



(12) PATENT

(19) NO

(11) 336159

(13) B1

NORGE

(51) Int Cl.

C07K 14/245 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 21/78 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/566 (2006.01)

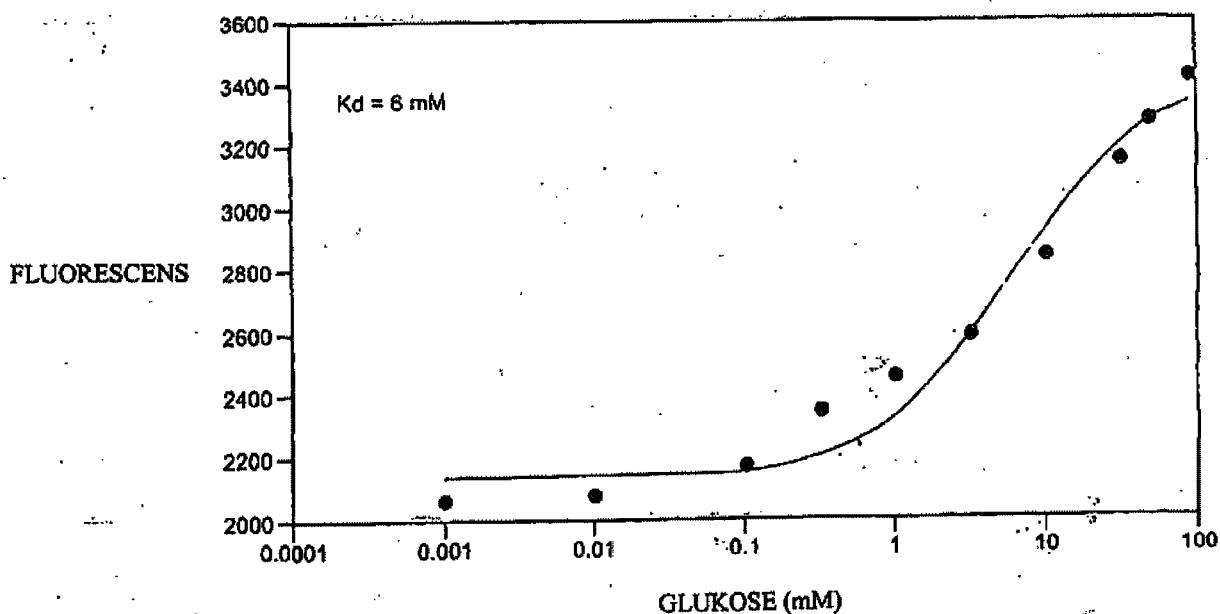
G01N 33/58 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20043259	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2003.01.06 PCT/US2003/00203
(22)	Inng.dag	2004.08.03	(85)	Videreføringsdag	2004.08.03
(24)	Løpedag	2003.01.06	(30)	Prioritet	2002.01.04, US, 040077
(41)	Alm.tilgj	2004.09.16			
(45)	Meddelt	2015.05.26			
(73)	Innehaver	Becton Dickinson and Co, One Becton Drive, US-NJ07417-1880 FRANKLIN LAKES, USA Bruce J Pitner, 2903 Quincemoor Road, US-NC27712 DURHAM, USA Terry J Amiss, 211 Honeysuckle Lane, US-NC27513 CARY, USA Colleen M Nycz, 5205 Six Pence Court, US-NC27613 RALEIGH, USA Douglas B Sherman, 7 Lansgate Court, US-NC27713 DURHAM, USA David J Wright, 1013 Mt. Carmel Church Road, US-NC27514 CHAPEL HILL, USA			
(72)	Oppfinner				
(74)	Fullmektig	Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, Norge			

(54)	Benevnelse	Glukosebiosensor, fremgangsmåte, anvendelse samt blanding omfattende mutert glukose/galaktosebindingsprotein
(56)	Anførte publikasjoner	US 6277627 B1 SALINS et al; A novel reagentless sensing system for measuring glucose based on the galactose/glucose-binding protein; Anal. Biochem, vol. 294, nr. 1, 2001, s. 19-26, ISSN 0003-2697
(57)	Sammendrag	

Oppfinnelsen ligger på området blandinger av muterte bindingsproteiner inneholdende rapportørgrupper, analytt-biosensorinnretninger som er avledet derfra, og deres anvendelse som analytiske biosensorer både in vitro og in vivo. Bindingsproteinene er kovalent bundet til et fluorescensfargestoff slik at konsentrasjonen av en analytt (for eksempel glukose) i en gitt prøve er proporsjonal med fluorescenssignalet på en skala.



Glukosebiosensor, fremgangsmåte, anvendelse samt blanding omfattende mutert glukose/galaktosebindingsprotein

OPPFINNELSENS BAKGRUNN

5

1. OPPFINNELSENS OMRÅDE

Oppfinnelsen ligger på området bioteknologi. Spesielt er oppfinnelsen rettet mot blandinger inneholdende spesielle muterte glukose/galaktosebindingsproteiner
 10 inneholdende rapportørgrupper, analytt-biosensorinnretninger som er avledet derfra, og deres anvendelse som analytiske biosensorer.

2. BESKRIVELSE AV RELEVANT TEKNIKK

15 Overvåking av glukosekonsentrasjoner for å lette adekvat metabolisk kontroll ved diabetes er et ønskelig mål og vil forbedre livet for mange individer. I dag benytter de fleste diabetikere "fingerstikk"-metoden for å overvåke blodglukosenivået og pasientfordrageligheten er problematisk på grunn av den smerte som forårsakes av hyppig (flere ganger pr. dag) stikk. Som en konsekvens har det vært gjort forsøk på å
 20 utvikle ikke-invasive eller minimalt invasive in vivo- og mer effektive in vitro-metoder for hyppig og/eller kontinuerlig overvåking av blodglukose eller andre glukoseholdige, biologiske fluider.

Noen av de mest lovende av disse metoder involverer bruken av en biosensor.
 25 Biosensorer er innretninger som er i stand til å gi spesifikke, kvantitative eller semikvantitative, analytiske informasjonen ved bruk av et biologisk gjenkjenningselement som er kombinert med et transduserende (detekterende) element.

Det biologiske gjenkjenningselement i en biosensor bestemmer selektiviteten slik at kun
 30 forbindelsen som skal måles, fører til et signal. Valget kan være basert på biokjemisk gjenkjenning av liganden der den kjemiske struktur av liganden (for eksempel glukose) er uendret eller biokatalyse der elementet katalyserer en biokjemisk reaksjon av analytten.

35 Transduseren translaterer gjenkjenning til det biologiske gjenkjenningselement til et semi-kvantitativt eller kvantitativt signal. Mulige transdusertechnologier er optiske, elektrokjemiske, akustisk/mekaniske eller kolorimetriske. De optiske egenskaper som

er eksponert, inkluderer absorbans, fluorescense/fosforescens, bio/kjemiluminescens, reflektans, lysspredning og refraktiv indeks. Konvensjonelle rapportørgrupper som fluorescente forbindelser, kan benyttes, eller alternativt er det muligheter for direkte optisk detektering uten behov for en merkelapp.

5

Biosensorer som er spesifikt designert for glukosedetektering som benytter biologiske elementer for signaltransduksjon, benytter typisk elektrokjemisk eller kolorimetrisk detektering av glukoseoksidaseaktiviteten. Denne metode er assosiert med vanskelighet som inkluderer innvirkningen av oksygennivåene, inhibitorer i blodet og problemer med elektrodene. I tillegg resulterer detektering i forbruk av analytt som kan forårsake vanskeligheter når man måler lave glukosekonsentrasjoner.

Et sterkt økende område av biosensorutvikling er bruken av fluorescent merkede, periplasmiske bindingsproteiner (PBP'er). Som rapportert av Cass (*Anal. Chem.* 1994, 66, 3847) ble et merket maltosebindingsprotein (MBP) effektivt påvist som en brukbar maltosesensor. I dette arbeidet ble MBP, som ikke har noen native cysteinrester, mutert for å gi et protein med en enkelt cysteinrest i posisjon 337 (S337C). Denne mutasjonsposisjon ligger innenfor bindingskløften der maltosebinding inntreffer og erfarer derfor en stor omgivelsesforandring ved maltosebinding. Tallrike fluorofor ble studert, noen enten blokkerte ligandbindinger eller interfererte med den konformasjonelle forandring av proteinet. Av de som var studert, resulterte IANBD i en vesentlig økning av fluorescens (160%) intensiteten ved maltosebinding. Dette resultat er konsistent med lokasjonen og av fluoroforforandringen fra en hydrofil eller oppløsningsmiddeleksponert omgivelse til en mer hydrofob omgivelse enn det som teoretisk skulle kunne forutsies fra lukking av hengslet ved maltosebinding. Imidlertid bandt dette mutante protein og den assosierte rapportørgruppen ikke diagnostisk viktige sukker i pattedyr-kroppsfluider. Cass beskrev også (*Analytical Chemistry* 1998, 70(23), 5111-5113) assosiasjonen av dette protein på TiO_2 overflater, imidlertid led det overflatebundne protein fra redusert aktivitet med tiden og krevde konstant hydratering.

