



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 310 647**

51 Int. Cl.:
C07K 14/245 (2006.01)
C12M 1/34 (2006.01)
C12Q 1/00 (2006.01)
G01N 31/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03700682 .2**
96 Fecha de presentación : **06.01.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1468023**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.10.2004**

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

30 Prioridad: **04.01.2002 US 40077**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.01.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.01.2009

73 Titular/es: **Becton, Dickinson and Company**
1 Becton Drive
Franklin Lakes, New Jersey 07417-1880, US

72 Inventor/es: **Amiss, Terry, J.;**
Nycz, Colleen, M.;
Pitner, J., Bruce;
Sherman, Douglas, B. y
Wright, David, J.

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

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

DESCRIPCIÓN

Proteínas de unión como biosensores.

5 Antecedentes de la invención

1. Campo de la invención

La invención se encuentra en el campo de la biotecnología. Específicamente, la invención está dirigida a composiciones que contienen proteínas de unión mutadas de glucosa/galactosa que contienen dispositivos biosensores de analitos de grupos indicadores derivados de las mismas, y a su uso como biosensores de analitos.

2. Descripción de la técnica relacionada

La monitorización de las concentraciones de glucosa para facilitar un control metabólico adecuado en diabéticos es un objetivo deseable y mejoraría las vidas de muchos individuos. Actualmente, la mayoría de los diabéticos usando el procedimiento de la "punción en el dedo" para controlar sus niveles de glucosa en sangre y el cumplimiento del paciente supone un problema debido al dolor que causan las frecuentes punciones (varias veces al día). Como consecuencia, se han realizado esfuerzos para desarrollar procedimientos *in vivo* no invasivos o mínimamente invasivos y más eficaces *in vitro* para el control frecuente y/o continuo de la glucosa en sangre o de otros fluidos biológicos que contienen glucosa. Algunos de estos procedimientos más prometedores implican el uso de un biosensor. Los biosensores son dispositivos capaces de proporcionar información analítica específica cuantitativa o semicuantitativa usando un elemento de reconocimiento biológico que se combina con un elemento transductor (de detección).

El elemento de reconocimiento biológico de un biosensor determina la selectividad, de modo que sólo el compuesto que se va a medir conduce a una señal. La selección se puede basar en el reconocimiento bioquímico del ligando cuando la estructura del ligando (p. ej., glucosa) no varía, o biocatalizadores en los que el elemento cataliza una reacción bioquímica del analito.

El transductor traduce el reconocimiento del elemento de reconocimiento biológico en una señal semicuantitativa o cuantitativa. Las posibles tecnologías de transducción son ópticas, electroquímicas, acústicas/mecánicas o colorimétricas. Las propiedades ópticas que se han explotado incluyen la absorbancia, la fluorescencia/fosforescencia, bio/quimioluminiscencia, reflectancia, dispersión de luz e índice de refracción. Se pueden usar grupos indicadores convencionales tales como compuestos fluorescentes o, como alternativa, existe la oportunidad de detección óptica directa. Sin la necesidad de un marcador.

Los biosensores diseñados específicamente para la detección de glucosa que usan elementos biológicos para la transducción se la señal normalmente usando detección electroquímica o colorimétrica de la actividad de glucosa oxidasa. Este procedimiento está asociado con dificultades, incluida la influencia de los niveles de oxígeno, los inhibidores en la sangre y los problemas con los electrodos. Además, la detección tiene como resultado el consumo del analito, que puede producir dificultades al medir concentraciones de glucosa bajas.

Un área del desarrollo de biosensores que está en rápido avance es el uso de proteínas de unión periplásmicas (PUP) marcadas con fluorescencia. Como ha comunicado Cass (Anal. Chem. 1994, 66, 3840-3847), se ha demostrado eficazmente que una proteína de unión a maltosa (PUM) marcada es un sensor de maltosa utilizable. En este trabajo, la PUM, que no tiene residuos de cisteína nativa, se mutó para proporcionar una proteína con un único residuo de cisteína en una posición a 337 (S337C). La posición de esta mutación está dentro de la hendidura de unión en la que se produjo la unión a maltosa y, por tanto, experimenta un gran cambio ambiental tras la unión de la maltosa. Se estudiaron numerosos fluoróforos, algunos bloquearon la unión al ligando o interfirieron con el cambio conformacional de la proteína. De los estudiados, el IANBD tuvo como resultado un incremento considerable de la intensidad de la fluorescencia (160%) tras la unión de la maltosa. Este resultado es consistente con la localización del fluoróforo que cambia de un entorno hidrofílico o expuesto al disolvente a un entorno más hidrofóbico como el que se habría predicho teóricamente para el cierre de la bisagra tras la unión de la maltosa. No obstante, esta proteína mutante y el grupo indicador asociado no se unen a los azúcares de importancia diagnóstica en los fluidos corporales de mamífero. Cass también describió (Analytical Chemistry, 1998, 70(23), 5111-5113) la asociación de esta proteína sobre superficies de TiO₂, no obstante, la proteína unida a la superficie sufrió una reducción de la actividad con el tiempo y requería hidratación constante.

Hellinga y col., (documento US 6.277.627) indica la ingeniería de un biosensor de glucosa mediante la introducción de un transductor fluorescente en una proteína de unión a galactosa/glucosa (PUGG) mutada para que contenga un residuo de cisteína, aprovechándose de los grandes cambios conformacionales que se producen tras la unión de la glucosa. Hellinga y col. (documento US 6.277.627) describen que la transmisión de los cambios conformacionales en las PUGG mutadas se puede explotar para construir funciones de transducción de señal integradas que convierten un suceso de unión a glucosa en un cambio en la fluorescencia a través de un mecanismo de acoplamiento alostérico. Se ha comunicado que las funciones de transducción de fluorescencia interfieren mínimamente en las propiedades de unión intrínsecas del hueco de unión al azúcar en la PUGG.

Con el fin de determinar con precisión la concentración de la glucosa en soluciones biológicas tales como sangre, fluidos intersticiales, soluciones oculares o transpiración, etc., puede ser deseable ajustar la constante de unión a la molécula sensora de un biosensor de modo que coincida con el intervalo de funcionamiento fisiológico y/o patológico de la solución biológica de interés. Sin la constante de unión adecuada, una señal puede estar fuera del intervalo para una concentración fisiológica y/o patológica concreta. Además, los biosensores se pueden configurar usando más de una proteína, cada una de ellas con una constante de unión diferente, para proporcionar mediciones precisas en un amplio intervalo de concentraciones de glucosa tal y como describen Lakowicz (documento US 6.197.534).

A pesar de la utilización de las PUGG mutadas, pocas de estas proteínas se han diseñado e investigado, con o sin grupos indicadores. Mutaciones específicas de sitios y/o unión de ciertos grupos indicadores pueden actuar para modificar una constante de unión de un modo impredecible. Además, un biosensor que contiene grupos indicadores pueden tener una constante de unión deseable, pero no dar lugar a un cambio de señal fácilmente detectable tras la unión del analito. Algunos de los factores primordiales que determinan la sensibilidad de una sonda indicadora concreta unida a una proteína concreta para la detección de un analito específico es la naturaleza de las interacciones específicas entre la sonda seleccionada y los residuos de aminoácido de la proteína. Actualmente no es posible predecir estas interacciones dentro de las proteínas usando los procedimientos de computación existentes, ni tampoco es posible emplear una metodología de diseño racional para optimizar la elección de sondas indicadoras. Actualmente no es posible predecir el efecto sobre la constante de unión o la selectividad basada en la posición de cualquier grupo indicador o una sustitución de aminoácidos en la proteína (o *viceversa*).

