

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 524 723**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/00 (2006.01)

C12Q 1/26 (2006.01)

G01N 33/72 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.08.2010 E 10751788 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.09.2014 EP 2462239**

54 Título: **Fructosil peptidil oxidasa y un sensor para analizar una proteína glucosilada**

30 Prioridad:

03.08.2009 EP 09009968

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.12.2014

73 Titular/es:

F.HOFFMANN-LA ROCHE AG (50.0%)

Grenzacherstrasse 124

4070 Basel , CH y

ULTIZYME INTERNATIONAL LTD. (50.0%)

72 Inventor/es:

SODE, KOJI y

IKEBUKURO, KAZUNORI

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 524 723 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

Fructosil peptidil oxidasa y un sensor para analizar una proteína glucosilada

5 Área técnica

La presente invención está relacionada con una nueva fructosil peptidil oxidasa (FPOX). Más concretamente, la presente invención está relacionada con una fructosil peptidil oxidasa para su utilización en un equipo y un sensor para la medida de proteínas glucosiladas, como albúmina, fructosamina, HbA1c, un fructosil hexapéptido, fructosil valina y fructosil valil histidina glucosiladas.

10 Antecedentes de la materia

Una proteína glucosilada se genera de forma no enzimática mediante un enlace covalente entre un grupo amino en una proteína y el extremo reductor de un azúcar, y también se refiere como compuesto Amadori. En la sangre, la glucosa se une a la valina en el extremo N-terminal de la cadena β de la hemoglobina para generar hemoglobina glucosilada (glucohemoglobina; HbA1c). LA proporción de la abundancia de HbA1c respecto hemoglobina (Hb) es mayor en los pacientes que sufren de diabetes mellitus comparado con un individuo normal sano y es conocido que la concentración de HbA1c en la sangre refleja los niveles de azúcar en sangre durante las semanas anteriores. Así, la concentración de HbA1c en sangre es bastante importante en los ensayos clínicos para el diagnóstico de la diabetes mellitus y en el control del azúcar en sangre de pacientes que sufren diabetes mellitus. La concentración de HbA1c en la sangre puede determinarse utilizando una enzima con especificidad por la fructosil valina.

La fructosil aminoácido oxidasa es una enzima dependiente de FAD que cataliza una reacción en la que el fructosil aminoácido se oxida para generar 2-ceto-D-glucosa y el correspondiente aminoácido. Se han aislado fructosil aminoácido oxidasas a partir de varios tipos de organismos y se ha sugerido que las proteínas glucosiladas como la albúmina glucosilada, HbA1c y fructosamina pueden analizarse utilizando estas enzimas.

La PE1626088 describe un método para determinar de forma específica un cadena β glucosilada en el extremo N-terminal de la hemoglobina glucosilada utilizando una proteasa y una cetoamina oxidasa, preferiblemente derivada de una bacteria que pertenece al género *Curvularia*.

La PE2020439 describe una amadoriasa eucariota que actúa sobre la fructosil valil histidina en presencia de oxígeno y que cataliza una reacción para generar un α -cetoaldehído, valil histidina y de peróxido de hidrógeno. Otras amadoriasas y su utilización en productos para el cuidado corporal se describen en la WO 2007/128542.

La PE1291416 describe una fructosil péptido oxidasa, preferiblemente derivada de *Coniochaeta* sp. NISL 9330 actúa sobre la fructosil valil histidina en presencia de oxígeno y cataliza una reacción para generar α -cetoaldehído, valil histidina y peróxido de hidrógeno y métodos para la cuantificación de proteína glucosilada. La JP11046769 describe una fructosil aminoácido oxidasa derivada del género *Penicillium* y un método para determinar la hemoglobina glucosilada.

Las estructuras primarias de las fructosil aminoácido oxidasas fúngicas y su aplicación a la determinación de las proteínas glucosiladas se describe en Yoshida et al, *Eur.J.Biochem*, 242, 1996, 499-505.

La PE2354224, que representa el estado de la material de acuerdo al artículo 54(3) EPC, describe una fructosil peptidil oxidasa derivada de *Phaeosphaeria nodorum* y su utilización para la determinación de proteínas glucosiladas. Sin embargo, la PE2354224 no proporciona ninguna descripción sobre los mediadores electrónicos específicos que se utilizan aquí.

Para analizar la HbA1c con una elevada especificidad, la fructosil aminoácido oxidasa preferiblemente posee selectividad hacia la fructosilvalina comparado con la fructosil lisina. Más preferiblemente, la fructosil aminoácido oxidasa puede poseer una actividad oxidasa hacia la fructosil valil histidina, que se corresponde con dos residuos de la aminoácido en el extremo N-terminal de la Hb. Hirokawa et al. (*Biochem Biophys Res Commun*, 311(1), 2003, 104-111) describen las fructosil peptidil oxidasas derivadas de las bacterias filamentosas de los géneros *Achaetomiella* y *Chaetomius*.

Un objeto de la presente invención es proporcionar una nueva fructosil peptidil oxidasa para su utilización en la determinación de proteínas glucosiladas.

60 Descripción de la invención

La presente invención está basada en el descubrimiento de la fructosil peptidil oxidasa derivada de *Phaeosphaeria nodorum* con la secuencia de aminoácidos que se muestra en la Figura. 1 (Id. de Sec. N°:1). En un aspecto, la presente invención proporciona la utilización de una fructosil peptidil oxidasa que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 90% de identidad con la secuencia de aminoácidos que se indica en el Id. de Sec.

Nº:1 y posee un valor de Km frente a la fructosil valil histidina de 1 mM o inferior para analizar una proteína glucosilada en una muestra en presencia de un mediador de electrones, y dicho mediador de electrones es mPMS/DCIP (metilsulfato de 1-metoxi-5-metilfenazinio/ 2,6-dicloroindofenol), cPES (trifluoroacetato-1-(3-carboxi-propoxi)-5-etil-fenanzinio, NA BM31 1144 clorhidrato de (N,N-bis-(hidroxietil)-3-metoxi-nitrosoanilina, NA BM31 1008 (N,N-bis-hidroxietil-4-nitrosoanilina) o N-N-4-dimetil-nitrosoanilina. La presente invención también proporciona la utilización de una fructosil peptidil oxidasa que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 90% de identidad con la secuencia de aminoácidos que se indica en el Id. de Sec. Nº:1 y posee un valor de Vmax/Km hacia la fructosil valil histidina de 10U/mg·mM o superior para determinar una proteína glucosilada en una muestra en presencia de un mediador de electrones, y dicho mediador de electrones es mPMS/DCIP (metilsulfato de 1-metoxi-5-metilfenazinio/ 2,6-dicloroindofenol), cPES (trifluoroacetato-1-(3-carboxi-propoxi)-5-etil-fenanzinio, NA BM31 1144 clorhidrato de (N,N-bis-(hidroxietil)-3-metoxi-nitrosoanilina, NA BM31 1008 (N,N-bis-hidroxietil-4-nitrosoanilina) o N-N-4-dimetil-nitrosoanilina. La presente invención también proporciona la utilización de una fructosil peptidil oxidasa que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 90% de identidad con la secuencia de aminoácidos que se indica en el Id. de Sec. Nº:1 y con una actividad residual del 50% o superior cuando se trata con calor a 50°C durante 10 minutos para analizar una proteína glucosilada en una muestra en presencia de un mediador de electrones, y dicho mediador de electrones es mPMS/DCIP (metilsulfato de 1-metoxi-5-metilfenazinio/ 2,6-dicloroindofenol), cPES (trifluoroacetato-1-(3-carboxi-propoxi)-5-etil-fenanzinio, NA BM31 1144 clorhidrato de (N,N-bis-(hidroxietil)-3-metoxi-nitrosoanilina, NA BM31 1008 (N,N-bis-hidroxietil-4-nitrosoanilina) o N-N-4-dimetil-nitrosoanilina.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para analizar una proteína glucosilada en una muestra, que comprende poner en contacto la muestra con la fructosil peptidil oxidasa como se ha definido anteriormente, y determinar la cantidad de proteína glucosilada oxidada por la fructosil peptidil oxidasa en presencia de un mediador de electrones, y dicho mediador de electrones es mPMS/DCIP metilsulfato de (1-metoxi-5-metilfenazinio/ 2,6-dicloroindofenol), cPES (trifluoroacetato-1-(3-carboxi-propoxi)-5-etil-fenanzinio, NA BM31 1144 clorhidrato de (N,N-bis-(hidroxietil)-3-metoxi-nitrosoanilina, NA BM31 1008 (N,N-bis-hidroxietil-4-nitrosoanilina) o N-N-4-dimetil-nitrosoanilina.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para analizar la HbA1c que comprende la digestión de HbA1c en una muestra para generar fructosil valina o fructosil valil histidina, poner en contacto la fructosil valina o fructosil valil histidina con la fructosil peptidil oxidasa como se ha definido anteriormente, y medir la cantidad de fructosil valina o fructosil valil histidina oxidada.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un dispositivo para analizar la fructosil valina, fructosil valil histidina, un fructosil hexapéptido o HbA1c en una muestra que comprende la fructosil peptidil oxidasa como se ha definido anteriormente, y un mediador de la transferencia de electrones, y dicho mediador de electrones es mPMS/DCIP (metilsulfato de 1-metoxi-5-metilfenazinio/ 2,6-dicloroindofenol), cPES (trifluoroacetato-1-(3-carboxi-propoxi)-5-etil-fenanzinio, NA BM31 1144 clorhidrato de (N,N-bis-(hidroxietil)-3-metoxi-nitrosoanilina, NA BM31 1008 (N,N-bis-hidroxietil-4-nitrosoanilina) o N-N-4-dimetil-nitrosoanilina. Preferiblemente, el mediador de la transferencia de electrones es N,N-bis-hidroxietil-4-nitrosoanilina. También preferiblemente el dispositivo también comprende uno o más reactivos seleccionados de entre saponina, oxidasa de bilirrubina y proteinasa N.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un equipo para determinar la fructosil valina, fructosil valil histidina, un fructosil hexapéptido o HbA1c en una muestra que comprende la fructosil peptidil oxidasa como se ha definido anteriormente y un mediador de la transferencia de electrones, y dicho mediador de electrones es mPMS/DCIP (metilsulfato de 1-metoxi-5-metilfenazinio/ 2,6-dicloroindofenol), cPES (trifluoroacetato-1-(3-carboxi-propoxi)-5-etil-fenanzinio, NA BM31 1144 clorhidrato de (N,N-bis-(hidroxietil)-3-metoxi-nitrosoanilina, NA BM31 1008 (N,N-bis-hidroxietil-4-nitrosoanilina) o N-N-4-dimetil-nitrosoanilina.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un electrodo enzimático con la fructosil peptidil oxidasa como se ha definido anteriormente y un mediador de electrones, y dicho mediador de electrones es mPMS/DCIP (metilsulfato de 1-metoxi-5-metilfenazinio/ 2,6-dicloroindofenol), cPES (trifluoroacetato-1-(3-carboxi-propoxi)-5-etil-fenanzinio, NA BM31 1144 clorhidrato de (N,N-bis-(hidroxietil)-3-metoxi-nitrosoanilina, NA BM31 1008 (N,N-bis-hidroxietil-4-nitrosoanilina) o N-N-4-dimetil-nitrosoanilina, que están inmovilizados sobre el electrodo. Preferiblemente, la fructosil peptidil oxidasa se inmoviliza sobre el electrodo utilizando una resina de polivinilalcohol foto-entrecruzable.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un sensor enzimático para determinar la fructosil valina, fructosil valil histidina, un fructosil hexapéptido o HbA1c que comprende un electrodo enzimático de la invención como un electrodo de trabajo.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra la secuencia de aminoácidos de la fructosil peptidil oxidasa de *Phaeosphaeria nodorum*.