30

Hellinga, et al., (US 6.277.627) rapporterte konstruksjonen av en glukosebiosensor ved innføring av en fluorescent transduser i et Galaktose/Glukose Bindingsprotein (GGBP) som er mutert til å inneholde en cysteinrest og derved trekke fordel av de store konformasjonsforandringer som inntreffer ved glukosebindingen. Hellinga et al (US 6.277.627) beskriver at transmisjonen av konformasjon eller forandringer i muterte GGBP'er kan eksploateres til konstruktintegrerte signaltransduksjonsfunksjoner som konverterer et glukosebindingsevenement til en forandring i fluorescens via en

35

allosterisk koblingsmekanisme. De fluorescente transduksjonsfunksjoner er rapportert å interferere minimalt med de iboende bindingsegenskaper for sukkerbindingslommen i GGBP.

- 5 For nøyaktig å bestemme glukosekonsentrasjonen i biologiske oppløsninger som blod, interstitialfluider, okularoppløsninger eller perspirasjon, osv., kan det være ønskelig å justere bindingskonstanten for følermolekyler i biosensor til å passe til det fysiologiske og/eller patologiske arbeidsområdet for den biologiske oppløsning av interesse. Uten egnet bindingskonstant kan et signal være utenfor området for en spesiell fysiologisk og/eller patologisk konsentrasjon. I tillegg kan biosensorer være konfigurert ved bruk
10 av mer enn et protein, hver med en annen bindingskonstant, for å gi nøyaktige målinger over et vidt spektrum av glukosekonsentrasjonen slik det er beskrevet av Lakowicz (US 6.197.534).
- 15 Salins et al. (Anal. Biochem., vol. 294, nr. 1, 2001, s. 19 – 26, ISSN 0003-2697) omhandler muterte glukose/galaktose bindingsproteiner som kan fungere som en glukosebiosensor.

På tross av brukbarheten til muterte GGBP'er er kun få av disse proteiner konstruert og
20 undersøkt, verken med eller uten rapportørgrupper. Spesifikke mutasjoner av seter og/eller festing av visse rapportørgrupper kan bevirke modifisering av en bindingskonstant på uforutsigelig måte. I tillegg kan en biosensor som inneholder rapportørgrupper ha en ønskelig bindingskonstant, men ikke resultere i noen lett detekterbar signalforandring ved analyttbinding. Noen av de overstyrende faktorer som
25 bestemmer sensitiviteten for en spesiell rapportørprobe som er festet til et spesielt protein for detektering av en spesifikk analytt er arten av de spesifikke interaksjoner mellom den valgte probe og proteinets aminosyrerester. Det er ikke i dag mulig å forutsi disse interaksjoner innen proteiner ved bruk av eksisterende beregningsmetoder, heller ikke er det mulig å benytte noen fornuftig designmetologi til å optimalisere valget
30 av rapportørprober. Det er i dag ikke mulig å forutsi effekten verken på bindingskonstanten eller på selektiviteten, basert på posisjonen til en rapportørgruppe, eller proteinets aminosyresubstitusjon (eller vice-versa).

For å utvikle reagensfrie, selvforsynte og/eller implanterbare og/eller ombrukbare
35 biosensorer ved bruk av proteiner, må transduksjonselementet være i kommunikasjon med en detekteringsinnretning for å tolke signalet til og fra transduksjonselementet. Med "tolke" menes en prosess med sending av lys til og måling av emittert lys fra en

prøve. Typiske metoder inkluderer å plassere proteiner i eller på overflaten av optiske fibre eller plane bølgeføringer ved bruk av immobiliseringsstrategier. Slike immobiliseringsstrategier inkluderer innfangning av protein i semipermeable membraner, organiske polymermatriser eller uorganiske polymermatriser.

- 5 Immobiliseringsstrategien kan til slutt bestemme ytelsen for den arbeidende biosensor. Tidligere teknikk oppsummerer tallrike problemer i forbindelse med immobiliseringen av biologiske molekyler. For eksempel undergår mange proteiner irreversible konformasjonelle forandringer, denaturering og tap av biokjemisk aktivitet. Immobiliserte proteiner kan eksistere i et stort antall mulige orienteringer på enhver
- 10 spesiell overflate med for eksempel noen proteiner orientert slik at deres aktive seter er eksponert mens andre kan være orientert slik at de aktive setene ikke er eksponert og således ikke i stand til å undergå noen selektive bindingsreaksjoner med analytten. Immobiliserte proteiner er også offer for tidsavhengig denaturering, denaturering under immobilisering og utlutning av innfangede proteiner etter immobilisering. Derfor
- 15 oppstår det problemer inkludert en manglende evne til å opprettholde kalibrering av føleinnretningen og signaldriften. Generelt krever bindingsproteiner en orienteringskontroll for å muliggjøre deres bruk og derfor er fysisk absorpsjon og vilkårlig eller massekovalent overflatefesting eller immobiliseringsstrategier som beskrevet i litteraturen, generelt ikke vellykket.

20

- Derfor er det et behov i denne teknikk til å konstruere ytterligere, brukbare, muterte proteiner og muterte GGBP proteiner som genererer detekterbare signalforandringer ved analyttbinding for bruk som biosensorer, og i tillegg er det et behov i teknikkene for å konstruere ytterligere, brukbare, muterte bindingsproteiner - og muterte GGBP'er
- 25 inneholdende rapportørgrupper som genererer detekterbare og reversible signalforandringer ved analytt- eller glukosebinding for bruk som biosensorer.

OPPSUMMERING AV OPPFINNELSEN

- 30 Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer en glukosebiosensor, kjennetegnet ved at den omfatter:
- minst ett mutert glukose/galaktose bindingsprotein som har minst en aminosyre substitusjon som er et cystein i posisjon 149, hvori aminosyre nummereringen referer til E.coli glukose/galaktose bindingsprotein som har 309 aminosyrerester, og minst en
- 35 rapportørgruppe festet dertil, slik at rapportørgruppen gir en detekterbar og reversibel signalforandring når det muterte bindingsprotein er eksponert til varierende

glukosekonsentrasjoner, idet den detekterbare og reversible signalforandring er relatert til nevnte varierende konsentrasjoner.

Videre tilveiebringer oppfinnelsen en fremgangsmåte for in vitro glukosedetektering, kjennetegnet ved at den omfatter:

- a) å tilveiebringe minst ett mutert glukose/galaktosebindingsprotein og minst en rapportørgruppe festet dertil som definert ved glukose biosensor ifølge ethvert av kravene 1 til 14;
- b) eksponering av nevnte muterte glukose/galaktosebindingsprotein til varierende glukosekonsentrasjoner; og
- c) detektering av en detekterbar og reversibel signalforandring fra nevnte rapportørgruppe der nevnte detekterbare og reversible signalforandring tilsvarer nevnte varierende glukosekonsentrasjoner.

- Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer i tillegg anvendelse av et mutert glukose/galaktosebindingsprotein og minst en rapportørgruppe koblet dertil som definert over for fremstilling av et diagnostisk middel for in-vivo glukose deteksjon.

Videre tilveiebringer oppfinnelsen en blanding, kjennetegnet ved at den omfatter:

- et mutert glukose/galaktosebindingsprotein med minst en aminosyresubstitusjon bestående av et cystein i posisjon 149, hvori aminosyre nummereringen referer til E.coli glukose/galaktose bindingsprotein som har 309 aminosyrerester.

- Det ovennevnte muterte glukose/gallaktosebindingsprotein anvendt i biosensoren, det diagnostiske midlet, fremgangsmåten eller blandingen kan ha ytterligere substitusjoner valgt fra cystein i posisjon 1, et serin i posisjon 1, et cystein i posisjon 11, et cystein i posisjon 14, et cyistein i posisjon 19, et cystein i posisjon 43, et cystein i posisjon 74, et cystein i posisjon 107, et cystein i posisjon 110, et cystein i posisjon 112, et cystein i posisjon 113, et cystein i posisjon 137, et cystein i posisjon 213, et cystein i posisjon 216, et cystein i posisjon 238, et cystein i posisjon 287, et cystein i posisjon 292, et cystein i posisjon 152, et cystein i posisjon 182, et cystein i posisjon 236 og et cystein i posisjon 296.

- Videre tilveiebringes det en biosensor, et diagnostisk middel, fremgangsmåte eller blanding omfattende et mutert glukose/galaktosebindingsprotein med minst to aminosyresubstitusjoner valgt fra gruppen bestående av et cystein i posisjon 112 og et serin i posisjon 238, et cystein i posisjon 149 og et serin i posisjon 238, et cystein i

posisjon 152 og et cystein i posisjon 182, et cystein i posisjon 152 og et serin i posisjon 213, et cystein i posisjon 213 og et cystein i posisjon 238, et cystein i posisjon 149 og et arginin i posisjon 213, et cystein i posisjon 149 og et serin i posisjon 213 og et serin i posisjon 238 og et cystein i posisjon 149 og et arginin i posisjon 213 og et serin i posisjon 238. Ytterligere eksempler på muterte glukose/galaktosebindingsproteiner er vist nedenfor i Tabell 1. Aminosyrerestnumrene henviser til den publiserte sekvens av *E. coli* med 309 rester som detaljert nedenfor, eller den tilsvarende aminosyrerest i en hvilken som helst i det vesentlige homolog sekvens fra en alternativ kilde (for eksempel glukose/galaktose bindingsproteiner fra *Citrobacter freundii* eller *Salmonella typhimurium*, sekvensaksessnumre P23925 henholdsvis P23905).