Para desarrollar biosensores sin reactivos, incorporados y/o implantables y/o reutilizables usando proteínas, el elemento de transducción debe estar en comunicación con un dispositivo de detección para emitir la señal hacia y desde el elemento de transducción. Por "emitir" se quiere decir el procedimiento de enviar luz a una muestra y medir la luz emitida desde la misma. Los métodos típicos incluyen la colocación de proteínas en el interior o sobre la superficie de fibras ópticas o guías de ondas organizadoras utilizando estrategias de inmovilización. Tales estrategias de inmovilización incluyen el atrapamiento de la proteína dentro de membranas semipermeables, matrices de polímeros orgánicos o matrices de polímeros inorgánicos. La estrategia de inmovilización puede, en último término, determinar el rendimiento del biosensor en funcionamiento. La técnica anterior detalla numerosos problemas asociados con la inmovilización de moléculas biológicas. Por ejemplo, muchas proteínas sufren cambios conformacionales irreversibles, desnaturalización y pérdida de actividad bioquímica. Las proteínas inmovilizadas pueden existir en un gran número de posibles orientaciones sobre cualquier superficie concreta, por ejemplo con algunas proteínas orientadas de modo que sus sitios activos están expuestos, mientras que otras pueden estar orientadas de modo que sus sitios activos no estén expuestos y, por tanto, no pueden sufrir reacciones de unión selectiva con el analito. Las proteínas inmovilizadas son también sujeto de desnaturalización dependiente del tiempo, desnaturalización durante la inmovilización y pérdida de la proteína atrapada después de la inmovilización. Por tanto, se producen problemas, incluida una incapacidad para mantener la calibración del dispositivo sensor y deriva de la señal. En general, las proteínas de unión requieren el control de la orientación para permitir su uso, por tanto, en general, la absorción física y las estrategias de inmovilización o unión covalente total la superficie, tal y como se enseña en la literatura, no tienen éxito.

Por tanto, en la técnica existe la necesidad de diseñar proteínas mutadas útiles adicionales y proteínas PUGG mutadas que generen cambios en la señal detectable tras la unión del analito para usar como biosensores y, además, existe una necesidad en la técnica de diseñar proteínas de unión mutadas útiles y PUGG mutadas que contienen grupos indicadores que generan cambios de señal detectables y reversibles tras la unión del analito o la glucosa para usar como biosensores.

La invención proporciona un biosensor de glucosa que comprende:

al menos una proteína de unión a glucosa/galactosa mutada que posee al menos una sustitución de aminoácido cisteína en la posición 149, en la que el número del aminoácido se refiere a la proteína de unión a glucosa/galactosa de *E. coli* que posee 309 residuos de aminoácidos, y al menos un grupo indicador unido a la misma, de modo que dicho grupo indicador proporciona un cambio de señal detectable y reversible cuando dicha proteína de unión mutada se expone a varias concentraciones de glucosa,

en la que dicho cambio de señal detectable y reversible está relacionado con dichas concentraciones variables.

Además, la invención proporciona un procedimiento para la detección de glucosa *in vitro* que incluye a) proporcionar al menos una proteína de unión de glucosa/galactosa mutada como se ha definido antes y al menos un grupo indicador unido a la misma; b) exponer dicha proteína de unión de glucosa/galactosa mutada a concentraciones de glucosa variables; c) detectar un cambio de señal detectable y reversible a partir de dicho grupo indicador, en el que dicho cambio de señal detectable y reversible corresponde a dichas concentraciones de glucosa variables.

La invención también proporciona el uso de la proteína de unión de glucosa/galactosa mutada como se ha definido antes para preparar un agente diagnóstico para la detección de glucosa *in vivo*.

La invención además proporciona una composición que comprende una proteína de unión de glucosa/galactosa mutada que tiene al menos una sustitución de aminoácido que es una cisteína en la posición 149, en la que el número de aminoácido se refiere a la proteína de unión a glucosa/galactosa de *E. coli* que posee 309 residuos de aminoácidos.

La proteína de unión de glucosa/galactosa mutada mencionada en lo que antecede utilizada en el biosensor, agente, procedimiento o composición de diagnóstico puede presentar sustituciones adicionales seleccionadas de cisteína en la posición 1, una serina en la posición 1, una cisteína en la posición 11, una cisteína en la posición 14, una cisteína en la posición 19, una cisteína en la posición 43, una cisteína en la posición 74, una cisteína en la posición 107, una cisteína en la posición 110, una cisteína en la posición 112, una cisteína en la posición 113, una cisteína en la posición 137, una cisteína en la posición 213, una cisteína en la posición 216, una cisteína en la posición 238, una cisteína en la posición 287, una cisteína en la posición 292, una cisteína en la posición 152, una cisteína en la posición 182, una cisteína en la posición 236, y una cisteína en la posición 296.

También se proporciona en la presente invención un biosensor, agente, procedimiento o composición diagnóstico que comprende una proteína de unión de glucosa/galactosa mutada que posee al menos dos sustituciones de aminoácidos seleccionados del grupo compuesto por una cisteína en la posición 112 y una serina en la posición 238, una cisteína en la posición 149 y una serina en la posición 238, una cisteína en la posición 152 y una cisteína en la posición 182, una cisteína en la posición 152 y una serina en la posición 213, una cisteína en la posición 213 y una cisteína en la posición 238, una cisteína en la posición 149 y una arginina en la posición 213, una cisteína en la posición 149 y una serina en la posición 213 y una serina en la posición 238 y una cisteína en la posición 149 y una arginina en la posición 213 y una serina en la posición 238. Ejemplos adicionales de proteínas de unión de glucosa/galactosa mutadas se muestran a continuación en la Tabla 1. Los números de residuos de aminoácidos se refieren a la secuencia publicada de *E. coli* que posee 309 residuos, como se detalla más adelante, o el residuo de aminoácido correspondiente en cualquier secuencia sustancialmente homóloga de una fuente alternativa (p. ej., proteínas de unión de glucosa/galactosa de *Citrobacter freundii* o *Salmonella typhimurium*, números de registro de la secuencia P23925 y P23905, respectivamente).

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 ilustra el cambio en la respuesta de fluorescencia a una serie de concentraciones de glucosa para A213C/L238C NMD amida PUGG H₆ en solución.

La Figura 2 ilustra el cambio en la respuesta de fluorescencia a una serie de concentraciones de glucosa para E149C/A213R NBD amida PUGG H₆ en solución.

La Figura 3 ilustra la transducción de señal reversible de una proteína de unión mutada tras la exposición a soluciones de glucosa a las concentraciones indicadas.

Descripción detallada de la invención

El término biosensor normalmente se refiere a un dispositivo que usa reacciones bioquímicas específicas mediadas por enzimas aisladas, inmunosistemas, tejidos, orgánulos o células enteras para detectar compuestos químicos, normalmente mediante señales eléctricas, térmicas u ópticas. Como se usa en la presente memoria descriptiva, un “biosensor” se refiere a una proteína capaz de unirse a un analito que pueda usarse para detectar un analito o un cambio en la concentración del analito mediante un detector, como se describe en la presente memoria descriptiva.

El término “proteínas de unión” se refiere a proteínas que interactúan con analitos específicos de un modo capaz de proporcionar o transducir una señal detectable y/o reversible diferenciable de cuando el analito no está presente, el analito está presente en concentraciones variables en el tiempo o de un modo dependiente de la concentración, por medio de los procedimientos descritos en la presente memoria descriptiva. El suceso de transducción incluye medios continuos, programados y episódicos, incluidas las aplicaciones de un solo empleo o reutilizables. La transducción de señal reversible puede ser instantánea o puede depender del tiempo siempre que se establezca una correlación con la presencia o la concentración del analito. Se prefieren las proteínas de unión mutadas de tal modo que efectúen la transducción.

El término “proteína de unión a galactosa/glucosa” o “PUGG”, como se usa en la presente memoria descriptiva, se refiere a un tipo de proteína natural del compartimento periplásmico de las bacterias. Estas proteínas están implicadas de forma natural en la quimiotaxis y el transporte de moléculas pequeñas (p. ej., azúcares, aminoácidos y péptidos pequeños) en el citoplasma. La PUGG es una proteína de cadena sencilla constituida por dos dominios α/β globulares que están conectados por tres hebras para formar una bisagra. El sitio de unión se localiza en la hendidura entre los dos dominios. Cuando la glucosa entra en el sitio de unión, la PUGG sufre un cambio conformacional, centrado en la bisagra, que junta los dos dominios y atrapa a la glucosa en el sitio de unión. Se han determinado estructuras cristalográficas por rayos X para la forma cerrada de la PUGG de *E. coli* (N. K. Vyas, M. N. Vyas, F. A. Quiocho Science 1988, 242, 1290-1295) y *S. typhimurium* (S. L. Mowbray, R. D. Smith, L. B. Cole Receptor, 1990, 1, 41-54) Y ESTÁN DISPONIBLES en el banco de datos de proteínas (<http://www.resb.org/pdb/>) COMO 2PUG y 3PUG, respectivamente. El ADN de OUGG de *E. coli* natural y la secuencia de aminoácidos se pueden encontrar en www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/accionnumber/D90885 (clon genómico) y número de registro 230520 (secuencia de aminoácidos). La PUGG preferida procede de *E. coli*.

