



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 338 368**

51 Int. Cl.:
G01N 33/542 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06816778 .2**

96 Fecha de presentación : **11.10.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1934610**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.06.2008**

54 Título: **Ensayos de interactividad molecular o subcelular usando despolarización tras transferencia de energía de resonancia (DARET).**

30 Prioridad: **12.10.2005 US 726515 P**
11.10.2006 US 548411

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
06.05.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
06.05.2010

73 Titular/es: **ALLERGAN, Inc.**
2525 Dupont Drive
Irvine, California 92612, US

72 Inventor/es: **Gilmore, Marcella, A.;**
Williams, Dudley, J.;
Steward, Lance, E. y
Aoki, Kei Roger

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 338 368 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).

ES 2 338 368 T3

DESCRIPCIÓN

Ensayos de interactividad molecular o subcelular usando despolarización tras transferencia de energía de resonancia (DARET).

5

La presente solicitud reivindica prioridad a tenor del Código de los Estados Unidos 35 § 119(e) a la Solicitud de Estados Unidos 11/548.411 presentada el 11 de octubre de 2006, publicada como US 2007/0275477.

10

La presente invención se refiere en general a ensayos para detectar la interacción física (o la falta de interacción física) entre moléculas o partes de la misma molécula. Además, el presente ensayo es aplicable para detectar interacciones entre, por ejemplo, las características subcelulares tales como, sin limitación, la membrana plasmática, las mitocondrias, el aparato de Golgi, las vesículas, y similares usando la nueva técnica óptica llamada despolarización tras transferencia de energía de resonancia (DARET).

15

Tales ensayos pueden ser muy útiles en las aplicaciones que incluyen la medición o la detección de interacciones ligando:receptor, determinados ensayos enzimáticos (tales como ensayos de proteasas), la detección de la circulación molecular intracelular y en la detección de interacciones proteína:proteína, ácido nucleico:ácido nucleico y proteína:ácido nucleico.

20

La posición de las moléculas dentro de una célula puede sugerir algo con respecto a su función. Las proteínas que pasan del citoplasma al núcleo cuando la célula se expone a una hormona o a un factor de crecimiento pueden estar implicadas en la expresión genética. Como alternativa, las moléculas que son transportadas a la membrana celular en respuesta a un estímulo pueden ser, por ejemplo, moléculas secretoras implicadas en las señales célula-célula, los neurotransmisores que se producen dentro las neuronas se almacenan para el uso posterior antes de responder a un cambio transitorio en el potencial de membrana siendo secretados en la hendidura sináptica. Es útil para controlar la posición de tales moléculas con respecto a características celulares tales como, por ejemplo, el aparato de Golgi, la membrana celular y los lisosomas.

25

30

Por otra parte, los ensayos para la detección de interactividad entre moléculas pueden tener aplicabilidad clara para los esfuerzos en el descubrimiento de fármacos. Por ejemplo, la construcción de bibliotecas de compuestos que contienen cientos de miles de compuestos o más se ha convertido actualmente en algo común; sin embargo, la capacidad para cribar bibliotecas tan grandes de compuestos es un cuello de botella común para desarrollar un fármaco. Los presentes procedimientos proporcionan ensayos fáciles y rápidos, por ejemplo, unión y/o actividad de fármacos, que pueden realizarse en tiempo real, sin el uso de reactivos radiantes o tóxicos. Los presentes procedimientos son también adaptables para el uso en formatos de selección de alto rendimiento, que permitan la automatización de diversas etapas del ensayo.

35

40

La construcción y el cribado de grandes bibliotecas de compuestos es un avance práctico relativamente reciente en el desarrollo de fármacos, coincidiendo con el desarrollo de la clonación molecular precisa y las técnicas de ingeniería genética que permiten la construcción de moléculas diana clonadas, en particular proteínas. Las proteínas son por lo general el resultado de la manipulación genética, con frecuencia como resultado de la expresión de una construcción de un vector introducido en una célula huésped. Las moléculas diana pueden purificarse parcialmente y algunas veces se utilizan en un sistema de ensayo completamente *in vitro*. Como alternativa, algunas veces la célula huésped que expresa la molécula diana se usa en cultivo como parte del sistema de ensayo.

45

50

Antes de la llegada del cribado de alto rendimiento, los ensayos de selección de fármacos eran con frecuencia el resultado de la investigación académica desarrollada con un énfasis en la investigación biológica básica más que en el gran volumen. Estos ensayos demandaban frecuentemente mucho tiempo y trabajo, y típicamente implicaban el uso de radionúclidos, con los riesgos acompañantes para la salud del personal del laboratorio asociado con los mismos. Por lo tanto, los sistemas de ensayo utilizados como base para los primeros esfuerzos diseñados racionalmente para el descubrimiento de fármacos eran derivados de estos ensayos, y se convirtieron en una etapa limitante de la velocidad en la identificación rápida de los compuestos potencialmente útiles para una aplicación terapéutica dada.

55

60

Típicamente, los procedimientos de ensayo han estado basados en procedimientos de ensayo denominados heterogéneos. En la mayoría de los ensayos, estos dan como resultado una mezcla de compuestos sin reaccionar o no unidos (tales como, sin limitación, un sustrato enzimático o ligando del receptor) y componentes que reaccionaron o unidos, (por ejemplo un producto enzimático o un receptor-ligando unido). Con frecuencia, uno o más de estos componentes se marcan con un marcador detectable. En un "ensayo heterogéneo" esta mezcla se resuelve (y por lo general debe resolverse) por separación física del material marcado que ha reaccionado, se ha modificado, o unido del marcador restante antes de que puedan obtenerse datos útiles. Por ejemplo, si el ensayo es un ensayo de unión, la fijación del receptor a unir por un ligando a un soporte sólido, tal como perlas magnéticas, permite el lavado de las perlas después de la reacción. El marcador asociado con las perlas lavadas puede entonces detectarse como indicación de la interacción o de la actividad deseada.

65

En contraste, los procedimientos de ensayo en los que la detección del material marcado que ha reaccionado, se ha modificado, o unido puede hacerse sin la necesidad de una etapa de separación se denominan sistemas de ensayo "homogéneos". Puede encontrarse una ilustración de un sistema homogéneo de detección de ácidos nucleicos en, por ejemplo, la Patente de EEUU N° 5.639.604 con el título "Homogeneous Protection Assay".

ES 2 338 368 T3

Ésta y todas las otras publicaciones citadas en esta solicitud de patente se incorporan en el presente documento por referencia como parte de la presente solicitud de patente a menos que se indique expresamente de otra manera.

Más recientemente, en particular tras el desarrollo de las proteínas de fusión fabricadas con precisión que incorporan restos fluorescentes tales como la proteína fluorescente verde (GFP) y sus derivados de otros colores, el uso de la fluorescencia se ha convertido en una elección cada vez más popular en la investigación y el desarrollo de la biología. Los fluoróforos pueden ser moléculas orgánicas más pequeñas tales como los colorantes fluorescentes o moléculas más grandes tales como los polipéptidos fluorescentes. Aunque no todos los procedimientos de fluorescencia son aptos para el cribado de alto rendimiento, se ha descrito una serie de procedimientos en la bibliografía. Por ejemplo, Eggeling y col., 8: 632 *Drug Discovery Today* (julio de 2003) describen técnicas que incluyen fluorescencia total, fluorescencia dependiente del tiempo, polarización de fluorescencia, tiempo de vida de la fluorescencia, o anisotropía resuelta por tiempo, que son aptos para el cribado de alto rendimiento.

La fluorescencia total se usa frecuente para detectar la actividad enzimática en los ensayos diseñados de manera tal que el sustrato (o el producto) se vuelve fluorescente (o se extingue la fluorescencia) tras la modificación enzimática del sustrato. Para los objetivos de la presente solicitud de patente, el término “fluorescencia” significa la emisión de radiación electromagnética, especialmente de luz visible, estimulada en una sustancia por la absorción de radiación incidente, e incluye específicamente la luminiscencia. La fluorescencia dependiente del tiempo utiliza fluoróforos que tienen tiempos de vida de fluorescencia largos (tales como los quelatos de lantánido) para distinguir su fluorescencia de la fluorescencia de vida más corta. Esto se ha usado según se informa en combiNaClón con la transferencia de energía de resonancia de la fluorescencia (FRET), que implica la transferencia no radiante de energías desde un donador a una molécula aceptora. La polarización de fluorescencia es una técnica que implica la detección de cambios en la polarización que surgen de las diferencias en el volumen molar de los reactivos y los productos.

Además, el uso de dispositivos tales como los láseres de alta energía para la excitación y la microscopía confocal ha permitido que la excitación y la detección de luz emitida puedan controlarse mucho más fácilmente hoy que nunca antes. Por ejemplo, aunque no solamente o estrictamente un procedimiento de alto rendimiento, recientemente se ha descrito un ensayo de proteasas que utiliza GFP y la proteína fluorescente roja DsRed de un modo que permite tanto la FRET como el análisis de la correlación cruzada de colores duales (un procedimiento de molécula única de volumen ultra bajo que explora selectivamente el movimiento concomitante de dos sondas distinguibles). En este ensayo homogéneo, se marca un sustrato de la proteasa con los dos marcadores fluorescentes y se detecta la escisión proteolítica de un sustrato que contiene los dos dominios fluorescentes de la proteína cuando el sustrato marcado de manera dual se separa en dos sustratos con un único marcador. La escisión no sólo interrumpe las fluctuaciones conjuntas en los dos canales de detección, sino también da como resultado la termiNaClón de la FRET entre los marcadores. Véase Kohl y col., *Proc. Nat'l. Acad. Sci.* 99: 12161 (17 de septiembre de 2002).

Como se mencionó anteriormente, la polarización de fluorescencia se ha usado tradicionalmente para obtener información con respecto al tamaño y/o a la forma de las moléculas. La polarización de fluorescencia es un fenómeno que tiene lugar cuando una molécula fluorescente es excitada por la luz polarizada en un plano de una longitud de onda dada de manera que experimenta una transición a un estado excitado de energía más alta, denominado estado S₁. Tal molécula emite a continuación luz de energía más baja (y, por consiguiente, de una longitud de onda más larga) cuando retorna a su estado basal no excitado (S₀). El tiempo promedio que un fluoróforo (o más exactamente, una población de fluoróforos idénticos) pasa en el estado excitado antes de volver al estado basal a través de la emisión de luz fluorescente se denomina “tiempo de vida de fluorescencia”, y es específico para cada compuesto. Si la molécula está en disolución líquida, el movimiento browniano (denominado algunas veces rotación browniana) puede causar un cambio en la orientación de la molécula fluorescente entre el tiempo de excitación y el tiempo de emisión de fluorescencia. Un fluoróforo tiene intrínsecamente un momento dipolar con una orientación definida a lo largo de la cual vibra cuando está excitado, y a lo largo de la cual emite un fotón cuando regresa a su estado basal. Cuando está en disolución, la orientación de este momento dipolar puede cambiar a medida que gira la molécula, de modo que la orientación de la luz emitida posteriormente por la molécula será, hasta cierto punto, aleatoria. El movimiento del momento dipolar depende de una serie de factores.

Algunos de estos factores están relacionados con la capacidad de rotar de la molécula excitada. La viscosidad de la disolución es uno de tales factores. Cuanto mayor sea la viscosidad de la disolución en la que la molécula fluorescente está contenida, más restringida estará cada molécula de cambiar su orientación y menos probablemente la fluorescencia emitida será polarizada con respecto al ángulo de la luz de excitación despolarizada en el plano.

De manera similar, una molécula globular sustancialmente redonda tendrá más libertad para girar alrededor de cualquier eje que una molécula filamentosa larga para girar extremo sobre extremo, y una molécula voluminosa, masiva tiene mayor inercia (y, por consiguiente, resistencia a la rotación) que una molécula menos voluminosa, más pequeña. Por consiguiente, en esta situación, siendo todas las otras circunstancias iguales, la molécula más pequeña tiene mayor probabilidad de mostrar despolarización fluorescente que la molécula más voluminosa, más grande.

Bajo ciertas condiciones se observa un fenómeno adicional, denominado algunas veces migración de energía, con las moléculas fluorescentes en disolución. En disoluciones concentradas, a medida que aumenta la concentración de moléculas fluorescentes también aumenta la posibilidad de transferencia de energía entre estas moléculas, por ejemplo, de una primera molécula excitada S₁ a una segunda molécula no excitada S₀ que tiene una orientación similar pero no necesariamente perfectamente paralela a la primera. La transferencia de los estados de energía más

ES 2 338 368 T3

altos de la primera molécula a la segunda provoca que la primera molécula regrese al estado basal S_0 y la transición de la primera molécula a un estado de energía más alto. De este modo la orientación del fluoróforo emisor puede tener poca relación con el excitado originalmente. Véase por ejemplo, Weber, G., Polarization of the Fluorescence of Solutions, en FLUORESCENCE AND PHOSPHORESCENCE ANALYSIS 217, 229 (Capítulo 8 Wiley Interscience, 5 1966). Por consiguiente, se observa despolarización de fluorescencia incluso en disoluciones muy viscosas (en las que la capacidad de la molécula para rotar está seriamente restringida) si la concentración de las moléculas fluorescentes es suficientemente alta para permitir la transferencia de energía de resonancia. Véase id.

Recientemente, las ventajas de la polarización de fluorescencia han llevado a un número creciente de investiga-
10 dores a investigar usando este fenómeno como indicación de la actividad enzimática o de otra actividad biológica o bioquímica. De este modo, Simeonov y col., 304 Anal. Biochem. 193 (2002) han descrito el uso de la polarización de fluorescencia en disoluciones que contienen poliarginina para la detección de la actividad cinasa, fosfatasa y proteasa. Scott y Carpenter, 316 Anal. Biochem. 82 (2003) han descrito el uso de la polarización de fluorescencia en presencia
15 de sales de cinc para la detección de fosfopéptidos en ensayos de actividad cinasa. Kristjansdottir y Rudolph, 316 Anal. Biochem. 41 (2003) describen un ensayo de polarización de fluorescencia para la detección de sustratos proteicos nativos de cinasas. Sugden y col., patente de EEUU N° 6.110.750 describen un procedimiento para la detección de *Mycobacterium bovis* por polarización de fluorescencia.

Las ventajas de los ensayos de polarización de fluorescencia incluyen el hecho que son homogéneos - no requieren una etapa de separación y no requieren la fijación del sustrato a una fase inmovilizada. Además, los valores de la polarización pueden medirse de forma repetida, sin necesidad de consumir la muestra o el sustrato. Además, la polarización de fluorescencia es una técnica sensible que puede usarse para medir valores de polarización de fluoróforos desde niveles picomolares y micromolares bajos incluso hasta del orden atomolar. La polarización es también independiente de la intensidad de la fluorescencia.

25 En particular, la polarización de fluorescencia (P) y la anisotropía (r) se definen de la siguiente manera:

$$30 \text{ Polarización} = P = \frac{I_{\text{Vertical}} - I_{\text{Horizontal}}}{I_{\text{Vertical}} + I_{\text{Horizontal}}}$$

y

$$35 \text{ Anisotropía} = r = \frac{I_{\text{Vertical}} - I_{\text{Horizontal}}}{I_{\text{Vertical}} + 2 * I_{\text{Horizontal}}}$$

40 donde I_{vertical} es la intensidad de la luz de emisión paralela al plano de la luz de excitación e $I_{\text{Horizontal}}$ es la intensidad de la luz de emisión perpendicular al plano de la luz de excitación. P y r, al ser relaciones de intensidades de luz, son adimensionales. Los datos experimentales pueden expresarse en unidades de milipolarización (mP), donde 1 unidad de polarización = 1000 unidades mP, o en unidades de milianisotropía (mA), donde 1 unidad de anisotropía = 1000 unidades mA.

45 En el contexto de la polarización de fluorescencia, la polarización puede expresarse en parte como la relación que incluye el tiempo de vida de la fluorescencia y cuán rápido rota un fluoróforo en el tiempo entre la excitación y la emisión. Los principales factores que controlan la rotación son el volumen molar (V), la temperatura absoluta (T) y la viscosidad (η). El tiempo de correlación rotacional (θ) y el tiempo de relajación rotacional (ρ_0) se toman del trabajo de Perrin y Weber. En particular, el tiempo de correlación rotacional (θ) se toma de la ecuación de Perrin de la siguiente manera:

$$55 \left(\frac{1}{P} - \frac{1}{3} \right) = \left(\frac{1}{P_0} - \frac{1}{3} \right) * (1 + \tau / \theta)$$

60 y se define como: Tiempo de correlación rotacional

$$65 (\theta) = \frac{\eta V}{RT}$$

ES 2 338 368 T3

Además, el tiempo de relajación rotacional (ρ_0) se toma de la ecuación de Perrin/Weber, de la siguiente manera:

$$\left(\frac{1}{\rho} - \frac{1}{3}\right) = \left(\frac{1}{\rho_0} - \frac{1}{3}\right) * (1 + 3\tau / \rho)$$

y se define como: Tiempo de relajación rotacional, donde R es la constante de los gases, τ es el tiempo de vida de la fluorescencia, ρ es la polarización, y ρ_0 es la polarización limitante.

$$(\rho_0) = \frac{3\eta V}{RT}$$

De lo anterior, puede verse que, cuando se mantienen constantes el tiempo de vida, la viscosidad y la temperatura, el volumen molecular (y por consiguiente la polarización o anisotropía) determina la rotación. A mayor volumen molecular, más lenta será la rotación de la molécula y mayores los valores de polarización y anisotropía. Además, como resulta evidente de las ecuaciones anteriores, el tiempo de relajación rotacional será exactamente tres veces mayor que el tiempo de correlación rotacional.

Asimismo, la FRET (transferencia de energía de resonancia de fluorescencia) es un fenómeno que ya se ha utilizado ampliamente en el ensayo de moléculas y de interacciones moleculares. La transferencia de energía fluorescente requiere un fluoróforo “donador” que absorbe energía lumínica de una longitud de onda dada, y un fluoróforo “aceptor” que recibe la energía resonante sin la emisión de luz de la oscilación de la molécula donadora excitada. Una vez que se ha transferido tal energía, la molécula donadora regresa a su estado basal y la molécula aceptora se excita, y por consiguiente libera un fotón de luz que permite que regrese a su estado basal.

Como la FRET requiere la transferencia de energía desde una molécula donadora a una molécula aceptora, el fenómeno de FRET es dependiente de la distancia; la eficacia de la FRET depende de la inversa de la sexta potencia de la separación intermolecular, que la hace útil en distancias comparables a las dimensiones de las macromoléculas biológicas. Esto significa que las moléculas de los colorantes deben estar separadas por no más de aproximadamente 0,5 nm (5 Angstroms) o aproximadamente 1 nm (10 Angstroms) o aproximadamente 10 nm (100 Angstroms) o de preferencia desde no más de aproximadamente 2 hasta aproximadamente 10 nm (aproximadamente 20 hasta aproximadamente 100 Angstroms) o aproximadamente 5 hasta aproximadamente 10 nm (aproximadamente 50 hasta aproximadamente 100 Angstroms) o aproximadamente 5 hasta aproximadamente 8 nm (aproximadamente 50 hasta aproximadamente 80 Angstroms). Es también importante en la elección de los pares fluoróforo donador/aceptor adecuados que el espectro de absorción del aceptor se superponga con el espectro de emisión de fluorescencia del donador. Finalmente, los momentos dipolares de transición del donador y del aceptor deberán ser aproximadamente paralelos. Véase por ejemplo, el sitio web de Invitrogen, y búsquese en probes.invitrogen.com/handbook/.

Una multitud de proveedores de reactivos de investigación bioquímica y herramientas de investigación ofrecen productos en venta que utilizan FRET como un procedimiento para detectar la proximidad de características moleculares y/o celulares entre sí. Por ejemplo, el uso de FRET está bien establecido en ciertos ensayos de transducción de señales, circulación de proteínas, expresión genética y ensayos de proteasas.

A pesar del uso conjunto de FRET y las proteínas fluorescentes, existe una necesidad de otros ensayos homogéneos, rápidos y diferentes, en aplicaciones que incluyen la selección de alto rendimiento, ensayos de control de calidad y de seguridad y como una herramienta científica básica para detectar proximidad molecular. De preferencia tales procedimientos podrán controlarse en tiempo real.

La solicitud de patente 10/948097 presentada como U.S. 7.399.607 con el título “Fluorescent Polarization Assays for Determining Clostridial Toxin Activity”, presentada el 22 de septiembre de 2004, tiene autores de la invención comunes y el mismo beneficiario que la presente solicitud. La solicitud citada está dirigida entre otras cosas, al uso de DARET para la detección y medición de la actividad proteasa, en particular la actividad de neurotoxinas procedentes de, por ejemplo, *Clostridium botulinum* y *Clostridium tetanii*.

La presente invención está dirigida a un procedimiento nuevo para detectar y/o medir diferencias en la distancia entre dos o más características moleculares. El procedimiento, al que se le da el nombre de despolarización tras transferencia de energía de resonancia (DARET), se basa en la detección de cambios en el estado de polarización de la luz absorbida por un fluoróforo y emitida por un segundo fluoróforo en analitos marcados.

Como se indicó anteriormente, la fluorescencia es la luz emitida por un átomo o molécula tras una duración finita posterior a la absorción de energía electromagnética. Específicamente, la luz emitida surge de la transición de las especies excitadas desde su primer nivel de singlete electrónico excitado hasta su nivel electrónico basal.

En la detección convencional basada en la fluorescencia, un fluoróforo sólo será capaz de absorber la luz de excitación si sus momentos dipolares de absorción (que tienen una dirección fija en el marco molecular del fluoróforo)

están aproximadamente alineados con el vector eléctrico de la luz. Este proceso se denomina fotoselección. El principio de operación de un procedimiento basado en la fluorescencia es simplemente medir la cantidad de fotones emitidos desde el fluoróforo tras la excitación, un término denominado intensidad de la fluorescencia.

5 Los procedimientos que usan detección convencional basada en la fluorescencia incluyen, por ejemplo, la fluorescencia tradicional y la transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET). En la fluorescencia tradicional, una luz excita directamente el fluoróforo, que emite luz a medida que retorna al estado basal. En la FRET, la excitación del fluoróforo aceptor tiene lugar cuando la energía de estado excitado de un fluoróforo donador se transfiere al aceptor por acoplamiento intermolecular dipolo-dipolo de largo alcance. En la FRET, la eficacia de la transferencia de energía depende de la extensión de la superposición espectral del espectro de emisión del donador y del espectro de absorción del aceptor así como de la distancia entre las moléculas del donador y del aceptor y la orientación relativa del dipolo de emisión del donador y del dipolo de absorción del aceptor. La luz emitida por el fluoróforo aceptor tiene menos energía que la luz absorbida (o emitida) por el fluoróforo donador, y por consiguiente tiene una longitud de onda diferente que la luz emitida por el donador solo.

15 En la detección de fluorescencia basada en la polarización (FP), la luz de excitación se polariza, que significa que la dirección del vector eléctrico de la luz tiene una única dirección plana. La polarización de la luz emitida por una población de fluoróforos dependerá del grado de rotación que cada fluoróforo de esa población experimente durante su tiempo de vida de estado excitado. Los únicos fluoróforos que se excitan por la luz polarizada serán los fluoróforos cuyos momentos de dipolos de absorción estén aproximadamente alineados con esta luz polarizada. Como tal, la FP no detecta la intensidad de fluorescencia, sino que en su lugar determina el grado de rotación del fluoróforo entre la excitación y la emisión.

20 Como principio general, a mayor volumen ocupado por una molécula, o a mayor viscosidad del disolvente, más lentamente rotará la molécula antes de que el fluoróforo excitado emita la luz. Por consiguiente, cuando el fluoróforo está girando lentamente, con relación a su tiempo de vida de estado excitado, hay una mayor probabilidad de que la luz emitida tenga aún su vector eléctrico aproximadamente alineado con la dirección de la excitación polarizada y, por consiguiente, la polarización de esta emisión será alta. Por el contrario, cuanto menor volumen ocupe una molécula, o cuanto menor sea la viscosidad del disolvente, más rotará esa molécula en el espacio antes de que el fluoróforo excitado emita la luz. En este escenario de rotación rápido, hay una posibilidad disminuida de que la luz emitida tenga su vector eléctrico aproximadamente alineado con la dirección de la excitación polarizada y, por consiguiente, la polarización de esta emisión será baja.

25 En la detección basada en la despolarización tras transferencia de energía de resonancia (DARET), la luz polarizante excita el fluoróforo donador y el fluoróforo donador excitado es capaz de transferir su energía de estado excitado a un fluoróforo aceptor que esté en estrecha proximidad. Sin embargo, el fluoróforo aceptor usualmente tendrá una orientación diferente con relación a la molécula donadora y por consiguiente su momento dipolar de absorción no está por lo general alineado con el dipolo de emisión del donador. En esta situación, la emisión de un fluoróforo aceptor tendrá una polarización más baja que la característica del fluoróforo donador. Por consiguiente, la luz emitida desde el fluoróforo aceptor tendrá un vector eléctrico que no está alineado con la dirección de la luz de excitación polarizada.

30 Tras la separación del fluoróforo donador y el fluoróforo aceptor, sin embargo, la situación es diferente. La única emisión del fluoróforo aceptor que puede observarse en este caso es de los fluoróforos aceptores que son directamente excitados por la luz polarizante porque los fluoróforos aceptores están ahora muy distantes del fluoróforo donador para que tenga lugar la transferencia de energía de resonancia. En los Ejemplos que se muestran en el presente documento, el fluoróforo aceptor tendrá una polarización más alta que la característica de la fluorescencia que surge tras transferencia de energía. El resultado final es que la polarización tras la separación será mayor que la polarización antes de la separación.

35 Por consiguiente, la DARET usa la orientación no paralela de los momentos dipolares que surgen desde los fluoróforos donador y aceptor para medir los cambios de polarización, más que, como en la FRET, la relación de intensidad de fluorescencia obtenida midiendo el máximo de emisión del fluoróforo donador y el fluoróforo aceptor. Como tal, la DARET mide el cambio en la luz de polarización que es emitida por el fluoróforo aceptor. Aunque en este procedimiento también puede aparecer un cambio en la intensidad de la fluorescencia de los fluoróforos donador y aceptor, como en la FRET, o de relajación rotacional, como en la FP, la DARET no se basa en la intensidad de la fluorescencia ni en la relajación rotacional en su esquema de detección.

40 El uso de DARET ha proporcionado varias ventajas. Una ventaja es que la naturaleza absoluta de la medición no se basa en ninguna plataforma particular de instrumento usada para obtener los datos. Esta característica contrasta con los ensayos FRET basados en intensidad de fluorescencia que tendrán diferentes relaciones de intensidad según la instrumentación precisa utilizada. También, DARET no es sensible al tamaño o al volumen real de las especies emisoras, mientras que las mediciones normales de FP se basan en un cambio significativo de las velocidades rotacionales de los fluoróforos antes y después de que tenga lugar el cambio de la distancia entre las características moleculares, tales como la unión de ligando a receptor o la escisión por proteasa.

45 Por consiguiente, en una forma de realización, la presente invención llega a un procedimiento para determinar la proximidad de dos o más características moleculares en una muestra, que comprende poner en contacto en dicha muestra, una primera característica molecular marcada con un fluoróforo donador que tiene un primer espectro de

ES 2 338 368 T3

absorción y un primer espectro de emisión, y una segunda característica molecular marcada con un fluoróforo aceptor que tiene un segundo espectro de absorción que se superpone con el primer espectro de emisión y un segundo espectro de emisión; irradiar dicha muestra con luz plana polarizada a una longitud de onda dentro de dicho primer espectro de absorción; detectar la polarización de fluorescencia de la muestra a una longitud de onda dentro de dicho segundo espectro de emisión; y correlacionar un cambio en la transferencia de energía y en la polarización con un cambio en la proximidad de la primera y la segunda características moleculares entre ellas durante el tiempo o con relación a un control.

En una forma de realización opcional, el fluoróforo aceptor se une a un grupo voluminoso eficaz para al menos restringir en alguna medida la rotación libre del momento dipolar del fluoróforo aceptor. En estos aspectos de la invención la presencia del grupo voluminoso puede mejorar la detección de cambios en la proximidad de dos o más características moleculares, tal como por el aumento de la sensibilidad o del intervalo dinámico del ensayo.

Por consiguiente, otra forma de realización de la invención de ejemplo y opcional, incluye un procedimiento para determinar si dos o más características moleculares están o no en proximidad, que comprende: poner en contacto, en una fase fluida, una primera característica molecular marcada con un fluoróforo donador que tiene un primer espectro de absorción y un primer espectro de emisión, y una segunda característica molecular marcada con un fluoróforo aceptor que tiene un segundo espectro de absorción que se superpone con el primer espectro de emisión, en el que, cuando el fluoróforo donador es excitado con luz polarizada en un primer plano bajo condiciones que permiten la transferencia de energía de resonancia entre el fluoróforo donador y el fluoróforo aceptor, el fluoróforo aceptor emite luz despolarizada con respecto a dicho primer plano, comparado con la luz polarizada emitida por dicho fluoróforo aceptor bajo condiciones que no permiten la transferencia de energía de resonancia, en el que una disminución en la transferencia de energía y un aumento en la polarización con el tiempo o con relación a un control indican que la distancia entre la primera y la segunda característica ha aumentado, mientras que un aumento en la transferencia de energía y una disminución en la polarización con el tiempo o relación a un control indican que la distancia entre la primera y la segunda característica ha disminuido.

En otras formas de realización, la presente invención llega a un procedimiento para determinar si dos o más características moleculares en una muestra están próximas, que comprende: poner en contacto en dicha muestra, una primera característica molecular marcada con un fluoróforo donador que tiene un primer espectro de absorción y un primer espectro de emisión, y una segunda característica molecular marcada con un fluoróforo aceptor que tiene un segundo espectro de absorción que se superpone con el primer espectro de emisión y un segundo espectro de emisión; irradiar dicha muestra con luz plana polarizada a una longitud de onda dentro de dicho primer espectro de absorción; detectar la polarización de la fluorescencia de la muestra a una longitud de onda dentro de dicho segundo espectro de emisión; y correlacionar un cambio en la transferencia de energía y en la polarización con un cambio en la proximidad de la primera y segunda características moleculares entre ellas, dicho cambio con relación a la transferencia de energía y a la polarización de la luz emitida de la misma muestra en un tiempo diferente o de un control.