KORT BESKRIVELSE AV FIGURENE

Figur 1 viser forandringen i fluorescensrespons for et område av glukosekonsentrasjoner for A213C/L238C NBD amid GGBP H₆ i oppløsning.

Figur 2 viser forandringen i fluorescensrespons for et område av glukosekonsentrasjonen for B149C/A213R NBD amid GGBP H₆ i oppløsning.

Figur 3 illustrerer reversibel signaltransduksjon fra et mutert bindingsprotein etter eksponering til oppløsninger av glukose ved de antydede konsentrasjoner.

DETALJERT BESKRIVELSE AV OPPFINNELSEN

Uttrykket biosensor henviser generelt til en innretning som benytter spesifikke, biokjemiske reaksjoner som medieres av isolerte enzymer, immunosystemer, vev, organeller eller hele celler, for å detektere kjemiske forbindelser, vanligvis ved elektriske, termiske eller optiske signaler. Som benyttet her, henviser en "biosensor" til et protein som er i stand til binding til en analytt som kan benyttes for detektere en analytt eller en forandring i analyttkonsentrasjonen ved detektormidler som beskrevet her.

Uttrykket "bindingsproteiner" henviser til proteiner som interagerer med spesifikke analyter på en måte i stand til å tilveiebringe eller transducere et detekterbart og/eller reversibelt signal som kan differensieres enten fra når analytten ikke er tilstede, analytten er tilstede i varierende konsentrasjoner med tiden, eller på en konsentrasjonsavhengig måte, ved hjelp av de her beskrevne metoder.

Transduksjonsevenementet inkluderer kontinuerlige, programmerte eller episodiske midler inkludert engangs- eller ombruksapplikasjoner. Reverserbar signaltransduksjon kan være øyeblikkelig eller være tidsavhengig og tilveiebringe en korrelasjon i nærværet eller konsentrasjonen av en analytt. Bindingsproteiner som er mutert på en slik måte, for å bevirke transduksjon, er foretrukket.

Uttrykket "galaktose/glukosebindingsprotein" eller "GGBP" slik det her benyttes, henviser til en type protein som finnes naturlig i bakterieperiplasmiske rom. Disse proteiner er naturlig involvert i kjemotaksis og transport av små molekyler (for eksempel sukkere, aminosyrer og små peptider) inni cytoplasmaet. GGBP er et enkeltkjedeprotein bestående av to globulære α/β -domener som er forbundet via tre tråder for å danne et hengsel. Bindingssettet er lokalisert i kløften mellom de to domener. Når glukose trer inn i bindingssettet, undergår GGBP en konformasjonell forandring, sentrert ved hengslen, som bringer de to domener sammen og fanger glukose i bindingssettet. Krystallografiske røntgenstrukturer er bestemt for den lukkede form av GGBP fra *E. coli* (N.K. Vyas, M. N. Vyas, F.A. Quioco Science 1988, 242, 1290-1295) og *S. Typhimurium* (S.L. Mowbray, R.D. Smith, L.B. Cole Receptor 1990, I, 41-54) og er tilgjengelige fra Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/>) som 2GBP og 3GBP. Villtype *E. coli* GGBP DNA og aminosyresekvensen kan finnes på www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/ aksessnummer D90885 (genomisk klon) og aksessnummer 230520 (aminosyresekvens). Den foretrukne GGBP er fra *E. coli*.

"Mutert bindingsprotein" (for eksempel "mutert GGBP") henviser, slik det her benyttes, til bindingsproteiner fra bakterier inneholdende en eller flere aminosyrer som er kommet i stedet for, deletert fra eller addert til en eller flere aminosyrer som er tilstede i naturlig forekommende protein. Fortrinnsvis involverer slike substitusjoner, delesjoner eller insersjoner færre enn 5 aminosyrerester og helst en eller to rester. Eksempler på mutasjoner av bindingsproteiner inkluderer addisjon eller substitusjon av cysteingrupper, ikke-naturlig forekommende aminosyrer (Turcatti, et al. J Bio, Chem: 1996 271, 33, 19991-19998) og erstatning av i det vesentlige ikke-reaktive aminosyrer med reaktive aminosyrer for å gi den kovalente festing av elektrokjemiske eller fotoresponsive rapportørgrupper. Med "reaktiv" aminosyre menes en aminosyre som kan modifiseres med et merkende middel analogt med merkingen av cystein med et tiolreaktivt fargestoff. Ikke-reaktive aminosyrer inkluderer alanin, leucin, fenylalanin og andre som har sidekjeder som ikke lett kan modifiseres når de først er innarbeidet i et protein (se Greg T. Hermanson, Bioconjugate Techniques, Academic Press, 1996, San Diego, s. 4-16 for klassifisering av aminosyre-sidekjedereaktivitet).

I tillegg til den minst ene aminosyresubstitusjonen som er et cystein i posisjon 149 inkluderer mutasjonseksempler på GGBP proteinet et cystein i stedet for et lysin i posisjon 11(K11C); et cystein i stedet for aspartinsyre i posisjon 14 (D14C); et cystein i
5 stedet for valin i posisjon 19 (V19C); et cystein i stedet for asparagin i posisjon 43 (N43C); et cystein i stedet for glycine i posisjon 74 (G74C); et cystein i stedet for tyrosin i posisjon 107 (Y107C); et cystein i stedet for treonin i posisjon 110 (T110C); et cystein i stedet for serin i posisjon 112 (S112C); en dobbelt mutant inkludert en cystein i stedet for serin i posisjon 112 og serin i stedet for leucin i posisjon 238 (S112C/L238S); et
10 cystein i stedet for lysin i posisjon 113 (K113C); et cystein i stedet for lysin i posisjon 137 (K137C); et cystein i stedet for glutaminsyre i posisjon 149 og et serin i stedet for leucin i posisjon 238 (E149C/L238S); en dobbeltmutant omfattende et cystein i stedet for histidin i posisjon 152 og et cystein i stedet for metionin i posisjon 182 (H152C/M182C); en dobbeltmutant omfattende et serin i stedet for alanin i posisjon 213
15 og et cystein i stedet for histidin i posisjon 152 (H152C/A213S); et cystein i stedet for metionin i posisjon 182 (M182C); et cystein i stedet for alanin i posisjon 213 (A213C); en dobbeltmutant omfattende et cystein i stedet for alanin i posisjon 213 og et cystein i stedet for leucin i posisjon 238 (A213C/L238C); et cystein i stedet for metionin i posisjon 216 (M216C); et cystein i stedet for aspartinsyre i posisjon 236 (D236C); et
20 cystein i stedet for leucin i posisjon 238 (L238C); et cystein i stedet for aspartinsyre i posisjon 287 (D287C); et cystein i stedet for arginin i posisjon 292 (R292C); et cystein i stedet for valin i posisjon 296 (V296C); en trippelmutant omfattende et cystein i stedet for glutaminsyre i posisjon 149, en alanin i stedet for serin i posisjon 213 og et serin i stedet for leucin i posisjon 238 (E149C/A213S/L238S); og en trippelmutant omfattende
25 et cystein i stedet for glutaminsyre i posisjon 149, et arginin i stedet for en alanin i posisjon 213 og et serin i stedet for leucin i posisjon 238 (E149C/A213R/L238S). Kvadrupel (og høyere) mutanter er også inkludert, for eksempel en mutant der serin erstatter alanin i posisjon 1, cystein erstatter glutaminsyre i posisjon 149, arginin erstatter alanin i posisjon 213 og serin erstatter leucin i posisjon 238 (A1S,
30 E149C,A213R,L238S); en mutant der serin erstatter alanin i posisjon 1, cystein erstatter glutaminsyre i posisjon 149, serin erstatter alanin i posisjon 213 og serin erstatter leucin i posisjon 238 (A1S, E149C, A213S, L238S); og en mutant der cystein erstatter glutaminsyre i posisjon 149, cystein erstatter metionin i posisjon 182, cystein erstatter alanin i posisjon 213 og serin erstatter leucin i posisjon 238 (E149C, M182C, A213C,
35 L238S).

Mutasjonen kan tjene ett eller flere forskjellige formål. For eksempel kan et naturlig forekommende protein være mutert for å forandre langtidsstabiliteten for proteinet; for å konjugere, binde, koble eller på annen måte å assosiere protein til en spesiell innkapslingsmatriks eller polymer; for å tilveiebringe bindings seter for detekterbare rapportørgrupper; for å justere bindingskonstanten med henblikk på en spesiell analytt; eller en hvilken som helst kombinasjon derav.

Ifølge oppfinnelsen virker analytt og muterte proteiner som bindingspartnere. Uttrykkene "assosierer" eller "binder" slik de benyttes her, henviser til bindingspartnere med en relativ bindingskonstant (K_d) som er tilstrekkelig sterk til å tillate detektering av binding til proteinet ved hjelp av en detekteringsinnretning. K_d -verdien kan beregnes som konsentrasjonen av fri analytt ved hvilken halvparten av proteinet er bundet, eller vice versa. Når analytten av interesse er glukose, er K_d -verdien for bindingspartnerne fortrinnsvis mellom rundt 0,0001 mM til rundt 30 mM, og fortrinnsvis ligger K_d -verdiområdet på fra rundt 1 mM til 15 mM ifølge oppfinnelsen.