La figura 2 muestra un proceso de purificación de la fructosil peptidil oxidasa.

La figura 3 muestra la curva de SV de la fructosil peptidil oxidasa purificada.

La figura 4 muestra la termoestabilidad de la fructosil peptidil oxidasa.

La figura 5 muestra la medida de fructosilvalina utilizando la fructosil peptidil oxidasa en un sistema de m-PMS/DCIP. La figura 6 muestra la medida de fructosil hexapéptido utilizando la fructosil peptidil oxidasa.

La figura 7 muestra la medida de HbA1c utilizando la fructosil peptidil oxidasa.

5 La figura 8 muestra la medida de fructosilvalina utilizando un electrodo con la fructosil peptidil oxidasa en un sistema de H₂O₂.

La figura 9 muestra la medida de fructosilvalina utilizando un electrodo con la fructosil peptidil oxidasa en un sistema de azul prusiano.

La figura 10 muestra la medida de fructosilvalina utilizando un electrodo con la fructosil peptidil oxidasa en un sistema de nitrosoanilina (NA).

10 La figura 11 muestra la medida de fructosilvalina utilizando un electrodo con la fructosil peptidil oxidasa en un sistema de m-PMS.

Descripción detallada de la invención

15 La fructosil peptidil oxidasa utilizada en la presente invención (PnFPOX) se deriva de *Phaeosphaeria nodorum* y posee al menos un 90% de identidad con la secuencia de aminoácidos que se muestra en la figura. 1 (Id. de Sec. N°:1). Una variante de la fructosil peptidil oxidasa con una secuencia de aminoácidos modificada con una identidad de secuencia de al menos el 80% con la secuencia de aminoácidos indicada en el Id. de Sec. N°:1 también puede utilizarse en la presente descripción. La identidad de secuencia es de al menos un 90%, y más preferiblemente de al menos un 95%. La secuencia genómica de *Phaeosphaeria nodorum* se ha publicado, pero este gen no se encuentra anotado. No se sugiere o se implica que *Phaeosphaeria nodorum* posea fructosil peptidil oxidasa o el gen puede codificar cualquier tipo de enzima.

20 La secuencia de aminoácidos de PnFPOX muestra un 71% de identidad con FPOX-E (*Eupenicillum terrenum* ATCC 18547; GenBank: BAD00185.1) y un 74% de identidad con FPOX-C (*Coniochaeta* sp. NISL 9330; GenBank: BAD00186.1). La homología de secuencia con otras fructosil aminoácido oxidasas conocidas es de alrededor del 30%.

30 Como se describe en los Ejemplos a continuación, PnFPOX muestra una actividad superior frente a fructosil valina que frente a fructosil lisina. También muestra una actividad incluso superior frente a fructosil valil histidina. El valor de Km frente a fructosil valil histidina de PnFPOX es de 1 mM o inferior, preferiblemente de 0,5 mM o inferior, y más preferiblemente de 0,3 mM o inferior, lo que es alrededor de diez veces inferior que la de FPOX-E y FPOX-C. El valor de Vmax/Km frente a la fructosil valil histidina de PnFPOX es de 10 U/mg·mM o superior. Esta característica es especialmente ventajosa en la utilización de la enzima para determinar la HbA1c con una mayor sensibilidad y especificidad.

35 Otra característica ventajosa de la fructosil peptidil oxidasa utilizada en la presente invención es su termoestabilidad. Cuando la PnFPOX se trató con calor a 50°C durante 10 minutos en PPB 10 mM (pH 7,0), se observó una actividad residual de alrededor del 75%.

40 La fructosil peptidil oxidasa utilizada en la presente invención puede prepararse mediante la expresión recombinante utilizando técnicas bien conocidas en la materia. La secuencia de ácido nucleico de PnFPOX se encuentra en GenBank: XP_001798711.1. La secuencia puede modificarse de forma adecuada o diseñarse para conseguir un mayor nivel de expresión en un organismo huésped seleccionado. Un polinucleótido que codifica la PnFPOX puede clonarse a partir de *Phaeosphaeria nodorum*, o prepararse mediante PCR utilizando una serie de oligonucleótidos sintetizados químicamente, o totalmente sintetizados utilizando un sintetizador automático de DNA.

45 El gen que codifica la PnFPOX se inserta en un vector de expresión apropiado, y el vector se introduce en una célula huésped apropiada, como *E. coli*. El transformante se cultiva y la fructosil peptidil oxidasa expresada en el transformante puede recogerse de las células o del medio de cultivo.

50 La fructosil peptidil oxidasa recombinante así obtenida puede purificarse mediante cualquiera de las técnicas de purificación conocidas en la materia, lo que incluye la cromatografía en columna de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, cromatografía líquida, filtración, ultrafiltración, precipitación con sales, precipitación con solventes, inmunoprecipitación, electroforesis en gel, electroforesis isoeléctrica y diálisis.

55 La fructosil peptidil oxidasa utilizada en la invención es útil para determinar una proteína glucosilada en una muestra. El método de ensayo como se define en las reivindicaciones comprende entre otros poner en contacto la muestra con la fructosil peptidil oxidasa utilizada en la invención y determinar la cantidad de la proteína glucosilada oxidada por la fructosil peptidil oxidasa. Las proteínas glucosiladas determinadas mediante la presente invención incluyen, por ejemplo, la fructosil valina, fructosil valil histidina, un fructosil hexapéptido, HbA1c, albúmina glucosilada y fructosamina. En un aspecto, la presente invención proporciona un método para determinar la HbA1c como se define en las reivindicaciones, que comprende entre otros digerir la HbA1c en una muestra para generar la fructosil valina, poner en contacto la fructosil valina con la fructosil peptidil oxidasa utilizada en la invención, y medir la cantidad de fructosil valina oxidada. La HbA1c puede digerirse con una proteinasa, como la proteasa y proteinasa N. En una realización preferible, el método comprende la digestión de la HbA1c en una muestra con proteinasa N para

generar la fructosil valil histidina, poner en contacto la fructosil valil histidina con la fructosil peptidil oxidasa utilizada en la invención, y determinar la cantidad de fructosil valil histidina oxidada. En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para determinar la HbA1c como se define en las reivindicaciones digiriendo la HbA1c mediante una endoproteasa Glu-C para generar un fructosil hexapéptido, y determinar el fructosil hexapéptido mediante la fructosil peptidil oxidasa utilizada en la invención. Sorprendentemente, ahora se ha descubierto que la fructosil aminoácido oxidasa de *Phaeosphaeria nodorum* es capaz de oxidar el fructosil hexapéptido, mientras que el anteriormente conocido FPOX-C no (*Coniochaeta* sp. NISL 9330; GenBank: BAD00186.1).