En variaciones de esta forma de realización de la invención, el procedimiento puede contener uno o más de los siguientes elementos adicionales, en las que los elementos concuerdan unos con otros:

La forma de realización en la que la primera y segunda características molecular están comprendidas en la misma molécula.

La forma de realización en la que la molécula comprende una secuencia de aminoácidos.

La forma de realización en la que la primera característica molecular está comprendida en una mitad amino terminal de dicha secuencia de aminoácidos.

La forma de realización en la que la primera característica molecular está comprendida en una mitad carboxilo terminal de dicha secuencia de aminoácidos.

La forma de realización en la que al menos uno de dichos fluoróforo donador y aceptor comprende un polipéptido unido a dicha molécula.

La forma de realización en la que al menos un fluoróforo donador o aceptor está unido a dicha molécula por un enlace peptídico.

La forma de realización en la que al menos un fluoróforo comprende un polipéptido seleccionado del grupo constituido por una proteína fluorescente verde, una proteína fluorescente azul, una proteína fluorescente roja, una proteína fluorescente cian y una proteína fluorescente amarilla.

La forma de realización en la que cualquiera de un fluoróforo donador y uno aceptor o ambos comprenden un polipéptido unido a dicha molécula.

La forma de realización en la que al menos uno de un fluoróforo donador y uno aceptor se selecciona del grupo constituido por un colorante Alexa Fluor®; fluoresceína; un derivado de fluoresceína; diaminotriazinilamino fluoresceína (DTAF); un derivado biarsenicado de fluoresceína; colorante de unión a la horquilla arsenicada de la fluoresceína

ES 2 338 368 T3

(FIAsHTM); colorante rojo biarsenicado (ReAsHTM); carboxifluoresceína (FAM); Texas RedTM; tetrametilcarboxirrodamina (TMR); carboxi-x-rodamina (ROX); verde de rodamina; Oregon Green 488; BODIPY-TR[®]; BODIPY-TMR[®]; BODIPY-FL[®]; Cy3, Cy3BTM y Dansilo.

5 La forma de realización en la que al menos un fluoróforo donador y aceptor se une a una característica molecular por medio de un conector, que puede ser un reactivo bifuncional.

La forma de realización en la que un conector de unión contiene un resto reactivo seleccionado del grupo constituido por tiol, haloacetilo, N-hidroxisuccinamida, vinil sulfona y maleimida.

10 La forma de realización en la que al menos una de la primera y la segunda características moleculares comprende una región de polinucleótido.

15 La forma de realización en la que al menos una característica molecular comprende un lípido o un resto hidrato de carbono.

La forma de realización en la que la primera y la segunda características moleculares están contenidas en diferentes moléculas o estructuras celulares.

20 La forma de realización en la que al menos una de dicha primera o segunda característica molecular está comprendida en una membrana celular.

La forma de realización en la que una de dichas primera y segunda características moleculares está comprendida en una vesícula.

25 La forma de realización en la que una de dichas primera y segunda características moleculares comprende un receptor.

30 La forma de realización en la que una de dichas primera y segunda características moleculares comprende una región variable de un anticuerpo.

La forma de realización en la que una de dichas primera y segunda características moleculares comprende un ligando de receptor.

35 La forma de realización en la que una de dichas primera y segunda características moleculares comprende un polipéptido.

La forma de realización en la que una de dichas primera y segunda características moleculares comprende un lípido.

40 La forma de realización en la que dicho lípido comprende un fosfolípido.

La forma de realización en la que al menos una de la primera y la segunda características moleculares comprende colesterol o un derivado de colesterol.

45 La forma de realización en la que dicho lípido comprende una prostaglandina o un derivado de prostaglandina.

La forma de realización en la que al menos una de dicha primera o segunda característica molecular comprende una región de polinucleótido.

50 La forma de realización en la que una de dichas primera y segunda características moleculares comprenden una región de polinucleótido.

55 La forma de realización en la que al menos un fluoróforo donador o aceptor está unido a al menos la primera o la segunda característica molecular por un enlace peptídico.

60 La forma de realización en la que la etapa de correlación comprende correlacionar un aumento en la polarización con una disminución en la distancia entre la primera y segunda características moleculares a lo largo del tiempo o con relación a un control, y correlacionar una disminución en la polarización con un aumento en la distancia entre la primera y segunda características a lo largo del tiempo o con relación a un control.

65 La forma de realización en la que la etapa de correlación comprende correlacionar una disminución en la polarización con un aumento en la distancia entre la primera y segunda características moleculares a lo largo del tiempo o con relación a un control, y correlacionar un aumento en la polarización con un aumento en la distancia entre la primera y segunda características a lo largo del tiempo o con relación a un control.

En algunas formas de realización de la invención, el resultado del ensayo puede ser que tenga lugar una disminución en la polarización a medida que aumenta la distancia entre la primera y la segunda característica molecular; en otras

formas de realización de la invención el resultado del ensayo puede ser que tenga lugar un aumento en la polarización a medida que aumenta la distancia entre la primera y la segunda característica molecular. Por consiguiente, los presentes procedimientos proporcionan, en una forma de realización más amplia, un cambio en la polarización de luz emitida por un fluoróforo aceptor cuando aumenta la distancia entre el mismo y el fluoróforo donador; los fluoróforos donador y aceptor están unidos entre sí para separar las características moleculares.

Por “característica molecular” se entiende una región molecular o celular cuya proximidad a una o más regiones moleculares o celulares diferentes busca determinarse en los procedimientos de la presente invención. Las diferentes características moleculares pueden ser partes de la misma molécula, por ejemplo, sin limitación, los extremos amino y carboxilo terminales de una proteína, dos sitios internos dentro de una proteína, los extremos 5’ y 3’ de una molécula de polinucleótido o dos sitios internos de una molécula de polinucleótido. Como alternativa, diferentes características moleculares pueden ser parte de diferentes moléculas; un ejemplo de este aspecto incluye pares anticuerpo/antígeno, proteína de unión de ADN y una región de unión de polinucleótido como un promotor, región represora o potenciadora, un par lípido/proteína de membrana o pares ligando/receptor. Además, una característica molecular puede ser un orgánulo celular, tal como, por ejemplo, la membrana plasmática, en la que el marcador puede intercalarse o asociarse de otra manera con la característica molecular sin unirse necesariamente de manera covalente a ninguna molécula. En tal uso, la asociación de otra característica molecular marcada (por ejemplo, una característica molecular comprendida en una proteína dirigida a la membrana) con la membrana plasmática podría, bajo las condiciones descritas en la presente solicitud, dar como resultado DARET y un cambio en la polarización comparado con la característica molecular marcada en la proteína no asociada.

Por “poner en contacto”, como se usa en las reivindicaciones, se entiende que las características moleculares se juntan bajo condiciones que permiten su interactividad (hasta un nivel eficaz para permitir la transferencia de energía de resonancia entre los marcadores), ya sea inicialmente, durante un período de tiempo, o en comparación con un control. Por consiguiente, poner en contacto las características moleculares marcadas cuya proximidad intramolecular se busca determinar puede simplemente implicar marcar dos o más características moleculares diferentes de la misma molécula. Como alternativa, poner en contacto, por ejemplo, dos características moleculares cuya proximidad intermolecular se busca determinar puede implicar mezclar las características moleculares que están comprendidas en diferentes moléculas o loci celulares bajo condiciones en las que su proximidad molecular diferirá con el tiempo o con referencia a un control.

Una “fase fluida” puede incluir una fase gaseosa o una fase líquida, y poner en contacto características moleculares en una fase fluida requiere solamente que una de las características moleculares esté en una fase fluida. Por consiguiente, dicho contacto puede significar que ambas características están en la fase gaseosa, que ambas están en la fase líquida, o que una característica molecular está en una fase seleccionada del grupo constituido por gas y líquido, y que la otra característica molecular se selecciona de una fase diferente fase seleccionada del grupo constituido por gas, líquido y sólido.

Por ejemplo, diferentes características moleculares de la misma molécula pueden marcarse con diferentes fluoróforos capaces de actuar como parejas de DARET como se establece en el presente documento y, como es conocido de otra manera por los expertos en la técnica, de una manera que permita que estas características se pongan en estrecho contacto una con la otra para que la transferencia de energía de resonancia pueda tener lugar entre los marcadores fluorescentes. La posterior digestión, escisión o destrucción de la molécula puede dar como resultado el cese de la transferencia de energía de resonancia entre estas características moleculares. Como ejemplo, una proteína puede marcarse con dos marcadores fluorescentes, uno en o cerca del extremo amino terminal de la proteína y el otro en o cerca del extremo carboxilo terminal. La proteólisis en un enlace peptídico entre las dos características moleculares dará como resultado la disociación de los marcadores, y el fin de la transferencia de energía de resonancia entre estos marcadores.

En otro ejemplo de poner en contacto características moleculares, puede introducirse un ácido nucleico en una célula bajo condiciones que permitan la expresión de una proteína codificada. La proteína puede ser una proteína de fusión en la que, por ejemplo, se introduce una secuencia codificadora de la proteína fluorescente verde (GFP) en el extremo amino o carboxilo terminal. Si las membranas plasmáticas de las células huésped se cargan con un colorante fluorescente lipófilo, la migración de la proteína expresada a la membrana puede detectarse por un cambio en DARET. Además, la asociación de la proteína con la membrana celular también dará como resultado un cambio en la polarización de la luz emitida por el fluoróforo asociado a la membrana, por despolarización de la transferencia de energía, como se describió anteriormente.

En aún otro ejemplo, puede marcarse una característica molecular comprendida en un antígeno con un aceptor fluorescente. Se diseña, expresa y purifica un anticuerpo sintético de cadena única en el que está presente un resto donador de GFP en una característica molecular. La asociación del antígeno y el anticuerpo permite la FRET entre los marcadores, y la asociación del antígeno con la proteína de fusión GFP/anticuerpo causa una diferencia en la polarización fluorescente debida a la transferencia de energía resultante entre el donador y el aceptor alineados de manera imperfecta.

Aunque sin limitar la invención, y sin desear estar limitados por la teoría, los solicitantes creen que ciertos cambios en la polarización de la fluorescencia son en parte una indicación de diferencias en la orientación de una molécula (realmente, diferencias en la orientación del momento dipolar de un fluoróforo) entre el tiempo en que es excitada por

la luz en o cerca de la máxima absorbancia y algunas veces más tarde cuando esta (u otra molécula fluorescente que es excitada como resultado de la transferencia de energía de resonancia desde la primera) emite luz de una longitud de onda más larga. Por consiguiente, cuando el fluoróforo está, por ejemplo, bloqueado en una forma cristalina, es posible muy poco movimiento del momento dipolar y la luz emitida permanece extremadamente polarizada. Asimismo, en una disolución viscosa, el fluoróforo tiene una capacidad algo restringida para moverse, aunque mucho mayor que cuando está en una forma cristalina, y la luz emitida permanecerá en gran parte polarizada. El momento dipolar de una molécula fluorescente en una disolución acuosa de baja viscosidad tendrá sustancialmente mayor capacidad para rotar que las de cualquiera de los otros dos ejemplos, y la luz emitida resultante estará por consiguiente más despolarizada.

Sólo como ilustración, los solicitantes creen que otro modo en el que pueden inducirse cambios en la polarización fluorescente es cuando hay transferencia de energía de resonancia no radiante entre las moléculas fluorescentes próximas una a la otra. En concentraciones muy altas o bajo otras condiciones adecuadas la transferencia de energía puede tener lugar cuando la luz polarizada plana que incide en una colección de moléculas orientadas aleatoriamente sea sólo absorbida por y excite las moléculas que tengan momentos dipolares orientados en aproximadamente el plano idéntico (o el recíproco) al de la luz de excitación. Estas moléculas excitadas pueden a través de la transferencia de energía de resonancia transferir a continuación el estado excitado a otra molécula que tiene un momento dipolar orientado de manera ligeramente diferente. Cuando la molécula excitada emite luz, la fluorescencia resultante puede tener una orientación no relacionada en absoluto con la orientación de la luz polarizada plana original. Por consiguiente, se observa que la polarización de la luz de excitación está disminuida por la transferencia de energía de resonancia por una molécula excitada a una molécula en estado basal no orientada en exactamente el mismo plano que el de la luz, y la posterior emisión de luz menos polarizada.

Una ventaja de la invención actualmente dada a conocer es el hecho de que la FP tradicional se basa en cambios en la orientación del momento dipolar de un fluoróforo que tienen lugar por la rotación de la molécula entre la excitación y la emisión. Por el contrario, los procedimientos de DARET descritos en el presente documento, que son el resultado de la transferencia de energía no radiante entre moléculas de orientación similar pero diferente, no requieren (pero sin embargo pueden incluir) una diferencia en el volumen de masa o molar entre la primera y la segunda característica molecular.

Como se estableció anteriormente, puede ser importante en ciertas formas de realización de la invención que haya una diferencia en el volumen entre las características moleculares marcadas cuando están en estrecha proximidad y cuando no están en estrecha proximidad. En algunas formas de realización de la invención de menor preferencia, la característica molecular unida al fluoróforo donador tiene un volumen significativamente más bajo cuando no está próxima al fluoróforo aceptor que su volumen aparente cuando está en estrecha proximidad con el fluoróforo aceptor.

En ciertas formas de realización de la invención, tales como en los ensayos de proteasas que usan sustratos polipeptídicos relativamente pequeños, los presentes ensayos pueden tener ventajas a partir del uso de un grupo voluminoso unido a la característica molecular asociada o unido a uno de los fluoróforos; en tal caso también resulta de utilidad, pero no necesariamente esencial, que la característica molecular asociada o unida al otro fluoróforo no esté unida a un grupo voluminoso. La familia de proteínas fluorescentes tales como la proteína fluorescente verde (GFP) puede constituir tales grupos voluminosos, ya que estos polipéptidos forman estructuras terciarias grandes, estables, similares a tubos para proteger los fluoróforos, compuestas por aminoácidos modificados en su interior. Véase por ejemplo, Fang y col., *Nature Biotechnology* 14: 1246-1251 (1996).

En una forma de realización específica, en el presente documento se proporciona además un procedimiento para determinar la presencia o actividad de una proteasa por medio de (a) el tratamiento con una muestra, bajo condiciones adecuadas para la actividad proteasa, de un sustrato de proteasa que contiene (i) un fluoróforo donador; (ii) un aceptor que tiene un espectro de absorbancia que solapa el espectro de emisión del fluoróforo donador; y (iii) una secuencia de reconocimiento de proteasa que contiene un sitio de escisión, en el que el sitio de escisión interviene entre el fluoróforo donador y el aceptor y en el que, bajo las condiciones adecuadas, se exhibe transferencia de energía de resonancia entre el fluoróforo donador y el aceptor; (b) la excitación del fluoróforo donador con luz polarizada plana; y (c) la determinación de la polarización de fluorescencia del sustrato tratado con relación a un sustrato de control, donde un cambio (aumento o disminución) en la polarización de fluorescencia del sustrato tratado comparado con la polarización de fluorescencia del sustrato control es indicador de la presencia o actividad de la proteasa.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra el ensayo de DARET del complejo BoNT/A (900 kDa) con el sustrato GFP-SNAP25-2xBFP en el formato de ensayo basado en cubetas. Las condiciones finales de reacción fueron complejo BoNT/A 200 pM y sustrato 10 μ M. El control negativo contenía el sustrato sin toxina.

La Figura 2 muestra el ensayo de DARET de BoNT/A purificada (150 kDa) con el sustrato GFP-SNAP25-2xBFP en el formato de ensayo basado en cubetas.

La Figura 3 muestra el ensayo de DARET de rLC/A usando el sustrato GFP-SNAP25-2xBFP en un formato de ensayo basado en cubetas.

ES 2 338 368 T3

La Figura 4 muestra un ensayo basado en cubetas de la actividad de BoNT/E usando el ensayo de DARET con el sustrato GFP-SNAP25-2xBFP.

La Figura 5 muestra el ensayo de DARET basado en placas del complejo BoNT/A (900 kDa) con el sustrato de GFP-SNAP25-1 xBFP.

Las Figuras 6, 7, y 8 muestran los ensayos de DARET de BoNT/A pura, BoNT/E y rLC/E respectivamente, en formatos de ensayo similares basados en placas usando el sustrato de GFP-SNAP25-1xBFP.

La Figura 9 muestra los resultados de DARET sobre la escisión de GFP-SNAP25-1xBFP con tripsina añadida.

Descripción detallada

La presente invención proporciona procedimientos para el control de la proximidad de dos o más características moleculares localizadas en la misma molécula o en diferentes moléculas. Por consiguiente, como un ejemplo no limitante, los presentes procedimientos pueden usarse en ensayos de proteasas, en particular los que utilizan un sustrato útil para la análisis de la polarización de fluorescencia, tales como, por ejemplo, uno que tiene al menos un fluoróforo donador y un fluoróforo aceptor, unido cada uno a una característica molecular separada de otra característica molecular por un sitio de escisión de la proteasa. La combinación de transferencia de energía de resonancia y análisis de polarización de fluorescencia da como resultado procedimientos de detección extremadamente sensibles que pueden sufrir menos interferencia por el fondo fluorescente en la muestra que los ensayos tradicionales basados en la FRET. Además, los nuevos procedimientos de la invención pueden realizarse como ensayos homogéneos en fase de disolución y son susceptibles de automatización para formatos de alto rendimiento y análisis en tiempo real sin necesidad del consumo de muestra.

Estos procedimientos son también adecuados para otros análisis de proximidad tales como, sin limitación, estudios de unión de ligando a receptor, estudios de circulación intracelular, localización conjunta de proteínas y otras moléculas, estudios de localización de membrana, ensayos del autofosforilación de cinasas y similares. Véase, por ejemplo, la D. Mochinsky y col., J. Biomol. Screening, volumen 8, 447-452 (2003). De hecho, virtualmente cualquier aplicación de ensayo para la que actualmente pueda usarse la FRET es susceptible de uso en los ensayos de DARET descritos en el presente documento. Por consiguiente, pueden usarse los procedimientos de ensayo de DARET de la presente invención para investigar, por ejemplo y sin limitación:

1) *La estructura y la conformación de las proteínas* (Véase por ejemplo, Jonsson, T. y col., Biochemistry 35: 4795-4802 (1996)); véase por ejemplo, Wells, y col., Method For Identifying Active Domains And Amino Acid Residues In Polypeptides And Hormone Variants, US6428954; Craig, y col., Methods and Compositions Using Protein Binding Partners, US9672198);

2) *La distribución y la disposición espacial de las proteínas* (Véase por ejemplo, Watson, B.S. y col., Biochemistry 34: 7904-7912 (1995));

3) *Interacciones receptor/ligando* (Véase por ejemplo, Berger, W. y col., Biochemistry 33: 1875-11883 (1994); Nakayama y col., Fluorescence Polarization Method, US6432632; Lustig y col., Nuclear Hormone Receptor Drug Screens, US7101681; Huggins, y col., Specific Binding Assay Techniques, US4211762; Sippel y col., Method For The Cellular High-Throughput-Detection Of Receptor Ligand Interactions, US7029905);

4) *Immunoensayos* (Véase por ejemplo, Khanna, P. L y col., Anal. Biochem. 108:156-161 (1980); Magnusson y col., Immunoassay Of Proteins, US4455381; Newman y col., Immunoassay Of Thymosin α ! US4427783; Hammerling y col., Process For Sex Determination In Man By Use Of Monoclonal Antibodies To The H-Y Antigen, US4680258; Forrest y col., Immunoassay Of Antigens, US4659678; Gay, Vitro Diagnostic Methods Using Monoclonal Antibodies Against Connective Tissue Proteins, US4628027; Ota y col., Amyloid- β Protein Aggregation-Regulating Factors, US7029860);

5) *Estructura y conformación de los ácidos nucleicos* (Véase por ejemplo, Clegg, R. M. y col., Biophys. J. 66: 99-109 (1994); Weiss y col., Semiconductor Nanocrystal Probes For Biological Applications And Process For Making And Using Such Probes US6207392);

6) *Ensayos de PCR en tiempo real y detección de SNP* (Véase por ejemplo, Lee, L.G., Biotechniques 27: 342-349 (1999); Myakishev, M. V., Genome Res. 11: 163-169, 2001; Cockerill y col., Detection of Legionella, US6830888; Parkhurst y col., Method For Detecting Point Mutations In DNA Utilizing Fluorescence Energy Transfer, US6248518);

7) *Hibridación de ácidos nucleicos* (Véase por ejemplo, Parkhurst, K.M. y col., Biochemistry 34: 285-292 (1995)); Clark y col., Diagnostics and Therapeutics for Glaucoma, US7033755; Stefano y col., Methods, Kits And Compositions For Detecting And Quantitating Target Sequences US6287772; Gellibolian y col., Methods And Compositions For High Throughput Identification Of Protein/Nucleic Acid Binding Pairs US6713262; Smith y col., Detection Of Herpes Simplex Virus US6958210; Cockerill y col., Detection Of Vancomycin-Resistant Enterococcus spp. US7074598);

ES 2 338 368 T3

- 8) *Distribución y transporte de lípidos* (Véase por ejemplo, Nichols, J.W. y col., J. Biol. Chem. 258: 5368-5371 (1983)); Normant y col., Methods And Compositions For Screening Modulators Of Lipid Kinases, US6723525; Hammock y col., Linoleic Acid Diol And Glucuronide Conjugate Levels As Diagnostic Markers Of Disorders Of Abnormal Regulation Of Cytochrome P450 Metabolism Of Unsaturated Fatty Acids, US6756210; Kreiger y col., Methods For Modulation Of Lipid Uptake, US5925333; Drees y col., Assaying Apparatus, Kit, And Method For Lipids And Associated Enzymes, US7067269; Lusk y col., Monoclonal Antibodies For Assaying Lipid Transfer Proteins, US6423546);
- 9) *Ensayos de fusión de membranas* (Véase por ejemplo, Uster P. S., Methods Enzymol. 221: 239-246 (1993));
- 10) *Detección del potencial de membrana* (Véase por ejemplo, Hoffman, R. y col., Bio-Tek Application Note. http://www.biotek.com/products/tech_res_detail.php?id=:135; Gonzalez, J. E. y col., Biophys. J. 69: 1272-1280 (1995)); Farinas y col., Use Of Nernstein Voltage Sensitive Dyes In Measuring Transmembrane Voltage; US6979553; Tsien y col., Detection Of Transmembrane Potentials By Optical Methods, US6107066; Negulescu y col., Photon Reducing Agents For Reducing Undesired Light Emission In Assays US6214563; Tsien y col., Detection Of Transmembrane Potentials By Optical Methods, US6596522; Tsien y col., Detection Of Transmembrane Potentials By Optical Methods, US6342379);
- 11) *Ensayos de proteasas* (Véase por ejemplo, Matayoshi E. D., y col., Science 247, 954-958 (1990); Shone y col., Toxin Assay US6337386; Auld, Methods for Measuring Kinase Activity US6942987; Darrow y col., Methods for Identifying Modulators of Serine Protease EOS, US6806059; Shine y col., Substrate Peptides And Assays For Detecting And Measuring Proteolytic Activity Of Serotype A Neurotoxin From Clostridium Botulinum, US6504006; Darrow y col., DNA encoding the human serine protease T, US6458564; Darrow y col., Zymogen Activation System US6420157); y
- 12) *Indicadores para AMP cíclico* (Véase por ejemplo, Adams S.R. y col., Optical Probes for Cyclic AMP, Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity, páginas 133-149 (Mason WT., Ed. (1993) Tomlinson, Cloning And Characterization Of A Human Adenylyl Cyclase, US7115570; Reymond, Use Of The Regulatory Subunit Of The Camp Dependent Protein Kinase (Pka) From Dictyostelium For Camp Measurements US6573059; Garman, Fluorescence Energy Transfer Substrates; US6291201).

En un aspecto de la invención particularmente útil, los procedimientos presentes pueden ser útiles para determinar la presencia o la actividad de toxinas de clostridios, incluidas las toxinas botulínicas de todos los serotipos así como las toxinas tetánicas. Estos aspectos de la invención, que se basan en un sustrato de toxina de clostridios útil para la análisis DARET, reduce la necesidad de estudios de toxicidad en animales y pueden usarse para analizar en muestras brutas y a granel la neurotoxina de clostridios así como toxinas bicatenarias o monocatenarias altamente purificadas, complejos de toxinas, productos formulados de toxina o los derivados de toxinas, tales como los que se dan a conocer en la Patente de EEUU N° 6.843.998.

En los procedimientos DARET de la invención, el procedimiento implica una característica molecular que incluye, en parte, un fluoróforo donador o un fluoróforo aceptor, o ambos. Como se utiliza en el presente documento, el término “fluoróforo” significa una molécula que, cuando se irradia con luz de cierta longitud de onda, emite luz de una longitud de onda diferente. El término fluoróforo es sinónimo en la técnica del término “fluorocromo”. Un “fluoróforo donador” es una molécula que, cuando se irradia con luz de cierta longitud de onda transfiere energía al aceptor a través de transferencia de energía de resonancia no radiante. Según se utiliza en el presente documento, el término “fluoróforo aceptor” significa una molécula que puede absorber energía de, y tras la excitación de, un fluoróforo donador.

Se prevé que cualquiera y todos los fluoróforos puedan servir como fluoróforo donador o fluoróforo aceptor para DARET, incluidos, sin limitación, una proteína fluorescente, una proteína de unión a fluoróforo y un colorante fluorescente. Un experto en la técnica sabe que éstos y otros fluoróforos adecuados para DARET son conocidos en la técnica y pueden ser útiles en los procedimientos de la invención.

Un fluoróforo donador o un fluoróforo aceptor dados a conocer en la presente memoria descriptiva puede ser, en parte, una proteína fluorescente. Según se utiliza en el presente documento, el término “proteína fluorescente” significa un péptido que absorbe energía luminosa de determinada longitud de onda y emite energía luminosa de una longitud de onda diferente y abarca los que emiten en una diversidad de espectros, incluidos el violeta, azul, cian, verde, amarillo, naranja y rojo, véase la Tabla 1. Se prevé que las proteínas fluorescentes derivadas de cualquiera de una diversidad de especies puedan ser útiles en aspectos de la presente invención incluidas, pero no limitadas a, proteínas fluorescentes de *Aequorea*, proteínas fluorescentes de *Anemonia*, proteínas fluorescentes de *Anthozoa*, proteínas fluorescentes de *Discosoma*, proteínas fluorescentes de *Entacmeae*, proteínas fluorescentes de *Heteractis*, proteínas fluorescentes de *Montastrea*, proteínas fluorescentes de *Renilla*, proteínas fluorescentes de *Zoanthus*, y proteínas fluorescentes de otros organismos. Las proteínas fluorescentes útiles en la invención abarcan, sin limitación, proteínas fluorescentes naturales, variantes que se presentan en la naturaleza y variantes genéticamente modificadas, producidas, por ejemplo, por mutagénesis aleatoria o diseñadas de manera racional y fragmentos de peptídicos activos derivados de un organismo. Las proteínas fluorescentes útiles en aspectos de la invención incluyen, por ejemplo, las que se han modificado genéticamente para un rendimiento superior tales como, sin limitación, longitudes de onda de excitación o emisión alteradas; brillo mejorado, resistencia al pH, estabilidad o velocidad de formación de proteínas fluorescentes; fotoactivación; o fotoblanqueamiento u oligomerización reducidas, véase por ejemplo, Brendan P. Cormack y col., FACS-

optimized Mutants of the Green Fluorescent Protein (GFP), Patente de EEUU N° 5.804.387 (8 de septiembre de 1998); Roger Y. Tsien & Roger Heim, Modified Green Fluorescent Proteins, U Patente de EEUU N° 6.800.733 (5 de octubre de 2004); Roger Y. Tsien y col., Long Wavelength Engineered Fluorescent Proteins, Patente de EEUU N° 6.780.975 (24 de agosto de 2004); y Roger Y. Tsien y col., Fluorescent Protein Sensors For Measuring the pH of a Biological Sample, Patente de EEUU N° 6.627.449 (Sep. 30, 2003). Se entiende que una proteína fluorescente puede modificarse para una mayor expresión proteica convirtiendo los codones de tipo silvestre en otros codones que se utilizan de manera más eficaz en la célula que sirve para expresar el sustrato de toxina de clostridios, véase por ejemplo, Brian Seed and Jurgen Haas, High Level Expression of Proteins, Patente de EEUU N° 5.795.737 (18 de agosto de 1998). Una proteína fluorescente puede unirse de manera operativa a una característica molecular que comprende un polipéptido para crear una proteína de fusión usando técnicas convencionales de genética molecular. Además, una proteína fluorescente puede unirse específicamente al extremo amino o carboxilo terminal de una característica molecular que comprende un polipéptido usando procedimientos químicos muy conocidos, véase, por ejemplo, Chemical Approaches to Protein Engineering, en *Protein Engineering: A Practical Approach* (Eds. Rees y col., Oxford University Press, 1992).

15

TABLA 1. Excitación y emisión máximas de proteínas fluorescentes de ejemplo		
Proteína fluorescente	Excitación máxima (nm)	Emisión máxima (nm)
EBFP	380	440
ECFP	439	476
AmCyan	458	489
AcGFP	475	505
ZsGreen	493	505
Vitality [®] hrGFP	500	506
EGFP	484	510
Monster Green [®]	505	515
EYFP	512	529
ZsYellow	529	539
DsRed-Express	557	579
DsRed2	563	582
DsRed	558	583
AsRed2	576	592
HcRed1	588	618

También se prevé que cualquiera de una diversidad de fragmentos proteicos activos de una proteína fluorescente puedan ser útiles en los aspectos de la presente invención con la condición de que estos fragmentos activos retengan la capacidad de emitir energía lumínica en un intervalo adecuado para el funcionamiento apropiado de aspectos de la presente invención, tales como, por ejemplo 420-460 nm para las proteínas fluorescentes que emiten azul, 460-500 nm para las proteínas fluorescentes que emiten cian, 500-520 nm para las proteínas fluorescentes que emiten verde, 520-550 nm para las proteínas fluorescentes que emiten amarillo y para 550-740 nm para las proteínas fluorescentes que emiten rojo. Por consiguiente, los aspectos de esta forma de realización pueden incluir fragmentos activos de proteínas fluorescentes que retengan la capacidad de emitir energía lumínica en un intervalo adecuado para el funcionamiento apropiado de aspectos de la presente invención que tengan una longitud de, por ejemplo, al menos 50 aminoácidos, al menos 60 aminoácidos, al menos 70 aminoácidos, al menos 80 aminoácidos, al menos 90 aminoácidos, al menos 100 aminoácidos, al menos 125 aminoácidos, al menos 150 aminoácidos, al menos 175 aminoácidos y al menos 200 aminoácidos. Otros aspectos de esta forma de realización, pueden incluir fragmentos activos de proteínas fluorescentes que retengan la capacidad de emitir energía lumínica en un intervalo adecuado para el funcionamiento apropiado de los aspectos de la presente invención que tengan una longitud de, por ejemplo, como máximo 50 aminoácidos, como máximo 60 aminoácidos, como máximo 70 aminoácidos, como máximo 80 aminoácidos, como máximo 90 aminoácidos, como máximo 100 aminoácidos, como máximo 125 aminoácidos, como máximo 150 aminoácidos, como máximo 175 aminoácidos y como máximo 200 aminoácidos.

