



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 329 850**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/00** (2006.01)

**C07K 16/00** (2006.01)

**C12Q 1/54** (2006.01)

**G01N 27/26** (2006.01)

**G01N 33/66** (2006.01)

**G01N 33/542** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **99935583 .7**

96 Fecha de presentación : **15.07.1999**

97 Número de publicación de la solicitud: **1098658**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.05.2001**

54 Título: **Proteínas manipuladas para la detección de analitos.**

30 Prioridad: **17.07.1998 US 93188 P**  
**14.10.1998 US 104237 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.12.2009**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.12.2009**

73 Titular/es: **University of Maryland, Baltimore**  
**520 West Lombard Street**  
**Baltimore, Maryland 21201-1602, US**

72 Inventor/es: **Lakowicz, Joseph, R.;**  
**Tolosa, Leah;**  
**Eichhorn, Lisa y**  
**Rao, Govind**

74 Agente: **Roeb Díaz-Álvarez, María**

ES 2 329 850 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Proteínas manipuladas para la detección de analitos.

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

10 La presente invención se refiere a la determinación de la presencia o concentración de un analito, tal como un azúcar, en una muestra, usando un sensor de proteínas marcadas.

2. **Descripción de la técnica relacionada**

15 Al final de la Descripción detallada de la invención sigue una bibliografía. Todas las referencias enumeradas se incorporan en este documento por referencia.

20 La diabetes produce consecuencias a largo plazo para la salud que incluyen enfermedad cardiovascular y ceguera. Estas consecuencias adversas para la salud a largo plazo resultan de niveles irregulares de glucosa en sangre en diabéticos. Para controlar las complicaciones a largo plazo asociadas a diabetes, los niveles de glucosa en sangre deben regularse estrictamente. Esto requiere una cuidadosa monitorización de la glucosa en sangre que implica el desagradable procedimiento de extraer sangre.

25 La necesidad de la medición en tiempo real de la glucosa en sangre ha resultado en esfuerzos por desarrollar procedimientos no invasivos y mínimamente invasivos para monitorizar la glucosa en sangre. Se ha propuesto una amplia variedad de procedimientos que incluyen espectroscopía de infrarrojos cercana [1-3], rotación óptica [4, 5], detección amperométrica [6, 7], colorimétrica [8, 9] y de fluorescencia [10-15]. A pesar de intensos esfuerzos, actualmente no está disponible ningún procedimiento para la medición no invasiva de glucosa en sangre.

30 La mayoría de los sensores de glucosa que usan elementos biológicos para la transducción de señales usan detección electroquímica o colorimétrica de la actividad de la glucosa oxidada. Este procedimiento está asociado a dificultades que incluyen la influencia de los niveles de oxígeno, inhibidores en la sangre y problemas con electrodos. Además, la detección produce el consumo del analito, que puede producir dificultades cuando se miden bajas concentraciones de glucosa. Las mediciones electroquímicas son conocidas por requerir un calibrado frecuente que no es aceptable para una monitorización continua de glucosa.

35 Usando fluorescencia, la glucosa puede medirse usando fluoróforos que responden o bien a glucosa o a proteínas tales como concanavalina A (ConA). Los ensayos de glucosa basados en proteínas son normalmente ensayos competitivos en los que la glucosa perturba la unión de ConA a un polímero que contiene glucosa tal como dextrano. La unión de ConA al polímero de glucosa se detecta normalmente por transferencia de energía de resonancia (TER).

45 Aunque un sensor de glucosa práctico tal como ConA-dextrano puede usarse para detectar satisfactoriamente glucosa mediante un ensayo de TER competitivo, no es completamente reversible [13-15]. La ConA y el dextrano forman agregados que con el tiempo se hacen cada vez más resistentes a la alteración por glucosa. Un sensor no es útil para monitorizar glucosa a menos que la unión sea reversible.

50 Otra aproximación para desarrollar un biosensor es manipular genéticamente una proteína para posicionarse específicamente en un sitio de moléculas transductoras de señales alostéricas. Los principios estructurales se usan para aprovechar las interacciones cooperativas entre la molécula de señalización y la unión del ligando. Esta técnica se ha aplicado a la proteína de unión a maltosa y la proteína de unión a glucosa/galactosa de *Escherichia coli* (GGBP) [16, 17]. El documento WO 99/34212 A desvela un biosensor de glucosa que comprende una proteína de unión a glucosa genéticamente manipulada (GBP) que incluye mutaciones de una única cisteína que permiten la unión covalente específica del sitio de un fluoróforo. Los estudios estructurales de GGBP revelan dos dominios cuyas posiciones relativas cambian con la unión de glucosa [18]. Puede esperarse que tales cambios conformacionales produzcan cambios espectrales de sondas medioambientalmente sensibles, o cambios en la eficiencia de transferencia entre los pares de donante y aceptor unidos covalentemente a la proteína. Los cambios espectrales de sondas medioambientalmente sensibles se han notificado para GGBP [17]. El documento WO 98/40477 A desvela un biosensor basado en la transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FTER) para la detección de analitos de un modo dependiente de la concentración, estando dicho biosensor constituido por un resto de proteína fluorescente donante y aceptor acoplado a un resto de proteína de unión a analito.

65 Sin embargo, sigue existiendo la necesidad en la técnica de procedimientos mejorados para determinar la presencia o concentración de glucosa usando moléculas de detección fluorescente.

**Resumen de la invención**

En un aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para determinar la presencia o concentración de un analito en una muestra que comprende las etapas de:

- 5 a) proporcionar una molécula de detección de proteínas que puede unir dicho analito en dicha muestra, teniendo dicha molécula una calidad detectable que cambia de un modo dependiente de la concentración cuando dicha molécula se une a dicho analito;
- 10 b) exponer dicha molécula de detección a dicha muestra; y
- c) medir cualquier cambio en dicha calidad detectable para así determinar la presencia o concentración de dicho analito en dicha muestra,

15 en el que dicha molécula de detección de proteínas es una proteína de unión a glucosa/galactosa modificada que contiene un residuo de cisteína en las posiciones 26 y 182 y en el que un colorante donante reactivo con tiol y un colorante aceptor reactivo con tiol están unidos a dichos residuos de cisteína respectivamente en las posiciones 26 y 182.

20 En otro aspecto, la presente invención proporciona un sensor para determinar la presencia o concentración de un analito en una muestra que comprende:

- 25 a) una molécula de detección de proteínas que puede unirse al analito en dicha muestra, teniendo dicha molécula una calidad detectable que cambia de un modo dependiente de la concentración cuando dicha molécula se une al analito;
- b) una fuente de radiación que puede producir que dicha molécula de detección emita dicha calidad detectable; y
- 30 c) medios para detectar cambios en dicha calidad detectable en respuesta a dicha unión al analito

en el que dicha molécula de detección de proteínas es una proteína de unión a glucosa/galactosa modificada que contiene un residuo de cisteína en las posiciones 26 y 182 y en el que un colorante donante reactivo con tiol y un colorante aceptor reactivo con tiol están unidos a dichos residuos de cisteína en las posiciones 26 y 182 respectivamente.

**Breve descripción de los dibujos**

40 La fig. 1 representa la estructura cristalina tridimensional de la proteína de unión a glucosa-galactosa (GGBP) mostrando las localizaciones de los residuos 26 y 182 en presencia de glucosa unida.

La fig. 2 representa la estructura de Q26C-ANS-GGBP en ausencia y presencia de glucosa. En presencia de glucosa, la sonda medioambientalmente sensible ANS está más expuesta a la fase acuosa.

45 La fig. 3 representa un ensayo de FTER hipotético de glucosa basado en cambios conformacionales de proteínas en el que colorantes donantes y aceptores se separan con la unión a glucosa ( $\tau$ =vida,  $\varphi$ =ángulo de fase).

La fig. 4 representa un ensayo de FTER hipotético de glucosa basado en cambios conformacionales de proteínas en el que colorantes donantes y aceptores se acercan más con la unión a glucosa ( $\tau$ =vida,  $\varphi$ =ángulo de fase).

La fig. 5 representa la clonación del gen *mglb* de tipo silvestre.

55 La fig. 6 representa la estructura minimizada de energía de GGBP marcada con pireno en los residuos 26 y 182. En ausencia de glucosa a 37°C parece que los residuos de pireno están muy apilados (derecha). En presencia de glucosa disminuye la cantidad de emisión del excímero sugiriendo que los residuos de pireno se han desapilado y son más comparables a la conformación a temperatura ambiente (izquierda).

60 La fig. 7 muestra los espectros de emisión de ANS-Q26 GGBP en presencia de glucosa 0 a 8  $\mu$ M. La concentración de GGBP fue 0,25  $\mu$ M y la excitación fue a 325 nm. El inserto muestra el cambio en la intensidad frente a la concentración de glucosa.

La fig. 8 muestra la elución del mutante de dicisteína Q26C/M182C de GGBP después de la reacción con pireno-maleimida y TEMPO-yodoacetamida. La separación se llevó a cabo mediante cromatografía por interacción hidrófoba. Las fracciones que contienen el cromóforo pireno se designan como los picos 1, 2 y 3.

65 La fig. 9 muestra los espectros de absorción de los picos 1, 2 y 3 de la Figura 8. La proteína total en cada disolución es 1  $\mu$ M.

## ES 2 329 850 T3

La fig. 10 muestra las relaciones de absorbancias a 343 y 277 nm a lo largo del perfil de elución cromatográfica para las fracciones de las Figuras 8 y 9. Las áreas sombreadas indican fracciones que se reunieron.

La fig. 11 muestra los espectros de emisión del pico 2 de GGBP marcada (de la Figura 8) en función de la concentración de glucosa.

La fig. 12 muestra los espectros de emisión del pico 3 de GGBP marcada (de la Figura 8) con y sin glucosa 2 mM.

La fig. 13 muestra las intensidades de fluorescencia normalizadas medidas a 384 nm para los picos 1, 2 y 3 (de la Figura 8) en función de la concentración de glucosa. La longitud de onda de excitación fue 340 nm. En el caso del pico 3, la emisión también se midió a 480 nm.

La fig. 14 muestra las mediciones de la vida del dominio de la frecuencia del pico 3 de GGBP (de la Figura 8) a diversas concentraciones de glucosa. El desplazamiento hacia menores frecuencias a mayores concentraciones de glucosa indica que la vida media disminuyó con la unión a glucosa.

La fig. 15 muestra la detección de glucosa basada en la vida basada en los datos de fase o modulación a 10 MHz.

La fig. 16 representa la estructura cristalina terciaria de una proteína de fusión GGBP mutante con proteína fluorescente verde (GFP) en el extremo C y una cisteína reactiva y colorante reactivo con tiol en la posición 26 (Q26C-GGBP-GFP).

La fig. 17 representa que las posiciones relativas de C26 y el extremo C de una Q26C-GGBP están más próximos con la unión a glucosa (estructura cristalina a partir de los datos de la proteína).

La fig. 18 representa la estructura cristalina terciaria de una proteína de fusión GGBP con proteína fluorescente azul (BFP) en el extremo N y GFP en el extremo de C (BFP-GGBP-GFP) en presencia de glucosa unida.

La fig. 19 muestra la relajación simulada de la intensidad del dominio de la frecuencia para una mezcla de fluoróforos,  $\tau_1 = 5$  ns,  $\tau_2 = 1000$  ns,  $f_1 = 0,76$  a  $0,1$ .

La fig. 20 muestra la dependencia simulada de la modulación a 2 MHz con la intensidad fraccionaria ( $f_1$ ) del componente de 5 ns.

La fig. 21 muestra la modulación simulada para un sensor de glucosa con  $\tau_1 = 5$  ns,  $\tau_2 = 1000$  ns.

La fig. 22 muestra las respuestas de frecuencia del sensor de glucosa a glucosa 0, 1, 4 y 8  $\mu\text{M}$ .

La fig. 23 muestra el efecto de glucosa sobre la modulación del sensor de glucosa a 2,1 MHz.

### Descripción detallada de las realizaciones preferidas

La presente invención se basa en el descubrimiento de que ciertas proteínas pueden usarse como moléculas de detección para determinar la presencia o concentración de un analito en una muestra. El analito incluye azúcares tales como glucosa, lactosa, galactosa, sacarosa, maltosa, etc., siendo la glucosa la más preferida.

La proteína es una proteína de unión a glucosa/galactosa modificada que contiene un residuo de cisteína en la posición 26 y 182 que se une reversiblemente al analito que va detectarse y que muestra un cambio espectral detectable. Otras características deseables incluyen tener un único sitio de unión para el analito, que minimiza la agregación debido a la reticulación y maximiza la reversibilidad del sensor. También se desea que la proteína sea estable y fácil de purificar tras el clonado y la expresión. Por tanto, también se desea la unión cooperativa del analito ya que ese efecto podría aumentar los cambios espectrales en el intervalo fisiológicamente importante de las concentraciones de analito. También es preferible que la proteína se una al analito en cuestión sin mostrar una transformación química significativa del analito.

Preferentemente, la proteína es una proteína de unión a glucosa/galactosa de *E. coli* ("GGBP") como se describe previamente [38] o fragmentos funcionalmente equivalentes de la misma. Como sensor para la monitorización de glucosa, la GGBP tiene varias características favorables que incluyen un único sitio de unión a glucosa y alta afinidad por la glucosa; la GGBP se une a la glucosa con una constante de disociación próxima a  $0,8 \mu\text{M}$ . El único sitio, y la falta de aceptores poliméricos, dan como resultado la reversibilidad completa con la eliminación de la glucosa. Al igual que las proteínas de transporte similares de otras bacterias, la GGBP es altamente específica para unirse a glucosa y/o galactosa. La clara afinidad de unión de GGBP por azúcares distintos de glucosa o galactosa es normalmente 100-1000 veces más débil [19-22]. La alta afinidad por la glucosa también permitirá el uso del sensor con pequeños volúmenes de sangre o fluido intersticial; para medir concentraciones de glucosa  $\mu\text{M}$  no podría usarse un sensor de proteínas con una baja afinidad. Para uso en la detección de niveles de glucosa en sangre, la proteína del sensor de glucosa tendría que tener una menor constante de afinidad por la glucosa. Esto podría llevarse a cabo con mutantes de hexoquinasa, por ejemplo, que tienen una menor afinidad por la glucosa, o posiblemente con mutantes de GGBP manipuladas para tener una menor constante de unión a glucosa.

## ES 2 329 850 T3

Las proteínas modificadas pueden ser moléculas de detección adecuadas. La modificación puede servir a uno o más de varios fines. Por ejemplo, una proteína puede modificarse con el fin de ajustar su constante de unión con respecto al analito; para cambiar la estabilidad a largo plazo de la proteína; para conjugar la proteína con un polímero; para proporcionar sitios de unión para marcas detectables; etc.

