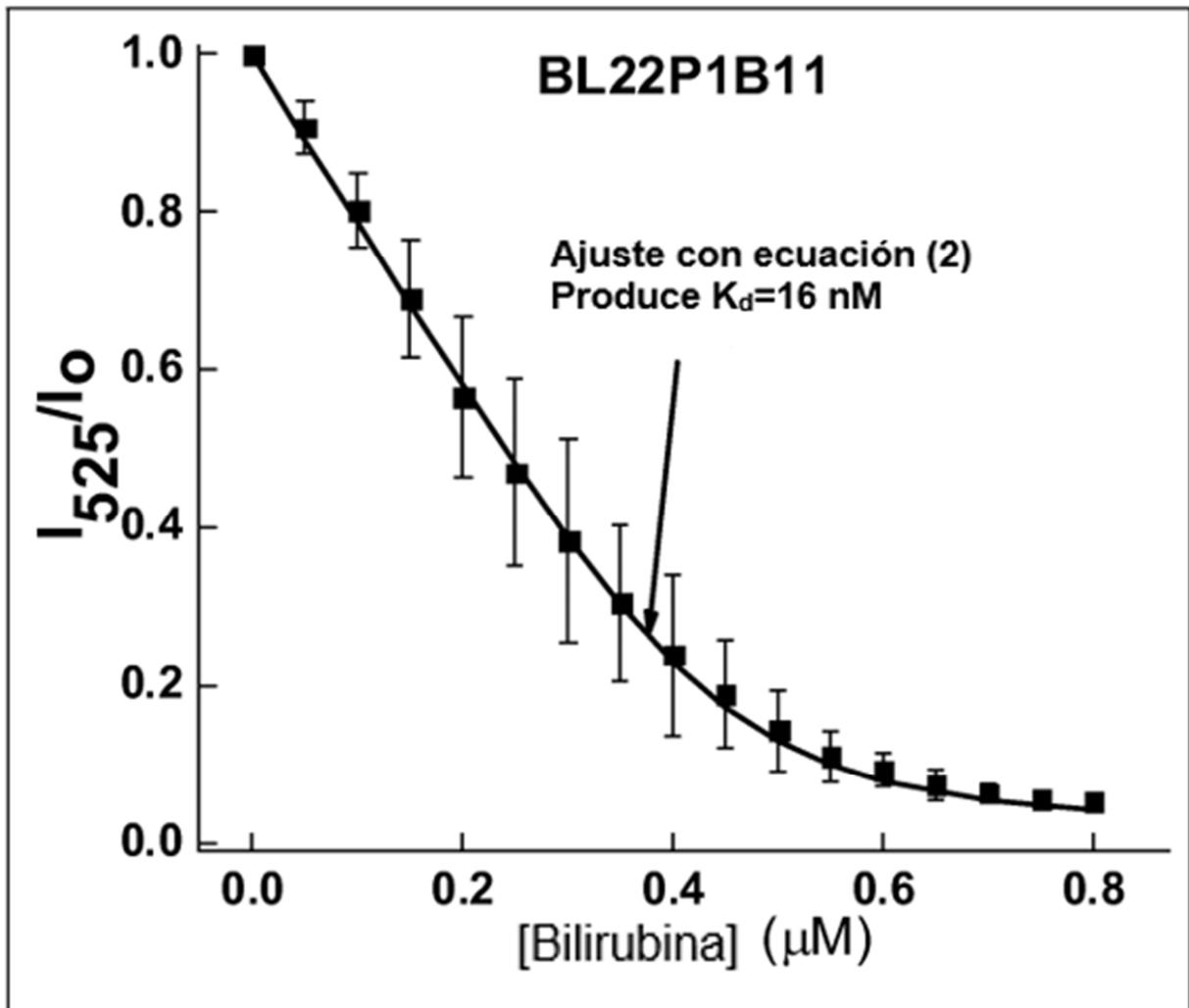


Figura 4