La “proteína de unión mutada” (por ejemplo “PUGG mutada”), como se usa en la presente memoria descriptiva, se refiere a las proteínas de unión de bacterias que contienen aminoácidos que han sido sustituidos, deletados o añadidos a los aminoácidos presentes en la proteína natural. Preferentemente, tales sustituciones, deletaciones o inserciones implican menos de 5 residuos de aminoácidos, más preferentemente uno o dos residuos. Ejemplos de mutaciones de

proteínas de unión incluyen la adición o sustitución de grupos de cisteína, aminoácidos no naturales (Turcatti y col., J. Bio. Chem. 1996 271, 33, 19991-19998) y sustitución de aminoácidos sustancialmente no reactivos con aminoácidos reactivos para proporcionar la unión covalente de grupos indicadores electroquímicos o fotorespondedores. Por aminoácido “reactivo” se quiere decir un aminoácido que se puede modificar con un agente marcador análogo al marcaje de cisteína con un pigmento reactivo al tiol. Entre los aminoácidos no reactivos se incluyen alanina, leucina, fenilalanina, y otros, que poseen cadenas laterales que no pueden modificarse con facilidad una vez que se han incorporado en una proteína (véase Greg T. Hermanson, Bioconjugate Techniques, Academic Press, 1996, San Diego, pág. 4-16 para la clasificación de la reactividad de las cadenas laterales de aminoácidos).

Además de la sustitución de al menos un aminoácido que es una cisteína en la posición 149, entre los ejemplos de mutaciones de la proteína PUGG se incluyen una cisteína sustituida por una lisina en la posición 11 (K11C); una cisteína sustituida por ácido aspártico en la posición 14 (D14C); una cisteína sustituida por valina en la posición 19 (V 19C); una cisteína sustituida por asparagina en la posición 43 (N43C); una cisteína sustituida por glicina en la posición 74 (G74C); una cisteína sustituida por tirosina en la posición 197 (Y107C); una cisteína sustituida por treonina en la posición 110 (T110C); una cisteína sustituida por serina en la posición 112 (S112C); un mutante doble que incluye una cisteína sustituida por serina en la posición 112 y una serina sustituida por leucina en la posición 238 (S112C/L238S); una cisteína sustituida por lisina en la posición 113 (K113C); una cisteína sustituida por lisina en la posición 137 (K137C); una cisteína sustituida por ácido glutámico en la posición 149 (E149C); un doble mutante que incluye una cisteína sustituida por ácido glutámico en la posición 149 y una serina sustituida por leucina en la posición 238 (E149/L238S); un doble mutante que comprende una cisteína sustituida por histidina en la posición 152 y una cisteína sustituida por metionina en la posición 182 (H152C/M182C); un doble mutante que incluye una serina sustituida por alanina en la posición 213 y una cisteína sustituida por histidina en la posición 152 (H152C/A213S); una cisteína sustituida por metionina en la posición 182 (M182C); una cisteína sustituida por alanina en la posición 213 (A213C); un doble mutante que incluye una cisteína sustituida por alanina en la posición 213 y una cisteína sustituida por leucina en la posición 238 (A213C/L238C); una cisteína sustituida por metionina en la posición 216 (M216C); una cisteína sustituida por ácido aspártico en la posición 236 (D236C); una cisteína sustituida por leucina en la posición 238 (L238C); una cisteína sustituida por ácido aspártico en la posición 287 (D287C), una cisteína sustituida por arginina en la posición 292 (R292C); una cisteína sustituida por una valina en la posición 296 (V296C); un mutante triple que incluye una cisteína sustituida por ácido glutámico en la posición 149, una alanina sustituida por serina en la posición 213 y una serina sustituida por leucina en la posición 238 (E149C/A213S/L238S); y un mutante triple que incluye una cisteína sustituida por ácido glutámico en la posición 149, una arginina sustituida por una alanina en la posición 213 y una serina sustituida por leucina en la posición 238 (E149C/A213r/L238S). También están incluidos los mutantes cuádruples (y mayores), por ejemplo un mutante en el que la serina sustituye a la alanina en la posición 1, la cisteína sustituye al ácido glutámico en la posición 149, la arginina sustituye a la alanina en la posición 213 y la serina sustituye a la leucina en la posición 238 (A1 S, E149C, A213R, L238S); un mutante en el que la serina sustituye a la alanina en la posición 1, la cisteína sustituye al ácido glutámico en la posición 149, la serina sustituye a la alanina en la posición 213 y la serina sustituye a la leucina en la posición 238 (A1S, E149C, A213S, L238S); y un mutante en el que la cisteína sustituye al ácido glutámico en la posición 149, la cisteína sustituye a la metionina en la posición 182, la cisteína sustituye a la alanina en la posición 213 y la serina sustituye a la leucina en la posición 238 (E149C, M182C, A213S, L238S).

La mutación puede servir para uno o varios propósitos. Por ejemplo, una proteína natural puede mutar con el fin de cambiar la estabilidad a largo plazo de la proteína; conjugar, unir, acoplar o asociar de otro modo la proteína con una matriz o polímero de encapsulación concreto; proporcionar sitios de unión para grupos indicadores detectables; ajustar su constante de unión con respecto a un analito concreto; o cualquier combinación de estos.

En la presente invención, el analito y la proteína mutada actúan como socios de unión. El término “asocia” o “une”, como se usa en la presente memoria descriptiva, se refiere a socios de unión que tienen una constante de unión relativa (K_d) suficientemente fuerte para permitir la detección de la unión a la proteína a través de un medio de detección. La K_d puede calcularse como la concentración de analito libre a la que se unen la mitad de la proteína, o *viceversa*. Cuando el analito de interés es glucosa, los valores de K_d para los socios de unión son, preferentemente, entre aproximadamente 0,0001 mM a aproximadamente 30 mM, más preferentemente los valores de K_d varían de aproximadamente 1 mM a 15 mM en la presente invención.

En la presente invención se ha mostrado que PUGG mutadas pueden usarse para detectar la unión a glucosa mediante su fijación a un grupo indicador que traduce un cambio de señal detectable tras la unión de la glucosa. “Proporcionar un cambio de señal detectable”, como se usa en la presente invención, se refiere a la capacidad para reconocer un cambio en una propiedad de un grupo indicador de modo que permita la detección de la unión ligando-proteína. Por ejemplo, en una forma de realización, las PUGG mutadas comprenden un grupo indicador detectable cuyas características detectables se alteran tras un cambio en la conformación de la proteína que se produce en la unión de la glucosa. En una forma de realización preferida, el grupo indicador es un marcador luminiscente que tiene como resultado una PUGG mutada con afinidad por glucosa que produce una deriva detectable en las características de la luminiscencia sobre la unión a la glucosa. El cambio en las características detectables puede deberse a una alteración en el ambiente del marcador, que se une a la PUGG mutada.

El marcador luminiscente puede ser un marcador fluorescente o un marcador fosforescente. Se prefiere el uso de marcadores fluorescentes que pueden excitarse para emitir fluorescencia mediante la exposición a ciertas longitudes de onda de luz.

