



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 271 253**

51 Int. Cl.:
G01N 33/543 (2006.01)
C12Q 1/00 (2006.01)
G01N 27/333 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **02732154 .6**
86 Fecha de presentación : **18.01.2002**
87 Número de publicación de la solicitud: **1352245**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **15.10.2003**

54 Título: **Biosensor con proteínas transmembrana unidas covalentemente.**

30 Prioridad: **18.01.2001 GB 0101279**
10.04.2001 GB 0108947

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.04.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.04.2007

73 Titular/es: **Newcastle University Ventures Limited**
Central Square South, Orchard Street
Newcastle upon Tyne NE1 3XX, GB

72 Inventor/es: **Lakey, Jeremy, Hugh y**
Vogel, Horst

74 Agente: **Zea Checa, Bernabé**

ES 2 271 253 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

Biosensor con proteínas transmembrana unidas covalentemente.

5 **Campo técnico**

La invención se refiere a un producto, normalmente referido como biosensor, que comprende una proteína transmembrana unida a un sustrato, incluyendo los métodos de fabricación del producto y sus usos.

10 **Antecedentes**

Es conocido que las moléculas anfífilas, por ejemplo los lípidos, se agregan en solución para formar estructuras de membrana que pueden ser monocapas, micelas o liposomas. Se ha demostrado que estas estructuras tienen propiedades semipermeables que, en algunos casos, permiten el paso selectivo de moléculas (e.g. iones, ligandos, antagonistas, agonistas). La permeabilidad selectiva está relacionada con la química de los lípidos utilizados en la construcción de las estructuras de membrana. También es conocido que estas membranas sintéticas pueden incorporar moléculas más grandes tales como polipéptidos o proteínas que actúan, por ejemplo, facilitando el transporte de moléculas (por ejemplo, los canales iónicos que facilitan el transporte de iones a través de membranas son conocidos como ionóforos), actuando como receptores de ligandos, formando poros a través de los cuales se pueden translocar los polipéptidos (por ejemplo, estructuras que forman poros nucleares, estructuras que importan proteínas mitocondriales). Estos polipéptidos de membrana son conocidos como proteínas de membrana.

Dado que las proteínas de membrana tienen la capacidad intrínseca de acoplarse a interfases en combinación con otras sustancias anfífilas, son adecuadas para la construcción de superficies biomimetizadas para el uso en dispositivos biocompatibles y biosensores. Los biosensores que incorporan polipéptidos de membrana tienen numerosas aplicaciones potenciales incluyendo, por ejemplo y sin suponer una limitación, biosensores basados en ligandos para el diagnóstico clínico; la detección de contaminantes en el agua y en el medio ambiente; dispositivos de memoria; dispositivos de cribado para aplicaciones farmacéuticas; el suministro de superficies funcionalizadas biológicamente; centros de unión y, de esta manera, sensores para moléculas pequeñas tales como fármacos, pesticidas, moléculas que requieren ser analizadas durante el control de procesos (i.e. alimentos, productos de fermentación, productos químicos); moléculas más grandes tales como proteínas para el cribado de compuestos en investigación (e.g. tecnología matricial (en inglés “array technology”) o diagnóstico (marcadores para cáncer, marcadores para enfermedades infecciosas, hormonas); ácidos nucleicos; polímeros de carbohidratos; células tales como bacterias patógenas; células eucariotas tales como células cancerígenas y pequeños organismos unicelulares o pluricelulares, en particular parásitos. Además, un biosensor puede contener polipéptidos de membrana combinados con otros componentes acoplados de manera independiente a la superficie del biosensor, los cuales actúan como centros de unión específicos y para los que el polipéptido de membrana proporciona una superficie estable no desnaturizante y/o una función de sensor dependiente de los canales iónicos. Los biosensores se pueden utilizar en el cribado de alto rendimiento de compuestos para aplicaciones farmacéuticas mediante la modulación del canal iónico o mediante los otros métodos descritos arriba.

Los biosensores pueden proporcionar un ensamblaje inerte, estable, y biológicamente compatible de superficies biológicamente funcionalizadas incluyendo péptidos, ácidos nucleicos, proteínas y otras moléculas de gran tamaño. Estas estructuras se pueden utilizar en el cribado de compuestos y en sistemas de biosensores. También pueden utilizarse para crear superficies compatibles con el cultivo celular o para su implantación en tejido vivo.

Además, los enzimas se pueden modificar en los polipéptidos de membrana o pueden coensamblarse con polipéptidos de membrana de tal forma que puedan ensamblarse de manera funcional y precisa en superficies. Esto podría tener aplicaciones en sistemas de biorreactores, donde se necesitan superficies catalíticas, o en sistemas de sensores, donde el producto enzimático se detecta más fácilmente que el sustrato. El enzima junto con el polipéptido de membrana se puede imprimir específicamente o se puede aplicar de manera que se podrían definir conformaciones espaciales en 1, 2, e incluso 3 dimensiones. Combinada con sistemas de flujo, podría permitir la síntesis/degradación secuencial enzimática en un biorreactor a pequeña escala.

Para el experto en la materia será evidente que esta tecnología también tiene un amplia aplicación en el suministro de superficies que permitan la unión de polipéptidos de membrana a un sustrato en una orientación y densidad determinadas que permitan a estas superficies actuar como superficies de unión para una diversidad de moléculas de las que pueda seguirse su interacción mediante métodos convencionales. Por ejemplo, métodos ópticos como la resonancia de plasma superficial; la fluorescencia; la elipsometría; o métodos eléctricos como la espectroscopia de impedancia, la voltametría cíclica, la medida de la conductancia. Los polipéptidos de membrana podrían ser utilizados en biosensores en dispositivos para captar señales físicas como el voltaje, la presión o la temperatura.

La permeabilidad modificable del biosensor se podría utilizar para permitir la liberación controlada de moléculas a través de la superficie desde un reservorio bajo la capa. Una capa compuesta por lípidos y polipéptidos de membrana también podría utilizarse para almacenar moléculas en un reservorio, como por ejemplo fármacos. Una señal biológica tal como el pH, la actividad proteasa o la unión de ligandos, podría activar la liberación del fármaco. Un ejemplo podrían ser microcápsulas dirigidas a tejidos específicos que liberan fármacos a través del canal polipeptídico de la

membrana cuando entran o se unen a la célula diana. Los polipéptidos de membrana se podrían modificar también para llevar secuencias peptídicas que, al unirse a receptores celulares específicos, dirijan las microcápsulas a tejidos específicos. Esto puede sumarse o ser independiente de la función de liberación del fármaco.

Los ionóforos son polipéptidos o estructuras proteicas de estructura terciaria y en muchos casos cuaternaria que forman poros incrustados en las membranas celulares. La función de los ionóforos es controlar el flujo de corrientes iónicas en respuesta a la excitación eléctrica (conocido como activación por voltaje (en inglés “*voltage gating*”)) o a la presencia de ligandos estimulantes, por ejemplo neurotransmisores (conocido como activación por ligandos (en inglés “*ligand gating*”)).

Un ejemplo de un grupo de proteínas de membrana relacionadas funcionalmente son las porinas, que son un subgrupo de los ionóforos. Otros grupos incluyen los GPCRs, los canales pentaméricos activados por ligandos, los transportadores ABC, etc.

Las propiedades de transducción de señal de los canales iónicos, combinadas con su alta sensibilidad y su tamaño mínimo, ha llevado al desarrollo de biosensores basados en estructuras de membrana sintética que incorporan proteínas de canal iónico. Aunque no existe dificultad en la fabricación de estas membranas que incorporan canales iónicos, su preparación suele ser costosa o resultan frágiles e inestables.

Los biosensores existentes en el estado de la técnica (cfr. US 5.234.566; US 5.736.342; US 5.516.890; WO 9725616) se basan en el acoplamiento de una biocapa a la superficie de un sustrato de modo que una capa quede unida al sustrato (pe. mediante el uso de tiolípidos). Estas bicapas sirven como sustrato en el que se pueden insertar polipéptidos formadores de canal iónico durante o después de la formación, proporcionando un transductor biológico funcional. Un problema asociado con las membranas sintéticas de este tipo es que, cuando se usan con proteínas integrales de membrana de gran tamaño y de origen biológico, estas tienen poca duración, son caras de fabricar y su densidad proteica y orientación están poco controladas. En un caso concreto, el dispositivo de Cornell (Cornell *et al.*, 1997) utiliza una bicapa lipídica fluida compuesta por lípidos que atraviesan media membrana (en inglés “*half membrane spanning lipids*”) y lípidos transmembrana que se anclan a la superficie de tiolípidos. La membrana permite una difusión fácil en el plano de la bicapa y esto se aprovecha mediante el uso de péptidos gramicidina. Estos péptidos sintéticos ionóforos que atraviesan media membrana sólo permiten el flujo de iones cuando se forma un dímero que atraviese toda la membrana. Generalmente un monómero está anclado al sustrato y el monómero superior está conectado a una molécula receptora. La unión al receptor altera la cantidad de dímeros conductores presentes provocando un cambio en la conductancia. Esto permite que se fabriquen los biosensores de alta sensibilidad.

Heyse *et al.* (1998) ofrecen una revisión de las técnicas emergentes para la investigación de interacciones moleculares en membranas lipídicas. En un ejemplo, una superficie de soporte de oro se funcionaliza alternando las regiones de tiolípidos que exhiben carbohidratos y regiones con tioles que exhiben carboxilos en las que se ensambla la proteína fotorreceptora rodopsina. En otro ejemplo, una proteína receptora de OmpF se ensambla en una bicapa lipídica, la cual está unida a una superficie de soporte de oro utilizando derivados de fosfolípidos funcionalizados con tiol.

Breve descripción de la invención

La presente invención inmoviliza directamente proteínas transmembrana, por ejemplo proteínas de membrana que forman canales iónicos, a la superficie de un sustrato sólido para formar una capa de proteínas acopladas de alta densidad a la que se le añade una capa lipídica para formar una estructura de membrana. La combinación de la proteína absorbida químicamente y la capa lipídica anfifílica proporciona una capa estable en la que se conservan la estructura proteica y la función proteica normales. Esto es contrario a lo conocido en el estado de la técnica, que enseñaba que el acoplamiento directo de las proteínas de membrana a un sustrato provocaría la desnaturalización del polipéptido y de ese modo se obtendría una proteína de membrana no funcional.

Los biosensores contruidos según la invención se fabrican fácilmente, son más robustos y se pueden aplicar más ampliamente que los sensores del estado de la técnica, ya que además de las aplicaciones para biosensores basados en membranas, el método permite un ensamblaje denso en sustratos sólidos, imitando a las capas de proteína nativa con una orientación controlada. Las proteínas pueden modificarse para incorporar funciones específicas en sus superficies expuestas.