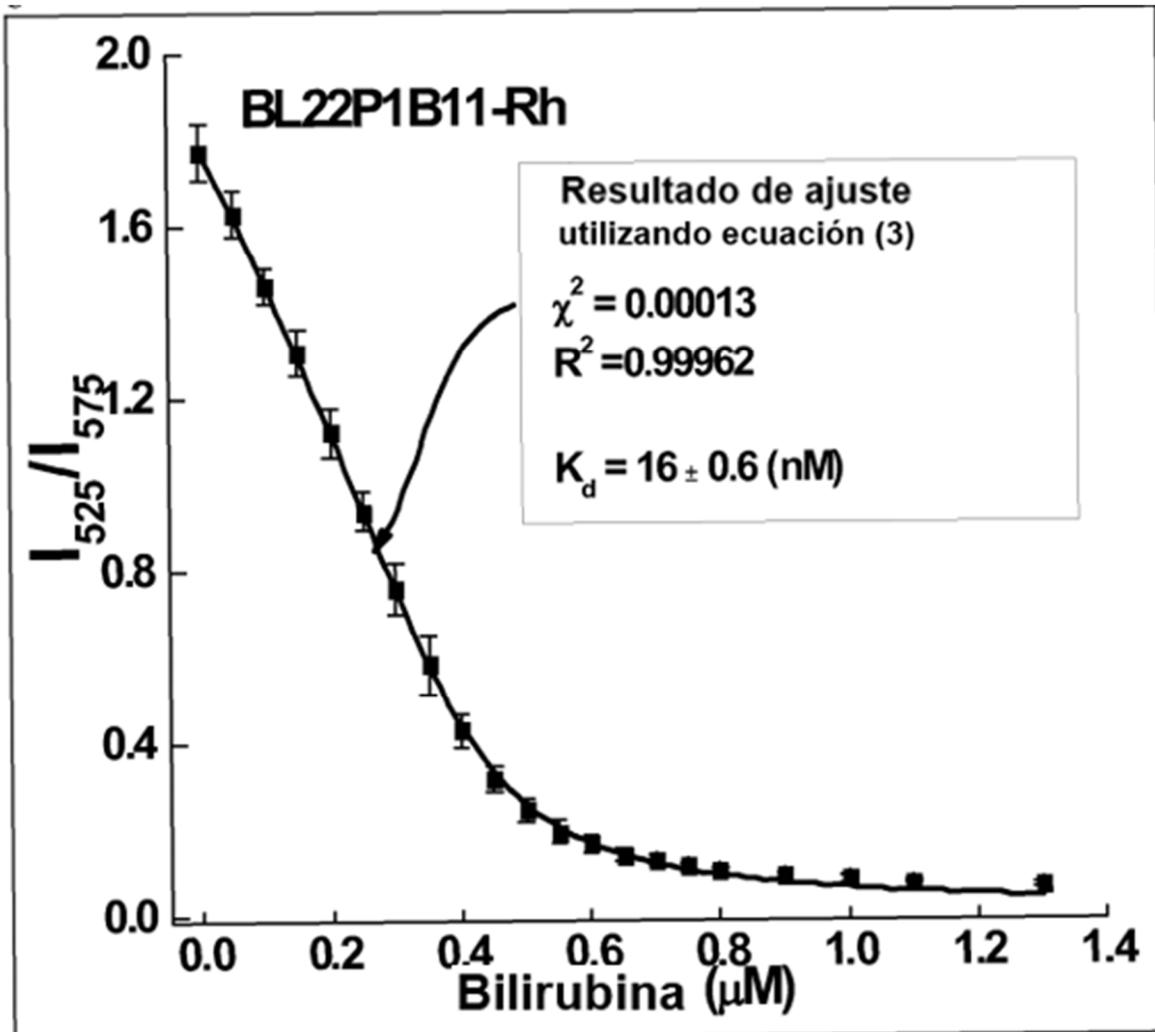


Figura 5

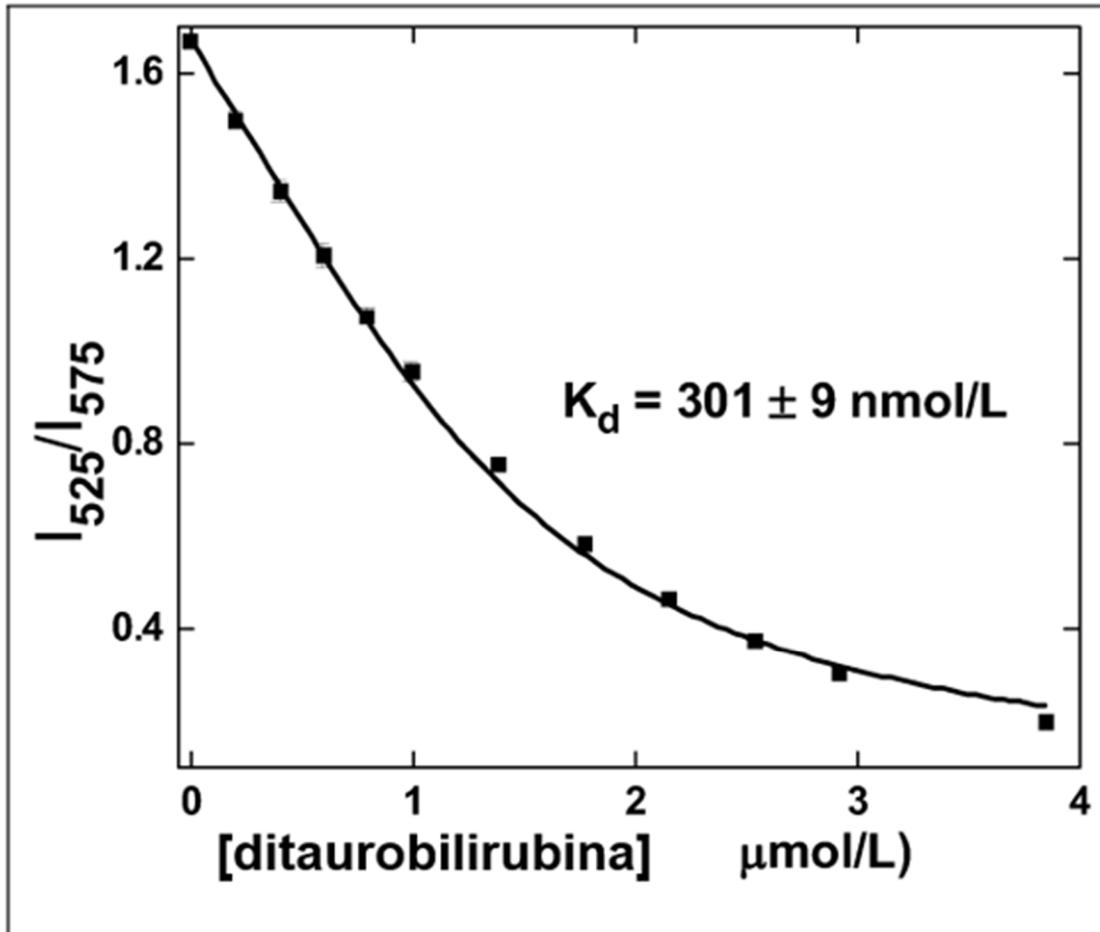