65

ES 2 338 368 T3

Por consiguiente, en una forma de realización, un fluoróforo donador o un fluoróforo aceptor es una proteína fluorescente. En aspectos de esta forma de realización, un fluoróforo donador o un fluoróforo aceptor es una proteína fluorescente azul, una proteína fluorescente cian, una proteína fluorescente verde, una proteína fluorescente amarilla, una proteína fluorescente roja o una proteína fluorescente ultravioleta. En otros aspectos de esta forma de realización, un fluoróforo donador y un fluoróforo aceptor pueden ser ambos una proteína fluorescente azul, una proteína fluorescente cian, una proteína fluorescente verde, una proteína fluorescente amarilla, una proteína fluorescente roja o una proteína fluorescente ultravioleta.

Un fluoróforo donador o un fluoróforo aceptor dados a conocer en la presente memoria descriptiva pueden ser, en parte, una proteína de unión a fluoróforo que posteriormente se asocia con un fluoróforo. Una proteína de unión a fluoróforo establece un enlace covalente, o una fuerte interacción no covalente, con el fluoróforo en una reacción química o bioquímica selectiva. Los ejemplos no limitantes de tales proteínas de unión a fluoróforo y los correspondientes fluoróforos incluyen el sistema tetracisteína biarsenicada, véase, por ejemplo, el B. Albert Griffin y col., Specific covalent labeling of recombinant protein molecules inside live cells, 281 (5374) *Science* 269-272 (1998); y B. Albert Griffin y col., Fluorescent labeling of recombinant proteins in living cells with FIAsH, 327 *Methods Enzymol.* 565-578 (2000); el sistema alquilganina-DNA-alkiltransferasa (AGT), véase, por ejemplo, Antje Keppler y col, A General Method for the Covalent Labeling of Fusion proteins with Small Molecules *in vivo*, 21 (1) *Nat. Biotech* 86-89 (2003); Antje Keppler y col, Labeling of fusion proteins of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase with small molecules *in vivo* and *in vitro*, 32(4) *Methods* 437-444 (2004); y Antje Keppler y col, Labeling of Fusion Proteins with Synthetic Fluorophores in Live Cells, 101 (27) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 9955-9959 (2004); y el sistema de dehalogenasa. Además, los ejemplos no limitantes de proteínas de unión a fluoróforo y los fluoróforos correspondientes, así como los reactivos bien caracterizados, condiciones y protocolos están fácilmente disponibles de vendedores comerciales que incluyen, sin limitación, TC-FIAsH™ TC-ReAsH™ kit de detección intracelular del marcador Tetracisteína (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA); SNAP-tag™ sistema multipropósito del marcador proteína (Covalys Biosciences AG, Switzerland); y HaloTag™ tecnología de marcación intercambiable (Promega Corp., Madison WI) (véase Tabla 2). Estos protocolos son procedimientos de rutina que están dentro del ámbito de un experto en la técnica y de las enseñanzas del presente documento. Una proteína de unión a fluoróforo puede unirse de manera operativa a una característica molecular que comprende un polipéptido para crear una proteína de fusión usando técnicas convencionales de genética molecular. Además, una proteína de unión a fluoróforo puede unirse específicamente al extremo amino o carboxilo terminal de una característica molecular que comprende un polipéptido usando procedimientos químicos muy conocidos, véase, por ejemplo, *Chemical Approaches to Protein Engineering*, en *PROTEIN ENGINEERING: A PRACTICAL APPROACH* (Eds. Rees y col., Oxford University Press, 1992).

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 2. Excitación y emisión máximas de fluoróforos de ejemplo para proteínas de unión a fluoróforos			
Nombre	Colorante	Excitación máxima (nm)	Emisión máxima (nm)
Sistema de tetracisteína biarsenicada			
FIAsH	proteína de unión a la horquilla de fluoresceína arsenicada	508	528
ReAsH	proteína de unión a la horquilla de resorufina arsenicada	593	608
Sistema AGT/SNAP-Tag			
BG-430	para-bencil guanina dietilaminocumarina	421	444 y 484
BG-DAF	para-bencil guanina diacetilfluoresceína	500	524
BG-505	para-bencil guanina dyomic DY-505-05	504	532
BG-488	para-bencil guanina ATTO 488	506	526
BG-532	para-bencil guanina ATTO 532	536	554
BG-547	para-bencil guanina dyomic DY-547	554	568
TMR-Star	para-bencil guanina tetrametilrodamina	554	580
BG-600	para-bencil guanina ATTO 600	606	626
BG-632	para-bencil guanina dyomic DY-632	636	656
BG-647	para-bencil guanina dyomic DY-647	660	673
BG-732	para-bencil guanina dyomic DY-732	732	474
BG-747	para-bencil guanina dyomic DY-747	752	763
Sistema dehalogenasa/HaloTag™			
Halo Tag cumarina	derivado de cumarina	353	434
Halo Tag diAcFAM	derivado diacetilado de fluoresceína no fluorescente	494	526
Halo Tag TMR	derivado de tetrametilrodamina	555	585

Por consiguiente, en una forma de realización, un fluoróforo donador o un fluoróforo aceptor es una proteína de unión a fluoróforo que interactúa fuertemente con un fluoróforo. En otra forma de realización, un fluoróforo donador o un fluoróforo aceptor es un péptido tetracisteína que interactúa fuertemente con un fluoróforo. En aspectos de esta forma de realización, un fluoróforo donador o un fluoróforo aceptor es un péptido tetracisteína que interactúa fuertemente con un derivado biarsenicado de fluoresceína no fluorescente o un derivado biarsenicado de resorufina no fluorescente. En otra forma de realización, un fluoróforo donador o un fluoróforo aceptor es un polipéptido AGT que interactúa fuertemente con un fluoróforo. En aspectos de esta forma de realización, un fluoróforo donador o un fluoróforo aceptor es un AGT que interactúa fuertemente con un derivado de bencilguanina sustituido en posición para que comprende una dietilaminocumarina, una diacetilfluoresceína, un dyomic DY-505-05, un ATTO 488, un ATTO 532, un DY-547, una tetrametilrodamina, un ATTO 600, un dyomic DY-632, un dyomic DY-647, un dyomic DY-732 o un dyomic DY-747. En otra forma de realización, un fluoróforo donador o un fluoróforo aceptor es un polipéptido dehalogenasa que interactúa fuertemente con un fluoróforo. En aspectos de esta forma de realización, un fluoróforo donador o un fluoróforo aceptor es una dehalogenasa que interactúa fuertemente con un derivado de cumarina tal como HaloTag Cumarina, un derivado de fluoresceína tal como HaloTag diAcFAM o un derivado de tetrametilrodamina tal como HaloTag TMR.

En otra forma de realización, un fluoróforo donador y un fluoróforo aceptor pueden ser ambos una proteína de unión a fluoróforo que interactúa fuertemente con un fluoróforo. En otra forma de realización, un fluoróforo donador y un fluoróforo aceptor pueden ser ambos un péptido tetracisteína que interactúa fuertemente con un fluoróforo. En aspectos de esta forma de realización, un fluoróforo donador y fluoróforo aceptor puede ser un péptido tetracisteína que interactúa fuertemente con un derivado biarsenicado de fluoresceína no fluorescente o un derivado biarsenicado de resorufina no fluorescente. En otra forma de realización, un fluoróforo donador y un fluoróforo aceptor pueden ser ambos un polipéptido AGT que interactúa fuertemente con un fluoróforo. En aspectos de esta forma de realización, un fluoróforo donador y un fluoróforo aceptor pueden ser ambos un AGT que interactúa fuertemente con un derivado de bencilguanina sustituido en posición para que comprende una dietilaminocumarina, una diacetilfluoresceína, un dyomic DY-505-05, un ATTO 488, un ATTO 532, un DY-547, una tetrametilrodamina, un ATTO 600, un dyomic DY-632, un dyomic DY-647, un dyomic DY-732 o un dyomic DY-747. En otra forma de realización, un fluoróforo donador o un fluoróforo aceptor puede ser un polipéptido dehalogenasa que interactúa fuertemente con un fluoróforo. En aspectos de esta forma de realización, un fluoróforo donador y un fluoróforo aceptor pueden ser ambos una dehalogenasa que interactúa fuertemente con un derivado de cumarina tal como HaloTag Cumarina, un derivado de fluoresceína tal como HaloTag diAcFAM o un derivado de tetrametilrodamina tal como HaloTag TMR.

Un fluoróforo donador o un fluoróforo aceptor dados a conocer en la presente memoria descriptiva pueden ser, en parte, un colorante fluorescente. Según se utiliza en el presente documento, el término “colorante fluorescente” significa una molécula que absorbe energía lumínica de determinada longitud de onda, incluidas, por ejemplo, violeta, azul, cian, verde, amarillo verdoso, amarillo, naranja, rojo anaranjado, rojo, rojo extremo o infrarrojo, y emite energía lumínica de una longitud de onda diferente y abarca las que emiten en una diversidad de espectro, incluidos violeta, azul, cian, verde, amarillo verdoso, amarillo, naranja, rojo anaranjado, rojo, rojo extremo o infrarrojo, véase Tabla 3 para ejemplos no limitantes. Los ejemplos no limitantes de colorantes fluorescentes incluyen colorantes derivados de, por ejemplo, una cumarina, una cianina, una fluoresceína, un isocianato, un isotiocianato, una indocarbocianina, una indodicarbocianina, un piridiloxazol, una ficoeritrina, una ficocianina, un o-ftaldehído y una rodamina. Como otro ejemplo no limitante, un colorante fluorescente puede ser un colorante fluorescente azul, tal como, por ejemplo, ácido 7 amino-4-metilcumarin-3-acético (AMCA), Cascade Blue, Alexa Fluor® 350 y Alexa Fluor® 405. Como aún otro ejemplo no limitante, un colorante fluorescente puede ser un colorante fluorescente verde, tal como, por ejemplo, fluoresceína, fluorescamina, carboxifluoresceína (FAM), isotiocianato de fluoresceína (FITC), Cy2, BODIPY FL, BODIPY 493/503, BODIPY 499/508, Alexa Fluor® 488, Oregon Green® 488 y Alexa Fluor® 500. Como otro ejemplo no limitante más, un colorante fluorescente puede ser un colorante fluorescente amarillo verdoso, tal como, por ejemplo, rodamina 6G, BODIPY R6G, Alexa Fluor® 430 y Alexa Fluor® 514. Como otro ejemplo no limitante, un colorante fluorescente puede ser un colorante fluorescente amarillo, tal como, por ejemplo, Lucifer Yellow, BODIPY 507/545, BODIPY 530/550, Alexa Fluor® 532. Como aún otro ejemplo no limitante más, un colorante fluorescente puede ser un colorante fluorescente naranja, tal como, por ejemplo, tetrametil rodamina (TAMRA), 5-isotiocianato de tetrametil rodamina (5-TRITC), 6-isotiocianato de tetrametil rodamina (6-TRITC), Cy3, BODIPY TMR, BODIPY 581/591, Alexa Fluor® 546. Como aún otro ejemplo no limitante más, un colorante fluorescente puede ser un colorante fluorescente rojo anaranjado, tal como, por ejemplo, Rodamina Lisamina B, Alexa Fluor® 555 y Alexa Fluor® 568. Como otro ejemplo no limitante, un colorante fluorescente puede ser un colorante fluorescente rojo, tal como, por ejemplo, Texas Red, BODIPY TR, BODIPY 577/618, Alexa Fluor® 594 y Alexa Fluor® 610. Como aún otro ejemplo no limitante, un colorante fluorescente puede ser un colorante fluorescente rojo extremo, tal como, por ejemplo, Cy5, BODIPY 630/650, BODIPY 650/665, Alexa Fluor® 633, Alexa Fluor® 635 y Alexa Fluor® 647; y colorantes fluorescentes infrarrojos cercanos, tal como, por ejemplo, allofocianina (APC), Cy5.5, Cy7, Alexa Fluor® 660, Alexa Fluor® 680, Alexa Fluor® 700 y Alexa Fluor® 750.

Un colorante fluorescente dado a conocer en la presente memoria descriptiva puede unirse a una característica molecular usando procedimientos convencionales de química de conjugación conocidos en la técnica, véase, por ejemplo, Richard P. Haugland, *A Guide to Fluorescent Probes and Labelling Technologies*, (Michelle T. Z. Spence ed., Invitrogen Corp., 10th ed., 2005). Puede usarse una variedad de grupos reactivos para acoplar un fluoróforo donador o un fluoróforo aceptor a la posición deseada en una característica molecular dada a conocer en la presente memoria descriptiva. Un procedimiento para marcar una característica molecular dado a conocer en la presente memoria descriptiva es unir un colorante fluorescente a un grupo amina libre presente en residuos lisina y en el extremo amino terminal de un polipéptido. Otro procedimiento para marcar una característica molecular dado a conocer en la presente memoria descriptiva es unir un colorante fluorescente a un grupo reactivo libre presente en nucleótidos y en el extremo 5' terminal de un polinucleótido. Los colorantes reactivos para aminas son en su mayor parte reactivos acilantes que forman carboxamidas, sulfonamidas o tioureas tras la reacción con las aminas. Los grupos reactivos usualmente presentes en los colorantes fluorescentes reactivos para aminas, incluyen, sin limitación, un grupo éster de succinimidilo, un grupo éster de sulfosuccinimidilo, un grupo éster de tetrafluorofenilo, un grupo azida de carbonilo, un grupo isocianato, un grupo cloruro de sulfonilo o un grupo que contiene aldehído, tal como, por ejemplo, el o-ftaldialdehído (OPA), naftalenodicarboxaldehído (NDA) y el 3-acilquinolincarboxaldehído (ATTO-TAG). Otro procedimiento para marcar una característica molecular dado a conocer en la presente memoria descriptiva es unir un colorante fluorescente a un grupo tiol libre (también denominados mercaptanos o sulfhidrilos) presente en residuos cisteína de un polipéptido. Los grupos reactivos usualmente presentes en los colorantes fluorescentes reactivos para tioles incluyen, sin limitación, un grupo maleimida, un grupo yodoacetamida, un grupo fenilmercurio, un grupo tiosulfato o un grupo metilbromuro. Aún otro procedimiento para marcar una característica molecular dado a conocer en la presente memoria descriptiva es unir un colorante fluorescente a un grupo ácido carboxílico libre. Los grupos reactivos usualmente presentes en colorantes fluorescentes reactivos para ácidos carboxílicos incluyen, sin limitación, un grupo hidrazida, un grupo hi-

ES 2 338 368 T3

droxilamina, un grupo cadaverina o un grupo amina. Un colorante fluorescente puede también unirse usando un resto de reticulación, incluidos, sin limitación, reticuladores homo y hetero-bifuncionales, tales como, por ejemplo, BMH y SPDP.

5

TABLA 3. Excitación y emisión máximas de colorantes fluorescentes de ejemplo		
Colorante	Excitación máxima (nm)	Emisión máxima (nm)
Alexa Fluor® 350	346	440
Alexa Fluor® 405	402	421
Alexa Fluor® 430	430	540
Alexa Fluor® 488	495	519
Alexa Fluor® 500	503	525
Alexa Fluor® 514	518	540
Alexa Fluor® 532	532	553
Alexa Fluor® 546	556	575
Alexa Fluor® 555	555	565
Alexa Fluor® 568	578	603
Alexa Fluor® 594	590	617
Alexa Fluor® 610	612	628
Alexa Fluor® 633	632	647
Alexa Fluor® 647	650	665
Alexa Fluor® 660	663	690
Alexa Fluor® 680	679	702
Alexa Fluor® 700	696	719
Alexa Fluor® 750	749	775
BODIPY FL	505	513
BODIPY TMR	544	570
BODIPY 493/503	493	503
BODIPY 499/508	499	508
BODIPY 507/545	508	543
BODIPY 530/550	534	554
BODIPY 577/618	577	618

55

60

65

TABLA 3. Excitación y emisión máximas de colorantes fluorescentes de ejemplo

Colorante	Excitación máxima (nm)	Emisión máxima (nm)
BODIPY 581/591	584	592
BODIPY 630/650	625	640
BODIPY 650/665	646	660
Cy-2	492	510
Cy-3	550	570
Cy-5	650	670
Cy-7	740	760
Eosina	524	544
Fluo-4	494	516
Fluoresceína	494	518
Lucifer yellow	426	531
NBD	478	541
Oregon Green 488	496	524
PyMPO	415	570
Rojo rodamina	570	590
Sulfonarrodamina	555	580
Tetrametilrodamina	555	580
Texas Red	595	615

Por consiguiente, en una forma de realización, un fluoróforo donador es un colorante fluorescente violeta, un colorante fluorescente azul, un colorante fluorescente cian, un colorante fluorescente verde, un colorante fluorescente de amarillo verdoso, un colorante fluorescente amarillo, un colorante fluorescente naranja, un colorante fluorescente rojo anaranjado, un colorante fluorescente rojo, un colorante fluorescente rojo extremo o un colorante fluorescente infrarrojo. En otra forma de realización, un fluoróforo aceptor es un colorante fluorescente violeta, un colorante fluorescente azul, un colorante fluorescente cian, un colorante fluorescente verde, un colorante fluorescente amarillo verdoso, un colorante fluorescente amarillo, un colorante fluorescente naranja, un colorante fluorescente rojo anaranjado, un colorante fluorescente rojo, un colorante fluorescente rojo extremo o un colorante fluorescente infrarrojo. En otra forma de realización, un fluoróforo donador y fluoróforo aceptor pueden ser ambos un colorante fluorescente violeta, un colorante fluorescente azul, un colorante fluorescente cian, un colorante fluorescente verde, un colorante fluorescente amarillo verdoso, un colorante fluorescente amarillo, un colorante fluorescente naranja, un colorante fluorescente rojo anaranjado, un colorante fluorescente rojo, un colorante fluorescente rojo extremo o un colorante fluorescente infrarrojo.

Los fluoróforos útiles en la invención incluyen los que tienen tiempo de vida de fluorescencia adecuado para el análisis de polarización de fluorescencia. De preferencia, los fluoróforos donadores tienen un tiempo de vida de fluorescencia largo y los fluoróforos aceptores tienen de preferencia un tiempo de vida de fluorescencia corto. En aspectos de la invención, un fluoróforo puede tener, sin limitación, un tiempo de vida de fluorescencia de al menos 0,1 nanosegundos, o al menos 0,5 nanosegundos, o al menos 5 nanosegundos, o al menos 10 nanosegundos, o menos de 100 nanosegundos o entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 100 nanosegundos. Algunos fluoróforos, en particular aquellos tales como ciertos quelatos de metales, y el pireno pueden tener tiempos de vida de fluorescencia tan largos como 1-2 milisegundos. Véase por ejemplo, Joseph R. Lakowicz, PRINCIPLES OF FLUORESCENCE SPECTROSCOPY (2d ed. Kluwer Academic/Plenum Publishers, Nueva York 1999).

En muchos aspectos de la presente invención, no es necesaria una diferencia en el volumen molar entre el donador y el aceptor (o las características moleculares asociadas con cada uno). Sin embargo, en algunas situaciones, un grupo voluminoso puede aumentar la detección de cambios en la proximidad de dos o más características moleculares usando DARET.

Según se utiliza en el presente documento, el término “grupo voluminoso” significa un resto que tiene suficiente volumen hidrodinámico tal que, tras la disociación de una característica molecular asociada al aceptor de una carac-

terística molecular asociada al donador a la que está unida el grupo voluminoso, hay un cambio en la polarización de al menos 3 unidades de milipolarización (mP). Una diversidad de grupos voluminosos pueden ser útiles en ciertos aspectos de los procedimientos de la invención, incluidas, sin limitación, las proteínas fluorescentes tales como la proteína fluorescente verde.

5

En una forma de realización, se pone en práctica un procedimiento de la invención tal que el cambio en la masa molecular después de que las características moleculares pasan de un estado asociado a uno no asociado es de al menos aproximadamente 1000 Da o al menos aproximadamente 1500 Da o al menos aproximadamente 1700 Da. En otra forma de realización, se pone en práctica un procedimiento de la invención tal que el cambio en la polarización de fluorescencia es de al menos 5 unidades de milipolarización (mP). En aún otra forma de realización, se pone en práctica un procedimiento de la invención tal que el cambio en la polarización de fluorescencia es de al menos 15 mP.

10

Aunque el uso de grupos voluminosos de proteínas fluorescentes tales como GFP es con frecuencia conveniente, los grupos voluminosos no necesariamente tienen que ser fluoróforos. De hecho, en aspectos de la invención que utilizan grupos voluminosos, pueden ser útiles cualquiera de una variedad de restos como grupo voluminoso en un procedimiento de la invención, incluidos restos físicos, químicos y biológicos que pueden incorporarse en o unirse a la característica molecular asociada al donador de manera covalente o no covalente. Cuando el presente procedimiento se usa en un ensayo de, por ejemplo, escisión con proteasa (y se utiliza un grupo voluminoso), el grupo voluminoso puede expresarse como una proteína de fusión con otro componente del sustrato de la proteasa.

20

Los grupos voluminosos útiles en tales aspectos de la presente invención abarcan restos naturales y sintéticos y abarcan además, sin limitación, restos inertes así como los que tienen actividad biológica u otra actividad. Un grupo voluminoso útil en la invención puede ser, sin limitación, una proteína, un péptido o peptidomimético inerte o activo; un anticuerpo; un producto químico orgánico; una perla de látex u otra; o restos tales como estreptavidina. Otros grupos voluminosos útiles en la invención abarcan, sin limitación, fagos y otros virus; células; liposomas; membranas celulares, matrices poliméricas y no poliméricas; oro y otras partículas; y microdispositivos y nano dispositivos. Como ejemplos no limitantes, un grupo voluminoso útil en la invención puede ser una proteína fluorescente tal como GFP o BFP, o un fragmento de las mismas; una proteína útil para la purificación por afinidad tal como glutatión-S-transferasa (GST) o proteína de unión a la maltosa (MBP); o un anticuerpo tal como, sin limitación, un anticuerpo anti-poli-histidina, un anticuerpo anti-FLAG, anti-hemaglutinina (HA) o anti-myc. La estreptavidina también puede ser un grupo voluminoso útil en la invención.

30

Se entiende que las características moleculares útiles en la invención pueden incluir opcionalmente unos o más componentes adicionales. Como ejemplo no limitante, puede incluirse una secuencia espaciadora flexible tal como GGGGS (ID. SEC. N°: 1) y EAAAK (ID. SEC. N°: 2) en una proteasa u otro sustrato peptídico útil en la invención. Un sustrato peptídico útil puede además incluir, sin limitación, uno o más de los siguientes: un marcador de afinidad tal como polihistidina; biotina o una secuencia de biotilado; o un epítipo tal como FLAG, hemaglutinina (HA), c-myc, o AU1; una región de bisagra de inmunoglobulina; un conector de N-hidroxisuccinimida; un lazo de horquilla peptídico o peptidomimético; o una secuencia hidrófila u otro componente o secuencia que, por ejemplo, facilite la purificación o promueva la solubilidad o la estabilidad del sustrato de toxina de clostridios.

35

40

Las condiciones adecuadas para los ensayos DARET deben tener lugar por lo general a temperaturas en las que al menos una característica molecular unida al fluoróforo esté en fase fluida. Por consiguiente, dependiendo de las características del fluido, tales temperaturas pueden ser incluso más bajas que 0°C, aunque en fases acuosas tales temperaturas por lo general son inferiores a cero, tales como desde aproximadamente 4°C hasta aproximadamente 45°C. Más comúnmente, las temperaturas pueden estar en el intervalo desde aproximadamente 20°C hasta aproximadamente 45°C, por ejemplo, en el intervalo de 25°C a 40°C, o en el intervalo de 35°C a 39°C. Los volúmenes de ensayo están frecuentemente en el intervalo desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 200 μ l, por ejemplo, en el intervalo desde aproximadamente 10 μ l hasta 100 μ l o aproximadamente 0,5 μ l hasta 100 μ l, aunque los volúmenes de reacción del orden de nanolitros pueden también usarse con los procedimientos de la invención. Los volúmenes de ensayo también pueden estar, por ejemplo, en el intervalo de 100 μ l a 2,0 ml o en el intervalo de 0,5 ml a 1,0 ml.

45

50

Los tiempos de ensayo pueden ser variados según sea adecuado por el experto en la técnica y dependen generalmente, en parte, de la concentración, la pureza y la actividad de las características moleculares. Los tiempos de ensayo varían generalmente, sin limitación, en el intervalo desde aproximadamente instantáneo hasta aproximadamente 5 horas. Como ejemplos no limitantes, los tiempos de ensayo de ejemplo incluyen la incubación, por ejemplo, a 37°C durante 1 segundo, a 37°C durante 5 segundos, a 37°C durante 30 segundos, a 37°C durante 1 minuto, a 37°C durante 5 minutos, a 37°C durante 15 minutos, a 37°C durante 30 minutos, 45 minutos, 60 minutos, 75 minutos ó 90 minutos. En formas de realización particulares, tales como las que incluyen ensayos con proteasas, las características moleculares están disociadas al menos el 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o el 100%. Por ejemplo una actividad proteasa puede detectarse cuando el sustrato está escindido al menos el 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o el 100%. Por ejemplo, una reacción de proteasa basada en un sustrato que contiene GFP como el fluoróforo donador puede finalizarse por medio de la adición de cloruro de guanidinio, por ejemplo, hasta una concentración final de 1 ó 2 M. Las reacciones de proteasas también pueden finalizarse por medio de la adición de H₃SO₄; adición de borato de sodio desde aproximadamente 0,5 hasta 1,0 M, pH 9,0 a 9,5; adición de quelantes de cinc, o adición de concentraciones eficaces de un desnaturalizante tal como urea o cloruro del guanidinio. Un experto en la técnica sabe que las reacciones de proteasas y otras reacciones enzimáticas pueden finalizarse, si se desea, antes de excitar el fluoróforo o el fluoróforo donador con luz polarizada plana.

60

65

ES 2 338 368 T3

Según se demostró anteriormente, se entiende que los procedimientos de la invención pueden automatizarse y pueden configurarse en un formato de alto rendimiento o ultra alto rendimiento usando, sin limitación, placas de 96 pocillos, 384 pocillos o 1536 pocillos. Pueden usarse cualquiera de una diversidad de espectrofluorómetros equipados con un polarizador adecuado para analizar el cambio en la polarización de fluorescencia con el tiempo incluidos, sin limitación, un espectrofluorómetro Cary Eclipse; el lector de microplacas SpectraMax M5 y otros sistemas de, por ejemplo, Perkin-Elmer.

En los procedimientos de la invención, el cambio en la polarización de fluorescencia puede ser un aumento o una disminución en la polarización de la fluorescencia. En una forma de realización, el fluoróforo donador tiene un tiempo de vida de la fluorescencia de al menos de 0,5 nanosegundos. En otra forma de realización, el fluoróforo donador tiene un tiempo de vida de fluorescencia de al menos de 5 nanosegundos. Los tiempos de vida de fluorescencia pueden variar desde aproximadamente 10 picosegundos, o aproximadamente 100 picosegundos, o aproximadamente 200 picosegundos hasta aproximadamente 10 μ segundos, o aproximadamente 25 μ segundos, o aproximadamente 50 μ segundos, o aproximadamente 100 μ segundos o milisegundos. BFP y GFP tienen tiempo de vida de fluorescencia de aproximadamente 4 nanosegundos. Los quelatos de metales fluorescentes tales como rutenio, que emite luz polarizada, pueden tener tiempo de vida fluorescente en el orden de micro a milisegundos.

En los procedimientos DARET de la invención, un fluoróforo aceptor útil en un sustrato de toxina de clostridios tiene un espectro de absorbancia que se superpone con el espectro de emisión de un fluoróforo donador incluido en el sustrato. Un aceptor útil en la invención generalmente tiene absorción algo baja en una longitud de onda adecuada para la excitación del fluoróforo donador.

Según se estableció anteriormente, un aceptor tiene un espectro de absorbancia que se superpone con el espectro de emisión del fluoróforo donador. El término "superponer" según se utiliza en el presente documento con referencia al espectro de absorbancia de un aceptor y el espectro de emisión de un fluoróforo donador, significa un espectro de absorbancia y un espectro de emisión que están parcial o totalmente compartidos. Por consiguiente, en tales espectros superpuestos, el extremo superior del intervalo del espectro de emisión del fluoróforo donador es más alto (es decir, tiene una longitud de onda más larga) que el extremo inferior del intervalo del espectro de absorbancia del aceptor. Por consiguiente, que un fluoróforo sea un donador o un aceptor depende de las características espectrales del otro fluoróforo con el que se va a emparejar.

Según se estableció anteriormente, puede ser útil en la invención cualquiera de una diversidad de fluoróforos donadores y fluoróforos aceptores incluidos, sin limitación, una proteína fluorescente, tal como, por ejemplo, una BFP, una CFP, una GFP, una YFP y una RFP; una proteína de unión a fluoróforos que interactúa fuertemente con un fluoróforo, tal como, por ejemplo, una tetracisteína, un polipéptido AGT o una dehalogenasa; y un colorante fluorescente, tal como, por ejemplo, un colorante fluorescente violeta, un colorante fluorescente azul, un colorante fluorescente cian, un colorante fluorescente verde, un colorante fluorescente amarillo verdoso, un colorante fluorescente amarillo, un colorante fluorescente naranja, un colorante fluorescente rojo anaranjado, un colorante fluorescente rojo, un colorante fluorescente rojo extremo o un colorante fluorescente infrarrojo.