Por ejemplo, según la invención, hemos manipulado genéticamente una proteína que forma un canal iónico de tal manera que pueda unirse directamente a una superficie metálica, en este ejemplo oro, a la que se le añaden tiolípidos, completando la estructura de membrana y proporcionando un biosensor funcional. En un ejemplo se utiliza un polipéptido OmpF bacteriano que está modificado para incorporar un aminoácido cisteína que facilita la unión del polipéptido a un sustrato tratado. Es evidente que esta tecnología se puede aplicar a otros polipéptidos que forman canales iónicos y a otros polipéptidos de membrana utilizando aminoácidos que contengan tiol. En particular, cualquier proteína que presente una superficie plana cerca de la interfase de membrana (tales como las proteínas externas de membrana bacterianas o de la bacteriorodopsina) pueden considerarse adecuadas para este método. Los polipéptidos pueden incluir, de manera natural un aminoácido que contenga tiol o pueden ser modificados genéticamente para

incluir un aminoácido que contenga tiol. Los aminoácidos pueden ser los que se encuentran de manera natural o ser aminoácidos modificados.

En comparación con el antecedente de Cornell, la presente invención se basa en proteínas integrales de membrana de gran tamaño fijadas directamente a la superficie del sustrato y no se produce una difusión lateral en la bicapa. Por lo tanto, el papel de la bicapa es estabilizar la capa proteica ensamblada, reducir uniones no específicas a la superficie del sustrato y proporcionar aislamiento eléctrico. Ya que no se necesita que la bicapa sea fluida, los lípidos anclados pueden comprender el 100% de los lípidos en la mitad de la bicapa al lado de la superficie. La mitad superior de la bicapa se completa de esta manera con fosfolípidos de membrana tales como difitanoilo-fosfatidilcolina. Sin embargo, como todas las proteínas empleadas atraviesan completamente la bicapa lipídica en vez de atravesar sólo la mitad de la membrana (como en el estado de la técnica de Cornell), existe la opción de formar toda la membrana con lípidos anclados capaces de atravesar todo el espesor de la membrana. Los cambios de conductancia observados mediante espectroscopia de impedancia cuando se utilizan porinas como las proteínas transmembrana en la presente invención, se deben a cambios en el poro de cada proteína y depende de la activación intrínseca de canales individuales más que de la formación e interrupción de dímeros. Además, debido a que se pueden utilizar proteínas de membrana recombinantes purificadas, el método ofrece una técnica amplia para crear superficies de proteínas inmovilizadas manipuladas genéticamente que no sería posible conseguir con los péptidos sintéticos de Cornell. La familia de proteínas barril- β de membrana son buenas dianas para la manipulación genética de proteínas y por lo tanto, de este modo se puede construir una amplia variedad de interfases de proteína.

En el contexto de la presente invención “proteínas transmembrana” se refiere a los polipéptidos que se unen directamente al sustrato. La implicación de esto es que los polipéptidos generalmente no son simples secuencias lineales cortas de aminoácidos sintéticos con poca o ninguna estructura secundaria/terciaria (pe. plegamiento de proteínas). La implicación es también que la proteína tiene un tamaño y una configuración que indica que residiría en una membrana y que se extendería al menos en su mayoría a través del ancho de la bicapa lipídica. Generalmente, se espera que los polipéptidos que se ubican esencialmente solo en una, o en una u otra periferia de una bicapa de membrana no sean ventajosamente útiles en esta invención. De manera similar, es poco probable que sean ventajosamente útiles en la invención proteínas muy grandes o complejos de proteínas que se ubican principalmente en el exterior de la bicapa de membrana pero que puedan extenderse parcialmente en la bicapa. Los expertos en la materia entenderán que el término “transmembrana” no debería interpretarse tan estrictamente como para excluir de esta invención las proteínas que se extienden parcialmente más allá de los límites de la membrana o las que se extienden únicamente a través de la mayoría de la región entre los límites de la membrana.

Fundamentos de la invención

Según un primer aspecto de la invención se proporciona un producto que comprende: una proteína transmembrana; una membrana lipídica formada por moléculas anfifílicas y moléculas de proteína transmembrana; y un sustrato sólido: caracterizado porque la proteína de membrana incluye un aminoácido que contiene tiol a través del cual la proteína de membrana se une al sustrato sólido mediante una unión covalente directa.

En una realización preferida de la invención el producto es un biosensor o una matriz de proteínas.

En otra realización preferida de la invención la proteína transmembrana comprende una estructura hélice α o una estructura barril β .

Las porinas son proteínas de membrana externa que, en forma monomérica, dimerica o trimérica, constituyen un canal transmembrana lleno de agua (“poro”). Este poro permite el paso de iones y de otras numerosas moléculas no específicas a través de una membrana. Las porinas se encuentran en la membrana externa de la mitocondria y en varias bacterias Gram-negativas. Las porinas incluyen la familia OmpA de polipéptidos que tienen ocho barriles β entrelazados, y la OmpF que es un homotrímero con 16 barriles β entrelazados.

Los transportadores de membrana externa dependientes de TonB y los relacionados también están incluidos en el ámbito de esta invención. Estas proteínas son polipéptidos normalmente monoméricos, no forman canales y son altamente específicas para nutrientes concretos.

Las proteínas transmembrana se pueden modificar para facilitar el acoplamiento del polipéptido al sustrato.

Hemos modificado genéticamente las OmpF mediante la mutación de glutamato 183 a cisteína (E183C). La inserción de una cisteína, u otro aminoácido que contenga tiol, en cualquiera de los giros (en inglés “turns”) periplasmáticos del polipéptido OmpF dará resultados similares a los descritos. Se podría añadir más de un residuo de cisteína a cada proteína para aumentar la interacción con la superficie, de esta manera se podría confeccionar para necesidades particulares. La inserción de cisteína en las extremos de los bucles extracelulares también funcionaría pero resultaría en una capa proteica con la orientación opuesta.

Los sinónimos de OmpF son: Porina OmpF

Proteína 1 A de membrana externa

5 Proteína 1 A de membrana externa

Proteína B de membrana externa

Los nombres de los genes son: OMPF o TOLF o CMLB o COA o CRY o B0929.

10

También hemos modificado genéticamente los OmpA para insertar un residuo Cys.

15 En una realización de la invención, la proteína transmembrana puede ser rica en hélices α y no tener proyecciones adicionales de gran tamaño fuera de la membrana en, por lo menos, una de las dos superficies de membrana. Ejemplos de los que se conocen las estructuras con alta resolución incluyen la bacteriorodopsina y el canal de potasio bacteriano KcsA. Esta forma de inmovilización puede aplicarse a muchos miembros de la familia de los GPCR.

20 La proteína transmembrana se puede seleccionar entre las que se presentan en la Tabla 1 o Tabla 2.

La unión de una proteína transmembrana directamente a un sustrato puede conseguirse mediante la reacción de un átomo de azufre (que, por ejemplo, se encuentra en la cisteína) con un sustrato, por ejemplo oro, mediante un enlace directo azufre-oro. Esto resulta en una proteína que mantiene su actividad funcional. El sustrato puede convertirse en hidrofóbico mediante la preincubación con un tiol hidrofílico pequeño, por ejemplo β -mercaptoetanol o tioglicerol.

30 Las porinas son proteínas estables y se pueden añadir a la superficie en soluciones detergentes (tales como SDS o dodecilglucósido) que no desnaturalizan la proteína pero aseguran que no se anulen o se reduzcan las interacciones hidrofóbicas no específicas con la superficie.

35 La naturaleza cooperativa de la reacción de la cisteína implica que la proteína OmpF reacciona fácilmente con la superficie pretratada y que no se inhibe en presencia de tioles. La cooperación puede surgir al tener tres cisteínas por trímero, o más de una cisteína por monómero. En general, es probable que las propiedades de autoensamblaje de las proteínas sean importantes a la hora de crear una monocapa de proteína con contactos no polares entre las proteínas vecinas. Esto puede explicar la alta densidad que se puede conseguir. Además, el contacto de los bucles hidrofílicos de la proteína con la superficie hidrofílica no es desnaturalizante y separa el núcleo de la proteína de la superficie.

40 La capa proteica se estabiliza más, de esta manera, añadiendo anfífilos a la superficie, preferiblemente tiolípidos, que se unirán a través de un enlace oro azufre y llenarán los espacios entre las proteínas. Esto proporciona un entorno similar a membrana que satisface las necesidades de los polipéptidos de superficies hidrofílicas e hidrofóbicas y así se asegura la estabilidad de la proteína.

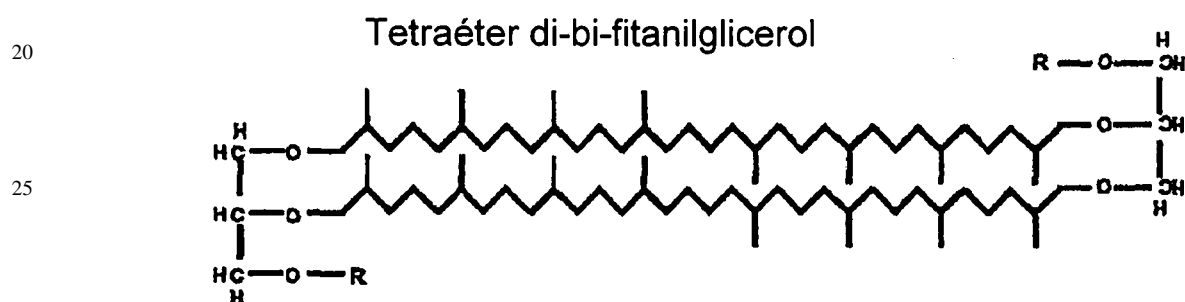
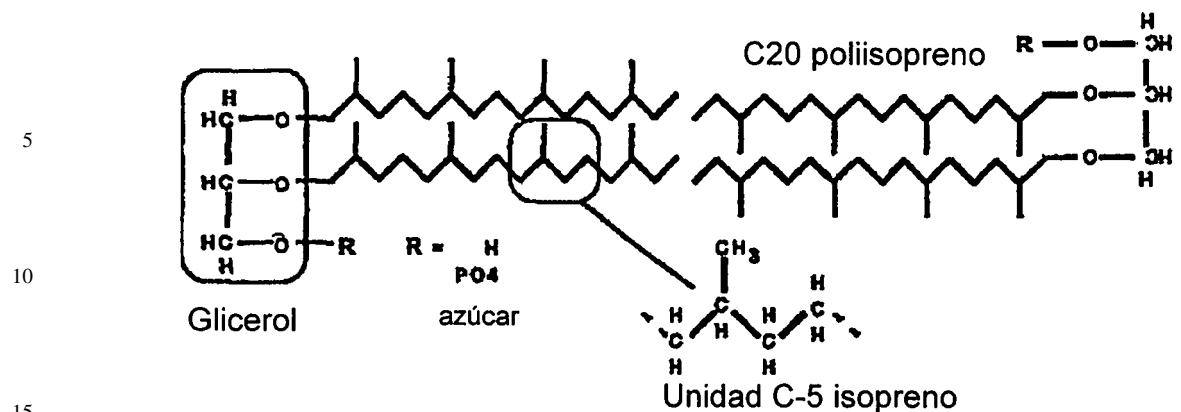
45 En otra realización de la invención el lípido es un tiolípido.

Los tiolípidos son un grupo muy variable. Por ejemplo, el ZD16, se basa en el ácido dipalmitoilfosfatídico, que se extiende al fosfato del lípido mediante una cadena espaciadora hidrofílica de grupos etoxilo de longitud variable, con un grupo disulfuro terminal en el extremo del espaciador hidrofílico. Estos Atiolípidos portadores de punto de anclaje se pueden unir a sustratos formando un enlace sustrato-azufre estable. De esta manera, podemos unir bicapas lipídicas a sustratos, con la posibilidad de conservar una capa de agua entre el sustrato y la primera monocapa.