Figura 6

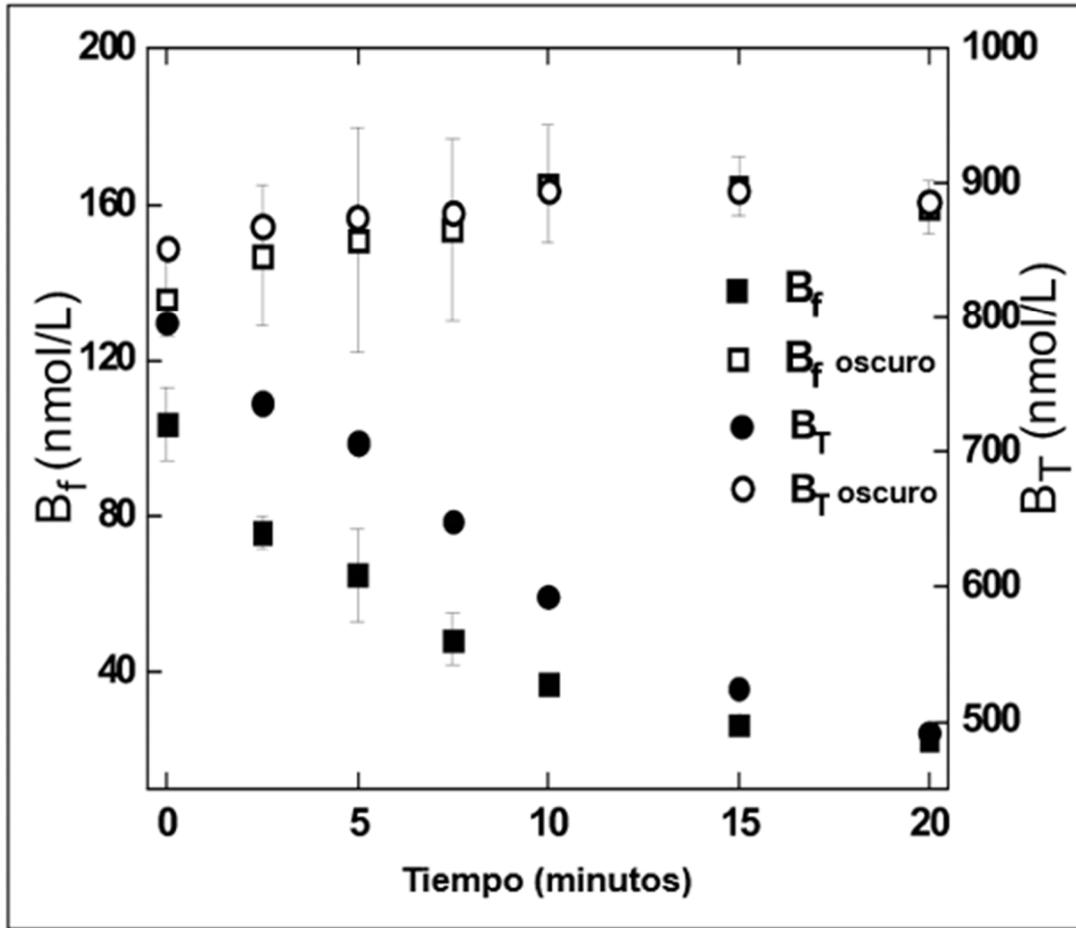