La medida de la cantidad de la proteína glucosilado oxidada mediante la fructosil peptidil oxidasa puede efectuarse determinando la cantidad de H₂O₂ generado por cualquiera de los métodos conocidos en la materia, por ejemplo, utilizando un reactivo para la detección de H₂O₂ como 4AA/TODB/POD (4-aminoantipirina/ sal disódica de N,N-bis(4-sulfobutil)-3-metilnilina/ peroxidasa de rábano picante) o mediante un electrodo de Pt. Alternativamente, el ensayo puede realizarse en presencia de un mediador de electrones y la cantidad de electrones transferidos al mediador se mide utilizando, por ejemplo, mPMS/DCIP (1-metoxi-5-metilfenaziniometilsulfato/ 2,6-dicloroindofenol), cPES (trifluoroacetato-1-(3-carboxi-propoxi)-5-etil-fenanzinio, NA BM31 1144 (clorhidrato de N,N-bis-(hidroxietil)-3-metoxi-nitrosoanilina, NA BM31 1008 (N,N-bis-hidroxietil-4-nitrosoanilina) y N-N-4-dimetil-nitrosoanilina. Entre ellos, el NA BM31 1008 es particularmente preferible.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un dispositivo como se define en las reivindicaciones para determinar la fructosil valina, fructosil valil histidina, un fructosil hexapéptido o la HbA1c en una muestra que comprende la fructosil peptidil oxidasa utilizada en la invención.

El dispositivo de ensayo puede poseer una estructura similar a cualquiera de las tiras de ensayo biosensores amperométricos convencionales, disponibles a nivel comercial para el seguimiento del nivel de glucosa en sangre. Un ejemplo de tales dispositivos posee dos electrodos (el electrodo de trabajo y el de referencia o contraelectrodo) posicionados en un sustrato aislante, un puerto de reactivo y un receptor de la muestra. El puerto para el reactivo contiene la fructosil peptidil oxidasa utilizada en la invención, FAD, y un mediador de la transferencia de electrones. Cuando una muestra, como una muestra de sangre, se añade al receptor de muestras, la fructosilamina contenida en la muestra reaccionará con la fructosil peptidil oxidasa para generar corriente, que es indicativa de la cantidad de fructosilamina en la muestra. Cuando se utiliza sangre completa como muestra, el dispositivo también puede comprender un reactivo para la hemólisis. Concretamente el reactivo de hemólisis preferible es la saponina. En otra realización preferible, el dispositivo también puede comprender la bilirrubina oxidasa (BOD) para reducir la corriente de ruido de fondo del sensor causada por la reducción de los ingredientes contenidos en la muestra de sangre completa. En otra realización preferible, el dispositivo también puede contener proteinasa N para efectuar la liberación de fructosil valina o fructosil valil histidina de la albúmina glucosilada presente en la sangre. La saponina, BOD y proteinasa N pueden inmovilizarse separadamente sobre el dispositivo, de forma que la muestra de sangre completa se ponga en contacto con la saponina para efectuar la hemólisis y luego se ponga en contacto con la BOD y la proteinasa N. Ejemplos típicos de sensores electroquímicos adecuados para la determinación de sustratos enzimáticos se describen, por ejemplo en la WO 2004/113900 y US 5.997.817. Como alternativa a los sensores electroquímicos, pueden utilizarse tecnologías de detección óptica. Normalmente, tales dispositivos ópticos están basados en cambios de color que ocurren en un sistema de reactivos que comprenden la enzima, un mediador de la transferencia de electrones y un indicador. Los cambios de color pueden cuantificarse utilizando fluorescencia, medidas de absorción o remisión. Ejemplos típicos de dispositivos ópticos adecuados para la determinación de sustratos enzimáticos se describen por ejemplo en la US 7.008.799, US 6.036.919 y US 5.334.508.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un equipo como se ha definido en las reivindicaciones para determinar la fructosil valina, fructosil valil histidina, un fructosil hexapéptido o la HbA1c en una muestra que comprende la fructosil peptidil oxidasa utilizada en la invención.

Un equipo para la medida de fructosil valina, fructosil valil histidina o un fructosil hexapéptido puede construirse con la fructosil peptidil oxidasa utilizada en la presente invención. Además de la fructosil peptidil oxidasa utilizada en la invención, el equipo puede contener el tampón necesario para la medida, el mediador apropiado, estándares de fructosil valina, fructosil valil histidina o un fructosil hexapéptido o un derivado de los mismos para la preparación de una curva de calibración y unas instrucciones de uso. El equipo también puede contener una endoproteasa Glu-C para digerir la HbA1c para generar un fructosil hexapéptido. La fructosil peptidil oxidasa utilizada en la presente invención puede proporcionarse en varias formas, por ejemplo, como un reactivo liofilizado o como una solución en una solución de almacenaje apropiada.

También es posible construir un equipo de ensayo de la fructosamina, albúmina glucosilada o HbA1c utilizando la fructosil peptidil oxidasa utilizada en la presente invención. La fructosilamina, albúmina glucosilada o HbA1c se digiere de forma enzimática o química para generar un compuesto fructosilamina como la fructosil valina o fructosil valil histidina, que a su vez se cuantifican utilizando la fructosil peptidil oxidasa utilizada en la presente invención. De acuerdo con ello, el equipo de ensayo definido en las reivindicaciones de la presente invención para la fructosamina, albúmina glucosilada o HbA1c también puede contener un reactivo para la hidrólisis o una proteinasa. La proteinasa preferible es la proteinasa N que digerirá la HbA1c para generar fructosil valil histidina.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un electrodo enzimático definido en las reivindicaciones con la fructosil peptidil oxidasa utilizada en la invención inmovilizada sobre el electrodo. En una realización preferible, la fructosil aminoácido oxidasa utilizada en la invención está inmovilizada sobre el electrodo utilizando un polímero para evitar que la BOD y la proteinasa N se pongan en contacto con la fructosil aminoácido oxidasa y el mediador. De otro modo, la BOD podría interferir con las propiedades redox del mediador, y la proteinasa N podría degradar la fructosil aminoácido oxidasa. El polímero preferible es una resina de polivinilalcohol fotoentrecruzable, por ejemplo, un fotopolímero de azida con unidad colgante soluble en agua (AWP) proporcionado por Toyo Gosei Co., Ltd. (Chiba, Japón). Para construir el electrodo enzimático, se aplica una solución tampón que contiene el AWP, la fructosil aminoácido oxidasa y un mediador como como NA BM31 1008 en la superficie del electrodo. Tras secarse la solución, se irradia con luz UV para realizar el entrecruzado del polímero.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un sensor enzimático como el definido en las reivindicaciones para determinar la fructosil valina, fructosil valil histidina, un fructosil hexapéptido o la HbA1c que comprende el electrodo enzimático definido en las reivindicaciones de la invención como electrodo de trabajo.

La concentración de fructosilamina en una muestra puede determinarse mediante la mediación de la cantidad de electrones generados por una reacción enzimática. La fructosil peptidil oxidasa utilizada en la presente invención se inmoviliza en los electrodos, como un electrodo de carbono, un electrodo metálico y un electrodo de platino. La inmovilización de la enzima puede efectuarse mediante entrecruzamiento, encapsulado en una matriz macromolecular, recubrimiento con una membrana de diálisis, polímero de entrecruzamiento óptico, polímero electroconductor, polímero de oxidación-reducción, u otros métodos bien conocidos para el experto en la materia, y cualquier combinación de los mismos.

Cuando la medida se realiza en un sistema amperométrico, el electrodo de carbono, electrodo de oro o electrodo de platino con PnFPOX inmovilizado se utiliza como electrodo de trabajo, junto con un contraelectrodo (como un electrodo de platino) y un electrodo de referencia (como un electrodo de Ag/AgCl). Los electrodos se insertan en un tampón que contiene un mediador y se mantiene a una temperatura predeterminada. Se aplica un voltaje predeterminado al electrodo de trabajo, luego se añade una muestra y se mide el aumento del valor de corriente eléctrica. Ejemplos de mediador utilizados en el ensayo incluyen ferricianuro potásico, ferroceno, derivados del osmio, derivados del rutenio, metosulfato de fenazina, etc. Generalmente también es posible utilizar los denominados sistemas de dos electrodos con un electrodo de trabajo y un contraíón o electrodo de pseudo-referencia.

