

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 537 106**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/04** (2006.01)

**C12N 15/53** (2006.01)

**C12Q 1/32** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.10.2005 E 10168981 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.03.2015 EP 2251420**

54 Título: **Mutantes termoestables de la glucosa deshidrogenasa dependiente de quinona de pirroloquinolina**

30 Prioridad:

**15.10.2004 EP 04024593**

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

**02.06.2015**

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)  
Grenzacherstrasse, 124  
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**BOENITZ-DULAT, MARA;  
KRATZSCH, PETER y  
SCHMUCK, RAINER**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 537 106 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

Mutantes termoestables de la glucosa deshidrogenasa dependiente de quinona de pirroloquinolina

5 La presente invención se refiere a una proteína mutante de s-GDH dependiente de QPQ **caracterizada porque** en por lo menos una de las posiciones 122 y 124 se encuentra presente el aminoácido lisina, en la que dichas posiciones corresponden a las posiciones aminoácidas conocidas de la GDH de secuencia de tipo salvaje de *A. calcoaceticus* (SEC ID n° 2); también da a conocer genes codificantes de dicha s-GDH mutante, y diferentes aplicaciones de dichos mutantes de s-GDH, particularmente para determinar la concentración de glucosa en una muestra.

Campo de la invención:

15 La determinación de la concentración de glucosa sanguínea resulta extremadamente importante en el diagnóstico clínico y en el control de la diabetes. Aproximadamente 150 millones de personas en todo el mundo sufren la enfermedad crónica de la diabetes mellitus, un número que podría doblarse para el 2025 según la OMS. Aunque la diabetes se diagnostica y trata con facilidad, un control de largo plazo exitoso requiere herramientas diagnósticas de bajo coste que informen rápida y exactamente de las concentraciones de glucosa en sangre. Las glucosa deshidrogenasas dependientes de QPQ (EC 1.1.5.2) catalizan una reacción en la que se oxida la glucosa en gluconolactona. En consecuencia, se utiliza este tipo de enzima en la medición del azúcar en sangre. Una de dichas herramientas es una tira diagnóstica basada en la glucosa deshidrogenasa soluble (s-GlucDOR, EC 1.1.5.2), un enzima que contiene quinona de pirroloquinolina originalmente derivada de *Acinetobacter calcoaceticus*.

25 Las quinoproteínas utilizan quinona como cofactor para oxidar alcoholes, aminas y aldosas en sus lactonas, aldehídos y ácidos aldólicos correspondientes (Duine J.A., Energy generation and the glucose dehydrogenase pathway in *Acinetobacter*, en: "The Biology of *Acinetobacter*", 295 a 312, New York, Plenum Press, 1991; Duine J.A., Eur. J. Biochem. 200:271-284, 1991; Davidson V.L., en: "Principles and applications of quinoproteins", el libro completo, New York, Marcel Dekker, 1993; Anthony C., Biochem. J. 320:697-711, 1996; Anthony C. y Ghosh M., Current Science 72:716-727, 1997; Anthony C., Biochem. Soc. Trans. 26:413-417, 1998; Anthony C. y Ghosh M., Prog. Biophys. Mol. Biol. 69:1-21, 1998. Entre las quinoproteínas, aquéllas que contienen el cofactor no unido covalentemente 2,7,9-tricarboxi-1H-pirrolo[2,3-f]quinolín-4,5-diona (QPQ) constituye el subgrupo más grande (Duine, 1991, *supra*). Todas las quinona glucosa deshidrogenasas bacterianas conocidas hasta el momento pertenecen a dicho subgrupo con QPQ como cofactor (Anthony y Ghosh, *supra*, 1997; Goodwin P.M. y Anthony C., Adv. Microbiol. Physiol. 40:1-80, 1998; Anthony C., Adv. in Phot. and Resp. 15:203-225, 2004).

35 Se han caracterizado dos tipos de glucosa deshidrogenasa dependiente de QPQ (EC 1.1.5.2) en bacterias: una se encuentra unida a membrana (m-GDH); la otra es soluble (s-GDH). Ambos tipos no comparten ninguna homología significativa de secuencia (Cleton-Jansen A.M. *et al.*, Mol. Gen. Genet. 217:430-436, 1989; Cleton-Jansen A.M. *et al.*, Antonie Van Leeuwenhoek 56:73-79, 1989; Oubrie A. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96:11787-11791, 1999). También son diferentes con respecto a tanto sus propiedades cinéticas como a sus propiedades inmunológicas (Matshushita K. *et al.*, Bioscience Biotechnol. Biochem. 59:1548-1555, 1995). Las m-GDH son comunes en las bacterias Gram-negativas; sin embargo, las s-GDH se han encontrado únicamente en el espacio periplasmático de las cepas de *Acinetobacter*, tales como *A. calcoaceticus* (Duine J.A. 1991a; Cleton-Jansen A.M. *et al.*, J. Bacteriol. 170:2121-2125, 1988; Matsushita y Adachi, 1993) y *A. baumannii* (patente JP n° 11243949).