5

La molécula de detección tiene una calidad detectable que cambia de un modo dependiente de la concentración cuando la molécula está unida a glucosa. La calidad detectable resulta de una marca detectable asociada a la molécula de detección. La marca puede estar covalente o no covalentemente unida a la molécula de detección. Se conoce una amplia gama de marcas adecuadas. Por ejemplo, la marca puede ser una marca fluorescente, un aceptor de transferencia de energía no fluorescente, etc. La marca comprende un resto donante de energía y un resto aceptor de energía, cada uno unido a la molécula de detección y espaciado de forma que haya un cambio detectable cuando la molécula de detección está unida al analito.

10

Preferentemente, la calidad detectable es un cambio espectral detectable. Tal incluye cambios en el tiempo de relajación fluorescente (determinado por la medición del dominio del tiempo o dominio de la frecuencia), intensidad fluorescente, anisotropía o polarización fluorescente; un desplazamiento espectral del espectro de emisión; un cambio en la relajación de la anisotropía resuelta en el tiempo (determinada por la medición del dominio del tiempo o el dominio de la frecuencia), etc.

15

Preferentemente, la calidad detectable se refiere a cambios en la fluorescencia. La molécula de detección puede marcarse con una o más marcas detectables y en ella pueden haberse manipulado uno o más residuos de cisteína para ayudar en la incorporación de marcas. Hay muchos pares de marcas adecuados que serían muy conocidos para un experto en la materia. Tales incluyen sondas sensibles a disolventes tales como las sondas de dansilo, sondas de anilinoftaleno, sondas de deproxilo, sondas de ftalamida, sondas de aminoftalamida y sondas comparables a Prodan, Lordan o Acrylodan. Tales sondas son sensibles a la polaridad del entorno local y son muy conocidas para aquellos expertos en la materia.

20

25

Las sondas útiles incluyen aquellas que muestran transferencia de energía de resonancia (TER). Muchos de tales pares donante-aceptor son conocidos e incluyen fluoresceína respecto a rodamina, cumarina respecto a fluoresceína o rodamina, etc. Todavía otra clase de pares de marcas útiles incluyen pares de fluoróforo-inhibidor de la fluorescencia en los que el segundo grupo es un inhibidor de la fluorescencia que disminuye la intensidad de fluorescencia del grupo fluorescente. Algunos inhibidores de la fluorescencia conocidos incluyen grupos acrilamida, átomos pesados tales como yoduro y bromato, marcas de spin de nitróxido tales como TEMPO, etc.

30

Como la GGBP es la molécula de detección, es esencial modificar la molécula para incluir residuos de cisteína en ambas posiciones 26 y 182. Mediante GGBP mutantes de manipulación genética con cisteínas selectivamente situadas, las moléculas reactivas con tiol pueden unirse covalentemente a la proteína. Los sitios se seleccionan basándose en la estructura de la proteína de manera que, por ejemplo, la unión de la glucosa producirá cambios espectrales para la GGBP marcada con sondas medioambientalmente sensibles. En algunas realizaciones, el cambio conformacional de GGBP produce interacciones entre fluoróforos unidos a dominios separados de la proteína que se mueven los unos respecto a los otros en respuesta a la unión a glucosa.

35

40

Las GGBP mutantes se crean cambiando dos residuos de aminoácido por cisteínas en las posiciones 26 y 182 (Figura 1). Estas posiciones son útiles porque están próximas a la región bisagra entre los dos dominios de la GGBP. El sitio 26 se expone mediante cambio conformacional de la proteína con la unión a glucosa, cambiando así el entorno de una sonda unida en ese sitio (véase la Figura 2).

45

Las GGBP mutantes tienen dos residuos sustituidos con cisteína en posiciones ideales para la unión covalente de sondas de forma que, cuando se marcan con sondas fluorescentes adecuadas, la unión a glucosa produce cambios espectrales de sondas medioambientalmente sensibles o cambios en la eficiencia de transferencia de energía. Adicionalmente, las GGBP mutantes pueden haberse unido a fluoróforos con vidas ampliamente espaciadas, permitiendo la detección de la glucosa basada en la modulación. Esta invención también describe sensores de glucosa de GGBP que son proteínas de fusión con proteína fluorescente verde que, mediante cambios en la eficiencia de transferencia de energía en la unión a glucosa, pueden medir glucosa.

50

En una realización del mutante de doble cisteína, la GGBP se manipula genéticamente de manera que las cisteínas cambian residuos en las posiciones 26 y 182 en las que un colorante donante reactivo con tiol y un colorante aceptor reactivo con tiol pueden unirse covalentemente a los residuos de cisteína (véase la Figura 1). La distancia de cys26 a cys182 cambia con la unión de glucosa, moviéndose las sondas unidas en estos sitios las unas respecto a las otras (véase el Ejemplo 3).

55

60

Como comparación, en lugar de la GGBP de manipulación genética, los colorantes donantes y aceptores pueden unirse proporcionando una proteína de fusión, como se describe en el Ejemplo 4. Por tanto, para el mutante de doble cisteína, marcado por ejemplo con un par donante-aceptor, la unión a glucosa produce cambios en la eficiencia de transferencia. Las Figuras 3 y 4 demuestran esquemáticamente cómo los cambios conformacionales de GGBP con la unión a glucosa pueden desplazar las posiciones relativas de moléculas donantes yceptoras cuidadosamente posicionadas.

65

## ES 2 329 850 T3

Los sensores de glucosa de esta invención pueden medir concentraciones de glucosa micromolar sin consumo de reactivo. Debido a su alta sensibilidad a la glucosa, las GGBP mutantes pueden usarse para medir las bajas concentraciones de glucosa conocidas que están presentes en el fluido intersticial extraído [23]. Las muestras de fluido intersticial son conocidas por estar indoloramente disponibles usando procedimientos que perturban la capa más externa de la piel, el estrato córneo, por ejemplo mediante extirpación láser [24] y débil succión [25].

Puede esperarse que un sensor o monitor de glucosa basado en GGBP muestre varias características favorables. El uso de un único sensor promete un rápido tiempo de respuesta, limitado por la velocidad del transporte de glucosa a la proteína. Esto contrasta con la respuesta más lenta esperada para ensayos competitivos de glucosa en la técnica anterior debido a la necesidad de difusión de dos macromoléculas, la unión a glucosa y los restos que contienen glucosa. Para un sensor basado en GGBP, el único movimiento necesario es el de los dos dominios de las proteínas, que debería producirse fácilmente incluso en soportes poliméricos.

Cuando se marcan con fluoróforos adecuados, los cambios espectrales útiles se observan para los mutantes de tanto una única como de doble cisteína de GGBP. La unión a glucosa podría detectarse mediante cambios en la intensidad de emisión, anisotropía, vida o eficiencias de transferencia de energía. Se espera que estas proteínas manipuladas sean útiles para las mediciones de glucosa en tiempo real en una variedad de formatos convenientes. Los desplazamientos espectrales similarmente útiles pueden observarse con proteínas de fusión marcadas con fluoróforo creadas a partir de GGBP o sus mutantes.

Finalmente, los cambios espectrales mostrados para GGBP pueden medirse actualmente con dispositivos de bajo coste. La excitación para la detección basada en una vida de nanosegundos puede llevarse a cabo con diodos láser [26], diodos emisores de luz (LED) [27] o fuentes de luz electroluminiscente [28]. Basándose en estos avances en la detección de fluorescencia a bajo coste, los sensores basados en GGBP pueden usarse en dispositivos de mano para la monitorización en tiempo real de la glucosa.

En realizaciones adicionales, un sensor puede usar una variedad de moléculas de detección con diferentes marcas fluorescentes. Adicionalmente, un sensor puede utilizar múltiples moléculas de detección con un intervalo de constantes de unión a glucosa. Los sensores de glucosa pueden configurarse usando más de una proteína, proporcionar mediciones exactas durante un amplio intervalo de concentraciones de glucosa. Las proteínas sensibles a glucosa manipuladas, acopladas con nuevos procedimientos a fluido intersticial de extracción indolora, proporcionan un excelente procedimiento prometedor a plazo corto para la monitorización en tiempo real de glucosa.

Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la invención y no debe interpretarse que limitan las reivindicaciones.

### Ejemplo comparativo 1

#### 40 Construcción y aislamiento de un mutante de una única cisteína de GGBP

Una realización de la invención comprende una GGBP mutada de manera que una única cisteína cambia un residuo de glutamina en la posición 26 (véase la Figura 5). El gen *mg1b* que codifica la GGBP de tipo silvestre y su promotor natural se aislaron del genoma de K-12 de *E. coli* y se amplificaron por PCR. El fragmento promotor del gen se introdujo en los sitios de restricción *PstI/SstI* del fagémido pTz18U (Bio Rad Laboratories). El plásmido resultante pJL01 se usó como molde para la construcción del mutante Q26C. La mutagénesis dirigida al sitio se llevó a cabo usando el kit de mutagénesis QuickChange™ de Stratagene. Los datos de secuenciación de ADN verificaron la presencia de la mutación puntual deseada.

El mutante de monocisteína de GGBP se produjo en exceso en NM303 de *E. coli* ( $F^+$  *mg1503 lacZlacY<sup>+</sup> recA* 1), una cepa mutante que no produce GGBP. Los cultivos estuvieron constituidos por 0,5% de inóculo, 25  $\mu$ g/ml de ampicilina en 200 ml de medio Luria-Bertani (LB) (10 g/l de bacto-triptona, 5 g/l de extracto de bacto-levadura, 10 g/l de NaCl, pH 7,2), fucosa 1 mM se incubaron en un matraz de agitación de 1 l a 37°C y 260 rpm. Las células se recogieron a 16 h y la GGBP se extrajo mediante choque osmótico como se describió previamente [29]. El extracto bruto se volvió a suspender en tampones de Tris-HCl y EDTA concentrados de manera que la concentración final fue 5 mM y 1 mM, pH 8,0, respectivamente. Los mutantes de cisteína de GGBP también recibieron una concentración final de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) 1 mM. La GGBP se purificó basándose en un procedimiento previo [30] usando una columna de intercambio aniónico DEAE (Bio-Rad, Hercules, CA) y eluyendo la GGBP con Tris-HCl 5 mM, pH 8,0, gradiente de NaCl 0 a 0,5 M.

La GGBP mutante de una única cisteína puede marcarse con un único fluoróforo como en el ejemplo 2 y usarse como un sensor de glucosa en el que el giro conformacional de la proteína inducida por la unión de glucosa produce un cambio en el entorno alrededor del fluoróforo. Alternativamente, la GGBP mutante de una única cisteína marcada con un fluoróforo de corta vida puede usarse conjuntamente con un fluoróforo de vida larga para la detección de la modulación basada en la vida como en el Ejemplo 5.

## Ejemplo comparativo 2

*GGBP Q26C marcada fluorescentemente*

5 Una realización de la invención comprende marcar una GGBP mutante de una única cisteína con ácido 2-(4'-  
 (yodoacetamido)-anilino)naftaleno-6-sulfónico (I-ANS; véase la Figura 6). Una disolución que contenía 2,5 mg/ml de  
 GGBP Q26C en fosfato 20 mM, tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) 1 mM, pH 7,0, se hizo reaccionar con 50  $\mu$ l de una  
 disolución 20 mM de la sal de sodio de I-ANS en tetrahidrofurano (comprado de Molecular Probes, Inc.). La proteína  
 10 marcada resultante se separó del colorante libre pasando la disolución a través de una columna Sephadex G-25. El  
 conjugado de proteína-ANS se purificó adicionalmente en Sephadex G-100.

Los espectros de emisión de ANS26-GGBP se muestran en la Figura 7. La adición de concentraciones micromola-  
 res de glucosa dio como resultado una disminución de aproximadamente 2 veces en la intensidad de la marca de ANS,  
 con una constante de disociación aparente próxima a glucosa 1  $\mu$ M. El ANS es conocido por ser sensible a su entorno  
 15 local con menores intensidades en entornos más polares [31]. La disminución en la intensidad sugiere que el ANS se  
 desplaza hacia la fase acuosa con la unión de la glucosa a ANS26-GGBP. Esto es coherente con la estructura unida a  
 glucosa de GGBP (Figura 2) en la que el residuo en la posición 26 está dirigido hacia la fase acuosa.

## Ejemplo 3

*Construcción y marcado de los sensores de glucosa de GGBP mutante de doble cisteína*

En esta realización, la proteína del sensor de glucosa actúa mediante interacciones entre fluoróforos en dominios  
 25 separados de una proteína que cambia en respuesta a la unión a glucosa. Con el fin de obtener marcas fluorescentes  
 en cada dominio de la GGBP, un mutante de doble cisteína se preparó mediante medios similares a los descritos en  
 el Ejemplo 1 (véase la Figura 5), en el que los residuos de cisteína se insertaron genéticamente en las posiciones 26 y  
 182. El mutante de doble cisteína se cultivó en medio GC (30 g/l de casaminoácidos, 20 g/l de extracto de levadura)  
 que contenía 40 g/l de glicerina, MgSO<sub>4</sub> 4 mM, 25  $\mu$ g/ml de ampicilina y fucosa 1 mM. Las células se cultivaron en  
 30 las mismas condiciones que para el mutante de monocisteína y se usó el choque osmótico para extraer la GGBP. El  
 tampón final fue Tris 20 mM, pH 7, DTT 1 mM y EDTA. Las proteínas contaminantes se precipitaron con sulfato  
 de amonio. El sobrenadante se concentró y el tampón se cambió a sulfato de amonio 2 M. La GGBP se purificó con  
 el sistema de cromatografía de perfusión Biocad Sprint (PE Corp.) en un medio de interacción hidrófobo (POROS  
 20 PE, PE corp.) con un gradiente de sulfato de amonio de 2 a 0 M. La GGBP marcada se separó usando el mismo  
 35 procedimiento con un gradiente de 1,5 a 0 M.

Después, el mutante doble se hizo reaccionar con pirenomaleimida, un fluoróforo, y TEMPO-yodoacetamida,  
 un inhibidor de la fluorescencia o aceptor de transferencia de energía de resonancia ("TER") para pireno. Se eligió  
 TEMPO debido a la posibilidad de o bien inhibirse colisionalmente mediante el grupo nitróxido o TER a las bandas  
 40 de absorción de mayor longitud de onda de TEMPO. La proteína se hizo reaccionar de tal forma que los inventores  
 esperaron obtener un residuo de pireno y un residuo de TEMPO en cada residuo de cisteína. La proteína reaccionada  
 se purificó por cromatografía y se observaron 3 picos que aparentemente contuvieron el cromóforo pireno, como se  
 muestra en la Figura 8.