Los pares fluoróforo donador-aceptor de ejemplo que exhiben DARET y que son útiles en los procedimientos de la invención abarcan, sin limitación, GFP y BFP, de GFP y Alexa Fluor[®] 546; fluoresceína y tetrametilrodamina; Dansilo y octadecilrodamina (Tabla 4). Otros pares DARET conocidos incluyen, sin limitación,

TABLA 4. Pares fluoróforo donador-fluoróforo aceptor de DARET de ejemplo	
Donador	Aceptor
Alexa Fluor [®] 350	Alexa Fluor [®] 488
Alexa Fluor [®] 488	Alexa Fluor [®] 546, Alexa Fluor [®] 555, Alexa Fluor [®] 568, Alexa Fluor [®] 594, Alexa Fluor [®] 647
Alexa Fluor [®] 546	Alexa Fluor [®] 568, Alexa Fluor [®] 594, Alexa Fluor [®] 647
Alexa Fluor [®] 555	Alexa Fluor [®] 594, Alexa Fluor [®] 647
Alexa Fluor [®] 568	Alexa Fluor [®] 647
Alexa Fluor [®] 594	Alexa Fluor [®] 647
fluoresceína	Fluoresceína
IAEDANS	Fluoresceína

TABLA 4. Pares fluoróforo donador-fluoróforo aceptor de DARET de ejemplo	
Donador	Aceptor
EDANS	Dansilo
BODIPY FL	BODIPY FL

5 Un experto en la técnica sabe que los fluoróforos donadores presentados y otros fluoróforos donadores adecuados para DARET pueden emparejarse con cualquiera de una variedad de aceptores que tengan un espectro de absorbancia que se superponga con el espectro de emisión del fluoróforo donador.

15 Como se describió anteriormente, los procedimientos recombinantes pueden en casos particulares usarse para producir unas o más características moleculares según la presente invención. Además, un fluoróforo donador y/o aceptor pueden comprender una proteína fluorescente o una proteína de unión fluorescente, y pueden unirse a una característica molecular por medio de un enlace peptídico. Como alternativa, puede incorporarse un resto cisteína u otro resto reactivo y puede usarse para la unión de un fluoróforo a una característica molecular recombinante de tipo proteica. En otras formas de realización, los fluoróforos pueden conjugarse a proteínas usando, por ejemplo, un reactivo o un conector bifuncional.

25 Los procedimientos químicos para modificar una proteína, un péptido o peptidomimético para que contenga un grupo fluoróforo y/o voluminoso, o un fluoróforo donador y un aceptor, son bien conocidos en la técnica (Fairclough and Cantor, *Methods Enzymol.* 48: 347-379 (1978); Glaser y col., *Chemical Modification of Proteins* Elsevier Biochemical Press, Amsterdam (1975); Haugland, *Excited States of Biopolymers* (Steiner Ed.) páginas 29-58, Plenum Press, Nueva York (1983); Means and Feeney, *Bioconjugate Chem.* 1: 2-12 (1990); Matthews y col., *Methods Enzymol.* 208: 468-496 (1991); Lundblad, *Chemical Reagents for Protein Modification* 2nd Ed., CRC Press, Boca Raton, Florida (1991); Haugland, *supra*, 1996). Puede usarse una variedad de grupos para acoplar un grupo voluminoso (si se utiliza), un fluoróforo donador y/o un fluoróforo aceptor, por ejemplo, a un péptido o peptidomimético. Un grupo tiol, por ejemplo, puede usarse para acoplar un fluoróforo, un grupo voluminoso, un fluoróforo donador o aceptor a la posición deseada en un péptido o un peptidomimético para producir una característica molecular marcada según la presente invención. También pueden usarse reactivos marcadores haloacetilo y maleimida para acoplar un fluoróforo, un grupo voluminoso, un fluoróforo donador y/o aceptor para preparar una característica molecular útil en la invención. Véase, por ejemplo, Wu and Brand, *supra*, 1994.

35 Los restos reticuladores también pueden ser útiles para preparar una característica molecular marcada con un fluoróforo. Los reticuladores son muy conocidos en la técnica e incluyen reticuladores homo- y hetero-bifuncionales tales como BMH y SPDP. En los casos en que un fluoróforo, un grupo voluminoso, un fluoróforo donador y/o aceptor, es una proteína, pueden usarse procedimientos químicos muy conocidos para unir específicamente las moléculas a los extremos amino o carboxi terminal de una proteína se empleen. Véase, por ejemplo, "Chemical Approaches to Protein Engineering" en *Protein Engineering: A Practical Approach* Rees y col. (Eds) Oxford University Press, 1992.

45 Cuando un ensayo de la proteasa se diseña para DARET según la presente invención, el sustrato de proteasa contiene un fluoróforo donador y un aceptor, el sitio de escisión de la proteasa está situado entre el fluoróforo donador y el fluoróforo aceptor. En una forma de realización, el fluoróforo donador está situado en posición amino terminal del sitio de escisión mientras que el aceptor está situado en posición carboxi terminal del sitio de escisión. En otra forma de realización, el fluoróforo donador está situado en posición carboxi terminal del sitio de escisión mientras que el aceptor está situado en posición amino terminal del sitio de escisión.

50 Un experto en la técnica sabe que hay diversas consideraciones para seleccionar y situar un grupo voluminoso (si se lo va a utilizar), un fluoróforo donador y un fluoróforo aceptor, de una manera útil en la invención. El fluoróforo donador y el fluoróforo aceptor, se sitúan por lo general para reducir al mínimo la interferencia con la unión o la interacción entre las características moleculares. Por consiguiente, un fluoróforo donador y el aceptor, pueden seleccionarse y situarse, por ejemplo, para reducir al mínimo la interrupción de las interacciones unidas y no unidas que son importantes para la unión, y para reducir al mínimo el impedimento estérico. Además, como se analiza a continuación, la distancia espacial entre un aceptor y un fluoróforo donador generalmente se limita para alcanzar la transferencia eficaz de energía desde el fluoróforo donador hasta el aceptor - y tal distancia debe estar dentro del intervalo entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 10 nm (aproximadamente 5 Å y aproximadamente 100 Å) de preferencia entre aproximadamente 1 y aproximadamente 5 nm (aproximadamente 1 Å y aproximadamente 50 Å), o aproximadamente 1 y aproximadamente 3 nm (aproximadamente 10 Å y aproximadamente 30 Å), o aproximadamente 3 y aproximadamente 10 nm (aproximadamente 30 Å y aproximadamente 100 Å) o aproximadamente 7 y aproximadamente 10 nm (aproximadamente 70 Å y aproximadamente 100 Å).

65 Como se analizó anteriormente, la eficacia de transferencia de energía desde un fluoróforo donador a un aceptor depende, en parte, de la separación espacial del fluoróforo donador y la molécula aceptor. A medida que aumenta la distancia entre el fluoróforo donador y el aceptor (y/o varía la orientación del dipolo), hay menor transferencia de energía al aceptor, y por consiguiente aumenta la señal de fluorescencia del donador. La transferencia de energía global entre el fluoróforo donador y el aceptor depende de muchos factores, incluidos la distancia de separación entre el

ES 2 338 368 T3

fluoróforo donador y el aceptor, la superposición espectral entre el fluoróforo donador y el aceptor y las orientaciones dipolares relativas del donador y el aceptor. Un experto en la técnica sabe que, a medida que aumenta la concentración de las características moleculares, la extinción intermolecular del donador se convierte en un factor. Este fenómeno se denomina el “efecto de filtro interno”. Un experto en la técnica sabe además que la concentración del sustrato puede controlarse para reducir esto al mínimo.

La distancia de Förster, que es la separación entre un fluoróforo donador y un aceptor que da una transferencia de energía no radiante del 50%, representa una separación espacial entre el fluoróforo donador y el aceptor que proporciona buena sensibilidad. Para sustratos peptídicos, los residuos adyacentes están separados por una distancia de aproximadamente 0,36 nm (3,6 Å) en la conformación más extendida. Por ejemplo, la distancia calculada de Förster calculada para un par fluoresceína/tetrametilrodamina es de 5,5 nm (55 Å), que representará una separación espacial entre la fluoresceína y al tetrametilrodamina de aproximadamente 15 residuos de aminoácidos en la conformación más extendida. Como los péptidos y los peptidomiméticos en disolución rara vez tienen una conformación totalmente extendida, y son capaces de tener flexibilidad sustancial, los fluoróforos donadores y los aceptores pueden estar más ampliamente separados de lo esperado en base a un cálculo realizado usando una distancia de 0,34 nm (3,6 Å) por residuo y aún permanecer dentro de la distancia de Förster. Esto se muestra, por ejemplo, por la aparición de FRET entre pares donador-aceptor separados por aproximadamente 50 aminoácidos (Graham y col., *Anal. Biochem.* 296: 208-217 (2001)).

La teoría de Förster se basa en interacciones muy débiles entre un fluoróforo donador y un aceptor; las propiedades espectroscópicas tales como la absorción de un fluoróforo no deberían alterarse en presencia del otro, definiendo la distancia más corta sobre la que es válida la teoría. Se entiende que, para muchos pares fluoróforo donador - aceptor, la teoría de Förster es válida cuando los fluoróforos donadores y los aceptores están separados por cerca aproximadamente 1-10 nm (10 Å hasta 100 Å). Sin embargo, para pares fluoróforo donador- aceptor particulares, la teoría de Förster es válida en distancias inferiores a 1 nm (10 Å) (tal como 0,5 nm (5 Å) o menos) según se determina por técnicas de subpicosegundos (Kaschke and Ernsting, *Ultrafast Phenomenon in Spectroscopy* (Klose and Wilhelm (Eds.)) Springer-Verlag, Berlín 1990).

La ecuación de Förster para R_0 , el radio de Förster, es: $R_0 = [8,8 \times 10^{23} \cdot \kappa^2 \cdot \eta^4 \cdot QY_D \cdot J(\lambda)]^{1/6}$ Angstroms, donde κ^2 es el factor de orientación del dipolo (intervalo desde 0 hasta 4; 2/3 para donadores y aceptores orientados aleatoriamente; QY_D es el rendimiento cuántico de la fluorescencia del donador en la ausencia del aceptor; η es el índice de refracción, $J(\lambda)$ es la integral de la superposición espectral $\int \epsilon_A(\lambda) \cdot F_D(\lambda) \cdot \lambda^4 d\lambda \text{ cm}^3 \text{ M}^{-1}$, donde ϵ_A es el coeficiente de extinción del aceptor; y F_D es la intensidad del coeficiente de fluorescencia del donador expresado como una fracción de la intensidad integrada total.

En formas de realización particulares, la invención proporciona un procedimiento para determinar la proximidad de las características moleculares en las que el fluoróforo donador está separado del aceptor por una distancia de al menos aproximadamente 10 nm (100 Å). En otras formas de realización, la invención proporciona un procedimiento para determinar la proximidad de las características moleculares en las que el fluoróforo donador está separado del aceptor por una distancia de como máximo 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 ó 0,5 nm (90 Å, 80 Å, 70 Å, 60 Å, 50 Å, 40 Å, 30 Å, 20 Å, 10 Å ó 5 Å). En otras formas de realización, la invención proporciona un procedimiento para determinar la proximidad de las características moleculares en las que el fluoróforo donador está separado del aceptor por una distancia de 0,5-10, 1-8, 1-6, 1-4, 1-2, 2-10, 2-8, 2-6, 2-4, 4-10, 4-8 ó 4-6 nm (5 Å a 100 Å, 10 Å a 80 Å, 10 Å a 60 Å, 10 Å a 40 Å, 10 Å a 20 Å, 20 Å a 100 Å, 20 Å a 80 Å, 20 Å a 60 Å, 20 Å a 40 Å, 40 Å a 100 Å, 40 Å a 80 Å ó 40 Å a 60 Å). En aún otras formas de realización, la invención proporciona un procedimiento para determinar la proximidad de las características moleculares entre proteínas, o regiones de una proteína, en las que el fluoróforo donador y el aceptor están separados como máximo seis residuos de aminoácidos, como máximo ocho residuos, como máximo diez residuos, como máximo doce residuos, como máximo quince residuos, como máximo veinte residuos, como máximo veinticinco residuos, como máximo treinta residuos, como máximo treinta y cinco residuos, como máximo cuarenta residuos, como máximo cuarenta y cinco residuos, como máximo cincuenta residuos, como máximo sesenta residuos, como máximo setenta residuos, como máximo ochenta residuos, como máximo noventa residuos, como máximo 100 residuos, como máximo 150 residuos o como máximo 200 residuos. Se entiende que las características moleculares pueden estar asociadas con residuos de aminoácidos muy distantes pero pueden sin embargo estar en proximidad por el plegamiento conformacional.

Al procurar determinar la proximidad de las características moleculares dentro de una molécula única, tal como en un ensayo de proteasa, o al detectar cambios en la conformación de una proteína, un experto en la técnica sabe que puede diseñarse un sustrato peptídico útil en la invención si se desea, para optimizar la eficacia de DARET. Un experto en la técnica sabe que puede seleccionarse un fluoróforo donador, si se desea, con un rendimiento cuántico alto, y puede seleccionarse un aceptor, si se desea, con un coeficiente de extinción alto para maximizar la distancia de Förster. Un experto en la técnica también sabe que la fluorescencia que surge de la excitación directa de un aceptor puede ser difícil de distinguir de la fluorescencia resultante de la transferencia de energía de resonancia. Por consiguiente, se reconoce que pueden seleccionarse un fluoróforo donador y un aceptor que tengan relativamente poca superposición de sus espectros de excitación tal que el donador pueda ser excitado a una longitud de onda que de como resultado la mínima excitación directa del aceptor. Se reconoce además que pueden diseñarse un sustrato que contiene características moleculares y un fluoróforo donador y un aceptor útiles en la invención de manera que los espectros de emisión del fluoróforo donador y aceptor se superpongan relativamente poco tal que las dos emisiones puedan distinguirse fácilmente.

Un sustrato, tal como un sustrato que contiene un sitio de escisión de proteasa, un sitio de fosforilación (o ambos), o dos o más características moleculares cuya proximidad debe determinarse, puede tener una o múltiples modificaciones comparado con una molécula que se presenta en la naturaleza. Como un ejemplo, tal molécula puede ser una proteína de fusión que comprenda uno o dos restos de proteína fluorescente. Además, tal molécula puede producirse para que contenga uno o más residuos aminoácidos capaces de formar un enlace a un fluoróforo, directamente o a través de un conector. En una forma de realización, tales residuos son residuos de cisteína.

Según se utiliza en el presente documento, el término “peptidomimético” se usa ampliamente para significar una molécula similar a un péptido que es capaz de servir como modelo para un sustrato peptídico en el que está estructuralmente basado. Tal peptidomimético incluye péptidos modificados químicamente, moléculas similares a péptidos que contienen aminoácidos que no se presentan en la naturaleza, y peptoides, que son moléculas similares a péptidos resultantes de la organización oligomérica de glicinas N-sustituidas (véase, por ejemplo, Goodman and Ro, *Peptidomimetics for Drug Design*, en “Burger’s Medicinal Chemistry and Drug Discovery” Vol. 1 (ed. M. E. Wolff; John Wiley & Sons 1995), páginas 803-861).

En la técnica se conoce una variedad de peptidomiméticos incluidos, por ejemplo, moléculas similares a péptidos que contienen un aminoácido restringido, un componente no peptídico que imita la estructura secundaria del péptido, o un isómero con enlace amida. Un peptidomimético que contiene un aminoácido restringido, que no se presenta en la naturaleza puede incluir, por ejemplo, un aminoácido α -metilado; un α,α -dialquil-glicina o un ácido α -aminocicloalcano carboxílico; un aminoácido N $^{\alpha}$ -C $^{\alpha}$ ciclizado; un aminoácido N $^{\alpha}$ metilado; un ácido β - o γ -amino cicloalcano carboxílico; un aminoácido α,β -insaturado; un β,β -dimetil o β -metil aminoácido; un 2,3-metano aminoácido β -sustituido; un aminoácido NC $^{\delta}$ o C $^{\alpha}$ -C $^{\delta}$ ciclizado; o una prolina sustituida u otro aminoácido mimético. Además, un peptidomimético que imita la estructura secundaria del péptido puede contener, por ejemplo, un mimético del giro β no peptídico; un mimético del giro γ ; un mimético de la estructura de lámina β ; o un mimético de la estructura helicoidal, cada una de las cuales se conoce bien en la técnica. Un peptidomimético también puede ser una molécula similar a un péptido que contiene, por ejemplo, un isómero con enlace amida tal como una modificación retroinversa; un enlace amida reducido; un enlace metilenoéter o metileno sulfóxido; un enlace éter de metileno; un enlace etileno; un enlace tioamida; un enlace transolefina o fluorolefina; un anillo tetrazol 1,5-disustituido; un enlace cetometileno o fluorocetometileno u otro isómero de amida. Un experto en la técnica sabe que estos y otros peptidomiméticos están abarcados dentro del significado del término “peptidomimético” según se utiliza en el presente documento. El término “polipéptido” incluirá peptidomiméticos a menos que se indique expresamente de otra manera.

Ejemplo 1

Ensayo de DARET de BoNT-A-Sustrato marcado con GFP/Alexa Fluor 546

Como un ejemplo de un aspecto de la presente invención, las características moleculares cuya proximidad debía determinarse comprendían a) la porción amino terminal y b) la porción carboxilo terminal de un molde que comprendía el sitio de reconocimiento y escisión (contenido en los residuos 134-206) de la proteína SNAP-25 del complejo SNARE por la neurotoxina tipo A de *C. botulinum* (BONT-A) y localizada entre estas dos características moleculares.

El vector pQBI GFP-SNAP25(134-206) comprende una región del ácido nucleico que codifica una proteína de fusión GFP-SNAP-25. Este vector se construyó de la siguiente manera en dos fases: Primero, se modificó el vector pQBI T7-GFP por medio de PCR - para eliminar el codón de terminación en el extremo 3' de la secuencia de codificadora de GFP y para insertar la secuencia codificadora de una porción del conector peptídico que separa GFP del fragmento de SNAP-25. Segundo, se amplificó un fragmento de ADN que codifica SNAP-25 (134-206) por medio de PCR de pQE50/BirASNA(128-206). Los cebadores de PCR se diseñaron para incorporar la secuencia codificadora para el resto del conector peptídico fusionado en posición 5' al gen de SNAP-25 (134-206) y un marcador de afinidad 6xHis fusionado en posición 3' del gen. El producto de PCR resultante se clonó en el vector pQBI modificado para dar el plásmido pQBI GFP-SNAP25 (134-206) deseado.

Este vector se modificó para crear dos vectores derivados que tuvieran residuos cisteína incorporados nuevos en diferentes lugares para colocar un segundo fluoróforo, Alexa Fluor® 546, en el lado carboxilo terminal del sitio de escisión de BONT-A. En tal primera construcción, la cisteína se colocó como el último residuo C-terminal en la proteína de fusión, y en la segunda construcción, la cisteína se colocó entre la secuencia de SNAP-25 y el marcador HIS6. Estas construcciones se denominaron pQBI GFP-SNAP25 (Cys-Stop) y pQBI GFP-SNAP25 (Cys-6His).

El vector pQBI GFP-SNAP25(134-206) se sometió a 2 reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) separadas para crear las construcciones mencionadas anteriormente usando los cebadores Cys-Stop y Cys-6His junto con sus secuencias complementarias como cebadores de “hebra opuesta”.

Cebador Cys-Stop (ID. SEC. N°: 3): 5'-GTTATTGCTCAGCTTTAGCAGTGATGGTGATGGTG-3'

Cebador Cys-6His (ID. SEC. N°: 4): 5'-GATGGTGATGGTGATGACAGCCGCCACCGCCACC-3'

ES 2 338 368 T3

Se montaron seis reacciones de PRC de 50 μ l para cada par de cebadores. Cada reacción contenía el siguiente tampón de PCR: tampón Pfu 10 x 5 μ l (Stratagene), dNTPs 1 μ l (12,5 mM de cada uno; Promega), DNA polimerasa Pfu Turbo 1 μ l (Stratagene; adición en caliente), ADN molde (20, 30 ó 40 ng pQBI GFP-SNAP25(134-206)), y cada cebador del par adecuado en una concentración final de 0,2 μ M. Las mezclas de reacción se llevaron hasta un volumen final de 50 μ l con agua libre de nucleasa, y las muestras se incubaron según las siguientes condiciones del termociclador:

10	Etapa 1	95 °C	2 minutos
	Etapa 2	95 °C	1 minuto
	Etapa 3	50 ó 55 °C	30 segundos
15	Etapa 4	72 °C	12 minutos
	Etapa 5	72 °C	7 minutos
	Etapa 6	10 °C	mantener

20 Las etapas 2-4 se repitieron 25 veces, antes de proceder a las Etapas 5 y 6. Después del termociclado, se añadió 1 μ l de enzima de restricción Dpn I (Stratagene) a cada reacción y se incubó durante 1 hora 15 minutos a 37°C para digerir el ADN molde. Las reacciones se purificaron por medio del kit QIAquick (Qiagen) y se analizaron por electroforesis en gel de agarosa. Todas las reacciones menos dos produjeron el plásmido de longitud total. La secuenciación de los plásmidos candidato identificó un plásmido de cada tipo conteniendo el cambio deseado, y estas dos muestras se seleccionaron para continuar.

30 El primer plásmido contenía un marco de lectura abierto que contenía las secuencias de nucleótidos que codifican la proteína de fusión GFP/SNAP-25, en la que la cisteína se incorporó como el últimos residuos C-terminal. Esta secuencia de aminoácidos y los nucleótidos correspondientes se presentan a continuación y como las secuencias ID. SEC. N°: 5 e ID. SEC. N°: 6, respectivamente.

35 (Secuencia pasa a página siguiente)

40

45

50

55

60

65

ES 2 338 368 T3

```

                    GFP
-----
M A S K G E E L F T G V V P I L V E L D G
ATGGCTAGC AAAGGAGAA GAACTCTTC ACTGGAGTT GTCCCAATT CTTGTTGAA TTAGATGGT
5
                    GFP
-----
D V N G H K F S V S G E G E G D A T Y ° G K
GATGTTAAC GGCCACAAG TTCTCTGTC AGTGGAGAG GGTGAAGGT GATGCAACA TACGAAAA
                    GFP
-----
L T L K F I C T T G K L P V P W P T L V T
10
CTTACCCTG AAGTTCATC TGCACTACT GGCAAAC TG CCTGTTCCA TGGCCAACA CTAGTCACT
                    GFP
-----
T L C Y G V Q C F S R Y P D H M K R H D F
15
ACTCTGTGC TATGGTGTT CAATGCTTT TCAAGATAC CCGGATCAT ATGAAACGG CATGACTTT
                    GFP
-----
F K S A M P E G Y V Q E R T I F F K D D G
20
TTCAAGAGT GCCATGCC GAAGGTAT GTACAGGAA AGGACCATC TTCTTCAA GATGACGGC
                    GFP
-----
N Y K T R A E V K F E G D T L V N R I E L
25
AACTACAAG ACACGTGCT GAAGTCAAG TTTGAAGGT GATACCCTT GTAATAGA ATCGAGTTA
                    GFP
-----
K G I D F K E D G N I L G H K L E Y N Y N
AAAGGTATT GACTTCAAG GAAGATGGC AACATTCTG GGACACAAA TTGGAATAC AACTATAAC
                    GFP
-----
S H N V Y I M A D K Q K N G I K V N F K T
30
TCACACAAT GTATACATC ATGGCAGAC AAACAAAAG AATGGAATC AAAGTGAAC TTCAAGACC
                    GFP
-----
R H N I E D G S V Q L A D H Y Q Q N T P I
35
CGCCACAAC ATTGAAGAT GGAAGCGTT CAACTAGCA GACCATTAT CAACAAAAT ACTCCAATT
                    GFP
-----
G D G P V L L P D N H Y L S T Q S A L S K
GGCGATGGC CCTGTCCTT TTACCAGAC AACCATAC CTGTCCACA CAATCTGCC CTTTCGAAA
                    GFP
-----
D P N E K R D H M V L L E F V T A A G I T
40
GATCCCAAC GAAAAGAGA GACCACATG GTCCTTCTT GAGTTTGTA ACAGCTGCT GGGATTACA
                    Conector
-----
                    GFP
-----
H G M D E L Y N G G A G S G A G G G G I R
45
CATGGCATG GATGAACTG TACAACGGC GGTGCAGGA TCCGGTGCG GGTGGCGGT GGCATCCGG
                    SNAP25(134-206)
-----
R V T N D A R E N E M D E N L E Q V S G I
AGGGTAACA AACGATGCC CGGAAAAT GAGATGGAT GAGAACCTG GAGCAGGTG AGCGGCATC
                    SNAP25(134-206)
-----
I G N L R H M A L D M G N E I D T Q N R Q
50
ATCGGAAAC CTCCGCCAT ATGGCTCTA GACATGGGC AATGAGATT GACACCCAG AATCGCCAG
                    SNAP25(134-206)
-----
I D R I M E K A D S N K T R I D E A N Q R
55
ATCGACAGG ATCATGGAG AAGGCTGAT TCCAACAAA ACCAGAATT GATGAAGCC AACCAACGT
                    Conector
                    SNAP25(134-206)          6xHis Tag          Cys
-----
A T K M L G S G G G G G H H H H H H C *
GCAACAAAAG ATGCTGGGA AGTGGTGGC GGTGGCGGC CATCACCAT CACCATCAC TGCTAA

```

60 El segundo plásmido contenía un marco de lectura abierto que contenía las secuencias de nucleótidos que codifican la proteína de fusión GFP/SNAP-25, en la que la cisteína se incorporó entre el marcador HIS6 y la región SNAP-25. Esta secuencia de aminoácidos y los nucleótidos correspondientes se presentan a continuación y como las secuencias ID. SEC. N°: 7 e ID. SEC. N°: 8, respectivamente.

65

ES 2 338 368 T3

```

                    GFP
-----
M A S K G E E L F T G V V P I L V E L D G
ATGGCTAGC AAAGGAGAA GAACTCTTC ACTGGAGTT GTCCCAATT CTTGTTGAA TTAGATGGT
5
                    GFP
-----
D V N G H K F S V S G E G E G D A T Y G K
GATGTTAAC GGCCACAAG TTCTCTGTC AGTGGAGAG GGTGAAGGT GATGCAACA TACGAAAA
                    GFP
-----
L T L K F I C T T G K L P V P W P T L V T
CTTACCCTG AAGTTCATC TGCACTACT GGCAAAC TGCTGTTCCA TGGCCAACA CTAGTCACT
10
                    GFP
-----
T L C Y G V Q C F S R Y P D H M K R H D F
ACTCTGTGC TATGGTGT TCAAGATAC CCGGATCAT ATGAAACGG CATGACTTT
15
                    GFP
-----
F K S A M P E G Y V Q E R T I F F K D D G
TTCAAGAGT GCCATGCCC GAAGGTAT GTACAGGAA AGGACCATC TTCTTCAA GATGACGGC
20
                    GFP
-----
N Y K T R A E V K F E G D T L V N R I E L
AACTACAAG ACACGTGCT GAAGTCAAG TTTGAAGGT GATACCCCTT GTTAATAGA ATCGAGTTA
                    GFP
-----
K G I D F K E D G N I L G H K L E Y N Y N
AAAGTATT GACTTCAAG GAAGATGCC AACATTCTG GGACACAAA TTGGAATAC AACTATAAC
25
                    GFP
-----
S H N V Y I M A D K Q K N G I K V N F K T
TCACACAAT GTATACATC ATGGCAGAC AAACAAAAG AATGGAATC AAAGTGAAC TTCAAGACC
30
                    GFP
-----
R H N I E D G S V Q L A D H Y Q Q N T P I
CGCCACAAC ATTGAAGAT GGAAGCGTT CAACTAGCA GACCATTAT CAACAAAAT ACTCCAATT
                    GFP
-----
G D G P V L L P D N H Y L S T Q S A L S K
GGCGATGGC CCTGTCTT TTACCAGAC AACCATTAC CTGTCCACA CAATCTGCC CTTTCGAAA
35
                    GFP
-----
D P N E K R D H M V L L E F V T A A G I T
GATCCCAAC GAAAAGAGA GACCACATG GTCCTTCTT GAGTTTGTG ACAGCTGCT GGGATTACA
40
                    GFP
-----
                    Conector
-----
H G M D E L Y N G G A G S G A G G G G I R
CATGGCATG GATGAACTG TACAACGGC GGTGCAGGA TCCGGTGCG GGTGGCGGT GGCATCCGG
45
                    SNAP25(134-206)
-----
R V T N D A R E N E M D E N L E Q V S G I
AGGGTAACA AACGATGCC CGGGAAAAT GAGATGGAT GAGAACCTG GAGCAGGTG AGCGGCATC
                    SNAP25(134-206)
-----
I G N L R H M A L D M G N E I D T Q N R Q
ATCGGAAAC CTCCGCCAT ATGGCTCTA GACATGGGC AATGAGATT GACACCCAG AATCGCCAG
50
                    SNAP25(134-206)
-----
I D R I M E K A D S N K T R I D E A N Q R
ATCGACAGG ATCATGGAG AAGGCTGAT TCCAACAAA ACCAGAATT GATGAAGCC AACCAACGT
55
                    SNAP25(134-206)
                    Conector
                    6xHis Tag
-----
A T K M L G S G G G G G C H H H H H *
GCAACAAAG ATGCTGGGA AGTGGTGGC GGTGGCGGC TGTCATCAC CATCACCAT CACTAA

```

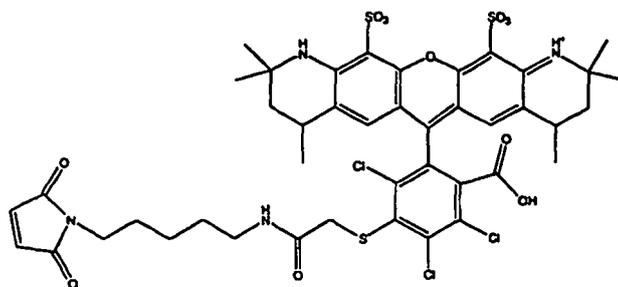
60 Los plásmidos pQBI GFP-SNAP25 (Cys-Stop) y pQBI GFP-SNAP25 (Cys-6His) se transformaron en células de *E. coli* BL21-CodonPlus®(DE3)-RIL (obtenidas de Stratagene, Inc.) que contenían el gen de la RNA polimerasa T7. Las células transformadas se propagaron en placas de caldo Luria que contenía ampicilina (100 µg/ml) y se incubaron durante la noche a 37°C. Se usaron colonias únicas para inocular cultivos de 2 ml de caldo Luria + ampicilina (LB + amp) y 1 ml de cada uno de estos cultivos se usó a su vez para inocular un cultivo de 500 ml de LB + amp de cada tipo.