En una forma de realización, el grupo indicador es un fluoróforo. Como se usa en la presente memoria descriptiva, “fluoróforo” se refiere a una molécula que absorbe energía y después emite luz. Ejemplos no limitantes de fluoróforos útiles como grupos indicadores en esta invención incluyen fluoresceína, cumarinas, rodaminas, 5-TMRIA (tetrametilrodamina-5-yodoacetamida), Quantum Red™, Texas Red™, Cy3, N-((-2-yodoacetoxi)etil)-N-metilamino-7-nitrobenzoxadiazol (IANBD), 5-acrilóil-2-dimetilaminonaftaleno (acrilodán), pireno, amarillo lucifer, Cy5, Dapoxyl® (2-bromoacetamidoetil)sulfonamida, (N-(4,4-difluoro-1,3,5,7-tetrametil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-2-il)yodoacetamida (Bodipy597/545IA), N-(4,4-difluoro-5,7-difenil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-3-propionil)-N-yodoacetiletilendiamina (BODIPY® 530/550 IA) ácido 5-((((2-yodoacetil)amino)etil)amino)naftaleno-1-sulfónico (1,5-IAEDANS) y carboxi-X-rodamina, 5/6-yodoacetamida (XRIA 5,6). Preferentemente Se usa IANBD. Muchas propiedades intrínsecas detectables de un grupo indicador fluoróforo pueden controlarse para detectar la unión de glucosa. Algunas propiedades que exhiben cambios tras la unión de la glucosa incluyen duración de la fluorescencia, intensidad de la fluorescencia, anisotropía o polarización de la fluorescencia y los desplazamientos espectrales de la emisión de fluorescencia. Los cambios en estas propiedades del fluoróforo pueden inducirse a partir de cambios en el ambiente del fluoróforo tal como los resultantes de los cambios en la conformación de la proteína. Los pigmentos sensibles al ambiente, como IANBD, son particularmente útiles a este respecto. Otros cambios de las propiedades del fluoróforo pueden resultar de las interacciones con el propio analito o de interacciones con un segundo grupo indicador, por ejemplo cuando se usa FRET (transferencia de energía de resonancia de fluorescencia) para controlar los cambios en la distancia entre dos fluoróforos.

Aunque se desea el uso de marcadores fluorescentes, se ha contemplado que se pueden usar otros grupos indicadores. Por ejemplo, se pueden usar grupos indicadores electroquímicos en los que una alteración en el ambiente del indicador dará lugar a un cambio en su estado redox. Tal cambio se puede detectar usando un electrodo.

Además, se ha previsto que se pueden usar otros marcadores espectroscópicamente detectables, por ejemplo marcadores detectables mediante RMN (resonancia magnética nuclear), como se conocen en la técnica.

El grupo indicador se puede fijar a la proteína mutada o a las PUGG por cualquier medio convencional conocido en la técnica. Por ejemplo el grupo indicador puede fijarse a través de residuos de aminos o de carboxilo sobre la proteína. No obstante, es especialmente preferido el acoplamiento covalente a través de grupos tiol sobre los residuos de cisteína. Por ejemplo, para PUGG mutadas, en la presente invención se prefieren las cisteínas localizadas en la posición 11, posición 14, posición 19, posición 43, posición 74, posición 107, posición 110, posición 112, posición 113, posición 137, posición 149, posición 152, posición 213, posición 216, posición 238, posición 287 y posición 292.

Cualquier grupo reactivo frente a tiol conocido en la técnica se puede usar para fijar grupos indicadores tales como fluoróforos a una cisteína de una proteína sometida a ingeniería. Por ejemplo, una yodoacetamida, bromoacetamida o maleimida son restos reactivos frente a tiol bien conocidos que pueden usarse para este propósito.

Los fluoróforos que funcionan a longitudes de onda prolongadas de excitación y emisión (por ejemplo, a longitudes de onda de excitación y emisión de aproximadamente 600 nm o mayores) se prefieren cuando el sensor molecular debe usarse *in vivo*, por ejemplo, se va a incorporar en un dispositivo biosensor implantable (donde la piel es opaca por debajo de 600 nm). Actualmente, se dispone de pocas sondas sensibles al ambiente en esta región del espectro y, quizá ninguna con grupos funcionales reactivos frente a tiol. No obstante, se pueden preparar derivados reactivos a tiol de Cy-5, por ejemplo tal y como indican H. J. Gruber y col., Bioconjugate Chem. (2000), 11, 161-166. Los conjugados que contienen estos fluoróforos, por ejemplo, fijados a varios mutantes de cisteína construidos en PUGG mutadas, se pueden someter a detección selectiva para identificar aquéllos que producen el mayor cambio en la fluorescencia tras la unión de la glucosa.

Las PUGG mutadas se pueden someter a ingeniería para que tengan una marca de histidina sobre el extremo N, el extremo C, o de ambos, de las proteínas. Las proteínas de fusión de histidina son ampliamente usadas en el campo de la biología molecular para ayudar en la purificación de proteínas. Ejemplos de sistemas de marcaje producen proteínas con una cola que contiene aproximadamente seis histidinas y, preferentemente, tal marcaje no compromete la actividad de unión a la PUGG mutada.

La presente invención también proporciona un biosensor y un procedimiento para preparar un agente diagnóstico para la detección de glucosa *in vivo*. En este aspecto, el biosensor está compuesto por una o más proteínas de unión mutadas que están encapsuladas en una matriz. El biosensor encapsulado puede, después, usarse como un dispositivo implantable o parte del mismo.

La “matriz puede estar en cualquier forma o conformación deseable, incluidos un disco, cilindro, parche, microesfera, polímero poroso, espuma de células abiertas o similares, siempre que sea permeable al analito. La matriz además impide la fuga del biosensor. La matriz permite que la luz procedente de fuentes ópticas o de cualquier otra luz emitida que se dirija o proceda del grupo indicador atraviese el biosensor. El medio de determinación o detección de un cambio en la concentración del analito puede, en una forma de realización, ser continuo. Como alternativa, el medio de determinación o detección de la concentración del analito puede estar programado o ser episódico.

El biosensor *in vivo* previsto de la presente invención comprende al menos una proteína de unión mutada en una matriz de atrapamiento o encapsulación permeable al analito, de modo que la proteína de unión mutada proporcione un cambio de señal detectable y reversible cuando la proteína de unión mutada esté expuesta a varias concentraciones del analito y la señal detectable y reversible puede estar relacionada con la concentración del analito.

En este aspecto de la invención, la configuración del elemento de transducción puede, por ejemplo, incorporarse en el extremo distal de una fibra o de otra sonda pequeña mínimamente invasiva e insertarse dentro del tejido de un paciente para los procedimientos de uso, incluida la lectura episódica, continua o programada, en el paciente. Los biosensores implantables pueden, en algunas formas de realización, implantarse en el interior o debajo de la piel de un pliegue epidérmico-dérmico de un mamífero para que interaccionen con el fluido intersticial, tejido u otros fluidos biológicos.

Un ejemplo de procedimiento que puede usarse para detectar la presencia de un analito usando el biosensor para el uso *in vivo* descrito en la presente memoria descriptiva incluye la emisión del implante con una fuente de luz remota, la detección de la señal del grupo indicador-proteína y la determinación de la cantidad de glucosa sobre la base de una relación con la señal detectada, como se conoce en la técnica (véanse los documentos US 5.517.313, US 5.910.661 y US 5.342.789).

Los biosensores de proteína de unión de esta invención son capaces de medir o detectar concentraciones del analito dentro del intervalo micromolar (10^{-6} molar) a molar, sin consumo de reactivos. En algunas formas de realización, su sensibilidad para el analito puede permitir el uso de los biosensores para medir las concentraciones bajas del analito que se sabe que están presentes en volúmenes pequeños de muestras de fluido intersticial u ocular y de perspiración. Los biosensores de proteína de unión de la presente invención proporcionan los medios para controlar el analito de forma continua, episódica o “a demanda”, como sea adecuado para el usuario o para el tratamiento de una afección.

En otras formas de realización, la sensibilidad de los biosensores al analito (por ejemplo, glucosa) es tal que pueden usarse para analizar los niveles en sangre del analito o se pueda determinar la concentración del analito en una solución biológica u otra solución. Como se usa en la presente memoria descriptiva, una “solución biológica” incluye, entre otras, sangre, transpiración y/o fluido ocular o intersticial, incluidas combinaciones de estos.

Los ejemplos siguientes ilustran ciertas formas de realización preferidas de la presente invención pero no se pretende que sean ilustrativos de todas las formas de realización.

Ejemplo 1

Procedimiento para la expresión y purificación de proteínas mutantes sin colas de histidina

La PUGG está codificada en el gen Mg1B-1 en *E. coli*. Esta proteína se alteró introduciendo el aminoácido cisteína en varias posiciones mediante mutagénesis dirigida por sitio del gen Mg1 B-1. A continuación, estas proteínas se expresaron en *E. coli* y se purificaron.