45 Las muestras se purificaron por cromatografía y las fracciones de columna se reunieron basándose en la relación  
 de absorción a diferentes longitudes de onda. Los espectros de absorción de los tres picos principales se muestran en  
 la Figura 9. Estos espectros de absorción muestran que cada uno de los picos contenía el cromóforo pireno, como se  
 observa de la absorción estructurada de 300 a 350 nm.

50 La Figura 10 muestra la relación de absorbancias a 343 a 277 nm para las diferentes fracciones del cromatógrafo.  
 El pico 3 contiene la mayor cantidad de pireno por molécula de proteína. Los cálculos basados en el coeficiente de  
 extinción del pireno a 343 nm y la cantidad total de proteína ensayada usando azul de Coomassie mostraron que el pico  
 3 contenía dos moléculas de pireno por proteína.

55 Cálculos similares para el pico 2 mostraron un pireno por molécula de proteína. El mutante de una única cisteí-  
 na, Q26C, marcado con pirenomaleimida presentó propiedades idénticas, indicándose así que el pico 2 está lo más  
 probablemente marcado con pireno en la posición 26 y TEMPO en el sitio 182. Los espectros de emisión del pico 2  
 (Figura 11) son muy característicos del pireno. La emisión baja próxima a cero a 450 nm, lo que indica la ausencia  
 de formación de complejos en estado excitado (excímero de pireno) consigo mismo u otras moléculas que forman  
 60 excímeros o excímeros con pireno.

Parece que el pico 1 contiene la menor cantidad de pireno por molécula de proteína (Figura 10), pero es probable  
 que el espectro de absorbancia esté simplemente ensanchado por interacciones del estado base con residuos cercanos.  
 Esto también puede explicar la forma inusual del espectro de emisión (no mostrada).

65 La Figura 12 muestra los espectros de emisión del pico 3 que se cree que está marcado con dos residuos de pireno  
 por proteína. La prueba de esta afirmación es la presencia de una emisión de mayor longitud de onda de 450-500  
 nm. Una emisión tal es típica de dos residuos de pireno en interacción que se sabe que forman complejos en estado

## ES 2 329 850 T3

excitado que muestran una emisión de mayor longitud de onda. También se sabe que el pireno libre en disolución forma excímeros, pero esto no se produciría a la concentración de proteína 0,5 micromolar en el pico 3.

5 La Figura 13 muestra las intensidades normalizadas de las tres fracciones con glucosa añadida. En el caso de la fracción 3, los inventores miraron las intensidades tanto en la emisión de monómero de 384 como en la emisión de excímero a 480 nm. Los resultados más prometedores se obtuvieron para la emisión de excímero que disminuyó el 30% con la adición de glucosa. La relajación de la intensidad del dominio de la frecuencia de la emisión a 480 nm del pico 3 se muestra en la Figura 14. La respuesta a la frecuencia fue fuertemente dependiente de la glucosa indicando un cambio en la vida media de la proteína marcada con la unión a glucosa. La Figura 15 muestra los datos de fase y de modulación a 10 MHz, que también demuestran una vida cambiada con la unión a glucosa. Estos datos demuestran que la GGBP mutante puede usarse con detección basada en la vida para mediciones de glucosa.

### Ejemplo comparativo 4

15 *Sensor de glucosa de GGBP mutante marcada para transferencia de energía*

Puede haber dificultades con marcar selectivamente una proteína con dos residuos de cisteína cuando se necesita para un sensor de glucosa que actúa mediante transferencia de energía. Por tanto, esta invención incluye realizaciones en las que se crean proteínas de fusión de GGBP o sus mutantes.

20 En una realización, la GGBP mutante de monocisteína con una cisteína reactiva y un colorante en la posición 26 es una proteína de fusión con un fluoróforo en el extremo C. Esto se muestra esquemáticamente en la Figura 16. En este caso, la proteína sólo necesita estar marcada con un fluoróforo en un único residuo de cisteína. Esto debería ser más simple y más eficaz que marcar el mutante de dicisteína. La distancia entre el residuo de cisteína y el extremo C debería cambiar con la unión a glucosa (Figura 17) dando como resultado un cambio en la vida, transferencia de energía, intensidad o anisotropía.

25 En esta realización, por ejemplo, los dos fluoróforos pueden incluir una molécula donante proteína fluorescente verde en el extremo C y una molécula aceptora colorante en la posición 26. Las moléculas donantes yceptoras están posicionadas en la GGBP de forma que la unión de la glucosa produce un cambio conformacional a la GGBP que aparta los fluoróforos donantes y aceptores de manera que la emisión del fluoróforo donante ya no se inhibe por la absorbancia por el fluoróforo aceptor. Por tanto, la unión a glucosa produce un aumento en la fluorescencia de la GGBP mutante marcada (véase la Figura 3).

30 Todavía otra realización puede incluir una proteína de fusión GGBP con fluoróforos en tanto las posiciones del extremo C como del extremo N. Un ejemplo no exclusivo se ilustra en la Figura 18, en la que una molécula donante proteína fluorescente verde está unida en el extremo C y una molécula aceptora proteína fluorescente azul está unida en el extremo N de GGBP. En este caso no habría necesidad de marcar adicionalmente la proteína tras su síntesis mediante *E. Coli*. El cambio conformacional que se produce con la unión de glucosa produciría un cambio en la eficiencia de transferencia de energía entre los dos fluoróforos.

35 En esta realización, las moléculas donantes yceptoras están posicionadas en la GGBP de forma que la unión de glucosa produce un cambio conformacional a la GGBP. Este cambio conformacional acerca los fluoróforos donantes y aceptores más de manera que la emisión del fluoróforo donante GFP se inhibe por la absorbancia por el fluoróforo aceptor BFP. Por tanto, la unión a glucosa produce una disminución en la fluorescencia de la GGBP mutante marcada (véase la Figura 4).

### 50 Ejemplo comparativo 5

#### *Simulación del sensor de glucosa basado en la modulación de baja frecuencia*

55 La intensidad sensible a la glucosa de ANS26-GGBP hace de esta proteína un posible componente en el diseño de otra realización de la invención: un sensor de glucosa basado en la modulación de baja frecuencia. Una descripción de la teoría en la que se basan los sensores de modulación se proporciona en un artículo de Lakowicz y col. [32]. Esta realización usa técnicas de detección basadas en la vida en las que se identifican fluoróforos o esquemas de detección que muestran un cambio dependiente del analito en el tiempo de relajación de la muestra, y el cambio en el tiempo de relajación se usa para determinar la concentración del analito. La idea básica es usar una mezcla del fluoróforo de nanosegundos con un fluoróforo que muestre una vida próxima a 1  $\mu$ s. Para una mezcla tal, la modulación de la emisión a frecuencias intermedias se vuelve equivalente a la fracción de la emisión total debida al fluoróforo de nanosegundos de corta vida. Esto se produce porque la emisión del fluoróforo de microsegundos está desmodulada y la del fluoróforo de nanosegundos es próxima a la unidad. Este procedimiento permite la detección basándose en la modulación de aproximadamente 1 a 10 MHz. Adicionalmente, el fluoróforo de detección de nanosegundos no necesita mostrar un cambio en la vida ( $\tau$ ). Un único cambio en la intensidad en respuesta al analito es adecuado para el sensor de modulación de baja frecuencia.

## ES 2 329 850 T3

La detección basada en la vida se realiza más frecuentemente usando el procedimiento de modulación de fase. El uso de ángulos de fase ( $\varphi$ ) o tiempos de relajación puede ser preferible a la detección basada en la intensidad porque los tiempos de relajación son la mayoría de las veces independientes de cambios en la concentración de sonda o nivel de señal total y pueden medirse en medios turbios e incluso a través de la piel [32]. Debido a que la modulación es independiente del nivel de señal total, la detección de la modulación puede ser exacta incluso si hay cambios en el nivel de señal debidos a cambios en la posición de la muestra o flexión de la óptica de fibra. Lo que es necesario es que las proporciones relativas de fluoróforos de corta vida y larga sigan siendo las mismas. La curva de calibrado cambiará si las intensidades relativas de los fluoróforos cambian de un modo independiente de la concentración de analito. Por ejemplo, si los fluoróforos de detección y de referencia fotoblanquean a diferentes velocidades, las curvas de calibrado del sensor de modulación cambiarán.

En una realización de un sensor de modulación, una sonda sensible a la glucosa de corta vida puede combinarse con una sonda de vida larga tal como un complejo de metal-ligando. A bajas frecuencias, la modulación de la emisión combinada de sonda de corta vida sensible al analito y de complejo de metal-ligando de vida larga depende de la intensidad de fluorescencia fraccionaria de la especie con vida más corta. La intensidad fraccionaria disminuye con la unión a glucosa dando como resultado un aumento en la modulación que puede usarse para medir la concentración de glucosa.

La ANS26-GGBP sensible a la glucosa se combina con un complejo de metal-ligando de vida larga tal como [Ru(bpy)<sub>3</sub>]<sup>2+</sup>. Para la construcción del sensor, [Ru(bpy)<sub>3</sub>]<sup>2+</sup> se disolvió en poli(alcohol vinílico) calentado, que luego se pintó en el exterior de una cubeta que contenía la proteína sensible a la glucosa (ANS26-GGBP). GGBP de Q26C se marcó con I-ANS para preparar ANS26-GGBP como se describe en el Ejemplo 2.

La relajación de la intensidad del dominio de la frecuencia se midió con la instrumentación descrita previamente [33] modificada con una tarjeta de adquisición de datos de ISS, Inc. Urbana, Illinois [34]. La excitación fue a 325 nm de un láser HeCd modulado con una célula de Pockels. Los espectros de emisión se registraron en un espectrofluorómetro Aminco SLM AB2 usando una longitud de onda de excitación de 325 nm. Se usaron polarizadores para eliminar el efecto de rotación browniana. La concentración de ANS26-GGBP fue 0,25  $\mu$ M. Los espectros de fluorescencia son idénticos en comparación con una muestra de referencia que estaba sin azúcar.

Los datos simulados del dominio de la frecuencia para una mezcla de fluoróforos se muestran en la Figura 19. Se supuso que las vidas eran  $\tau_1 = 5$  ns y  $\tau_2 = 1000$  ns = 1  $\mu$ s. La vida de 5 ns es comparable a la vida media de ANS-GGBP. Los complejos de Re de metal-ligando con vidas superiores a 1  $\mu$ s están ahora disponibles, de forma que también están disponibles fluoróforos de 1  $\mu$ s. Para estas simulaciones, los inventores supusieron que la intensidad fraccionaria de los 5 ns cambió de 0,1 a 0,76. Hay una región próxima a 2 MHz en la que la modulación es casi independiente de la frecuencia de modulación. Y, lo que es más importante, la modulación es sensible a la intensidad fraccionaria del componente de corta vida. Para las vidas asumidas, la modulación a 2 MHz es casi igual a la amplitud del componente de corta vida. Esto se muestra en la Figura 20, que indica que la modulación a 2 MHz es esencialmente equivalente a la amplitud fraccionaria del componente de corta vida. Este resultado puede entenderse fácilmente observando que la modulación del componente de 5 ns es próxima a 1,0 a 2 MHz, y la modulación del componente de 1  $\mu$ s es próxima a cero a 2 MHz.

La exactitud en la concentración de glucosa esperada para un sensor de modulación tal basado en una mezcla con vida de  $\tau_1 = 5$  ns y  $\tau_2 = 1$   $\mu$ s se calculó a partir de los cambios en la modulación que podrían esperarse para los cambios de intensidad de 2 veces mostrados por GGBP (Figura 21). Para esta proteína sensible a la glucosa, la disminución de dos veces en la intensidad de GGBP podría disminuir la modulación de 2 MHz de 0,81 a 0,66 (Figura 21). La modulación puede medirse rutinariamente a una exactitud de 0,005, que daría como resultado concentraciones de glucosa de aproximadamente +0,2  $\mu$ M. Los inventores observan que un cambio mayor en la intensidad de la emisión sensible a la glucosa daría como resultado cambios mayores en la modulación y mayor exactitud en la concentración de glucosa. Por tanto, con instrumentos especializados la modulación puede medirse a mayor exactitud.

Para medir la glucosa, la proteína marcada ANS26-GGBP se colocó adyacente al complejo de rutenio para dar como resultado una intensidad de GGBP fraccionaria próxima a 0,87 en ausencia de glucosa. El complejo de Ru estaba en una fina película de PVA fuera de la cubeta que contenía ANS26-GGBP. Las respuestas a la frecuencia se muestran en la Figura 22. Estas respuestas son comparables a las simulaciones mostradas en la Figura 19. Y, lo que es más importante, la modulación a 2,1 MHz disminuye en presencia de glucosa, como se espera para la disminución de emisión para ANS26-GGBP. Estos cambios en la modulación se usaron para preparar una curva de calibrado para glucosa (Figura 23). Estos datos demuestran que la ANS26-GGBP puede usarse para cuantificar concentraciones micromolares de glucosa. Las mediciones de la modulación exactas a  $\Delta m = \pm 0,007$  darían como resultado concentraciones de glucosa exactas a  $\Delta c = \pm 0,2$   $\mu$ M. Los inventores esperan que futuros mutantes de GGBP marcados muestren grandes cambios en la fluorescencia y den mediciones de glucosa más exactas.

Los componentes de corta y larga vida en esta realización simulada se separaron físicamente para evitar interacciones del complejo de rutenio de vida larga con la GGBP. Una separación física tal puede llevarse a cabo fácilmente en un sensor que, por ejemplo, comprende dos capas poliméricas, una que contiene la GGBP marcada y otra que contiene el complejo de vida larga. Alternativamente pueden elegirse otros fluoróforos de vida larga que no interactúan con la

proteína, tales como el complejo de rutenio altamente cargado propuesto recientemente como un sensor de oxígeno soluble en agua [35]. Esta invención incluye sensores que comprenden dos capas poliméricas y fluoróforos de vida larga que no reaccionan con GGBP.

5 Otras realizaciones del sensor basado en la modulación pueden incluir complejos de metal-ligando de vida larga tales como, pero no limitados a, renio y osmio. Para el componente de sensor de corta vida puede usarse cualquier fluoróforo de detección que cambie la intensidad, y se incluye en esta invención; no se necesita un cambio en la vida de la sonda.