Ifølge oppfinnelsen har det vært vist at GGBP'er kan benyttes for å detektere glukosebinding ved festing dertil av en rapportørgruppe som trasducerer en detekterbar signalforandring ved glukosebinding. Å "tilveiebringe en detekterbar signalforandring" betyr, slik uttrykket her benyttes, evnen til å gjenkjenne en forandring av en egenskap hos en rapportørgruppe på en måte som muliggjør detektering av ligand-proteinbinding. I en utførelsesform omfatter for eksempel de muterte GGBP'er en detekterbar rapportørgruppe hvis detekterbare karakteristika endrer seg ved en forandring i proteinkonformasjonen som inntreffer på glukosebindingen. I en foretrukket utførelsesform er rapportørgruppen en luminescent merkelapp som resulterer i en mutert GGBP med en affinitet for glukose som gir et detekterbart skift i luminiscensegenskapene for glukosebindingen. Forandringen i detekterbare karakteristika kan skyldes en endring i omgivelsene for merkelappen som er bundet til den muterte GGBP.

Den luminescente merkelapp kan være en fluorescentmerkelapp eller en fosforescent merkelapp. Bruken av fluorescente merkelapper som kan eksiteres ved fluorescens ved eksponering til visse bølgelengder av lys, er foretrukket.

I en utførelsesform er rapportørgruppen en fluorofor. Som benyttet her, henviser "fluorofor" til et molekyl som absorberer energi og så emitterer lys. Ikke-begrensende eksempler på fluoroforer som kan benyttes som rapportørgrupper ifølge oppfinnelsen, er

fluorescein, kumariner, rhodaminer, 5-TMRIA (tetrametyl rhodamin-5-jodacetamid), Quantum Red™, Texas Red™, Cy3, N-((2-jodacetoksy)etyl)-N-metyl)amino-7-nitrobenzoksadiazol (IANBD); 6-akryloyl-2-dimetylaminonafalen (akrylodan), pyren, Lucifer Yellow, Cy5, Dapoxyl® (2-bromacetamidoetyl)sulfonamid, (N-(4,4-difluor-1,3,5,7-tetametyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-2-yl)jodacetamid (Bodipy507/545 IA), N-(4,4-difluor-5,7-difenyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-3-propionyl)-N'-jodacetyletylendiamin (BODIPY® 530/550 IA) 5-(((2-jodacetyl)amino)etyl)amino)naftalen-1-sulfonsyre (1,5-IAEDANS) og karboksy-X-rhodamin, 5/6-jodacetamid (XRIA 5,6). Fortrinnsvis benyttes IANBD. Mange
 10 detekterbare, iboende egenskaper hos en fluorofor rapportørgruppe kan overvåkes for å detektere glukosebinding. Noen egenskaper som kan vise forandringer ved glukosebinding, inkluderer fluorescenslevetiden, fluorescensintensiteten, fluorescensanisotropi eller polarisering, og spektrale skift for fluorescensemisjon. Forandringer av disse fluoroforegenskaper kan induseres fra forandringer i fluorofor-
 15 omgivelsene, som de som stammer fra endringer i proteinkonformasjonen. Omgivelsessensitive fargestoffer som IANBD er spesielt brukbare i denne forbindelse. Andre forandringer av fluoroforegenskapene kan stamme fra interaksjoner med selve analytten eller fra interaksjoner med en andre rapportørgruppe, for eksempel når FRET (fluorescensresonansenergitransfer) benyttes for å overvåke forandringene i avstanden
 20 mellom to fluoroforer.

Selv om bruken av fluorescente merkelapper er ønskelige, er det tatt sikte på at andre rapportørgrupper kan benyttes. For eksempel kan det benyttes elektrokjemiske rapportørgrupper der en endring i omgivelsene for rapportøren vil gi grunn til en
 25 forandring i redox-tilstanden. Slike forandringer kan detekteres ved bruk av en elektrode.

Videre er det tatt sikte på at andre spektroskopisk detekterbare merkelapper, for eksempel merkelapper som kan detekteres ved NMR (kjernemagnetiskresonans) kan
 30 benyttes, som velkjent i teknikken.

Rapportørgruppen kan være festet til det muterte protein eller GGBP'ene på en hvilken som helst konvensjonell måte, som kjent i teknikken. For eksempel kan rapportørgruppene festes via aminer eller karboksylrester på proteinet. Spesielt
 35 foretrukket er imidlertid en kovalent kobling via tiolgrupper på cysteinrester. For muterte GGBP'er er for eksempel cysteiner lokalisert på posisjon 11, posisjon 14, posisjon 19, posisjon 43, posisjon 74, posisjon 107, posisjon 110, posisjon 112, posisjon

113, posisjon 137, posisjon 149, posisjon 152, posisjon 213, posisjon 216, posisjon 238, posisjon 287 og posisjon 292 foretrukket ifølge oppfinnelsen.

Enhver tiolreaktiv gruppe som er kjent i teknikken kan benyttes for festing av
 5 rapportørgrupper som fluorofores til et cystein på et konstruert protein. For eksempel er et jodacetamid, bromacetamid eller maleimid velkjente tiolreaktive deler som kan benyttes for dette formål.

Fluorofores som arbeider ved lange eksiterings- og emitteringsbølgelengder (for
 10 eksempel rundt 600 nm eller høyere eksiterings- eller emitteringsbølgelengder) er foretrukket når den molekylære sensor skal benyttes in vivo, for eksempel innarbeides i en implanterbar biosensorinnretning (huden er opak under 600 nm). I dag finnes det få miljømessig sensitive prober tilgjengelige i dette området av spekteret og sannsynligvis ingen funksjonelle, tiolreaktive grupper. Imidlertid kan tiolreaktive derivater av Cy-5
 15 fremstilles, for eksempel som beskrevet av H. J. Gruber et al., Bioconjugate Chem., (2000), 11, 161-166. Konjugater inneholdende disse fluorofores, for eksempel festet til forskjellige cysteinmutanter som er konstruert i muterte GGBP'er, kan screenes for å identifisere de som resulterer i den største forandring i fluorescens ved glukosebinding.

20 Muterte GGBP'er kan konstrueres til å ha en histidinmerkelapp på protein N-terminus, C-terminus eller begge. Histidinfusjonsproteiner er hyppig benyttet på det molekylærbiologiske området for å understøtte rensing av proteiner. Eksempler på taggesystem gir proteiner med en tag inneholdende ca. seks histidiner og fortrinnsvis påvirker slik tagging ikke bindingsaktiviteten for den muterte GGBP.

25 Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer også en biosensor og en fremgangsmåte for å fremstille et diagnostisk middel for in vivo glukosedeteksjon. I denne forbindelse består biosensoren av en eller flere muterte bindingsproteiner som er innkapslet i en matriks. Den innkapslede biosensor kan også benyttes som en implanterbar innretning eller en
 30 del derav.

"Matriksen" kan være i en hvilken som helst ønsket form, inkludert plate, sylinder, pute, mikrosfære, porøs polymer, åpencellet skum eller lignende, forutsatt at den er permeabel for analytten. Matriksen forhindrer i tillegg utlutning av biosensoren.
 35 Matriksen tillater at lys fra optiske kilder eller ethvert annet interagerende lys til eller fra rapportørgruppen passerer gjennom biosensorer. Midlene for bestemmelse eller detektering av en forandring i analyttkonsentrasjonen kan i en utførelsesform være

kontinuerlig. Alternativt kan midlene for bestemmelse eller detektering av analyttkonsentrasjonen være programmert eller episodisk.

Den tilsiktede in vivo biosensor ifølge oppfinnelsen består av minst et mutert
 5 bindingsprotein i en analyttpermeabel omgivelse eller en innkapslingsmatriks slik at det muterte bindingsprotein gir en detekterbar og reversibel signalforandring når det muterte bindingsprotein eksponeres til varierende analyttkonsentrasjoner, og det detekterbare og reversible signal kan relateres til konsentrasjonen av analytten.

- 10 I dette aspekt ved oppfinnelsen kan konfigurasjonen for transduserelementet for eksempel være innarbeidet i den distale ende av en fiber eller en annen liten, minimalt invasiv probe ob innføres i vevet hos en pasient for å muliggjøre metoder for bruk inkludert episodisk, kontinuerlig eller programmert avlesning av pasienten. De implanterbare biosensorer kan, i enkelte utførelsesformer, implanteres i eller under
 15 huden hos et pattedyrs epidermal-dermalforbindelse for å interagere med interstitialfluidet, vev- eller andre biologiske fluider.

Et eksempel på en metode som kan benyttes for å detektere nærværet av analytt ved bruk av biosensoren for in vivo anvendelse som beskrevet her, inkluderer en
 20 interrogering av implantatet med en fjern lyskilde, detektering av signalet fra proteinrapportørgruppen og bestemme mengden av glukose basert på en sammenheng med det detekterte signal som velkjent i teknikken (se US 5.517.313, US 5.910.661 og US 5.342.789).