ES 2 338 368 T3

Estos cultivos más grandes se dejaron crecer a 37°C con agitación hasta que la A₅₉₅ alcanzó a 0,5-0,6 unidades de absorbancia, momento en el que se retiraron del incubador y se dejaron enfriar. La expresión de la proteína, bajo el control inductor del represor lac, se indujo por la adición de Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 1 mM y los cultivos se incubaron durante la noche a 16°C con agitación. Se recogieron las células de alícuotas de 250 ml de cada cultivo por centrifugación (6.000 x g, 15 minutos, 4°C) y se almacenaron a -80°C, a menos que la proteína debiera ser purificada inmediatamente. Las proteínas de fusión se purificaron como se describe a continuación.

Todas las etapas de purificación se realizaron a 4°C. El sedimento celular de cada cultivo de 250 ml se resuspendió en 10 ml de tampón de unión de la proteína de fusión a la columna (HEPES 25 mM, pH 8,0; NaCl 500 mM; β-mercaptoetanol 1 mM; imidazol 10 mM) a los que se había añadido inhibidor de proteasas Protease Inhibitor Cocktail Set III (Caibiochem) 100 μl (μl/ml). Las células se lisaron por ultrasonido (1 minuto 40 segundos en pulsos de 10 segundos a una amplitud del 38%) y se clarificaron por centrifugación (16.000 rpm, 4°C, 45 minutos). Se equilibró la resina de afinidad (Talon® SuperFlow Co²⁺, B-D Biosciences, 8 ml) en soportes de columnas de 20 ml (BioRad) aclarando con 8 volúmenes de la columna de H₂O y 8 volúmenes de la columna de tampón de unión de la proteína de fusión a la columna. Se añadieron los lisados clarificados a la resina y se unieron en lotes por incubación horizontal durante 1-1,5 horas con oscilación suave. Tras la unión en lotes, se enderezaron las columnas y se drenaron las disoluciones, se recogieron y se hicieron pasar sobre lechos de resina nuevamente. Las columnas se lavaron a continuación con 8 volúmenes de la columna de lavado de la columna de proteína de fusión (HEPES 25, pH 8,0; NaCl 500 mM; β-mercaptoetanol 1 mM; imidazol 20 mM) y se eluyeron las proteínas con 15 ml de tampón de elución de la proteína de fusión de la columna (HEPES 25, pH 8,0; NaCl 500 mM; β-mercaptoetanol 1 mM; imidazol 500 mM), que se recogió en fracciones de aproximadamente 1,4 ml. Las fracciones verdes se combinaron para cada proteína y se concentraron hasta un volumen total inferior a 5 ml en un concentrador Apolo de 20 ml (QMWL 25 kDa, Orbital Biosciences). A continuación se desalaron las proteínas por FPLC (BioRad Biologic DuoLogic, detector UV-Vis QuadTec) con una columna de exclusión HiPrep de tamaño 26/10 (Pharmacia) y una fase móvil isocrática de tampón de desalado de proteína de fusión enfriado (HEPES 50 mM, pH 7,2, 4°C) a un caudal de 10 ml/min. Las proteínas desaladas se recogieron como una fracción única y la concentración se determinó por el ensayo de proteínas BioRad. Las disoluciones de proteínas se separaron en alícuotas de 500 μl, se congelaron rápidamente con N₂ líquido y se almacenaron a -80°C. Una vez descongeladas, las alícuotas de trabajo se almacenaron a 4°C, protegidas de la luz.

Se eligió Alexa Fluor™ 546 como fluoróforo complementario capaz de exhibir DARET con GFP. Alexa Fluor™ 546 C₅ maleimida es un derivado de Alexa Fluor™ 546 que comprende un conector diseñado para acoplar con, por ejemplo, los grupos sulfhidrilo libres de los residuos cisteína. La estructura de Alexa Fluor™ 546 C₅ maleimida se muestra a continuación:



Todos los reactivos, tampones y reacciones se mantuvieron a 4°C. Se añadieron cuatro microlitros de una disolución acuosa 10 mM de Alexa 546 C₅ maleimida (PM 1.034.37; Molecular Probes) a 200 μl de GFP-SNAP25 (Cys-Stop) (135 μM en tampón HEPES 25 mM, pH 7,2) y a una disolución de 200 μl de GFP-SNAP25 (Cys-6His) (135 μM en tampón HEPES 25 mM, pH 7,2), se mezcló bien, y se incubó a 4°C durante la noche. Las reacciones se transfirieron a filtros de centrifuga Biomax Ultrafree (30 kDa NMWL, Millipore), se concentraron, y a continuación se concentraron dos veces más desde HEPES 25 mM, pH 7,2, hasta eliminar la mayor parte del exceso de Alexa Fluor™ 546 sin reaccionar. Para eliminar el Alexa 546 sin reaccionar restante, se transfirieron las disoluciones concentradas a un microdializador por rotación Spin Microdialyzers (Harvard Apparatus) y se dializó cada una frente a 500 ml de HEPES 20 mM, pH 6,9, durante 1 hora, y frente a 3 x 250 ml de ese tampón durante aproximadamente 1,5 horas cada uno. Se retiraron pequeñas alícuotas para realizar la medición de fluorescencia y el resto de las reacciones se congelaron rápidamente en N₂ líquido y se almacenaron a -80°C.

Las mediciones de DARET se realizaron en un espectrofotómetro Cary Eclipse (Varian). La excitación de los conjugados de Alexa 546 fue a 474 nm, el máximo de excitación del componente GFP. La emisión se midió en el máximo de fluorescencia de Alexa 546 de 570 nm. En todos los casos, se utilizó una cubeta de longitud de paso doble (10 mm por 2 mm) y la emisión se observó a través del paso de 2 mm. Se colocó una disolución de 390 μl de tampón de reacción de la toxina (HEPES 50 mM, pH 7,2; TWEEN-20 al 0,1% v/v; ZnCl₂ 10 μM, DTT 10 mM) y 10 μl de GFP-SNAP25(Cys-Stop)-Alexa 546 o GFP-SNAP25 (Cys-6His)-Alexa 546 en la cubeta y se dejó equilibrar a 30°C. Cuando las mediciones de DARET, que se obtuvieron en intervalos de 30 segundos, se estabilizaron, se añadieron 10

ES 2 338 368 T3

μl de cadena ligera de BONT-A recombinante (rLC/A) a una concentración de 1,0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ó 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ a la cubeta. Se siguieron tomando las mediciones hasta que la señal se estabilizó nuevamente.

El sustrato de proteína de fusión utilizado como el material de partida para la construcción de los derivados que contienen cisteína en esta forma de realización de la invención contiene una región conectora y un marcador 6xHis después de la secuencia de SNAP25 134-206. Hay un total de cuatro residuos Cys en el sustrato, todos ellos en el dominio estable desde el punto de vista conformacional de GFP. Las cisteínas de GFP no están expuestas en la superficie de la estructura terciaria de GFP, y según se informa no reaccionan con los conectores de maleimida de los colorantes fluorescentes tales como Alexa Fluor 546. Plafker, K y col., J. Biol. Chem. 277: 30121-30127 (2002). Por consiguiente se insertó un residuo Cys en el lado C terminal del sitio de escisión de tipo A contenido en la secuencia SNAP-25 como un asa química para unir un segundo fluoróforo. Como no había manera de determinar *a priori* cuál sería la mejor posición de unión, se usaron ambas construcciones, aquella en la que se incorporó la cisteína como el residuo C terminal final y la otra variante (inmediatamente antes del marcador 6xHis). Las proteínas se expresaron, se purificaron y se usaron directamente en reacciones de marcación.

Los residuos cisteína introducidos se añaden al resto maleimida del colorante Alexa Fluor 546 por adición de Michael para formar un enlace tio-éter a la proteína de fusión. Se añadió un exceso 2-4 M del colorante a una disolución helada de la proteína de fusión a pH 7,2, y se dejó proceder la reacción durante la noche a 4°C. Se extinguió la reacción con β -mercaptoetanol y se eliminó el exceso de colorante por una combinación de filtración por centrifugación y diálisis. Los productos dializados se usaron sin otra purificación para los estudios DARET. Las proteínas marcadas se congelaron rápidamente con N_2 líquido y se almacenaron a -80°C entre los usos.

En un ensayo típico de polarización de fluorescencia (FP), la proteólisis del sustrato libera un fragmento marcado con fluoróforo que es significativamente más pequeño (o menos voluminoso) que la molécula original. La velocidad de caída de este fragmento es por consiguiente mayor que la de la molécula original y se observa una reducción en la polarización del fragmento más pequeño, comparada con el fragmento sin escindir. En la prueba de DARET en la que se trató nuestro conjugado de proteína de fusión con rLC/A, sin embargo, se midió un aumento, más que una disminución, en la polarización. El fluoróforo aceptor se excitó en el máximo de absorbancia de GFP y las mediciones de DARET se tomaron en el máximo de emisión de Alexa.

Los expertos en la técnica apreciarán, sin embargo, que en otras formas de realización de los ensayos DARET de la presente invención, una *disminución* en la polarización puede coincidir con la disociación de las características moleculares y el cese o disminución coincidente de la transferencia de energía de resonancia.

Sin desear estar limitados por la teoría, los presentes solicitantes creen que la despolarización observada para el sustrato intacto en este experimento se debe a la transferencia de energía de resonancia entre los fluoróforos aceptores inicialmente excitados y las otras moléculas (aceptor) que tienen un momento dipolar orientado aproximadamente (pero no exactamente) en la misma dirección. Puesto que la molécula del aceptor excitada no está precisamente en la misma orientación que el fluoróforo(s) donador(es) originalmente excitado(s), se observa una disminución en la polarización cuando se mide la polarización de la fluorescencia del fluoróforo aceptor. Este efecto se extingue cuando no puede tener lugar más la transferencia de energía de resonancia - es decir, cuando los fluoróforos donador y aceptor están a una distancia mayor de aproximadamente 100 Angstroms uno del otro.

El ensayo de DARET se repitió con diferentes concentraciones de rLC/A (2,4, 6,0 y 12,0 ng/ml) con el mismo resultado. Las representaciones gráficas de los datos para dos de las pruebas se muestran en las Figuras 1 A y 1 B.

Ejemplo 2

50 *Ensayo de proteasa BoNT-Sustrato recombinante y formato de lectura de alta capacidad*

En este Ejemplo, se realizó un ensayo de DARET de la actividad de BoNT/A y de BoNT-E usando una molécula de sustrato totalmente recombinante, y los resultados se obtuvieron tanto en un formato basado en cubetas como en un formato de 96 pocillos compatible con la selección de alto rendimiento.

Los plásmidos que codifican GFP-SNAP25-1xBFP y los sustratos de proteína de fusión -2xBFP se prepararon modificando el vector pQBI GFP para contener una región secuencia abajo de la región de GFP, que contenía los residuos 134-206 de SNAP25, seguido inmediatamente por un sitio de endonucleasa de restricción Kpn I y a continuación la secuencia que codifica el marcador HIS6. El ADN que codifica la proteína fluorescente azul (BFP) se obtuvo del plásmido pQBI T7-BFP, adquirido de Clontech (BD Biosciences). La región codificadora de BFP se amplificó por PCR usando cebadores de PCR diseñados para eliminar la metionina inicial y para introducir los sitios de restricción de Kpn I en ambos extremos.

65 Cebador BFP-A: 5'-GGTACCTTTGTATAGTTCATCCATG-3' (ID. SEC. Nº: 9)

Cebador BFP-B: 5'-GGTACCGCAAGCAAAGGAGAAGAACTC-3' (ID. SEC. Nº: 10)

ES 2 338 368 T3

Se montaron dos series de cuatro reacciones de PRC de 50 μ l. Cada reacción contenía 5 μ l de tampón Pfu 10x (Stratagene), 1 μ l de dNTPs (12,5 mM de cada uno; Promega), DNA polimerasa Pfu Turbo 1 μ l (Stratagene; adición en caliente), ADN molde 20-50 ng (pQBI T7-BFP; Clontech), y cada cebador en una concentración final de 0,2 μ M. Las reacciones se llevaron hasta un volumen final de 50 μ l con agua libre de nucleasa. Las condiciones del termociclador de PCR fueron:

Etapa 1	95 °C	2 minutos
Etapa 2	95 °C	1 minuto
Etapa 3	50 °C	30 segundos
Etapa 4	72 °C	18 minutos
Etapa 5	72 °C	5 minutos
Etapa 6	10 °C	mantener

Las etapas 2-4 se repitieron durante 25 ciclos antes de proceder a las Etapas 5 y 6. Después del termociclado, se añadió 1 μ l de enzima de restricción Dpn I (New England Biolabs) a cada reacción y se incubó durante la noche a 37°C para digerir el ADN molde. Los productos de reacción se analizaron por electroforesis en gel de agarosa. Todas las reacciones contenían productos del tamaño predicho, y todas se subclonaron en el vector TOPO-Blunt, que facilita la clonación de los fragmentos de PCR, que se usan a continuación para transformar químicamente las células de *E. coli* TOP-10 competentes (Invitrogen). Los transformantes se seleccionaron en las placas de LB que contenían kanamicina 50 μ g/ml, a continuación se cultivaron y se purificaron desde cultivos de 5 ml durante la noche por medio del kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen). La secuenciación (Sequetech) identificó tres clones que contenían la secuencia de ADN de BFP anticipada correcta.

El plásmido pQBI GFP-SNAP25-1xBFP se preparó ligando la secuencia de BFP como un fragmento de Kpn I de pBFP-TOPO en el vector pQBI GFP-SNAP25(KpnI). Como primera etapa, se digirieron ambos plásmidos con la enzima de restricción Kpn I. El vector linealizado pQBI GFP-SNAP25(KpnI) y el inserto de BFP se resolvieron por electroforesis en gel de agarosa y a continuación se purificaron por medio del kit de Extracción en Gel QIAquick® (Qiagen). El vector purificado en agarosa se desfosforiló con la fosfatasa alcalina de camarón (Roche) y purificó nuevamente el kit de Extracción en Gel QIAquick® (Qiagen). Se montaron dos reacciones de unión con relaciones molares de inserto:vector de 6:1 y 12:1 y se incubaron durante aproximadamente 20 horas a 16°C. Los productos de la reacción de unión se usaron para transformar químicamente las células de *E. coli* TOP-10 competentes (Invitrogen) y células de *E. coli* TOP-10 electrocompetentes (Invitrogen) tras una diálisis de 40 minutos frente a agua desionizada estéril. Las colonias transformadas se seleccionaron en las placas de LB que contenían ampicilina 100 μ g/ml, a continuación se cultivaron y se purificaron desde cultivos de 5 ml durante la noche por medio del kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen). La secuenciación (Sequetech) identificó tres clones que contenían la secuencia de ADN correcta.

El plásmido pQBI GFP-SNAP25-2xBFP fue un producto involuntario de la reacción de unión que creó el plásmido 1xBFP, siendo el resultado de una inserción doble de la región codificadora de BFP. La secuenciación inicial no detectó la presencia de los dos clones porque las reacciones de secuenciación que comenzaron secuencia arriba y secuencia abajo de la región tándem de BFP no se extendieron lo suficiente para secuenciar completamente una de las regiones de BFP y extenderse en la siguiente. Más tarde, cuando ésta se había realizado, la secuenciación proporcionó la confirmación final de que se habían creado dos plásmidos, uno con un único gen de BFP pQBI GFP-SNAP25-1XBFP y el otro con dos genes de BFP en tándem, pQBI GFP-SNAP25-2xBFP.

ES 2 338 368 T3

Las secuencias del ADN de GFP-SNAP-25-1xBFP (ID. SEC. Nº: 11) y las secuencias de aminoácidos (ID. SEC. Nº: 12) son las siguientes:

La proteína de fusión GFP-SNAP25-1xBFP y las secuencias codificadoras de ADN.

5

GFP

M A S K G E E L F T G V V P I L V E L D G
ATGGCTAGC AAAGGAGAA GAACTCTTC ACTGGAGTT GTCCCAATT CTTGTTGAA TTAGATGGT

10

GFP

D V N G H K F S V S G E G E G D A T Y G K
GATGTTAAC GGCCACAAG TTCTCTGTC AGTGGAGAG GGTGAAGGT GATGCAACA TACGGAAAA

15

GFP

L T L K F I C T T G K L P V P W P T L V T
CTTACCCTG AAGTTCATC TGCACTACT GGCAAACG CCGTTCCA TGGCCAACA CTAGTCACT

20

GFP

T L C Y G V Q C F S R Y P D H M K R H D F
ACTCTGTGC TATGGTGTT CAATGCTTT TCAAGATAC CCGGATCAT ATGAAACGG CATGACTTT

25

GFP

F K S A M P E G Y V Q E R T I F F K D D G
TTCAGAGT GCCATGCC GAAGGTAT GTACAGGAA AGGACCATC TTCTTCAA GATGACGGC

30

GFP

N Y K T R A E V K F E G D T L V N R I E L
AACTACAAG ACACGTGCT GAAGTCAAG TTGGAAGT GATACCCTT GTTAATAGA ATCGAGTTA

35

GFP

K G I D F K E D G N I L G H K L E Y N Y N
AAAGTATT GACTTCAAG GAAGATGCC AACATTCTG GGACACAAA TTGGAATAC AACTATAAC

40

GFP

S H N V Y I M A D K Q K N G I K V N P K T
TCACACAAT GTATACATC ATGGCAGAC AAACAAAAG AATGGAATC AAAGTGAAC TTCAGACC

45

GFP

R H N I E D G S V Q L A D H Y Q Q N T P I
CGCCACAAC ATTGAAGAT GGAAGCGTT CAACTAGCA GACCATTAT CAACAAAAT ACTCCAATT

50

55

60

65

ES 2 338 368 T3

GFP

G D G P V L L P D N H Y L S T Q S A L S K
GGCGATGGC CCTGTCCTT TTACCAGAC AACCATTTAC CTGTCCACA CAATCTGCC CTTTCGAAA

5

GFP

D P N E K R D H M V L L E F V T A A G I T
GATCCCAAC GAAAAGAGA GACCACATG GTCCTTCTT GAGTTTGTGTA ACAGCTGCT GGGATTACA

10

GFP

SNAP25 (134-206)

Conector

H G M D E L Y N G G A G S G A G G G G I R
CATGGCATG GATGAACTG TACAACGGC GGTGCAGGA TCCGGTGC GGTGGCGGT GGCATCCGG

15

SNAP25 (134-206)

R V T N D A R E N E M D E N L E Q V S G I
AGGGTAAAC AACGATGCC CGGGAAAAT GAGATGGAT GAGAACCCTG GAGCAGGTG AGCGGCATC

20

SNAP25 (134-206)

I G N L R H M A L D M G N E I D T Q N R Q
ATCGGAAAC CTCGCCAT ATGGCTCTA GACATGGGC AATGAGATT GACACCCAG AATGCCAG

25

SNAP25 (134-206)

I D R I M E K A D S N K T R I D E A N Q R
ATCGACAGG ATCATGGAG AAGGCTGAT TCCAACAAA ACCAGAATT GATGAAGCC AACCAACGT

SNAP25 (134-206)

BFP

Conector

30

A T K M L G S G G G G G T A S K G E E L F
GCAACAAAG ATGCTGGGA AGTGGTGGC GGTGGCGGT ACCGCAAGC AAAGGAGAA GAACTCTTC

BFP

35

T G V V P I L V E L D G D V N G H K F S V
ACTGGAGTT GTCCCAATT CTGTGTGAA -MTAGATGGT GATGTTAAC GGCCACAAG TTCTCTGT

BFP

40

S G E G E G D A T Y G K L T L K F I C T T
AGTGGAGAG GGTGAAGGT GATGCAACA TACGGAAAA CTTACCCCTG AAGTTCATC TGCACTACT

BFP

45

G K L P V P W P T L V T T L S H G V Q C F
GGCAAACCTG CCTGTTCCA TGGCCAACA CTAGTCACT ACTCTCTCT CATGGTGTT CAATGCTTT

BFP

S R Y P D H M K R H D P F K S A M P E G Y
TCAAGATAC CCGGATCAT ATGAAACGG CATGACTTT TTCAAGAGT GCCATGCCC GAAGGTTAT

BFP

50

V Q E R T I F F K D D G N Y K T R A E V K
GTACAGGAA AGGACCATC TTCTTCAA GATGACGGC AACTACAAG ACACGTGCT GAAGTCAAG

BFP

55

F E G D T L V N R I E L K G I D F K E D G
TTTGAAGGT GATACCCCTT GTTAATAGA ATCGAGTTA AAAGGTATT GATTTTAAA GAAGATGGA

BFP

60

N I L G H K L E Y N Y N S H N V Y I M A D
AACATTCTT GGACACAAA TTGGAATAC AACATAAC TCACACAAT GTATACATC ATGGCAGAC

BFP

K Q K N G I K A N F K I R H N I E D G S V

65

ES 2 338 368 T3

AAACAAAAG AATGGATC AAAGCGAAC TTCAAGATC CGCCACAAC ATTGAAGAT GGAAGCGTT

BFP

Q L A D H Y Q Q N T P I G D G P V L L P D
CAACTAGCA GACCATAT CAACAAAAT ACTCCAATT GGCATGGC CCTGTCCTT TTACCAGAC

BFP

N H Y L S T Q S A L S K D P N E K R D H M
AACCATTAC CTGTCCACA CAATCTGCC CTTTCGAAA GATCCCAAC GAAAAGAGA GACCACATG

BFP

Conector

V L L E F V T A A G I T H G M D E L Y K G
GTCCTTCTT GAGTTTGTGTA ACAGCTGCT GGGATTACA CATGGCATG GATGAACATA TACAAAGGT

Conector

His Tag

T H H H H H H
ACCCATCAC CATCACCAT CAC

La secuencia de nucleótidos (ID. SEC. N°: 13) y la secuencia de aminoácidos (ID. SEC. N°: 14) de GFP-SNAP25-2xBFP.

GFP

M A S K G E E L F T G V V P I L V E L D G
ATGGCTAGC AAAGGAGAA GAACTCTTC ACTGGAGTT GTCCCAATT CTTGTTGAA TTAGATGGT

GFP

D V N G H K F S V S G E G E G D A T Y G K
GATGTTAAC GGCCACAAG TTCTCTGTC AGTGGAGAG GGTGAAGGT GATGCAACA TACGGAAAA

GFP

L T L K F I C T T G K L P V P W P T L V T
CTTACCCTG AAGTTCATC TGCCTACT GGCAACTG CCTGTCCA TGGCCAACA CTAGTCACT

GFP

T L C Y G V Q C F S R Y P D H M K R H D F
ACTCTGTGC TATGGTGT CAATGCTTT TCAAGATAC CCGGATCAT ATGAAACGG CATGACTTT

GFP

F K S A M P E G Y V Q E R T I F F K D D G
TTCAAGAGT GCCATGCC GAAGTTAT GTACAGGAA AGGACCATC TTCTTCAA GATGACGGC

GFP

N Y K T R A E V K P E G D T L V N R I E L
AACTACAAG ACACGTGCT GAAGTCAAG TTGAAGGT GATACCCTT GTTAATAGA ATCGAGTTA

GFP

K G I D P K E D G N I L G H K L E Y N Y N
AAAGGTATT GACTTCAAG GAAGATGGC AACATTCTG GGACACAAA TTGGAATAC AACTATAAC

GFP

S H N V Y I M A D K Q K N G I K V N F K T
TCACACAAT GTATACATC ATGGCAGAC AAACAAAAG AATGGAATC AAAGTGAAC TTCAAGACC

GFP

R H N I E D G S V Q L A D H Y Q Q N T P I
CGCCACAAC ATTGAAGAT GGAAGCGTT CAACTAGCA GACCATAT CAACAAAAT ACTCCAATT

GFP

ES 2 338 368 T3

 G D G P V L L P D N H Y L S T Q S A L S R
 GGCGATGGC CCTGTCCTT TTACCAGAC AACCATTTAC CTGTCCACA CAATCTGCC CTTTCGAAA

GFP

 D P N E K R D H M V L L E F V T A A G I T
 GATCCCAAC GAAAAGAGA GACCACATG GTCCTTCTT GAGTTTGTA ACAGCTGCT GGGATTACA
 Conector

GFP

SNAP25(134-206)

 H G M D E L Y N G G A G S G A G G G G I R
 CATGGCATG GATGAAGT TACAACGGC GGTGCAGGA TCCGGTGC GGTGGCGGT GGCATCCGG

SNAP25(134-206)

 R V T N D A R E N E M D E N L E Q V S G I
 AAGGTAACA AACGATGCC CGGAAAAT GAGATGGAT GAGAACCCTG GAGCAGGTG AGCGGCATC

SNAP25(134-206)

 I G N L R H M A L D M G N E I D T Q N R Q
 ATCGGAAAC CTCGCCAT ATGGCTCTA GACATGGGC AATGAGATT GACACCCAG AATCGCCAG

SNAP25(134-206)

 I D R I M E K A D S N K T R I D E A N Q R
 ATCGACAGG ATCATGGAG AAGGCTGAT TCCAACAAA ACCAGAATT GATGAAGCC AACCAACGT

Conector

SNAP25(134-206)

BFP

 A T K M L G S G G G G G T A S K G E E L F
 GCAACAAAG ATGCTGGGA AGTGGTGGC GGTGGCGGT ACCGCAAGC AAAGGAGAA GAACTCTTC

BFP

 T G V V P I L V E L D G D V N G H K F S V
 ACTGGAGTT GTCCCAATT CTGTGTGAA TTAGATGGT GATGTTAAC GGCCACAAG TTCTCTGTC

BFP

 S G E G E G D A T Y G K L T L K F I C T T
 AGTGGAGAG GGTGAAGT GATGCAACA TACGGAAA CTTACCCTG AAGTTCATC TGCCTACT

BFP

 G K L P V P W P T L V T T L S H G V Q C F
 GGCAAACTG CCTGTTCCA TGGCAACA CTAGTCACT ACTCTCTCT CATGGTGT CAATGCTTT

BFP

 S R Y P D H M K R H D F F K S A M P E G Y
 TCAAGATAC CCGGATCAT ATGAAACGG CATGACTTT TTCAAGAGT GCCATGCCC GAAGGTTAT

BFP

 V Q E R T I F F K D D G N Y K T R A E V K
 GTACAGGAA AGGACCATC TTCTTCAA GATGACGGC AACTACAAG ACACGTGCT GAAAGTCAAG

BFP

 F E G D T L V N R I E L K G I D F K E D G
 TTGGAAGGT GATACCTT GTTAATAGA ATCGAGTTA AAAGGTATT GATTTAAA GAAGATGGA

BFP

 N I L G H K L E Y N Y N S H N V Y I M A D
 AACATTCTT GGACACAAA TTGGAATAC AACTATAAC TCACACAAT GTATACATC ATGGCAGAC

BFP

 K Q K N G I K A N F K I R H N I E D G S V
 AAACAAAAG AATGGAATC AARGCGAAC TTCAAGATC CGCCACAAC ATTGAAGAT GGAAGCGTT

ES 2 338 368 T3

BFP

Q L A D H Y Q Q N T P I G D G P V L L P D
CAACTAGCA GACCATTAT CAACAAAAT ACTCCAATT GCGGATGGC CCTGTCCTT TTACCAGAC

5

BFP

N H Y L S T Q S A L S K D P N E K R D H M
AACCATTAC CTGTCCACA CAATCTGCC CTTTCGAAA GATCCCAAC GAAAAGAGA GACCACATG

Conector

10

BFP

V L L E F V T A A G I T H G M D E L Y K G
GTCTTCTT GAGTTTGT A CAGCTGCT GGGATTACA CATGGCATG GATGAACTA TACAAAGGT

Conector

15

2° BFP

T A S K G E E L F T G V V P I L V E L D G
ACCGCAAGC AAAGGAGAA GAATCTTC ACTGGAGTT GTCCCAATT CTTGTGAA TTAGATGTT

20

2° BFP

D V N G H K F S V S G E G E G D A T Y G K
GATGTTAAC GGCCACAAG TTCTCTGTC AGTGGAGAG GGTGAAGGT GATGCAACA TACGAAAA

25

2° BFP

L T L K F I C T T G K L P V P W P T L V T
CTTACCCTG AAGTTCATC TGCCTACT GGCAACTG CCTGTTCCA TGGCCAACA CTAGTCACT

30

2° BFP

T L S H G V Q C F S R Y P D H M K R H D F
ACTCTCTCT CATGGTGT CAATGCTT TCAAGATAC CCGGATCAT ATGAAACGG CATGACTTT

35

2° BFP

P K S A M P E G Y V Q E R T I F F K D D G
TTCAAGAGT GCCATGCC GAAGGTTAT GTACAGGAA AGGACCATC TTCTTCAA GATGACGGC

40

2° BFP

N Y K T R A E V K F E G D T L V N R I E L
AACTACAAG ACACGTGCT GAAGTCAAG TTTGAAGGT GATACCCTT GTTAATAGA ATCGAGTTA

45

2° BFP

K G I D F K E D G N I L G H K L E Y N Y N
AAAGGTATT GATTTAAA GAAGATGGA AACATTCTT GGACACAAA TTGGAATAC AACTATAAC

2° BFP

S H N V Y I M A D K Q K N G I K A N P K I
TCACACAAT GTATACATC ATGGCAGAC AAACAAAAG AATGGAATC AAAGCGAAC TTCAAGATC

50

2° BFP

R H N I E D G S V Q L A D H Y Q Q N T P I
CGCCACAAC ATTGAAGAT GGAAGCGTT CAACTAGCA GACCATTAT CAACAAAAT ACTCCAATT

55

2° BFP

G D G P V L L P D N H Y L S T Q S A L S K
GCGGATGGC CCTGTCCTT TTACCAGAC AACCATTAC CTGTCCACA CAATCTGCC CTTTCGAAA

60

2° BFP

D P N E K R D H M V L L E F V T A A G I T
GATCCCAAC GAAAAGAGA GACCACATG GTCTTCTT GAGTTTGT A CAGCTGCT GGGATTACA

Conector

2nd BFP

6xHis Tag

H G M D E L Y K G T H H H H H H
CATGGCATG GATGAACTA TACAAAGGT ACCCATCAC CATCACCAT CAC

65

ES 2 338 368 T3

Los plásmidos pQBI GFP-SNAP25-1 xBFP y pQBI GFP-SNAP25-2xBFP se transformaron en células de *E. coli* BL21-(DE3) químicamente competentes (Novagen) que contenían el gen de la RNA polimerasa T7. Las células transformadas se propagaron en placas de caldo LB que contenían ampicilina 100 µg/ml y se incubaron durante la noche a 37°C. Se usaron colonias únicas, o poblaciones congeladas cultivadas a partir de colonias únicas, para inocular cultivos de partida pequeños (1 a 3 ml) en medio LB (ampicilina 100 µl/ml) o medio PA 0,5G (ampicilina 100 µl/ml). Los cultivos de partida se incubaron durante la noche con agitación a 37°C. Estos cultivos se usaron a su vez a una dilución 1000x para inocular cultivos más grandes en medio LB (ampicilina 100 µl/ml) o en medio de autoinducción ZYP-5052 (ampicilina 100 µl/ml). El medio no inductor, PA 0,5G contiene Na₂HPO₄ 50 mM, KH₂PO₄ 50 mM, (NH₄)₂SO₄ 25 mM, MgSO₄ 2 mM, metales traza 0,2x, glicerol al 0,5% y glucosa al 0,5% y el medio de autoinducción ZYP-5052 contiene N-Z amina al 1%, extracto de levadura al 0,5%, Na₂HPO₄ 50 mM, KH₂PO₄ 50 mM, (NH₄)₂SO₄ 25 mM, MgSO₄ 2 mM, metales traza 0,2x, glicerol al 0,5%, glucosa al 0,05% y lactosa al 0,2%. Los cultivos LB se cultivaron a 37°C con agitación hasta que la A₆₀₀ alcanzó 0,62-0,65 unidades de absorbancia, momento en el que se retiraron del incubador y se dejaron enfriar brevemente a temperatura ambiente. A continuación se indujo la expresión de la proteína por la adición de IPTG a una concentración final de 1 mM y los cultivos se incubaron durante la noche a 16°C con agitación. Los cultivos en ZYP-5052 se dejaron crecer a 37°C durante 8 horas tras la inoculación, tras lo que se redujo la temperatura y los cultivos se incubaron durante 16-19 horas a 16°C con agitación. La proteína debe expresarse debajo de 30°C para que el fluoróforo GFP se forme de manera óptima. Las células de los cultivos de expresión se recogieron por centrifugación (30 minutos a 6.000 x g, 4°C) y se almacenaron a -80°C hasta que fueron necesarias.