10 Considerando la optoelectrónica requerida para la detección basada en la modulación, los diodos emisores de luz azul (LED) pueden ser modulados por la amplitud de 0,1 a 100 MHz [36] y los LED con salida ultravioleta próxima a 380 nm están disponibles y pueden modularse a 100 MHz [27]. Los dispositivos electroluminiscentes también pueden modularse a frecuencias de MHz [28]. De ahí que podrían usarse fuentes de luz baratas y simples para un sensor de glucosa de modulación.

15 Un dispositivo para la detección basada en la modulación puede ser más simple que los instrumentos de modulación de fase usuales. Para las mediciones del ángulo de fase, el detector debe modularse con una relación de fases fija respecto a la excitación modulada. Las mediciones de la modulación pueden realizarse sin la relación de bloqueo de fases que simplifica la electrónica. Estas consideraciones sugieren que un dispositivo alimentado por batería portátil puede diseñarse para monitorizar glucosa. La sensibilidad de este procedimiento para bajas concentraciones de glucosa sugiere su uso para monitorizar glucosa en fluido intersticial. Debido a la alta afinidad de la GGBP por la glucosa, este dispositivo también podría usarse con sangre diluida, ya que la concentración de glucosa en sangre completa está en el intervalo de mM. Experimentos recientes muestran la viabilidad de construir instrumentación de bajo coste para mediciones de modulación de fase de hasta 100 MHz [37].

25

## Referencias

30 1. Heise, H. M., Marbach, R., Koschinsky, Th. y Gries, F. A. (1994) Noninvasive blood glucose sensors based on the near-infrared spectroscopy, *Artif. Organs* 18(6):439-447.

35 2. Robinson, M. R., Eaton, R. P., Haaland, D. M., Koeppe, G. W., Thomas, E. V., Stallard, B. R. y Robinson, P. L. (1992) Noninvasive glucose monitoring in diabetic patients: a preliminary evaluation, *Clin. Chem.* 38(9):1618-1622.

3. Burmeister, J. J., Chung, H. y Arnold, M. A. (1998) Phantoms for noninvasive blood glucose sensing with near infrared transmission spectroscopy, *Photochem. Photobiol.* 67(1):50-55.

40 4. March, W. F., Rabinovitch, B., Adams, R., Wise, J. R. y Melton, M. (1982) Ocular glucose sensor, *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organ.* 28:232-235.

5. Rabinovitch, B., March, W. F. y Adams, R. L. (1982) Noninvasive glucose monitoring of the aqueous humor of the eye: Part I. Measurement of very small optical rotations, *Diabetes Care* 5(3):254-258.

45 6. Claremont, D. J., Sambrook, I. E., Penton, C. y Pickup, J. C. (1986) Subcutaneous implantation of a ferrocene-mediated glucose sensor in pigs, *Diabetologia* 29:817-821.

7. Yokoyama, K., Sode, K., Tamiya, E. y Karube, I. (1989) Integrated biosensor with glucose and galactose, *Anal. Chim. Acta.* 218:137-142.

50 8. Schier, G. M., Moses, R. G., Gan, I. E. T. y Blair, S. C. (1988) An evaluation and comparison of reflolux II and glucometer II, two new portable reflectance meters for capillary blood glucose determination, *Diabetes Res. Clin. Practice* 4:177-181.

55 9. Clarke, W., Becker, D. J., Cox, D., Santiago, J. V., White, N. H., Betschart, J., Eckenrode, K., Levandoski, L. A., Prusinski, E. A., Simineiro, L. M. Snyder, A. L., Tideman, A. M. y Yaeger, T. (1988) Evaluation of a new system for self blood glucose monitoring, *Diabetes Res. Clin. Practice* 4:209-214.

60 10. Meadows, D. y Schultz, J. S. (1988) Fiber-optic biosensors based on fluorescence energy transfer, *Talanta* 35 (2):145-150.

11. Shultz, J. S., Mansouri, S. y Goldstein, I. J. (1982) Affinity sensor: a new technique for developing implantable sensors for glucose and other metabolites, *Diabetes Care* 5(3):245-253.

65 12. Schultz, J. S. and Sims, G. (1979) Affinity sensors for individual metabolites, *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 9:65-71.

## ES 2 329 850 T3

13. **Lakowicz, J. R. and Maliwal, B. P. (1993)** Optical sensing of glucose using phase-modulation fluorometry, *Anal. Chim. Acta.* 271:155-164.
14. **Tolosa, L., Szmecinski, H., Rao, G. y Lakowicz, J. R. (1997)** Lifetime-based sensing of glucose using energy transfer with a long lifetime donor, *Anal. Biochem.* 250:102-108.
15. **Tolosa, L., Malak, H., Rao, G. y Lakowicz, J. R. (1997)** Optical assay for glucose based on the luminescence decay time of the long wavelength dye Cy5<sup>TM</sup>, *Sensors and Actuators B* 45:93-99.
16. **Marvin, J.S., Corcoran, E.E., Hattangadi, N.A., Zhang, J.V., Gere, S.A. y Hellinga, H.W. (1997)** The rational design of allosteric interactions in a monomeric protein and its applications to the construction of biosensors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:4366-4371.
17. **Marvin, J. S. and Hellinga, H. W. (1998)** Engineering biosensors by introducing fluorescent allosteric signal transducers: Construction of a novel glucose sensor, *J. Am. Chem. Soc.* 120:7-11.
18. **Careaga, C. L., Sutherland, J., Sabeti, J. y Falke, J. J. (1995)** Large amplitude twisting motions of an inter-domain hinge: A disulfide trapping study of the glucose-galactose binding protein, *Biochem.* 34:3048-3055.
19. **Boos, W., Gordon, A. S., Hall, R. E. and Price, H. D. (1972)** Transport properties of the galactose-binding protein of *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.* 247(3):917-924.
20. **Boos, W. (1972)** Structurally defective galactose-binding protein isolated from a mutant negative in the methyl galactoside transport system of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 247(17):5414-5424.
21. **Strange, P.G. and Koshland, D.G. (1976)** Receptor interactions in a signalling system: Competition between ribose receptor and galactose receptor in the chemotaxis response. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 73(3):762-766.
22. **Zukin, R.S., Strange, P.G., Heavey L.R. and Koshland, D.E. (1977)** Properties of the galactose binding protein of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*, *Biochemistry* 16(3):381-386.
23. **Tamada, J. A., Bohannon, N. J. V. y Potts, R. O. (1995)** Measurement of glucose in diabetic subjects using noninvasive transdermal extraction, *Nature Med.* 1(11):1198-1201.
24. **Jacques, S. L., McAuliffe, D. J., Blank, I. H., Parrish, J. A. (1987)** Controlled removal of human stratum corneum by pulsed laser, *J. Investig. Dermatol.* 88:88-93.
25. **Ito, N., Kayashima, S., Kimura, J., Kuriyama, T., Arai, T., Kikuchi, M. y Nagata, N. (1994)** Development of a transcutaneous blood constituent monitoring method using a suction effusion fluid collection technique and an ion-sensitive field-effect transistor glucose sensor, *Biosensors* 32:242-246.
26. **Berndt, K. W., Gryczynski, I. y Lakowicz, J. R. (1990)** Phase-modulation fluorometry using a frequency-doubled pulsed laser diode light source, *Rev. Sci. Instrum.* 61:1816-1820.
27. **Sipior, J., Carter, G. M., Lakowicz, J. R. y Rao, G. (1997)** Blue light-emitting diode demonstrated as an ultraviolet excitation source for nanosecond phase modulation fluorescence lifetime measurements, *Rev. Sci. Instrum.* 68(7):2666-2670.
28. **Berndt, K. W. y Lakowicz, J. R. (1992)** Electroluminescent lamp-based fluorometer and oxygen sensor, *Anal. Biochem.* 201:319-325.
29. **Neu, H. C. y Heppel, L. A. (1965)** The release of enzymes from *Escherichia coli* by osmotic shock and during the formation of spheroplasts. *J. Biol. Chem.* 240(9):3685-3691.
30. **Boos, W. y Gordon, A. S. (1971)** Transport properties of the galactose binding protein of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 246(3):621-628.
31. **Slavik, I. (1982)** Aniline naphthalene sulfonate as a probe of membrane composition and function, *Biochim. Biophys. Acta.* 694:1-25.
32. **Lakowicz, J.R., Castellano, F.N., Dattelbaum, J.D., Tolosa, L., Rao, G. and Gryczynski, I., Low Frequency Modulation Sensors Using Nanosecond Fluorophores, Anal. Chem.** 70:5115-5121 (1998).
33. **Lakowicz, J. R. y Maliwal, B. P. (1985)** Construction and performance of a variable-frequency phase-modulation fluorometer, *Biophys. Chem.* 21:61-78.
34. **Feddersen, B. A., Piston, D. W. y Gratton, E. (1989)** Digital parallel acquisition in frequency-domain fluorimetry, *Rev. Sci. Instrum.* 60(9):2929-2936.

## ES 2 329 850 T3

35. **Castellano**, F. N. y **Lakowicz**, J. R. (1998) A water-soluble luminescence oxygen sensor, *Photochem. Photobiol.* 67(2):179-183.

5 36. **Sipior**, J., **Carter**, G. M., **Lakowicz**, J. R. y **Rao**, G. (1996) Single quantum well light emitting diodes demonstrated as excitation sources for nanosecond phase-modulation fluorescence lifetime measurements, *Rev. Sci. Instrum.* 67(11):3795-3798.

10 37. **Harms**, P., **Sipior**, J., **Ram**, N., **Carter**, G.M. y **Rao**, G. (1999) Low cost phase modulation measurements of nanosecond fluorescence lifetimes using a lock-in amplifier. *Rev. Sci. Instrum.* 70:1535-1539.

15 38. **Scholle** y col., Sequence of the *mglB* gene from *Escherichia coli* K12: comparison of wild-type and mutant galactose chemoreceptors. *Mol. Gen. Genet.* 208(1-2):247-53, 1987.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Un procedimiento para determinar la presencia o concentración de un analito en una muestra, que comprende las etapas de:

- 10 a) proporcionar una molécula de detección de proteínas que puede unir dicho analito en dicha muestra, teniendo dicha molécula una calidad detectable que cambia de un modo dependiente de la concentración cuando dicha molécula se une a dicho analito;
- b) exponer dicha molécula de detección a dicha muestra; y
- 15 c) medir cualquier cambio en dicha calidad detectable para así determinar la presencia o concentración de dicho analito en dicha muestra,

20 en el que dicha molécula de detección de proteínas es una proteína de unión a glucosa/galactosa modificada que contiene un residuo de cisteína en las posiciones 26 y 182 y en el que un colorante donante reactivo con tiol y un colorante aceptor reactivo con tiol están unidos a dichos residuos de cisteína respectivamente en las posiciones 26 y 182.

25 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el analito es glucosa o galactosa.

3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la calidad detectable es un cambio espectral detectable.

30 4. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que el cambio espectral detectable se selecciona del grupo que consiste en un cambio en el tiempo de relajación fluorescente; un cambio en la intensidad fluorescente; un cambio en la anisotropía fluorescente; un cambio en la polarización fluorescente; un desplazamiento espectral del espectro de emisión o un cambio en la relajación de la anisotropía resuelta en el tiempo; y el cambio en el tiempo de relajación fluorescente o en la relajación de la anisotropía resuelta en el tiempo se determina preferentemente por la medición del dominio del tiempo o por la medición del dominio de la frecuencia.

35 5. Un sensor para determinar la presencia o concentración de un analito en una muestra, que comprende:

- 40 a) una molécula de detección de proteínas que puede unirse al analito en dicha muestra, teniendo dicha molécula una calidad detectable que cambia de un modo dependiente de la concentración cuando dicha molécula se une al analito;
- b) una fuente de radiación que puede producir que dicha molécula de detección emita dicha calidad detectable; y
- c) medios para detectar cambios en dicha calidad detectable en respuesta a dicha unión al analito,

45 en el que dicha molécula de detección de proteínas es una proteína modificada de unión a glucosa/galactosa que contiene un residuo de cisteína en las posiciones 26 y 182 y en el que un colorante donante reactivo con tiol y un colorante aceptor reactivo con tiol están unidos a dichos residuos de cisteína respectivamente en las posiciones 26 y 182.

50 6. El sensor de la reivindicación 5, en el que el analito es glucosa o galactosa.

7. El sensor de la reivindicación 5, en el que la calidad detectable es un cambio espectral detectable.

55 8. El sensor de la reivindicación 7, en el que el cambio espectral detectable se selecciona del grupo que está constituido por un cambio en el tiempo de relajación fluorescente; un cambio en la intensidad fluorescente; un cambio en la anisotropía fluorescente; un cambio en la polarización fluorescente; un desplazamiento espectral del espectro de emisión o un cambio en la relajación de la anisotropía resuelta en el tiempo; y el cambio en el tiempo de relajación fluorescente o en la degradación de la anisotropía resuelta en el tiempo se determina preferentemente por la medición del dominio del tiempo o por la medición del dominio de la frecuencia.