- 25 Bindingsprotein-biosensorene ifølge oppfinnelsen er i stand til å måle eller detektere mikromolare (10^{-6} molar) til molare analyttkonsentrasjoner uten reagensforbruk. I enkelte utførelsesformer kan deres sensitivitet overfor analytt muliggjøre at biosensorene benyttes for å måle de lave analyttkonsentrasjoner som er kjent for å være tilstede i lavvolumprøver av interstitial- eller okularfluid og perspirasjon.
 30 Bindingsprotein-biosensorene ifølge oppfinnelsen tilveiebringer midler for å overvåke analytt kontinuerlig, episodisk eller "etter behov" slik det vil være hensiktsmessig for brukeren eller ved behandling av en tilstand.

- I andre utførelsesformer er biosensorenes sensitivitet overfor analytt (for eksempel
 35 glukose) slik at de kan benyttes for å teste blodanalyttnivået eller konsentrasjonen av analytt i en biologisk oppløsning, eller en annen oppløsning kan bestemmes. Som

benyttet her, inkluderer en ”biologisk oppløsning”, uten begrensning, blod, svette og/eller okular- eller interstitialfluid inkludert kombinasjoner derav.

De følgende eksempler illustrerer visse foretrukne utførelsesformer av oppfinnelsen,
5 men er ikke ment å være illustrerende for alle utførelsesformer.

Eksempel 1: Metoder for å uttrykke og å rense mutante proteiner uten histidintagger.

10 GGBP kodes av Mg1B-1 genet i E. coli. Dette proteinet ble endret ved å innføre aminosyrecystein ved forskjellige posisjoner ved seterettet mutagenese av Mg1B-1 genet. Disse proteiner ble så uttrykt i E. coli og rensset.

Kassettmutagenese av Mg1B-1 ble gjennomført som følger. Villtype Mg1B-1 genet ble
15 klonet in i en pTZ18R vektor (Dr. Anthony Cass, Imperial College, London, England). Mutante plasmider ble generert fra dette opphavsplasmid ved bruk av kassettmutagenese som ga randomiserte aminosyresekvenser, i det vesentlige som beskrevet av Kunkel (1991) og klonet i E. coli JM109 (Promega Life Science, Madison, WI). Mutante plasmider ble identifisert ved sekvensering. Det mutante protein ble
20 indusert i JM109 og rensset som beskrevet nedenfor. En E. coli JM109 koloni som inneholdt det mutante plasmid ble dyrket over natten ved 37°C under rysting ved 220 omdreininger pr. minutt i LB buljong inneholdende 50 µg/mL ampicillin (LB/Amp). Overnatt-veksten ble fortynnet 1:100 i 1L friskt LB/Amp og inkubert ved 37°C under rysting inntil OD₆₀₀-verdien for kulturen var 0,3 - 0,5. Ekspresjon av mutanten ble
25 indusert ved tilsetning av 1 mM IPTG (Life Technologies, Gaithersburg, MD) sluttkonsentrasjonen under fortsatt inkubering og rysting ved 37°C i 4 - 6 timer. Cellene ble høstet ved sentrifugering (10,000 x g, 10 min., 4°C).

Det mutante protein ble høstet ved osmotisk sjokk og rensset ved kolonnekromatografi.
30 Cellepelletten ble resuspendert i en sukrosebuffer (30 mM Tris-HCL pH 8,0, 20% sukrose 1 mM EDTA), inkubert ved romtemperatur i 10 min. og så sentrifugert (4000 x g, 15 min., 4°C). Supernatanten ble helt av og holdt på is. Cellepelletten ble resuspendert og 10 mL iskald, steril, deionisert H₂O ble repetert og suspensjonen ble inkubert på is og sentrifugert. Den gjenværende supernatanten ble slått sammen med
35 andre samlede supernatanter og sentrifugert en gang til (12,000 x g, 10 min., 4°C). Det sammenslåtte ”shockate” ble filtrert gjennom et 0,8 µm - og så et 0,45 µm filter. Streptomycinsulfat (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), 5% vekt/volum ble satt til

”shockate” og omrørt en gang i 30 min. fulgt av sentrifugering (12.000 x g, 10 min., 4°C). ”Shockate” ble så konsentrert ved bruk av Emicon Centriprep 10 (10.000 MWCO) filtre (Charlotte, NC) og dialysert over natten mot 5 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM MgCl₂. Det dialyserte ”shockate” ble sentrifugert (12.000 x g, 30 min., 4°C). Den resulterende supernatanten ble satt til en preekvilibrert DEAE Fast Flow Sepharose kolonne (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) i en mengde av 0,5 mL/min. Kolonnen ble vasket med 5 til 10 kolonnevolumer. En lineær gradient fra 0 til 0,2 M NaCl ble lagt på kolonnen og fraksjoner ble samlet. Mutantproteinholdige fraksjoner ble identifisert ved SDS-PAGE med Coomassie Brilliant Blue farging (molekylvekt ca. 32 kDa). Fraksjonene ble slått sammen og dialysert over natten ved 4°C mot fosfatbufret saltoppløsning (PBS) eller 10 mM ammoniumbikarbonat (pH 7,4), konsentrert ved bruk av Amicon Centriprep 10 filter og lagret ved 4°C eller -20°C med glycerol. Det ammoniumbikarbonatdialyserte protein ble lyofilisert.

Eksempel 2: Ekspresjon og rensing av mutante GGBP’er inneholdende Histidin Tags

GGBP mutanter ble konstruert enten ved seterettet mutagenese eller kassettmutagenese. Seterettet mutagenese (QuikChange, Stratagene, La Jolla, CA) ble gjennomført for å endre individuelle aminosyrer i pQE70 vektoren ved å erstatte en aminosyre med en annen, spesifikt valgt aminosyre. Kassettmutagenesemetoden (Kunkel 1991) ble gjennomført for å randomisere aminosyrer i et spesifisert område av GGBP genet. De muterte kassetter ble så subklonet inn i pQE70 ekspresjonsvektoren.

pGGBP-His plasmidet inneholdt GGBP genet klonet inn i pQE70 ekspresjonsvektoren (Qiagen, Valencia, CA). Dette konstrukt plasserer seks histidinrester på C-terminus av GGBP genet. E. coli stamme SG13009 ble benyttet for å overuttrykke mutant GGBP-His ved å følge standard prosedyrer (Qiagen). Etter overekspresjon av en 250 mL kultur ble cellene samlet ved sentrifugering (6000 rpm) og resuspendert i 25 mL bugbuster (Novagen, Madison, WI), Lysozym (25 mg) ble satt til lysatet og blandingen forsiktig blandet ved romtemperatur i 30 minutter. Klart lysat ble fremstilt ved sentrifugering (6000 rpm) og dertil ble det tilsatt 0,5 ml imidazol (1 M) og 3 ml NI-NTA kuler (Qiagen). Etter 30 minutters forsiktig blanding ved romtemperatur ble blandingen sentrifugert (6000 rpm) og lysatet fjernet. Kulene ble vasket med 25 ml oppløsning (1 M NaCl, 10 mM Tris, pH 8,0) og resentrifugert. Den mutante GGBP-His ble eluert fra kulene ved tilsetning av 5 mL oppløsning (160 mM imidazol, 1 M NaCl, 10 mM Tris, pH 8,0) og blanding i 15 minutter. Proteinoppløsningen ble umiddelbart filtrert

gjennom et Centriplus YM-100 filter (Amicon, Charlotte, NC) og så konsentrert til 1 - 3 mg/ml ved bruk av et Centriplus YM-10 filter. Proteinet ble dialysert over natten mot 2 L lagringsoppløsning (1 M NaCl, 10 mM Tris, 50 mM NaPO₄, pH 8,0).

5 Eksempel 3: Merking av mutante GGBP'er

En alikvot av mutant GGBP inneholdende cystein (4,0 nmol) i PBS ble behandlet med 2 mM ditiotreitol (5 µL, 10 nmol) i 30 min. En forrådsoppløsning av N,N'-dimetyl-N-(jodacetyl)-N'-(7-nitrobenz-2-oksa-1,3-diazol-4-yl)etylendiamin (IANBD amid, 0,5 mg) ble preparert i DMSO (100 µL, 11,9 mM) og 3,36 µL (40 nmol) ble satt til
 10 proteinet. Reaksjonen skred frem ved romtemperatur i 4 timer på en Dynal rotamix i mørket. Det merkede protein ble rensset ved gelfiltrering på en NAP-5 kolonne (Amersham Pharmacia). Merkingsforholdet ble bestemt ved bruk av en estimert ekstinksjonskoeffisient ($50 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) for GGBP som ble beregnet i GeneWorks 2,45
 15 (IntelliGenetics), ϵ_{478} (IANBD amid) = $25 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), og en måling av O.D. for en standard oppløsning av IANBD amid ved 280 nm og 478 nm. Fargekonsentrasjonen i proteinet ble beregnet som $C_{\text{dye}} = A_{478}/\epsilon_{478}$. Absorbansen for protein ved 280 nm ble beregnet som $A_{\text{prot}(280)} = A_{\text{total}(280)} - A_{\text{dye}(280)}$, der $A_{\text{dye}(280)} = A_{478} \times (A_{280}/A_{478})_{\text{dye st.}}$. Konsentrasjonen av protein var derved $C_{\text{prot}(280)} = A_{\text{prot}(280)}/\epsilon_{280}$. Tabell 1 oppsummerer
 20 forandringer i fluorescens av forskjellige GGBP mutanter merket med rapportørgrupper, inkludert rapportørgrupper med enten eksiterings- eller emitteringsmaksimum på minst 600 nanometer. Tabell 2 oppsummerer forandringen i fluorescens og bestemte K_d -verdier for mutasjoner av en, to, tre og fire aminosyresubstitusjoner. Disse data viser klart at mutasjoner av GGBP merket med rapportørgrupper kan gi ønskede attributter
 25 som glukosebiosensorer. Disse data viser mutasjons- rapportørgruppesammenhengen for de testede prøver. Figur 1 viser forandringen i fluorescensrespons til forskjellige glukosekonsentrasjoner av A213C/IL238C NBD amid GGBP H₆ som et representativt eksempel, i oppløsning. Figur 2 illustrerer forandringen i fluorescensrespons overfor forskjellige glukosekonsentrasjoner av E149C/A213R NBD amid GGBP H₆, som nok et
 30 representativt eksempel, i oppløsning.