Para la purificación de las construcciones de la proteína de fusión, todas las etapas se efectuaron a 4°C o en hielo, excepto la etapa de lisis celular química, cuando era aplicable. Para la lisis por ultrasonido, se resuspendieron los sedimentos celulares de cultivos de 250 ml cada uno en 10 ml de tampón de unión a la columna (HEPES 25 mM, pH 8,0; NaCl 50 mM; imidazol 10 mM) y se sometieron a ultrasonido durante 2 minutos en pulsos de 10 segundos a una amplitud del 40% usando un Branson Digital Sonifier®. Para la lisis química, se resuspendieron los sedimentos celulares en 5 ml de tampón de lisis por gramo de pasta celular a temperatura ambiente [Tampón de lisis = reactivo BugBuster® (Novagen, número de catálogo 70584), reactivo de extracción de proteínas que contiene Benzonase nucleasa 25 U/ml (Novagen, número de catálogo 70664), rLysozyme (Novagen, número de catálogo 71297) y inhibidor de proteasas 1x Protease Inhibitor Cocktail Set III (Caibiochem, número de catálogo 539134)] y se incubaron con oscilación suave durante 20 minutos a temperatura ambiente. En ambos casos, los lisados se clarificaron por centrifugación (36000 RCF, 4°C, 0,5-1 hora).

La resina de la afinidad de Co²⁺ (5 ml de SuperFlow Talon® por sedimento celular para las células lisadas por ultrasonido; 5-10 ml por el sedimento celular para las células lisadas químicamente) se equilibra en un soporte de columnas de vidrio o desechables (Bio-Rad) aclarando con 4 volúmenes de columna de H₂O estéril y 4 volúmenes de columna de tampón de unión a la columna. A continuación se aplica el lisado a la columna y se deja entrar lentamente en la columna por gravedad. Una vez que el lisado ha entrado en la columna, la columna se lava con 5 volúmenes de columna de tampón de unión a la columna.

La proteína se eluye con 1-2 volúmenes de columna de tampón de elución de la columna (HEPES 25 mM, pH 8,0; NaCl 500 mM; imidazol 500 mM), que se recoge en fracciones de aproximadamente 2,0 ml. Las fracciones verdes se combinan, se concentran en un concentrador de 15 ml (MWCO 30 kDa, Millipore), y se desalan por FPLC (BioRad Biologic DuoLogic, detector UV-Vis QuadTec) con una columna de exclusión por tamaños HiPrep 26/10 (Pharmacia) y una fase móvil isocrática de tampón de desalado de la proteína de fusión enfriado (HEPES 25 mM, pH 7,2, 4°C) a un caudal de 10 ml/min. Las proteínas desaladas se recogen como una fracción única y la concentración se determina por densitometría, con una corrección realizada para el nivel de fluorescencia de ese lote según necesidad. La disolución de proteína se separan en alícuotas de 500 µl, se congelan rápidamente con nitrógeno líquido y se almacenan a -80°C. Una vez descongelada, una alícuotas de trabajo se almacenan a 4°C durante hasta 10 días, protegidas de la luz.

Las células de un cultivo de expresión de 500 ml se sedimentaron por centrifugación (10 minutos a 6000 RCF, 4°C), y se decantó todo excepto 30 ml de la disolución sobrenadante. Los sedimentos celulares se resuspendieron en la disolución sobrenadante restante, dando un volumen final de aproximadamente 38 ml. A la suspensión celular se le añadieron 420 µl de Protease Inhibitor Cocktail III (Caibiochem, número de catálogo 539134), 42 µl de Benzonase nucleasa (Novagen, número de catálogo 70664), y 4 ml de 10x reactivo de lisis celular FastBreak™ (Promega, número de catálogo V8573). La mezcla se incubó con oscilación suave durante 30 minutos a temperatura ambiente y se clarificó por centrifugación (30 minutos a 15000 RCF, 4°C).

Se preparó una columna IMAC de 10 ml transfiriendo resina de purificación de proteínas HisLink™ (Promega, número de catálogo, V8821) a un soporte de columna de vidrio (Bio-Rad) y drenando el tampón de almacenamiento. A continuación se aplicó el lisado a la columna y se dejó entrar lentamente en la columna por gravedad. Una vez que el lisado ha entrado en la columna, la columna se lava con 10 volúmenes de columna de tampón de lavado de la columna (HEPES 50 mM, pH 7,4; imidazol 10 mM). A continuación la proteína se eluyó con 2,5 volúmenes de columna de tampón de elución de la columna (HEPES 50 mM, pH 7,4; imidazol 300 mM) y se recogió en fracciones de aproximadamente 2,0 ml. Las fracciones 4-12 se combinaron, se concentraron en un concentrador de 15 ml (MWCO 30 kDa, Millipore) hasta un volumen final de aproximadamente 4,6 ml, y se desalaron por FPLC (BioRad Biologic DuoLogic, detector UV-Vis QuadTec) con una columna de exclusión por tamaños HiPrep 26/10 (Pharmacia) y una fase móvil isocrática de tampón de desalado de la proteína de fusión enfriado (HEPES 25 mM, pH 7,2, 4°C) a un caudal

ES 2 338 368 T3

de 10 ml/min. La proteína desalada se recogió como una fracción única de aproximadamente 10 ml. La disolución de proteínas se separó en 40 alícuotas de 250 μ l, se congelaron rápidamente con nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C.

5 Otra etapa de purificación por intercambio aniónico para las proteínas GFP-SNAP25-1xBFP y -2xBFP, que se habían purificado por IMAC, se realizó en una columna de intercambio aniónico de 1 ml UNO-Q1 [BioRad, número de catálogo 720-0001, y UNO-Q1 R (reemplazo) número de catálogo 720-0011] con tampones que se enfriaron previamente y se mantuvieron en hielo a lo largo del procedimiento cromatográfico. Se descongeló una alícuota de 500 μ l de cada una de las proteínas de fusión GFP-SNAP25-1xBFP (Lote N° 1) y GFP-SNAP25-2xBFP (Lote N° 7) y se concentró cada una hasta aproximadamente 100 μ l por filtración por centrifugación durante 15 minutos a 7.500 RCF, 4°C (Tubo y filtro de centrifuga de membrana 0,5 Biomax-30K NMWL, Millipore, número de catálogo UFV5BTK00). A continuación se aumentaron los volúmenes de la muestra hasta 1 ml por medio de la adición de tampón A (Tris-HCl 25 mM, pH 7,2) y se aplicaron a la columna a un caudal de 0,5 ml/min. Las muestras se eluyeron con tampón B (Tris-HCl 25 mM, pH 7,2, NaCl 1M) como se especifica a continuación (Tabla 5). La proteína eluida se intercambiaba a continuación con tampón una vez con HEPES 25 mM, pH 7,2.

TABLA 5. Protocolo de elución de intercambio aniónico (AEX) con gradientes por etapas seguido por un gradiente lineal.

Etapa	Tampón B %	Volumen	Caudal
1	5%	3,0 ml	0,5 ml/min
2	10%	3,0 ml	1,5 ml/min
3	10 \rightarrow 40%	20,0 ml	1,5 ml/min
4	100%	2,0 ml	1,5 ml/min

Hubo otro resultado, inesperado de la purificación por AEX. Las proteínas usadas para las pruebas GFP-SNAP25-1xBFP y GFP-SNAP25-2xBFP tuvieron cierta actividad inhibitoria cuando se incluyeron en ensayos DARET, dando como resultado una actividad aparentemente inferior de las toxinas ensayadas. Las muestras de proteína de cada lote, antes y después de la purificación por AEX, se probaron como sustratos en un ensayo de DARET de His10-rLC/A 1,4 nM. Sorprendentemente, los efectos inhibitorios observados previamente se eliminaron por completo en los sustratos purificados por AEX. Este resultado del ensayo de DARET indica que ciertos componentes inhibitorios en el tampón no se habían eliminado eficazmente por la purificación IMAC seguida por una etapa de desalado, y que la purificación por columna de AEX es el procedimiento más prometedor para eliminar la contaminación residual.

El complejo de BONT/A de 900 kDa, la toxina bicatenaria BoNT/A de 150 kDa y la toxina monocatenaria de BoNT/E de 160 kDa se adquirieron de MetabioLogics Inc. Generando mellas en la toxina monocatenaria con tripsina e produjo la toxina BoNT/E activa. Además, los plásmidos que codifican las versiones recombinantes de las cadenas ligeras de BoNT/A y BoNT/E (denominadas rLC/A y rLC/E, que contienen también un marcador polihistidina para facilitar la purificación) se expresaron en células *E. coli* BL21-CodonPlus®(DE3)-RIL.

Con respecto a los sustratos GFP-SNAP25-1xBFP y de GFP-SNAP25-2xBFP, GFP y BFP son parejas conocidas de FRET, y la transferencia de energía tiene lugar de manera eficaz entre estos fluoróforos. BFP tiene una máxima excitación de 387 nm y una máxima emisión en 450 nm, mientras que esta GFP particular tiene una máxima excitación en 473 nm y una máxima emisión en 509 nm. El segmento SNAP-25 de estos sustratos contiene sitios de escisión para BoNT/A (entre Gln₁₉₇ y Arg₁₉₈), BoNT/E (entre Arg₁₈₀ e Ile₁₈₁) y BoNT/C1 (entre Arg₁₉₈ y Ala₁₉₀).

El ensayo de DARET puede realizarse en formatos de cubeta o de placa. El formato de cubeta es el siguiente: se coloca una disolución de sustrato 5-12 μ M en tampón de reacción del ensayo (HEPES 50 mM, pH 7,2, Tween® 20 al 0,1% v/v; ZnCl₂ 10 μ M; ditioneitol (DTT) 10 mM) en una cubeta de cuarzo y se deja equilibrar a 37°C. A continuación se excita el sustrato luz polarizada plana en la máxima excitación de BFP de 387 nm y se mide la polarización de la luz emitida en la longitud de onda de 509 nm de GFP en intervalos de 0,5-3 minutos. Mientras tanto, se incubaba la toxina (o la cadena ligera recombinante) durante 20-30 minutos en el tampón de reacción del ensayo. Una vez estabilizada la señal del sustrato, se añade la toxina y se continúan las mediciones de polarización durante el período de reacción deseado.

En el formato de placa, la toxina (o la cadena ligera recombinante) se diluye hasta dos veces la concentración final de reacción en 2 x tampón de reacción del ensayo y se colocan alícuotas de 20 μ l en los pocillos de una placa de 96 pocillos, generalmente por triplicado. El sustrato también se diluye hasta dos veces la concentración final de reacción de 5-12 μ M, y se transfieren alícuotas de 25 μ l del sustrato a los pocillos correspondientes de una segunda placa de 96 pocillos. Las soluciones se calientan hasta 37°C y después de que la toxina se haya preincubado durante 20-30 minutos, se transfieren alícuotas de 20 μ l del sustrato transferido a la placa de toxina simultáneamente y se mezclan. La placa se transfiere a un lector de placas y las mediciones de polarización se toman cada 10-20 minutos en

ES 2 338 368 T3

la duración de las reacciones. La longitud de onda de excitación es 400 nm (el límite del lector de placas), la longitud de onda de emisión es 509 nm, usando un filtro de corte de 495 nm.

5 Los resultados de estos ensayos se muestran en las Figuras 2-9. La Figura 1 muestra el ensayo de DARET del complejo BoNT/A (900 kDa) con el sustrato GFP-SNAP25-2xBFP en el formato de ensayo basado en cubetas. Las condiciones finales de reacción fueron: complejo BoNT/A 200 pM y sustrato 10 μ M. La longitud de onda de excitación fue de 387 nm, y la longitud de onda de emisión fue de 509 nm. Un control negativo contenía sustrato 8 μ M y no contenía toxina. Los resultados indican claramente que en el curso de aproximadamente 60 minutos la polarización de la muestra que contenía toxina aumentó en aproximadamente 0,20 unidades de polarización, mientras que no hubo cambios para el control negativo.

15 La Figura 2 muestra el ensayo de DARET de BoNT/A (150 kDa) purificada con el sustrato de GFP-SNAP25-2xBFP en el formato de ensayo en cubeta. La toxina se añadió tras 11 minutos; la medición de la polarización continuó durante aproximadamente 120 minutos. La mezcla final de la reacción contenía complejo BoNT/A 300 pM y sustrato 8 μ M. La longitud de onda de excitación fue de 387 nm, mientras que la longitud de onda de emisión fue de 509 nm. Un control negativo contenía sustrato 8 μ M y no contenía toxina. Una vez más, se observó un aumento en la polarización en la cubeta que contenía BoNT/A, mientras que no hubo cambios en el control negativo.

20 La Figura 3 muestra el ensayo de DARET de rLC/A en un formato basado en cubetas. Una vez más el sustrato era GFP-SNAP25-2xBFP, y la toxina se añadió después de que se tomaran las mediciones de polarización durante 14 minutos. La concentración final de la toxina rLC/A fue de 9 nM, y la muestra contenía sustrato 8 μ M. Las mediciones de polarización se tomaron durante aproximadamente 45 minutos. La longitud de onda de excitación fue de 387 nm y la longitud de onda de emisión fue de 509 nm.

25 En la Figura 4 se lleva a cabo un ensayo basado en cubetas de la actividad de BoNT/E usando el ensayo de DARET con el sustrato GFP-SNAP25-2xBFP. Las concentraciones finales de toxina y sustrato son 200 pM y 8 μ M, respectivamente. Las lecturas de polarización se toman durante 18 minutos antes de añadir la toxina, y se continúan durante un total de aproximadamente 110 minutos. La longitud de onda de excitación fue de 387 nm y la longitud de onda de emisión fue de 509 nm.

30 La Figura 5 muestra el ensayo de DARET basado en placas del complejo BoNT/A (900 kDa) con el sustrato GFP-SNAP25-1xBFP. Las condiciones finales de reacción utilizaron sustrato 8 μ M y complejo BoNT/A 25 pM, 50 pM, 100 pM y 150 pM. La longitud de onda de excitación fue de 400 nm, mientras que la longitud de onda de emisión fue de 509 nm. Se utilizó un control negativo que contenía sustrato 8 μ M y no contenía toxina. Similar al ensayo basado en cubetas, los resultados indican que en el curso de aproximadamente 90 minutos aumentó la polarización de la muestra que contenía toxina, mientras que no hubo cambios para el control negativo. En el ensayo basado en placas los cambios en la polarización se controlaron en unidades mP o milipolarización.

40 Las Figuras 6, 7 y 8 muestran ensayos DARET de BoNT/A pura, BoNT/E y rLC/E, respectivamente, en formatos de ensayo basados en placas similares. En las figuras 7 y 8 el sustrato GFP-SNAP25-1xBFP se usó en una concentración de 8 μ M; en la Figura 9 el sustrato GFP-SNAP25-1xBFP se usó en una concentración de 10 μ M. En la Figura 7, la toxina pura de BoNT/A se usó en concentraciones de 25, 50, 100, 150 y 200 pM y se controló cada 20 minutos durante 100 minutos. En la Figura 8, se añadió BoNT/E pura a las reacciones en concentraciones de 400, 500 y 1000 pM. La polarización se midió aproximadamente cada 10 minutos. En la Figura 9, el ensayo de DARET basado en placas se llevó a cabo usando rLC/E 0,5 mM, 1,0 mM y 1,5 mM y la polarización se midió aproximadamente cada 10 minutos. En cada caso se observó un cambio en la polarización de la muestra como una indicación de que el sustrato estaba escindido.

50 Ejemplo 3

Ensayo de DARET de actividad de la tripsina

55 En este ejemplo, se usó la proteína de fusión GFP-SNAP-25-1XBFP como sustrato del ensayo para una actividad proteasa diferente de la contenida en una neurotoxina de clostridios.

Se predice que la tripsina escinde la secuencia de SNAP-25(134-206) 11 veces. El patrón de escisión de la tripsina es el siguiente: NH₃ ----P⁴-P³-P²-P¹==P¹'-P²'-P³'-P⁴'---- COOH, donde == es el sitio de escisión, y P¹ es Arg o Lys, aunque hay excepciones cuando están presentes otros residuos de aminoácidos específicos en otras posiciones.

60 El formato de cubetas es el siguiente: se coloca una disolución de sustrato GFP-SNAP-25-1XBFP 8 μ M en tampón de reacción del ensayo (HEPES 50 mM, pH 7,2, Tween[®] 20 al 0,1% (v/v); ZnCl₂ 10 μ M; ditioneitol (DTT) 10 mM), en una cubeta de cuarzo y se deja equilibrar a 37°C. A continuación el sustrato se excita con luz polarizada plana en el máximo de excitación de BFP de 387 nm y se mide la polarización de la luz emitida en la longitud de onda de GFP de 509 nm en intervalos de 0,5-3 minutos. Mientras tanto, se incubaba tripsina 170 pM durante 20-30 minutos en el tampón de reacción del ensayo. La medición del sustrato DARET se controló durante 17 minutos, a continuación se añadió la tripsina y la reacción continuó aproximadamente durante 90 minutos, con control de las muestras aproximadamente cada minuto.

ES 2 338 368 T3

Los resultados se muestran en la Figura 9. Como puede observarse, el sustrato se escindió separándose las dos características moleculares (las regiones de proteína de fusión marcadas con BFP y con GFP) casi instantáneamente tras la adición de tripsina a la mezcla de reacción, dando como resultado un aumento en la polarización de fluorescencia bajo las condiciones de ensayo de DARET, comparado con el sustrato intacto.

5

Ejemplo 4

Detección DARET de la actividad cinasa

10

Se someten péptidos que contienen un sitio de escisión de quimotripsina cerca de un sitio de fosforilación putativo a sensibilidad diferencial de proteasas, dependiendo de si el péptido se fosforila o no se fosforila.

15

La quimotripsina escinde de preferencia en Trp, Tyr y Phe en posición P1 (el residuo de aminoácido inmediato al lado amino terminal del sitio de escisión) y en menor grado (teniendo en cuenta cuando se utiliza quimotripsina de baja especificidad) en Leu, Met y His en posición P1. Las excepciones a estas reglas son las siguientes: cuando Trp se encuentra en posición P1, la escisión está bloqueada cuando Met o Pro se encuentran en posición P1' (el primer aminoácido en el lado carboxilo terminal del sitio de escisión) al mismo tiempo. Además, Pro en posición P1' bloquea prácticamente por completo la escisión, independientemente del aminoácido que esté en posición P1'. Cuando Met se encuentra en posición P1, la escisión está bloqueada por la presencia de Tyr en posición P1'. Pearson, R. B., and Kemp, B. E. in *Methods in Enzymology* Vol. 200: 62-81 (T. Hunter and B. M. Sefton (Eds.) San Diego: Academic Press. (1991)) proporcionan un listado de sitios de fosforilación y motivos de reconocimiento.

20

25

Se produce un péptido de fusión que tiene el motivo de fosforilación de cinasas de la subunidad reguladora *B. taurus* R_{II} de proteína cinasa A (PKA R_{II}), con un sitio de quimotripsina producido para que aparezca hacia el lado carboxi terminal (y situado cerca) de esta secuencia. El péptido también se construye para que contenga un marcador HIS6 para fines de purificación. Esta proteína de fusión se usa como sustrato para detectar la actividad de caseína cinasa II; el motivo del reconocimiento para la actividad de caseína cinasa II (con residuos fosforilados subrayados) es: S/T-X-X-E. El motivo de reconocimiento de fosforilación de PKA R_{II} es DSESEEEED (ID. SEC. N°: 15); ambas serinas en este motivo están fosforiladas. La secuencia de PKA R_{II} (número de acceso del GenBank P00515) es la siguiente, con los motivos identificados anteriormente, subrayados.

30

35

40

```
SHIQIPPLGT ELLQGYTVEV LRQRPPDLVD FAVDYFTRLR EARSRASTPP AAPPSSGSQDF DPGAGLVADA
VADSESEDEE DLDVPIPGRF DRRVSVCAET YNPDEEEEDT DPRVIHPKTD QQRCLQEAC KDILLFKNLD
PEQLSQVLDA MFERTVKVDE HVIDQGDDGD NFYVIERGTY DILVTKDNQT RSVGQYDNHG SFGELALMYN
TPRAATIVAT SEGSLWGLDR VTFRRRIIVKN NAKKRKMFEF FIESVPLLKS LEVSERMKIV DVIGEKVYKD
GERIITQGEK ADSFYIIESG EVSILIKSKT KVNKDGENQE VEIARCHKGQ YFGELALVTN KPRAASAYAV
GDVKCLVMDV QAFERLLGPC MDIMKRNISH YEEQLVKMFG SSMDLIDPGQ (ID Sec. N° 16)
```

45

Este péptido de fusión está marcado en el extremo N terminal con cumarina y en el extremo carboxilo terminal con fluoresceína.

50

El péptido de fusión se combina a continuación con ATP y la preparación de cinasa cuya actividad va a evaluarse y se incuba bajo condiciones de reacción que permitan que se produzca la fosforilación. Tras esto, la reacción de cinasa se extingue y el sustrato se incuba en una segunda reacción con quimotripsina. Bajo estas condiciones, el sustrato fosforilado interferirá con la escisión por quimotripsina, mientras que el sustrato no fosforilado se escindiría fácilmente.

55

60

La muestra se excita usando luz polarizada plana en una longitud de onda de máxima absorción para cumarina (370 nm). Usando DARET, la polarización controlada en la longitud de onda de la máxima emisión de la fluoresceína bajo estas condiciones cambiará con el aumento de la concentración de cinasa. La escisión interrumpe la transferencia de energía de resonancia entre los fluoróforos donador y aceptor en el sustrato peptídico, mientras que los sustratos peptídicos fosforilados, no escindidos mantienen la transferencia de energías de resonancia. Bajo las condiciones de reacción, se escinde la mayor parte del péptido no fosforilado, y solo un pequeño porcentaje del péptido fosforilado. El aumento de actividad cinasa da como resultado la disminución de la escisión proteolítica del sustrato (y por consiguiente disminución de la interferencia o cese de la transferencia de energía de resonancia) y una reducción en la despolarización con relación al control "sin proteasa".

Ejemplo 5

65

Se construye una sonda de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos (5'-TTC TCCTTGCTAGCCAT-3') (ID. SEC. N°: 17) a la que está unido un conector éster N-hidroxisuccinamida sintético en 3' que comprende el compuesto Alexa Fluor® 350 unido al extremo distal como fluoróforo donador. El conector tiene menos de 100

ES 2 338 368 T3

Angstroms de longitud, y de preferencia menos de 50 Angstroms de longitud. Además, se sintetiza un ácido nucleico de ID. SEC. N°: 13 y el compuesto Alexa Fluor® 488 se une a través del extremo 5' de esta secuencia de ADN por medio de otro enlace éster N-hidroxisuccinamida.

5 La hebra de ácido nucleico marcado de secuencia ID. SEC. N°: 13 se mezcla en disolución con la sonda de ADN marcada indicada anteriormente, y se lleva a 98°C. A continuación se enfría la disolución lentamente hasta 32°C, mientras se permite que la luz polarizada plana ilumine la disolución a una longitud de onda de 346 nm. La polarización de fluorescencia de disolución se controla a 519 nm.

10 A medida que se enfría la disolución, y más moléculas de la sonda y de la hebra de ácido nucleico diana hibridan, tiene lugar la transferencia de energía de resonancia entre el fluoróforo donador Alexa Fluor® 350 y el fluoróforo aceptor Alexa Fluor® 488, dando como resultado una disminución en la despolarización observada a medida que la temperatura se acerca a la temperatura ambiente. Por consiguiente, este sistema modelo ilustra la aplicabilidad general del uso de DARET para la detección de unión o hibridación de dos moléculas separadas.

15 Aunque la invención se ha descrito con referencia a los ejemplos proporcionados anteriormente, debe entenderse que pueden realizarse diversas modificaciones sin apartarse del espíritu de la invención. Por consiguiente, la invención está limitada sólo por las siguientes reivindicaciones.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Un procedimiento basado en DARET (despolarización tras transferencia de energía de resonancia) para determinar la proximidad de dos o más características moleculares, que son regiones moleculares o celulares, en una muestra, comprendiendo el procedimiento:

- 10 a) poner en contacto en dicha muestra, una primera característica molecular marcada con un fluoróforo donador que tiene un primer espectro de absorción y un primer espectro de emisión, y una segunda característica molecular marcada con un fluoróforo aceptor que tiene un segundo espectro de absorción que se superpone con el primer espectro de emisión y un segundo espectro de emisión;
- 15 b) irradiar dicha muestra con luz plana polarizada a una longitud de onda dentro de dicho primer espectro de absorción;
- c) detectar la polarización de fluorescencia de la muestra a una longitud de onda dentro de dicho segundo espectro de emisión; y
- 20 d) correlacionar un cambio en la transferencia de energía y en la polarización con un cambio en la proximidad de la primera y la segunda características moleculares entre ellas en el transcurso del tiempo o con relación a un control,

25 en el que una disminución en la transferencia de energía y un aumento en la polarización en el transcurso del tiempo o con relación a un control indican que la distancia entre la primera y la segunda característica ha aumentado, mientras que un aumento en la transferencia de energía y una disminución en la polarización en el transcurso del tiempo o con relación a un control indican que la distancia entre la primera y la segunda característica ha disminuido.

30 2. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que dicha primera y segunda características moleculares están comprendidas en la misma molécula.

3. El procedimiento de la reivindicación 2 en el que dicha molécula comprende una secuencia de aminoácidos.

35 4. El procedimiento de la reivindicación 3 en el que dicha primera característica molecular está comprendida en una mitad amino terminal de dicha secuencia de aminoácidos.

5. El procedimiento de la reivindicación 3 en el que dicha primera característica molecular está comprendida en una mitad carboxilo terminal de dicha secuencia de aminoácidos.

40 6. El procedimiento de la reivindicación 3 en el que al menos uno de dichos fluoróforo donador y aceptor comprende un polipéptido unido a dicha molécula.

7. El procedimiento de la reivindicación 6 en el que al menos uno de dichos fluoróforo donador o aceptor está unido a dicha molécula por un enlace peptídico.

45 8. El procedimiento de la reivindicación 6 en el que al menos un fluoróforo se selecciona del grupo constituido por una proteína fluorescente verde, una proteína fluorescente azul, una proteína fluorescente roja, una proteína fluorescente cian, una proteína fluorescente amarilla, un péptido tetracisteína que interactúa fuertemente con un fluoróforo, un polipéptido AGT que interactúa fuertemente con un fluoróforo, un polipéptido dehalogenasa que interactúa fuertemente con un fluoróforo, un colorante fluorescente violeta, un colorante fluorescente azul, un colorante fluorescente cian, un colorante fluorescente verde, un colorante fluorescente amarillo verdoso, un colorante fluorescente amarillo, un colorante fluorescente naranja, un colorante fluorescente rojo anaranjado, un colorante fluorescente rojo, un colorante fluorescente rojo extremo o un colorante fluorescente infrarrojo, o, un fluoróforo aceptor es un colorante fluorescente violeta, un colorante fluorescente azul, un colorante fluorescente cian, un colorante fluorescente verde, un colorante fluorescente amarillo verdoso, un colorante fluorescente amarillo, un colorante fluorescente naranja, un colorante fluorescente rojo anaranjado, un colorante fluorescente rojo, un colorante fluorescente rojo extremo o un colorante fluorescente infrarrojo.

60 9. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que dichas primera y segunda características moleculares están contenidas en el mismo polipéptido, y están separadas por un sitio de escisión de proteasas susceptible a enzimas.

10. El procedimiento de la reivindicación 9 en el que sitio de escisión de proteasas comprende un sitio de escisión de tripsina, un sitio de escisión de quimotripsina y un sitio de escisión de endopeptidasa de toxina botulínica.

65 11. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que dicha primera característica molecular y dicha segunda característica molecular son dominios de polipéptidos.

ES 2 338 368 T3

12. El procedimiento de la reivindicación 1 en el que dichas primera y segunda características moleculares están situadas en una única molécula de sustrato, separadas por una diana escindible.

5 13. El procedimiento de la reivindicación 12 en el que la diana escindible comprende un dominio de polipéptido.