50 Los tiolípidos sin espaciadores tales como el 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfotioetanol también tienen utilidad en relación al biosensor de la invención. La parte lipídica puede ser cualquier ácido graso que incluya una cadena ramificada (pe. grupos fitanoilo) o insaturada (pe. oleoilo) o un esteroil tal como el colesterol o el lípido puede basarse en una ceramida. La parte lipídica también puede consistir en lípidos tales como los que provienen de los *archaea*, en los cuales la membrana contiene lípidos que atraviesan todo su espesor desde una fase acuosa a la otra.

60

65



Los tiolípidos basados en este diseño enlazarán covalentemente toda la membrana a la superficie. Ejemplos de este diseño son los tetraéteres de di-bi-fitanilglycerol que se encuentran en especies como la *Methanobacterium*, la *Methanobrevibacter*, la *Sulfolobus*, la *Thermoplasma*, la *Thermoproteus*. Los grupos hidrofílicos pueden ser cualquier tipo de unidad química que enlace el grupo tiol a los grupos hidrofóbicos. Preferiblemente el esqueleto carbonado es hidrofílico para estabilizar los bucles hidrofílicos de la proteína adyacentes.

Preferentemente, el tiolípidos se selecciona entre:

1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfotioetanol;

1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[3-(2-piridilditio)propionato];

1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[3-(2-piridilditio)propionato];

N-(14'-mercapto-1',11'-dioxo-3'-6'-9'-trioxa-12'-azatetradecilo)-2-oleoil-1-palmitoil-*sn*-glicero-3-fosfatidiletanolamina;

ácido (8'-mercapto-3',6'-dioxo-octilo)-1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfatídico.

La invención también incluye el uso de moléculas anfífilas diferentes de los lípidos. Las moléculas anfífilas tienen una o dos cabezas hifrofílicas y al menos una región hidrofóbica y son denominados comúnmente surfactantes. Como ejemplos, surfactantes catiónicos (e.g. sales cuaternarias de amonio); surfactantes aniónicos (e.g. sales orgánicas de sulfatos) y surfactantes zwitteriónicos (e.g. fosfatidilcolinas). Otras moléculas anfífilas incluyen detergentes, ácidos grasos. Pueden ser apropiadas moléculas menos solubles en agua tales como los alcanotioles. Estos pueden terminar con un tiol en un extremo y con un grupo soluble en agua tal como un grupo hidroxilo o un azúcar en el otro extremo. Estos pueden tener, por ejemplo, longitudes de cadena de carbono de entre 10 y 18.

En otra realización de la invención el sustrato es un metal. El metal puede seleccionarse entre: oro; cromo; platino; plata.

En una realización más de la invención el sustrato se selecciona entre: vidrio, silicio, silicio terminado en hidrógeno o polímeros plásticos.

Para el experto en la materia, resultarán evidentes métodos que generen mutaciones que delecionen o cambien el uso del codón. La modificación de una proteína transmembrana (tal como un polipéptido formador de canal iónico) significa la deleción, la adición o la sustitución de por lo menos un residuo de aminoácido, en el que la modificación proporciona una proteína capaz de unirse directamente a un sustrato para proporcionar un producto según la invención.

ES 2 271 253 T3

En una realización de la invención, OmpF está modificada en la posición 183 de la secuencia de aminoácidos mediante la mutación de glutamato a cisteína. Esto corresponde a la posición 205 del polipéptido OmpF no procesado y a la posición 183 del polipéptido maduro.

5 Se proporciona un método para la producción de la proteína modificada utilizada en la invención, que comprende:

- i) proporcionar una célula transformada/transfectada con una molécula de ácido nucleico que forma parte de un vector adaptado para facilitar la expresión recombinante de la proteína;
- 10 ii) hacer crecer dicha célula en condiciones adecuadas para la expresión de dicha proteína; y
- iii) purificar dicha proteína de dicha célula, o de su medio de crecimiento.

15 El vector puede codificar, y por lo tanto se le proporciona a dicha proteína recombinante modificada, una señal de secreción para facilitar la purificación de la proteína.

Según otro aspecto de la invención se proporciona un producto que comprende un biosensor.

20 El producto puede ser un biosensor de un solo elemento que se sirva de métodos electroquímicos u ópticos para detectar la interacción específica de un analito definido, proteína, ácido nucleico, azúcar, esteroide, etc, con la capa proteica modificada genéticamente. Puede consistir en una capa proteica/lipídica en una superficie de oro combinada con circuitos electrónicos o como parte de un dispositivo de resonancia de plasma superficial. La capa proteica contendría, por ejemplo, puntos de unión para un anticuerpo específico para el diagnóstico de una infección. Se podría aplicar una muestra de sangre u otro fluido biológico en la superficie a través de un filamento que filtre partículas grandes, células, etc. Al llegar a la capa proteica la unión causaría un cambio en las propiedades eléctricas u ópticas que podrían leerse mediante un dispositivo electrónico de salida.

30 Otro producto relacionado podría ser un sensor implantado en el cuerpo para controlar a tiempo real los niveles de biomoléculas específicas en sangre o tejido. El dispositivo puede consistir en un componente eléctrico que contiene un electrodo de oro pequeño (e.g. < 1 mm de diámetro) cubierto con la capa de membrana proteica. La unión de moléculas específicas se podría leer como un cambio en las propiedades de impedancia.

35 El producto también puede ser un dispositivo para construir y analizar dos matrices dimensionales de proteínas para cribados analíticos. El dispositivo incluiría un aparato para la impresión de proteínas modificadas sobre superficies para la creación de las matrices. Las matrices se utilizarían para cribar muestras que contengan proteínas, moléculas pequeñas, células, inhibidores enzimáticos, ácidos nucleicos, que se enlazarán a sitios específicos en la matriz. Los puntos donde se ha unido la proteína se detectaría mediante resonancia de plasma superficial, fluorescencia, espectrometría de masas, métodos electroquímicos, etc.

40 El producto permitiría un cribado rápido de muestras para una diversidad de proteínas y de esta manera se incrementaría la productividad en laboratorios clínicos o de investigación.

Otro producto sería un biorreactor que utilice superficies catalíticas creadas insertando dominios catalíticos en la proteína de membrana. Las muestras se bombearían mediante microfluídicos a lo largo de los canales revestidos de proteínas catalíticas inmovilizadas. En este sentido, se podría conseguir la modificación secuencial de muestras y la síntesis o la modificación precisas de moléculas biológicas. Un biorreactor de este tipo se podría montar en una estructura micromecanizada de silicio para modificar pequeñas cantidades de muestra que puedan ser utilizadas, a continuación, para el posterior análisis. Las fusiones de enzimas con las proteínas de membrana permitirán que las matrices del biorreactor sean utilizadas en cribados de alto rendimiento.

50 Un producto adicional podría ser la creación de superficies biocompatibles para la implantación *in vitro* o para la tecnología de cultivos celulares. Por ejemplo, podría mejorarse la biocompatibilidad de una prótesis coronaria recubriéndola con una monocapa de proteínas modificadas genéticamente que mejoren la interacción con las células epiteliales. Otros ejemplos son las articulaciones artificiales o los aparatos de monitorización continua *in vivo* para la liberación controlada de fármacos.

60 Otro ejemplo más serían las placas para cultivos celulares que se modifican con una monocapa proteica para favorecer patrones de crecimiento celular definidos. El tamaño de éstas puede ir desde el tamaño de una placa de Petri hasta el de aparatos micromecanizados de silicio. Las aplicaciones del producto pueden implicar la inducción de cambios morfológicos en células, especialmente células nerviosas o en los patrones de crecimiento de diferentes líneas celulares adyacentes a otras para poder estudiar y aprovechar la comunicación célula-célula en investigación y en análisis. El producto consistiría en monocapas diseñadas de proteínas modificadas que presentan superficies reconocidas por cada tipo de célula. Las monocapas diseñadas podrían incorporarse en recipientes para cultivo celular de diversos tamaños.

65 El producto de la invención se podría producir a partir de una solución preparada previamente (no necesariamente acuosa) de proteínas de membrana, opcionalmente también con un anfífilo (detergente/lípido), que puede utilizarse para crear superficies proteicas monomoleculares controladas. La solución podría consistir en una mezcla definida

ES 2 271 253 T3

de proteínas que proporcionaría una mezcla definida de manera similar de proteínas modificadas en la superficie. Esto permitiría la fabricación de sustratos con una densidad controlada de puntos de unión que se aplicaría mediante autoensamblaje con proteínas no enlazantes que actúan de espaciadores.

5 Un producto según la invención serían superficies de oro ya preparadas con capas definidas de proteína/lípido que podrían utilizarse en un biosensor de resonancia de plasma superficial.

Según todavía un aspecto más de la invención se proporciona un método para la preparación de un producto que comprende:

- 10 i) tratar un sustrato sólido con un agente de recubrimiento hidrofílico;
- ii) proporcionar al menos una proteína transmembrana que incluye un aminoácido que contiene tiol;
- 15 iii) poner en contacto la proteína con el sustrato sólido tratado, en condiciones para el acoplamiento directo de la proteína al sustrato sólido tratado a través del aminoácido que contiene tiol;
- iv) añadir moléculas anfifílicas al sustrato sólido acoplado a proteína para formar una membrana lipídica.

20 En un método de la invención el producto es un biosensor. En otro método de la invención la proteína de membrana es una proteína de membrana externa, por ejemplo una porina.

En el método de la invención el agente de recubrimiento hidrofílico se puede seleccionar de entre: 2-mercaptoetanol; ácido mercaptopropiónico; 1-mercapto-2-propanol; 2,3-dimercapto-1-propanol; 2-mercapto-3-butanol; ditioneritrol (*eritro*-1,4-dimercapto-2,3-butanodiol, DTE); ditiontreitol (reactivo de Cleland, *treo*-1,4-dimercapto-2,3-butanodiol, DTT); mezclas de DTE y DTT; tioglicerol.

Preferiblemente, el agente de recubrimiento es 2-mercaptoetanol.

30 Las condiciones para el recubrimiento de sustratos pueden ser variadas. Por ejemplo, la concentración del agente hidrofílico de recubrimiento está entre aproximadamente 1 mM y 1 M, preferiblemente entre aproximadamente 50 mM y 500 mM, más preferiblemente entre aproximadamente 100 mM y 200 mM. El tiempo de incubación puede también variar desde horas a muchos días sin tener efectos perjudiciales para la superficie preparada.

35 Preferiblemente, el sustrato es oro y el polipéptido de membrana externa es una porina. Más preferiblemente la porina es OmpF u OmpF modificada. Preferiblemente la molécula anfifílica es un lípido, idealmente un tiolípido.

Según un aspecto de la invención se proporciona un biosensor obtenible mediante el método según la invención.

40 Según un aspecto más de la invención se proporciona el uso del biosensor según la invención para detectar al menos una de las siguientes moléculas: Dominio R de colicina N; polipéptidos; polipéptidos antigénicos; anticuerpos o fragmentos de anticuerpos; receptores; ligandos; antibióticos; fármacos; pesticidas; azúcares; aminoácidos; ácidos grasos; péptidos; hormonas; esteroides; ácidos nucleicos (ADN, ARN, ADNc); ácidos nucleicos peptídicos; metales; iones inorgánicos.