TABELL 1 Prosent forandring i fluorescens for GGBP mutanter¹						
Fargestoff	Eksitasjon/emisjon (nm)	S112C	M182C	A213C	A213C His ₆	M216C
IANBD amid	470/550	0	4	3	51	7
IANBD ester	470/550					
IAEDANS	336/490	-7	-8	0		-9
Bodipy530/550IA	530/550	7	-10	33		4
XRIA 5,6	575/600	-21	-19	-38		-15
Lucifer Yellow IA	426/530			-14		-3
Bodipy 507/545 IA	507/545			25		-3
Cy5	640/660	2	0	11		-7
Texas Red-maleimid	580/610				-13	
Dapoxyl	375/580	15	7	12		2

¹ F fra 0 til 1 mM glukose ved 0,5 µM [fargestoff]. Hvis ikke annet er sagt, var alle merkelapper w/o

5 histidin merkelapper.

Eksempel 4: Detekterbar signalforandring som er synlig ved glukosebinding til den muterte GGBP merket med luminescente merkelapper og bestemmelse av K_d .

- 10 Forandringen i fluorescens (ΔF , Tabell 2) ble målt som prosentual forskjell i fluorescens mellom 0 og 1 mM glukose ved 0,5 µM protein ved bruk av et SLM Aminco fluorimeter (Ontario, Canada) med slissinnstillinger på 8 og 4 for eksitering og innstillinger på 5 og 5 på MC250 emisjonsmonokromatoren.
- 15 Bindingskonstanter (Tabell 2) ble bestemt ved titrering og økende konsentrasjoner av glukose inn i en 0,1 µM proteinoppløsning (PBS) med blanding etter hver tilsetning av glukose. Slissinnstillingene var de samme som ovenfor. K_d ble bestemt fra følgende sammenheng, tilpasset etter Pisarchick og Thompson (1990):

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

17

der F er fluorescensintensiteten, F_{inf} er fluoresensen ved uendelig, F_0 er fluorescensen ved null glukose og x er den frie konsentrasjonen av glukose ($[Glc]_{free}$) bestemt ved ligningen:

$$5 \quad [Glc]_{free} = \frac{[GLC]_{tot} - [Prot]_{tot} - Kd + \sqrt{([Glc]_{tot} - [Prot]_{tot} - Kd)^2 + 4 * [Glc]_{tot} * Kd}}{2}$$

der $[Glc]_{tot}$ og $[Pro]_{tot}$ er de totale konsentrasjoner av glukose henholdsvis protein.

10

Tabell 2. Oppsummering av GGBP-H6 NBD mutasjoner

Identifisering	Oppløsning $\Delta F(\%)^1$	Kd(mM) ²	Dye/Prot
VILLTYPE	iboende	0,0002	
A1C			
A1S			
A1S, E149C, A213R, L238S	+21 ³		0,31
A1S, E149C, A213S, L238S	+480	0,37	0,9
K11C	10		1,8
D14C	1		1,5
V19C	-56	0,0001	0,38
N43C	40	0,0002	0,28
G74C	-3	0,0009	1,43
Y107C	-30	0,001	0,93
T110C	-9		
S112C	220	0,05	1,15
S112C, L238S	6		1,5
K113C	15		0,65
K137C	-5	0,00004	1,17
E149C	300	0,0002	0,96
E149C, A213C	+110		0,70
E149C, A213R	660	1	1,1
E149C, A213S	240 ⁴	0,0023	1,1
E149C, A213T	350	1	0,6
E149C, A213L	280	0,1	1,1
E149C, A213Y	280	0,1	1,1
E149C, A213C, L238C	+39 ³		1,08
E149C, A213S, K223N			
E149C, K223N	260	0,003	0,7
E149C, L238C	260	5	1,6
E149C, L238S	660 ⁴	0,08	1,36
E149C, K223N, N256R			
E149C, N256S	1		0,93
E149C, N256R	200	742 ⁶	0,9
E149C, M182C, A213C, L238S	200	216 ⁶	3,2
E149C, A213S, L238S	480	0,47	0,76
E149C, A213R, L238S	500	12	1,1
H152C	210	0,07	1,3
H152C, A213S	100	0,16	
H152C, A213R	-3		1,2
H152C, K223N	200	0,003	1
H152C, M182C			
M182C	11		
A213C	50	0,124	0,68
A213C, L238C	24,67 ²	6	1,4
A213C, L255C	-5		0,98
M216C	67	0,008	0,91
D236C	+2 ³		0,43
L238C	-6, +3 ³	0,003 (SPR)	1,3
D287C	4		1,1
R292C	-34	0,0008	1,5
V296C	-10	0,00001 ⁵	1,08

¹ ΔF 0 til 1 mM Glc ved 0,5 mM [dye]

² Kd målt ved 0,1 mM [dye]

³ ΔF når målt fra 0 til 100 mM Glc

⁴ ΔF når målt fra 0 til 10 mM Glc

5 ⁵ Estimert: Sigma Plot beregning konvergente ikke

⁶ Estimert: kurven nådde ikke metning.

Eksempel 5: Immobilisering av en biosensor ifølge oppfinnelsen inn i en
 10 **dialysemembranmatriks og matriksens evne til å gi reversible og**
kontinuerlige avlesninger.

Det ble benyttet et Varian Eclipse fluorimeter med fiberoptisk festing, GGBP
 L238C/A213C protein (2 M i PBS buffer) innfanget i en dialysemembran med en
 15 molekylterskel på 3500 Dalton festet til den distale ende av fiberen. Oppløsninger ble
 preparert inneholdende PBS buffer, 2 mM og 20 mM glukose i PBS buffer. Med
 proben i PBS oppløsning ble avlesninger notert i 0,02 sekunders intervaller av
 emisjonsbølgelengden 521 nm, fulgt av innføring av fiberen i glukoseoppløsningene.
 Plassering av fiberen til oppløsning kun med buffer, resulterte i retur til initialsignalet.
 20 Figur 3 viser multiple sykler som alternerer mellom buffer og glukoseoppløsninger og
 som viser reversibiliteten for biosensoren innlagt i en permeabel matriks med
 fysiologisk område.

P a t e n t k r a v

1.

Glukosebiosensor, k a r a k t e r i s e r t v e d at den
5 omfatter:

minst ett mutert glukose/galaktose bindingsprotein som har minst en aminosyre
substitusjon som er et cystein i posisjon 149, hvori aminosyre nummereringen referer til
E.coli glukose/galaktose bindingsprotein som har 309 aminosyrerester, og minst en
rapportørgruppe festet dertil, slik at rapportørgruppen gir en detekterbar og reversibel
10 signalforandring når det muterte bindingsprotein er eksponert til varierende
glukosekonsentrasjoner, idet den detekterbare og reversible signalforandring er relatert
til nevnte varierende konsentrasjoner.

2.

15 Biosensor ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte
muterte glukose/galaktose bindingspotein omfatter minst en ytterligere
aminosyresubstitusjon, minst to ytterligere aminosyresubstitusjoner, eller minst tre
ytterligere aminosyresubstitusjoner.

3.

20 Biosensor ifølge krav 1 eller 2, k a r a k t e r i s e r t v e d at
det muterte glukose/galaktose bindingsproteinet har ytterligere aminosyresubstitusjoner
valgt fra et cystein i posisjon 1, et serin i posisjon 1, et cystein i posisjon 11, et cystein i
posisjon 14, et cystein i posisjon 19, et cystein i posisjon 43, et cystein i posisjon 74, et
25 cystein i posisjon 107, et cystein i posisjon 110, et cystein i posisjon 112, et cystein i
posisjon 113, et cystein i posisjon 137, et cystein i posisjon 213, et cystein i posisjon
216, et cystein i posisjon 238, et cystein i posisjon 287, og et cystein i posisjon 292, et
cystein i posisjon 152, et cystein i posisjon 182, et cystein i posisjon 236, et cystein i
posisjon 296.

4.

