

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 370 812**

51 Int. Cl.:
C12N 15/53 (2006.01)
C12N 9/04 (2006.01)
C12Q 1/32 (2006.01)
C12Q 1/54 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01988775 .1**
96 Fecha de presentación: **20.10.2001**
97 Número de publicación de la solicitud: **1332216**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.08.2003**

54 Título: **VARIANTES DE GLUCOSA DEHIDROGENASA SOLUBLE, DEPENDIENTE DE
PIRROLOQUINOLINA QUINONA.**

30 Prioridad:
27.10.2000 EP 00123512
19.12.2000 EP 00127294

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
23.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
23.12.2011

73 Titular/es:
F. Hoffmann-La Roche AG
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

72 Inventor/es:
KRATZSCH, Peter;
SCHMUCK, Rainer;
BUNK, Daniela;
SHAO, Zhixin;
THYM, Detlef y
KNAPPE, Wolfgang-Reinhold

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 370 812 T3

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

DESCRIPCIÓN

Variantes de glucosa dehidrogenasa soluble, dependiente de pirroloquinolina quinona

5 La presente invención se refiere a variantes mejoradas de glucosa dehidrogenasa soluble (s-GDH), dependientes de pirroloquinolina quinona (PQQ), a genes que codifican s-GDH mutadas, a proteínas mutantes de s-GDH con especificidad mejorada de sustrato para la glucosa y a diferentes aplicaciones de estas variantes de s-GDH particularmente para determinar concentraciones de azúcar, especialmente de glucosa, en una muestra.

10 Se han caracterizado dos tipos de glucosa dehidrogenasa (EC 1.1.99.17) dependientes de PQQ: Una es (m-GDH) unida a membrana y la otra es soluble (s-GDH). Ninguno de estos tipos comparte ninguna homología de secuencia significativa (Cleton-Jansen, A. M., y otros, Mol Gen Genet 217 (1989) 430-6; Cleton-Jansen, A. M., y otros, Antonie Van Leeuwenhoek 56 (1989) 73-9; Oubrie, A., y otros, Proc Natl Acad Sci U S A 96 (1999) 11787-91). También son distintas respecto a su cinética y también a sus propiedades inmunológicas (Matsushita, K., y otros, Bioscience Biotechnology & Biochemistry 59 (1995) 1548-1555).

Las quinoproteínas utilizan quinona como co-factor para oxidar alcoholes, aminas y aldosas a sus correspondientes lactonas, aldehídos y ácidos aldóicos (Duine, J. A. Energy generation and the glucose dehydrogenase pathway in Acinetobacter in "The Biology of Acinetobacter" (1991) 295-312, New York, Plenum Press; Duine, J. A., Eur J Biochem 200 (1991) 271-84, Davidson, V. L. - in "Principles and applications of quinoproteins" (1993), todo el libro, New York, Marcel Dekker; Anthony, C., Biochem J 320 (1996) 697-711 ;Anthony, C. and Ghosh, M., Current Science 72 (1997) 716-727; Anthony, C., Biochem Soc Trans 26 (1998) 413-7; Anthony, C. and Ghosh, M., Prog Biophys Mol Biol 69 (1998) 1-21). Entre las quinoproteínas, las que contienen el co-factor unido de forma no covalente 2,7,9-tricarboxi-1H-pirrolo [2,3-f]quinolina-4,5-diona (PQQ) constituyen el subgrupo más importante (Duine 1991, supra).

25 Todas las dehidrogenasas de glucosa bacterianas conocidas hasta el momento pertenecen a este subgrupo siendo PQQ el grupo protésico (Anthony y Ghosh 1997, supra, Goodwin y Anthony 1998, supra).

En las bacterias hay dos tipos completamente distintos de glucosa dehidrogenasas dependientes de PQQ (EC1.1.99.17): el tipo soluble (s-GDH) y el tipo unido a membrana (m-GDH) (Duine y otros, 1982; Matsushita y otros, 1989a,b). Los m-GDH están extendidos entre las bacterias gram-negativas, las s-GDH, no obstante, se han encontrado solamente en el espacio periplasmático de cepas de *Acinetobacter*, tales como *A. calcoaceticus* (Duine, 1991a; Cleton-Jansen y otros, 1988; Matsushita y Adachi, 1993) y *A. Baumannii* (JP 11243949).

Por investigación de bases de datos de secuencias se han identificado dos secuencias homólogas a la *A. calcoaceticus* s-GDH de longitud completa en *E.coli* K-12 y *Synechocystis* sp. Además, se han encontrado también dos secuencias incompletas homólogas de *A. calcoaceticus* s-GDH en el genoma de *Paeruginosa* y *Bordetella pertussis* (Oubrie y otros 1999a), respectivamente. Las secuencias de aminoácidos deducidas de estas cuatro proteínas no caracterizadas están íntimamente relacionadas con *A. calcoaceticus* s-GDH con muchos residuos en el lugar putativamente activo conservados de manera absoluta. Estas proteínas homólogas es probable que tengan una estructura similar y que catalicen reacciones similares dependientes de PQQ (Oubrie y otros, 1999a).

Las s-GDH y m-GDH bacterianas, se ha observado que poseen secuencias muy diferentes y diferente especificidad de sustrato. Por ejemplo, la *A. calcoaceticus* contiene dos dehidrogenasas de glucosa dependientes de PQQ distintas, una m-GDH que es activa *in vivo* y la otra, indicada s-GDH para la que se puede demostrar solamente actividad *in vitro*. Cleton-Jansen y otros, (1988;1989a,b) clonaron los genes que codifican para dos enzimas GDH y determinaron las secuencias de ADN de estos dos genes de GDH. No hay homología evidente entre m-GDH y s-GDH corroborando el hecho de que m-GDH y s-GDH representan dos moléculas completamente diferentes.

El gen de s-GDH procedente de *A. calcoaceticus* ha sido clonado en *E. coli* detrás de una secuencia líder y un promotor fuerte. Después de ser sintetizado en la célula, el s-GDH es trasladado a través de la membrana citoplasmática hacia dentro del espacio periplásmico (Duine, J. A. Energy generation and the glucose dehydrogenase pathway in Acinetobacter in "The Biology of Acinetobacter" (1991) 295-312, New York, Plenum Press, Matsushita, K. y Adachi, O. Bacteria quinoproteins glucose dehydrogenase and alcohol dehydrogenase in "Principles and applications of Quinoproteins" (1993) 47-63, New York, Marcel Dekker). Igual que los s-GDH nativos procedentes de *A. calcoaceticus*, s-GDH expresado en *E. coli* es también un homodímero con una molécula de PQQ y tres iones calcio por monómero (Dokter y otros, 1986 supra,1987 supra1988 supra; Olsthoorn, A. y J. Duine, J. A., Arch Biochem Biophys 336 (1996) 42-8; Oubrie, A., y otros, J Mol Biol 289 (1999) 319-33, Oubrie, A., y otros, Proc Natl Acad Sci U S A 96 (1999) 11787-91, Oubrie, A., y otros, Embo J 18 (1999) 5187-94). La s-GDH oxida una amplia gama de mono y disacáridos a las correspondientes cetonas que hidrolizan adicionalmente a los ácidos aldóicos y también es capaz de donar electrones a PMS (metosulfato de fenazina), DCPIP (2,6-diclorofenolindofenol), WB (Wurster's blue) (Azul de Wurster) y ubiquinonas de cadena corta, tales como ubiquinona Q1 y ubiquinona Q2 (Matsushita, K., y otros, Biochemistry 28 (1989) 6276-80; Matsushita, K., y otros, Antonie Van Leeuwenhoek 56 (1989) 63-72), varios aceptadores de electrones artificiales tales como metil sulfato de N-metilfenazonio (Olsthoorn, A. J. y Duine, J. A., Arch Biochem Biophys 336 (1996) 42-8 ; Olsthoorn, A. J. y Duine, J. A., Biochemistry 37 (1998) 13854-61) y polímeros electroconductores (Ye, L., y otros, Anal. Chem. 65 (1993) 238-41).

En vistas de la alta actividad específica de las s-GDH hacia la glucosa (Olsthoorn, A. J. y Duine, J. A., Arch Biochem Biophys 336 (1996) 42-8) y su amplia especificidad de aceptador de electrones artificial, la enzima es muy adecuada para aplicaciones analíticas, particularmente para su utilización en biosensores o tiras de pruebas para determinada acción de glucosa en aplicaciones de diagnóstico (Kaufmann y otros, 1997 supra).

5 La oxidación de la glucosa puede ser catalizada, como mínimo, por tres grupos de enzimas completamente distintas, es decir, por dehidrogenasas de glucosa enlazadas por covalente, dependientes de NAD, por flavoproteína glucosa oxidasa o por las GDH de quinoproteína (Duine 1995). Se ha observado una autooxidación más bien lenta de s-GDH reducidas, demostrando que el oxígeno es un mal aceptador de electrones para s-GDH (Olsthoorn y Duine 1996). La s-GDH puede ceder electrones eficazmente a PMS, DCPIP, WB y a ubiquinonas de cadena corta, tales como Q1 y Q2, pero no puede ceder eficazmente electrones directamente al oxígeno.

15 Las tiras tradicionales de pruebas y sensores para controlar el nivel de glucosa en sangre, suero y orina, por ejemplo, de pacientes diabéticos, utilizan glucosa oxidasa. No obstante, dado que la glucosa oxidasa transfiere sus electrones al oxígeno, es conocido que el oxígeno puede tener un impacto negativo en las mediciones de glucosa que se basan en esta enzima. La ventaja más importante de las dehidrogenasas de glucosa dependientes de PQQ es su independencia del oxígeno. Esta importante característica se explica, por ejemplo, en el documento US 6.103.509 en el que se han investigado algunas características de GDH unida a membrana.

20 Una importante aportación en este sector ha sido la utilización de s-GDH junto con sus sustratos apropiados. Se dan a conocer en detalle métodos de ensayo y dispositivo de banda de pruebas basados en s-GDH en el documento US 5.484.708. Esta patente contiene también información detallada en la organización de ensayos y producción de tiras de pruebas basadas en s-GDH para la medición de glucosa. Los métodos descritos en aquél documento, así como los documentos citados, se incluyen en el actual a título de referencia. Otras patentes o solicitudes relativas al sector y que comprenden información específica de varias modalidades de aplicaciones para enzimas con actividad dehidrogenasa de glucosa son los documentos US 5.997.817; US 6.057.120; EP 620 283; y JP 11-243949-A.

25 Un sistema comercial que utiliza s-GDH y un indicador que produce un cambio de color cuando tiene lugar la reacción (Kaufmann y otros, 1997) es el sistema Glucotrend® distribuido por Roche Diagnostics GmbH.

30 A pesar de las importantes ventajas que se han descrito, existe también un problema importante intrínseco de s-GDH. s-GDH tiene más bien un espectro de sustrato amplio en comparación con m-GDH. Es decir, s-GDH oxida, no solamente glucosa, sino también otros varios azúcares, incluyendo maltosa, galactosa, lactosa, manosa, xilosa y ribosa (Dokter y otros, 1986a). La reactividad hacia azúcares distintos de la glucosa puede dificultar en algunos casos la exactitud de la determinación de los niveles de glucosa en sangre en algunos pacientes diabéticos. En pacientes específicos, sometidos a diálisis peritoneal tratados con icodextrina (un polímero de glucosa) pueden contener en sus fluidos corporales, por ejemplo en la sangre, elevados niveles de otros azúcares, especialmente maltosa (Wens, R., y otros, Perit Dial Int 18 (1998) 603-9).

40 Por lo tanto, muestras clínicas, por ejemplo las obtenidas de pacientes diabéticos, especialmente pacientes con complicaciones renales y especialmente de pacientes sometidos a diálisis, pueden contener niveles significativos de otros azúcares, especialmente maltosa. Las determinaciones de la glucosa en muestras obtenidas a partir de dichos pacientes críticos se pueden ver dificultadas por la maltosa.

45 Hay pocos informes en la literatura científica sobre intentos de producir s-GDH dependientes de PQQ modificada que muestren especificidad de sustrato alterada. Debido a un resultado negativo, la mayor parte de estos esfuerzos no han sido publicados. Igarashi, S., y otros, (1999) indica que la introducción de una mutación de punto en la posición Glu277 conduce a mutantes con perfil de especificidad de sustrato alterado. No obstante, ninguno de estos mutantes conduce a una especificidad mejorada, por lo menos dos veces, para la glucosa, por ejemplo en comparación con xilosa, galactosa o maltosa.

50 El documento EP 1 176 202 es técnica anterior de acuerdo con Art 54(3) EPC. Da a conocer los mutantes Asn452Thr, Asn457Ile, Asp 457Asn que tienen especificidad mejorada para la glucosa en comparación con lactosa o maltosa.

55 Se puede resumir en que los intentos conocidos en la técnica destinados a mejorar las características de s-GDH, especialmente su especificidad hacia la glucosa, no han tenido éxito para ampliar de manera requerida para un control preciso de los niveles de glucosa en pacientes que tienen también elevados niveles de azúcares distintos a la glucosa.

60 Por lo tanto, existe una elevada demanda y necesidad clínica de formas mutantes de s-GDH caracterizadas por una especificidad mejorada para la glucosa como sustrato.

65 Ha sido el objetivo de la presente invención dar a conocer nuevos mutantes o variantes de s-GDH con especificidad de sustrato significativamente mejorada para la glucosa, en comparación con otras moléculas de azúcares seleccionados, tales como, por ejemplo, galactosa o maltosa.

De manera sorprendente se ha descubierto que es posible mejorar significativamente la especificidad de sustrato de s-GDH para la glucosa en comparación con otros azúcares y superar, por lo menos parcialmente, los problemas anteriormente conocidos en esta técnica.

5 La especificidad de sustrato para la glucosa en comparación con otras moléculas de azúcar seleccionadas ha sido mejorada significativamente al prever s-GDH mutante, de acuerdo con la presente invención, tal como se describe a continuación y en las reivindicaciones adjuntas. Debido a la especificidad mejorada de sustrato de las nuevas formas de s-GDH es posible un avance técnico significativo para las determinaciones de glucosa en diferentes campos de aplicación.

10 Resumen de la invención

Se ha descubierto de manera sorprendente que es posible conseguir mutantes de s-GDH con especificidad de sustrato mejorada hacia la glucosa como sustrato en comparación con otros azúcares seleccionados. Se dan a conocer nuevas variantes de s-GDH que muestran una especificidad de sustrato significativamente más elevada para la glucosa, en especial en comparación con la maltosa.

También se dan a conocer moléculas mutantes de s-GDH que en comparación con la enzima de tipo natural muestran actividad específica esencialmente igual para la glucosa como sustrato pero actividad marcadamente reducida para otras moléculas de azúcar seleccionadas.

Esta comparación de actividad específica de un mutante para una de las otras moléculas de sustrato se basa en relación con las actividades enzimáticas originales de una encima de tipo natural y se calcula con respecto a la misma, por ejemplo, aislada de *Acinetobacter calcoaceticus*.

También se prevén proteínas s-GDH mutadas así como secuencias de polinucleótidos que codifican para dichas proteínas, que muestran características mejoradas, especialmente especificidad incrementada para la glucosa.

Se ha descubierto que los mutantes de s-GDH que comprenden, como mínimo, una sustitución de aminoácido en una posición de aminoácido que corresponde a una posición de la secuencia de tipo natural de s-GDH conocidos por *A. calcoaceticus* (SEQ ID NO: 24) seleccionados entre el grupo que consiste en las posiciones 348 y 428 proporcionan enzimas s-GDH con características mejoradas, especialmente especificidad mejorada para la glucosa. Las variantes que comprenden una sustitución en la posición 348 muestran un notable efecto positivo sobre la especificidad de la glucosa.

Los mutantes de s-GDH mejorados pueden ser utilizados de manera muy ventajosa para la detección específica o medición de glucosa en muestras biológicas, especialmente en dispositivos formados por tiras de prueba o biosensores.

Los siguientes ejemplos, referencias, listado de secuencias y figuras se facilitan para ayudar a la comprensión de la presente invención, cuyo ámbito real es indicado en las reivindicaciones adjuntas. Se comprenderá que se pueden introducir modificaciones en los procedimientos indicados sin alejarse del espíritu de la invención.

Descripción de las figuras

Figura 1: Secuencia de nucleótido (ADN) del gen dehidrogenasa de glucosa soluble dependiente de PQQ de *Acinetobacter calcoaceticus* y la correspondiente secuencia de aminoácido (SEQ ID NO: 23).

Figura 2: Secuencias de proteína de s-GDH (superior) dependiente de PQQ de *A. calcoaceticus* y s-GDH (inferior) de *A. baumannii*, alineadas de acuerdo con homología de secuencia.