Para preparar un sensor para la medida de fructosilamina, albúmina glucosilada o HbA1c, el sensor anteriormente mencionado para la medida de fructosil valina o fructosil valil histidina se combina además con una membrana que contiene una proteinasa inmovilizada (como la proteinasa N o una proteasa, preferiblemente proteinasa N) para construir un sensor complejo. La estructura de tal sensor complejo basada en una reacción continua mediante una combinación de enzimas plurales es bien conocida en la materia. Véase, por ejemplo, "Biosensor - Fundamental and Applications" de Anthony P. F. Tuner, Isao Karube y George S. Wilson, Oxford University Press, 1987.

Ejemplos

La presente invención se ilustrará en detalle mediante los Ejemplos a continuación, aunque la presente invención no se verá limitada a estos Ejemplos.

Ejemplo 1

Preparación de la fructosil peptidil oxidasa de *Phaeosphaeria nodorum*

La secuencia de nucleótidos de PnFPOX se encuentra en la información genómica de *Phaeosphaeria nodorum* en una base de datos pública (GenBank: XP 001798711.1). Como el presunto ORF contenía varios codones menores en *E.coli*, el uso de codón del gen se optimizó para expresar el gen en *Escherichia coli*. Tras esta optimización, ya no existían codones menores significativos en la secuencia. El gen sintético se subclonó en un vector de expresión pET28a para construir la pEPN (pET28a-PnFPOX).

Las células *E coli* BL21(DE3) transformadas con un vector de expresión de PnFAOD (pEPN) se cultivaron en 50 mL de medio LB suplementado con 50 µg/mL de kanamicina a 37°C, y se añadió IPTG (f.c. 0,4 mM) a DO a 660 nm = 0,8. El cultivo se continuó a 25°C hasta que la DO a 660 nm alcanzó alrededor de 3. Las células se recogieron mediante centrifugación (5.000 x g, 4°C, 10 min.), se lavaron (0,85% NaCl ac., 6.000 x g, 4°C, 5 min.), se resuspendieron en 3 mL de PPB 10 mM (pH 7,0), y se homogenizaron mediante un homogenizador ultrasónico. La suspensión resultante se centrifugó (10.000 x g, 4°C, 20 min.), y a continuación se centrifugó el sobrenadante (60.000 rpm, 4°C, 60 min.). El sobrenadante se dializó frente a PPB 10 mM (pH 7,0) con FAD 25 mM para obtener una fracción soluble en agua. En un análisis de SDS-PAGE, la fracción soluble en agua mostró una banda a alrededor de 48-50 kDa, lo que es consistente con el peso molecular esperado de la PnFPOX.

Se examinó si la fracción soluble en agua tenía actividad oxidasa utilizando el método de POD/TODB/4A.A. con tres sustratos: fructosil valina (FV), fructosil lisina (FK) y fructosil valil histidina (FVH). La fructosil peptidil oxidasa mostró actividad oxidante frente a fructosil aminoácido (FV, FK) pero también frente a fructosil dipéptido (FVH).

5 Ejemplo 2

Purificación y caracterización de la fructosil peptidil oxidasa de *Phaeosphaeria nodorum*

10 El procedimiento de purificación se resume en la Figura 2. Se cultivaron *Escherichia coli* BL21 (DE3) transformadas con pEPN (pET28a-PnFPOX) de forma aeróbica a 37°C en medio LB (7 L) que contenía 50 µg de kanamicina ml⁻¹. Tras alcanzar un valor de A 660 nm de 1,4, las células se indujeron con IPTG 0,3 mM, y la incubación se continuó a 25°C hasta que alcanzó un valor de A 660 nm de 3,0. Las células se recogieron por centrifugación y un cuarto de las células recogidas (aprox. 10,5 g) se resuspendieron en PPB 10 mM, pH 7,0, y se lisaron en 2 pases a través de una prensa francesa (1.000 kg cm⁻²). El lisado se centrifugó a 10.000 g a 4°C durante 20 min., y el sobrenadante se centrifugó a 40.000 rpm a 4°C durante 90 min. Entonces se dializó el sobrenadante frente a PPB 10 mM, pH 8,0, que contenía FAD 25 µM.

20 Se añadió sulfato amónico al sobrenadante dializado hasta una saturación del 35% y luego el precipitado formado se recogió por centrifugación a 15.000 g durante 20 min. El sobrenadante al que se añadió sulfato amónico hasta un 95% de saturación se centrifugó a 15.000 g durante 20 min. El precipitado resultante se disolvió en PPB 10 mM, pH 8,0, que contenía FAD 25 µM y manosa al 1% y se dializó a 4°C frente al mismo tampón, y a continuación se dializó frente a PPB 10 mM, pH 8,0, que contenía FAD 25 µM. La solución de enzima dializada se aplicó a una columna RESOURCE Q (GE Healthcare) equilibrada con PPB 10 mM, pH 8,0. Las fracciones filtradas activas se recogieron, y las proteínas adsorbidas que no mostraron actividades FAOD se eluyeron con NaCl 1 M. Las fracciones filtradas activas se recogieron y se dializaron frente a PPB 10 mM, pH 7,0.

30 La solución de enzima dializada se aplicó a una columna HiLoad 16/60 Superdex 75 µg (GE Healthcare) equilibrada con PPB 10 mM, pH 7,0. Se realice una cromatografía de filtración en gel con el mismo tampón. Las fracciones activas se recogieron y la solución de enzima purificada se dializó frente a PPB 10 mM, pH 7,0 que contenía FAD 100 µM, y se almacenó a 4°C. La pureza de la enzima purificada se confirmó mediante SDS-PAGE, y la concentración de proteína se midió utilizando un equipo de ensayo de proteína DC (Bio-Rad, CA, USA).

35 Como se resume en la Tabla 1, la PnFPOX se purificó 35 veces mediante precipitación de sulfato amónico, cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía de filtración en gel a partir del extracto celular de *E.coli* BL21(DE3)/ pEPN(pET28a-PnFPOX). Las preparaciones purificadas mostraron una banda casi única en una SDS-PAGE.

Tabla 1 Purificación de PnFPOX recombinante

Etapa	Actividad total (U)	Proteína total (mg)	Actividad específica (U/mg)	Purificación (veces)	Rendimiento (%)
Fracción soluble	298	526	0,57	1	100
Sulfato amónico	243	415	0,59	1,03	82
Resource Q	189	23,9	7,9	13,9	63
HiLoad1	52,9	2,69	20	34,8	18

40 La actividad oxidasa se analizó utilizando 4A.A/TODB/POD con concentraciones variables de los sustratos FV, FK y FVH. La absorbancia a 546 nm se siguió a lo largo del tiempo. Los resultados se muestra en la Figura 3. Con FV y FVH se obtuvieron las curvas típicas de Michaelis-Menten, pero no con FK. Los valores aparentes de Km fueron 0,64 mM para FV y 0,20 mM para FVH (Tabla 2). Un valor elevado de Vmax Km⁻¹ para FV (42,8 U mg⁻¹ mM⁻¹) indicó una elevada especificidad de esta enzima frente a FV. Debe hacerse notar que el valor de Vmax Km⁻¹ para FVH también es considerable (14,7 U mg⁻¹ mM⁻¹, un 34% de la Vmax Km⁻¹ para FV). Esta actividad frente a FVH de PnFPOX será ventajosa en la medida basada en enzimas de la HbA1c. En comparación, la actividad oxidasa de fructosil peptidil oxidasas conocidas (FPOX-C y FPOX-E) también se incluyen en la tabla (Hirokawa et al. *ibid*).

50 Tabla 2 Parámetros cinéticos de fructosil peptidil oxidasas

	FV			FK			FVH		
	Km (mM)	Vmax (U/mg)	Vmax /Km	Km (mM)	Vmax (U/mg)	Vmax /Km	Km (mM)	Vmax (U/mg)	Vmax/ Km
PnFPOX	0,64	27,6	42,8	16	3,23	0,206	0,20	2,97	14,7
FPOX-C	0,824	66,0	80,1	10,6	23,4	2,17	2,81	23,8	8,47
FPOX-E	0,318	20,6	64,8	ND	0,42	---	2,76	5,43	1,97

La termoestabilidad de PnFPOX se evaluó mediante la incubación de la solución de enzima purificada en PPB 10 mM (pH 7,0) a varias temperaturas durante 10 min. y luego determinar la actividad residual. El resultado se muestra en la Figura 4. La actividad de la PnFPOX se mantuvo a alrededor del 75% hasta 50°C. Esto contrasta con las fructosil peptidil oxidasas conocidas (FPOXC y FPOX-E), que pierden casi toda su actividad a 50°C (Hirokawa et al. ibid).

Ejemplo 3

Medida de la fructosilamina utilizando fructosil peptidil oxidasas

(1) Sistema FV - m-PMS/DCIP

La fructosilvalina (FV) se determinó utilizando PnFPOX en el sistema m-PMS/DCIP en presencia de PMS 0,6 mM y DCIP 0,06 mM. Se siguió la absorbancia a 600 nm. El resultado se muestra en la Figura 5. La concentración de FV puede medirse dentro del rango entre 0,05 mM y 1 mM.