30 Biosensor ifølge krav 2, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte
muterte glukose/galaktose bindingsprotein omfatter minst to aminosyresubstitusjoner
som er valgt fra cystein i posisjon 149 og et serin i posisjon 238, et cystein i posisjon
149 og et arginin i posisjon 213, et cystein i posisjon 149 og et cystein i posisjon 213, et
35 cystein i posisjon 149 og et treonin i posisjon 213, et cystein i posisjon 149 og et leucin
i posisjon 213, et cystein i posisjon 149 og et tyrosin i posisjon 213, et cystein i posisjon

149 og et asparagin i posisjon 223, et cystein i posisjon 149 og et cystein i posisjon 238, et cystein i posisjon 149 og et serin i posisjon 256, og et cystein i posisjon 149 og et arginin i posisjon 256.

5 5.

Biosensor ifølge krav 2, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte muterte glukose/galaktose bindingsprotein omfatter minst tre aminosyresubstitusjoner som er valgt fra et cystein i posisjon 149, et serin i posisjon 213 og et serin i posisjon 238; et cystein i posisjon 149, et arginin i posisjon 213 og et serin i posisjon 238; et
10 cystein i posisjon 149, et cystein i posisjon 213 og et cystein i posisjon 238; et cystein i posisjon 149, et cystein i posisjon 213 og et asparagin i posisjon 223; og et cystein i posisjon 149, et asparagin i posisjon 223 og et arginin i posisjon 256.

6.

15 Biosensor ifølge krav 2, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte muterte glukose/galaktose bindingsprotein omfatter minst fire aminosyresubstitusjoner som er valgt fra et serin i posisjon 1, et cystein i posisjon 149, et arginin i posisjon 213 og et serin i posisjon 238, et serin i posisjon 1, et cystein i posisjon 149, et serin i posisjon 213 og et serin i posisjon 238, og et cystein i posisjon 149, et cystein i posisjon
20 182, et cystein i posisjon 213 og et serin i posisjon 238.

7.

Biosensor ifølge krav 6, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte fire aminosyresubstitusjoner er et serin i posisjon 1, et cystein i posisjon 149, et arginin i
25 posisjon 213 og et serin i posisjon 238.

8.

Biosensor ifølge ethvert av kravene 1 til 7, k a r a k t e r i s e r t v e d at det muterte glukose/galaktose bindingspoteinet i tillegg omfatter minst en
30 histidin tag.

9.

Biosensor ifølge ethvert av kravene 1 til 8, k a r a k t e r i s e r t v e d at rapportørgruppen er en luminescent merkelapp.

10.

Biosensor ifølge krav 9, k a r a k t e r i s e r t v e d at luminescentmerkelappen har en eksitasjonsbølgelengde på mer enn rundt 600 nanometer.

5

11.

Biosensor ifølge krav 9, k a r a k t e r i s e r t v e d at den luminescente merkelapp har en emisjonsbølgelengde på mer enn rundt 600 nanometer.

10 12.

Biosensor ifølge krav 9, k a r a k t e r i s e r t v e d at den luminescente merkelapp kovalent er koblet til nevnte minst ene glukose/galaktosebindingsprotein.

15 13.

Biosensor ifølge krav 12, k a r a k t e r i s e r t v e d at den luminescente merkelapp kovalent er koblet til nevnte glukose/galaktosebindingsprotein ved reaksjon med et medlem valgt fra gruppen bestående av fluorescein, kumariner, rhodaminer, 5-TMRIA (tetrametylrhodamin-5-jodacetamid), Quantum RedTM, Texas
 20 RedTM, Cy3, N-((2-jodacetoksy)etyl)-N-metyl)amino-7-nitrobenzoksadiazol (IANBD); 6-akryloyl-2-dimetylamino-naftalen (akrylodan), pyren, Lucifer Yellow, Cy5, Dapoxyl ® (2-bromacetamidoetyl)sulfonamid, (N-(4,4-difluor-1,3,5,7-tetrametyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-2-yl)jodacetamid (Bodipy507/545 IA), N-(4,4-difluor-5,7-difeny1-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-3-propionyl)-N'-jodacetyletylendiamin (BODIPY ®
 25 530/550 IA) 5-(((2-jodacetyl)amino)etyl)amino)naftalen-1-sulfonsyre (1,5-IAEDANS) og karboksy-X-rhodamin, 5/6-jodacetamid (XRIA 5,6).

14.

30 Biosensor ifølge ethvert av kravene 1 til 9, k a r a k t e r i s e r t v e d at rapportørgruppen emitterer nevnte signal som respons på eksponering til en energikilde.

15.

35 Fremgangsmåte for in vitro glukosedetektering, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter:

- a) å tilveiebringe minst ett mutert glukose/galaktosebindingsprotein og minst en rapportørgruppe festet dertil som definert ved glukose biosensor ifølge ethvert av kravene 1 til 14;
 - b) eksponering av nevnte muterte glukose/galaktosebindingsprotein til varierende glukosekonsentrasjoner; og
 - c) detektering av en detekterbar og reversibel signalforandring fra nevnte rapportørgruppe der nevnte detekterbare og reversible signalforandring tilsvarer nevnte varierende glukosekonsentrasjoner.
16.
Fremgangsmåte ifølge krav 15, k a r a k t e r i s e r t v e d at detekteringen skjer kontinuerlig, programmert, episodisk eller ved kombinasjoner derav.
17.
Fremgangsmåte ifølge krav 15, k a r a k t e r i s e r t v e d at de muterte glukose/galaktosebindingsproteiner er valgt blant bakterieperiplasmiske bindingsproteiner.
18.
Fremgangsmåte ifølge krav 15, k a r a k t e r i s e r t v e d at den ytterligere omfatter et trinn med eksponering av nevnte rapportørgruppe til en energikilde i stand til å eksitere rapportørgruppen for å emittere nevnte signal.
19.
Anvendelse av et mutert glukose/galaktosebindingsprotein og minst en rapportørgruppe koblet dertil som definert i ethvert av kravene 1-14 for fremstilling av et diagnostisk middel for in-vivo glukose deteksjon.
20.
Blanding, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter: et mutert glukose/galaktosebindingsprotein med minst en aminosyresubstitusjon bestående av et cystein i posisjon 149, hvori aminosyre nummereringen referer til E.coli glukose/galaktose bindingsprotein som har 309 aminosyrerester.

21.

Blanding ifølge krav 20, k a r a k t e r i s e r t v e d at det muterte glukose/galaktosebindingsprotein har ytterligere aminosyresubstitusjon valgt fra et cystein i posisjon 1, et serin i posisjon 1, et cystein i posisjon 11, et cystein i posisjon 14, et cystein i posisjon 19, et cystein i posisjon 43, et cystein i posisjon 74, et cystein i posisjon 107, et cystein i posisjon 110, et cystein i posisjon 112, et cystein i posisjon 113, et cystein i posisjon 137, et cystein i posisjon 149, et cystein i posisjon 213, og et cystein i posisjon 216, et cystein i posisjon 238, et cystein i posisjon 287, et cystein i posisjon 292, et cystein i posisjon 236 og et cystein i posisjon 296.

10

22.

Blanding ifølge krav 21, k a r a k t e r i s e r t v e d at det muterte glukose/galaktosebindingsproteinet har

- (i) minst to aminosyresubstitusjoner valgt fra gruppen bestående av et cystein i posisjon 149 og et serin i posisjon 238, et cystein i posisjon 149 og et arginin i posisjon 213, et cystein i posisjon 149 og et cystein i posisjon 213, et cystein i posisjon 149 og et threonin i posisjon 213, et cystein i posisjon 149 og et leucin i posisjon 213, et cystein i posisjon 149 og et tyrosin i posisjon 213, et cystein i posisjon 149 og et asparagin i posisjon 223, et cystein i posisjon 149 og et cystein i posisjon 238, et cystein i posisjon 149 og et serin i posisjon 256, et cystein i posisjon 149 og et arginin i posisjon 256, eller
- (ii) minst tre aminosyresubstitusjoner valgt fra gruppen omfattende et cystein i posisjon 149, et serin i posisjon 213 og et serin i posisjon 238; et cystein i posisjon 149, et arginin i posisjon 213 og et serin i posisjon 238; et cystein i posisjon 149, et cystein i posisjon 213 og et cystein i posisjon 238 ; og et cystein i posisjon 149, et serin i posisjon 213 og et asparagin i posisjon 223; et cystein i posisjon 149, et asparagin i posisjon 223 og et arginin i posisjon 256; eller
- (iii) minst fire aminosyresubstitusjoner valgt fra et serin i posisjon 1, et cystein i posisjon 149, et arginin i posisjon 213 og et serin i posisjon 238; et serin i posisjon 1, et cystein i posisjon 149, et serin i posisjon 213 og et serin i posisjon 238; og et cystein i posisjon 149, et cystein i posisjon 182, et cystein i posisjon 213 og et serin i posisjon 238.

30

23.

Blanding ifølge ethvert av kravene 20 til 22, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte muterte glukose/galaktosebindingsprotein i tillegg omfatter minst en histidin tag.

35

24.

Blanding ifølge ethvert av kravene 20 til 22, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte muterte glukose/galaktosebindingsprotein i tillegg omfatter minst en rapportørgruppe.

5

25.

Blanding ifølge krav 24, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte rapportørgruppe er en luminescent merkelapp.

10

25.