La mutagénesis por casete del Mg1B-1 se consiguió del siguiente modo. El gen de Mg1B-1 natural se clonó en un vector Ptz18r (Dr. Anthony Cass, Imperial College, Londres, Inglaterra). A partir de este plásmido parental se generaron plásmidos mutantes usando mutagénesis por casete mediante la que se produjeron secuencias aminoacídicas aleatorizadas, esencialmente como ha descrito Kunkel (1991), y se clonaron en *E. coli* JM109 (Promega Life Science, Madison WI). Los plásmidos mutantes se identificaron mediante secuenciación. La proteína mutante se indujo en JM109 y se purificó tal y como se ha descrito más adelante. Una colonia de *E. coli* JM109 que contiene el plásmido mutante se cultivó durante la noche a 37°C con agitación (220 rpm) en caldo LB que contiene 50 µg/ml de ampicilina (LB/Amp). el cultivo durante la noche se diluyó a 1:100 en 1 l de LB/Amp reciente y se incubó a 37°C con agitación hasta que la DO600 del cultivo fue 0.3-0.5. La expresión del mutante se indujo mediante la adición de IPTG 1 mM (Life Technologies, Gaithersburg, MD) a concentración final con incubación continua y agitando a 37°C durante 4-6 horas. Las células se recogieron mediante centrifugación (10.000 x g, 10 min, 4°C).

La proteína mutante se recolectó mediante choque osmótico y se purificó mediante cromatografía en columna. El sedimento celular se resuspendió en un tampón de sacarosa (Tris-HCL 30 mM, pH 8,0, sacarosa al 20%, EDTA 1 mM), se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos y después se centrifugó (4000 x g, 15 min, 4°C). El sobrenadante se extrajo y se mantuvo en hielo. El sedimento celular se resuspendió y repitió con 10 ml de H₂O desionizada estéril y helada, y la suspensión se incubó en hielo y se centrifugó. El sobrenadante restante se combinó con los demás sobrenadantes recolectados y se centrifugó una vez más (12.000 x g, 10 min, 4°C). El producto de choque osmótico combinado se filtró a través de un filtro de 0,8 µm y, después, de 0,45 µm. Al producto de choque osmótico se añadió sulfato de estreptomicina (Sigma Chemical Co., San Luis, MO), 5% v/v, y se agitó una vez durante 30 min, seguido por centrifugación (12.000 x g, 10 min, 4°C). A continuación, el SHOCKATE se concentró usando filtros de Amicon Centriprep 10 (10.000 COPM) (Charlotte, NC) y se dializaron durante la noche frente a Tris-HCl 5 mM, pH 8,0, MgCl₂ 1 mM. El producto de choque osmótico dializado se centrifugó (12.000 x g, 30 min, 4°C). El sobrenadante resultante se añadió a una columna de sefarsa de flujo rápido con DEAR y pre-equilibrada (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) a 0,5 ml/min. La columna se lavó con 5-10 volúmenes de columna. A la columna se aplicó un gradiente lineal de NaCl 0-0.2M y se recogieron las fracciones. La proteína mutante que contiene las fracciones se identificó mediante SDS-PAGE con tinción con azul de Coomassie brillante (pm aprox., 32 kDa). Las fracciones se combinaron y dializaron durante la noche (4°C) contra solución salina tamponada con fosfato (PBS) o bicarbonato amónico 10 mM (pH 7,4) concentrado usando filtros de Amicon Centriprep y se almacenó a 4°C o -20°C con glicerol. La proteína dializada con bicarbonato amónico se liofilizó.

Ejemplo 2

Expresión y purificación de PUGG mutantes que contienen colas de His

Los mutantes de PUGG se sometieron a ingeniería mediante mutagénesis dirigida por sitio o mutagénesis de casete. La mutagénesis dirigida por sitio (QuickChange, Stratagene, La Jolla, CA) se realizó para alterar los aminoácidos en el vector pQE70 sustituyendo un aminoácido por otro, *específicamente* el aminoácido escogido. El procedimiento de la mutagénesis de casete (Kunkel, 1991) se realizó para *aleatorizar* los aminoácidos de una región específica del gen de la PUGG. A continuación, los casetes mutados se subclonaron en el vector de expresión pQE70.

El plásmido pPUGG-His contenía el gen de la PUGG clonado en el vector de expresión pQE70 (Qiagen, Valencia, CA). Este constructor lleva seis residuos de histidina en el extremo C del gen de la PUGG. Para sobreexpresar la PUGG-His mutante se usó la cepa de *E. coli* SG13009 siguiendo los procedimientos estándar (Qiagen). Tras la sobreexpresión de un cultivo de 250 ml, las células se recolectaron mediante centrifugación (6000 rpm) y se resuspendieron en 25 ml de Bugbuster de (Novagen, Madison, WI), lisozima (se añadieron 25 mg al lisado y la mezcla se mezcló suavemente a temperatura ambiente (TA) durante 30 minutos. Mediante centrifugación (6000 rpm) se produjo un lisado transparente y a éste se añadieron 0,5 ml de imidazol (1M) y 3 ml de perlas de NI-NTA (Qiagen). Tras 30 minutos de mezcla suave a TA, la mezcla se centrifugó (6000 rpm) y se extrajo el lisado. Las perlas se lavaron con 25 ml de solución (NaCl 1M, Tris 10 mM, pH 8,0) y se recentrifugaron. La PUGG-His mutante se eluyó de las perlas mediante la adición de 5 ml de solución (imidazol 160 mM, NaCl 1M, Tris 10 mM, pH 8,0) y la mezcla durante 15 minutos. La solución proteica se filtró inmediatamente a través de un filtro Centriplus YM-100 (Amicon, Charlotte, NC) y después se concentró hasta 1-3 mg/ml usando un Centriplus YM-10. La proteína se dializó durante la noche frente a 2 l de solución de almacenamiento (NaCl 1M, Tris 10 mM, NaPO₄ 50 mM, pH 8,0).

Ejemplo 3

Marcaje de PUGG mutantes

Un alícuota de la PUGG mutante que contiene cisteína (4,0 nmol) en PBS se trató con ditiotretitol 2 mM (5 μ l, 10 nmol) durante 30 min. Una solución madre de N,N'-dimetil-N-(yodoacetil)-N'-(7-nitrobenc-2-oxa-1,3-diazol-4-il) etilendiamina (IANBD amida, 0,5 mg) se preparó en DMSO (100 μ l, 11,9 mM) y se añadieron 3,36 μ l (40 nmol) a la proteína. La reacción procedió a temperatura ambiente durante 4 h en un Dynal Rotamix en oscuridad. La proteína marcada se purificó mediante filtración en gel en una columna NAP-5 (Amersham Pharmacia). Los índices de marcaje se determinaron usando un coeficiente de extinción estimado (50 mM⁻¹ cm⁻¹) para la PUGG, que se calculó en GeneWorks 2,45 (IntelliGenetics), ϵ_{478} (IANBD amida) = 25 mM⁻¹ cm⁻¹ y una medición de la DO para una solución estándar de IANBD amida a 280 nm y 478 nm. La concentración del pigmento en la proteína se calculó como la $C_{\text{pigmento}} = A_{478} / \epsilon_{478}$. La absorbancia de la proteína a 280 nm se calculó como $A_{\text{prot}(280)} = A_{\text{total}(280)} - A_{\text{pigmento}(280)}$, en la que $A_{\text{pigmento}(280)} = A_{478} \times (= A_{280} / A_{478})_{\text{pigmento st}}$. La concentración de la proteína fue $C_{\text{prot}(280)} = A_{\text{prot}(280)} / \epsilon_{280}$. En la tabla 1 se resumen los cambios en la fluorescencia de varias PUGG mutantes marcadas con grupos indicadores, incluidos los grupos indicadores que tienen una excitación o emisión máximas de al menos 600 nanómetros. En la tabla 2 se resumen los cambios en la fluorescencia y los valores K_d determinados de las mutaciones de una, dos tres y cuatro sustituciones de aminoácidos. Este dato claramente muestra que las mutaciones de la PUGG marcada con grupo indicador pueden proporcionar características deseables como biosensores de glucosa. El dato muestra la relación mutación-grupo indicador para las muestras analizadas. La Figura 1 ilustra el cambio en la respuesta de fluorescencia a varias concentraciones de glucosa de A213C/L238C NBD amida PUGG-H₆, como ejemplo representativo, en solución. La Figura 2 ilustra el cambio en la respuesta de fluorescencia a varias concentraciones de glucosa de E149C/A213R NBD amida PUGG H₆, como otro ejemplo representativo, en solución.