Figura 3: Ilustración del vector pACSGDH referido al ejemplo 1, conteniendo el tipo natural de las secuencias de ADN mutado de glucosa dehidrogenasa soluble dependiente de PQQ.

Figura 4: Secuencia de nucleótido (ADN) del vector pACSGDH referido al ejemplo 1 conteniendo la secuencia de ADN de tipo natural de glucosa dehidrogenasa (SEQ ID NO: 25) soluble dependiente de PQQ.

Descripción detallada de la invención

En una primera realización, la invención se refiere a un mutante de la forma soluble de EC 1.1.99.17, también conocida como glucosa dehidrogenasa (s-GDH) soluble dependiente de PQQ, estando caracterizado dicho mutante porque con respecto a la correspondiente enzima de tipo natural y en referencia, como mínimo, a otros sustratos de azúcar seleccionado, tiene, como mínimo, una especificidad de sustrato mejorada de tipo doble para glucosa, en el que dicha mejora de especificidad es calculada de acuerdo con la siguiente fórmula:

65

$$\text{especificidad (mejora)} = \frac{\text{actividad mutante glucosa}}{\text{actividad glucosa tipo natural}} \times \frac{\text{actividad azúcar seleccionado tipo natural}}{\text{actividad mutante azúcar seleccionado}}$$

5 en el que dicho mutante comprende una sustitución de residuo de aminoácido en la posición de aminoácido que corresponde a la posición 348 de la secuencia de tipo natural de s-GDH conocida a partir de *A. calcoaceticus* (SEQ ID NO: 24).

10 Las directrices indicadas en la presente invención son aplicadas fácilmente para cualquier aislado de s-GDH conocido o incluso desconocido. Estos aislados de tipo natural pueden ser utilizados para evaluar las mejoras relativas de la especificidad para las variantes generadas a partir de las mismas.

15 La enzima de tipo natural de la cepa LMD 79.41 de tipo *Acinetobacter calcoaceticus* que corresponde a SEQ ID NO: 24 es bien conocida y está bien caracterizada. En caso de que una enzima distinta de tipo natural sometida a investigación no esté bien caracterizada, es ventajoso utilizar la s-GDH procedente de la cepa LMD 79.41 de tipo *Acinetobacter calcoaceticus* como referencia. En otra realización preferente, se comparan las características de una variante mejorada de s-GDH a esta enzima de tipo natural. La presente invención se refiere, por lo tanto, a un mutante de s-GDH cuyo mutante está caracterizado porque con respecto a la enzima de tipo natural de SEQ ID NO: 24 y con respecto, como mínimo, a otro sustrato de azúcar seleccionado tiene como mínimo especificidad de sustrato incrementada al doble para la glucosa.

20 Tal como se ha explicado anteriormente, se han caracterizado hasta la fecha dos familias de enzimas completamente diferentes con actividad de glucosa dehidrogenasa, agrupadas conjuntamente con la sigla EC1.1.99.17. No obstante, estas dos familias de enzimas no parecen estar relacionadas entre si.

25 A los efectos de la invención, solamente la forma soluble de GDH (s-GDH) es relevante y se explican variantes mejoradas de la misma más adelante.

30 Es conocido en esta técnica que la secuencia de ADN de tipo natural de una glucosa dehidrogenasa soluble dependiente de PQQ puede ser aislada de cepas de *Acinetobacter*. Es más preferente el aislamiento de la cepa LMD 79.41 de tipo *Acinetobacter calcoaceticus*. La secuencia de esta s-GDH de tipo natural (proteína madura) se facilita en la figura: 1 y SEQ ID NO: 24. Otras cepas LMD de *Acinetobacter* pueden ser utilizadas también como fuente de s-GDH de tipo natural. Estas secuencias se pueden alinear a la secuencia obtenida de *A. calcoaceticus* y se pueden hacer comparaciones de secuencias (ver figura: 2). También parece factible rastrear las bibliotecas de ADN de otras cepas bacterianas, tal como se describen, por ejemplo, para *E.coli* K-12 (Oubrie, A., y otros, J Mol Biol 289 (1999) 319-33) en lo anterior e identificar secuencias relacionadas con s-GDH en dichos genomas. Estas secuencias y secuencias homólogas todavía no identificadas pueden ser utilizadas para generar mutantes de s-GDH con mejor especificidad del sustrato para la glucosa.

40 El término "mutante" o "variante" en el sentido de la presente invención, se refiere a una proteína de s-GDH que comparada a una secuencia de tipo natural correspondiente muestra, como mínimo, una sustitución de aminoácido. Los expertos en el sector apreciarán que hay varias posibilidades para producir polinucleótidos que codifican para una secuencia de polipéptido de dicha s-GDH mutada. Desde luego, también es posible generar mutantes que comprenden una o varias adiciones o deleciones de aminoácidos.

45 Un mutante, de acuerdo con la presente invención, se caracteriza porque con respecto a la enzima correspondiente de tipo natural tiene, como mínimo, una especificidad de sustrato mejorada en un valor doble para la glucosa en comparación, como mínimo, con otro sustrato de azúcar seleccionado.

50 A efectos de calcular la especificidad del sustrato o reactividad cruzada, una forma sencilla consiste en disponer la actividad medida con glucosa como sustrato a 100% y comparar la actividad medida con el otro azúcar seleccionado al valor de la glucosa. En algunos casos, a efectos de no ser redundante, se utiliza simplemente el término especificidad sin hacer especial referencia a la glucosa por una parte, y a otro sustrato de azúcar seleccionado por otra.

55 Los expertos en la materia observarán que la comparación de las (re-) actividades se hace mejor a concentraciones equimolares de las moléculas del sustrato investigado utilizando condiciones bien definidas de ensayo. De otro modo, se tienen que hacer correcciones para diferencias en las concentraciones.

Se han escogido condiciones de ensayo normalizadas y bien definidas a efectos de evaluar especificidad (mejoras en). La actividad enzimática de s-GDH para la glucosa como sustrato y también para otros sustratos de azúcar seleccionados se mide tal como se describe en el ejemplo 6.

- 5 Basándose en estas mediciones, se evalúa la reactividad cruzada y la especificidad (mejoras en).

La reactividad (cruzada) de s-GDH para un azúcar seleccionado en porcentaje es calculado como reactividad cruzada [(%) = (actividad azúcar seleccionado / actividad glucosa) x 100%.

- 10 La reactividad (cruzada) para la s-GDH de la maltosa de tipo natural, de acuerdo con la siguiente fórmula, ha sido determinada aproximadamente en 105%. Se ha medido la reactividad (cruzada) de s-GDH de tipo natural para galactosa en un valor aproximado de 50% (ver tabla 1).
La especificidad (mejorada) se calcula de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{especificidad (mejora)} = \frac{\text{actividad mutante glucosa}}{\text{actividad glucosa tipo natural}} \times \frac{\text{actividad azúcar seleccionado tipo natural}}{\text{actividad mutante azúcar seleccionado}}$$

- 15 En comparación con la enzima de tipo natural, una forma s-GDH que tiene, como mínimo, una mejora por un factor doble en la especificidad para la glucosa, con respecto a la maltosa (maltosa/glucosa) de acuerdo con la maltosa como sustrato, tiene como máximo 52,5% de la actividad medida con la glucosa como sustrato. Sin embargo, si, por ejemplo, un s-GDH mutante tiene una reactividad cruzada para la maltosa de 20% (determinada y calculada tal como se ha descrito anteriormente), este mutante, en comparación con s-GDH de tipo natural, tiene, por lo tanto, una mejora según un factor 5,25 en la especificidad del sustrato (maltosa/glucosa).

- 25 El término "actividad específica" para un sustrato es bien conocido en esta técnica, siendo preferentemente utilizado para describir la actividad enzimática por cantidad de proteína. Se conocen varios métodos en la técnica para determinar la actividad específica de las moléculas de GDH, utilizando glucosa u otros azúcares como sustratos (Igarashi, S., y otros, Biochem Biophys Res Commun 264 (1999) 820). Uno de los métodos disponibles para dicha medición se describe en detalle en la sección de ejemplos.

- 30 Si bien es posible seleccionar muchas moléculas de azúcar distintas e investigar la especificidad de la glucosa de s-GDH en comparación con cualquier molécula de azúcar seleccionado, se prefiere seleccionar una molécula de azúcar clínicamente relevante para esta comparación. Se seleccionan azúcares seleccionados preferentemente del grupo que consiste en manosa, alosa, galactosa, xilosa y maltosa. Más preferentemente, la maltosa o galactosa son seleccionadas y el s-GDH mutante se prueba para especificidad mejorada del sustrato para la glucosa en comparación con galactosa o maltosa. En una realización preferente adicional, el azúcar seleccionado es maltosa.

- 35 Se ha descubierto de manera sorprendente que las mejoras en la especificidad de la glucosa de la s-GDH mutada, por ejemplo maltosa con respecto a glucosa, son muy considerables. Por lo tanto, es preferible que dicha especificidad del sustrato para la glucosa en comparación con la especificidad del sustrato para, como mínimo, otro de los sustratos de azúcar seleccionados, se mejore en un factor mínimo de tres. Otras realizaciones preferentes comprenden mutantes de s-GDH caracterizados por una especificidad de sustrato mejorada para la glucosa que es, por lo menos, 5 veces superior o también de modo preferente, como mínimo, 10 veces superior en comparación con la otra molécula de azúcar seleccionada.

- 45 Las mutaciones en s-GDH conducen en muchos casos a variantes de enzimas con actividad específica drásticamente reducida para la glucosa como sustrato. Esta disminución en actividad específica (absoluta o global) para el sustrato de glucosa, no obstante, puede ser crítica para aplicaciones rutinarias. De modo sorprendente, se ha descubierto que la especificidad mejorada para la glucosa no debe tener lugar a expensas de una reducción notable de la actividad específica general. Por lo tanto, es preferente que la s-GDH con especificidad mejorada con respecto al sustrato de glucosa muestre, como mínimo, 10% de la actividad específica para glucosa, según medición con la enzima de tipo natural. Desde luego, es más preferible que dichas enzimas mutadas muestren, como mínimo, 20% o de modo más preferente, como mínimo 50%, de la actividad de glucosa respectiva de la s-GDH de tipo natural.

- 55 En otra realización adicional preferente, la invención se refiere a un mutante de forma soluble de EC1.1.99.17 también conocido como glucosa dehidrogenasa (s-GDH) soluble dependiente de PQQ, cuyo mutante se caracteriza porque:

- a) la reactividad específica del sustrato hacia la glucosa es esencialmente igual a la de la enzima de tipo natural, y
 b) la reactividad específica del sustrato hacia la maltosa es 30% o menos en comparación con la enzima de tipo natural.

La reactividad específica del sustrato (también llamada actividad específica) hacia la glucosa, se considera que es esencialmente igual a la de la enzima de tipo natural, si como mínimo, 50% de la actividad enzimática original para la glucosa de la enzima de tipo natural se mantiene. También son preferentes los mutantes que muestran, como mínimo, 80% o preferentemente más, como mínimo 90% de la actividad específica para la glucosa medida para la enzima de tipo natural.

De manera muy sorprendente se ha descubierto que es posible obtener estos mutantes o variantes de s-GDH, que en comparación con s-GDH de tipo natural muestran esencialmente igual actividad enzimática para la glucosa, pero, no obstante, reactividad específica del sustrato significativamente reducida hacia otros azúcares seleccionados, especialmente hacia la maltosa. Los mutantes caracterizados porque la reactividad específica del sustrato hacia la glucosa es esencialmente igual a la de la enzima de tipo natural y porque la reactividad específica del sustrato hacia la maltosa es 20% o menos en comparación con la enzima de tipo natural, son preferibles. Son preferibles adicionalmente los mutantes para los que la actividad específica de la maltosa es de 15% o incluso solamente 10% o menos de la actividad específica de la maltosa medida para la enzima correspondiente de tipo natural, mientras que la reactividad específica para la glucosa es esencialmente igual a la actividad específica para la glucosa de la enzima de tipo natural correspondiente.

En el caso en que la enzima de tipo natural no está bien caracterizada, es preferible utilizar la s-GDH de la cepa LMD 79.41 de tipo *Acinetobacter calcoaceticus* como referencia. En otra realización preferente, las características de una variante mejorada de s-GDH se comparan a la enzima de tipo natural y la presente invención se refiere, por lo tanto, a un mutante de s-GDH, estando caracterizado dicho mutante en que con respecto a la enzima de tipo natural de SEQ ID NO: 24 muestra esencialmente igual actividad enzimática para la glucosa pero reactividad específica del sustrato significativamente reducida (como mínimo, 70% menos) hacia, como mínimo, otro sustrato de azúcar seleccionado.

De manera inesperada, se ha descubierto que es posible generar mutantes de s-GDH con especificidad substitutiva mejorada y de manera incluso más inesperada se ha descubierto que son solamente unas pocas posiciones de aminoácidos bien definidas las que son de mayor relevancia a este respecto.

Los logros de la presente invención se describen en mayor detalle haciendo referencia a posiciones de aminoácidos conocidas a partir de SEQ ID NO: 24, secuencia de tipo natural de s-GDH aislada a partir de la cepa LMD 79.41 de tipo *Acinetobacter calcoaceticus*. Las posiciones de aminoácidos en diferentes aislados de s-GDH correspondientes a posiciones de SEQ ID NO: 24 son identificadas fácilmente por comparación apropiada de secuencias. Preferentemente, el programa PileUp es utilizado para evaluar la homología o identidad entre estas secuencias. Las posiciones de aminoácidos que se indican a continuación se comprenderán como posiciones de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 o de posiciones correspondientes a las mismas en otras moléculas de s-GDH, excepto que se haga referencia específica a una SEQ ID NO distinta o a un aislado distinto de s-GDH. Para evitar redundancias solamente en unos pocos casos, se indica el hecho de que se pueden modificar posiciones correspondientes en diferentes aislados de la misma manera, mientras que a efectos de conveniencia, en la mayor parte de casos, y se utiliza se utiliza simplemente la posición correspondiente de SEQ ID NO: 24.

Los mutantes que comprenden una sustitución de aminoácido en la posición correspondiente a la posición 348 de s-GDH se ha observado que muestran un notable efecto en la especificidad para la glucosa. Tal como se ha demostrado en la tabla 1, se pueden identificar y generar múltiples variantes de s-GDH con especificidad mejorada para la glucosa, siempre que, como mínimo, el aminoácido en posición treonina 348 correspondiente a la posición de secuencia s-GDH de tipo natural de *A. calcoaceticus* sea sustituido por otro aminoácido apropiado.

También se ha descubierto que sustituciones combinadas de aminoácidos en posiciones de aminoácidos correspondientes a las posiciones 348 y 428 de SEQ ID NO: 24 son ventajosas para generar mutantes o variantes de s-GDH con especificidad significativamente mejorada para la glucosa.

Los residuos 348 o 428 de s-GDH aislados de la cepa LMD 79.41 de tipo *Acinetobacter calcoaceticus* no son conocidos en la técnica que ayude a la unión de un sustrato de s-GDH (Oubrie, A., y otros, Embo J 18 (1999) 5187-94.; Oubrie, A. y Dijkstra, B. W., Protein Sci 9 (2000) 1265-73). No hay explicación química o física disponible de por qué las sustituciones de estos residuos de aminoácidos altera la especificidad del sustrato de s-GDH para la glucosa, en comparación con otras moléculas de azúcar de interés.

Además, se ha descubierto además que la sustitución del aminoácido 76 también tiene un efecto positivo en la especificidad de la glucosa de s-GDH.

En otra realización adicional preferente, la s-GDH mutada se caracteriza porque el residuo de aminoácido treonina en la posición 348, es sustituido por un residuo de aminoácido, seleccionado entre el grupo que consiste en alanina, glicina, y serina. En una realización más preferente, se utiliza glicina para sustituir por treonina, en la posición 348.

5 Un grupo de variantes preferentes de s-GDH, de acuerdo con la presente invención, comprende la sustitución del residuo de aminoácido en la posición 348 y, como mínimo, una de las posiciones siguientes 76, 143, 168, 169 y 428.

10 En otra realización adicional, una proteína mutante de s-GDH dependiente de PQQ comprende la sustitución de un residuo de aminoácido en la posición 428 de la correspondiente secuencia de tipo natural de *Acinetobacter calcoaceticus*, en el que el residuo de asparagina, en la secuencia de tipo natural, es sustituido por otros residuos apropiados de aminoácidos. Preferentemente, dicho residuo de aminoácido es seleccionado del grupo que consiste en leucina, prolina, y valina. Es preferible sustituir la asparagina por prolina en la posición 428.