(2) F6P - 4AA/TODB/POD

Un fructosil hexapéptido (F6P: Fru-Val-His-Leu-Thr-Pro-Glu) con los residuos de aminoácido del extremo N-terminal de la cadena beta de la HbA1c se determinó utilizando PnFPOX. A una solución de fructosil hexapéptido a una concentración final de 300 μ M en tampón PBS (pH 7,4), se añadió proteinasa N derivada de *Bacillus subtilis* (Sigma) a una concentración final de 20 mg/ml, y se incubó a 37°C durante 10 minutos. Se eliminó la proteinasa N con una columna de centrifugación de hasta 10 kDa, y el producto escindido se determinó con PnFPOX en un sistema 4AA/TODB/POD. La cantidad de fructosil hexapéptido en una muestra se calculó utilizando la curva de calibración preparada con FVH como sustrato. El resultado mostró que se detectaron 300 μ M de FVH (Figura 6).

(3) HbA1c - 4AA/TODB/POD

Se aislaron hematias de sangre periférica y se purificaron mediante una columna de ácido borónico. Las fracciones absorbidas y no absorbidas se designaron muestra HbA1c y muestra Hb, respectivamente. Estas muestras se sometieron a un tratamiento para eliminar el hemo en acetona que contenía un 0,2% HCl para preparar muestras HbA1c des-hemo y Hb des-hemo. A una solución de muestra HbA1c des-hemo y muestra Hb des-hemo a una concentración final de 300 μ M en tampón PBS (pH 7,4), se añadió proteinasa N a una concentración final de 20 mg/ml, y se incubó a 37°C durante 10 minutos. Se eliminó la proteinasa N con una columna de centrifugación de hasta 10 kDa, y el producto escindido se determinó con PnFPOX en un sistema 4AA/TODB/POD. La cantidad de HbA1c en una muestra se calculó utilizando la curva de calibración preparada con FTV como sustrato en presencia de Hb tratada con proteinasa N. El resultado mostró que se detectaron 350 μ M de FVH (Figura 7). No se detectó FVH a partir de la Hb, lo que indica que HbA1c puede detectarse de forma específica.

(4) Sistema FV - Electrodo - H₂O₂

Se mezclaron 3,3 μ l (0,04 U) de una solución enzimática de PnFPOX (12 u/ml) con 1,7 μ l de resina fotoentrecruzable AWP al 6% (Toyo Gosei Kogyo) a una concentración final del 2%, y se aplicaron 5 ml de la mezcla sobre un electrodo de Pt con una área de superficie de 7 mm². El electrodo se secó al aire a 30°C durante 30 min., y se irradió con luz UV durante 1 min. para preparar un electrodo de trabajo. El electrodo y el contraelectrodo (cable de Pt) y un electrodo de referencia (Ag/ AgCl) se sumergieron en 2 ml de PPB 50 mM (pH 7,0) y se aplicaron +600 mV contra Ag/AgCl. Cuando se observe un equilibrio en la corriente, la solución de muestra que contenía la cantidad indicada de FV se añadió a la mezcla de reacción, y se monitorizó el aumento de la corriente. El resultado se muestra en la Figura 8. La concentración de FV puede medirse dentro del rango entre 0,05 mM y 1,5 mM.

(5) Sistema de FV - Electrodo – azul prusiano

Un electrodo de carbono vidrioso (BAS, área de la superficie de 7 mm²) se sumergió en una solución de FeCl₃ 1 mM, ferricianuro potásico 1 mM y KCl 2 M, y un voltage de +0,4 V frente a Ag/AgCl se aplicó durante 1 min. para preparar una membrana de azul prusiano. Luego se sometió el electrodo al tratamiento con CV durante diez veces de -50 mV a +350 mV frente a Ag/AgCl con una tasa de barrido de 5 mV/s para estabilizar la membrana de azul prusiano. El electrodo se lavó con agua y se secó. Se mezclaron 3,3 μ l (0,04 U) de una solución enzimática de PnFPOX (12 u/ml) con 1,7 μ l de resina fotoentrecruzable AWP al 6% (Toyo Gosei Kogyo) a una concentración final del 2%, y se aplicaron sobre el electrodo, y el electrodo se secó al aire a 30°C durante 30 min., luego se irradió con luz UV durante 1 min. para preparar un electrodo con enzima con azul prusiano inmovilizada como electrodo de trabajo. El electrodo y el contraelectrodo (cable de Pt) y un electrodo de referencia (Ag/ AgCl) se sumergieron en 2 ml de PPB 50 mM (pH 7,0) y se aplicaron -150 mV contra Ag/AgCl. Se añadió FV a la mezcla de reacción, y se monitorizó el aumento de la corriente. El resultado se muestra en la Figura 9. La concentración de FV puede medirse dentro del rango entre 0,05 mM y 1 mM.

(4) Sistema FV - Electrodo - NA

5 Se mezclaron 3,3 ul (0,04 U) de una solución enzimática de PnFPOX (12 u/ml) con 1,7 ul de resina fotoentrecruzable AWP al 6% (Toyo Gosei Kogyo) a una concentración final del 2%, y se aplicaron 5 mL de la mezcla sobre un electrodo de oro con un área de superficie de 7 mm². El electrodo se secó al aire a 30°C durante 30 min., y se irradió con luz UV durante 1 min. para preparar un electrodo de trabajo. El electrodo y el contraelectrodo (cable de Pt) y un electrodo de referencia (Ag/ AgCl) se sumergieron en 2 ml de PPB 50 mM (pH 7,0) que contenía N,N-bis(hidroxietil)-3-metoxi-4-nitrosoanilina (NA) 5 mM y se aplicaron +200 mV contra Ag/AgCl. Se añadió FV a la mezcla de reacción, y se monitorizó el aumento de la corriente. Para evitar el efecto del oxígeno, se purgó en la cámara de reacción gas Ar, de forma continua. El resultado se muestra en la Figura 10. La concentración de FV puede medirse dentro del rango entre 0,05 mM y 1 mM.

10 (5) Sistema FV - Electrodo - m-PMS

15 Se preparó un electrodo de oro con PnFPOX inmovilizada como se ha descrito en (4) anteriormente. El electrodo y un contraelectrodo (cable de Pt) y un electrodo de referencia (Ag/AgCl) se sumergieron en 2 ml de PPB 50 mM (pH 7,0) que contenía m-PMS 2 mM y se aplicaron +100mV contra Ag/AgCl. Se añadió FV a la mezcla de reacción y se siguió el aumento de la corriente. El resultado se muestra en la Figura 11. La concentración de FV puede medirse dentro del rango entre 0,05 mM y 1,5 mM.

20 Ejemplo 4

Actividad oxidasa de la fructosil peptidil oxidasa frente a fructosil hexapéptido

25 La actividad oxidasa de las fructosil peptidil oxidasas PnFPOX y FPOX-C sobre un fructosil hexapéptido (F6P: Fru-Val-His-Leu-Thr-Pro-Glu) se determinó sin añadir proteinasa N. La actividad enzimática se determinó en un sistema 4AA/TODB/POD como se ha descrito en el Ejemplo 2, con una concentración de sustrato de 1 mM para FV y FVH, y 5 mM para F6P. El resultado se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3

	FV (U/mg)	FVH (U/mg)	F6P (U/mg)
PnFPOX	1,3	0,11	1,3 x 10 ⁻³
FPOX-C	2,3	0,60	n.d.

30 La fructosil peptidil oxidasa PnFPOX fue capaz de oxidar el fructosil hexapéptido.

Aplicabilidad industrial

35 La fructosil peptidil oxidasa de la invención puede utilizarse para la medida de proteínas glucosiladas, como la hemoglobina (HbA1c) que es útil a nivel clínico en el diagnóstico y control de los estados diabéticos.