TABLA 1
Porcentaje de cambio en la fluorescencia para PUGG mutantes¹

Pigmento	Excitación/emisión (nm)	S112C	M182C	A213C	A213C His ₆	M216C
IANBD amida	470/550	0	4	3	51	7
IANBD éster	470/550					
IAEDANS	336/490	-7	-8	0		-9
Bodipy530/550IA	530/550	7	-10	33		4

XRIA 5,6	575/600	-21	-19	-38		-15
Amarillo Lucifer IA	426/530			-14		-3
Bodiy507/545IA	507/545			25		-3
Cy5	640/660	2	0	11		-7
Rojo maleimida Texas	580/610				-13	
Dapoxyl	375/580	15	7	12		2
¹ F de 0 a 1 mM de glucosa a 0,5 μ M [pigmento]. A menos que se indique lo contrario, los mutantes no tenían marcas de histidina.						

Ejemplo 4

Cambio de señal detectable evidente tras la unión de la glucosa a la PUGG mutada marcada con marcadores luminiscentes y la determinación de K_d

EL cambio en la fluorescencia (ΔF , Tabla 2) se midió en forma del porcentaje de diferencia en la fluorescencia entre 0 y 1 mM de glucosa a 0,5 μ M de proteína usando un fluorímetro SLM Aminco (Ontario, Canadá) con parámetros en hendidura de 8 y 4 para la excitación y configuraciones de 5 y 5 sobre el monocromador de emisión MC250.

Las constantes de unión (Tabla 2) se determinaron mediante titulación de concentraciones crecientes de glucosa en una solución proteica (PBS) 0,1 μ M con mezclado tras cada adición de glucosa. Los parámetros en hendidura fueron los mismos que se han indicado antes. La K_d se determinó a partir de las relaciones siguientes mediante adaptación de Pisarchick y Thompson (1990):

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

en la que F es la intensidad de la fluorescencia, F_{inf} es la fluorescencia en el infinito, F_0 es la fluorescencia a glucosa 0 y x es la concentración de glucosa libre ($[Glc]_{\text{libre}}$) determinada mediante la relación:

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

en la que $[Glc]_{\text{tot}}$ y $[Prot]_{\text{tot}}$ son las concentraciones totales de glucosa y proteínas, respectivamente.

ES 2 310 647 T3

TABLA 2

Resumen de mutaciones de PUGG-H6 NBD

Identificación	Solución		
	$\Delta F(\%)$	$K_d(Mm)^2$	Pigmento/Prot
TIPO NATURAL	Intrínseco	0,0002	
A1C			
A1S			
A1S, E149C, A213R, L238S	+21 ³		0,31
A1S, E149C, A213S, L238S	+480	0,37	0,9
K11C	10		1,8
D14C	1		1,5
V19C	-56	0,0001	0,38
N43C	40	0,0002	0,28
G74C	-3	0,0009	1,43
Y107C	-30	0.001	0,93
T110C	-9		
S112C	220	0.05	1,15
S112C, L238S	6		1,5
K113C	15		0,65
K137C	-5	0,00004	1,17
E149C	300	0,0002	0,96
E149C, A213C	+110		0,70
E149C, A213R	660	1	1,1
E149C, A213S	240 ⁴	0,0023	1,1
E149C, A213T	350	1	0,6
E149C, A213L	280	0,1	1,1
E149C, A213Y	280	0,1	1,1
E149C, A213C, L238C	+39 ³		1,08
E149C, A213S, K223N			

ES 2 310 647 T3

5	E149C, K223N	260	0,003	0,7
	E149C, L238C	260	5	1,6
	E149C, L238S	660 ⁴	0.08	1,36
10	E149C, K223N, N256R			
	E149C, N256S	1		0,93
	E149C, N256R	200	742 ⁶	0,9
15	E149C, M182C, A213C, L238S	200	216 ⁶	3,2
20	E149C, A213S, L238S	480	0,47	0,76
	E149C, A213R, L238S	500	12	1,1
25	H152C	210	0,07	1.3
	H152C, A213S	100	0,16	
30	H152C, A213R	-3		1,2
	H152C, K223N	200	0,003	1
	H152C, M182C			
35	M182C	11		
	A213C	50	0,124	0,68
	A213C, L238C	24,67 ³	6	1,4
40	A213C, L255C	-5		0,98
	M216C	67	0,008	0,91
	D236C	+2 ³		0,43
45	L238C	-6, +3 ³	,003(SPR)	1,3
	D287C	4		1,1
50	R292C	-34	0,0008	1,5
	V296C	-10	0,00001 ⁵	1,08
55	¹ ΔF de 0 a 1 mM Glc a 0,5 mM [pigmento]			
	² Kd medida a 0,1 mM [pigmento]			
	³ ΔF cuando se mide de 0 a 100 mM Glc			
	⁴ ΔF cuando se mide de 0 a 10 mM Glc			
60	⁵ Estimado; El cálculo de Sigma Plot no fue convergente			
	⁶ Estimado; La curva no alcanzó la saturación			

Ejemplo 5

Inmovilización de un biosensor de la presente invención en una matriz de membrana de diálisis y la capacidad de la matriz para proporcionar lecturas reversibles y continuas

5

Usando un fluorímetro Varian Eclipse con un dispositivo de fibra óptica, la proteína PUGG L238/A213C (2M en tampón PBS) atrapada en una membrana de diálisis y con un punto de corte molecular de 3500 dalton se fijó al extremo distal de la fibra. Se prepararon soluciones que contenían tampón PBS, 2 mM y glucosa 20 mM en tampón PBS. Con la sonda en la solución de PBS, las lecturas se registraron a intervalos de 0,02 segundos de la longitud de onda de emisión a 521 nm, seguido por la inserción de la fibra en las soluciones de glucosa. La sustitución de la fibra en solución con únicamente tampón tuvo como resultado el retorno de la señal inicial. La Figura 3 representa múltiples ciclos que alternan entre las soluciones de tampón y de glucosa, lo que demuestra la reversibilidad del biosensor atrapado dentro de una matriz permeable dentro del intervalo fisiológico.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un biosensor de glucosa, que comprende:

al menos una proteína de unión a glucosa/galactosa mutada que posee al menos una sustitución de aminoácido de una cisteína en la posición 149, en la que el número del aminoácido se refiere a la proteína de unión a glucosa/galactosa de *E. coli* que posee 309 residuos de aminoácidos, y al menos un grupo indicador unido a la misma, de modo que dicho grupo indicador proporciona un cambio de señal detectable y reversible cuando dicha proteína de unión mutada se expone a varias concentraciones de glucosa, en la que dicho cambio de señal detectable y reversible está relacionado con dichas concentraciones variables.

2. El biosensor de la reivindicación 1, en el que dicha proteína de unión a glucosa/galactosa mutada comprende al menos una sustitución de aminoácidos adicional, al menos dos sustituciones de aminoácidos adicionales o al menos tres sustituciones de aminoácidos adicionales.

3. El biosensor de la reivindicación 1 ó 2, en el que proteína de unión a glucosa/galactosa mutada presenta sustituciones de aminoácidos adicionales seleccionados de una cisteína en la posición 1, una serina en la posición 1, una cisteína en la posición 11, una cisteína en la posición 14, una cisteína en la posición 19, una cisteína en la posición 43, una cisteína en la posición 74, una cisteína en la posición 107, una cisteína en la posición 110, una cisteína en la posición 112, una cisteína en la posición 113, una cisteína en la posición 137, una cisteína en la posición 213, una cisteína en la posición 216, una cisteína en la posición 238, una cisteína en la posición 287, una cisteína en la posición 292, una cisteína en la posición 152, una cisteína en la posición 182, una cisteína en la posición 236, y una cisteína en la posición 296.

4. El biosensor de la reivindicación 2, en el que dicha proteína de unión a glucosa/galactosa mutada comprende al menos dos sustituciones de aminoácidos que se seleccionan de una cisteína en la posición 149 y una serina en la posición 238, una cisteína en la posición 149 y una arginina en la posición 213, una cisteína en la posición 149 y una cisteína en la posición 213, una cisteína en la posición 149 y una treonina en la posición 213, una cisteína en la posición 149 y una leucina en la posición 213, una cisteína en la posición 149 y una tirosina en la posición 213, una cisteína en la posición 149 y una asparagina en la posición 223, una cisteína en la posición 149 y una cisteína en la posición 238, una cisteína en la posición 149 y una serina en la posición 256, y una cisteína en la posición 149 y una arginina en la posición 256.