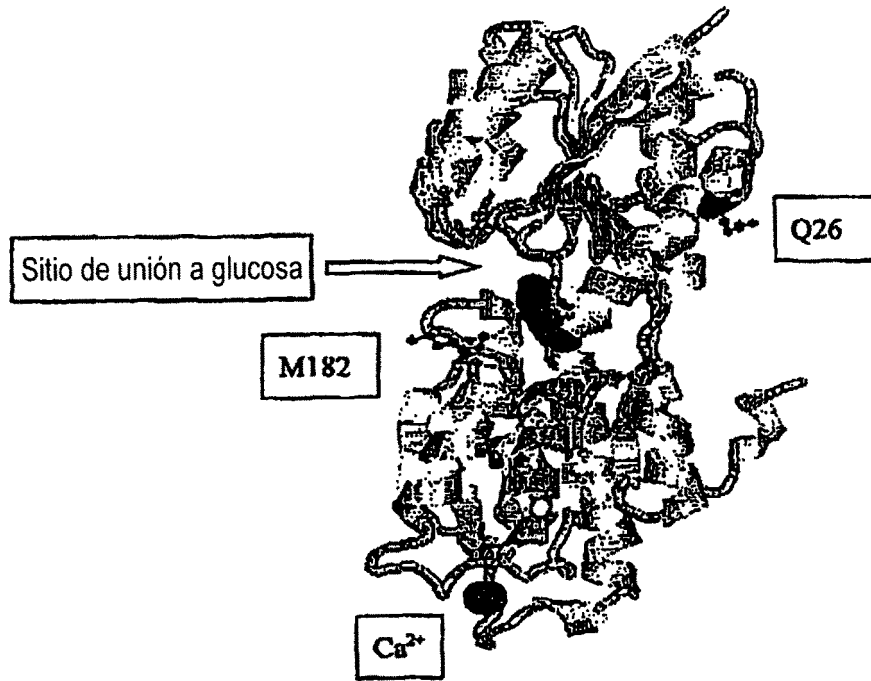


Figura 1

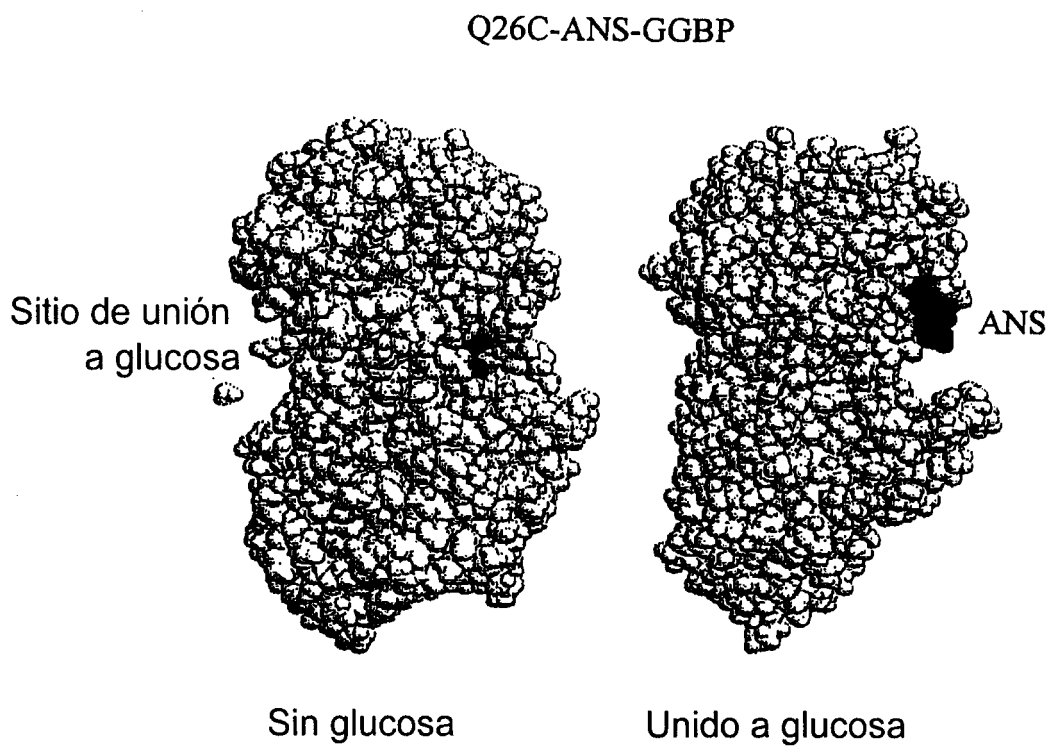


Figura 2

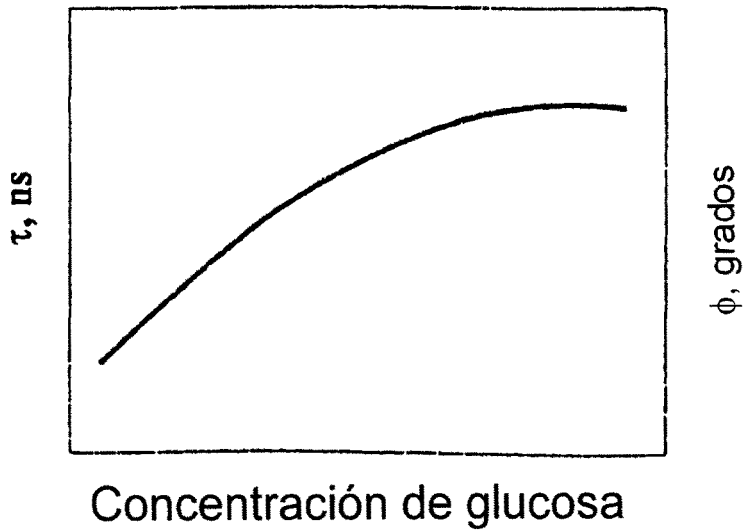
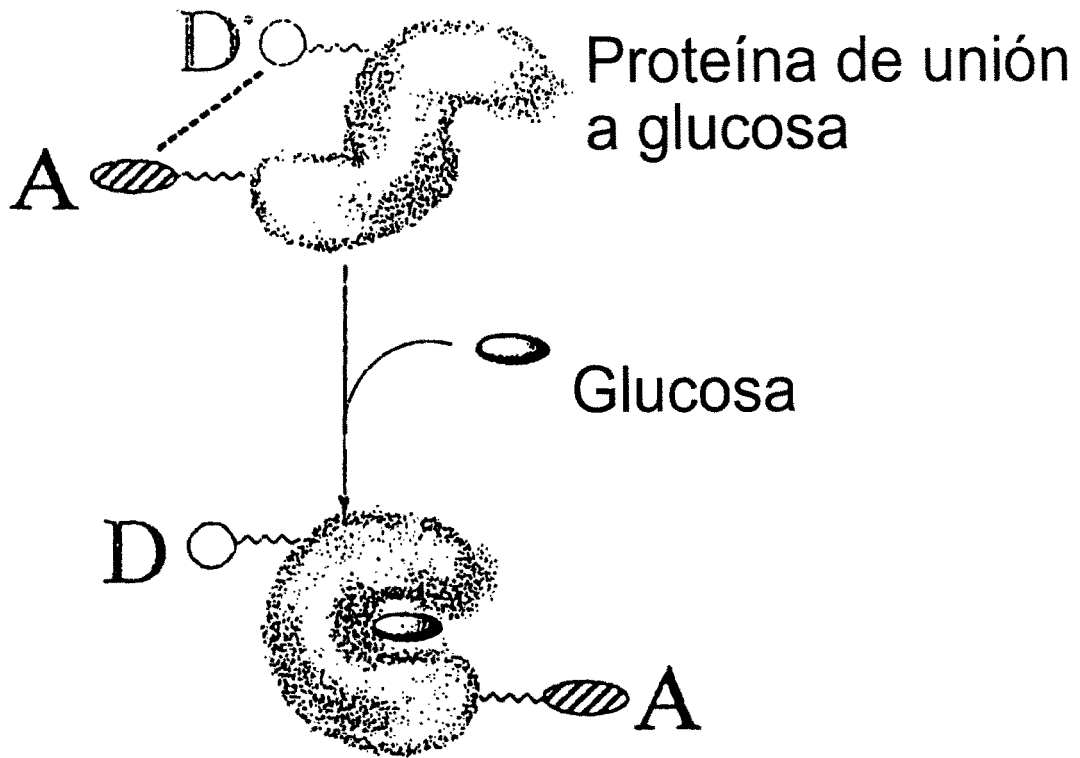


Figura 3

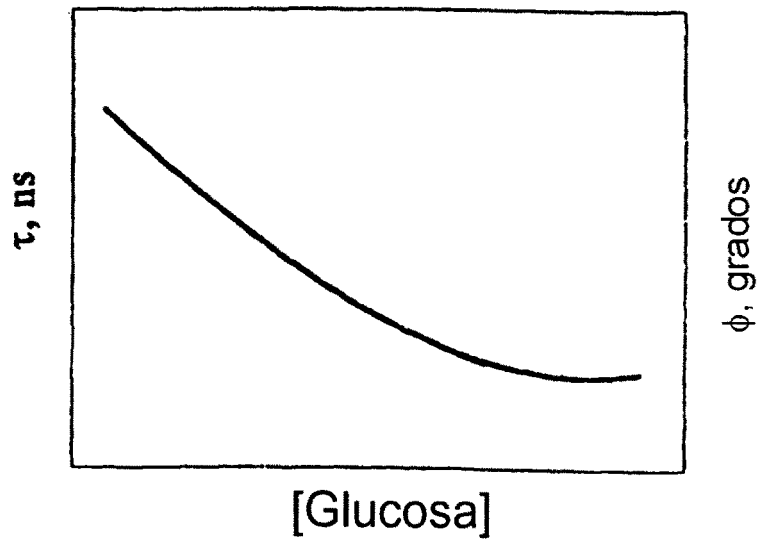
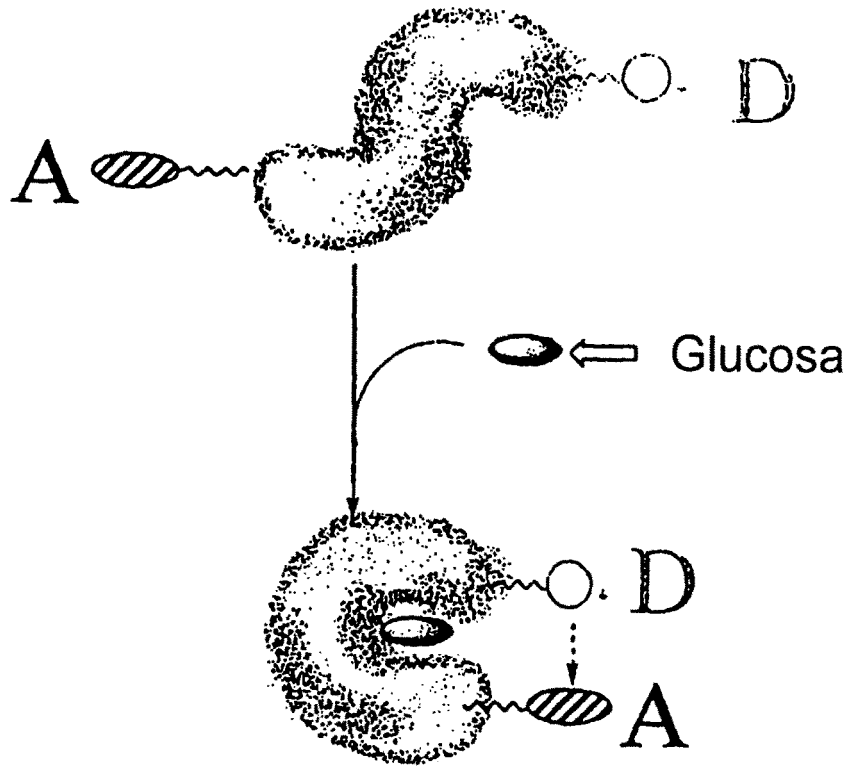