45 A continuación se proporciona una realización de la invención únicamente a modo de ejemplo y haciendo referencia a las siguientes Figuras y Tablas, donde:

La Tabla 1 representa genes de porina de bacteria Gram negativa;

50 La Tabla 2 representa los receptores dependientes de Ton B de varias especies bacterianas;

La Figura 1 es la secuencia de ácido nucleico que codifica para OmpF (natural) y la secuencia proteica de OmpF codificada; [SEC ID No. 1] y [SEC No. 2];

55 La Figura 2 representa la unión de los anticuerpos policlonales anti-OmpF a OmpF-Cys enlazados.

Materiales y métodos

60 Purificación de la proteína

Se preparó OmpF natural (OmpF-WT) de *E coli* BE3000 según se ha descrito previamente utilizando el plásmido pGBF96 (Bainbridge, G., Mobasheri, H., Armstrong, G. A., Lea, E. J. A. y Lakey, J. H. (1998)) y se purificó en detergente SDS o se resuspendió a continuación en POE-Octilo. El mutante de OmpF con una sola cisteína en la vuelta 1 (OmpF-CYS) se creó utilizando el método QuikChangeTM (Stratagene).

Mutagénesis de OmpF

En la mutagénesis se emplearon dos oligonucleótidos 37mero complementarios que codificaban un codón de cisteína TGT en vez de un codón de glutamato GAA.

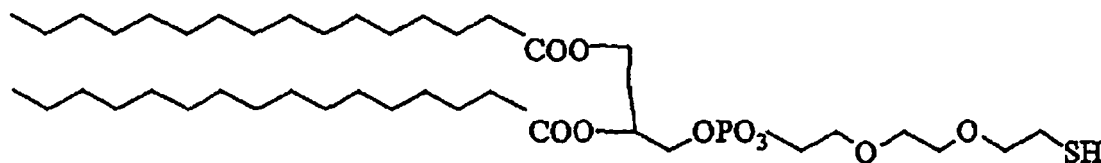
Sentido 5'-GGTTCTATCAGCTACTGTTACGAAGGCTTTGGTATCG-3' [SEQ ID No. 3]
 Antisentido 3'-CCAAGATAGTAGATGACAATGCTTCCGAAACCATAGC-5' [SEQ ID No. 4]

Estos cebadores mutagénicos fueron utilizados con el plásmido pGBF96 en el protocolo QuikChange descrito en el kit QuikChange suministrado por Stratagene. Se utilizaron las transformantes en células *E. coli* XL1-Blue para generar ADN plasmídico puro mediante la utilización de kits Promega Wizard SV miniprep. El gen OmpF fue secuenciado mediante un instrumento ABI-Prism 377 en la University of Newcastle Facility for Molecular Biology.

La mutación en el gen OmpF BE3000 provocada por nuestra introducción de una diana de restricción XbaI es la de Lisina 279 a arginina (K279R). Así, aunque la secuencia de ADN es diferente en posiciones "oscilantes" de la secuencia de ADN de OmpF de *E. coli* de la base de datos, la proteína utilizada en el ejemplo se diferencia del ejemplo de esta base de datos sólo por las mutaciones E183C y K279R.

Agentes anfifílicos

Los fosfolípidos utilizados fueron el dioleilfosfatidilcolina (de Sigma Chemical Company, Fancy Road Poole Dorset GB) o la di-fitanoilfosfatidil colina (de Avanti Polar Lipids Birmingham Alabama EEUU). El tiolípido (designación de laboratorio ZD16) tenía la fórmula siguiente y fue sintetizado mediante los métodos previamente descritos en Lang (1994).

*Resonancia de plasma superficial. [SPR]*

Los chips de oro para el Biacore eran tanto chips normales de oro del tipo Biacore J1 (Biacore AB, St. Albans GB) como chips Biacore reciclados limpiados con solución Piranha. Los portaobjetos de vidrio de índice de refracción 1,7 se limpiaron mediante sonicación en un baño de agua sonicador en un 2% de solución limpiadora Helmanex (Helma GmbH Alemania), seguido de un aclarado abundante con agua Nanopure, y se almacenaron en etanol, con o sin 2-mercaptoetanol, hasta el momento de utilizarse. El etanol residual fue evaporado bajo nitrógeno y se colocó el portaobjetos en un evaporador Edwards High Vacuum Evaporator. Cuando el vacío alcanzó los 5×10^{-6} milibares, el portaobjetos fue cubierto en una de sus caras con una capa de cromo de 3 nm mediante evaporación de cromo. Se dejó enfriar el sistema durante 15 minutos antes de evaporar una capa de oro de 100 nm sobre el sustrato de cromo. Después de 15 minutos más de enfriamiento, se rompió el vacío con argón y se montó el portaobjetos en el aparato de SPR. El montaje consistió en colocar el portaobjetos con la cara dorada de forma que quedara como el lado libre de una cubeta de Teflón que quedara abierta en su parte superior para el intercambio de fluidos. Se colocó un prisma Leica de 601 en el lado opuesto del portaobjetos con el espacio entre ellos relleno de un fluido con el índice de refracción correspondiente. Se fijó el montaje y se colocó en el aparato de SPR. Las soluciones se añadieron y se retiraron de la cubeta mediante pipeta Pasteur o jeringa graduada. El mínimo de luz del láser reflejada se detectó mediante el escaneo de la señal reflejada con un fotodiodo conectado a un ordenador personal. El mínimo exacto se calculó mediante regresión. Para seguir los cambios en función del tiempo de la señal SPR, el ángulo del diodo se ajustó a un valor aproximadamente 2 grados por debajo del mínimo inicial, donde la variación de intensidad por unidad angular es grande. Así, los incrementos en el ángulo del mínimo fueron representados como incrementos en la intensidad de señal.

Los experimentos Biacore se realizaron con la máquina en modo normal. Los chips tratados con mercaptoetanol se colocaron en la máquina y se bombearon sobre el chip las soluciones necesarias a un caudal determinado. Los caudales son 1 μ l por minuto para los pasos de ensamblaje proteína/tiolípido y 30 μ l por minuto para los ensayos de unión con dominio R de colicina N. Se utilizaron dos carriles en serie. Los cambios de la señal SPR en función del tiempo se midieron como cambios en unidades de resonancia tal como se define en el Manual del Usuario de Biacore.

Espectroscopia de impedancia [I.S.]

La espectroscopia de impedancia se llevó a cabo en una celda electroquímica que comprendía un electrodo de membrana recubierto de oro y un electrodo de referencia de Ag/AgCl en KCl 0,1 M, una solución tampón de fosfato de sodio 5 mM a pH 7,4. La superficie del electrodo de oro en forma de disco era de $3,34 \times 10^{-2} \text{ cm}^2$. No se aplicó voltaje de corriente continua. A la celda se le aplicó un voltaje sinusoidal de 10 mV (RMS) a 199 frecuencias sucesivas igualmente separadas entre sí en base a una escala logarítmica de 1 Hz a 20 kHz. La corriente resultante se monitorizó mediante un amplificador *lock-in* sensible a la fase para calcular la impedancia compleja y la admitancia.

Espectroscopia de Infrarrojos por Transformada de Fourier [FTIR]

Las muestras para el análisis FTIR se montaron en los portaobjetos de vidrio Helmanex para microscopio limpios sobre los cuales se evaporaron 3 nm de cromo seguido de 100 nm de oro de la misma manera que en el experimento de SPR excepto por el espesor del oro. El pretratamiento con mercaptoetanol se llevó a cabo de la misma manera que en el caso de los portaobjetos de vidrio para SPR. El ensamblaje de proteína, de tiolípido, o de fosfolípido se realizó dejando la solución encima del portaobjetos colocado en una cápsula de Petri de plástico y se cubrió para prevenir la evaporación. Se añadieron capas sucesivas mediante el reemplazo de la solución inicial por las subsiguientes soluciones sin secarlas o aclararlas. Antes de obtener los espectros, se lavaron los portaobjetos con corriente de agua Nanopure, se secaron bajo argón y se colocaron inmediatamente en el espectrómetro. El espectro de infrarrojos se tomó mediante un espectrómetro Bruker IFS 28 equipado con un detector HgCdTe. Se realizaron mil barridos a una resolución de 1 cm^{-1} y se corrigieron con una función boxcar. Se tomaron los espectros de fondo de los respectivos soportes vacíos. Los espectros corregidos se suavizaron por Fourier a una resolución de 1 cm^{-1} con una corrección triangular. Se tomó el espectro de reflectancia y absorbancia de capas moleculares de oro con un ángulo de incidencia de 85° utilizando únicamente luz polarizada paralelamente. Todas las posiciones de los picos derivaban de un segundo espectro de derivación. Para más detalles de la técnica, véase Boucheva (1997).

Unión de Anticuerpos Policlonales Anti-OmpF a OmpF-Cys

La Figura 2 muestra la unión del anticuerpo policlonal de conejo del bucle 6 anti-OmpF (a dos concentraciones) con OmpF-Cys unida al oro y sumergido en la bicapa híbrida fluida de DOPC (la capa superior, frente a la solución) y los tiolípidos (capa inferior, unida al oro). Los sensogramas se tomaron en una corriente de tampón PBS con un caudal de $30 \mu\text{l}/\text{min}$ en un Biacore X (Biacore AB, Uppsala, Suecia). Las curvas negras ajustadas a un modelo de unión Langmuir 1:1 están superpuestas. La constante de velocidad de asociación K_a se estimó en $4,4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, y la constante de velocidad de disociación K_d en $6,0 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ para una constante de afinidad calculada K_D de 1,4 nM. La interacción de la unión indica que la proteína está inmovilizada con sus bucles extracelulares expuestos.

Ejemplo 1

Experimento de inmovilización utilizando OmpF-Cys.

Se trata una superficie lisa de oro primero con β -mercaptoetanol (1 mM en tampón A (100 mM NaCl, 100 mM Na-fosfato pH 7,0.)), seguido de un lavado con tampón A. Se aplicó OmpF-Cys en Octilo-POE (0,3 mg/ml) a la superficie y se unió rápidamente a la superficie llegando a un equilibrio. El lavado con Tampón A elimina el efecto del tampón anterior y deja una señal incrementada de 1000 unidades de resonancia (la cual puede incrementarse con una incubación más prolongada). A continuación, la superficie se lava con 0,05% de SDS hasta que no se elimina más proteína. OmpF es estable en SDS y este tratamiento elimina la OmpF unida no específicamente y deja trómeros de OmpF unidos covalentemente a la superficie de oro. Mediante este tratamiento se elimina cualquier proteína natural que se una no específicamente a las superficies de oro. El tiolípido (ZD16) añadido mediante la solución de octilo-glucósido al 1% se une a la superficie restante de oro a través de su grupo tiol y completa una monocapa de lípido y proteína unidos covalentemente. La adición de tiolípido a una capa control de oro muestra un nivel de unión del lípido mucho mayor, confirmando que OmpF-Cys y ZD16 compiten por la capa superficial. La adición de vesículas de fosfatidilcolina completa la bicapa ya que se unen y deshacen en la superficie hidrofóbica expuesta. Hemos descubierto que la capa más completa se consigue mediante incubación *ex-situ* durante la noche seguida de lavado en el aparato Biacore. Tratamientos posteriores con β -mercaptoetanol no modifican las capas, indicando que las proteínas y los lípidos autoensamblados están unidos efectivamente e irreversiblemente a la superficie.