15 Además, se ha demostrado además que el aminoácido de glutamina, en la posición 76, puede ser sustituido para mejorar los problemas impuestos por la reactividad cruzada de s-GDH con otras moléculas de azúcar. Se identifican fácilmente posiciones de secuencia de otros aislados de s-GDH, correspondiente a esa posición de secuencia por una búsqueda de homología basada en SEQ ID NO: 3. En otra realización preferente, el mutante, de acuerdo con la presente invención, comprende por lo tanto la sustitución de glutamina en la posición 76 de la correspondiente secuencia de tipo natural de *Acinetobacter calcoaceticus*.

20 Es preferible seleccionar el aminoácido utilizado en dicha sustitución en una posición que corresponde a la posición 76 en SEQ ID NO: 24 del grupo que consiste en alanina, ácido aspártico, ácido glutámico, glicina, metionina, prolina, y serina.

30 Tal como se ha descrito en lo anterior, la sustitución del aminoácido en posición 348 de la secuencia de s-GDH correspondiente a la secuencia de tipo natural aislada de *A. calcoaceticus*, se puede utilizar para mejorar significativamente la especificidad de la glucosa de s-GDH. Se obtienen más mutantes mejorados mediante una proteína mutante de s-GDH que comprende, al menos, dos sustituciones de aminoácidos, en el que el aminoácido que corresponde a la posición de aminoácido 348 de SEQ ID NO: 24 es sustituido.

35 Otra realización de la presente invención es, por lo tanto, un s-GDH mutante que comprende, como mínimo, dos sustituciones de residuos de aminoácidos en una posición de aminoácidos que corresponde a una posición de la secuencia de tipo natural de s-GDH conocida de *A. calcoaceticus* (SEQ ID NO: 24), siendo seleccionadas dichas posiciones de aminoácidos sustituidos entre el grupo que consiste en las posiciones 16, 22, 76, 116, 120, 127, 143, 168, 169, 171, 177, 227, 230, 231, 245, 255, 277, 295, 299, 308, 317, 341, 348, 349, 355, 422, 428 y 438, en la que el residuo de aminoácido T348 se sustituye. Es preferible, además, que una variante de s-GDH que tiene, como mínimo, dos residuos de aminoácidos sustituidos, comprenda una sustitución en la posición 348 y, como mínimo, una sustitución adicional seleccionada entre el grupo de posiciones que comprenda las posiciones 76, 143, 168, 169, y 428.

45 En otra realización adicional preferente, las, como mínimo, dos posiciones de aminoácidos sustituidas en una s-GDH mutante, se seleccionan del grupo que formado por las posiciones de aminoácidos 76, 348, y/o 428.

50 Mutantes que comprenden sustituciones de residuos de aminoácidos correspondientes a las posiciones 348 y 428, se han mostrado muy ventajosas para mejorar la especificidad de s-GDH para la glucosa, en comparación con otros sustratos de azúcar. Es especialmente preferente, diseñar y seleccionar mutantes de s-GDH que comprendan una sustitución en ambas posiciones 348 y 428. Son más preferentes los mutantes que comprenden, en estas dos posiciones, las sustituciones preferentes que se han descrito en lo anterior. Una variante de s-GDH que comprende T348G y N428P es la más preferente.

55 La terminología T348G y N428P es conocida en esta técnica como indicativa de que la treonina en la posición 348, es sustituida por glicina, y la glutamina en la posición 428, es sustituida por prolina.

Las proteínas mutantes de s-GDH que comprenden, además de las sustituciones en las posiciones 348 y 428, sustituciones en las posiciones 76, 127 y 143, que representan también realizaciones preferentes de la presente invención.

60 Además de ejemplos preferentes de proteínas mutadas de s-GDH, de acuerdo con la presente invención, comprenden sustituciones de aminoácidos en las posiciones 76 y 348 y, también, dichos mutantes comprenden sustituciones en las posiciones 76 y 428. En otra realización preferente, la proteína mutada de s-GDH, de acuerdo con la presente invención, comprende sustituciones de los residuos de aminoácidos en las posiciones 76, 348 y 428.

65 En otra realización adicional preferente, la variante de s-GDH, de acuerdo con la presente invención, comprende,

como mínimo, tres sustituciones de aminoácidos, correspondiendo a los, como mínimo, tres residuos de aminoácidos sustituidos en posiciones de aminoácidos de la secuencia de s-GDH de tipo natural conocido de *A. calcoaceticus* (SEQ ID NO: 24), siendo seleccionadas dichas posiciones de aminoácidos sustituidas del grupo que consiste en las posiciones 171, 227, 230, 245, 341, 348, 349 y 428, de manera que ambos residuos de aminoácidos T348 y N428 son sustituidos. Preferentemente, dichos mutantes "tribe" comprenden, como mínimo, una de las siguientes sustituciones: Y171G, H227F, P230H, E245D o M341V.

Las variantes preferentes de s-GDH con especificidad muy mejorada para la glucosa comprenden sustituciones en las posiciones 348 y 428 en combinación con sustituciones en las posiciones 245 o 341, o ambas.

El análisis de secuencias de aminoácidos reveló que los motivos de secuencias hallados en s-GDH de tipo natural de *A. calcoaceticus* por una parte y *A. baumannii* por otra, parecen ser muy conservadores alrededor de las posiciones de mayor relevancia para mejorar la especificidad para la glucosa, tal como se ha identificado en la presente invención, es decir, en las posiciones 76, 348, y 428, correspondientes a s-GDH de tipo natural de *A. calcoaceticus* (ver figura 2).

Una realización preferente, según la presente invención, es, por lo tanto, una proteína mutante de s-GDH dependiente de PQQ que comprende la secuencia de aminoácido de WPXaaVAPS (SEQ ID NO: 1), en la que dicho residuo Xaa es un residuo de aminoácido distinto de la treonina. La SEQ ID NO:1 corresponde a la posición 346-352 de s-GDH fr tipo natural de *A. calcoaceticus* o posiciones 347-353 de s-GDH de tipo natural de *A. baumannii*.

Más preferente, es un mutante de s-GDH en el que dicho Xaa en SEQ ID NO: 1 representa alanina, glicina o serina, con mayor preferencia Xaa representa glicina.

Un mutante de s-GDH dependiente de PQQ, que comprende la secuencia de aminoácido de TAGXaaVQK (SEQ ID NO: 2), en el que dicho residuo Xaa es un residuo de aminoácidos distinto de asparagina, es otra realización preferente de la invención. La SEQ ID NO:2 corresponde a las posiciones 425-431 de s-GDH de tipo natural de *A. calcoaceticus* o a las posiciones 426-432 de s-GDH de tipo natural *A. baumannii*.

Preferentemente, el mutante de s-GDH que comprende la SEQ ID NO: 2 se caracteriza porque dicho residuo Xaa es seleccionado del grupo que consiste en leucina, prolina y valina, de modo más preferentemente Xaa es un residuo de prolina.

Se conocen numerosas posibilidades en la técnica para producir proteínas mutantes. En base a los importantes descubrimientos de la presente invención que dan a conocer la importancia crítica de las posiciones de aminoácidos 348 y 428 y también la utilidad de la posición 76, actualmente los técnicos en la materia pueden producir otras variantes apropiadas de s-GDH. Estas variantes, por ejemplo, pueden ser obtenidas por los métodos conocidos como mutagénesis al azar (Leung, D. W., y otros, Technique 1 (1989) II-15) y/o mutagénesis dirigida (Hill, D. E., y otros, Methods Enzymol 155 (1987) 558-68). Un método alternativo para producir una proteína con las propiedades deseadas consiste en proporcionar constructos quiméricos, que contienen elementos de secuencia de, como mínimo, dos fuentes distintas para sintetizar completamente un gen s-GDH apropiado. Estos procedimientos conocidos en la técnica pueden ser utilizados en combinación con la información que se da a conocer en la presente invención para proporcionar mutantes o variantes de s-GDH que comprenden, como mínimo, una sustitución de aminoácidos en una posición de la secuencia que corresponde a las posiciones 348 y/o 428 de la SEQ ID NO: 24.

Una variante de s-GDH de acuerdo con la presente invención puede ser producida, por ejemplo, a partir de un gen s-GDH aislado de la cepa LMD 79.41 de tipo *Acinetobacter calcoaceticus*, así como partiendo de una secuencia homóloga. De acuerdo con esta solicitud, el término "homólogo" está destinado a comprender s-GDH de tipo natural aislado de otros organismos a condición de que la homología de secuencia comparada con SEQ ID NO: 24 sea, como mínimo, del 90%. En otras palabras, después de la alineación apropiada utilizando el programa "PileUp", como mínimo, el 90% de los aminoácidos de dicha s-GDH son idénticos a los aminoácidos descritos en SEQ ID NO: 24.

Se comprenderá que existen naturalmente variaciones de ADN y secuencias de aminoácidos, o que éstas pueden ser introducidas intencionadamente utilizando métodos conocidos en la técnica. Estas variaciones pueden tener como resultado diferencias en hasta un 10% de aminoácidos en la secuencia global debido a deleciones, sustituciones, inserciones, inversiones o adiciones de uno o varios residuos de aminoácidos en dicha secuencia en comparación con la SEQ ID NO: 24. Estas sustituciones de aminoácidos pueden ser realizadas, por ejemplo, en base a la similitud en la polaridad, carga la solubilidad, hidrofobicidad, hidrofiliidad y/o la naturaleza anfipática de los residuos involucrados. Por ejemplo, los aminoácidos con carga negativa son el ácido aspártico y ácido glutámico; aminoácidos cargados positivamente incluyen lisina y arginina; los aminoácidos con grupos de cabeza polar o no polar no cargados que tienen valores de hidrofiliidad similares incluyen los siguientes: leucina, isoleucina, valina, glicina, alanina, asparagina, glutamina, serina, treonina, fenilalanina, tirosina. Otras variantes previstas incluyen sales y ésteres de los polipéptidos antes mencionados, así como los precursores de los polipéptidos antes mencionados, por ejemplo, los precursores que tienen sustitución del terminal N, tal como metionina, N-formilmetionina utilizadas como secuencias principales. Estas variaciones se pueden realizar sin salir necesariamente del ámbito y espíritu de la presente invención.

De acuerdo con el estado de la técnica o de acuerdo con procedimientos facilitados en la sección de ejemplos, es posible obtener secuencias de polinucleótidos que codifican para cualquiera de los mutantes de s-GDH, tal como se ha indicado anteriormente. La invención comprende, por lo tanto, asimismo secuencias de polinucleótidos aislados que codifican proteínas mutantes de s-GDH, tal como se ha descrito en lo anterior.

La presente invención comprende además un vector de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico, de acuerdo con la presente invención enlazada operativamente a una secuencia promotora capaz de dirigir su expresión en una célula huésped.

La presente invención incluye además un vector de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico, de acuerdo con la presente invención, enlazada operativamente a una secuencia promotora capaz de dirigir la expresión en una célula huésped. Los vectores preferentes son plásmidos, tales como pACSGDH mostrados en las figuras 3 y 4.

Los vectores de expresión, útiles para la presente invención, contienen de manera típica un origen de replicación, un promotor situado más arriba de la secuencia de ADN, y van seguidos de la secuencia de ADN que codifica para la totalidad o una parte de las variantes de s-GDH. La secuencia de ADN que codifica para la totalidad de una parte de las variantes de s-GDH es seguida por secuencias de terminación de la transcripción y el vector restante. Los vectores de expresión también pueden incluir otras secuencias de ADN conocidas en la técnica, por ejemplo, las secuencias principales de estabilidad, que proporcionan estabilidad del producto de expresión, las secuencias principales de secreción que proporcionan la secreción del producto de expresión, las secuencias que permiten la expresión del gen estructural a modular (por ejemplo, por la presencia o ausencia de nutrientes u otros inductores en el medio de crecimiento), las secuencias de marcado que son capaces de proporcionar selección fenotípica en células huésped transformadas, y las secuencias que proporcionan lugares de fraccionamiento por endonucleasas de restricción.

Las características del vector de expresión real utilizado deben ser compatible con la célula huésped que se debe utilizar. Por ejemplo, cuando se efectúa clonado en un sistema de células *E.Coli*, el vector de expresión debe contener promotores aislados del genoma de células de *E.Coli* (por ejemplo, *lac*, o *trp*). Se incluyen entre los orígenes apropiados de replicación en diferentes huéspedes de *E.Coli*, por ejemplo, un origen de replicación de plásmido ColE1. Se incluyen entre los promotores adecuados, por ejemplo, *lac* y *trp*. También es preferible que el vector de expresión incluya una secuencia que codifique para un marcador seleccionable. El marcador seleccionable es preferentemente un gen de resistencia a los antibióticos. Como marcadores seleccionables se pueden utilizar convenientemente el de resistencia a la ampicilina, o de resistencia a la kanamicina. Todos estos materiales son conocidos en la técnica y se encuentran a disposición comercialmente.

Se pueden construir vectores de expresión adecuados que contienen las secuencias deseadas de codificación y de control utilizando técnicas de ADN recombinante estándar conocidas en la técnica, muchas de las cuales se describen por Sambrook, y otros (1989).

La presente invención se refiere además a células huésped que contienen un vector de expresión que comprende una secuencia de ADN que codifica para la totalidad o una parte de los mutantes de s-GDH. Las células huésped contienen preferentemente un vector de expresión que comprende la totalidad o parte de una de las secuencias de ADN que tienen una o varias mutaciones, mostradas en la tabla 1. Son adicionalmente preferentes, las células huésped que contienen un vector de expresión que comprende una o varias secuencias reguladoras de ADN capaces de dirigir la replicación y/o expresión de una secuencia de ADN y que está operativamente enlazada a la misma, para la totalidad o una parte de mutantes de s-GDH. Se incluyen, entre las células huésped adecuadas, por ejemplo, *E.Coli* HB101 (ATCC 33694) disponible de la firma Pomega (2800 Woods Hollow Road, Madison, WI, USA), XL1-Blue MRF disponible de Stratagene (11011 North Torrey Pine Road, La Jolla, CA, USA) y similares.

Los vectores de expresión pueden ser introducidos en células huésped por varios métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la transformación de células huésped con vectores de expresión puede ser llevada a cabo por un método de transformación de protoplastos mediado por polietilenglicol (Sambrook, y otros 1989). No obstante, se pueden utilizar otros métodos para la introducción de vectores de expresión en células huésped, por ejemplo, electroporación, inyección biolística, o fusión de protoplastos.

Una vez se ha introducido un vector de expresión, que contiene una variante de s-GDH en una célula huésped apropiada, la célula huésped puede ser cultivada en condiciones que permitan la expresión de las variantes deseadas de s-GDH. Las células huésped que contienen un vector de expresión que contiene una secuencia de ADN que codifica para la totalidad o parte de los mutantes de s-GDH son identificadas, por ejemplo, por uno o varios de los sistemas generales siguientes: hibridación de ADN, presencia o ausencia de funciones de genes marcadores, la evaluación del nivel de transcripción, medida por la producción de transcriptores de s-GDH mRNA en la célula huésped, y detección inmunológicamente del producto de gen. Las células huésped preferentemente transformadas son identificadas por ensayo de enzimas, por ejemplo, detección colorimétrica.

La presente invención da a conocer también la generación y cribado de variantes de s-GDH. Se lleva a cabo, tal como se conoce en la técnica, mutagénesis al azar y mutagénesis de saturación. Las variantes son analizadas por la especificidad del sustrato de la glucosa, maltosa y otros azúcares. Las condiciones de ensayo escogidas están adaptadas para asegurar que los pequeños incrementos esperados producidos, por ejemplo, por una única sustitución de un aminoácido único, puedan ser medidos. Esto se ha conseguido ajustando las condiciones e ensayo, de manera que la actividad de la enzima de tipo natural (o parental) se encuentra próxima al límite inferior de detección. Una modalidad de selección o cribado de mutantes apropiados se indica en el ejemplo 3. Cualquier cambio o mejora, en comparación con la enzima de tipo natural, pueden ser claramente detectados de ésta manera.

Se debe comprender, desde luego, que no todos los vectores de expresión y secuencias reguladoras de ADN funcionarían igualmente bien para expresar las secuencias de ADN de la presente invención. Tampoco funcionarían igualmente bien todas las células huésped con el mismo sistema de expresión. No obstante, un técnico ordinario en la materia puede llevar a cabo una selección entre los vectores de expresión, las secuencias reguladoras de ADN y las células huésped utilizando las instrucciones que se facilitan en esta descripción sin necesidad de una experimentación indebida y sin alejarse del ámbito de la presente invención.