5. El biosensor de la reivindicación 2, en el que dicha proteína de unión a glucosa/galactosa mutada comprende al menos tres sustituciones de aminoácidos que se seleccionan de una cisteína en la posición 149, una serina en la posición 213 y una serina en la posición 238; una cisteína en la posición 149, una arginina en la posición 213 y una serina en la posición 238; una cisteína en la posición 149, una cisteína en la posición 213 y una cisteína en la posición 238; una cisteína en la posición 149, una cisteína en la posición 213 y una asparagina en la posición 223; y una cisteína en la posición 149, una asparagina en la posición 223 y una arginina en la posición 256.

6. El biosensor de la reivindicación 2, en el que dicha proteína de unión a glucosa/galactosa mutada comprende al menos cuatro sustituciones de aminoácidos que se seleccionan de una serina en la posición 1, una cisteína en la posición 149, una arginina en la posición 213 y una serina en la posición 238; una serina en la posición 1, una cisteína en la posición 149, una serina en la posición 213 y una serina en la posición 238; y una cisteína en la posición 149, una cisteína en la posición 182, una cisteína en la posición 213 y una serina en la posición 238.

7. El biosensor de la reivindicación 6, en el que dichas cuatro sustituciones de aminoácidos son una serina en la posición 1, una cisteína en la posición 149, una arginina en la posición 213 y una serina en la posición 238.

8. El biosensor de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicha proteína de unión a glucosa/galactosa mutada comprende además al menos una marca de histidina.

9. El biosensor de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicho grupo indicador es un marcador luminiscente.

10. El biosensor de la reivindicación 9, en el que dicho marcador luminiscente posee una longitud de onda de excitación de más de 600 nanómetros.

11. El biosensor de la reivindicación 9, en el que dicho marcador luminiscente posee una longitud de onda de emisión de más de 600 nanómetros.

12. El biosensor de la reivindicación 9, en el que dicho marcador luminiscente está acoplado covalentemente a dicha al menos una proteína de unión a glucosa/galactosa.

13. El biosensor de la reivindicación 12, en el que dicho marcador luminiscente está acoplado covalentemente a dicha proteína de unión a glucosa/galactosa mediante reacción con un miembro seleccionado del grupo compuesto por fluoresceína, cumarinas, rodaminas, 5-TMRIA (tetrametilrodamina-5-yodoacetamida), Quantum Red™, Te-

xas Red™, Cy3, N-((-2-yodoacetoxi)etil)-N-metil)amino-7-nitrobenzoxadiazol (IANBD), 6-acriloil-2-dimetilamino-naftaleno (acrilodán), pireno, amarillo lucifer, Cy5, Dapoxyl (2- bromoacetamidoetil)sulfonamida, (N-(4,4-difluoro-1,3,5,7-tetrametil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-2-il)yodoacetamida (Bodipy 507/545 IA), N-(4,4-difluoro-5,7-difenil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-3-propionil)-N'-yodoacetiletilendiamina (BODIPY 530/550 IA), ácido 5-(((2-yodoacetil)amino)etil)amino)naftaleno-1-sulfónico (1,5-IAEDANS) y carboxi-X-rodamina, 5/6-yodoacetamida (XRIA 5,6).

14. El biosensor de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicho grupo indicador emite dicha señal en respuesta a la exposición a una fuente de energía.

15. Un procedimiento para la detección de glucosa *in vitro*, que comprende:

a) proporcionar al menos una proteína de unión a glucosa/galactosa mutada y al menos un grupo indicador unido a la misma tal y como define el biosensor de glucosa de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14;

b) exponer dicha proteína de unión a glucosa/galactosa mutada a concentraciones de glucosa variables;

c) detectar un cambio de señal detectable y reversible de dicho grupo indicador en el que dicho cambio de señal detectable y reversible corresponde a dichas concentraciones de glucosa variables.

16. El procedimiento de la reivindicación 15, en el que dicha detección es continua, programada, episódica o combinaciones de estas.

17. El procedimiento de la reivindicación 15, en el que dicha proteína de unión a glucosa/galactosa mutada se selecciona de proteínas de unión periplásmicas bacterianas.

18. El procedimiento de la reivindicación 15, que además comprende la etapa de exponer dicho grupo indicador a una fuente de energía capaz de excitar dicho grupo indicador para que emita dicha señal.

19. Uso de una proteína de unión a glucosa/galactosa mutada y al menos un grupo indicador fijado a la misma como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-14 para preparar un agente diagnóstico para la detección de glucosa *in vivo*.

20. Una composición que comprende una proteína de unión a glucosa/galactosa mutada que posee al menos una sustitución de un aminoácido que es una cisteína en la posición 149, en la que el número del aminoácido se refiere a la proteína de unión a glucosa/galactosa de *E. coli* que tiene 309 residuos de aminoácidos.

21. La composición de la reivindicación 20, en la que la proteína de unión a glucosa/galactosa mutada presenta sustituciones adicionales de aminoácidos seleccionados de una cisteína en la posición 1, una serina en la posición 1, una cisteína en la posición 11, una cisteína en la posición 14, una cisteína en la posición 19, una cisteína en la posición 43, una cisteína en la posición 74, una cisteína en la posición 107, una cisteína en la posición 110, una cisteína en la posición 112, una cisteína en la posición 113, una cisteína en la posición 137, una cisteína en la posición 213, una cisteína en la posición 216, una cisteína en la posición 238, una cisteína en la posición 287, una cisteína en la posición 292, una cisteína en la posición 236 y una cisteína en la posición 296.

22. La composición de la reivindicación 21, en la que dicha proteína de unión a glucosa/galactosa mutada presenta

(i) al menos dos sustituciones de aminoácidos seleccionados de una cisteína en la posición 149 y una serina en la posición 238, una cisteína en la posición 149 y una arginina en la posición 213, una cisteína en la posición 149 y una cisteína en la posición 213, una cisteína en la posición 149 y una treonina en la posición 213, una cisteína en la posición 149 y una leucina en la posición 213, una cisteína en la posición 149 y una tirosina en la posición 213, una cisteína en la posición 149 y una asparagina en la posición 223, una cisteína en la posición 149 y una cisteína en la posición 238, una cisteína en la posición 149 y una serina en la posición 256, y una cisteína en la posición 149 y una arginina en la posición 256; o

(ii) al menos tres sustituciones de aminoácidos que se seleccionan de una cisteína en la posición 149, una serina en la posición 213 y una serina en la posición 238; una cisteína en la posición 149, una arginina en la posición 213 y una serina en la posición 238; una cisteína en la posición 149, una cisteína en la posición 213 y una cisteína en la posición 238; una cisteína en la posición 149, una serina en la posición 213 y una asparagina en la posición 223; y una cisteína en la posición 149, una asparagina en la posición 223 y una arginina en la posición 256; o

(iii) al menos cuatro sustituciones de aminoácidos que se seleccionan de una serina en la posición 1, una cisteína en la posición 149, una arginina en la posición 213 y una serina en la posición 238; una serina en la posición 1, una cisteína en la posición 149, una serina en la posición 213 y una serina en la posición 238; y una cisteína en la posición 149, una cisteína en la posición 182, una cisteína en la posición 213 y una serina en la posición 238.

23. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 22, en la que dicha proteína de unión a glucosa/galactosa mutada comprende además al menos una marca de histidina.

ES 2 310 647 T3

24. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 22, en la que dicha proteína de unión a glucosa/galactosa mutada comprende además al menos un grupo indicador.

25. La composición de la reivindicación 24, en la que dicho grupo indicador es un marcador luminiscente.

26. La composición de la reivindicación 25, en la que dicho marcador luminiscente posee una longitud de onda de excitación de más de 600 nanómetros.

27. La composición de la reivindicación 25, en la que dicho marcador luminiscente posee una longitud de onda de emisión de más de 600 nanómetros.