Ejemplo 2

Los datos del aparato SPR se muestran directamente en variaciones del ángulo de la señal SPR sobre un eje de tiempo. Los resultados son similares a los datos del Biacore, pero pueden relacionarse directamente con densidades superficiales que pueden ser utilizadas para calcular la media del grosor de la capa.

La inmovilización de la proteína dio una variación del ángulo de $0,31^\circ \pm 0,17$, ya estuviera disuelta la proteína en SDS o en Octilo-POE (0,3 mg/ml). El resultado fue altamente reproducible y confirma la eficiencia del proceso de autoensamblaje. La variación del ángulo esperada de un cristal de dos dimensiones de OmpF es $0,75^\circ$ por lo tanto la proteína está inmovilizada en un 40% de la cobertura máxima. Este es un nivel muy alto considerando que no se toman precauciones especiales para maximizar el autoensamblaje, como la formación previa de cristales de dos dimensiones.

El autoensamblaje de tiolípidos resulta en otro incremento de $0,42^\circ \pm 0,06$ y la adición PC en aproximadamente $0,30^\circ \pm 0,17$.

Los valores son muy constantes y muestran que se ha creado un sistema de autoensamblaje altamente reproducible.

Ejemplo 3

Se tomó el espectro FTIR de trímeros de porina autoensamblados directamente (1% octilo-POE 0,3 mg/ml OmpF-Cys) durante una hora a temperatura ambiente y después de una segunda etapa de autoensamblaje utilizando 1 mg/ml de tiolípidos ZD-16 en 90 mM de octilo-glucósido. Ninguna de las muestras mostró un espectro con restos de estructura beta.

El tratamiento previo del oro con β -mercaptoetanol (10 mM Metanol) (al menos 1 hora aunque ahora estas superficies se mantienen en β -mercaptoetanol 10 mM hasta su uso) provoca una mejora en la retención de la estructura secundaria de OmpF. A continuación siguió el autoensamblaje de OmpF-Cys tal como se describe arriba, seguido de una rápida sustitución de esta solución por la solución de ZD16. Esto autoensambla la capa de tiolípidos sin un paso de secado y además solubiliza y elimina la proteína unida no específicamente. El resultado es un espectro que concuerda en gran medida con el espectro publicado (Nabedryk *et al.*, 1988) y confirma que la estructura secundaria de OmpF se mantiene a través de este procedimiento. La incubación con vesículas de fosfatidilcolina 1 mg/ml en tampón A durante 1 hora proporciona una intensidad extra en el pico a un número de onda de 1740 cm^{-1} . Esto es del lípido y dobla exactamente el pico existente del tiolípidos indicando que la capa superficial de la bicapa se ha completado mediante este procedimiento. El espectro de proteína muestra un ligero aumento de la estructura secundaria beta.

Incluso sin el subsiguiente ensamblaje del tiolípidos, el pretratamiento con β -mercaptoetanol provoca una mejora significativa de la retención de la estructura secundaria. Utilizando otras moléculas hidrofílicas pequeñas con tiol pueden conseguirse mejoras similares.

Ejemplo 4

La densidad máxima de OmpF-Cys autoensamblado seguido por tiolípidos proporciona una capa que es muy conductora y que no puede ser analizada mediante IS. La espectroscopia de impedancia puede medirse a densidades inferiores de proteína y pueden obtenerse resultados claros utilizando una capa preparada mediante 1 hora de incubación con 0,003 mg/ml de solución de OmpF-Cys, lo que significa una concentración 100 veces inferior a la utilizada arriba. A 100 Hz la resistencia de la capa superficial domina la parte real de la señal. La adición de 10^{-6} M de colicina de dominio R provoca que la resistencia aumente indicando que la capa está bloqueada por la interacción de la proteína. Este efecto es dependiente de la concentración y concuerda con la afinidad medida en el artículo anterior.

La unión del dominio R de la colicina N está siendo estudiada mediante SPR en Newcastle y confirma los datos de impedancia mostrados aquí.

Ejemplo 5

Autoensamblaje de capas del dominio transmembrana de porina monomérica OmpA replegada sobre oro

Para utilizar proteínas receptoras de la membrana externa en el desarrollo de monocapas de proteínas de membrana para bionanotecnología, se necesita replegar las proteínas *in vitro* antes de ensamblarlas en las superficies. Aquí mostramos que la proteína OmpA de membrana externa plegada mediante los métodos publicados puede ensamblarse a las capas de proteína-tiolípidos como ya se ha mostrado para OmpF. El resultado también indica que las OMPs monoméricas como OmpA pueden inmovilizarse utilizando los mismos métodos que para las porinas triméricas.

Clonación

La secuencia codificante de OmpA maduro (1-147) se amplificó a partir del ADN genómico de *Escherichia coli* XL-Blue (Stratagene) utilizando colonia PCR y los siguientes cebadores Sentido 5'-TTTCTCGAGCTGTGCTCC GAAAGATAACACC-3' [SEQ ID No. 5], Antisentido 5'-TTTTCGCGCAAAGTGCCACGGCCTCGACCTGG-3' [SEQ ID No. 6]. Los cebadores incluyen respectivamente, las dianas de restricción MluI y XhoI, que permiten la clonación en el vector pET8c basado en el vector pET3c de Novagen. La proteína expresada contiene así una inserción N-terminal de una secuencia MHHHHHHSS [SEQ ID No. 7] codificada por el plásmido y un residuo de Cys adicional codificado por el cebador, y los aminoácidos 1-147 de la proteína OmpA madura. Al plásmido se le denominó pET8c-CysOmpA1-147. La ausencia de la señal peptídica natural significa que la proteína se expresa en el citoplasma y forma cuerpos de inclusión (Arora *et al.*, 2001; Pautsch & Schulz, 2000). La proteína se expresó en BL21 DE3 pLysE (Novagen) mediante la utilización de caldo Luria y 100 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina y 30 $\mu\text{g/ml}$ de cloranfenicol. Se incubaron 6 litros de cultivo en matraces Erlenmeyer hasta que la OD alcanzó los 0,6 cuando la expresión de OmpA fue inducida mediante IPTG. Después de crecer durante tres horas más, las células se recogieron mediante centrifugación, se lisaron mediante Prensa Francesa y las células no lisadas se eliminaron mediante centrifugación a baja velocidad (3000 rpm 10 mins). El sobrenadante se centrifugó a continuación a 10.000 rpm en un rotor Beckman 55.2 durante 1 hora a 4°C . Esta muestra cruda de cuerpos de inclusión se lavó tres veces homogeneizándola en 20 mM Tris pH 8.0 1% Triton X-100 y centrifugando a 8000 rpm durante 1,5 horas (dos veces) y durante 30 min (final) para obtener una preparación

pura de cuerpos de inclusión. Este pellet se resuspendió en 20 ml de tampón (20 mM Tris pH 8,0, 8,0 M urea) y 20 ml de isopropanol homogeneizado a 55°C durante 30 min. El homogeneizado se centrifugó a 38.000 rpm durante 1,5 h a 4°C. El sobrenadante contenía el His-Cys-OmpA1-147 solubilizado. La proteína se purificó adicionalmente utilizando una columna de Ni-agarosa e imidazol como eluyente. La proteína fue una sola banda en SDS-PAGE y su identidad se confirmó por transferencia Western utilizando un anticuerpo de marcado anti-His (SIGMA). El isopropanol se eliminó mediante diálisis de la muestra de proteína en una solución 8 M urea, 20 mM Tris, pH 8,0 y 1% v/v Genapol (Fluka) utilizando una membrana de diálisis Spectra-Por 6-8.000 MW.

La concentración de proteínas en este paso era de 0,34 mM. La proteína se replegó mediante dilución en un exceso molar de 200 de DG (n-dodecil- β -D-glucopiranosido, Calbiochem) a pH 8,1 siguiendo los procedimientos de Kleinschmidt *et al.* (1999). A continuación, la proteína replegada se examinó mediante espectroscopia de dicroísmo circular que mostró contener mucha estructura β , como se esperaba de un dominio de transmembrana OmpA totalmente replegado. La proteína también era resistente a la proteólisis, que es otra propiedad de un monómero plegado de OmpA.

Finalmente, se mostró mediante SPR que la proteína se ensambla en electrodos de oro, y que los lípidos pueden añadirse para completar la monocapa como se ha mostrado para las capas de OmpF. Los resultados demuestran que las porinas monoméricas replegadas tales como OmpA pueden utilizarse de la misma manera que se ha descrito para OmpF. El chip de oro J1 se limpió con solución Piranha (9% v/v H₂O₂ y 70% H₂SO₄ Conc.) aclarado con etanol y agua y secado con nitrógeno. En el espectrómetro de resonancia de plasma superficial Biacore-X, el chip se lavó con una solución 0,05% en SDS y a continuación con β -mercaptoetanol 0,2% para proporcionar la capa hidrofóbica. Después de un segundo lavado con SDS la proteína plegada His-Cys-OmpA(1-147) a 0,2 mg/ml de n-dodecil- β -D-glucopiranosido mostró una unión fuerte con la superficie. Un lavado adicional con SDS eliminó la proteína enlazada no específicamente y a continuación le siguió un segundo paso de ensamblaje del lípido ZD-16 (0,5 mg/ml en octilopolioxi-etileno 1% (Bachem)) para completar la capa lípido-proteica.

Referencias

1. Stora, T., Lakey, J.H. and Vogel, H. (1999). Ion-Channel Gating in Transmembrane Receptor Proteins: Functional Activity in Tethered Lipid Membranes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **38**(3), 389-392.
2. Cornell, B.A., Braach-Maksyutis, V.L.B., King, L.G., Osman, P., Raguse, B., Wiczorek, L. and Pace, R. J. (1997). A biosensor that uses ion-channel switches. *Nature* **387**(6633), 580-583.
3. Bainbridge, G., Mobasher, H., Armstrong, G. A., Lea, E. J. A. and Lakey, J. H. (1998). Voltage gating of *Escherichia coli* porin; a cystine scanning mutagenesis study of loop 3. *Journal Of Molecular Biology* **275**, 171-176.
4. Evans, L. J. A., Cooper, A. and Lakey, J. H. (1996). Direct measurement of the association of a protein with a family of membrane receptors. *Journal Of Molecular Biology* **255**(4), 559-563.
5. Navedryk, E., Garavito, R. M. and Breton, J. (1988). The orientation of beta-sheets in porin - a polarized fourier transform infrared spectroscopic investigation. *Biophysical Journal* **53**(5), 671 -676.
6. Evans, L. J. A., Labeit, S., Cooper, A., Bond, L. H. and Lakey, J. H. (1996). The central domain of colicin N possesses the receptor recognition site but not the binding affinity of the whole toxin. *Biochemistry* **35**(48), 15143-15148.
7. Stora, T., Lakey, J.H. and Vogel, H. (1999). Ion-Channel Gating in Transmembrane Receptor Proteins: Functional Activity in Tethered Lipid Membranes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **38**(3), 389-392.
8. Lang, H., Duschl, C., and Vogel, H. (1994). "A new class of thiolipids for the attachment of lipid bilayers on gold surfaces." *Langmuir*, 10(1), 197-210.
9. Boncheva, M., and Vogel, H. (1997). "Formation of stable polypeptide monolayers at interfaces: Controlling molecular conformation and orientation." *Biophysical Journal*, 73(2), 1056-1072.
10. Arora, A., Abildgaard, F., Bushweller, J. H. & Tamm, L. K. (2001). Structure of outer membrane protein A transmembrane domain by NMR spectroscopy. *Nature Structural Biology* **8**(4), 334-338.
11. Kleinschmidt, J.H., Wiener, M.C. & Tamm, L.K. (1999). Outer membrane protein A of *E-coli* folds into detergent micelles, but not in the presence of monomeric detergent. *Protein Science* **8**(10), 2065-2071.
12. Pautsch, A. & Schulz, G.E. (2000). High-resolution structure of the OmpA membrane domain. *Journal Of Molecular Biology* **298**(2) 273-282.
13. Heyse, S., Stora, T., Schmid, E., Lakey, J.H. & Vogel, H. (1998). Emerging techniques for investigating molecular interactions at lipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta* **855**07, 319-338.