La invención se refiere también a un procedimiento para la producción de variantes de s-GDH de la presente invención que comprende el cultivo de una célula huésped de la invención en las condiciones apropiadas para la producción de mutantes de s-GDH de la invención. Para células huésped bacterianas, las condiciones de cultivo típicas son un medio líquido que contiene el antibiótico apropiado y el agente de inducción. Se incluyen entre los antibióticos típicos apropiados, la ampicilina, kanamicina, cloramfenicol, tetraciclina, y similares. Entre los agentes de inducción típicos se incluyen IPTG, glucosa, lactosa y similares.

Es preferible que los polipéptidos de la presente invención se obtengan por producción en las células huésped que expresan una secuencia de ADN que codifica el mutante de s-GDH. Los polipéptidos de la presente invención pueden ser obtenidos también por traducción *in vitro* del mRNA, codificado por una secuencia de ADN que codifica para el mutante de s-GDH. Por ejemplo, las secuencias de ADN pueden ser sintetizadas, tal como se ha descrito anteriormente, e insertadas en un vector de expresión adecuado, que a su vez puede ser utilizado en un sistema de transcripción/traducción *in vitro*.

Un vector de expresión, que comprende un polinucleótido aislado, según se ha definido y descrito anteriormente, enlazado operativamente a una secuencia promotora capaz de promover su expresión en un sistema de síntesis de péptido libre de células, representa otra realización preferente de la presente invención.

Los polipéptidos producidos, por ejemplo, por procedimientos, tal como se ha descrito en lo anterior, pueden ser, a continuación, aislados y purificados utilizando diferentes técnicas de purificación de proteínas de rutina. Por ejemplo, se pueden utilizar procedimientos cromatográficos, tales como cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtrado de gel, y cromatografía de afinidad.

Una de las aplicaciones más importantes de las variantes de s-GDH mejoradas de la presente invención es para su utilización en tiras de pruebas para controlar el nivel de glucosa en sangre en pacientes diabéticos. Debido a la insensibilidad de la dehidrogenasa de glucosa dependiente de PQQ frente al oxígeno, un sistema que utilice variantes mejoradas de s-GDH tiene menor tendencia a la interferencia del oxígeno que los sistemas basados en oxidasa de glucosa. De modo más importante, dado que las variantes de s-GDH tienen especificidad mejorada frente a la glucosa y actividad enzimática relativa significativamente reducida con respecto a otros azúcares, la interferencia debida a maltosa, galactosa, y/o otros azúcares relacionados, que pueden encontrarse presentes en una muestra a analizar, se reduce significativamente. Desde luego, se pueden investigar muchos tipos de muestras. Los fluidos corporales, tales como suero, plasma, fluidos intestinales u orina, son fuentes preferentes para dichas muestras.

La invención comprende también un procedimiento para detectar, determinar o medir glucosa en una muestra utilizando un mutante de s-GDH de acuerdo con la presente invención. Es especialmente preferente que el procedimiento mejorado para la detección de glucosa en una muestra se caracterice porque dicha detección, determinación o medición de glucosa se lleve a cabo utilizando un sensor o dispositivo de tira de pruebas.

Asimismo, dentro del ámbito de la presente invención, se encuentra un dispositivo para la detección o medición de glucosa en una muestra que comprende un mutante de s-GDH de acuerdo con esta invención, así como otros reactivos requeridos para dicha medición.

Estas variantes de s-GDH, con especificidad del sustrato mejorada, según la presente invención, pueden ser también utilizadas de manera muy ventajosa en biosensores (D'Costa, E. J., y otros, *Biosensors* 2 (1986) 71-87; Laurinavicius, V., y otros, *Analytical Letters* 32 (1999) 299-316; Laurinavicius, V., y otros, *Monatshefte fuer Chemie* 130 (1999) 1269-1281) para el control en línea de la glucosa en una muestra o en un reactor. Para ello, las variantes de s-GDH pueden ser utilizadas, por ejemplo, para el recubrimiento de un electrodo vítreo insensible al oxígeno, con un complejo de osmio, que contiene una red conductora de epoxi redox (Ye y otros, 1993, *supra*) para

una determinación más exacta de la concentración de glucosa.

Existen también otras aplicaciones posibles para las variantes de s-GDH con la especificidad mejorada del sustrato de acuerdo con la presente invención. Por ejemplo, estas variantes de s-GDH pueden ser utilizadas en un proceso de producción de ácido aldónico. S-GDH de tipo natural tiene un elevado rendimiento a la oxidación del sustrato, produciendo ácidos glucónico y otros ácidos aldónicos. Mediante la utilización de variantes de s-GDH que son más específicas para la glucosa, la producción de ácido glucónico tendría como resultado una proporción mucho menor de subproductos. Con otras variantes de s-GDH de diferente especificidad del sustrato, es posible producir diferentes ácidos aldónicos, según las necesidades.

En los siguientes ejemplos, todos los reactivos, enzimas de restricción, y otros materiales, fueron obtenidos de la firma Roche Diagnostics de Alemania, si no se indican específicamente otras fuentes de origen, y se utilizaron de acuerdo con las instrucciones facilitadas por los suministradores. Las operaciones y métodos utilizados para la purificación, caracterización, y clonado de ADN son bien conocidos en esta técnica (Ausubel, F., y otros, in "Current protocols in molecular biology" (1994), Wiley Verlag) y se pueden adaptar según sea necesario por técnicos expertos.

Los siguientes ejemplos muestran adicionalmente la presente invención. Estos ejemplos no están destinados a limitar el alcance de la invención, sino a facilitar una mejor comprensión de la misma.

Ejemplo 1

Clonado y expresión de dehidrogenasa de glucosa dependiente de PQQ soluble de *A. calcoaceticus* de tipo natural en *E.Coli*.

El gen de s-GDH fue aislado de la cepa LMD 79.41 de *Acinetobacter Calcoaceticus* de acuerdo con procesos estándar. El gen de s-GDH de tipo natural fue subclonado en un plásmido, conteniendo el promotor mgl para la expresión ajustable (ver solicitud de patente WO 88/09373). El nuevo constructo fue designado pACSGDH (ver figuras 3 y 4). Los plásmidos recombinantes fueron introducidos en un organismo huésped seleccionado del grupo *E.Coli*. Estos organismos fueron cultivados a continuación bajo condiciones apropiadas y se seleccionaron colonias que mostraban la actividad de s-GDH.

El plásmido pACSGDH fue aislado de un cultivo de 200 ml durante una noche del clon mencionado anteriormente, utilizando el Maxi Kit QIAGEN Plasmid (Qiagen) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El plásmido fue resuspendido en 1 ml de agua bidestilada. La concentración del plásmido fue determinada utilizando un fotómetro Beckman DU 7400. El rendimiento fue de 600µg. A continuación, se determinó la calidad del plásmido por electroforesis de gel de agarosa.

Ejemplo 2

PCR Mutagénico

Para generar mutaciones al azar en el gen s-GDH, se llevó a cabo PCR Mutagénico (reacción en cadena de polimerasa). El plásmido pACSGDH y la secuencia de ADN que codifica las enzimas mutadas (producto PCR de PCR Mutagénico) fueron digeridos con enzimas de restricción *SphI* y *EcoRI*. Los productos fueron purificados. Las secuencias de ADN digeridas fueron ligadas y se utilizó una parte alícuota de la mezcla de reacción de ligado para transformar las células competentes *E.Coli*. Los transformantes fueron seleccionados a continuación en placas LB que contenían ampicilina.

Para el ensayo, se escogieron colonias individuales, se cultivaron durante una noche en LB medio conteniendo ampicilina, y se sometieron a rastreo (ver ejemplo 3).

Mezcla de reacción de PCR Mutagénico:

40 ng pACSGDH
 1 x buffer without MgCl₂ (Roche Diagnostics GmbH, Cat. 1699 105)
 dCTP, dTTP 1mM
 dATP, dGTP 0,2 mM (Roche Diagnostics GmbH, Cat. 1969 064)
 40 pmol GF23-Cebador (5'-CGC GCA CGC GCA TGC CGC CGA TGT TC) (= SEQ ID NO: 4)
 40 pmol GR23 (5'-GAC GGC CAG TGA ATT CTT TTC TA) (= SEQ ID NO: 5) 7 mM MgCl₂
 0.6 mM MnCl₂
 5 U Taq ADN polimerasa (Roche Diagnostics GmbH, Cat. 1146165)
 Gen Amp PCR Sistema 2400 (Perkin Elmer), 30 ciclos: 95 °C 1 min, 45 °C 2 min, 72 °C 2 min.

- Purificación de los productos de PCR utilizando el equipo de purificación de producto High Pure PCR, de Roche Diagnostics GmbH (Cat. 1732676) de acuerdo con su protocolo de fabricación.

ES 2 370 812 T3

- Digestión de los fragmentos de PCR con 25 U SphI (Roche Diagnostics GmbH, Cat. 606 120) en 1 x tampón H (Roche Diagnostics GmbH, Cat. 1 417 991) a 37 °C durante una noche; adición de 25 U EcoRI (Roche Diagnostics GmbH, Cat. 703 737) y digestión adicional durante 3,5 horas.

5 - Digestión de 50 µg pACSGDH con 180 U SphI y 180 U EcoRI en 1 x tampón H durante 4 horas a 37 °C.

-Electroforesis de gel del pACSGDH digerido y los fragmentos digeridos utilizando geles de agarosa (0,8 %).

10 - Extracción de moléculas de ADN utilizando Kit de extracción QUIAquick Gel (Qiagen, Cat. 28706), de acuerdo con el protocolo de los fabricantes.

- Determinación de la concentración de los fragmentos y vector digerido utilizando un fotómetro Beckman DU 7400.

15

- Determinación de la calidad de los productos purificados por electroforesis de gel de agarosa.

- Ligado del vector de 100ng digerido con fragmentos de 140ng mPCR utilizando 1 U T4-DNA-Ligase (Roche Diagnostics GmbH, Cat. 481 220) en un volumen de 20µl a 16 °C durante una noche.

20

- Electroporación de células ZL 1F electro-competentes (Stratagene) con 1µl de la reacción de ligado con cubetas de 2,5 KV in 0,2 cm utilizando un dispositivo BioRad E. coli Pulser (BioRad).

25

- Después de crecimiento en un ml LB a 37°C durante una hora, se aplicaron las bacterias en forma de placas sobre placas de LB Ampicilina Agar (100µg/ml de Ampicilina) y se cultivaron durante una noche a 37°C.

- 50% de estos clones expresando s-GDH mutada se activaron utilizando el siguiente método de rastreo.

30 **Ejemplo 3**

Rastreo

35 Las colonias mutantes sobre placas de Agar, descritas en lo anterior, fueron recogidas en placas de micro-titulación (mtp) conteniendo 200µl de LB-Ampicilina-Medio/pocillo, y se incubaron durante una noche a 37°C. Estas placas se llaman placas maestras.

40 De cada placa maestra se traspasaron 5µl muestra/pocillo a un mtp conteniendo 5µl por cada pocillo de B (B=reactivo de extracción de Proteínas Bacterianas; Pierce N°. 78248) para disrupción de células y se añadieron 240µl de 0,0556 mM pyrrolo-quinolona quinona (PQQ); 50 mM Hepes; 15 mM CaCl₂ pH 7,0/ pocillo, para activación de s-GDH. Para completar la formación del holoenzima, el mtp fue incubado a 25° C durante 2 horas y 10°C a lo largo de una noche. Esta placa es llamada placa de trabajo.

45 De la placa de trabajo se trasladaron 20x10µl muestra/orificio a 2 mtp vacías. Después de ello, una fue sometida a una prueba con glucosa, y la otra con maltosa u otras moléculas de azúcar seleccionadas como sustrato. Todas la moléculas de azúcar fueron utilizadas en concentraciones equimolares.

50 Se calculó dE/min y se ajustó el valor utilizando glucosa como sustrato a 100% de actividad. El valor obtenido con el otro azúcar fue comparado con la glucosa y calculado en actividad porcentual ((dE/min Maltosa/dE Glucosa)*100). Esto es equivalente a la reactividad cruzada de la enzima (mutante).

Ejemplo 4

Secuenciado de gen de s-GDH mutante a partir de PCR Mutagénica

55

El plásmido que contiene el gen de s-GDH mutante, que conduce un 50% de actividad maltosa/glucosa fue aislado (High Pure Plasmid Isolation Kit, Roche Diagnostics GmbH, No. 1754785) y secuenciado utilizando un Kit de Secuenciado ABI Prism y un secuenciador ABI 3/73 y 3/77 (Amersham Pharmacia Biotech).

60 Se utilizaron los cebadores siguientes:

65

Cadena sentido: GDH F2 : 5'-TTA ACG TGC TGA ACA GCC GG-3' (= SEQ ID NO: 6)
 GDH F3: 5'-GAT G CT GAT GGG CAG AAT GG-3' (= SEQ ID NO: 7)
 GDH F4: 5'-ATA TGG GTA AAG TAC TAC GC -3' (= SEQ ID NO: 8)
 GDH F5: 5'-ACG ATC CAA CTT GTG GAG AG- 3' (= SEQ ID NO: 9)

Cadena antisentido: GDH R1: 5'-CGA TTA AGT TGG GTA ACG CC-3' (= SEQ ID NO: 10)
 GDH R2: 5'-ATA CGG AAA ATG ACA CCA CG-3' (= SEQ ID NO: 11)
 GDH R3: 5'-GGG CCT TGT TCA GAC TGC AA-3' (= SEQ ID NO: 12)
 GDH R4: 5'-CAA GAC GAC CTG ACT GAT GG-3' (= SEQ ID NO: 13)
 GDH R5: 5'-CAT AAC AAC GCG TGC GGC TT-3' (= SEQ ID NO: 14)

Resultados:

15 => 6 mutaciones en nivel de secuencia de ADN
 => 4 mutaciones en nivel de aminoácido:
 en posición 340 (enzima madura) cambio de E a G
 en posición 348 (enzima madura) cambio de T a S
 en posición 369 (enzima madura) cambio de N a H
 20 en posición 413 (enzima madura) cambio de S a N

Ejemplo 5

25 Mutantes de s-GDH obtenidos por Mutagénesis de saturación

Se utilizó el Kit de Mutagénesis dirigido al lugar QuickChange (Stratagene, Cat. 200518) para sustituir satisfactoriamente aminoácidos de tipo natural en posiciones definidas de la proteína s-GDH o de los mutantes de s-GDH (purificación de plásmido, tal como se ha descrito en lo anterior) con otros aminoácidos al azar.

30 Los cebadores 5' y 3', utilizados para mutagénesis, eran complementarios entre sí, y contenían NNN en posición central. Estos nucleótidos estaban flanqueados por 12 a 16 nucleótidos en cada extremo. Las secuencias de los nucleótidos eran idénticas a la cadena cADN o a la cadena complementaria cADN flanqueando el codón para el aminoácido que tenía que ser sustituido. En vez del condón, el cebador contenía NNN, por lo que los oligonucleótidos codifican para cada codón.

35 Para cada posición definida, se llevó a cabo una reacción PCR.

Las reacciones PCR y las digestiones *DpnI* fueron llevadas a cabo, de acuerdo con el manual.

40 Después de ello, se utilizó 1 µl de cada reacción para la electroporación de células XL 1F. Las células fueron cultivadas y se determinó, tal como se ha descrito anteriormente, la actividad de s-GDH de los clones.

45 Para asegurar estadísticamente que los 20 aminoácidos variantes habían sido rastreados, se comprobaron 200 clones para cada posición.

Se utilizaron los siguientes cebadores:

50 para posición 340, cadena Sentido EGF 5'-TCC AAC TTG TGG ANN N AT GAC CTA CAT TT-3' (= SEQ ID NO: 15)

Cadena Antisentido EGR 5'- AAA TGT AGG TCA TNN NTC CAC AAG TTG GA-3' (= SEQ ID NO: 16)

55 para posición 348, cadena Sentido TSF 5'- CAT TTG CTG GCC ANN NGT TG C ACC GTC AT-3' (= SEQ ID NO: 17)

45

60 cadena Antisentido TSR 5'- ATG ACG GTG CAA CNN NTG GCC AGC AAA TG-3' (= SEQ ID NO: 18) para posición 369, cadena sentido NHF 5'-TAC TGG TTG GGA ANN NAC ATT ATT GGT TC -3' (= SEQ ID NO: 19)

ES 2 370 812 T3

cadena Antisentido NHR 5'- GAA CCA ATA ATG TNN NTT CCC AAC CAG TA-3'(= SEQ ID NO: 20)

para posición 413 cadena Sentido SNF 5'-TGA TGT GAT TGC ANN NCC AGA TGG GAA TG -3' (= SEQ ID NO: 21)

5

cadena Antisentido SNR 5'- CAT TCC CAT CTG GNN NTG CAA TCA CAT CA-3' (= SEQ ID NO: 22)

Resultados:

10 Los cambios de aminoácidos en las posiciones 340, 369 y 413 no cambiaron la especificidad del sustrato. Solamente la oscilación en la posición 348 facilitó la producción de clones con especificidad de sustrato de 25-100% (maltosa/glucosa).