REIVINDICACIONES

1. La utilización de fructosil peptidil oxidasa que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 90% de identidad con la secuencia de aminoácidos que se indica en el Id. de Sec. N°:1 y que posee un valor de Km frente a la fructosil valil histidina de 1 mM o inferior para determinar una proteína glucosilada en una muestra en presencia de un mediador de electrones, y dicho mediador de electrones es mPMS/DCIP (metilsulfato de 1-metoxi-5-metilfenazinio/ 2,6-dicloroindofenol), cPES (trifluoroacetato-1-(3-carboxi-propoxi)-5-etil-fenanzinio, NA BM31 1144 (clorhidrato de N,N-bis-(hidroxietil)-3-metoxi-nitrosoanilina, NA BM31 1008 (N,N-bis-hidroxi-etil-4-nitrosoanilina) o N-N-4-dimetil-nitrosoanilina.
2. La utilización de fructosil peptidil oxidasa que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 90% de identidad con la secuencia de aminoácidos que se indica en el Id. de Sec. N°:1 y posee un valor de Vmax/Km frente a la fructosil valil histidina de 10U/mg·mM o superior para determinar una proteína glucosilada en una muestra en presencia de un mediador de electrones, y dicho mediador de electrones es mPMS/DCIP (metilsulfato de 1-metoxi-5-metilfenazinio/ 2,6-dicloroindofenol), cPES (trifluoroacetato-1-(3-carboxi-propoxi)-5-etil-fenanzinio, NA BM31 1144 (clorhidrato de N,N-bis-(hidroxietil)-3-metoxi-nitrosoanilina, NA BM31 1008 (N,N-bis-hidroxi-etil-4-nitrosoanilina) o N-N-4-dimetil-nitrosoanilina.
3. La utilización de fructosil peptidil oxidasa que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 90% de identidad con la secuencia de aminoácidos que se indica en el Id. de Sec. N°:1 y con una actividad residual del 50% o superior cuando se trata con calor a 50°C durante 10 minutos para determinar una proteína glucosilada en una muestra en presencia de un mediador de electrones, y dicho mediador de electrones es mPMS/DCIP (metilsulfato de 1-metoxi-5-metilfenazinio/ 2,6-dicloroindofenol), cPES (trifluoroacetato-1-(3-carboxi-propoxi)-5-etil-fenanzinio, NA BM31 1144 (clorhidrato de N,N-bis-(hidroxietil)-3-metoxi-nitrosoanilina, NA BM31 1008 (N,N-bis-hidroxi-etil-4-nitrosoanilina) o N-N-4-dimetil-nitrosoanilina.
4. Un método para determinar una proteína glucosilada en una muestra, que comprende poner en contacto la muestra con la fructosil peptidil oxidasa como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-3, y determinar la cantidad de la proteína glucosilada oxidada por la fructosil peptidil oxidasa en presencia de un mediador de electrones, y dicho mediador de electrones es mPMS/DCIP (metilsulfato de 1-metoxi-5-metilfenazinio/ 2,6-dicloroindofenol), cPES (trifluoroacetato-1-(3-carboxi-propoxi)-5-etil-fenanzinio, NA BM31 1144 (clorhidrato de N,N-bis-(hidroxietil)-3-metoxi-nitrosoanilina, NA BM31 1008 (N,N-bis-hidroxi-etil-4-nitrosoanilina) o N-N-4-dimetil-nitrosoanilina.
5. Un método para determinar la HbA1c que comprende la digestión de HbA1c en una muestra para generar fructosil valina o fructosil valil histidina, poner en contacto la fructosil valina o fructosil valil histidina con la fructosil peptidil oxidasa como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-3, y determinar la cantidad de fructosil valina o fructosil valil histidina oxidada.
6. Un dispositivo para determinar la fructosil valina, fructosil valil histidina, un fructosil hexapéptido o la HbA1c en una muestra que comprende la fructosil peptidil oxidasa como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-3, y un mediador de la transferencia de electrones, y dicho mediador de electrones es mPMS/DCIP (metilsulfato de 1-metoxi-5-metilfenazinio/ 2,6-dicloroindofenol), cPES (trifluoroacetato-1-(3-carboxi-propoxi)-5-etil-fenanzinio, NA BM31 1144 (clorhidrato de N,N-bis-(hidroxietil)-3-metoxi-nitrosoanilina, NA BM31 1008 (N,N-bis-hidroxi-etil-4-nitrosoanilina) o N-N-4-dimetilnitrosoanilina.
7. El dispositivo tal y como se reivindica en la reivindicación 6, en el que el mediador de la transferencia de electrones es N,N-bis-hidroxi-etil-4-nitrosoanilina.
8. El dispositivo tal y como se reivindica en la reivindicación 6 o 7, que además comprende uno o más reactivos seleccionados de entre saponina, bilirrubina oxidasa y proteinasa N.
9. Un equipo para determinar la fructosil valina, fructosil valil histidina, un fructosil hexapéptido o HbA1c en una muestra que comprende la fructosil peptidil oxidasa como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1-3 y un mediador de la transferencia de electrones, y dicho mediador de electrones es mPMS/DCIP (metilsulfato de 1-metoxi-5-metilfenazinio/ 2,6-dicloroindofenol), cPES (trifluoroacetato-1-(3-carboxi-propoxi)-5-etil-fenanzinio, NA BM31 1144 (clorhidrato de N,N-bis-(hidroxietil)-3-metoxi-nitrosoanilina, NABM31 1008 (N,N-bis-hidroxi-etil-4-nitrosoanilina) o N-N-4-dimetil-nitrosoanilina.
10. El equipo tal y como se reivindica en la reivindicación 9, en el que el mediador de la transferencia de electrones es N,N-bis-hidroxi-etil-4-nitrosoanilina.
11. El equipo tal y como se reivindica en la reivindicación 9 o 10, que además comprende uno o más reactivos seleccionados de entre saponina, bilirrubina oxidasa y proteinasa N.

- 5 12. Un electrodo enzimático con fructosil peptidil oxidasa como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1-3 y un mediador de electrones, y dicho mediador de electrones es mPMS/DCIP (metilsulfato de 1-metoxi-5-metilfenazinio/ 2,6-dicloroindofenol), cPES (trifluoroacetato-1-(3-carboxi-propoxi)-5-etil-fenanzinio, NA BM31 1144 (clorhidrato de N,N-bis-(hidroxietil)-3-metoxi-nitrosoanilina, NA BM31 1008 (N,N-bis-hidroxietil-4-nitrosoanilina) o N-N- 4-dimetil-nitrosoanilina, que están inmovilizados sobre el electrodo.
- 10 13. El electrodo enzimático tal y como se reivindica en la reivindicación 12, en el que la fructosil peptidil oxidasa se inmoviliza sobre el electrodo utilizando un fotopolímero de azida de unidad colgante soluble en agua (AWP).
- 10 14. El electrodo enzimático tal y como se reivindica en la reivindicación 12 o 13, que además comprende N,N-bis-hidroxietil-4-nitrosoanilina inmovilizada sobre el electrodo.
- 15 15. Un sensor enzimático para determinar la fructosil valina, fructosil valil histidina, un fructosil hexapéptido o HbA1c que comprende el electrodo enzimático de cualquiera de las reivindicaciones de 12 a 14 como electrodo de trabajo.

Fructosil peptidil oxidasa de *Phaeosphaeria nodorum*

MAPSRANTSVIVVGGGGTIGSSTALHLVRSGYTPSNVTVLDAYPIPSQSAGNDLNKIMG
 VSLRNPVDLQLALEARQMWNEDELFKKFFHNTGRLDCAHGEKDIADLKSGYQALVDAGLD
 ATNEWLDEDEILKRMPLLSRDQIKGWKAIFSKDGGWLAATAKAINAVGEYLRDQGVRFGF
 YGAGSFKAPLLAEGVCIQVETVDGTRYADKVVLAAGAWSPTLVELHEQCVCVSKAWVYVYGH
 QLTPEEAARYKNSPVVYNGDVGFFFEPEHEGVIKVCDEFPGFTRFKMHQPPFGAKAPKRIS
 VPRSHAKHPTDTIPDASDVSIRRAIATFMPQFKNKKMFNQAMCWCTDTADAALLICEHPE
 WKNFVLATGDSGHSFKLLPNIGKHVVELLEGLTADDLAHAWRWRPFGSDALKSRRSAPAK
 DLADMPGWNHDKPRANL