ES 2 271 253 T3

TABLA 1

Ejemplos de proteínas de porina adecuadas para ser utilizadas en la invención

Hay más de 340 genes identificados que codifican porinas Gram-ve, de ellos muchos son variantes de porinas de membrana externa de *Neisseria meningitidis* que muestran una gran variabilidad en sus bucles externos. La siguiente es una lista por especie. Porinas adicionales, que tienen una homología de secuencia pequeña, se encuentran al final de la lista. Las cifras entre paréntesis son el número total de genes similares a los de las porinas que se han identificado en esas especies. Algunas de las proteínas pueden no ser porinas verdaderas.

Especies (número total de proteínas de esta clase identificadas por el momento en estas especies)
<i>Siphoviridae pa</i> (1)
Grupo p21 de fago Lambda (1)
<i>Ectothiorhodospira vacuolata</i> (1)
<i>Vibrio cholerae</i> (1)
<i>Photobacterium profundum</i> (1)
<i>Haemophilus influenzae</i> (30)
<i>Pasteurella multocida</i> (7)
<i>Rahnella aquatilis</i> (2)
<i>Salmonella typhimurium</i> (4)
<i>Enterobacter cloacae</i> (1)
<i>Salmonella typhi</i> (5)
<i>Citrobacter freundii</i> (1)
<i>Calymmatobacterium granulomatis</i> (1)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (7)
<i>Yersinia pestis</i> (2)
<i>Xenorhabdus nematophilus</i> (1)
<i>Klebsiella oxytoca</i> (1)
<i>Escherichia coli</i> (9)
<i>Serratia marcescens</i> (2)
<i>Burkholderia cepacia</i> (1)
<i>Eikenella corrodens</i> (1)
<i>Neisseria polysaccharea</i> (1)
<i>Neisseria lactamica</i> (2)
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> (91)
<i>Neisseria flavescens</i> (2)
<i>Neisseria sicca</i> (2)

ES 2 271 253 T3

TABLA 1 (continuación)

5	<i>Neisseria meningitidis</i> (160)
	<i>Bordetella pertussis</i> (1)
	<i>Rhodobacter blastica</i> (1)
10	<i>Rhodobacter capsulatus</i>
	<i>Brucella</i> sp
	<i>Chlamydia</i> sp
15	<i>Shigella</i>
	<i>Comamonas acidovorans</i>
20	<i>Aeromonas</i>
	<i>Thermotoga maritima</i>

Proteínas OmpA 8 con barriles beta encadenados y proteínas de membrana homólogas

30	Especies (número total de proteínas de esta clase identificadas por el momento en estas especies)
	<i>Chlamydophila pneumoniae</i> (1)
35	<i>Chlamydia trachomatis</i> (1)
	<i>Helicobacter pylori</i> (5)
40	<i>Haemophilus influenzae</i> (4)
	<i>Haemophilus</i> sp (1)
	<i>Pasteurella haemolytica</i> (1)
45	<i>Haemophilus parainfluenzae</i> (1)
	<i>Pasteurella multocida</i> (1)
50	<i>aemophilus somnus</i> (1)
	<i>Haemophilus ducreyi</i> (3)
	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> (1)
55	<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> (1)
	<i>Vibrio alginolyticus</i> (2)
60	<i>Vibrio cholerae</i> (1)
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (3)
	<i>Methylococcus capsulatus</i> (1)
65	<i>Aeromonas salmonicida</i> (2)

ES 2 271 253 T3

TABLA 1 (continuación)

5	<i>Pseudomonas syringae</i> (1)
	<i>Moraxella catarrhalis</i> (1)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (3)
10	<i>Pseudomonas putida</i> (2)
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (7)
	<i>Escherichia vulneris</i> (3)
15	<i>Escherichia hermannii</i> (1)
	<i>Escherichia fergusonii</i> (1)
20	<i>Escherichia blattae</i> (1)
	<i>Salmonella typhimurium</i> (2)
	<i>Shigella dysenteriae</i> (1)
25	<i>Serratia odorifera</i> (1)
	<i>Enterobacter aerogenes</i> (2)
30	<i>Citrobacter freundii</i> (1)
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (1)
	<i>Serratia marcescens</i> (1)
35	<i>Escherichia coli</i> (6)
	<i>Legionella pneumophila</i> (1)
40	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> (1)
	<i>Neisseria meningitidis</i> (1)
45	<i>Leptothrix discophora</i> (1)
	<i>Bordetella avium</i> (1)
	<i>Brucella abortus</i> (1)
50	<i>Bartonella bacilliformis</i> (1)
	<i>Sinorhizobium meliloti</i> (1)
55	<i>Rickettsia prowazekii</i> (1)
	<i>Aquifex aeolicus</i> (3)
	<i>Treponema phagedenis</i> (1)
60	<i>Borrelia burgdorferi</i> (2)
	<i>Treponema pallidum</i> (3)

65

ES 2 271 253 T3

TABLA 1 (continuación)

Porinas selectivas de azúcar

5	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (1)
	<i>Vibrio cholerae</i> (1)
10	<i>Aeromonas salmonicida</i> (1)
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (2)
	<i>Salmonella typhimurium</i> (2)
15	<i>Escherichia coli</i> (2)

Proteína TSX formadora de canales específicos de nucleósido

25	Especies (número total de proteínas de esta clase identificadas por el momento en estas especies)
	<i>Klebsiella pneumonia</i>
	<i>Enterobacter aerogenes</i>
30	<i>Escherichia coli.</i>
	<i>Salmonella typhimurium</i>

TABLA 2

40	Receptores dependientes de TonB que pueden inmovilizarse mediante el método han sido identificados en las siguientes especies de bacterias.
45	Especies (número total de proteínas de esta clase identificadas por el momento en estas especies)
	<i>Helicobacter pylori</i> (6)
	<i>Campylobacter coli</i> (1)
50	<i>Haemophilus influenzae</i> (17)
	<i>Pasteurella haemolytica</i> (1)
55	<i>Haemophilus ducreyi</i> (3)
	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> (5)
	<i>Vibrio vulnificus</i> (1)
60	<i>Vibrio anguillarum</i> (1)
	<i>Vibrio orientalis</i> (1)
65	<i>Vibrio cholerae</i> (3)

ES 2 271 253 T3

TABLA 2 (continuación)

5	<i>Aeromonas salmonicida</i> (1)
	<i>Pseudomonas stutzeri</i> (1)
	<i>Moraxella catarrhalis</i> (4)
10	<i>Acinetobacter sp</i> (1)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (11)
	<i>Pseudomonas putida</i> (2)
15	<i>Shewanella sp</i> (1)
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (1)
20	<i>Salmonella typhimurium</i> (2)
	<i>Shigella dysenteriae</i> (1)
	<i>Pectobacterium chrysanthemi</i> (1)
25	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> (1)
	<i>Citrobacter freundii</i> (1)
30	<i>Yersinia enterocolitica</i> (4)
	<i>Erwinia amylovora</i> (1)
	<i>Salmonella paratyphi</i> (1)
35	<i>Salmonella cholerae</i> (1)
	<i>Yersinia pestis</i> (2)
40	<i>Serratia marcescens</i> (1)
	<i>Escherichia coli</i> (17)
	<i>Neisseria gonorrhoea</i> (3)
45	<i>Neisseria meningitidis</i> (12)
	<i>Bordetella pertussis</i> (1)
50	<i>Bordetella bronchiseptica</i> (3)
	<i>Paracoccus denitrificans</i> (1)
55	<i>Sphingomonas aromaticivorans</i> (3)
	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> (1)
	<i>Rhizobiaceae sp</i> (1)
60	<i>Synechocystis sp</i> (3)
	<i>Proteobacteria sp</i> (1)

65

REIVINDICACIONES

1. Producto que comprende: una proteína transmembrana; una membrana lipídica formada a partir de moléculas anfifílicas y de moléculas de proteínas transmembrana; y un sustrato sólido: **caracterizado** porque la proteína de membrana incluye un aminoácido que contiene tiol a través del cual la proteína de membrana se acopla al sustrato mediante una unión covalente directa.
2. Producto según la reivindicación 1, en el que por lo menos algunas de las moléculas anfifílicas están unidas al sustrato sólido mediante una unión covalente directa.
3. Producto según la reivindicación 1 ó 2, en el que la proteína se acopla al sustrato sólido mediante al menos un residuo expuesto de cisteína, localizado en el lado periplasmático de la proteína.
4. Producto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el producto es un biosensor.
5. Producto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el producto es una matriz proteica.
6. Producto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la proteína comprende un polipéptido de más de 20 residuos L-aminoácidos purificados procedentes de un extracto celular.
7. Producto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la proteína comprende una estructura barril β .
8. Producto según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la proteína comprende una estructura hélice α .
9. Producto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la proteína es una proteína integral de membrana en la que las unidades estructurales secundarias atraviesan al menos una vez la membrana y unen regiones expuestas a una fase acuosa.
10. Producto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la proteína es una proteína que forma un canal iónico, un iónoforo.
11. Producto según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que la proteína es un receptor de un ligando o una familia de ligandos.
12. Producto según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que la proteína es un enzima.
13. Producto según cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en el que la proteína es una proteína recombinante manipulada genéticamente que comprende una proteína transmembrana y un polipéptido sintético.
14. Producto según cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en el que la proteína es una proteína recombinante modificada genéticamente que comprende una proteína transmembrana y toda o parte de una proteína soluble de más de 20 residuos L-aminoácidos purificados procedentes de un extracto celular.
15. Producto según cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en el que la proteína es una proteína recombinante manipulada genéticamente a la que se le ha introducido, por inserción o mutación, al menos un residuo expuesto de cisteína localizado en el lado periplasmático de la proteína.
16. Producto según la reivindicación 10, en el que la proteína es una porina.
17. Producto según la reivindicación 16, en el que la porina se selecciona de la Tabla 1.
18. Producto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las moléculas anfifílicas comprenden o consisten en tiolípido.
19. Producto según la reivindicación 18, en el que el tiolípido se selecciona del grupo que consiste en: 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanol; 1,2-di oleoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[3-(2-piridilditio)propionato]; 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[3-(2-piridilditio)propionato]; N-(14'-mercapto-1',11'-dioxo-3',6',9'-trioxa-12'-azatetradecilo)-2-oleoil-1-palmitoil-*sn*-glicero-3-fosfatidiletanolamina; ácido (8'-mercapto-3',6'-dioxo-octilo)-1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfatídico.
20. Producto según cualquiera de las reivindicaciones 1-19, en el que el sustrato sólido es un metal.
21. Producto según la reivindicación 20, en el que el metal se selecciona entre: oro, cromo, platino, plata.
22. Producto según cualquiera de las reivindicaciones 1-21, en el que el sustrato sólido tiene una superficie modificada para reaccionar con grupos tiol.