Figura 4

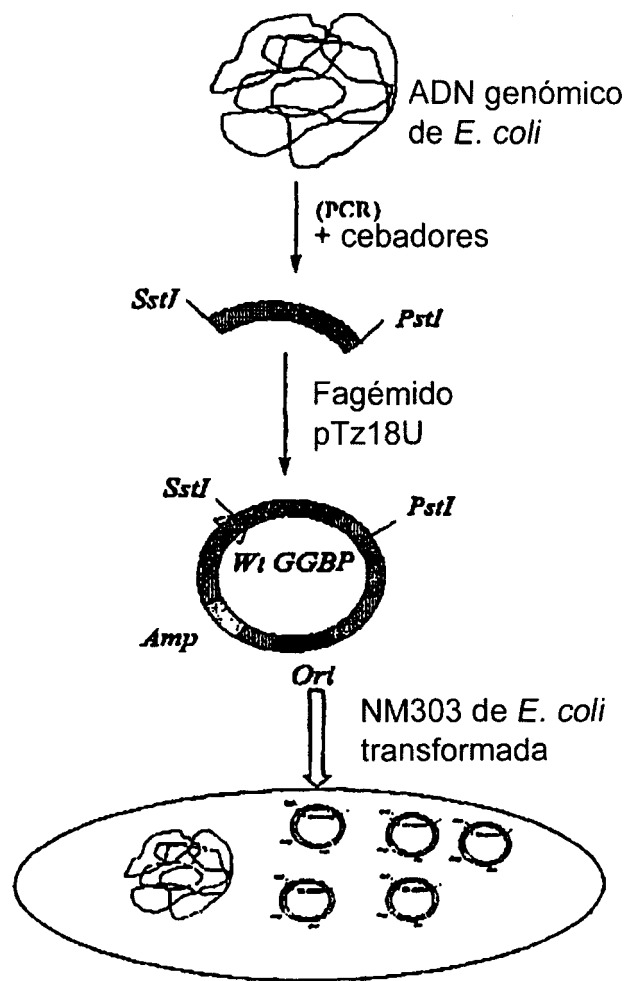


Figura 5

Pireno en 182 y 26

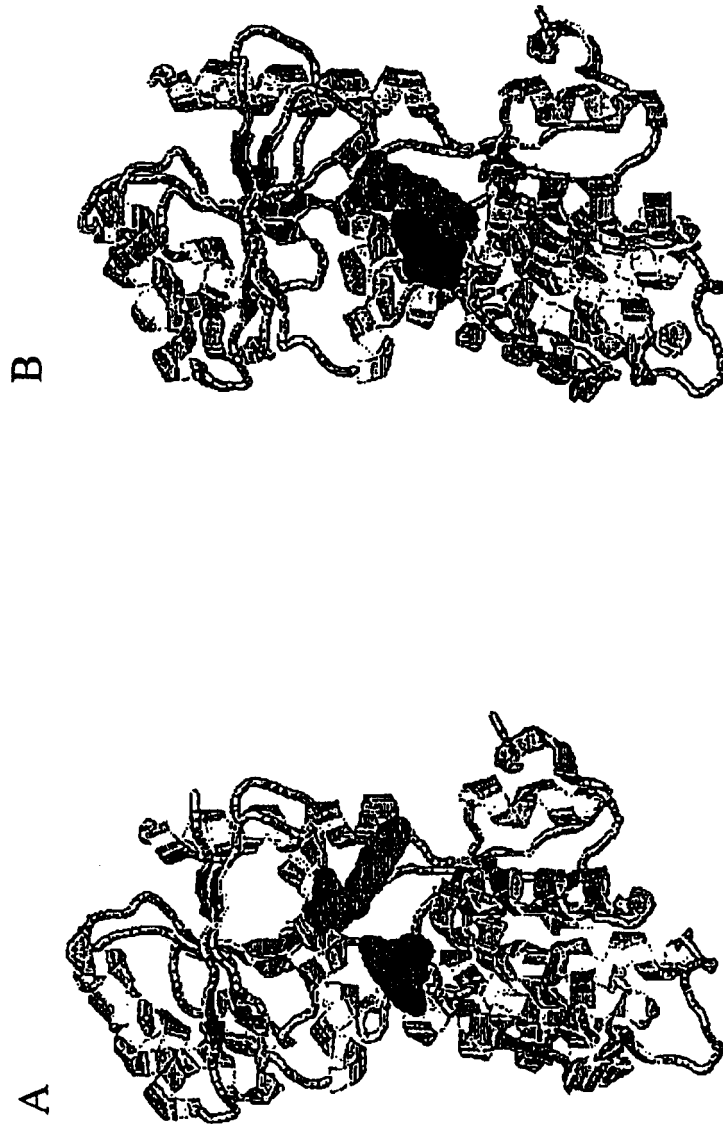


Figura 6

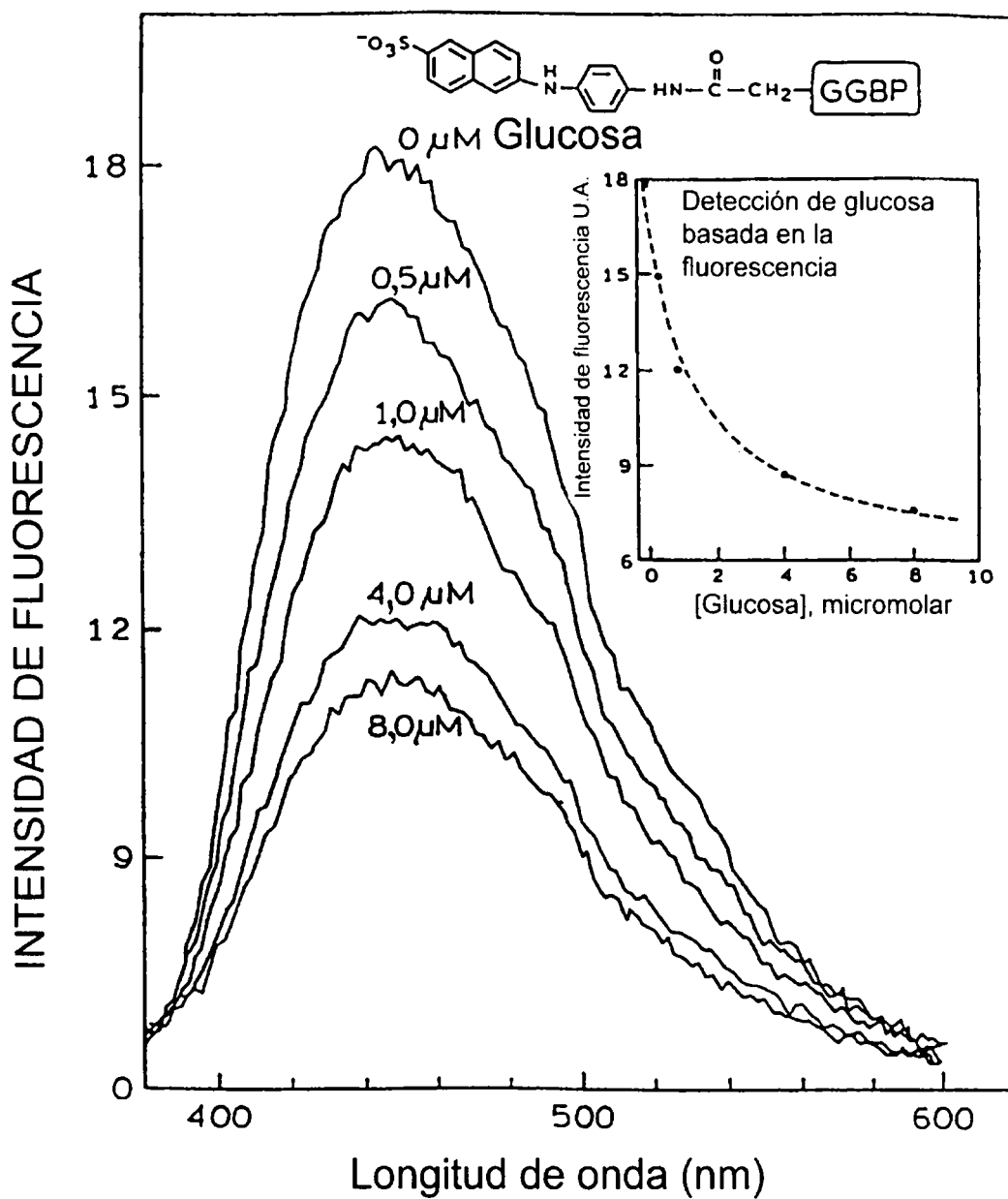


Figura 7

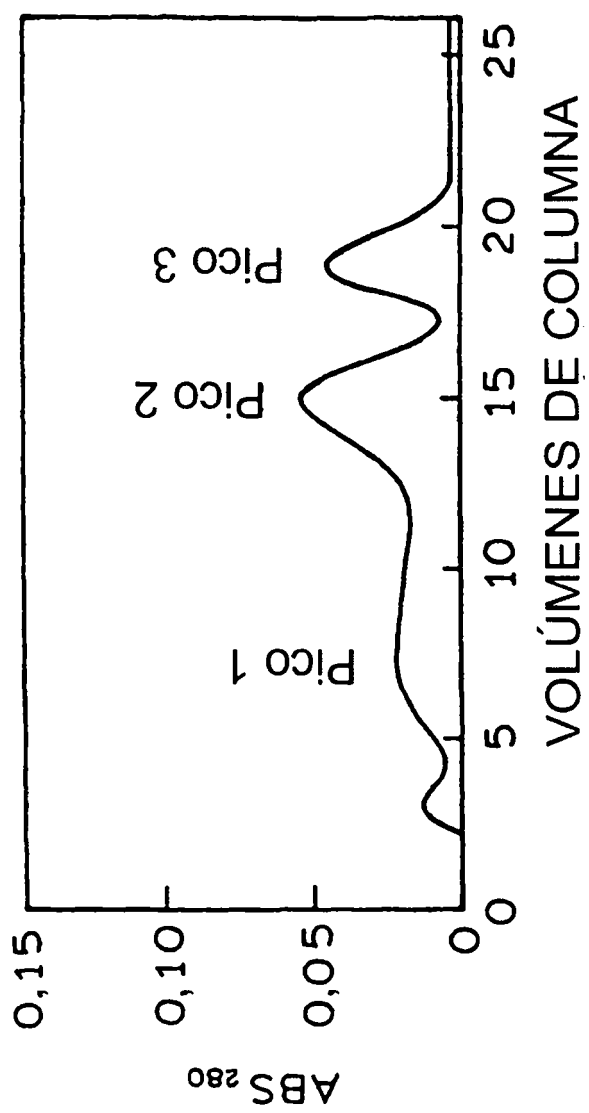


Figura 8

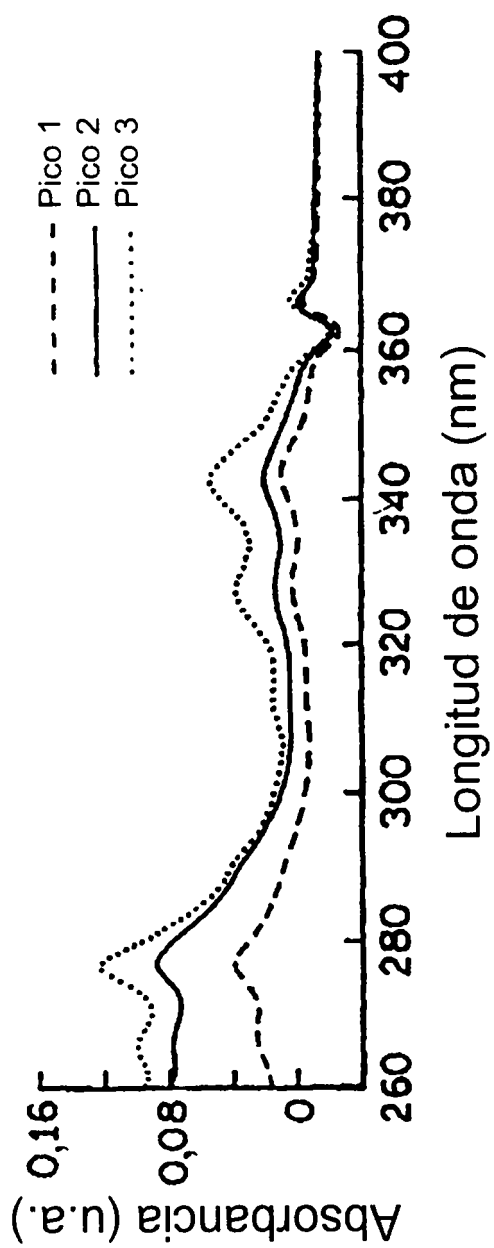


Figura 9

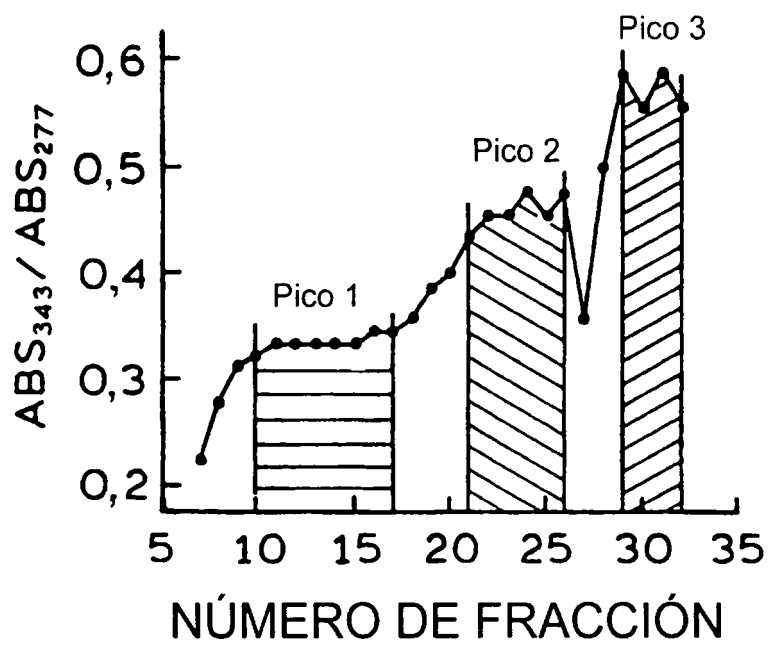


Figura 10