14. El procedimiento de la reivindicación 11 en el que el dominio de polipéptido es escindible por una enzima selectiva.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Figura 1

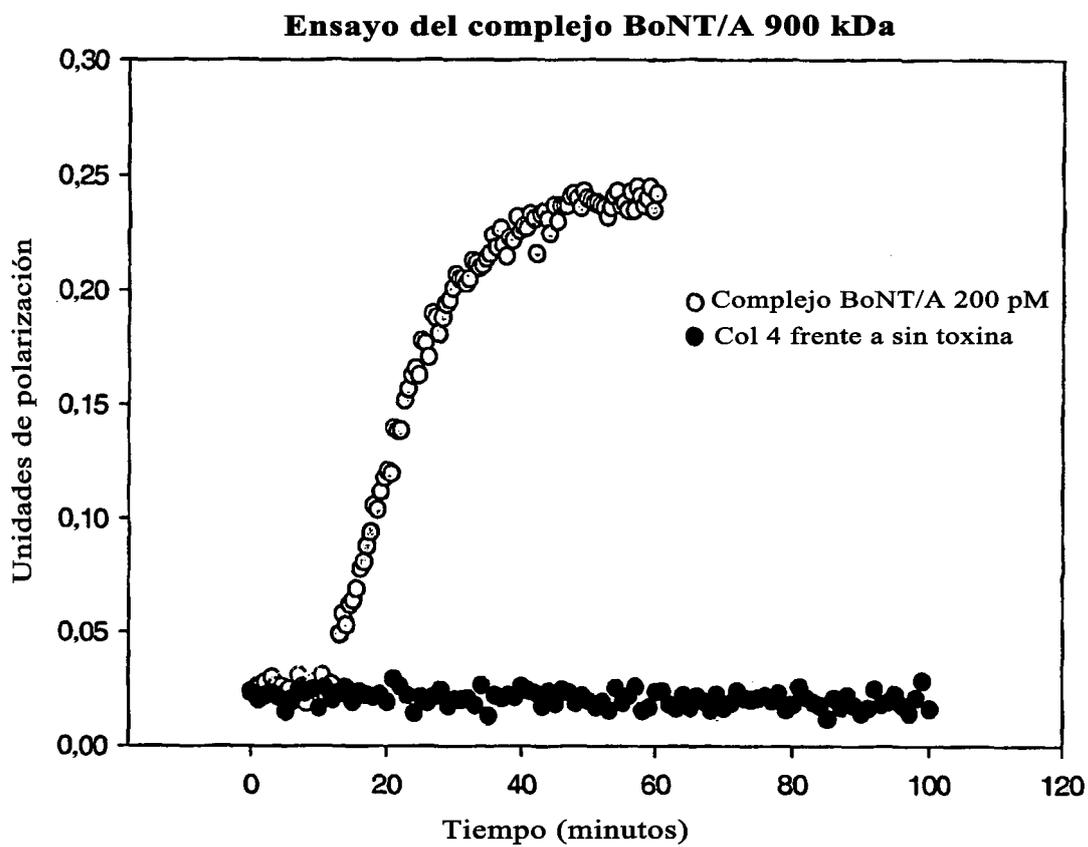


Figura 2

Ensayo de BoNT/A pura (150 kDa)

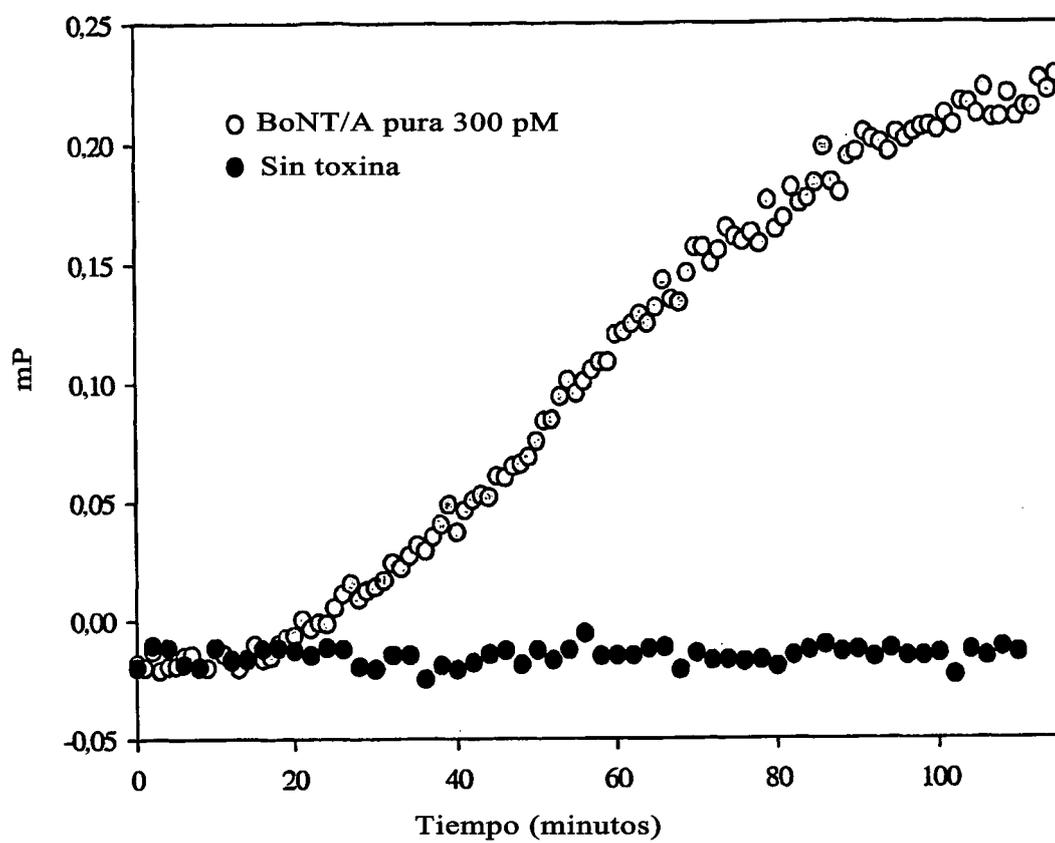


Figura 3

Ensayo de rLC/A

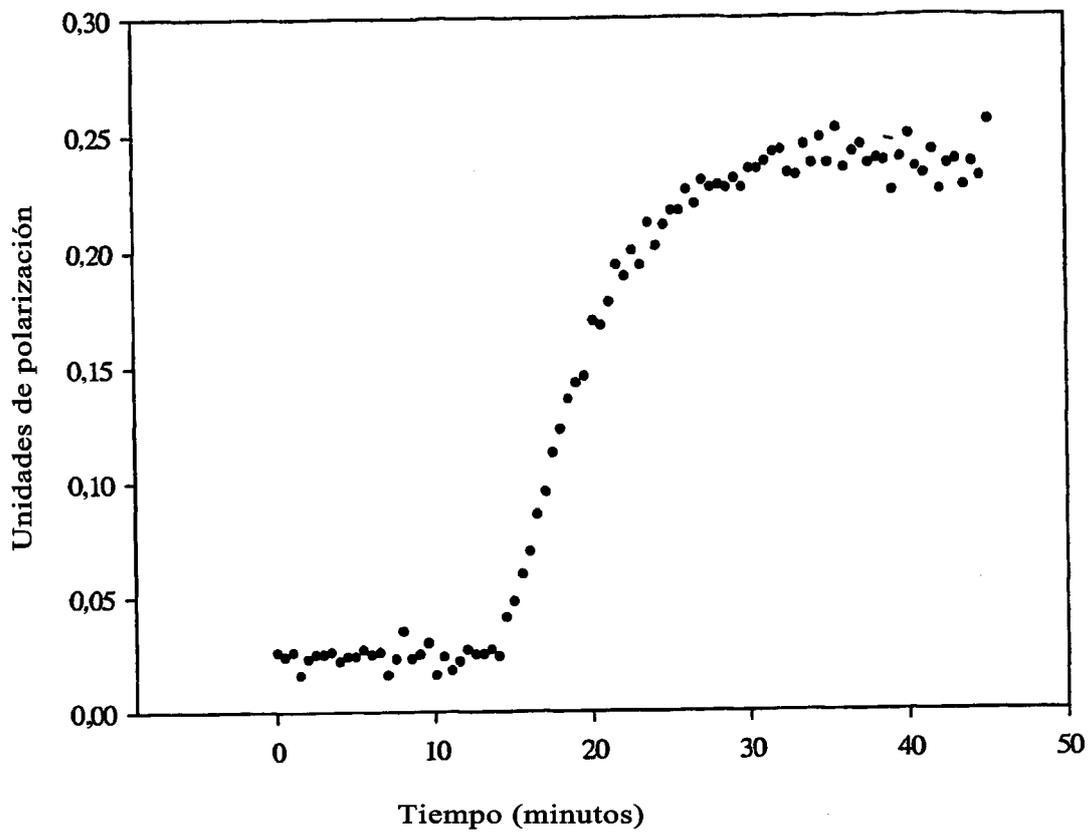


Figura 4

Ensayo de BoNT/E bicatenaria (150 kDa)

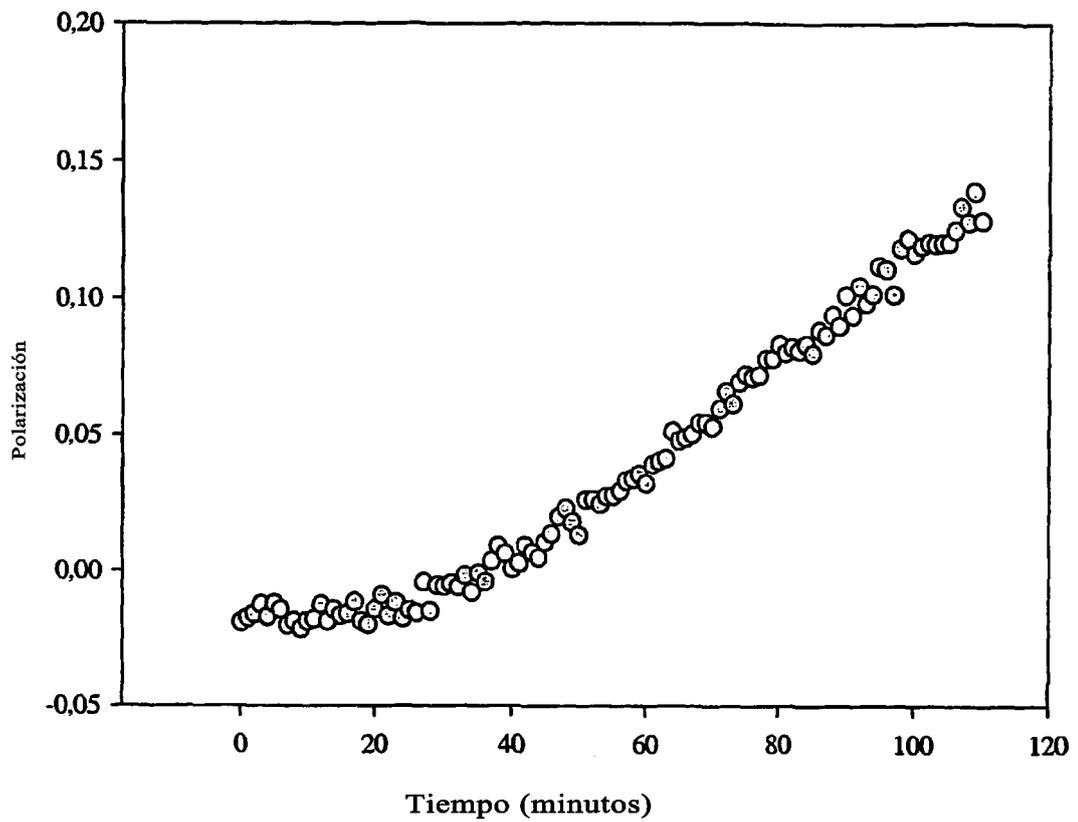


Figura 5

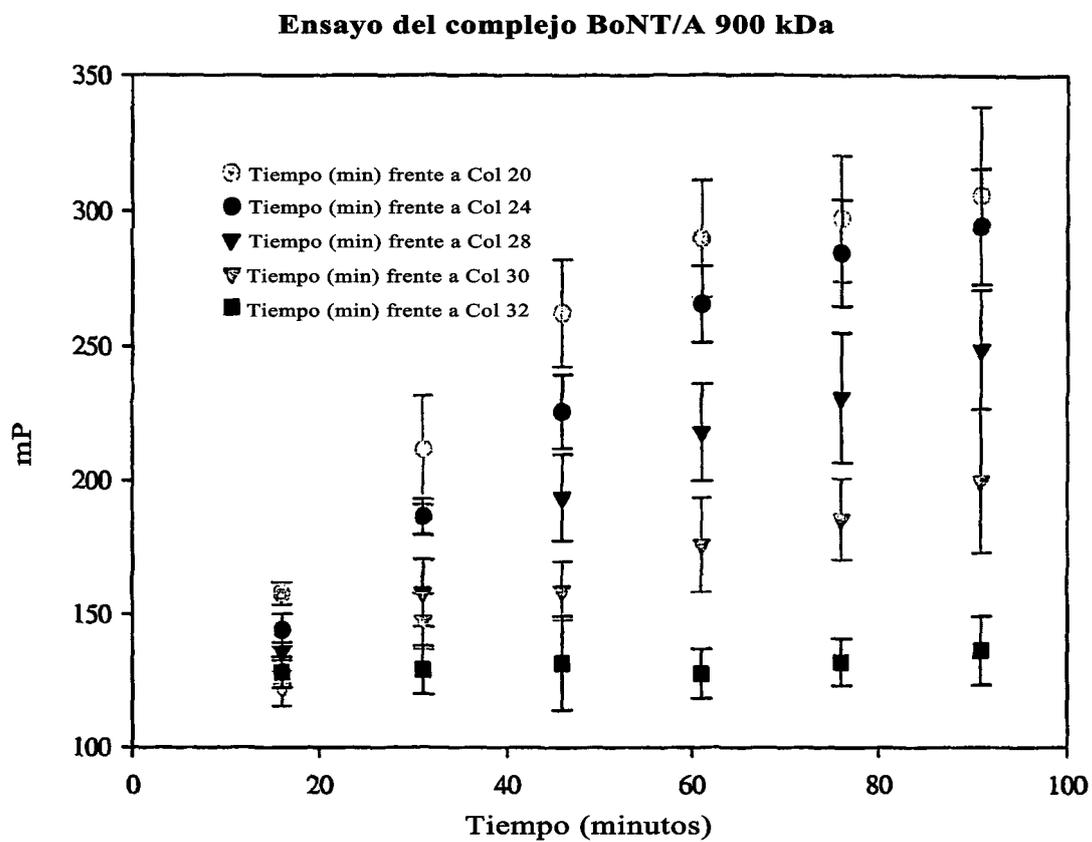


Figura 6

Ensayo de BoNT/A pura (150 kDa)

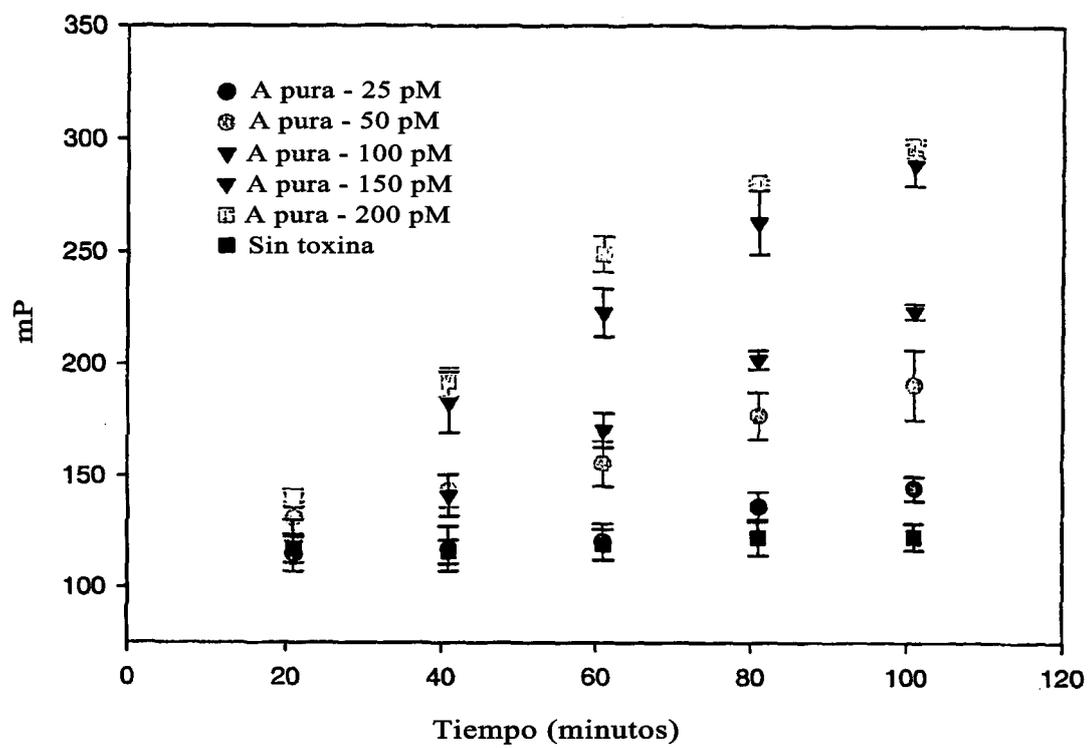


Figura 7

Ensayo de BoNT/E bicatenaria (150 kDa)

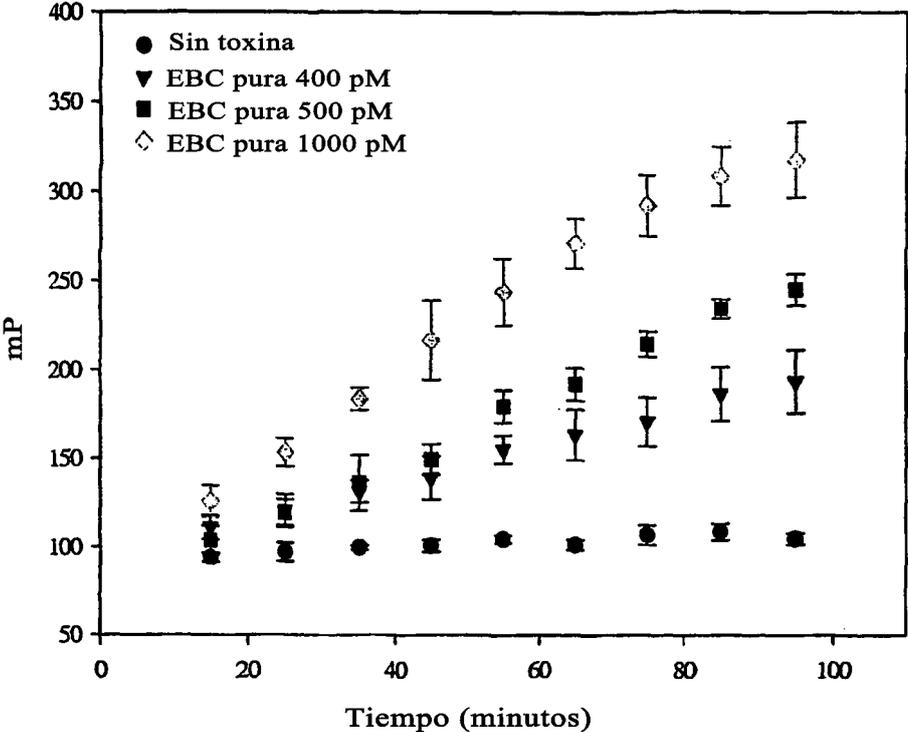


Figura 8

Ensayo de rLC/E

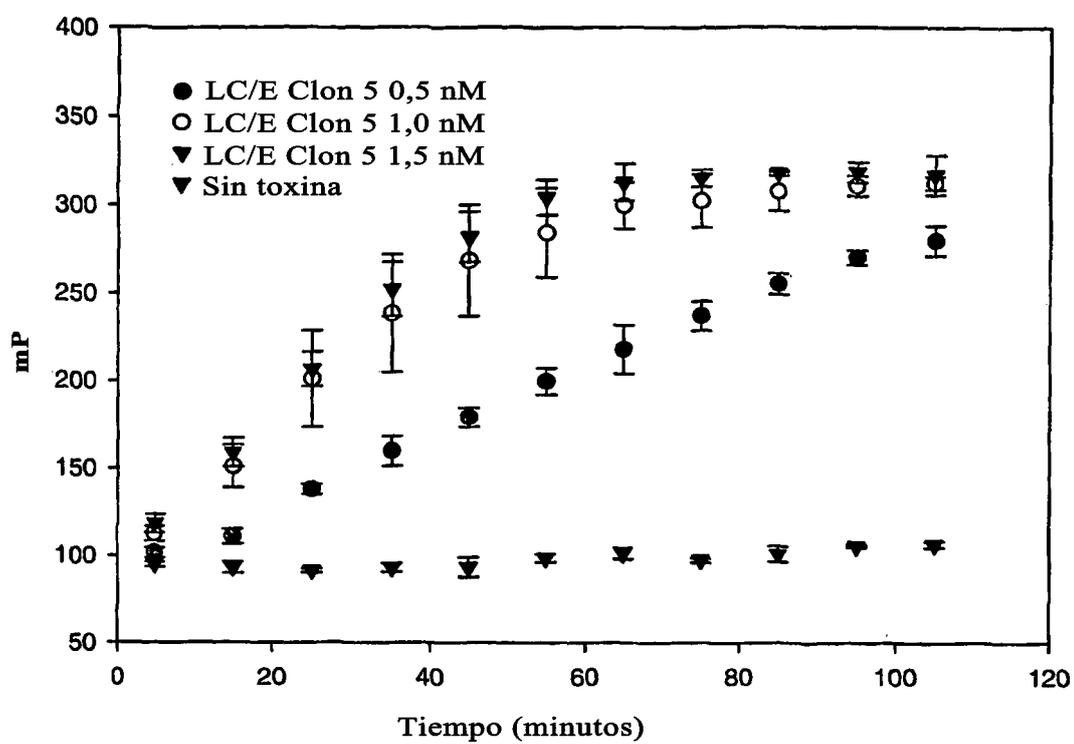
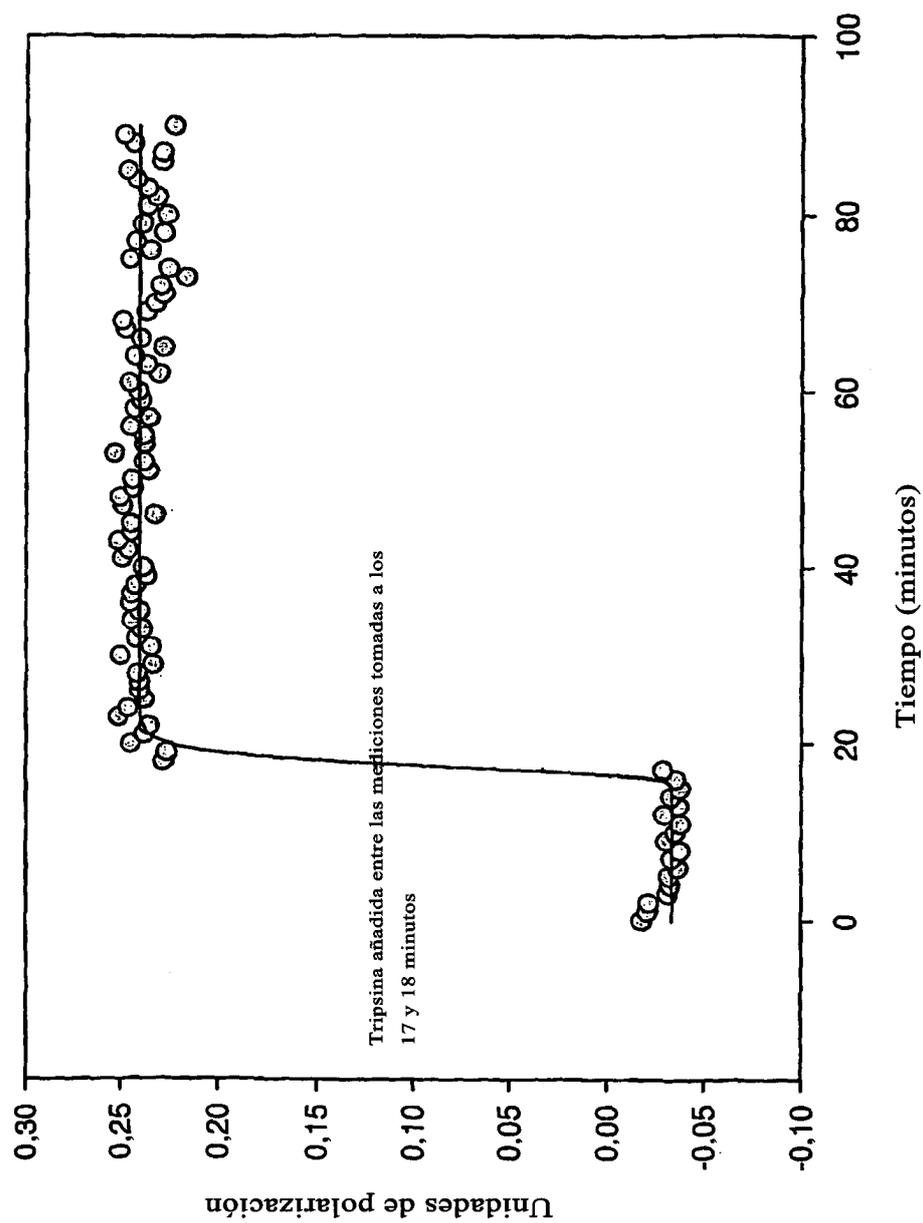


Figura 9

Ensayo FRET FP de tripsina, en formato de cubetas
Sustrato GFP SNAP25 1xBFP 8 μ M



ES 2 338 368 T3

LISTA DE SECUENCIAS

- 5 <110> Gilmore, Marcella A.
Williams, Dudley J.
Steward, Lance E.
- <120> Ensayos de interactividad molecular o celular usando despolarización tras transferencia de energía de resonancia (DARET)
- 10 <130> 17832 (BOT)
- <160> 17
- 15 <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1
- 20 <211> 5
- <212> PRT
- <213> Secuencia sintética
- 25 <400> 1
- | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Gly | Gly | Gly | Ser |
| 1 | | | | 5 |
- <210> 2
- 30 <211> 5
- <212> PRT
- <213> Secuencia sintética
- 35 <400> 2
- | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|
| Glu | Ala | Ala | Ala | Lys |
| 1 | | | | 5 |
- 40 <210> 3
- <211> 35
- <212> ADN
- 45 <213> Secuencia sintética
- <400> 3
- 50 gttattgctc agcttagca gtgatggtga tgggtg
- <210> 4
- <211> 34
- 55 <212> ADN
- <213> Secuencia sintética
- <400> 4
- 60 gatggtgatg gtgatgacag ccgccaccgc cacc
- <210> 5
- 65 <211> 334
- <212> PRT
- <213> Secuencia sintética

ES 2 338 368 T3

<400> 5

1	Met	Ala	Ser	Lys	Gly	Glu	Glu	Leu	Phe	Thr	Gly	Val	Val	Pro	Ile	Leu
				5					10						15	
5																
	Val	Glu	Leu	Asp	Gly	Asp	Val	Asn	Gly	His	Lys	Phe	Ser	Val	Ser	Gly
				20					25					30		
10																
	Glu	Gly	Glu	Gly	Asp	Ala	Thr	Tyr	Gly	Lys	Leu	Thr	Leu	Lys	Phe	Ile
			35					40					45			
15																
	Cys	Thr	Thr	Gly	Lys	Leu	Pro	Val	Pro	Trp	Pro	Thr	Leu	Val	Thr	Thr
		50					55					60				
20																
	Leu	Cys	Tyr	Gly	Val	Gln	Cys	Phe	Ser	Arg	Tyr	Pro	Asp	His	Met	Lys
	65					70					75					80
25																
	Arg	His	Asp	Phe	Phe	Lys	Ser	Ala	Met	Pro	Glu	Gly	Tyr	Val	Gln	Glu
				85						90					95	
30																
	Arg	Thr	Ile	Phe	Phe	Lys	Asp	Asp	Gly	Asn	Tyr	Lys	Thr	Arg	Ala	Glu
			100						105					110		
35																
	Val	Lys	Phe	Glu	Gly	Asp	Thr	Leu	Val	Asn	Arg	Ile	Glu	Leu	Lys	Gly
			115					120					125			
40																
	Ile	Asp	Phe	Lys	Glu	Asp	Gly	Asn	Ile	Leu	Gly	His	Lys	Leu	Glu	Tyr
		130					135					140				
45																
	Asn	Tyr	Asn	Ser	His	Asn	Val	Tyr	Ile	Met	Ala	Asp	Lys	Gln	Lys	Asn
	145					150					155					160
50																
	Gly	Ile	Lys	Val	Asn	Phe	Lys	Thr	Arg	His	Asn	Ile	Glu	Asp	Gly	Ser
				165						170				175		
55																
	Val	Gln	Leu	Ala	Asp	His	Tyr	Gln	Gln	Asn	Thr	Pro	Ile	Gly	Asp	Gly
			180						185					190		
60																
	Pro	Val	Leu	Leu	Pro	Asp	Asn	His	Tyr	Leu	Ser	Thr	Gln	Ser	Ala	Leu
			195					200					205			
65																
	Ser	Lys	Asp	Pro	Asn	Glu	Lys	Arg	Asp	His	Met	Val	Leu	Leu	Glu	Phe
		210					215					220				
70																
	Val	Thr	Ala	Ala	Gly	Ile	Thr	His	Gly	Met	Asp	Glu	Leu	Tyr	Asn	Gly
	225					230					235					240
75																
	Gly	Ala	Gly	Ser	Gly	Ala	Gly	Gly	Gly	Gly	Ile	Arg	Arg	Val	Thr	Asn
					245					250					255	

ES 2 338 368 T3

<210> 7

<211> 334

<212> PRT

5 <213> Secuencia sintética

<400> 7

10 Met Ala Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu
1 5 10 15

15 Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly
20 25 30

20 Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile
35 40 45

25 Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr
50 55 60

30 Leu Cys Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys
65 70 75 80

35 Arg His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu
85 90 95

40 Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu
100 105 110

45 Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly
115 120 125

50 Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr
130 135 140

55 Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn
145 150 155 160

60 Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Thr Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser
165 170 175