Id. de Sec. N°:1

Fig. 1

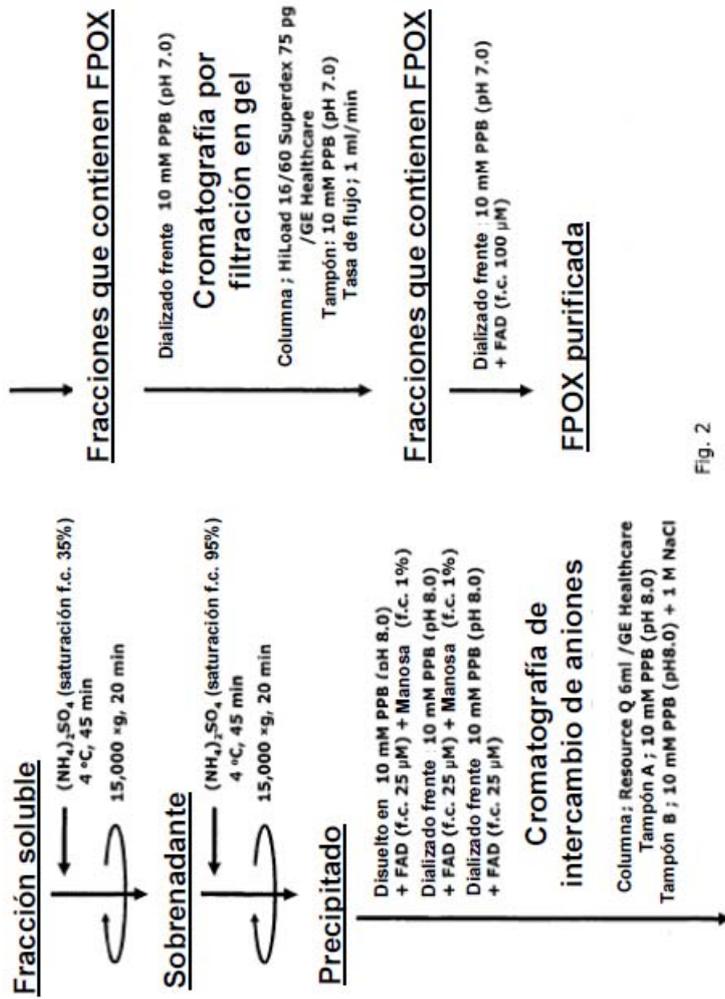


Fig. 2

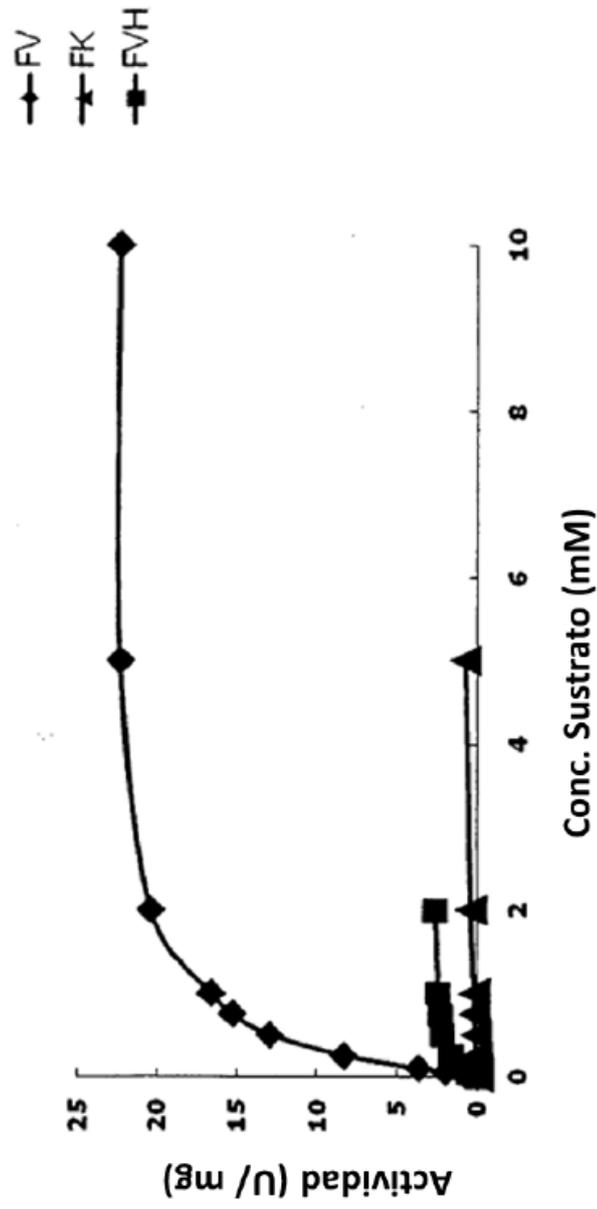


Fig. 3

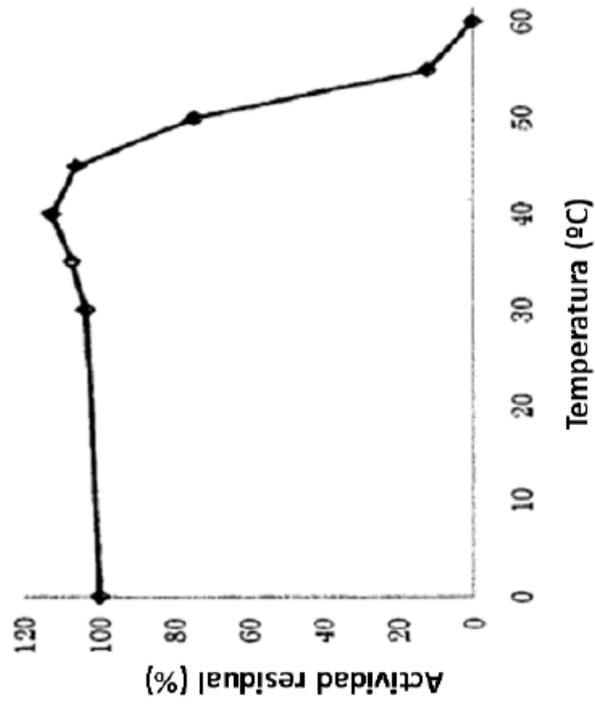


Fig. 4

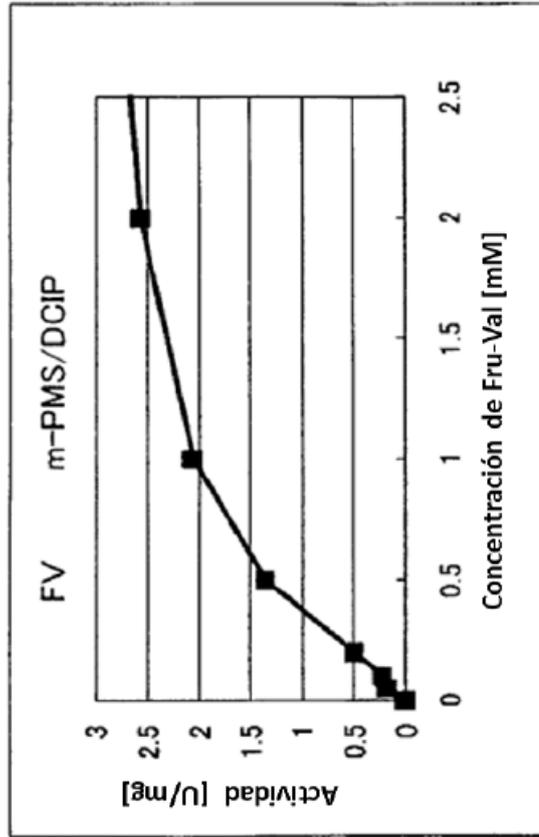


Fig. 5

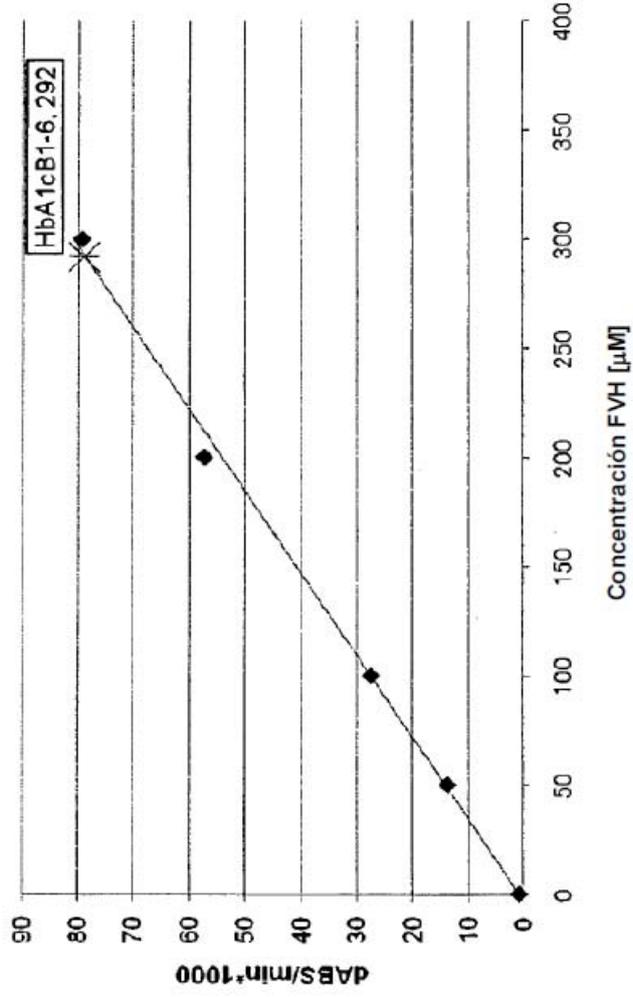