Blanding ifølge krav 25, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte luminescente merkelapp har en eksiteringsbølgelengde på mer enn rundt 600 nanometer.

15

27.

Blanding ifølge krav 25, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte luminescente merkelapp har en emitteringsbølgelengde på mer enn 600 nanometer.

28.

20

Blanding ifølge krav 25, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte luminescente merkelapp kovalent er koblet til nevnte muterte

glukose/galaktosebindingsprotein ved omsetning av nevnte bindingsprotein og et

medlem valgt fra gruppen bestående av fluorescein, kumariner, rhodaminer, 5-TMR1A

(tetrametylrhodamin-5-jodacetamid), Quantum RedTM, Texas RedTM, Cy3, N-((2-

25

jodacetoksy)etyl)-N-metyl)amino-7-nitrobenzoksadiazol (IANBD); 6-akryloyl-2-

dimetylaminaftalen (akrylodan), pyren, Lucifer Yellow, Cy5, Dapoxyl ® (2-

bromacetamidoetyl)sulfonamid, (N-(4,4-difluor-1,3,5,7-tetametyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-

indacen-2-yl)jodacetamid (Bodipy507/545 IA), N-(4,4-difluor-5,7-difenyl-4-bora-3a,4a-

diaza-s-indacen-3-propionyl)-N'-jodacetyletylendiamin (BODIPYS ® 530/550 IA) 5-

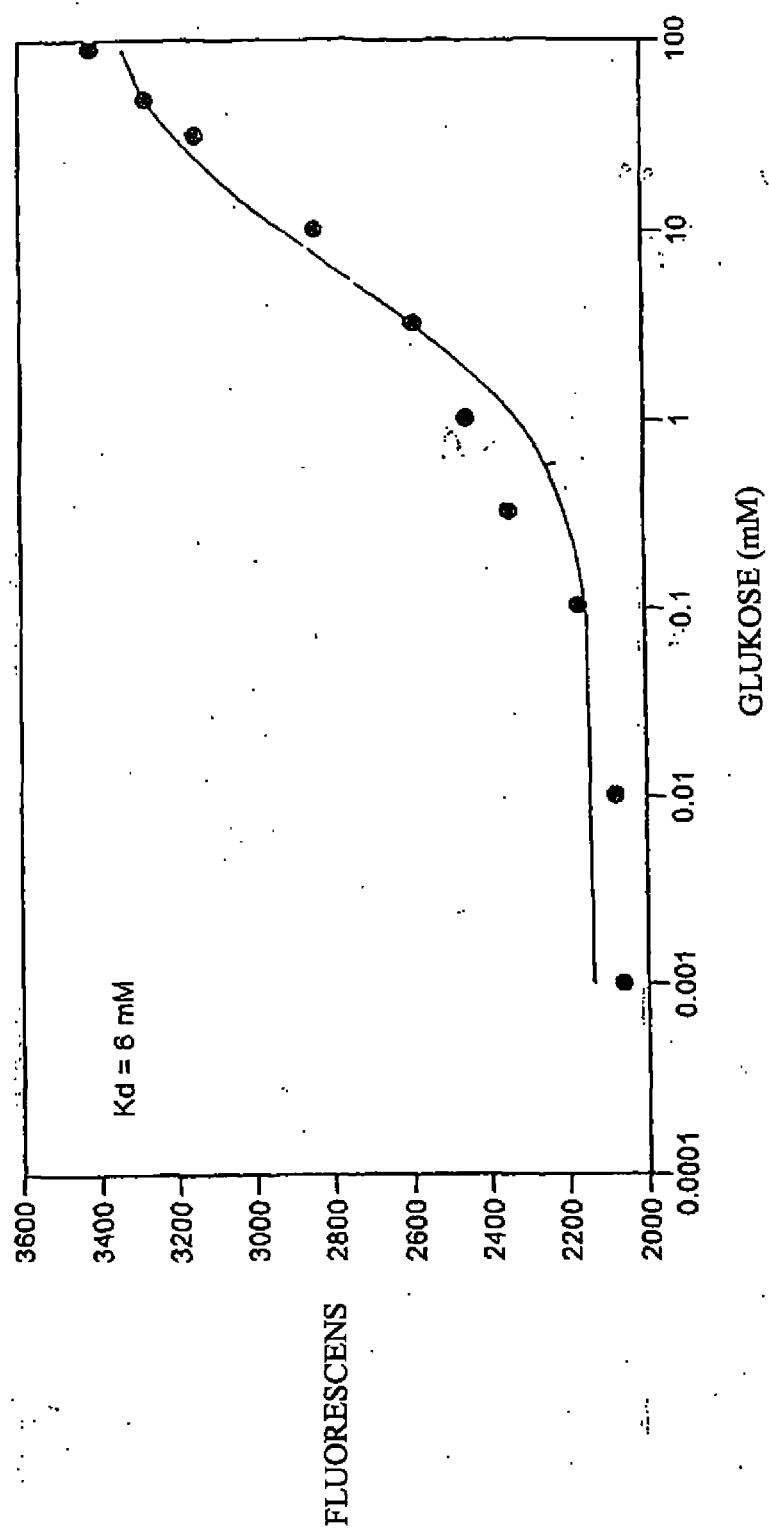
30

(((2-jodacetyl)amino)etyl)amino)naftalen-1-sulfonsyre (1,5-IAEDANS) og karboksy-

X-rhodamin, 5/6-jodacetamid (XRIA 5,6).

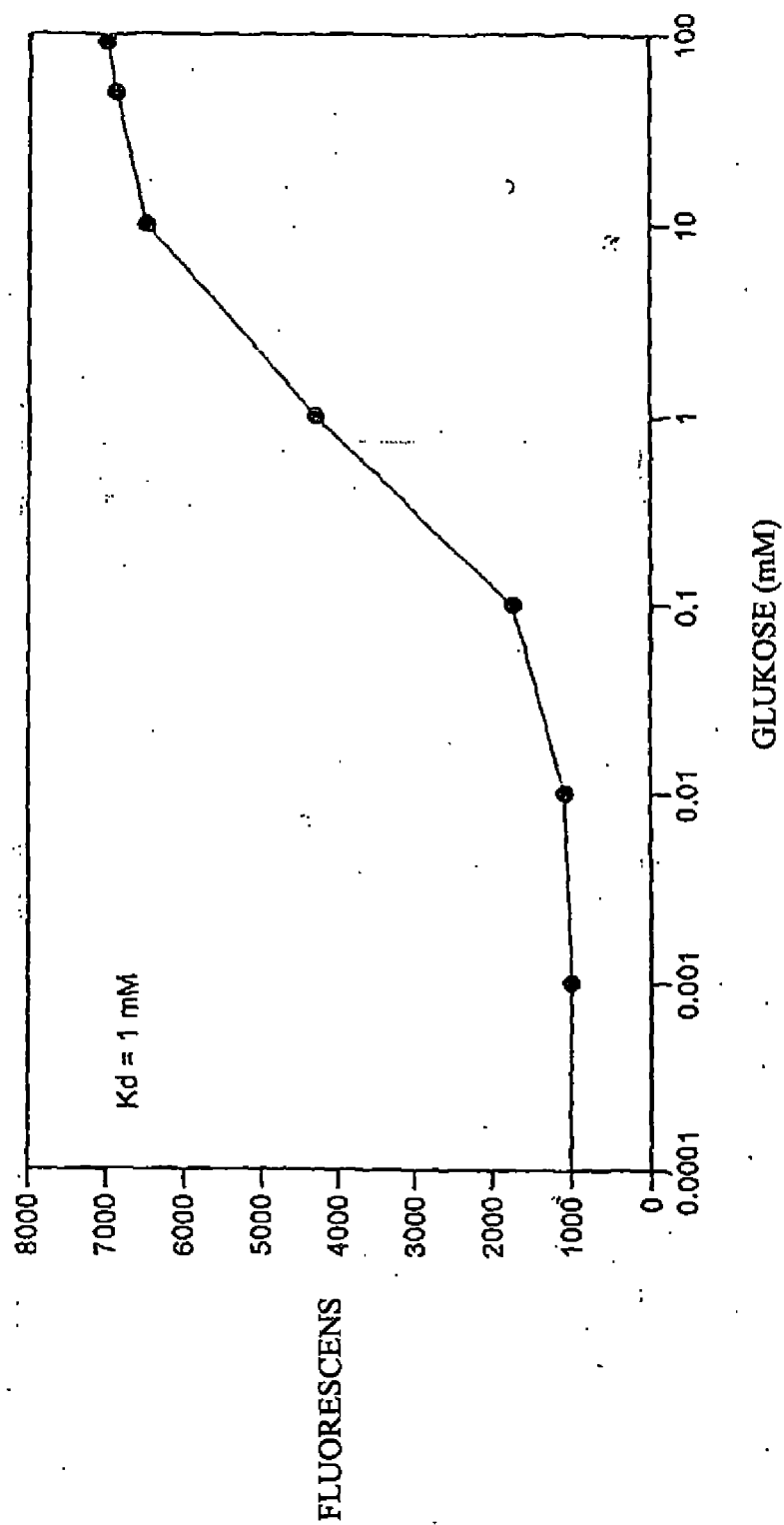
1/3

FIG. 1



2/3

FIG. 2



3/3