15 Numerosas rondas de PCR mutagénico y de saturación de mutagénesis fueron llevadas a cabo. Se descubrió y confirmó que las posiciones 348 y 428 son de mayor importancia y que el intercambio de otros aminoácidos puede mejorar adicionalmente la especificidad para glucosa mutada de s-GDH. En la tabla 1, se indican datos representativos y posiciones.

20

Tabla 1: Ejemplos de variantes s-GDH con especificidad mejorada a la glucosa

Abreviaciones:		n.p. = no probado		
		AE = actividad específica (U/mg proteína) con glucosa como sustrato		
Aminoácido cambiado a secuencia de tipo natural	Conversión de la glucosa	Conversión de la maltosa	Conversión de la galactosa	AE
Tipo natural	100%	105%	50%	1000
340 E a G 348 T a S 369 N a H 413 S a N	100%	50%	25%	700
22 I a L 295 Q a L 422 L a I	100%	123%	14%	178
348 T a D	100%	80%	n.p.	n.p.
348 T a A	100%	67%	n.p.	n.p.
348 T a G	100%	22%	20%	910
428 N a P	100%	8%	25%	n.p.
348 T a G	100%			
428 N a V 348 T a G	100%	22%	22%	n.p.
127 T a M 143 D a Q 348 T a G 428 N a P	100%	1%	32%	n.p.
76 Q a A 348 T a G	100%	17%	n.p.	n.p.
76 Q a M 348 T a G	100%	18%	n.p.	n.p.
76 Q a D 348 T a G	100%	17%	n.p.	n.p.
76 Q a P 348 T a G	100%	17%	n.p.	n.p.
76 Q a S 348 T a G	100%	17%	n.p.	n.p.
76 Q a G 348 T a G	100%	20%	n.p.	n.p.
76 Q a E 348 T a G	100%	17%	n.p.	n.p.
143 D a E 348 T a G	100%	17%	n.p.	n.p.
171 Y a H 348 T a G 308 K a N	100%	19%	n.p.	n.p.

171 Y a D 348 T a G 317 F a V	100%	18%	n.p.	n.p.
127 T a S 169 L a H 348 T a G 355 Y a H	100%	11%	n.p.	n.p.
16 N a D 120 T a S 177 Q a R 277 Y a H 348 T a G	100%	22%	n.p.	n.p.
116 I a T 255 N a T 299 K a R 348 T a G	100%	20%	n.p.	n.p.
227 H a Y	100%	18%	n.p.	n.p.
348 T a G 438 N a S				
341 M a V 348 T a G	100%	20%	n.p.	n.p.
348 T a G 349 V a G 428 N a P	100%	10%	n.p.	n.p.
171 Y a G 230 P a H 348 T a G 428 N a P	100%	3%	n.p.	n.p.
230 P a H 348 T a G 428 N a P	100%	10%	n.p.	200
227 H a F 230 P a H 348 T a G 428 N a P	100%	6%	n.p.	n.p.
143 D a E 348 T a G	100%	17%	n.p.	n.p.
143 D a E 348 T a G 428 N a P	100%	1%	n.p.	n.p.
169 G a X 230 P a H 348 T a G 428 N a P	100%	2%	n.p.	n.p.

Ejemplo 6:

Purificación de mutante s-GDH T348G

5

Las células cultivadas (LB-Amp. 37°C) fueron recogidas y resuspendidas en un tampón de fosfato potásico pH 7,0. Se llevó a cabo disrupción celular por paso por una French Press (700-900 bar). Después de la centrifugación, el sobrenadante fue aplicado a una columna de S-Sepharosa (Amersham Pharmacia Biotec) equilibrada con 10mM de tampón de fosfato potásico pH 7,0. Después de un lavado, la S-GDH fue eludida utilizando un gradiente de sal de 0-1 M NaCl. Las fracciones que mostraban actividad s-GDH fueron agrupadas, dializadas contra tampón de fosfato potásico pH 7,0, y recromatografiadas en una columna de S-Sepharosa reequilibrada. Las fracciones activas fueron reunidas y sometidas a una filtración de gel utilizando una columna de Superdex® 200 (Amersham Pharmacia Biotec). Las fracciones activas fueron agrupadas y almacenadas a -20 °C.

15

Ensayo de enzima y determinación de Proteína del mutante T348G y tipo natural de s-GDH. Se llevó a cabo una determinación de proteínas utilizando el reactivo de ensayo de proteínas nº. 23225 de la firma Pierce (curva de calibrado con BSA, 30 Min. 37°C).

20

Las muestras de s-GDH fueron diluidas en 1mg de proteína/ml con 0,0556 mM pirollo-quinolina quinona (PQQ); 50 mM Hepes; 15 mM CaCl₂ pH 7,0 incubadas a 25°C durante 30 minutos para la reconstitución o activación.

Después de la activación se añadieron 50 µl de la muestra a 1000 µl de una solución de tampón de citrato 0,2 M (pH 5,8; a 25°C), conteniendo 0,315 mg (4-(dimetil fosfinil metil)-2-metil-pirazolo-[1,5a]-imidazolil-3-)-(4-nitrosufenilamina) (ver patente US 5.484.708) /ml como mediador y 33 mM de azúcar).

Se controló la extinción a 620 nm durante los primeros 5 minutos a 25°C.

Una unidad de actividad de enzima corresponde a la conversión de 1mMol de mediador/min bajo las condiciones de ensayo indicadas.

Cálculo: Actividad = (volumen total * dE/min [U/ml]) : (ε* volumen de la muestra * 1)

(ε = coeficiente de extinción; en este ejemplo ε_{620 nm} = 30 [1* mmol⁻¹ * cm⁻¹])

El ensayo fue llevado a cabo con glucosa, maltosa y galactosa (Merck, Alemania).

Resultados:

Muestra	Actividad específica U/mg Proteína (glucosa como sustrato)	% de conversión de maltosa/glucosa	% de conversión de galactosa/glucosa
Tipo natural	1000	105%	50%
Mutante T348G	910	22%	20%

Ejemplo 7: Determinación de glucosa en presencia o ausencia de Maltosa

T348G de s-GDH de tipo natural y mutante fueron aplicados para la determinación de la glucosa. Las muestras de referencia contenían 65mg de glucosa/dl. La muestra de la “prueba” contenía 65mg de glucosa/dl y 130mg/dl de maltosa. Se utilizaron las mismas cantidades de actividad de s-GDH para cada ensayo (U/ml; ver ensayo de enzima).

Se mezcló en una cubeta:

1ml 0,315mg (4-(dimetil fosfinil metil)-2-metil-pirazolo-[1,5a]-imidazolil-3-)-(4-nitrosufenil)- amina ml/0,2 M citrato pH 5,8.

0,015 ml de muestra (glucosa, o glucosa + maltosa).

El ensayo fue iniciado añadiendo 0,050 ml 90 U/ml de s-GDH. El cambio de absorción a 620 nm fue controlado. Pasados 5 minutos, se observaron valores constantes y se calcularon dE/5 min. El valor obtenido midiendo la muestra de referencia con s-GDH de tipo natural se ajustó al 100%. Los otros valores fueron comparados a este valor de referencia y calculados en %.

Resultados:

	65 mg/dl de glucosa	65 mg/dl de glucosa y 130 mg/ml de maltosa
Tipo natural s-GDH	100%	190%
s-GDH T348G mutante	100%	130%

Se puede ver claramente que el “valor de la glucosa” medido es notablemente menos alterado cuando se utiliza s-GDH mutada en esta determinación.

Listado de referencias

Anthony C., 1996. Quinoprotein-catalysed reactions. Biochem. J. 320(3):697-711
 Anthony C., Ghosh M., 1997. The structure and function of PQQ-co ntaining quinoproteins. Curr. Sci. 72(10):716-727
 Anthony, C., Biochem J 320 (1996) 697-711
 Anthony, C. and Ghosh, M., Current Science 72 (1997) 716-727
 Anthony, C. and Ghosh, M., Prog Biophys Mol Biol 69 (1998) 1-21

- Anthony, C., *Biochem Soc Trans* 26 (1998) 413-7
 Ausubel, F., y otros, in "Current protocols in molecular biology" (1994), Wiley Verlag
 Cleton-Jansen, A. M., y otros, *Antonie Van Leeuwenhoek* 56 (1989) 73-9
 Cleton-Jansen, A. M., y otros, *J Bacteriol* 170 (1988) 2121-5
 5 Cleton-Jansen, A. M., y otros, *Mol Gen Genet* 217 (1989) 430-6
 Davidson, V. L. in "Principles and applications of quinoproteins" (1993) the whole book, New York, Marcel Dekker
 D'Costa, E. J., y otros, *Biosensors* 2 (1986) 71-87
 Dokter, P., y otros, *FEMS Microbiology Letters* 43 (1987) 195-200
 Dokter, P., y otros, *Biochem J* 239 (1986) 163-7
 10 Dokter, P., y otros, *Biochem J* 254 (1988) 131-8
 Duine, J. A. Energy generation and the glucose dehydrogenase pathway in *Acinetobacter* in "The Biology of *Acinetobacter*" (1991) 295-312, New York, Plenum Press
 Duine, J. A., *Biosens. Bioelectronics* 10 (1995) 17-23
 Duine, J. A., y otros, *Arch Microbiol* 131 (1982) 27-31
 15 Duine, J. A., *Eur J Biochem* 200 (1991) 271-84
 Goodwin, P. M. and Anthony, C., *Adv Microb Physiol* 40 (1998) 1-80
 Hill, D. E., y otros, *Methods Enzymol* 155 (1987) 558-68
 Igarashi, S., y otros, *Biochem Biophys Res Commun* 264 (1999) 820-4
 Kaufmann, N., y otros Development and evaluation of a new system for determining glucose from fresh capillary
 20 blood and heparinised venous blood in "Glucotrend" (1997) 1-16, Mannheim, Boehringer Mannheim GmbH
 Laurinavicius, V., y otros, *Analytical Letters* 32 (1999) 299-316
 Laurinavicius, V., y otros, *Monatshefte fuer Chemie* 130 (1999) 1269-1281
 Leung, D. W., y otros, *Technique* 1 (1989) 11-15
 Matsushita, K. and Adachi, O. Bacterial quinoproteins glucose dehydrogenase and alcohol dehydrogenase in "Prin-
 25 ciples and applications of Quinoproteins" (1993) 47-63, New York, Marcel Dekker
 Matsushita, K., y otros, *Antonie Van Leeuwenhoek* 56 (1989) 63-72
 Matsushita, K., y otros, *Biochemistry* 28 (1989) 6276-80
 Matsushita, K., y otros, *Bioscience Biotechnology & Biochemistry* 59 (1995) 1548-1555
 Oliphant, A. R., y otros, *Gene* 44 (1986) 177-83
 30 Olsthoorn, A. J. and Duine, J. A., *Arch Biochem Biophys* 336 (1996) 42-8
 Olsthoorn, A. J. and Duine, J. A., *Biochemistry* 37 (1998) 13854-61
 Oubrie, A. and Dijkstra, B. W., *Protein Sci* 9 (2000) 1265-73
 Oubrie, A., y otros, *Embo J* 18 (1999) 5187-94
 Oubrie, A., y otros, *J Mol Biol* 289 (1999) 319-33
 35 Oubrie, A., y otros, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (1999) 11787-91
 Sambrook, J., y otros - in "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (1989) -, Cold Spring Harbour, NY, Cold Spring
 Harbour Laboratory Press
 Wens, R., y otros, *Perit Dial Int* 18 (1998) 603-9
 Ye, L., y otros, *Anal. Chem.* 65 (1993) 238-41
 40
- EP 0 620 283
 JP 11243949
 US 5.484.708
 45 US 5.997.817
 US 6.057.120
 US 6.103.509
 WO 92/07953
 WO 99/30152
 50 WO 88/09373

LISTADO DE SECUENCIAS

- 55 <110> F. Hoffmann-La Roche AG
 Roche Diagnostics GmbH
- <120> Nuevas formas de Dhidrogenasa de glucosa soluble dependiente de Pirroloquinolina Quinona
 <130> 19139 WO
 60 <140>
 <141>
 <150> EP 00123512.6
 <151> 2000-10-27
 <150> EP 00127294.7
 65 <151> 2000-12-19
 <160> 25

ES 2 370 812 T3

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 7

<212> PRT

5 <213> Acinetobacter calcoaceticus

<400> 1

Trp Pro Xaa Val Ala Pro Ser
1 5

10

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> Acinetobacter calcoaceticus

15

<400> 2

Thr Ala Gly Xaa Val Gln Lys
1 5

<210> 3

<211> 7

20 <212> PRT

<213> Acinetobacter calcoaceticus

<400> 3

Ala Asp Gly Xaa Asn Gly Leu
1 5

25

<210> 4

<211> 26

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

30

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador de sentido GF23

<400> 4

35 cgcgcacgcg catgccgccg atgttc 26

<210> 5

<211> 23

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

40

<220>

<223> Descripción de la secuencia Artificial: cebador de antisentido GR23

<400> 5

gacggccagt gaattctttt cta 23

<210> 6

45

<211> 20

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador de sentido GDH F2

50

<400> 6

ttaactgtct gaacagccgg 20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

55

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador de sentido GDH F3

<400> 7

gatgctgatg ggcagaatgg 20

ES 2 370 812 T3

<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial
5 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador de sentido GDH F4
<400> 8
atatgggtaa agtactacgc 20
<210> 9
10 <211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador de sentido GDH F5
15 <400> 9
acgatccaac ttgtggagag 20

<210> 10
<211> 20
20 <212> DNA
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador de antisentido GDH R1
<400> 10
25 cgattaagtt gggtaacgcc 20
<210> 11
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial
30 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador de antisentido GDH R2
<400> 11
atacggaaaa tgacaccacg 20
<210> 12
35 <211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador de antisentido GDH R3
40 <400> 12
gggccttgt cagactgcaa 20
<210> 13
<211> 20
<212> DNA
45 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador de antisentido GDH R4
<400> 13
caagacgacc tgactgatgg 20
50 <210> 14
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial
<220>
55 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador de antisentido GDH R5
<400> 14
cataacaacg cgtgcggctt 20
<210> 15
<211> 29
60 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador de sentido EGF
65 <400> 15
tccaacttgt ggannnatga cctacattt 29

<210> 16
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador de antisentido EGR
 <400> 16
 aaatgtaggt catnntcca caagttgga 29
 <210> 17
 10 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador de sentido TSF
 15 <400> 17
 catttgctgg ccannngtg caccgtcat 29
 <210> 18
 <211> 29
 <212> DNA
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador de antisentido TSR
 <400> 18
 atgacggtgc aacnnntggc cagcaaatg 29
 25 <210> 19
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 30 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador de sentido NHF
 <400> 19
 tactggttg gaannnecat tattggtc 29
 <210> 20
 <211> 29
 35 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador de antisentido NHR
 40 <400> 20
 gaaccaataa tgtnnttc caaccagta 29
 <210> 21
 <211> 29
 <212> DNA
 45 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador de sentido SNF
 <400> 21
 tgatgtgatt gcannccag atgggaatg 29
 50 <210> 22
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 55 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador de antisentido SNR
 <400> 22
 cattccatc tggnnngca atcacatca 29
 <210> 23
 <211> 1362
 60 <212> DNA
 <213> Acinetobacter calcoaceticus
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1362)
 65 <400> 23

ES 2 370 812 T3

gat	gtt	cct	cta	act	cca	tct	caa	ttt	gct	aaa	gcg	aaa	tca	gag	aac	48
Asp	Val	Pro	Leu	Thr	Pro	Ser	Gln	Phe	Ala	Lys	Ala	Lys	Ser	Glu	Asn	
1				5					10					15		
ttt	gac	aag	aaa	gtt	att	cta	tct	aat	cta	aat	aag	ccg	cac	gcg	ttg	96
Phe	Asp	Lys	Lys	Val	Ile	Leu	Ser	Asn	Leu	Asn	Lys	Pro	His	Ala	Leu	
			20					25					30			
tta	tgg	gga	cca	gat	aat	caa	att	tgg	tta	act	gag	cga	gca	aca	ggt	144
Leu	Trp	Gly	Pro	Asp	Asn	Gln	Ile	Trp	Leu	Thr	Glu	Arg	Ala	Thr	Gly	
		35					40					45				
aag	att	cta	aga	gtt	aat	cca	gag	tcg	ggt	agt	gta	aaa	aca	gtt	ttt	192
Lys	Ile	Leu	Arg	Val	Asn	Pro	Glu	Ser	Gly	Ser	Val	Lys	Thr	Val	Phe	
	50					55					60					
cag	gta	cca	gag	att	gtc	aat	gat	gct	gat	ggg	cag	aat	ggt	tta	tta	240
Gln	Val	Pro	Glu	Ile	Val	Asn	Asp	Ala	Asp	Gly	Gln	Asn	Gly	Leu	Leu	
65					70					75					80	