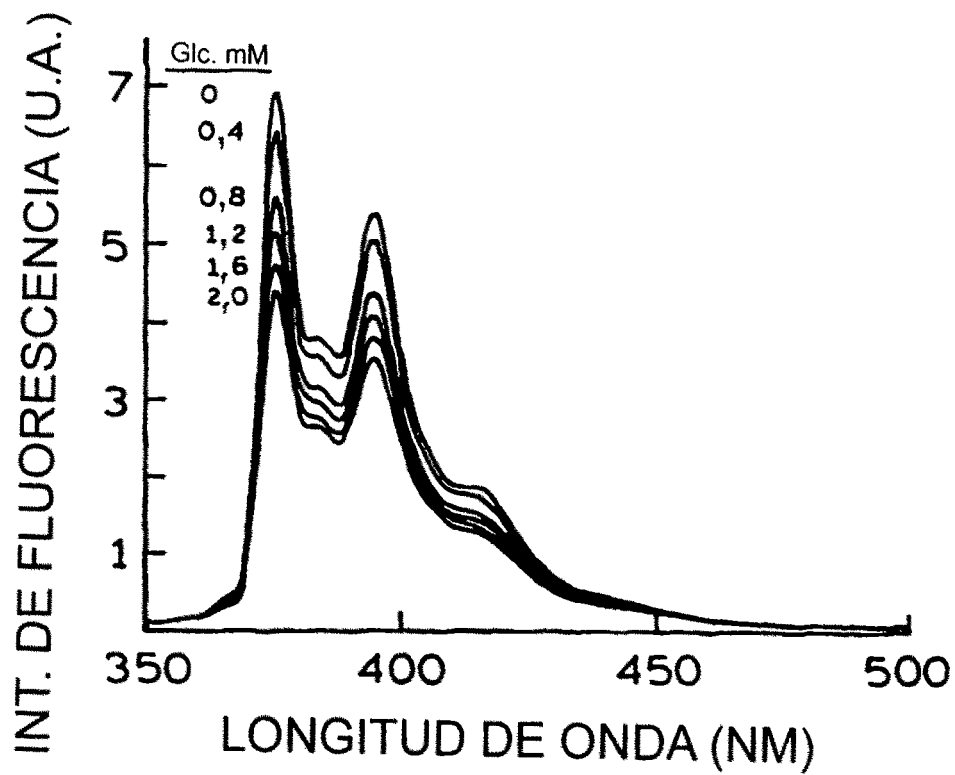


Figura 11

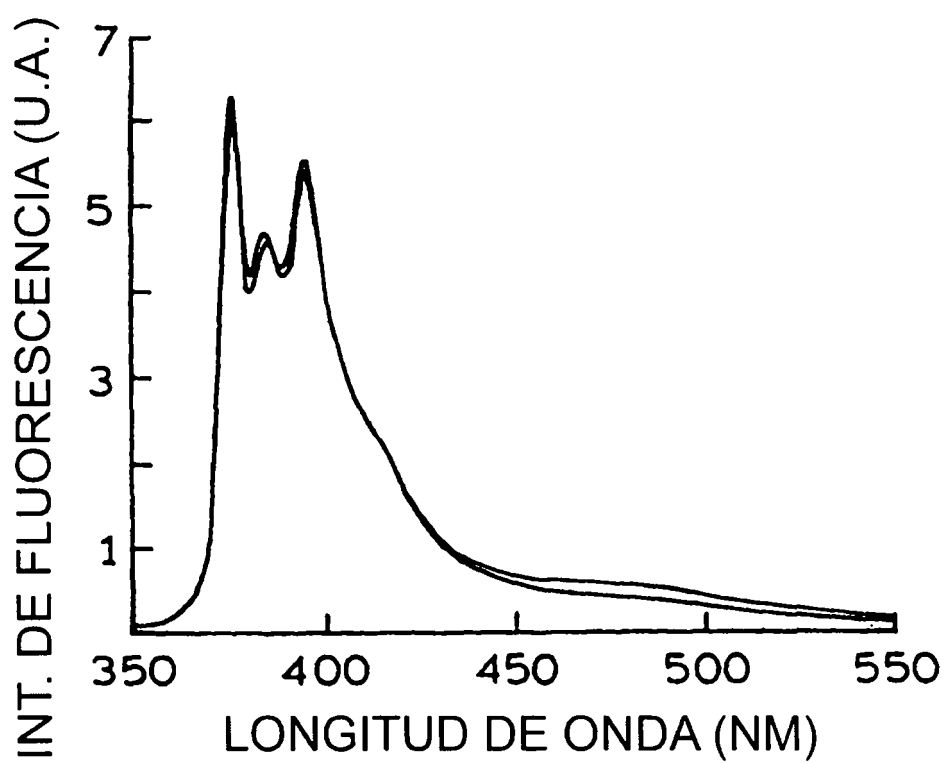


Figura 12

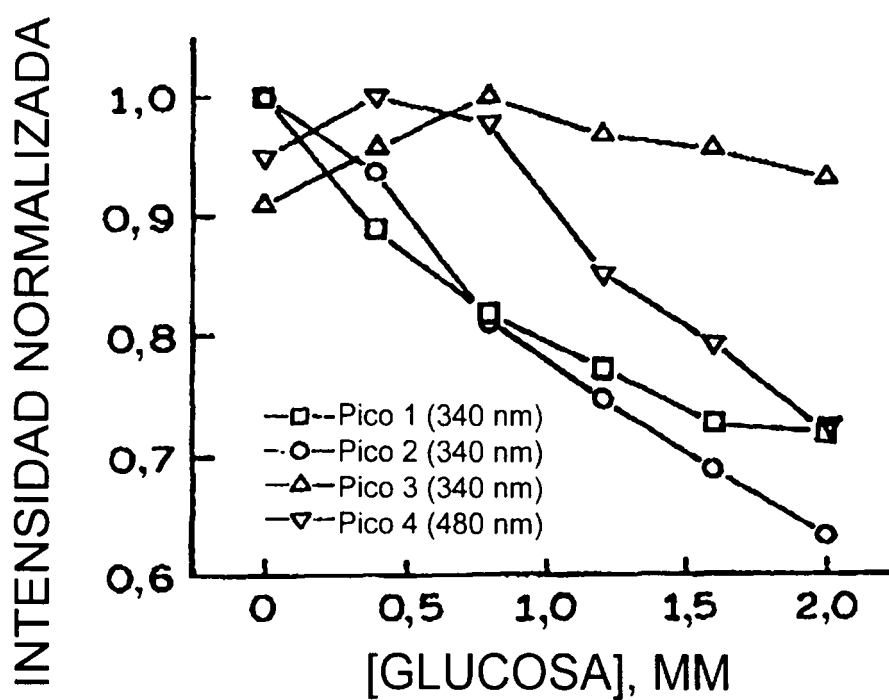


Figura 13

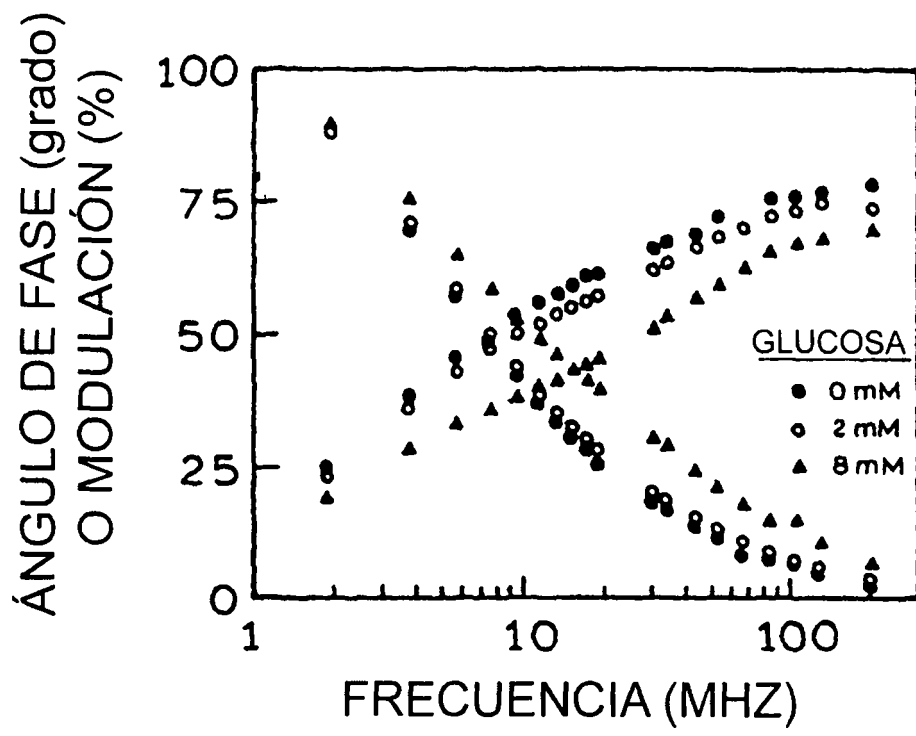


Figura 14

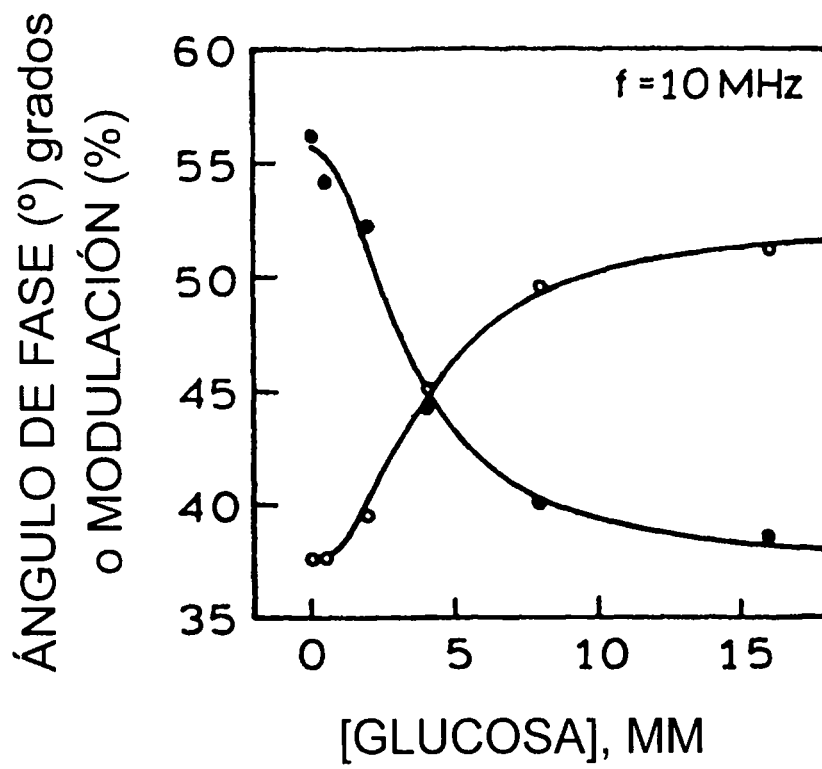


Figura 15

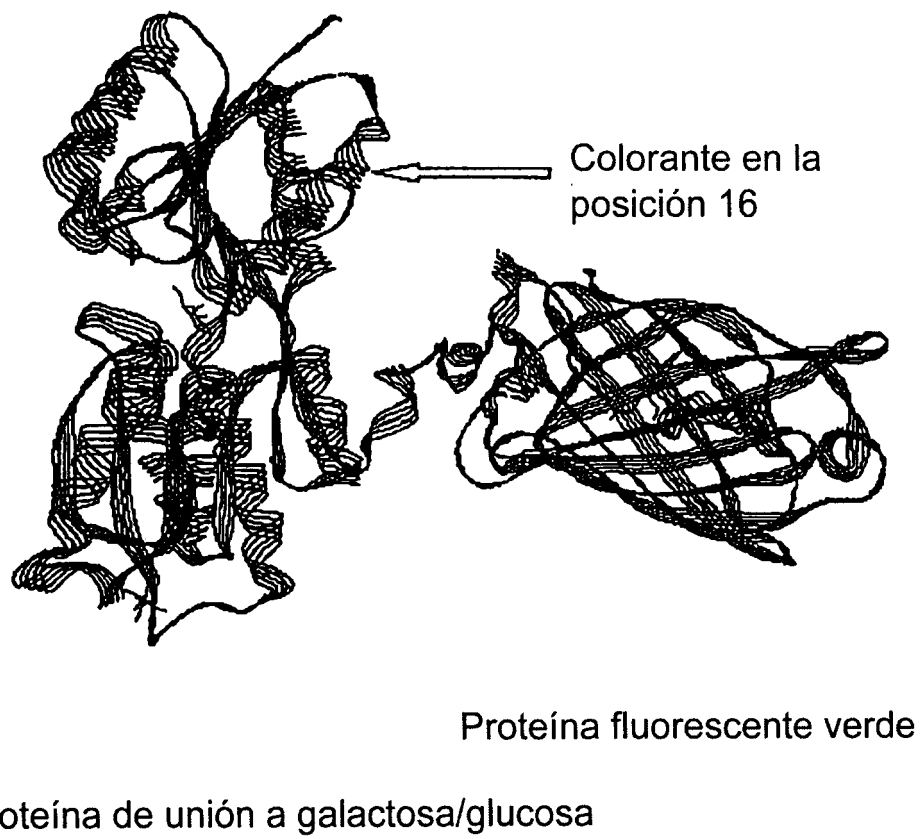


Figura 16

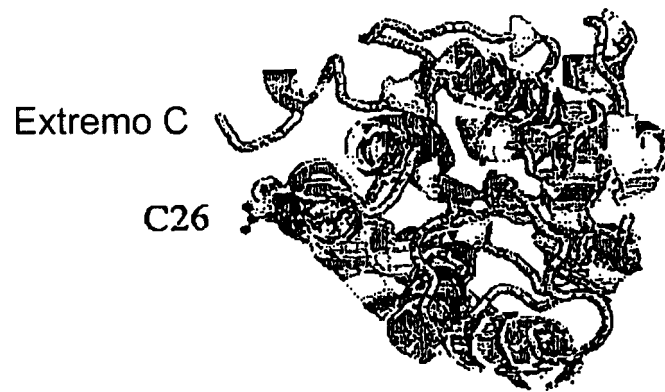