Figura 7

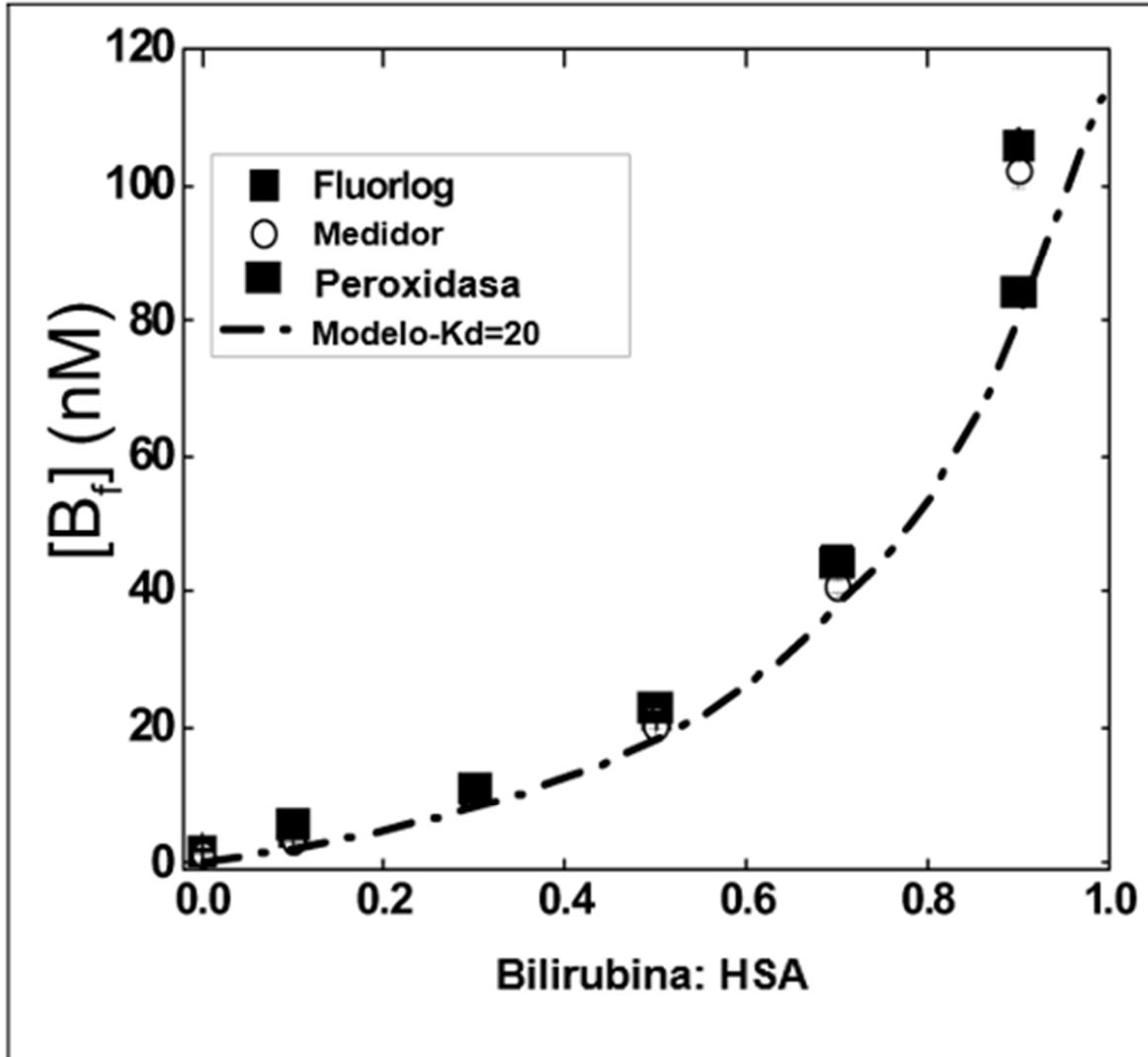