Fig. 6

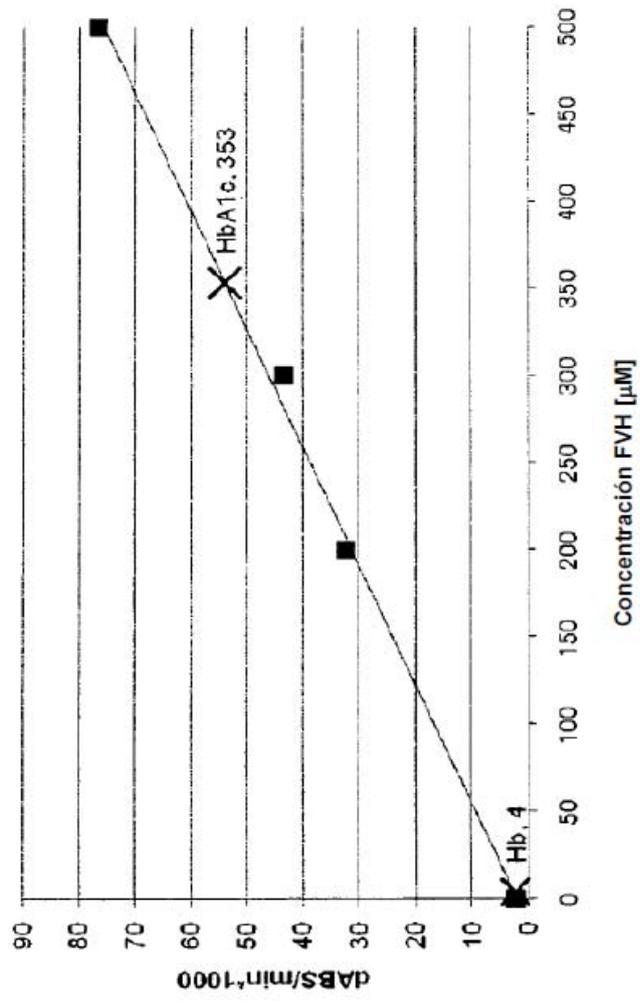


Fig. 7

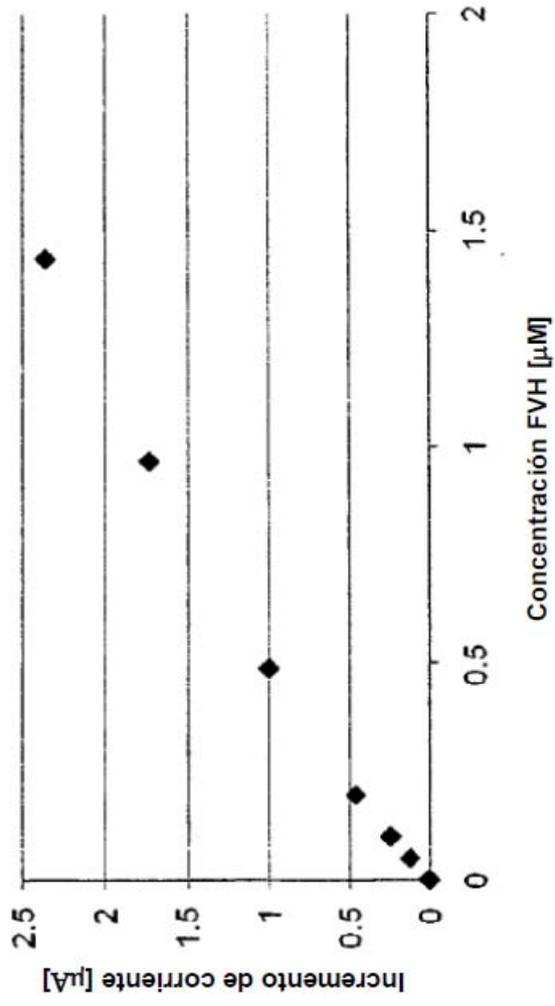


Fig. 8

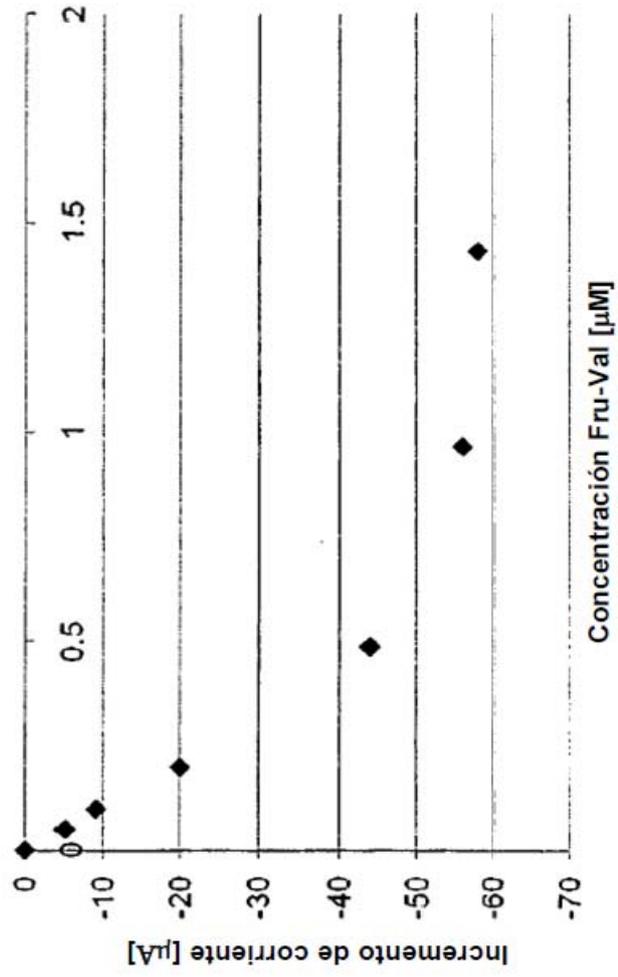


Fig. 9

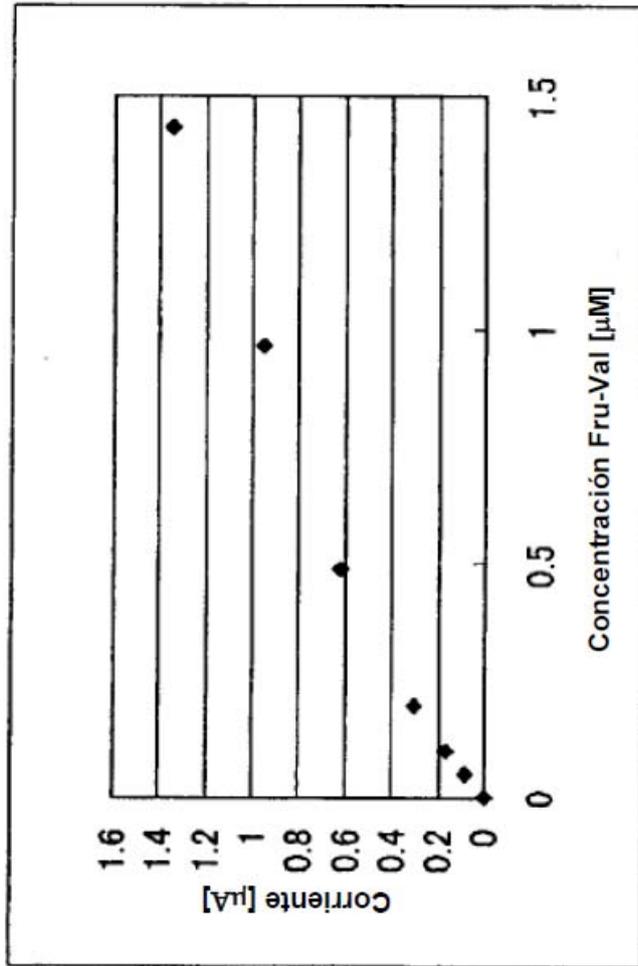


Fig. 10

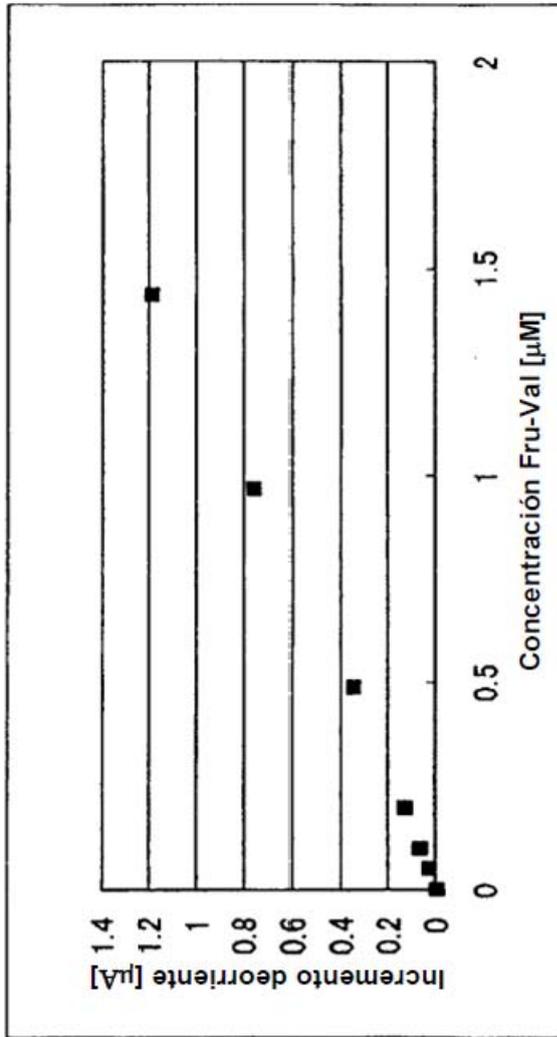


Fig. 11