Figura 17

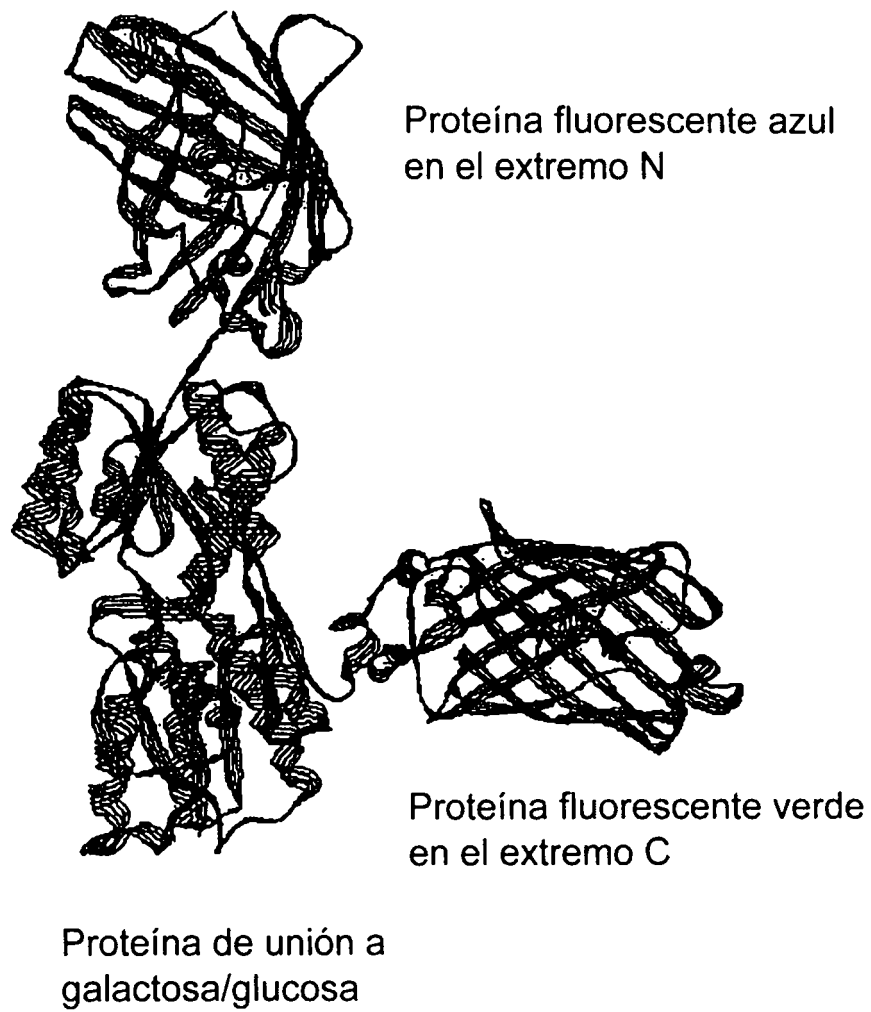


Figura 18

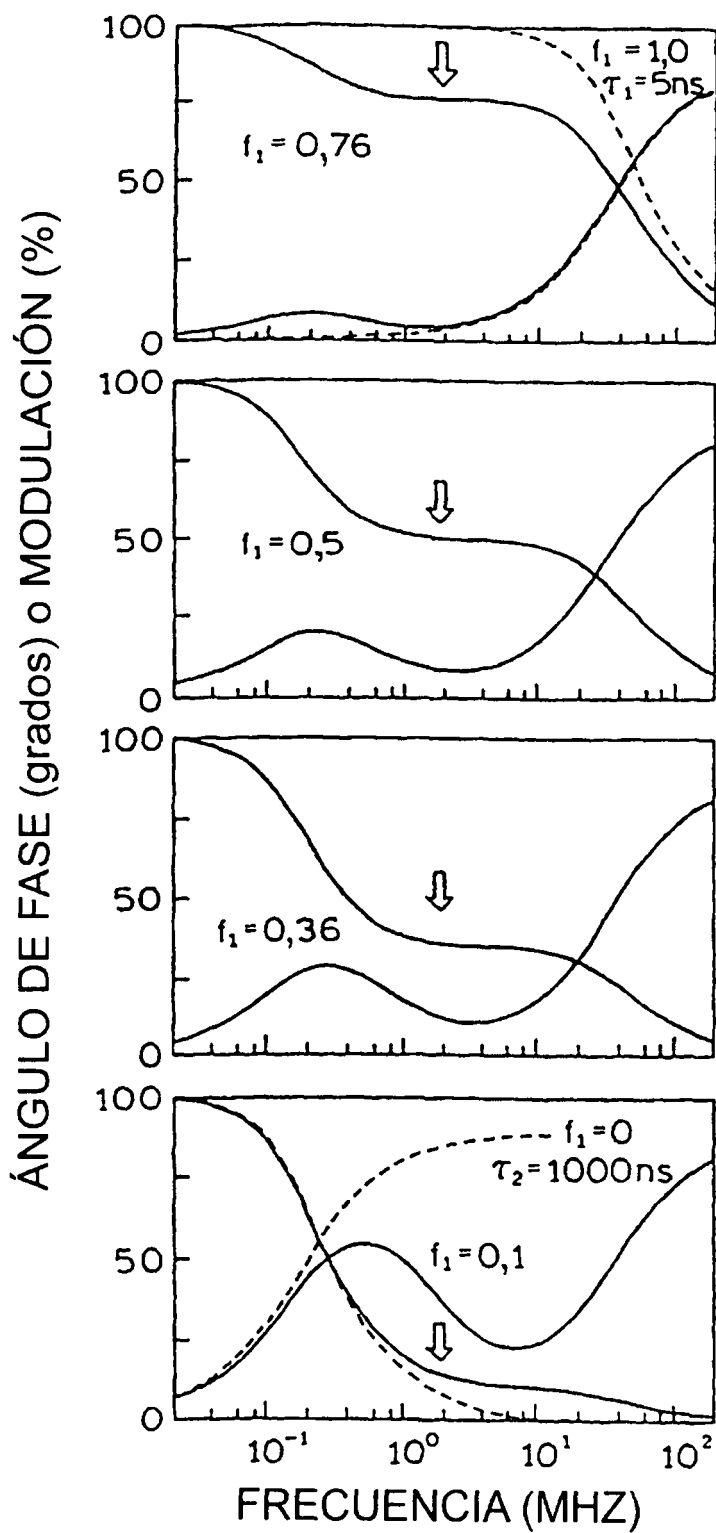


Figura 19

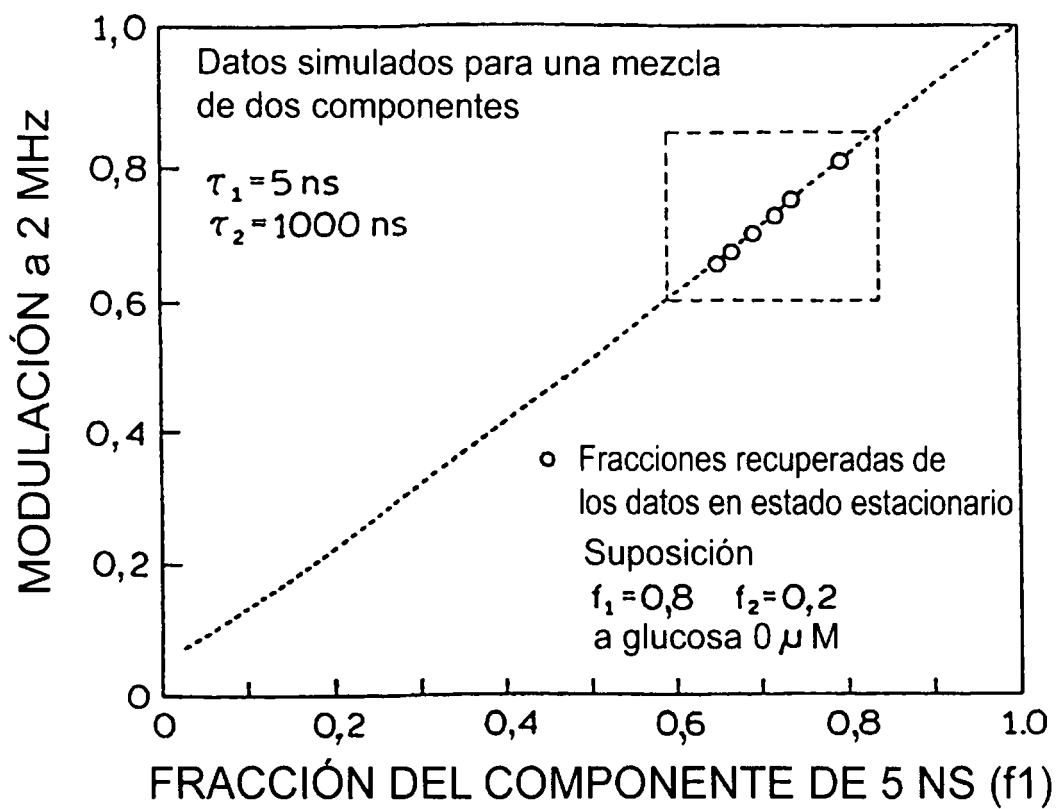


Figura 20

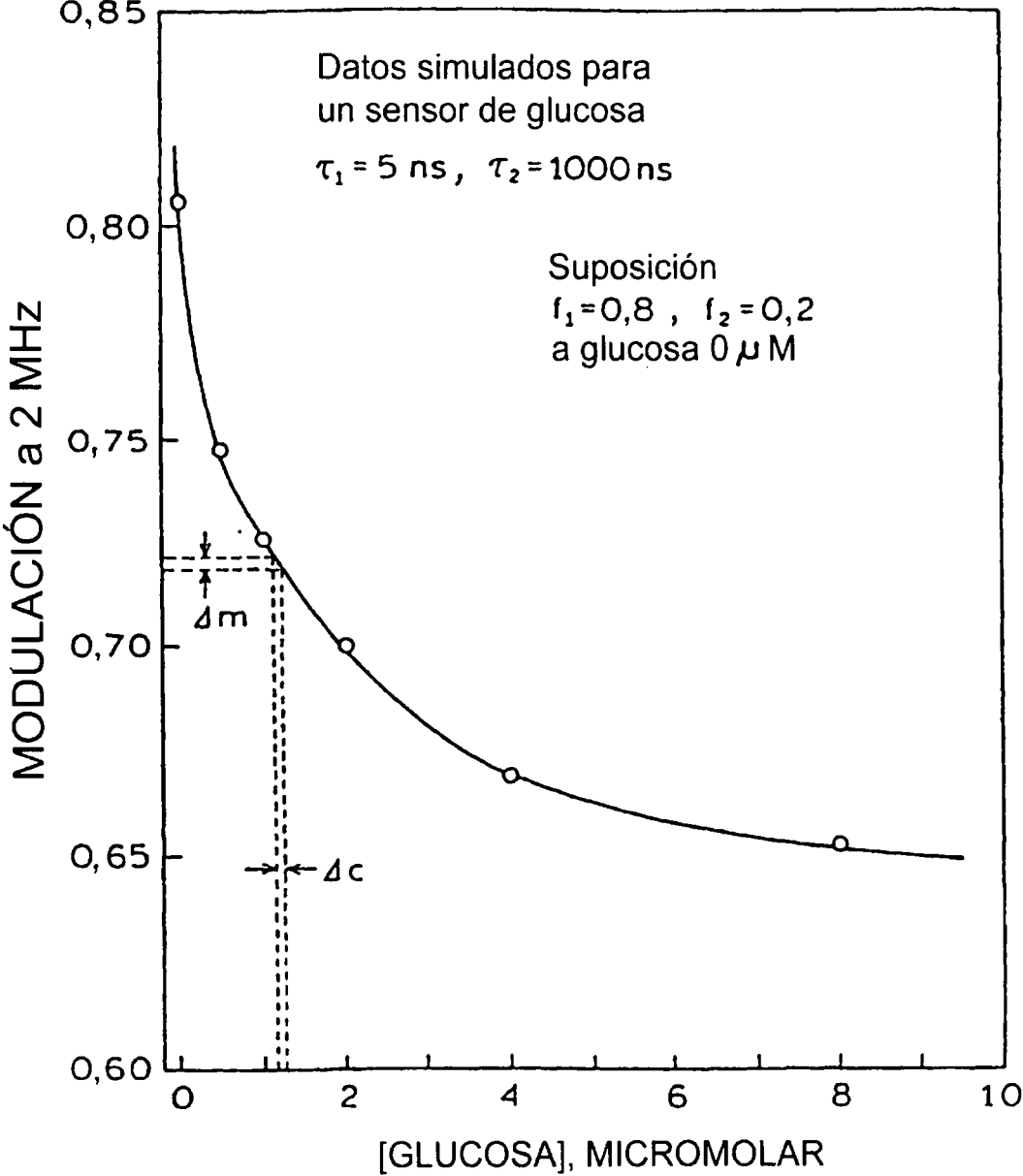


Figura 21

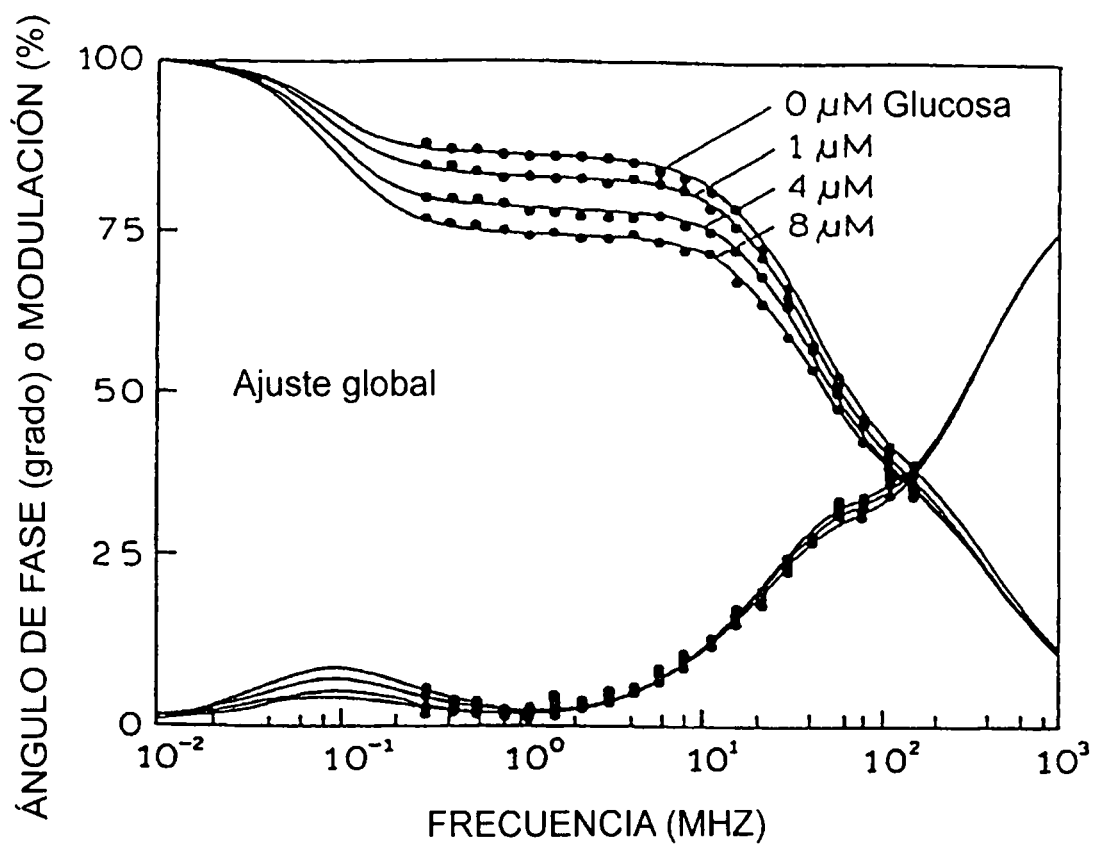


Figura 22

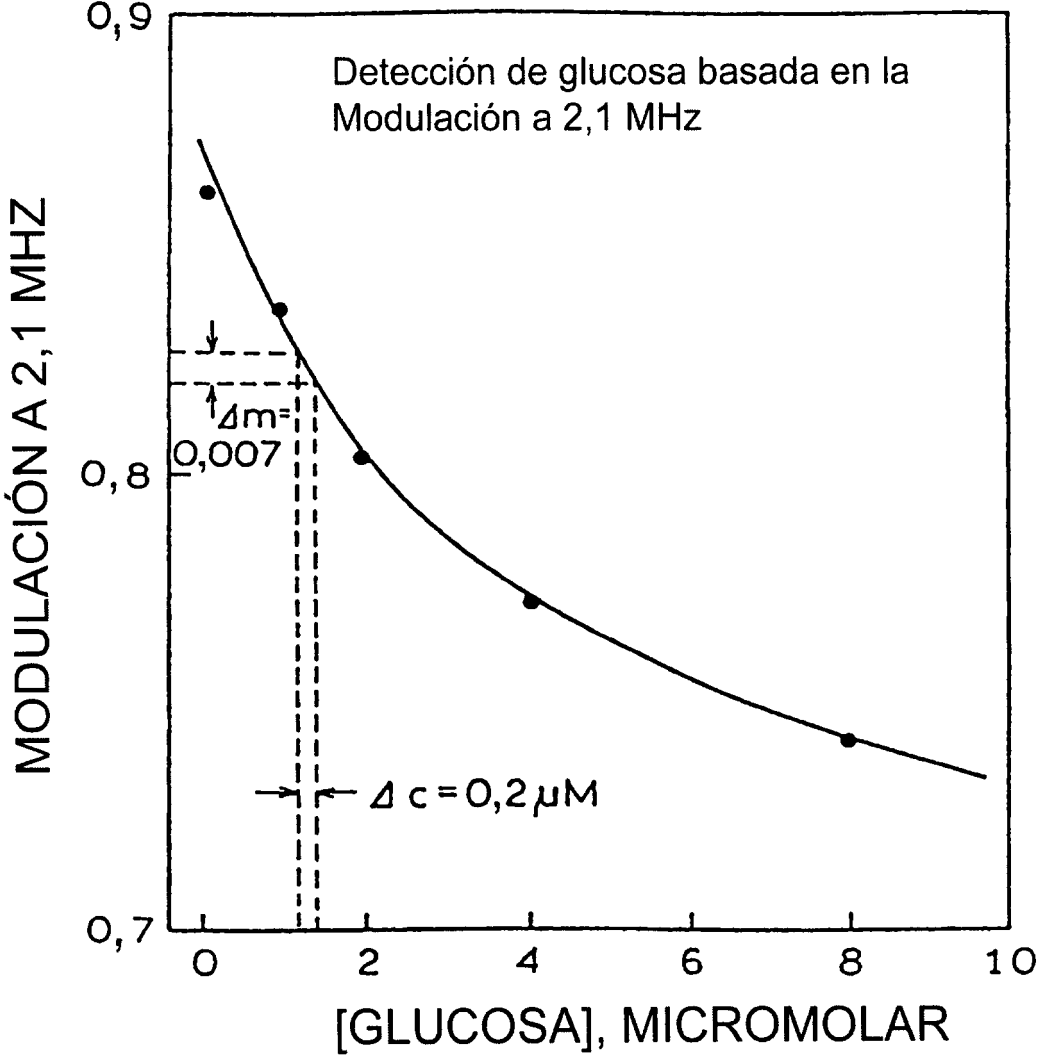


Figura 23