65 Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly
180 185 190

Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu
195 200 205

ES 2 338 368 T3

	Ser	Lys	Asp	Pro	Asn	Glu	Lys	Arg	Asp	His	Met	Val	Leu	Leu	Glu	Phe
	210						215					220				
5	Val	Thr	Ala	Ala	Gly	Ile	Thr	His	Gly	Met	Asp	Glu	Leu	Tyr	Asn	Gly
	225					230					235					240
10	Gly	Ala	Gly	Ser	Gly	Ala	Gly	Gly	Gly	Gly	Ile	Arg	Arg	Val	Thr	Asn
					245					250					255	
15	Asp	Ala	Arg	Glu	Asn	Glu	Met	Asp	Glu	Asn	Leu	Glu	Gln	Val	Ser	Gly
				260					265					270		
20	Ile	Ile	Gly	Asn	Leu	Arg	His	Met	Ala	Leu	Asp	Met	Gly	Asn	Glu	Ile
			275					280					285			
25	Asp	Thr	Gln	Asn	Arg	Gln	Ile	Asp	Arg	Ile	Met	Glu	Lys	Ala	Asp	Ser
	290						295					300				
30	Asn	Lys	Thr	Arg	Ile	Asp	Glu	Ala	Asn	Gln	Arg	Ala	Thr	Lys	Met	Leu
	305					310					315					320
35	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Cys	His							
					325					330						

<210> 8

<211> 1005

<212> ADN

40 <213> Secuencia sintética

45

50

55

60

65

ES 2 338 368 T3

<400> 8

5	atggctagca aaggagaaga actcttcaact ggagttgtcc caattcttgt tgaattagat	60
	ggtgatgtta acggccacaa gttctctgtc agtggagagg gtgaaggatga tgcaacatac	120
	ggaaaactta ccctgaagtt catctgcaact actggcaaac tgctgtttcc atggccaaca	180
10	ctagtcaacta ctctgtgcta tgggtgttcaa tgcttttcaa gataccgga tcatatgaaa	240
	cggcatgact ttttcaagag tgccatgcc gaaggttatg tacaggaaag gaccatcttc	300
15	ttcaaagatg acggcaacta caagacacgt gctgaagtca agtttgaagg tgataccctt	360
	gttaatagaa tcgagttaa aggtattgac ttcaaggaag atggcaacat tctgggacac	420
20	aaattggaat acaactataa ctcacacaat gtatacatca tggcagacaa acaaaagaat	480
	ggaatcaaag tgaacttcaa gaccogccac aacattgaag atggaagcgt tcaactagca	540
25	gaccattatc aacaaaatac tccaattggc gatggcctg tccttttacc agacaacat	600
	tacctgtcca cacaatctgc cctttcgaaa gatcccaacg aaaagagaga ccacatggtc	660
30	cttcttgagt ttgtaacagc tgctgggatt acacatggca tggatgaact gtacaacggc	720
	ggtgcaggat ccggtgcggg tggcgggtggc atccggaggg taacaaacga tgcccgggaa	780
35	aatgagatgg atgagaacct ggagcaggtg agcggcatca tcggaaacct ccgccatag	840
	gctctagaca tgggcaatga gattgacacc cagaatcgcc agatcgacag gatcatggag	900
40	aaggctgatt ccaacaaaac cagaattgat gaagccaacc aacgtgcaac aaagatgctg	960
	ggaagtggtg gcggtggcgg ctgtcatcac catcaccatc actaa	1005

45 <210> 9

<211> 25

<212> ADN

50 <213> Secuencia sintética

<400> 9

55 ggtaccttg tatagttcat ccatg

<210> 10

<211> 27

60 <212> ADN

<213> Secuencia sintética

<400> 10

65 ggtaccgca gcaaaggaga agaactc

ES 2 338 368 T3

<210> 11

<211> 574

<212> PRT

5 <213> Secuencia sintética

<400> 11

10 Met Ala Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu
 1 5 10 15

15 Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly
 20 25 30

20 Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile
 35 40 45

25 Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr
 50 55 60

30 Leu Cys Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys
 65 70 75 80

35 Arg His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu
 85 90 95

40

45

50

55

60

65

ES 2 338 368 T3

	Arg	Thr	Ile	Phe	Phe	Lys	Asp	Asp	Gly	Asn	Tyr	Lys	Thr	Arg	Ala	Glu
				100					105					110		
5	Val	Lys	Phe	Glu	Gly	Asp	Thr	Leu	Val	Asn	Arg	Ile	Glu	Leu	Lys	Gly
			115					120					125			
10	Ile	Asp	Phe	Lys	Glu	Asp	Gly	Asn	Ile	Leu	Gly	His	Lys	Leu	Glu	Tyr
	130						135					140				
15	Asn	Tyr	Asn	Ser	His	Asn	Val	Tyr	Ile	Met	Ala	Asp	Lys	Gln	Lys	Asn
	145					150					155					160
20	Gly	Ile	Lys	Val	Asn	Phe	Lys	Thr	Arg	His	Asn	Ile	Glu	Asp	Gly	Ser
					165					170					175	
25	Val	Gln	Leu	Ala	Asp	His	Tyr	Gln	Gln	Asn	Thr	Pro	Ile	Gly	Asp	Gly
				180					185					190		
30	Pro	Val	Leu	Leu	Pro	Asp	Asn	His	Tyr	Leu	Ser	Thr	Gln	Ser	Ala	Leu
			195					200					205			
35	Ser	Lys	Asp	Pro	Asn	Glu	Lys	Arg	Asp	His	Met	Val	Leu	Leu	Glu	Phe
		210					215					220				
40	Val	Thr	Ala	Ala	Gly	Ile	Thr	His	Gly	Met	Asp	Glu	Leu	Tyr	Asn	Gly
	225					230					235					240
45	Gly	Ala	Gly	Ser	Gly	Ala	Gly	Gly	Gly	Gly	Ile	Arg	Arg	Val	Thr	Asn
					245					250					255	
50	Asp	Ala	Arg	Glu	Asn	Glu	Met	Asp	Glu	Asn	Leu	Glu	Gln	Val	Ser	Gly
			260						265					270		
55	Ile	Ile	Gly	Asn	Leu	Arg	His	Met	Ala	Leu	Asp	Met	Gly	Asn	Glu	Ile
			275					280					285			
60	Asp	Thr	Gln	Asn	Arg	Gln	Ile	Asp	Arg	Ile	Met	Glu	Lys	Ala	Asp	Ser
		290					295					300				
65	Asn	Lys	Thr	Arg	Ile	Asp	Glu	Ala	Asn	Gln	Arg	Ala	Thr	Lys	Met	Leu
	305					310					315					320
70	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Thr	Ala	Ser	Lys	Gly	Glu	Glu	Leu	Phe
					325					330					335	
75	Thr	Gly	Val	Val	Pro	Ile	Leu	Val	Glu	Leu	Asp	Gly	Asp	Val	Asn	Gly
				340					345					350		

ES 2 338 368 T3

	His	Lys	Phe	Ser	Val	Ser	Gly	Glu	Gly	Glu	Gly	Asp	Ala	Thr	Tyr	Gly
			355					360					365			
5	Lys	Leu	Thr	Leu	Lys	Phe	Ile	Cys	Thr	Thr	Gly	Lys	Leu	Pro	Val	Pro
		370					375					380				
10	Trp	Pro	Thr	Leu	Val	Thr	Thr	Leu	Ser	His	Gly	Val	Gln	Cys	Phe	Ser
	385					390					395					400
15	Arg	Tyr	Pro	Asp	His	Met	Lys	Arg	His	Asp	Phe	Phe	Lys	Ser	Ala	Met
					405					410					415	
20	Pro	Glu	Gly	Tyr	Val	Gln	Glu	Arg	Thr	Ile	Phe	Phe	Lys	Asp	Asp	Gly
				420					425					430		
25	Asn	Tyr	Lys	Thr	Arg	Ala	Glu	Val	Lys	Phe	Glu	Gly	Asp	Thr	Leu	Val
			435					440					445			
30	Asn	Arg	Ile	Glu	Leu	Lys	Gly	Ile	Asp	Phe	Lys	Glu	Asp	Gly	Asn	Ile
		450					455					460				
35	Leu	Gly	His	Lys	Leu	Glu	Tyr	Asn	Tyr	Asn	Ser	His	Asn	Val	Tyr	Ile
	465					470					475				480	
40	Met	Ala	Asp	Lys	Gln	Lys	Asn	Gly	Ile	Lys	Ala	Asn	Phe	Lys	Ile	Arg
					485					490					495	
45	His	Asn	Ile	Glu	Asp	Gly	Ser	Val	Gln	Leu	Ala	Asp	His	Tyr	Gln	Gln
				500					505					510		
50	Asn	Thr	Pro	Ile	Gly	Asp	Gly	Pro	Val	Leu	Leu	Pro	Asp	Asn	His	Tyr
			515					520					525			
55	Leu	Ser	Thr	Gln	Ser	Ala	Leu	Ser	Lys	Asp	Pro	Asn	Glu	Lys	Arg	Asp
		530					535					540				
60	His	Met	Val	Leu	Leu	Glu	Phe	Val	Thr	Ala	Ala	Gly	Ile	Thr	His	Gly
	545					550					555					560
65	Met	Asp	Glu	Leu	Tyr	Lys	Gly	Thr	His							
					565					570						

<210> 12

<211> 1722

<212> ADN

<213> Secuencia sintética

ES 2 338 368 T3

<400> 12

5	atggctagca aaggagaaga actcttcact ggagttgtcc caattcttgt tgaattagat	60
	ggtgatgtta acggccacaa gttctctgtc agtggagagg gtgaaggatga tgcaacatac	120
	ggaaaactta ccctgaagtt catctgcact actggcaaac tgccctgttcc atggccaaca	180
10	ctagtcacta ctctgtgcta tgggtgttcaa tgcttttcaa gatacccgga tcatatgaaa	240
	cggcatgact ttttcaagag tgccatgccc gaaggttatg tacaggaaag gaccatcttc	300
15	ttcaaagatg acggcaacta caagacacgt gctgaagtca agtttgaagg tgataccctt	360
	gttaatagaa tcgagttaaa aggtattgac ttcaaggaag atggcaacat tctgggacac	420
	aaattggaat acaactataa ctcacacaat gtatacatca tggcagacaa acaaaagaat	480
20	ggaatcaaag tgaacttcaa gacccgccac aacattgaag atggaagcgt tcaactagca	540
	gaccattatc aacaaaatac tccaattggc gatggccctg tccttttacc agacaacat	600
25	tacctgtcca cacaatctgc cctttcgaaa gatcccaacg aaaagagaga ccacatggtc	660
	cttcttgagt ttgtaacagc tgctgggatt acacatggca tggatgaact gtacaacggc	720
	ggtgcaggat ccggtgcggg tggcgggtggc atccggaggg taacaaacga tgcccgggaa	780
30	aatgagatgg atgagaacct ggagcaggtg agcggcatca tcggaaacct ccgccatag	840
	gctctagaca tgggcaatga gattgacacc cagaatcgcc agatcgacag gatcatggag	900
35	aaggctgatt ccaacaaaac cagaattgat gaagccaacc aacgtgcaac aaagatgctg	960
	ggaagtgggtg gcggtggcgg taccgcaagc aaaggagaag aactcttcac tggagttgtc	1020
40	ccaattcttg ttgaattaga tgggtgatgtt aacggccaca agttctctgt cagtggagag	1080
	ggtgaaggatg atgcaacata cggaaaactt accctgaagt tcatctgcac tactggcaaa	1140
45	ctgcctgttc catggccaac actagtcact actctctctc atggtgttca atgcttttca	1200
	agatacccggt atcatatgaa acggcatgac tttttcaaga gtgccatgcc cgaaggttat	1260
	gtacaggaaa ggaccatctt cttcaaagat gacggcaact acaagacacg tgctgaagtc	1320
50	aagtttgaag gtgataccct tgttaataga atcgagttaa aaggtattga ttttaaagaa	1380
	gatggaaaca ttcttggaca caaattggaa tacaactata actcacacaa tgtatacatc	1440
55	atggcagaca aacaaaagaa tggaatcaaa gcgaacttca agatccgcca caacattgaa	1500
	gatggaagcg ttcaactagc agaccattat caacaaaata ctccaattgg cgatggccct	1560
60	gtccttttac cagacaacca ttacctgtcc acacaatctg ccctttcgaa agatcccaac	1620
	gaaaagagag accacatggt ccttcttgag tttgtaacag ctgctgggat tacacatggc	1680
65	atggatgaac tatacaaagg taccatcac catcaccatc ac	1722

<210> 13

<211> 814

ES 2 338 368 T3

<212> PRT

<213> Secuencia sintética

5 <400> 13

1	Met	Ala	Ser	Lys	Gly	Glu	Glu	Leu	Phe	Thr	Gly	Val	Val	Pro	Ile	Leu
				5						10					15	
10	Val	Glu	Leu	Asp	Gly	Asp	Val	Asn	Gly	His	Lys	Phe	Ser	Val	Ser	Gly
			20						25					30		
15	Glu	Gly	Glu	Gly	Asp	Ala	Thr	Tyr	Gly	Lys	Leu	Thr	Leu	Lys	Phe	Ile
			35					40					45			
20	Cys	Thr	Thr	Gly	Lys	Leu	Pro	Val	Pro	Trp	Pro	Thr	Leu	Val	Thr	Thr
		50					55					60				
25	Leu	Cys	Tyr	Gly	Val	Gln	Cys	Phe	Ser	Arg	Tyr	Pro	Asp	His	Met	Lys
	65					70					75					80
30	Arg	His	Asp	Phe	Phe	Lys	Ser	Ala	Met	Pro	Glu	Gly	Tyr	Val	Gln	Glu
				85						90					95	
35	Arg	Thr	Ile	Phe	Phe	Lys	Asp	Asp	Gly	Asn	Tyr	Lys	Thr	Arg	Ala	Glu
				100					105					110		
40	Val	Lys	Phe	Glu	Gly	Asp	Thr	Leu	Val	Asn	Arg	Ile	Glu	Leu	Lys	Gly
			115					120					125			
45	Ile	Asp	Phe	Lys	Glu	Asp	Gly	Asn	Ile	Leu	Gly	His	Lys	Leu	Glu	Tyr
		130					135					140				
50	Asn	Tyr	Asn	Ser	His	Asn	Val	Tyr	Ile	Met	Ala	Asp	Lys	Gln	Lys	Asn
	145					150					155					160
55	Gly	Ile	Lys	Val	Asn	Phe	Lys	Thr	Arg	His	Asn	Ile	Glu	Asp	Gly	Ser
					165					170					175	
60	Val	Gln	Leu	Ala	Asp	His	Tyr	Gln	Gln	Asn	Thr	Pro	Ile	Gly	Asp	Gly
				180					185					190		
65	Pro	Val	Leu	Leu	Pro	Asp	Asn	His	Tyr	Leu	Ser	Thr	Gln	Ser	Ala	Leu
			195					200					205			
70	Ser	Lys	Asp	Pro	Asn	Glu	Lys	Arg	Asp	His	Met	Val	Leu	Leu	Glu	Phe
		210					215					220				

ES 2 338 368 T3

	Val	Thr	Ala	Ala	Gly	Ile	Thr	His	Gly	Met	Asp	Glu	Leu	Tyr	Asn	Gly
	225					230					235					240
5	Gly	Ala	Gly	Ser	Gly	Ala	Gly	Gly	Gly	Gly	Ile	Arg	Arg	Val	Thr	Asn
					245					250					255	
10	Asp	Ala	Arg	Glu	Asn	Glu	Met	Asp	Glu	Asn	Leu	Glu	Gln	Val	Ser	Gly
				260					265					270		
15	Ile	Ile	Gly	Asn	Leu	Arg	His	Met	Ala	Leu	Asp	Met	Gly	Asn	Glu	Ile
			275					280					285			
20	Asp	Thr	Gln	Asn	Arg	Gln	Ile	Asp	Arg	Ile	Met	Glu	Lys	Ala	Asp	Ser
	290						295					300				
25	Asn	Lys	Thr	Arg	Ile	Asp	Glu	Ala	Asn	Gln	Arg	Ala	Thr	Lys	Met	Leu
	305					310					315					320
30	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Thr	Ala	Ser	Lys	Gly	Glu	Glu	Leu	Phe
					325					330					335	
35	Thr	Gly	Val	Val	Pro	Ile	Leu	Val	Glu	Leu	Asp	Gly	Asp	Val	Asn	Gly
				340					345					350		
40	His	Lys	Phe	Ser	Val	Ser	Gly	Glu	Gly	Glu	Gly	Asp	Ala	Thr	Tyr	Gly
			355					360					365			
45	Lys	Leu	Thr	Leu	Lys	Phe	Ile	Cys	Thr	Thr	Gly	Lys	Leu	Pro	Val	Pro
	370						375					380				
50	Trp	Pro	Thr	Leu	Val	Thr	Thr	Leu	Ser	His	Gly	Val	Gln	Cys	Phe	Ser
	385					390					395					400
55	Arg	Tyr	Pro	Asp	His	Met	Lys	Arg	His	Asp	Phe	Phe	Lys	Ser	Ala	Met
					405					410					415	
60	Pro	Glu	Gly	Tyr	Val	Gln	Glu	Arg	Thr	Ile	Phe	Phe	Lys	Asp	Asp	Gly
				420					425					430		
65	Asn	Tyr	Lys	Thr	Arg	Ala	Glu	Val	Lys	Phe	Glu	Gly	Asp	Thr	Leu	Val
			435					440					445			
70	Asn	Arg	Ile	Glu	Leu	Lys	Gly	Ile	Asp	Phe	Lys	Glu	Asp	Gly	Asn	Ile
	450						455					460				
75	Leu	Gly	His	Lys	Leu	Glu	Tyr	Asn	Tyr	Asn	Ser	His	Asn	Val	Tyr	Ile
	465					470					475				480	

ES 2 338 368 T3

	Met	Ala	Asp	Lys	Gln	Lys	Asn	Gly	Ile	Lys	Ala	Asn	Phe	Lys	Ile	Arg	
				485						490					495		
5	His	Asn	Ile	Glu	Asp	Gly	Ser	Val	Gln	Leu	Ala	Asp	His	Tyr	Gln	Gln	
			500						505					510			
10	Asn	Thr	Pro	Ile	Gly	Asp	Gly	Pro	Val	Leu	Leu	Pro	Asp	Asn	His	Tyr	
			515					520					525				
15	Leu	Ser	Thr	Gln	Ser	Ala	Leu	Ser	Lys	Asp	Pro	Asn	Glu	Lys	Arg	Asp	
		530					535					540					
20	His	Met	Val	Leu	Leu	Glu	Phe	Val	Thr	Ala	Ala	Gly	Ile	Thr	His	Gly	
	545					550					555					560	
25	Met	Asp	Glu	Leu	Tyr	Lys	Gly	Thr	Ala	Ser	Lys	Gly	Glu	Glu	Leu	Phe	
				565						570					575		
30	Thr	Gly	Val	Val	Pro	Ile	Leu	Val	Glu	Leu	Asp	Gly	Asp	Val	Asn	Gly	
			580						585					590			
35	His	Lys	Phe	Ser	Val	Ser	Gly	Glu	Gly	Glu	Gly	Asp	Ala	Thr	Tyr	Gly	
			595					600					605				
40	Lys	Leu	Thr	Leu	Lys	Phe	Ile	Cys	Thr	Thr	Gly	Lys	Leu	Pro	Val	Pro	
		610					615					620					
45	Trp	Pro	Thr	Leu	Val	Thr	Thr	Leu	Ser	His	Gly	Val	Gln	Cys	Phe	Ser	
	625					630					635					640	
50	Arg	Tyr	Pro	Asp	His	Met	Lys	Arg	His	Asp	Phe	Phe	Lys	Ser	Ala	Met	
					645					650					655		
55	Pro	Glu	Gly	Tyr	Val	Gln	Glu	Arg	Thr	Ile	Phe	Phe	Lys	Asp	Asp	Gly	
				660					665					670			
60	Asn	Tyr	Lys	Thr	Arg	Ala	Glu	Val	Lys	Phe	Glu	Gly	Asp	Thr	Leu	Val	
		675						680					685				
65	Asn	Arg	Ile	Glu	Leu	Lys	Gly	Ile	Asp	Phe	Lys	Glu	Asp	Gly	Asn	Ile	
		690					695					700					
70	Leu	Gly	His	Lys	Leu	Glu	Tyr	Asn	Tyr	Asn	Ser	His	Asn	Val	Tyr	Ile	
	705					710					715					720	

ES 2 338 368 T3

	Met	Ala	Asp	Lys	Gln	Lys	Asn	Gly	Ile	Lys	Ala	Asn	Phe	Lys	Ile	Arg
					725					730					735	
5	His	Asn	Ile	Glu	Asp	Gly	Ser	Val	Gln	Leu	Ala	Asp	His	Tyr	Gln	Gln
				740					745					750		
10	Asn	Thr	Pro	Ile	Gly	Asp	Gly	Pro	Val	Leu	Leu	Pro	Asp	Asn	His	Tyr
			755					760					765			
15	Leu	Ser	Thr	Gln	Ser	Ala	Leu	Ser	Lys	Asp	Pro	Asn	Glu	Lys	Arg	Asp
		770					775					780				
20	His	Met	Val	Leu	Leu	Glu	Phe	Val	Thr	Ala	Ala	Gly	Ile	Thr	His	Gly
	785					790					795					800
25	Met	Asp	Glu	Leu	Tyr	Lys	Gly	Thr	His							
					805				810							

25 <210> 14
 <211> 2442
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia sintética
 <400> 14

35	atggctagca	aaggagaaga	actcttcact	ggagttgtcc	caattcttgt	tgaattagat	60
	ggtgatgta	acggccacaa	gttctctgtc	agtggagagg	gtgaaggtga	tgcaacatac	120
40	ggaaaactta	ccctqaagtt	catctgcact	actggcaaac	tgctgtttcc	atggccaaca	180
	ctagtcacta	ctctgtgcta	tggtgttcaa	tgcttttcaa	gatacccgga	tcatatgaaa	240
	cggcatgact	ttttcaagag	tgccatgccc	gaaggttatg	tacaggaaag	gaccatcttc	300
45	ttcaaagatg	acggcaacta	caagacacgt	gctgaagtca	agtttgaagg	tgataccett	360
	gttaatagaa	tcgagttaaa	aggtattgac	ttcaaggaag	atggcaacat	tctgggacac	420
50	aaattggaat	acaactataa	ctcacacaat	gtatacatca	tggcagacaa	acaaaagaat	480
	ggaatcaaag	tgaacttcaa	gacccgccac	aacattgaag	atggaagcgt	tcaactagca	540
	gaccattatc	aacaaaatac	tccaattggc	gatggccctg	tccttttacc	agacaacat	600
55	tacctgtcca	cacaatctgc	cctttcgaaa	gatcccaacg	aaaagagaga	ccacatggtc	660
	cttcttgagt	ttgtaacagc	tgctgggatt	acacatggca	tggatgaact	gtacaacggc	720
60	ggtgcaggat	ccggtgcggg	tggcgggtggc	atccggaggg	taacaaacga	tgcccgggaa	780
	aatgagatgg	atgagaacct	ggagcaggtg	agcggcatca	tcggaaacct	ccgcatatg	840
	gctctagaca	tgggcaatga	gattgacacc	cagaatcgcc	agatcgacag	gatcatggag	900
65	aaggctgatt	ccaacaaaac	cagaattgat	gaagccaacc	aacgtgcaac	aaagatgctg	960

ES 2 338 368 T3

	ggaagtgggtg gcggtggcgg taccgcaagc aaaggagaag aactcttcac tggagttgtc	1020
	ccaattcttg ttgaattaga tggatgatgtt aacggccaca agttctctgt cagtggagag	1080
5	ggtgaaggtg atgcaacata cggaaaactt accctgaagt tcatctgcac tactggcaaa	1140
	ctgcctgttc catggccaac actagtcact actctctctc atgggtgttca atgcttttca	1200
10	agatacccgg atcatatgaa acggcatgac tttttcaaga gtgccatgcc cgaaggttat	1260
	gtacaggaaa ggaccatctt cttcaaagat gacggcaact acaagacacg tgctgaagtc	1320
15	aagtttgaag gtgataccct tgttaataga atcgagttaa aaggatttga ttttaaagaa	1380
	gatggaaaca ttcttggaca caaattggaa tacaactata actcacacaa tgtatacatc	1440
20	atggcagaca aacaaaagaa tggaatcaaa gcgaacttca agatccgcca caacattgaa	1500
	gatggaagcg ttcaactagc agaccattat caacaaaata ctccaattgg cgatggcctt	1560
25	gtccttttac cagacaacca ttacctgtcc acacaatctg ccctttcgaa agatcccaac	1620
	gaaaagagag accacatggt ccttcttgag tttgtaacag ctgctgggat tacacatggc	1680
30	atggatgaac tatacaaagg taccgcaagc aaaggagaag aactcttcac tggagttgtc	1740
	ccaattcttg ttgaattaga tggatgatgtt aacggccaca agttctctgt cagtggagag	1800
35	ggtgaaggtg atgcaacata cggaaaactt accctgaagt tcatctgcac tactggcaaa	1860
	ctgcctgttc catggccaac actagtcact actctctctc atgggtgttca atgcttttca	1920
40	agatacccgg atcatatgaa acggcatgac tttttcaaga gtgccatgcc cgaaggttat	1980
	gtacaggaaa ggaccatctt cttcaaagat gacggcaact acaagacacg tgctgaagtc	2040
45	aagtttgaag gtgataccct tgttaataga atcgagttaa aaggatttga ttttaaagaa	2100
	gatggaaaca ttcttggaca caaattggaa tacaactata actcacacaa tgtatacatc	2160
50	atggcagaca aacaaaagaa tggaatcaaa gcgaacttca agatccgcca caacattgaa	2220
	gatggaagcg ttcaactagc agaccattat caacaaaata ctccaattgg cgatggcctt	2280
55	gtccttttac cagacaacca ttacctgtcc acacaatctg ccctttcgaa agatcccaac	2340
	gaaaagagag accacatggt ccttcttgag tttgtaacag ctgctgggat tacacatggc	2400
	atggatgaac tatacaaagg taccatcac catcaccatc ac	2442

<210> 15

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia sintética

<400> 15

Asp Ser Glu Ser Glu Glu Glu Asp

1

5

<210> 16

ES 2 338 368 T3

<211> 400

<212> PRT

<213> Secuencia sintética

5

<400> 16

10	Ser	His	Ile	Gln	Ile	Pro	Pro	Gly	Leu	Thr	Glu	Leu	Leu	Gln	Gly	Tyr
	1				5					10					15	
15	Thr	Val	Glu	Val	Leu	Arg	Gln	Arg	Pro	Pro	Asp	Leu	Val	Asp	Phe	Ala
				20					25					30		
20	Val	Asp	Tyr	Phe	Thr	Arg	Leu	Arg	Glu	Ala	Arg	Ser	Arg	Ala	Ser	Thr
			35					40					45			
25	Pro	Pro	Ala	Ala	Pro	Pro	Ser	Gly	Ser	Gln	Asp	Phe	Asp	Pro	Gly	Ala
		50					55					60				
30	Gly	Leu	Val	Ala	Asp	Ala	Val	Ala	Asp	Ser	Glu	Ser	Glu	Asp	Glu	Glu
	65					70					75					80
35	Asp	Leu	Asp	Val	Pro	Ile	Pro	Gly	Arg	Phe	Asp	Arg	Arg	Val	Ser	Val
					85					90					95	
40	Cys	Ala	Glu	Thr	Tyr	Asn	Pro	Asp	Glu	Glu	Glu	Glu	Asp	Thr	Asp	Pro
				100					105					110		
45	Arg	Val	Ile	His	Pro	Lys	Thr	Asp	Gln	Gln	Arg	Cys	Arg	Leu	Gln	Glu
			115					120					125			
50	Ala	Cys	Lys	Asp	Ile	Leu	Leu	Phe	Lys	Asn	Leu	Asp	Pro	Glu	Gln	Leu
		130					135					140				
55	Ser	Gln	Val	Leu	Asp	Ala	Met	Phe	Glu	Arg	Thr	Val	Lys	Val	Asp	Glu
	145					150					155					160
60	His	Val	Ile	Asp	Gln	Gly	Asp	Asp	Gly	Asp	Asn	Phe	Tyr	Val	Ile	Glu
					165					170					175	
65	Arg	Gly	Thr	Tyr	Asp	Ile	Leu	Val	Thr	Lys	Asp	Asn	Gln	Thr	Arg	Ser
				180					185					190		
70	Val	Gly	Gln	Tyr	Asp	Asn	His	Gly	Ser	Phe	Gly	Glu	Leu	Ala	Leu	Met
			195					200					205			
75	Tyr	Asn	Thr	Pro	Arg	Ala	Ala	Thr	Ile	Val	Ala	Thr	Ser	Glu	Gly	Ser
	210						215					220				

ES 2 338 368 T3

Leu Trp Gly Leu Asp Arg Val Thr Phe Arg Arg Ile Ile Val Lys Asn
 225 230 235 240

5

Asn Ala Lys Lys Arg Lys Met Phe Glu Ser Phe Ile Glu Ser Val Pro
 245 250 255

10

Leu Leu Lys Ser Leu Glu Val Ser Glu Arg Met Lys Ile Val Asp Val
 260 265 270

15

Ile Gly Glu Lys Val Tyr Lys Asp Gly Glu Arg Ile Ile Thr Gln Gly
 275 280 285

20

Glu Lys Ala Asp Ser Phe Tyr Ile Ile Glu Ser Gly Glu Val Ser Ile
 290 295 300

25

Leu Ile Lys Ser Lys Thr Lys Val Asn Lys Asp Gly Glu Asn Gln Glu
 305 310 315 320

30

Val Glu Ile Ala Arg Cys His Lys Gly Gln Tyr Phe Gly Glu Leu Ala
 325 330 335

35

Leu Val Thr Asn Lys Pro Arg Ala Ala Ser Ala Tyr Ala Val Gly Asp
 340 345 350

40

Val Lys Cys Leu Val Met Asp Val Gln Ala Phe Glu Arg Leu Leu Gly
 355 360 365

45

Pro Cys Met Asp Ile Met Lys Arg Asn Ile Ser His Tyr Glu Glu Gln
 370 375 380

Leu Val Lys Met Phe Gly Ser Ser Met Asp Leu Ile Asp Pro Gly Gln
 385 390 395 400

<210> 17

50 <211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia sintética

55 <400> 17

ttctccttg ctagccat

60

65