ES 2 271 253 T3

23. Producto según cualquiera de las reivindicaciones 1-19, en el que el sustrato sólido se selecciona entre: vidrio, plástico, silicio, silicio con terminaciones de hidrógeno.

24. Método para la preparación de un producto según cualquiera de las reivindicaciones 1-23 que comprende:

- i) tratar un sustrato sólido con un agente de recubrimiento hidrofílico,
- ii) proporcionar al menos una proteína transmembrana que incluya un aminoácido que contiene tiol,
- iii) poner en contacto la proteína con el sustrato sólido tratado, en condiciones para la unión de la proteína directamente al sustrato sólido tratado a través del aminoácido que contiene tiol,
- iv) añadir moléculas anfifílicas a la proteína unida al sustrato para formar una membrana lipídica.

25. Método según la reivindicación 24, en el que el agente hidrofílico es un tiol.

26. Método según la reivindicación 25, en el que el tiol es de fórmula general $\text{OH}-(\text{CH}_2)_n\text{-SH}$, donde n es un número entero y la cadena alquilo es lineal o ramificada.

27. Método según la reivindicación 24, en el que el sustrato se trata con un agente hidrofílico seleccionado entre: 2-mercaptoetanol; ácido mercaptopropiónico; 1-mercapto-2-propanol; 2,3-dimercapto-1-propanol; 2-mercapto-3-butanol; eritro-1,4-dimercapto-2,3-butanodiol, (DTE); treo-1,4-dimercapto-2,3-butanodiol, (DTT); mezclas de DTE y DTT; tioglicerol

28. Método según la reivindicación 27, en el que el agente hidrofílico es 2-mercaptoetanol.

29. Método según cualquiera de las reivindicaciones 24-28, en el que el sustrato sólido es oro.

30. Método según la reivindicación 29, en el que las moléculas anfifílicas están unidas al sustrato de oro mediante un enlace oro-azufre.

31. Método según la reivindicación 30, en el que las moléculas anfifílicas son tiolípidos.

32. Método según cualquiera de las reivindicaciones 24-31, en el que la proteína es un ionóforo.

33. Un método según la reivindicación 32, en el que la proteína es una porina.

34. Método según cualquiera de las reivindicaciones 24-33, en el que se proporciona al menos un residuo expuesto de cisteína en el lado periplasmático de la proteína, de manera que la unión de la proteína al sustrato sólido tiene lugar mediante la unión de por lo menos una cisteína a por lo menos un grupo tiol en el sustrato sólido.

35. Método según la reivindicación 34, en el que la porina es OmpA modificada, formada por la adición N-terminal de MHHHHHSSCys- a la proteína OmpA madura.

36. Método según la reivindicación 34, en el que la porina es OmpF modificada, formada por la mutación del glutamato 183 a cisteína.

37. Producto obtenido mediante el método según cualquiera de las reivindicaciones 24-36.

38. Uso del producto según cualquiera de las reivindicaciones 1-23 para interactuar con al menos una de las siguientes moléculas: polipéptidos; polipéptidos antigénicos; anticuerpos o fragmentos de anticuerpos; receptores; ligandos; antibióticos; fármacos; pesticidas; azúcares; aminoácidos; ácidos grasos; péptidos; hormonas; esteroides; ácidos nucleicos (ADN, ARN, ADNc); ácidos nucleicos peptídicos; metales; iones inorgánicos.

atg atg aag cgc aat att ctg gca gtg atc gtc oct gct ctg cta gta	48
Met Met Lys Arg Asn Ile Leu Ala Val Ile Val Pro Ala Leu Leu Val	
1 5 10 15	
gca ggt act gca aac gct gca gaa atc tat aac aaa gat ggc aac aaa	96
Ala Gly Thr Ala Asn Ala Ala Glu Ile Tyr Asn Lys Asp Gly Asn Lys	
20 25 30	
gta gat ctg tac ggt aaa gct gtt ggt ctg cat tat ttt tcc aag ggt	144
Val Asp Leu Tyr Gly Lys Ala Val Gly Leu His Tyr Phe Ser Lys Gly	
35 40 45	
aac ggt gaa aac agt tac ggt ggc aat ggc gac atg acc tat ggc cgt	192
Asn Gly Glu Asn Ser Tyr Gly Asn Gly Asp Met Thr Tyr Ala Arg	
50 55 60	
ctt ggt ttt aaa ggg gaa act caa atc aat tcc gat ctg acc ggt tat	240
Leu Gly Phe Lys Gly Glu Thr Gln Ile Asn Ser Asp Leu Thr Gly Tyr	
65 70 75 80	
ggt cag tgg gaa cat aac ttc cag ggt aac aac tct gaa ggc gct gac	288
Gly Gln Trp Glu Tyr Asn Phe Gln Gly Asn Asn Ser Glu Gly Ala Asp	
85 90 95	
gct caa act ggt aac aaa acg cgt ctg gca ttc gcg ggt ctt aaa tac	336
Ala Gln Thr Gly Asn Lys Thr Arg Leu Ala Phe Ala Gly Leu Lys Tyr	
100 105 110	
gct gac gtt ggt tct ttc gat tac ggc cgt aac tac ggt gtg gtt tat	384
Ala Asp Val Gly Ser Phe Asp Tyr Gly Arg Asn Tyr Gly Val Val Tyr	
115 120 125	
gat gca ctg ggt tac acc gat atg ctg cca gaa ttt ggt ggt gat act	432
Asp Ala Leu Gly Tyr Thr Asp Met Leu Pro Glu Phe Gly Gly Asp Thr	
130 135 140	
gca tac agc gat gac ttc ttc gtt ggt cgt gtt ggc ggc gtt gct acc	480
Ala Tyr Ser Asp Asp Phe Phe Val Gly Arg Val Gly Gly Val Ala Thr	
145 150 155 160	
tat cgt aac tcc aac ttc ttt ggt ctg gtt gat ggc ctg aac ttc gct	528
Tyr Arg Asn Ser Asn Phe Phe Gly Leu Val Asp Gly Leu Asn Phe Ala	
165 170 175	
ggt cag cac ctg ggt aaa aac gag cgt gac act gca cgc cgt tot aac	576
Val Gln Tyr Leu Gly Lys Asn Glu Arg Asp Thr Ala Arg Arg Ser Asn	
180 185 190	
ggc gac ggt gtt ggc ggt tct atc agc tac gaa tac gaa ggc ttt ggt	624
Gly Asp Gly Val Gly Gly Ser Ile Ser Tyr Glu Tyr Glu Gly Phe Gly	
195 200 205	

Figura 1 (continúa en la página siguiente)

atc gtt ggt gct tat ggt gca gct gac cgt acc aac ctg caa gaa gct	672
Ile Val Gly Ala Tyr Gly Ala Ala Asp Arg Thr Asn Leu Gln Glu Ala	
210 215 220	
caa cct ctt ggc aac ggt aaa aaa gct gaa cag tgg gct act ggt ctg	720
Gln Pro Leu Gly Asn Gly Lys Lys Ala Glu Gln Trp Ala Thr Gly Leu	
225 230 235 240	
aag tac gac gcg aac aac atc tac ctg gca gcg aac tac ggt gaa acc	768
Lys Tyr Asp Ala Asn Asn Ile Tyr Leu Ala Ala Asn Tyr Gly Glu Thr	
245 250 255	
cgt aac gct acg cag atc act aat aaa ttt aca aac acc agc ggc ttc	816
Arg Asn Ala Thr Pro Ile Thr Asn Lys Phe Thr Asn Thr Ser Gly Phe	
260 265 270	
gcc aac aaa acg caa gac gtt ctg tta gtt gcg caa tac cag ttc gat	864
Ala Asn Lys Thr Gln Asp Val Leu Leu Val Ala Gln Tyr Gln Phe Asp	
275 280 285	
ttc ggt ctg cgt cag tcc atc gct tac acc aaa tct aac gcg aaa gac	912
Phe Gly Leu Arg Pro Ser Ile Ala Tyr Thr Lys Ser Lys Ala Lys Asp	
290 295 300	
gta gaa ggt atc ggt gat gtt gat ctg gtg aac tac ttt gaa gtg ggc	960
Val Glu Gly Ile Gly Asp Val Asp Leu Val Asn Tyr Phe Glu Val Gly	
305 310 315 320	
gca acc tac tac ttc aac aaa aac atg tcc acc tat gtt gac tac atc	1008
Ala Thr Tyr Tyr Phe Asn Lys Asn Met Ser Thr Tyr Val Asp Tyr Ile	
325 330 335	
atc aac cag atc gat tct gac aac aaa ctg ggc gta ggt tca gac gac	1056
Ile Asn Gln Ile Asp Ser Asp Asn Lys Leu Gly Val Gly Ser Asp Asp	
340 345 350	
aco gtt gct gtg ggt atc gtt tac cag ttc taa	1089
Thr Val Ala Val Gly Ile Val Tyr Gln Phe	
355 360	

Figura 1 (continuación)

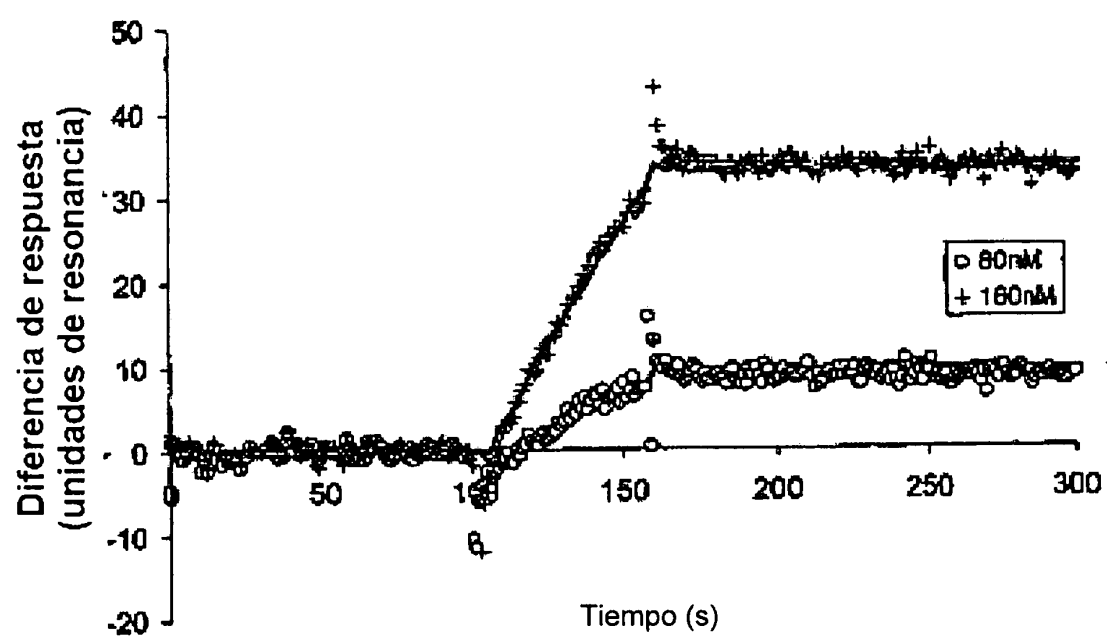


Figura 2

ES 2 271 253 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> University of Newcastle Upon Tyne