ES 2 370 812 T3

ggt ttt gcc ttc cat cct gat ttt aaa aat aat cct tat atc tat att	288
Gly Phe Ala Phe His Pro Asp Phe Lys Asn Asn Pro Tyr Ile Tyr Ile	
85 90 95	
tca ggt aca ttt aaa aat ccg aaa tct aca gat aaa gaa tta ccg aac	336
Ser Gly Thr Phe Lys Asn Pro Lys Ser Thr Asp Lys Glu Leu Pro Asn	
100 105 110	
caa acg att att cgt cgt tat acc tat aat aaa tca aca gat acg ctc	384
Gln Thr Ile Ile Arg Arg Tyr Thr Tyr Asn Lys Ser Thr Asp Thr Leu	
115 120 125	
gag aag cca gtc gat tta tta gca gga tta cct tca tca aaa gac cat	432
Glu Lys Pro Val Asp Leu Leu Ala Gly Leu Pro Ser Ser Lys Asp His	
130 135 140	
cag tca ggt cgt ctt gtc att ggg cca gat caa aag att tat tat acg	480
Gln Ser Gly Arg Leu Val Ile Gly Pro Asp Gln Lys Ile Tyr Tyr Thr	
145 150 155 160	
att ggt gac caa ggg cgt aac cag ctt gct tat ttg ttc ttg cca aat	528
Ile Gly Asp Gln Gly Arg Asn Gln Leu Ala Tyr Leu Phe Leu Pro Asn	
165 170 175	
caa gca caa cat acg cca act caa caa gaa ctg aat ggt aaa gac tat	576
Gln Ala Gln His Thr Pro Thr Gln Gln Glu Leu Asn Gly Lys Asp Tyr	
180 185 190	
cac acc tat atg ggt aaa gta cta cgc tta aat ctt gat gga agt att	624
His Thr Tyr Met Gly Lys Val Leu Arg Leu Asn Leu Asp Gly Ser Ile	
195 200 205	
cca aag gat aat cca agt ttt aac ggg gtg gtt agc cat att tat aca	672
Pro Lys Asp Asn Pro Ser Phe Asn Gly Val Val Ser His Ile Tyr Thr	
210 215 220	
ctt gga cat cgt aat ccg cag ggc tta gca ttc act cca aat ggt aaa	720
Leu Gly His Arg Asn Pro Gln Gly Leu Ala Phe Thr Pro Asn Gly Lys	
225 230 235 240	
tta ttg cag tct gaa caa ggc cca aac tct gac gat gaa att aac ctc	768
Leu Leu Gln Ser Glu Gln Gly Pro Asn Ser Asp Asp Glu Ile Asn Leu	
245 250 255	
att gtc aaa ggt ggc aat tat ggt tgg ccg aat gta gca ggt tat aaa	816
Ile Val Lys Gly Gly Asn Tyr Gly Trp Pro Asn Val Ala Gly Tyr Lys	
260 265 270	
gat gat agt ggc tat gct tat gca aat tat tca gca gca gcc aat aag	864
Asp Asp Ser Gly Tyr Ala Tyr Ala Asn Tyr Ser Ala Ala Ala Asn Lys	
275 280 285	
tca att aag gat tta gct caa aat gga gta aaa gta gcc gca ggg gtc	912
Ser Ile Lys Asp Leu Ala Gln Asn Gly Val Lys Val Ala Ala Gly Val	
290 295 300	

ES 2 370 812 T3

cct	gtg	acg	aaa	gaa	tct	gaa	tgg	act	ggt	aaa	aac	ttt	gtc	cca	cca	960
Pro	Val	Thr	Lys	Glu	Ser	Glu	Trp	Thr	Gly	Lys	Asn	Phe	Val	Pro	Pro	
305					310					315					320	
tta	aaa	act	tta	tat	acc	gtt	caa	gat	acc	tac	aac	tat	aac	gat	cca	1008
Leu	Lys	Thr	Leu	Tyr	Thr	Val	Gln	Asp	Thr	Tyr	Asn	Tyr	Asn	Asp	Pro	
				325					330					335		
act	tgt	gga	gag	atg	acc	tac	att	tgc	tgg	cca	aca	gtt	gca	ccg	tca	1056
Thr	Cys	Gly	Glu	Met	Thr	Tyr	Ile	Cys	Trp	Pro	Thr	Val	Ala	Pro	Ser	
			340					345					350			
tct	gcc	tat	gtc	tat	aag	ggc	ggt	aaa	aaa	gca	att	act	ggt	tgg	gaa	1104
Ser	Ala	Tyr	Val	Tyr	Lys	Gly	Gly	Lys	Lys	Ala	Ile	Thr	Gly	Trp	Glu	
		355					360						365			
aat	aca	tta	ttg	gtt	cca	tct	tta	aaa	cgt	ggt	gtc	att	ttc	cgt	att	1152
Asn	Thr	Leu	Leu	Val	Pro	Ser	Leu	Lys	Arg	Gly	Val	Ile	Phe	Arg	Ile	
	370					375					380					
aag	tta	gat	cca	act	tat	agc	act	act	tat	gat	gac	gct	gta	ccg	atg	1200
Lys	Leu	Asp	Pro	Thr	Tyr	Ser	Thr	Thr	Tyr	Asp	Asp	Ala	Val	Pro	Met	
385					390					395					400	
ttt	aag	agc	aac	aac	cgt	tat	cgt	gat	gtg	att	gca	agt	cca	gat	ggg	1248
Phe	Lys	Ser	Asn	Asn	Arg	Tyr	Arg	Asp	Val	Ile	Ala	Ser	Pro	Asp	Gly	
			405					410						415		
aat	gtc	tta	tat	gta	tta	act	gat	act	gcc	gga	aat	gtc	caa	aaa	gat	1296
Asn	Val	Leu	Tyr	Val	Leu	Thr	Asp	Thr	Ala	Gly	Asn	Val	Gln	Lys	Asp	
			420					425					430			
gat	ggc	tca	gta	aca	aat	aca	tta	gaa	aac	cca	gga	tct	ctc	att	aag	1344
Asp	Gly	Ser	Val	Thr	Asn	Thr	Leu	Glu	Asn	Pro	Gly	Ser	Leu	Ile	Lys	
		435					440					445				
ttc	acc	tat	aag	gct	aag											1362
Phe	Thr	Tyr	Lys	Ala	Lys											
			450													

<210> 24
 <211> 454
 5 <212> PRT
 <213> Acinetobacter calcoaceticus
 <400> 24

ES 2 370 812 T3

Asp Val Pro Leu Thr Pro Ser Gln Phe Ala Lys Ala Lys Ser Glu Asn
1 5 10 15

Phe Asp Lys Lys Val Ile Leu Ser Asn Leu Asn Lys Pro His Ala Leu
20 25 30

Leu Trp Gly Pro Asp Asn Gln Ile Trp Leu Thr Glu Arg Ala Thr Gly

ES 2 370 812 T3

	35						40					45			
Lys	Ile	Leu	Arg	Val	Asn	Pro	Glu	Ser	Gly	Ser	Val	Lys	Thr	Val	Phe
	50					55					60				
Gln	Val	Pro	Glu	Ile	Val	Asn	Asp	Ala	Asp	Gly	Gln	Asn	Gly	Leu	Leu
65					70					75					80
Gly	Phe	Ala	Phe	His	Pro	Asp	Phe	Lys	Asn	Asn	Pro	Tyr	Ile	Tyr	Ile
				85					90					95	
Ser	Gly	Thr	Phe	Lys	Asn	Pro	Lys	Ser	Thr	Asp	Lys	Glu	Leu	Pro	Asn
			100					105					110		
Gln	Thr	Ile	Ile	Arg	Arg	Tyr	Thr	Tyr	Asn	Lys	Ser	Thr	Asp	Thr	Leu
		115					120						125		
Glu	Lys	Pro	Val	Asp	Leu	Leu	Ala	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Lys	Asp	His
	130					135					140				
Gln	Ser	Gly	Arg	Leu	Val	Ile	Gly	Pro	Asp	Gln	Lys	Ile	Tyr	Tyr	Thr
145					150					155					160
Ile	Gly	Asp	Gln	Gly	Arg	Asn	Gln	Leu	Ala	Tyr	Leu	Phe	Leu	Pro	Asn
				165					170					175	
Gln	Ala	Gln	His	Thr	Pro	Thr	Gln	Gln	Glu	Leu	Asn	Gly	Lys	Asp	Tyr
			180						185				190		
His	Thr	Tyr	Met	Gly	Lys	Val	Leu	Arg	Leu	Asn	Leu	Asp	Gly	Ser	Ile
		195					200					205			
Pro	Lys	Asp	Asn	Pro	Ser	Phe	Asn	Gly	Val	Val	Ser	His	Ile	Tyr	Thr
	210					215						220			
Leu	Gly	His	Arg	Asn	Pro	Gln	Gly	Leu	Ala	Phe	Thr	Pro	Asn	Gly	Lys
225				230						235					240
Leu	Leu	Gln	Ser	Glu	Gln	Gly	Pro	Asn	Ser	Asp	Asp	Glu	Ile	Asn	Leu
				245					250					255	
Ile	Val	Lys	Gly	Gly	Asn	Tyr	Gly	Trp	Pro	Asn	Val	Ala	Gly	Tyr	Lys
			260					265					270		
Asp	Asp	Ser	Gly	Tyr	Ala	Tyr	Ala	Asn	Tyr	Ser	Ala	Ala	Ala	Asn	Lys
		275					280					285			
Ser	Ile	Lys	Asp	Leu	Ala	Gln	Asn	Gly	Val	Lys	Val	Ala	Ala	Gly	Val
	290					295					300				
Pro	Val	Thr	Lys	Glu	Ser	Glu	Trp	Thr	Gly	Lys	Asn	Phe	Val	Pro	Pro
305					310					315					320
Leu	Lys	Thr	Leu	Tyr	Thr	Val	Gln	Asp	Thr	Tyr	Asn	Tyr	Asn	Asp	Pro
				325					330					335	

ES 2 370 812 T3

Thr Cys Gly Glu Met Thr Tyr Ile Cys Trp Pro Thr Val Ala Pro Ser
 340 345 350

Ser Ala Tyr Val Tyr Lys Gly Gly Lys Lys Ala Ile Thr Gly Trp Glu
 355 360 365

Asn Thr Leu Leu Val Pro Ser Leu Lys Arg Gly Val Ile Phe Arg Ile
 370 375 380

Lys Leu Asp Pro Thr Tyr Ser Thr Thr Tyr Asp Asp Ala Val Pro Met
 385 390 395 400

Phe Lys Ser Asn Asn Arg Tyr Arg Asp Val Ile Ala Ser Pro Asp Gly
 405 410 415

Asn Val Leu Tyr Val Leu Thr Asp Thr Ala Gly Asn Val Gln Lys Asp
 420 425 430

Asp Gly Ser Val Thr Asn Thr Leu Glu Asn Pro Gly Ser Leu Ile Lys
 435 440 445

Phe Thr Tyr Lys Ala Lys
 450

- 5 <210> 25
- <211> 4373
- <212> DNA
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- 10 <223> Descripción de la secuencia artificial: vector pACSGDH
- <400> 25

ES 2 370 812 T3

```

cactaactga ttacgcaccg catgtaaccg ttttcaatct gtgagtaaat tcacagttta 60
ttaacattgt gatagctatg atgacaacgt ttgtcgcact gtaactaacg tgtaacagtt 120
agttgtcagt tttgctgggg tatttcgctt ataaaaaccg ttatcacaat atcccgcgac 180
taccggacaa aaataaagag ttgaataaga gcttatccca ttagggctat tttacttgcc 240
atthttggacc tgggcagtgc tcgccaaaac gcgttagcgt tttgaacgcg ctagcggcgg 300
cccgaagggc gagcgtagcg agtcaaacct cacgtactac gtgtacgctc cggthttttgc 360
gcgctgtccg tgtccaaact gctgcgccaa taacgcctgg tgggataggc tctaaatacg 420
cttcggcggt cagtaacacg cgttaacgtg ctgaacagcc gggcattttt ttacgctata 480
ccctacataa taaaaccgga gctaccatga ataagaaggt actgaccctt tctgccgtga 540
tggcaagtct gttattcggc gcgcacgcgc atgccgccga tgttcctcta actccatctc 600
aatttgctaa agcgaatca gagaactttg acaagaaagt tattctatct aatctaaata 660
agccgcacgc gttgttatgg ggaccagata atcaaatttg gttaactgag cgagcaacag 720
gtaagattct aagagttaat ccagagtcgg gtagtgtaaa aacagthttt caggtaccag 780
agattgtcaa tgatgctgat gggcagaatg gtttattagg thttgccttc catcctgatt 840
ttaaaaataa tccttatatc tatatttcag gtacatttaa aaatccgaaa tctacagata 900
aagaattacc gaaccaaacg attattcgtc gttataccta taataaatca acagatacgc 960
tcgagaagcc agtcgattta ttagcaggat taccttcac caaaagaccat cagtcaggtc 1020
gtcttgtcat tgggccagat caaaagattt attatacgat tggtgaccaa gggcgtaacc 1080
agcttgctta tttgttcttg ccaaatcaag cacaacatac gccaaactcaa caagaactga 1140