Figura 8

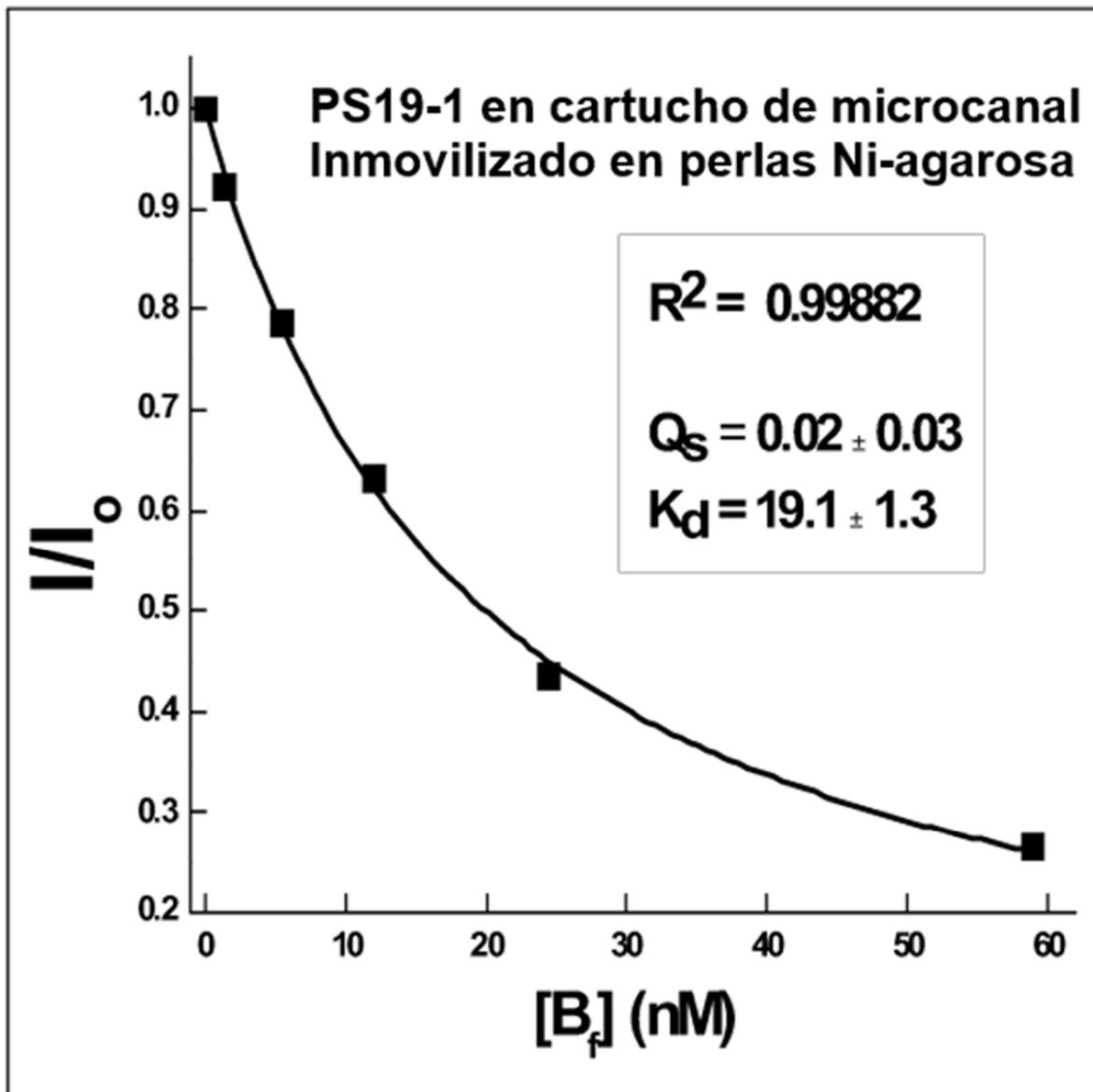


Figura 9