5 <120> Biosensor

<130> 44061.PCT/JMD/MAR

10 <160> 7

<170> PatentIn versión 3.1

15 <210> 1

<211> 1089

<212> ADN

20 <213> *Escherichia coli*

<220>

<221> CDS

25 <222> (1)..(1089)

<223>

<400> 1

30

atg atg aag cgc aat att ctg gca gtg atc gtc cct gct ctg tta gta 48

Met Met Lys Arg Asn Ile Leu Ala Val Ile Val Pro Ala Leu Leu Val

1 5 10 15

35

gca ggt act gca aac gct gca gaa atc tat aac aaa gat ggc aac aaa 96

Ala Gly Thr Ala Asn Ala Ala Glu Ile Tyr Asn Lys Asp Gly Asn Lys

20 25 30

40

gta gat ctg tac ggt aaa gct gtt ggt ctg cat tat ttt tcc aag ggt 144

Val Asp Leu Tyr Gly Lys Ala Val Gly Leu His Tyr Phe Ser Lys Gly

35 40 45

45

aac ggt gaa aac agt tac ggt ggc aat ggc gac atg acc tat gcc cgt 192

Asn Gly Glu Asn Ser Tyr Gly Gly Asn Gly Asp Met Thr Tyr Ala Arg

50 55 60

55

ctt ggt ttt aaa ggg gaa act caa atc aat tcc gat ctg acc ggt tat 240

Leu Gly Phe Lys Gly Glu Thr Gln Ile Asn Ser Asp Leu Thr Gly Tyr

60

65

ES 2 271 253 T3

	65	70	75	80	
5	ggt cag tgg gaa tat aac ttc cag ggt aac aac tct gaa ggc gct gac				288
	Gly Gln Trp Glu Tyr Asn Phe Gln Gly Asn Asn Ser Glu Gly Ala Asp				
		85	90	95	
10	gct caa act ggt aac aaa acg cgt ctg gca ttc gcg ggt ctt aaa tac				336
	Ala Gln Thr Gly Asn Lys Thr Arg Leu Ala Phe Ala Gly Leu Lys Tyr				
		100	105	110	
15	gct gac gtt ggt tct ttc gat tac ggc cgt aac tac ggt gtg gtt tat				384
	Ala Asp Val Gly Ser Phe Asp Tyr Gly Arg Asn Tyr Gly Val Val Tyr				
20		115	120	125	
25	gat gca ctg ggt tac acc gat atg ctg cca gaa ttt ggt ggt gat act				432
	Asp Ala Leu Gly Tyr Thr Asp Met Leu Pro Glu Phe Gly Gly Asp Thr				
		130	135	140	
30	gca tac agc gat gac ttc ttc gtt ggt cgt gtt ggc ggc gtt gct acc				480
	Ala Tyr Ser Asp Asp Phe Phe Val Gly Arg Val Gly Gly Val Ala Thr				
		145	150	155	160
35	tat cgt aac tcc aac ttc ttt ggt ctg gtt gat ggc ctg aac ttc gct				528
	Tyr Arg Asn Ser Asn Phe Phe Gly Leu Val Asp Gly Leu Asn Phe Ala				
		165	170	175	
40	gtt cag tac ctg ggt aaa aac gag cgt gac act gca cgc cgt tct aac				576
	Val Gln Tyr Leu Gly Lys Asn Glu Arg Asp Thr Ala Arg Arg Ser Asn				
		180	185	190	
45	ggc gac ggt gtt ggc ggt tct atc agc tac gaa tac gaa ggc ttt ggt				624
	Gly Asp Gly Val Gly Gly Ser Ile Ser Tyr Glu Tyr Glu Gly Phe Gly				
50		195	200	205	
55	atc gtt ggt gct tat ggt gca gct gac cgt acc aac ctg caa gaa gct				672
	Ile Val Gly Ala Tyr Gly Ala Ala Asp Arg Thr Asn Leu Gln Glu Ala				
		210	215	220	
60	caa cct ctt ggc aac ggt aaa aaa gct gaa cag tgg gct act ggt ctg				720
	Gln Pro Leu Gly Asn Gly Lys Lys Ala Glu Gln Trp Ala Thr Gly Leu				
		225	230	235	240

ES 2 271 253 T3

5 aag tac gac gcg aac aac atc tac ctg gca gcg aac tac ggt gaa acc 768
 Lys Tyr Asp Ala Asn Asn Ile Tyr Leu Ala Ala Asn Tyr Gly Glu Thr
 245 250 255

10 cgt aac gct acg ccg atc act aat aaa ttt aca aac acc agc ggc ttc 816
 Arg Asn Ala Thr Pro Ile Thr Asn Lys Phe Thr Asn Thr Ser Gly Phe
 260 265 270

15 gcc aac aaa acg caa gac gtt ctg tta gtt gcg caa tac cag ttc gat 864
 Ala Asn Lys Thr Gln Asp Val Leu Leu Val Ala Gln Tyr Gln Phe Asp
 275 280 285

20 ttc ggt ctg cgt ccg tcc atc gct tac acc aaa tct aaa gcg aaa gac 912
 Phe Gly Leu Arg Pro Ser Ile Ala Tyr Thr Lys Ser Lys Ala Lys Asp
 290 295 300

25 gta gaa ggt atc ggt gat gtt gat ctg gtg aac tac ttt gaa gtg ggc 960
 Val Glu Gly Ile Gly Asp Val Asp Leu Val Asn Tyr Phe Glu Val Gly
 305 310 315 320

30 gca acc tac tac ttc aac aaa aac atg tcc acc tat gtt gac tac atc 1008
 Ala Thr Tyr Tyr Phe Asn Lys Asn Met Ser Thr Tyr Val Asp Tyr Ile
 325 330 335

35 atc aac cag atc gat tct gac aac aaa ctg ggc gta ggt tca gac gac 1056
 Ile Asn Gln Ile Asp Ser Asp Asn Lys Leu Gly Val Gly Ser Asp Asp
 340 345 350

40 acc gtt gct gtg ggt atc gtt tac cag ttc taa 1089
 Thr Val Ala Val Gly Ile Val Tyr Gln Phe
 355 360

45 <210> 2
 <211> 362
 <212> PRT
 55 <213> *Escherichia coli*
 <400> 2

60 Met Met Lys Arg Asn Ile Leu Ala Val Ile Val Pro Ala Leu Leu Val
 1 5 10 15

ES 2 271 253 T3

5 Ala Gly Thr Ala Asn Ala Ala Glu Ile Tyr Asn Lys Asp Gly Asn Lys
 20 25 30

10 Val Asp Leu Tyr Gly Lys Ala Val Gly Leu His Tyr Phe Ser Lys Gly
 35 40 45

15 Asn Gly Glu Asn Ser Tyr Gly Gly Asn Gly Asp Met Thr Tyr Ala Arg
 50 55 60

20 Leu Gly Phe Lys Gly Glu Thr Gln Ile Asn Ser Asp Leu Thr Gly Tyr
 65 70 75 80

25 Gly Gln Trp Glu Tyr Asn Phe Gln Gly Asn Asn Ser Glu Gly Ala Asp
 85 90 95

30 Ala Gln Thr Gly Asn Lys Thr Arg Leu Ala Phe Ala Gly Leu Lys Tyr
 100 105 110

35 Ala Asp Val Gly Ser Phe Asp Tyr Gly Arg Asn Tyr Gly Val Val Tyr
 115 120 125

40 Asp Ala Leu Gly Tyr Thr Asp Met Leu Pro Glu Phe Gly Gly Asp Thr
 130 135 140

45 Ala Tyr Ser Asp Asp Phe Phe Val Gly Arg Val Gly Gly Val Ala Thr
 145 150 155 160

50 Tyr Arg Asn Ser Asn Phe Phe Gly Leu Val Asp Gly Leu Asn Phe Ala
 165 170 175

ES 2 271 253 T3

Val Gln Tyr Leu Gly Lys Asn Glu Arg Asp Thr Ala Arg Arg Ser Asn
180 185 190

Gly Asp Gly Val Gly Gly Ser Ile Ser Tyr Glu Tyr Glu Gly Phe Gly
195 200 205

Ile Val Gly Ala Tyr Gly Ala Ala Asp Arg Thr Asn Leu Gln Glu Ala
210 215 220

Gln Pro Leu Gly Asn Gly Lys Lys Ala Glu Gln Trp Ala Thr Gly Leu
225 230 235 240

Lys Tyr Asp Ala Asn Asn Ile Tyr Leu Ala Ala Asn Tyr Gly Glu Thr
245 250 255

Arg Asn Ala Thr Pro Ile Thr Asn Lys Phe Thr Asn Thr Ser Gly Phe
260 265 270

Ala Asn Lys Thr Gln Asp Val Leu Leu Val Ala Gln Tyr Gln Phe Asp
275 280 285

Phe Gly Leu Arg Pro Ser Ile Ala Tyr Thr Lys Ser Lys Ala Lys Asp
290 295 300

Val Glu Gly Ile Gly Asp Val Asp Leu Val Asn Tyr Phe Glu Val Gly
305 310 315 320

Ala Thr Tyr Tyr Phe Asn Lys Asn Met Ser Thr Tyr Val Asp Tyr Ile
325 330 335

Ile Asn Gln Ile Asp Ser Asp Asn Lys Leu Gly Val Gly Ser Asp Asp
340 345 350

Thr Val Ala Val Gly Ile Val Tyr Gln Phe
355 360

ES 2 271 253 T3

	<210> 3	
	<211> 37	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
10	<400> 3	
	ggttctatca gctactgtta cgaaggcttt ggtatcg	37
15	<210> 4	
	<211> 37	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
25	<400> 4	
	ccaagatagt agatgacaat gcttccgaaa ccatagc	37
30	<210> 5	
	<211> 32	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
40	<400> 5	
	ttttctcgag ctgtgctccg aaagataaca cc	32
45	<210> 6	
	<211> 31	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
55	<400> 6	
	ttttgcgcaa agtgccacgg cctcgacctc g	31
60	<210> 7	
	<211> 9	
	<212> PRT	
65	<213> Secuencia Artificial	

ES 2 271 253 T3

<220>

<223> Secuencia de la etiqueta N-terminal codificada por el vector pET8c

5 <400> 7

Met His His His His His His Ser Ser
1 5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65