```

5

10

15

20

ES 2 370 812 T3

atggtaaaga ctatcacacc tatatgggta aagtactacg cttaaatoctt gatggaagta 1200
ttccaaagga taatccaagt tttaacgggg tggtagcca tattataca cttggacatc 1260
gtaatccgca gggcttagca ttcactccaa atggtaaatt attgcagtct gaacaaggcc 1320
caaaactctga cgatgaaatt aacctcattg tcaaagggtg caattatggt tggccgaatg 1380
tagcaggtta taaagatgat agtggctatg cttatgcaaa ttattcagca gcagccaata 1440
agtcaattaa ggatttagct caaaatggag taaaagtagc cgcaggggtc cctgtgacga 1500
aagaatctga atggactggt aaaaactttg tcccaccatt aaaaacttta tataccgttc 1560
aagataccta caactataac gatccaactt gtggagagat gacctacatt tgctggccaa 1620
cagttgcacc gtcactctgcc tatgtctata agggcggtaa aaaagcaatt actggttggg 1680
aaaatacatt attggttcca tctttaaaac gtggtgtcat tttccgtatt aagttagatc 1740
caacttatag cactacttat gatgacgctg taccgatgtt taagagcaac aaccgttatc 1800
gtgatgtgat tgcaagtcca gatgggaatg tcttatatgt attaactgat actgccggaa 1860
atgtccaaaa agatgatggc tcagtaacaa atacattaga aaaccagga tctctcatta 1920
agttcaccta taaggctaag taatacagtc gcattaaaaa accgatctat aaagatcggg 1980
tttttagtt ttagaaaaga attcactggc cgtcgtttta caacgtcgtg actgggaaaa 2040
ccctggcggt acccaactta atcgccttgc agcacatccc cctttcgcca gctggcgtaa 2100
tagcgaagag gcccgaccg atcgccttcc ccaacagttg cgcagcctga atggcgaatg 2160
gcgctgatg cggtattttc tccttacgca tctgtgcggg atttcacacc gcataatggg 2220
cactctcagt acaatctgct ctgatgccgc atagttaagc cagccccgac acccgccaac 2280
accgctgac gcgccctgac gggcttgtct gctcccggca tccgcttaca gacaagctgt 2340
gaccgtctcc gggagctgca tgtgtcagag gttttcaccg tcatcaccga aacgcgcgag 2400
acgaaagggc ctcgtgatac gcctattttt ataggttaat gtcatagata taatggtttc 2460
ttagacgtca ggtggcactt ttcggggaaa tgtgcgcgga accctatatt gtttattttt 2520
ctaaatacat tcaaatatgt atccgctcat gagacaataa ccctgataaa tgcttcaata 2580
atattgaaaa aggaagagta tgagtattca acatttccgt gtcgcoctta tcccttttt 2640
tgccgcatth tgcccttctg tttttgctca cccagaaacg ctggtgaaag taaaagatgc 2700
tgaagatcag ttgggtgcac gagtgggta catcgaaact gatctcaaca gcggtaagat 2760
ccttgagagt tttcgccccg aagaacgtht tccaatgatg agcactttta aagttctgct 2820
atgtggcgcg gtattatccc gtattgacgc cgggcaagag caactcggtc gccgcataca 2880
ctattctcag aatgacttgg ttgagtactc accagtcaca gaaaagcatc ttacggatgg 2940
catgacagta agagaattat gcagtgtctc cataaccatg agtgataaca ctgcccga 3000
cttacttctg acaacgatcg gaggaccgaa ggagctaacc gcttttttgc acaacatggg 3060
ggatcatgta actcgccttg atcgttggga accggagctg aatgaagcca taccaaacga 3120
cgagcgtgac accacgatgc ctgtagcaat ggcaacaacg ttgcaaacac tattaactgg 3180
cgaactactt actctagctt cccggcaaca ataatagac tggatggagg cggataaagt 3240
tgcaggacca ctctctgcct cggcccttcc ggctggctgg tttattgctg ataaatctgg 3300
agccggtgag cgtgggtctc gcggtatcat tgcagcactg gggccagatg gtaagccctc 3360
ccgtatcgta gttatctaca cgacggggag tcaggcaact atggatgaac gaaatagaca 3420
gatcgtgag ataggtgcct cactgattaa gcattggtaa ctgtcagacc aagtttactc 3480
atatatactt tagattgatt taaaacttca tttttaattt aaaaggatct aggtgaagat 3540
cctttttgat aatctcatga ccaaaatccc ttaacgtgag ttttcgctcc actgagcgtc 3600
agaccccgta gaaaagatca aaggatcttc ttgagatcct tttttctgc gcgtaactctg 3660
ctgcttgcaa acaaaaaaac caccgctacc agcgggtggt tgtttgccgg atcaagagct 3720
accaactctt tttccgaagg taactggctt cagcagagcg cagataccaa atactgtcct 3780
tctagtgtag ccgtagttag gccaccactt caagaactct gtagcaccgc ctacatacct 3840
cgctctgcta atcctgttac cagtggctgc tgccagtggc gataagtcgt gtcttaccgg 3900
gttgactca agacgatagt taccggataa ggcgcagcgg tcgggctgaa cgggggggtc 3960
gtgcacacag cccagcttgg agcgaacgac ctacaccgaa ctgagatacc tacagcgtga 4020
gctatgagaa agcgcaccgc tccccgaagg gagaaaggcg gacaggtatc cggtaaagcg 4080
cagggctcga acaggagagc gcacgagggg gcttccaggg ggaaacgcct ggtatcttta 4140
tagtctctgc gggtttcgcc acctctgact tgagcgtcga tttttgtgat gctcgtcagg 4200
ggggcgagc ctatggaaaa acgccagcaa cgcggccttt ttacggttcc tggccttttg 4260
ctggcctttt gctcacatgt tctttcctgc gttatcccct gattctgtgg ataaccgat 4320
taccgccttt gagtgagctg ataccgctcg ccgcagccga acgacggggc cgg 4373

REIVINDICACIONES

1. Mutante de forma soluble de EC 1,199,17, también conocida como dehidrogenasa de glucosa soluble dependiente de PQQ (s-GDH) estando caracterizado dicho mutante porque, con respecto a la enzima de tipo natural correspondiente y con respecto, como mínimo, a otro sustrato de azúcar seleccionado, tiene, como mínimo dos veces, una mayor especificidad de sustrato incrementada, para la glucosa, de manera que dicha mejora de la especificidad se calcula de acuerdo con la fórmula:

$$\text{especificidad (mejora)} = \frac{\text{actividad mutante glucosa} \quad \text{actividad azúcar seleccionado tipo natural}}{\text{actividad glucosa tipo natural} \quad \text{actividad mutante azúcar seleccionado}}$$

en la que dicho mutante comprende una sustitución de residuo de aminoácido en la posición de aminoácido correspondiente a la posición 348 de la secuencia de tipo natural de s-GDH conocida desde *A. Calcoaceticus* (SEQ ID NO: 24).

2. Mutante, según la reivindicación 1, caracterizado además porque dicho azúcar seleccionado es seleccionado del grupo que consiste en maltosa y galactosa.

3. Mutante, según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado además porque dicho azúcar seleccionado es maltosa.

4. Mutante de s-GDH dependiente de PQQ, según la reivindicación 1, caracterizado además porque dicha especificidad del sustrato para la glucosa es mejorada, como mínimo, 3 veces.

5. Mutante de s-GDH dependiente de PQQ, según la reivindicación 1, caracterizado además porque dicha especificidad del sustrato para la glucosa es mejorada, como mínimo, 5 veces.

6. Mutante de s-GDH dependiente de PQQ, según la reivindicaciones 1 a 5, caracterizado además porque la s-GDH de tipo natural es aislada de una cepa del grupo de la especie *Acinetobacter* que consiste en *A. calcoaceticus* y *A. baumannii*.

7. Proteína mutante de s-GDH dependiente de PQQ, según la reivindicaciones 1 a 6, cuyo mutante comprende, como mínimo, otra sustitución del residuo de aminoácido en las posiciones de aminoácido correspondiente con las posiciones de la secuencia de tipo natural del s-GDH conocida de *A. calcoaceticus* (SEQ ID NO: 24), siendo seleccionadas dichas posiciones de aminoácidos sustituidos del grupo que consiste en las posiciones 16, 22, 76, 116, 120, 127, 143, 168, 169, 171, 177, 227, 230, 231, 245, 255, 277, 295, 299, 308, 317, 341, 349, 355, 422, 428 y 438.

8. Mutante, según la reivindicación 7, caracterizado además porque, como mínimo uno de los siguientes residuos de aminoácidos 16, 116, 120, 127, 169, 171, 177, 227, 255, 277, 299, 317, 355 y 438 está sustituido.

9. Proteína mutante, según la reivindicación 7, que comprende sustituciones de los residuos de aminoácidos en las posiciones 348 y 428.

10. Proteína mutante de s-GDH dependiente de PQQ, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, comprendiendo el mutante, como mínimo, 3 sustituciones de residuos de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos correspondientes a las posiciones de la secuencia de tipo natural de s-GDH conocida de *A. calcoaceticus* (SEQ ID NO: 24) siendo seleccionadas dichas posiciones de aminoácidos sustituidos del grupo que consiste en las posiciones 171, 227, 230, 245, 341, 348, 349, y 428, en el que ambos residuos de aminoácido T348 y N428 están sustituidos.

11. Mutante, según la reivindicación 9 ó 10, caracterizado además porque la asparagina en la posición 428 está sustituida por un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en ofleucina, prolina y valina.

12. Mutante, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizada además porque la treonina en posición 348 está sustituida por un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en alanina, glicina, y serina.

13. Proteína mutante de s-GDH dependiente de PQQ, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, comprendiendo el mutante la secuencia de aminoácido de WPXaaVAPS (SEQ ID NO: 1), en la que dicho residuo Xaa es un residuo de aminoácido distinto de treonina.

14. Proteína mutante, según la reivindicación 13, caracterizada además porque dicho residuo Xaa es glicina.

15. Proteína mutante de s-GDH dependiente de PQQ, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, comprendiendo el mutante la secuencia de aminoácido TAGXaaVQK (SEQ ID NO: 2), en el que dicho residuo Xaa es un residuo de aminoácido distinto de asparagina.

16. Proteína mutante, según la reivindicación 15, caracterizada además porque dicho residuo Xaa es prolina.
- 5 17. Proteína mutante de s-GDH dependiente de PQQ, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, comprendiendo el mutante la secuencia de aminoácido ADGXaaNGL (SEQ ID NO: 3), en el que dicho residuo Xaa es un residuo de aminoácido distinto de asparagina.
- 10 18. Mutante, según la reivindicación 17, caracterizada además porque dicho residuo Xaa es seleccionado entre el grupo que consiste en ácido aspártico, ácido glutámico, metionina, prolina, serina, alanina, o glicina.
- 15 19. Polinucleótido aislado que codifica al proteína mutante de s-GDH, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16.
- 20 20. Vector de expresión, que comprende un polinucleótido aislado, según la reivindicación 19 enlazado operativamente a una secuencia promotora capaz de promover la expresión de dicho polinucleótido en una célula huésped.
- 25 21. Célula huésped que comprende el vector de expresión de la reivindicación 20.
- 30 22. Procedimiento para la producción de variantes de s-GDH que comprende el cultivo de la célula huésped de la reivindicación 21, en condiciones apropiadas para la producción de las variantes de enzima.
- 35 23. Vector de expresión que comprende un polinucleótido aislado, según la reivindicación 20, enlazado operativamente a una secuencia promotora capaz de promover suexpresión en un sistema de síntesis de péptido libre de células.
- 40 24. Procedimiento para la producción de variantes de s-GDH con el constructo de la reivindicación 23, en un sistema de síntesis de péptido libre de células, en las condiciones adecuadas para la producción de dichas variantes de la enzima.
25. Método de detección, determinación, o medición de glucosa en una muestra utilizando mutante de s-GDH, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, comprendiendo dicha mejora el contacto de la muestra con el mutante.
26. Procedimiento, según la reivindicación 25, caracterizado además porque dicha detección, determinación, o medición de la glucosa es llevada a cabo utilizando un sensor o un dispositivo de banda de pruebas.
27. Dispositivo para la detección o medición de glucosa en una muestra que comprende un mutante de s-GDH, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, y otros reactivos requeridos para dicha medición.

Figura 1: ADN y secuencia de proteínas de s-GDH A. Calcoaceticus (sin péptido señal)

```

1 GATGTTCTCTAACTCCATCTCAATTTGCTAAAGCGAAATCAGAGAACTT 50
  |||
1 AspValProLeuThrProSerGlnPheAlaLysAlaLysSerGluAsnPh 17

51 TGACAAGAAAGTTATTCTATCTAATCTAAATAAGCCGCACGCGTTGTTAT 100
  |||
18 eAspLysLysValIleLeuSerAsnLeuAsnLysProHisAlaLeuLeuT 34

101 GGGGACCAGATAATCAAATTTGGTTAACTGAGCGAGCAACAGGTAAGATT 150
  |||
35 rpGlyProAspAsnGlnIleTrpLeuThrGluArgAlaThrGlyLysIle 50

151 CTAAGAGTTAATCCAGAGTCGGGTAGTGTA AAAACAGTTTTTCAGGTACC 200
  |||
51 LeuArgValAsnProGluSerGlySerValLysThrValPheGlnValPr 67

201 AGAGATTGTCAATGATGCTGATGGGCAGAATGGTTTATTAGGTTTGCCT 250
  |||
68 oGluIleValAsnAspAlaAspGlyGlnAsnGlyLeuLeuGlyPheAlaP 84

251 TCCATCCTGATTTTAAAAATAATCCTTATATCTATATTTTCAGGTACATT 300
  |||
85 heHisProAspPheLysAsnAsnProTyrIleTyrIleSerGlyThrPhe 100

301 AAAAATCCGAAATCTACAGATAAAGAATTACCGAACCAAACGATTATTCG 350
  |||
101 LysAsnProLysSerThrAspLysGluLeuProAsnGlnThrIleIleAr 117

351 TCGTTATACCTATAATAAATCAACAGATACGCTCGAGAAGCCAGTCGATT 400
  |||
118 gArgTyrThrTyrAsnLysSerThrAspThrLeuGluLysProValAspL 134

401 TATTAGCAGGATTACCTTCATCAAAGACCATCAGTCAGGTCGTCTTGTC 450
  |||
135 euLeuAlaGlyLeuProSerSerLysAspHisGlnSerGlyArgLeuVal 150

451 ATTGGGCCAGATCAAAAGATTTATTATACGATTGGTGACCAAGGGCGTAA 500
  |||
151 ileGlyProAspGlnLysIleTyrTyrThrIleGlyAspGlnGlyArgAs 167

501 CCAGCTTGCTTATTTGTTCTTGCCAAATCAAGCACAACATACGCCAACTC 550
  |||
168 nGlnLeuAlaTyrLeuPheLeuProAsnGlnAlaGlnHisThrProThrg 184

551 AACAGAAGTGAATGGTAAAGACTATCACACCTATATGGGTAAAGTACTA 600
  |||
185 lnGlnGluLeuAsnGlyLysAspTyrHisThrTyrMetGlyLysValLeu 200

601 CGCTTAAATCTTGATGGAAGTATTCCAAAGGATAATCCAAGTTTAAACGG 650
  |||
201 ArgLeuAsnLeuAspGlySerIleProLysAspAsnProSerPheAsnGl 217

651 GGTGGTTAGCCATATTTATACACTTGGACATCGTAATCCGCAGGGCTTAG 700
  |||
218 yValValSerHisIleTyrThrLeuGlyHisArgAsnProGlnGlyLeuA 234

701 CATCACTCCAAATGGTAAATATTGTCAGTCTGAACAAGGCCCAAACCTCT 750
  |||
235 laPheThrProAsnGlyLysLeuLeuGlnSerGluGlnGlyProAsnSer 250

```


Figura 1: continuación (segunda y última página)

```

751 GACGATGAAATTAACCTCATTGTCAAAGGTGGCAATTATGGTTGGCCGAA 800
   |||
251 AspAspGluIleAsnLeuIleValLysGlyGlyAsnTyrGlyTrpProAs 267
   .
801 TGTAGCAGGTTATAAAGATGATAGTGGCTATGCTTATGCAAATTATTCAG 850
   |||
268 nValAlaGlyTyrLysAspAspSerGlyTyrAlaTyrAlaAsnTyrSerA 284
   .
851 CAGCAGCCAATAAGTCAATTAAGGATTTAGCTCAAAATGGAGTAAAAGTA 900
   |||
285 laAlaAlaAsnLysSerIleLysAspLeuAlaGlnAsnGlyValLysVal 300
   .
901 GCCGCAGGGTCCCTGTGACGAAAGAATCTGAATGGACTGGTAAAAACTT 950
   |||
301 AlaAlaGlyValProValThrLysGluSerGluTrpThrGlyLysAsnPh 317
   .
951 TGTCACCATTAAAACTTTATATACCGTTCAAGATACCTACAATA 1000
   |||
318 eValProProLeuLysThrLeuTyrThrValGlnAspThrTyrAsnTyrA 334
   .
1001 ACGATCCAACCTTGTGGAGAGATGACCTACATTTGCTGGCCAACAGTTGCA 1050
   |||
335 snAspProThrCysGlyGluMetThrTyrIleCysTrpProThrValAla 350
   .
1051 CCGTCATCTGCCTATGTCTATAAGGGCGGTAAAAAAGCAATTACTGGTTG 1100
   |||
351 ProSerSerAlaTyrValTyrLysGlyGlyLysLysAlaIleThrGlyTr 367
   .
1101 GGAAAATACATTATTGGTTCCATCTTTAAAACGTGGTGTCAATTTCCGTA 1150
   |||
368 pGluAsnThrLeuLeuValProSerLeuLysArgGlyValIlePheArgI 384
   .
1151 TTAAGTTAGATCCAACCTATAGCACTACTTATGATGACGCTGTACCGATG 1200
   |||
385 leLysLeuAspProThrTyrSerThrThrTyrAspAspAlaValProMet 400
   .
1201 TTTAAGAGCAACAACCGTTATCGTGATGTGATTGCAAGTCCAGATGGGAA 1250
   |||
401 PheLysSerAsnAsnArgTyrArgAspValIleAlaSerProAspGlyAs 417
   .
1251 TGTCTTATATGTATTAAGTACTGACTGCCGAAATGTCCAAAAGATGATG 1300
   |||
418 nValLeuTyrValLeuThrAspThrAlaGlyAsnValGlnLysAspAspG 434
   .
1301 GCTCAGTAACAAATACATTAGAAAACCCAGGATCTCTCATTAAGTTCACC 1350
   |||
435 lySerValThrAsnThrLeuGluAsnProGlySerLeuIleLysPheThr 450
   .
1351 TATAAGGCTAAG 1362
   |||
451 TyrLysAlaLys 454