28. La composición de la reivindicación 25, en la que dicho marcador luminiscente está acoplado covalentemente a dicha al menos una proteína de unión a glucosa/galactosa mediante reacción con dicha al menos una proteína de unión mutada y un miembro seleccionado del grupo compuesto por fluoresceína, cumarinas, rodaminas, 5-TM-R1A (tetrametilrodamina-5-yodoacetamida), Quantum Red™, Texas Red™, Cy3, N-((-2-yodoacetoxi)etil)-N-metil amino-7-nitrobenzoxadiazol (IANBD), 5-acrilóil-2-dimetilaminonaftaleno (acrilodán), pireno, amarillo lucifer, Cy5, Dapoxyl® (2-bromoacetamidoetil)sulfonamida, (N-(4,4-difluoro-1,3,5,7-tetrametil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-2-il) yodoacetamida (Bodipy597/545IA), N-(4,4-difluoro-5,7-difenil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-3-propionil)-N-yodoacetiletilendiamina (BODIPY® 530/550 IA) ácido 5-(((2-yodoacetil)amino)etil)amino)naftaleno-1-sulfónico (1,5-IAE-DANS) y carboxi-X-rodamina, 5/6-yodoacetamida (XRIA 5,6).

FIG. 1

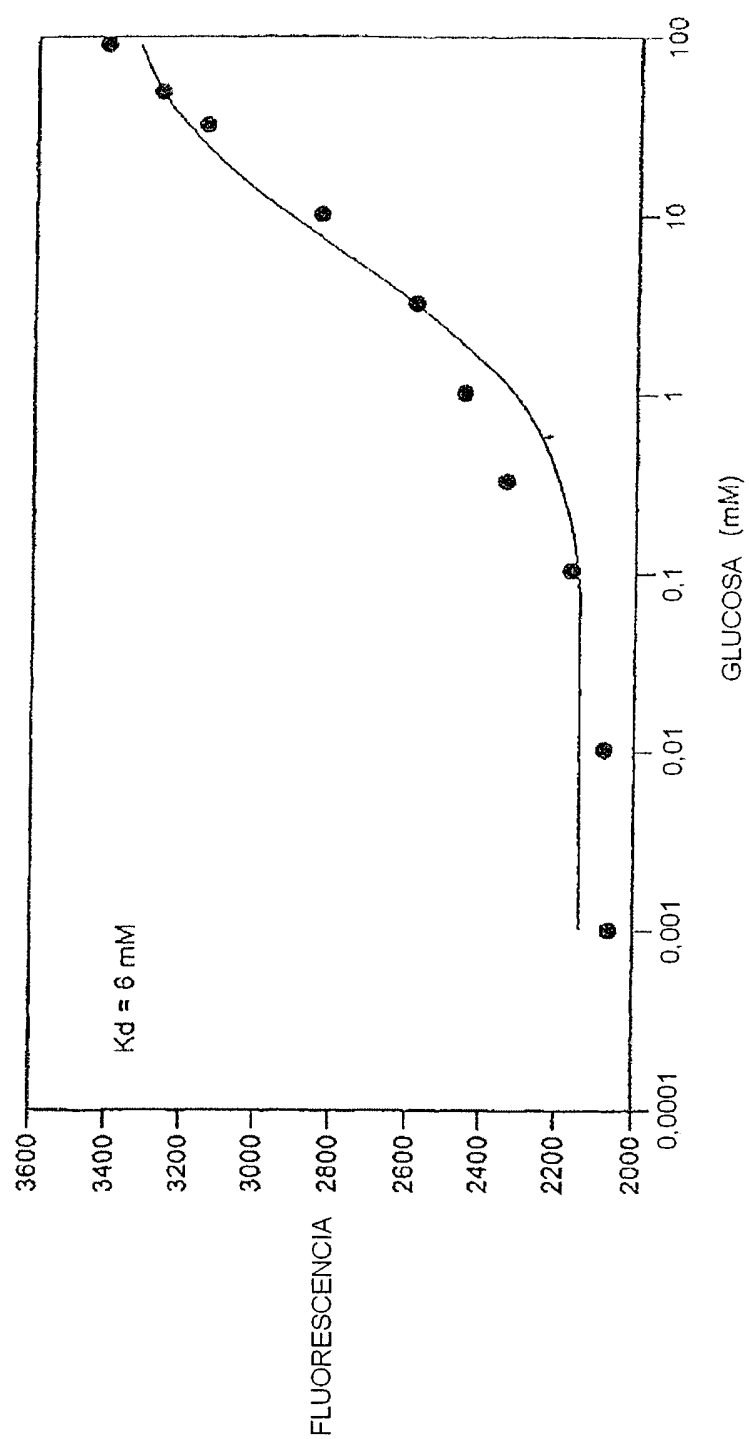


FIG. 2

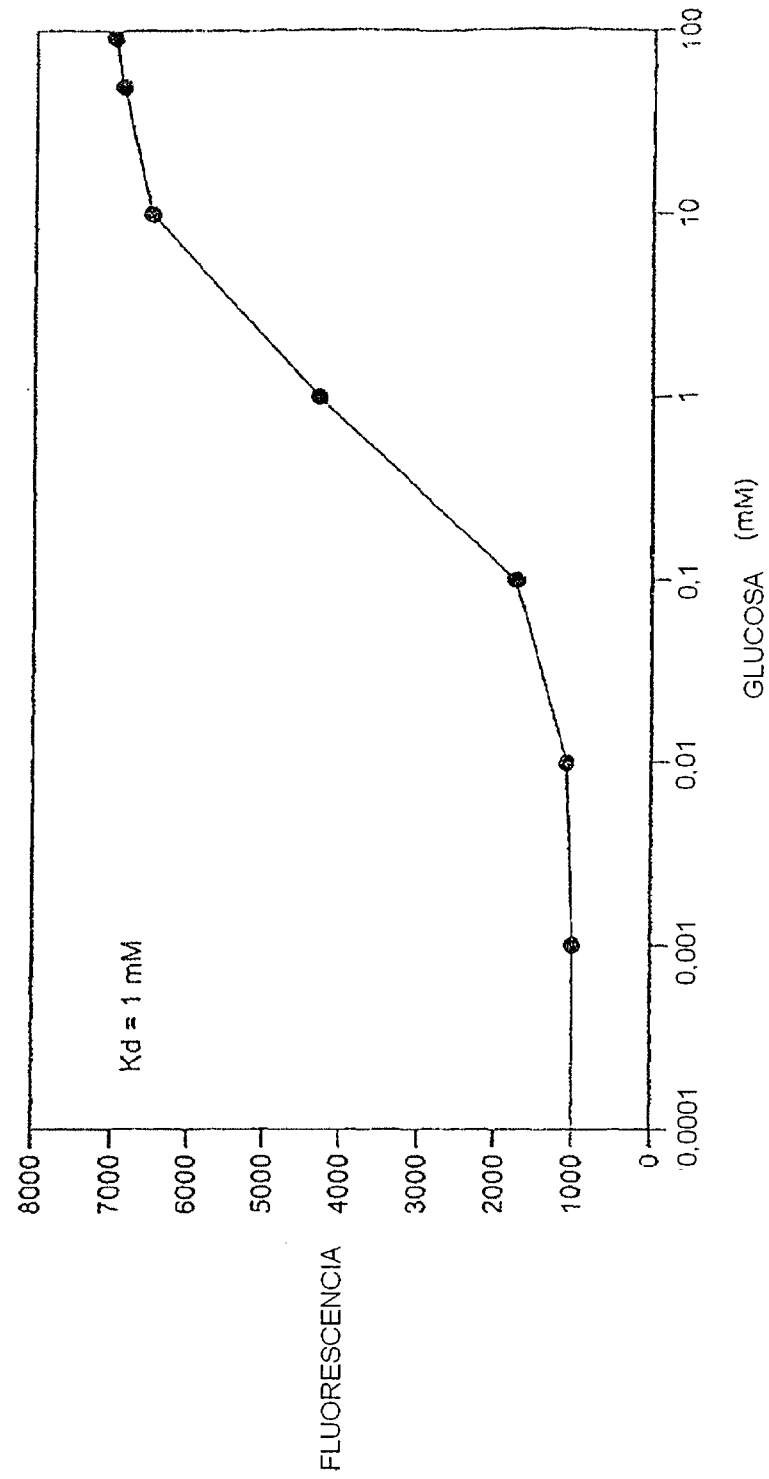


FIG. 3