```

Figura 2: secuencias de aminoácidos de *A. calcoaceticus* (arriba) y *A. Baumannii* (abajo)

```

1 DVPLTPSQFAKAKSENFDKKVIILSNLNKPHALLWGPDNQIWLTERATGKI 50
|:|||||.|||||.|||||
1 DIPLTPAQFAKAKTENFDKKVILSNLNKPHALLWGPDNQIWLTERATGKI 50

51 LRVNPESGSVKTVPQVPEIVNDADGQNGLLGFAPHPDFKHNPHYIYISGTF 100
||||| ||| |||||.|||||
51 LRVNPVSGSAKTVPQVPEIVSDADGQNGLLGFAPHPDFKHNPHYIYISGTF 100

101 KNPKSTDKELPNQTIIRRYTYNKSTDTLEKPVDLLAGLPSSKDHQSGRLV 150
||||| |||||.||| |||:|:|
101 KNPKSTDKELPNQTIIRRYTYNKTTDTFEKPIDLIAGLPSSKDHQSGRLV 150

151 IGPDQKIYYTIGDQGRNQLAYLFLPNQAQHTPTQQELNGKDYHTYMGKVL 200
||||| ||||| |||||
151 IGPDQKIYYTIGDQGRNQLAYLFLSNQAQHTPTQQELNSKDYHTYMGKVL 200

201 RLNLDGSI PKDNPSFNGVVSHIYTLGHRNPQGLAFTPNGKLLQSEQGPNS 250
||||| ||||| |||||
201 RLNLDGSI PKDNPSFNGVVSHIYTLGHRNPQGLAFAPNGKLLQSEQGPNS 250

251 DDEINLIVKGGNYGWPVAVAGYKDDSGYAYANYSAANKS.IKDLAONGVK 299
|||||:|||||
251 DDEINLVKGGNYGWPVAVAGYKDDSGYAYANYSAATNKSQIKDLAONGIK 300

300 VAAGVPVTKESEWTGKNFVPLKTLTYVQDTYNYNDPTCGEMTYICWPTV 349
|| |||||
301 VATGVPVTKESEWTGKNFVPLKTLTYVQDTYNYNDPTCGEMAYICWPTV 350

350 APSSAYVYKGGKAI TGWENTLLVPSLKRGVIFRIKLDPTYSTTYDDAVP 399
||||| ||||| |||||
351 APSSAYVYTGKKAIPGWENTLLVPSLKRGVIFRIKLDPTYSTTLDDAIP 400

400 MFKSNNRYRDVIASPDGNVLYVLTDTAGNVQKDDGSVTNTLENPGSLIKF 449
||||| |||||:||
401 MFKSNNRYRDVIASPEGNTLYVLTDTAGNVQKDDGSVTHNTLENPGSLIKF 450

450 TYKAK 454
|||
451 TYNGK 455

```

Figura 3: Diagrama esquemático del plásmido con gen para s-GDH (pACSGDH)

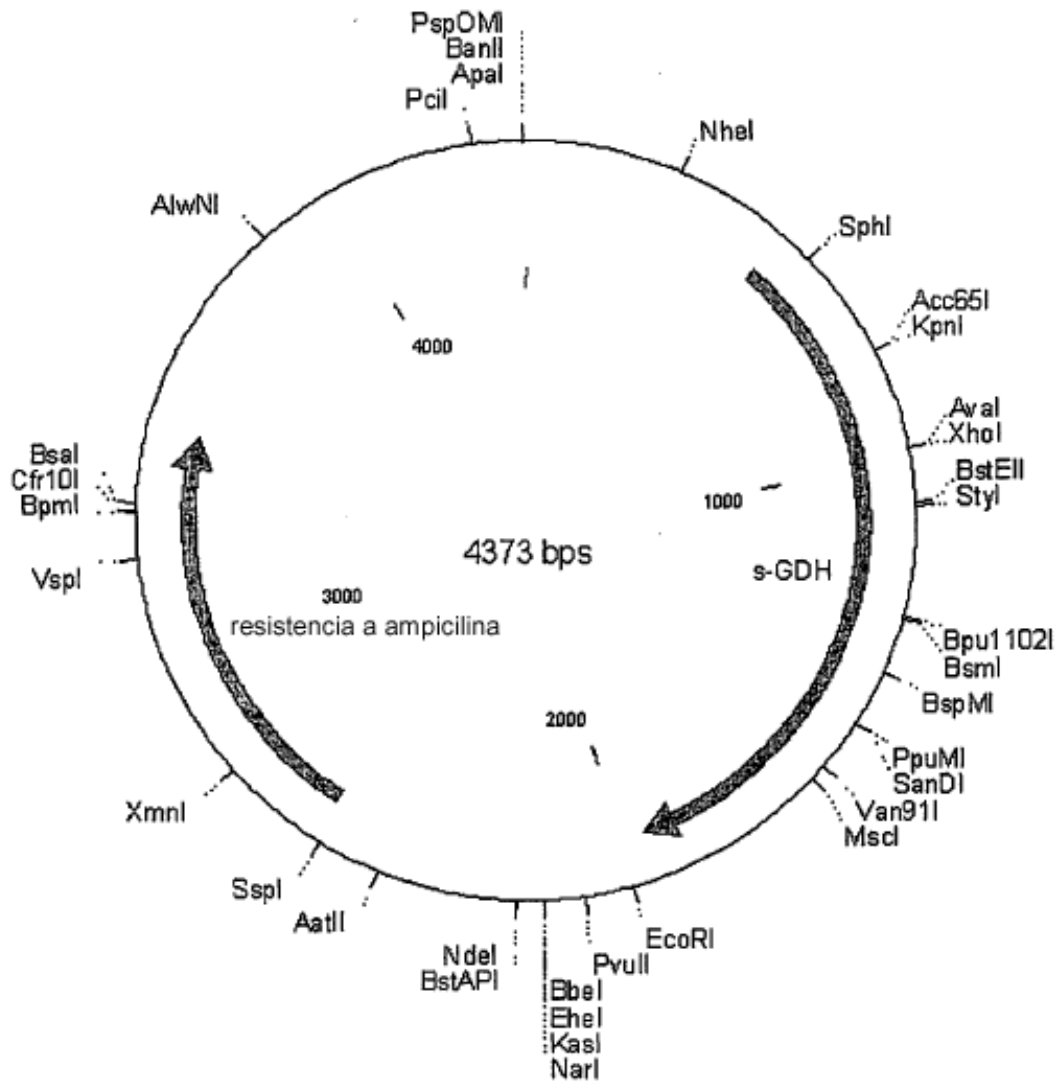


Figura 4: secuencia de nucleótido (ADN) del vector de pASCGDH

```

1  CACTAACTGA TTACGCACCG CATGTAACCG TTTTCAATCT GTGAGTAAAT
51  TCACAGTTTA TTAACATTGT GATAGCTATG ATGACAACGT TTGTCGCACT
101 GTAACTAACG TGTAACAGTT AGTTGTCAGT TTTGCTGGGG TATTTGCTT
151 ATAAAAACCG TTATCACAAT ATCCCGCGAC TACCGGACAA AAATAAAGAG
201 TTGAATAAGA GCTTATCCCA TTAGGGCTAT TTTACTTGCC ATTTTGGACC
251 TGGGCAGTGC TCGCCAAAAC GCGTTAGCGT TTTGAACGCG CTAGCGGGCG
301 CCCGAAGGGC GAGCGTAGCG AGTCAAACCT CACGTACTAC GTGTACGCTC
351 CGGTTTTTGC GCGCTGTCCG TGTCCAAACT GCTGCGCCAA TAACGCCTGG
401 TGGGATAGGC TCTAAATACG CTTGCGCGTT CAGTAACACG CGTTAACGTG
451 CTGAACAGCC GGGCATT'TTT TTACGCTATA CCCTACATAA TAAAACCGGA
501 GCTACCATGA ATAAGAAGGT ACTGACCCTT TCTGCCGTGA TGGCAAGTCT
551 GTTATTCGGC GCGCACGCGC ATGCCGCCGA TGTTCTCTA ACTCCATCTC
601 AATTTGCTAA AGCGAAATCA GAGAACTTTG ACAAGAAAGT TATTCTATCT
651 AATCTAAATA AGCCGCACGC GTTGTATGG GGACCAGATA ATCAAATTTG
701 GTTAACTGAG CGAGCAACAG GTAAGATTCT AAGAGTTAAT CCAGAGTCGG
751 GTAGTGTAAG AACAGTTTTT CAGGTACCAG AGATTGTCAA TGATGCTGAT
801 GGGCAGAATG GTTTATTAGG TTTTGCCTTC CATCCTGATT TAAAAAATAA
851 TCCTTATATC TATATTCAG GTACATTTAA AAATCCGAAA TCTACAGATA
901 AAGAATTACC GAACCAAACG ATTATTCGTC GTTATACCTA TAATAAATCA
951 ACAGATACGC TCGAGAAGCC AGTCGATTTA TTAGCAGGAT TACCTTCATC
1001 AAAAGACCAT CAGTCAGGTC GTCTTGTCAT TGGGCCAGAT CAAAAGATTT
1051 ATTATACGAT TGGTGACCAA GGGCGTAACC AGCTTGCTTA TTTGTTCTTG
1101 CCAAATCAAG CACAACATAC GCCAACTCAA CAAGAAGTGA ATGGTAAAGA
1151 CTATCACACC TATATGGGTA AAGTACTACG CTTAAATCTT GATGGAAGTA
1201 TTCCAAAGGA TAATCCAAGT TTTAACGGGG TGGTTAGCCA TATTTATACA
1251 CTTGGACATC GTAATCCGCA GGGCTTAGCA TTTACTCCAA ATGGTAAATT
1301 ATTGCAGTCT GAACAAGGCC CAAACTCTGA CGATGAAATT AACCTCATTG
1351 TCAAAGGTGG CAATTATGGT TGGCCGAATG TAGCAGGTTA TAAAGATGAT
1401 AGTGGCTATG CTTATGCAAA TTATTCAGCA GCAGCCAATA AGTCAATTA
1451 GGATTTAGCT CAAAATGGAG TAAAAGTAGC CGCAGGGGTC CCTGTGACGA
1501 AAGAATCTGA ATGGACTGGT AAAAACTTTG TCCCACCATT AAAAACTTTA

```

Figura 4: continuación (dos de tres páginas)

1551 TATACCGTTC AAGATACCTA CAACTATAAC GATCCAACCTT GTGGAGAGAT
 1601 GACCTACATT TGCTGGCCAA CAGTTGCACC GTCATCTGCC TATGTCTATA
 1651 AGGGCGGTAA AAAAGCAATT ACTGGTTGGG AAAATACATT ATTGGTTCCA
 1701 TCTTTAAAAC GTGGTGTGAT TTCCGTATT AAGTTAGATC CAACTTATAG
 1751 CACTACTTAT GATGACGCTG TACCGATGTT TAAGAGCAAC AACCGTTATC
 1801 GTGATGTGAT TGCAAGTCCA GATGGGAATG TCTTATATGT ATTAAGTATG
 1851 ACTGCCGGAA ATGTCCAAA AGATGATGGC TCAGTAACAA ATACATTAGA
 1901 AAACCCAGGA TCTCTCATT AGTTCACCTA TAAGGCTAAG TAATACAGTC
 1951 GCATTAAAA ACCGATCTAT AAAGATCGGT TTTTPTAGTT TTAGAAAAGA
 2001 ATTCACTGGC CGTCGTTTCA CAACGTCGTG ACTGGGAAAA CCCTGGCGTT
 2051 ACCCAACTTA ATCGCCTGC AGCACATCCC CCTTTCGCCA GCTGGCGTAA
 2101 TAGCGAAGAG GCCCGCACCG ATCGCCCTTC CCAACAGTTG CGCAGCCTGA
 2151 ATGGCGAATG GCGCCTGATG CGGTATTTTC TCCTTACGCA TCTGTGCGGT
 2201 ATTTACACCC GCATATGGTG CACTCTCAGT ACAATCTGCT CTGATGCCGC
 2251 ATAGTTAAGC CAGCCCCGAC ACCCGCCAAC ACCCGCTGAC GCGCCCTGAC
 2301 GGGCTTGTCT GCTCCCGGCA TCCGCTTACA GACAAGCTGT GACCGTCTCC
 2351 GGGAGCTGCA TGTGTCAGAG GTTTTCACCG TCATCACCGA AACCGCGAG
 2401 ACGAAAGGGC CTCGTGATAC GCCTATTTTT ATAGGTTAAT GTCATGATAA
 2451 TAATGGTTTC TTAGACGTCA GGTGGCACTT TTCGGGGAAA TGTGCGCGGA
 2501 ACCCCTATTT GTTTATTTTT CTAAATACAT TCAAATATGT ATCCGCTCAT
 2551 GAGACAATAA CCCTGATAAA TGCTTCAATA ATATTGAAAA AGGAAGAGTA
 2601 TGAGTATTCA ACATTTCCGT GTCGCCCTTA TTCCCTTTTT TGCGGCATT
 2651 TGCCTTCTG TTTTGTCTCA CCCAGAAACG CTGGTGAAAG TAAAAGATGC
 2701 TGAAGATCAG TTGGGTGCAC GAGTGGGTTA CATCGAACTG GATCTCAACA
 2751 GCGGTAAGAT CCTTGAGAGT TTTCGCCCG AAGAACGTTT TCCAATGATG
 2801 AGCACTTTTA AAGTCTGCT ATGTGGCGCG GTATTATCCC GTATTGACGC
 2851 CGGGCAAGAG CAACTCGGTC GCGCATACA CTATTCTCAG AATGACTTGG
 2901 TTGAGTACTC ACCAGTCACA GAAAAGCATC TTACGGATGG CATGACAGTA
 2951 AGAGAATTAT GCAGTGCTGC CATAACCATG AGTGATAACA CTGCGGCCAA
 3001 CTTACTTCTG ACAACGATCG GAGGACCGAA GGAGCTAACC GCTTTTTTGC
 3051 ACAACATGGG GGATCATGTA ACTCGCCTTG ATCGTTGGGA ACCGGAGCTG

Figura 4: continuación (tercera y última página)

3101 AATGAAGCCA TACCAAACGA CGAGCGTGAC ACCACGATGC CTGTAGCAAT
 3151 GGCAACAACG TTGCGCAAAC TATTAAGTGG CGAACTACTT ACTCTAGCTT
 3201 CCCGGCAACA ATTAATAGAC TGGATGGAGG CGGATAAAGT TGCAGGACCA
 3251 CTTCTGCGCT CGGCCCTTCC GGCTGGCTGG TTTATTGCTG ATAAATCTGG
 3301 AGCCGGTGAG CGTGGGTCTC GCGGTATCAT TGCAGCACTG GGGCCAGATG
 3351 GTAAGCCCTC CCGTATCGTA GTTATCTACA CGACGGGGAG TCAGGCAACT
 3401 ATGGATGAAC GAAATAGACA GATCGCTGAG ATAGGTGCCT CACTGATTAA
 3451 GCATTGGTAA CTGTCAGACC AAGTTTACTC ATATATACTT TAGATTGATT
 3501 TAAAACTTCA TTTTAAATTT AAAAGGATCT AGGTGAAGAT CCTTTTTGAT
 3551 AATCTCATGA CCAAATCCC TTAACGTGAG TTTTCGTTCC ACTGAGCGTC
 3601 AGACCCCGTA GAAAAGATCA AAGGATCTTC TTGAGATCCT TTTTTCTGC
 3651 GCGTAATCTG CTGCTTGCAA ACAAAAAAAC CACCGCTACC AGCGGTGGTT
 3701 TGTTTGCCGG ATCAAGAGCT ACCAACTCTT TTTCCGAAGG TAACTGGCTT
 3751 CAGCAGAGCG CAGATACCAA ATACTGTCCT TCTAGTGTAG CCGTAGTTAG
 3801 GCCACCACTT CAAGAACTCT GTAGCACCGC CTACATACCT CGCTCTGCTA
 3851 ATCCTGTTAC CAGTGGCTGC TGCCAGTGGC GATAAGTCGT GTCTTACCGG
 3901 GTTGGACTCA AGACGATAGT TACCGGATAA GCGCAGCGG TCGGGCTGAA
 3951 CGGGGGGTTC GTGCACACAG CCCAGCTTGG AGCGAACGAC CTACACCGAA
 4001 CTGAGATACC TACAGCGTGA GCTATGAGAA AGCGCCACGC TTCCCGAAGG
 4051 GAGAAAGGCG GACAGGTATC CGGTAAGCGG CAGGGTCGGA ACAGGAGAGC
 4101 GCACGAGGGA GCTTCCAGGG GGAAACGCCT GGTATCTTTA TAGTCTGTGC
 4151 GGGTTTCGCC ACCTCTGACT TGAGCGTCGA TTTTGTGAT GCTCGTCAGG
 4201 GGGGCGGAGC CTATGGAAAA ACGCCAGCAA CGCGCCCTTT TTACGGTTCC
 4251 TGGCCTTTTG CTGGCCTTTT GCTCACATGT TCTTTCCTGC GTTATCCCTT
 4301 GATTCTGTGG ATAACCGTAT TACCGCCTTT GAGTGAGCTG ATACCGCTCG
 4351 CCGCAGCCGA ACGACGGGGC CCG