45 Mediante la búsqueda de bases de datos de secuencias, se han identificado dos secuencias homólogas de la s-GDH de *A. calcoaceticus* de longitud completa en *E. coli* K-12 y en *Synechocystis* sp. Además, también se han encontrado dos secuencias incompletas homólogas de la s-GDH de *A. calcoaceticus* en el genoma de *P. aeruginosa* y de *Bordetella pertussis* (Oubrie *et al.*, 1.999 a, b, c) y *Enterobacter intermedium* (Kim C.H. *et al.*, Current Microbiol. 47:457-461, 2003), respectivamente. Las secuencias de aminoácidos deducidas de dichas cuatro proteínas no caracterizadas se encuentran estrechamente relacionadas con la s-GDH de *A. calcoaceticus*, con muchos residuos en el sitio activo putativo absolutamente conservados. Dichas proteínas homólogas probablemente presentan una estructura similar y catalizan reacciones dependientes de QPQ similares (Oubrie *et al.*, 1999a, b, c; Oubrie A., Biochim. Biophys. Acta 1647:143-151, 2003; Reddy S. y Bruice T.C., J. Am. Chem. Soc. 126:2431-2438, 2004; Yamada M. *et al.*, Biochim. Biophys. Acta 1647:185-192, 2003).

60 Las s-GDHs y m-GDHs bacterianas se ha encontrado que presentan secuencias bastante diferentes y diferente especificidad de sustrato. Por ejemplo, *A. calcoaceticus* contiene dos glucosa deshidrogenasas dependientes de QPQ, una denominada m-GDH que se encuentra activa *in vivo*, y la otra denominada s-GDH para la que sólo puede demostrarse actividad *in vitro*. Cleton-Jansen *et al.*, 1988, 1989a, b, clonaron los genes codificantes de dos enzimas GDH y determinaron las secuencias de ADN de los dos genes GDH indicados. No existe ninguna homología evidente entre m-GDH y s-GDH que corrobora el hecho de que m-GDH y s-GDH representan dos moléculas completamente diferentes (Laurinavicius V. *et al.*, Biologija, 31-34, 2003).

65 El gen de la s-GDH de *A. calcoaceti*us ha sido clonado en *E. coli*. Tras su producción en la célula, la s-GDH se trasloca a través de la membrana citoplasmática hacia el interior del espacio periplásmico (Duine J.A., Energy

generation and the glucose dehydrogenase pathway in *Acinetobacter*, en: "The Biology of *Acinetobacter*", 295-312, 1991, New York, Plenum Press; Matsushita K. y Adachi O., Bacterial quinoproteins glucose dehydrogenase and alcohol dehydrogenase, en: "Principles and applications of Quinoproteins", 47-63, 1993, New York, Marcel Dekker). Al igual que la s-GDH nativa de *A. calcoaceticus*, la s-GDH recombinante expresada en *E. coli* es un homodímero, con una molécula de QPQ y tres iones calcio en cada monómero (Dokter P. *et al.*, *Biochem. J.* 239:163-167, 1986; Dokter P. *et al.*, *FEMS Microbiol. Lett.* 43:195-200, 1987; Dokter P. *et al.*, *Biochem. J.* 254:131-138, 1988; Olsthoorn A.J. y Duine J.A., *Arch. Biochem. Biophys.* 336:42-48, 1996; Oubrie A. *et al.*, *J. Mol. Biol.* 289:319-333, 1999; Oubrie A. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96:11787-11791, 1999; Oubrie A. *et al.*, *Embo J.* 18:5187-5194, 1999). La s-GDH oxida un amplio abanico de monosacáridos y disacáridos en las cetonas correspondientes, que se hidrolizan adicionalmente en los ácidos aldónicos, y también es capaz de donar electrones al PMS (metosulfato de fenazina), DCPIP (2,6-diclorofenolindofenol), WB (azul de Wurster) y ubiquinonas de cadena corta tales como ubiquinona Q1 y ubiquinona Q2 (Matsushita K. *et al.*, *Biochem.* 28:6276-6280, 1989; Matsushita K. *et al.*, *Antonie Van Leeuwenhoek* 56:63-72, 1989), varios aceptores electrónicos artificiales tales como metilsulfato de N-metil-fenazonio (Olsthoorn A.J. y Duine J.A., *Arch. Biochem. Biophys.* 336:42-48, 1996; Olsthoorn A.J. y Duine J.A., *Biochem.* 37:13854-13861, 1998) y polímeros electroconductores (Ye L. *et al.*, *Anal. Chem.* 65:238-241, 1993). En vista de la elevada actividad específica de la s-GDH hacia la glucosa (Olsthoorn A.J. y Duine J.A., 1996, *supra*) y su amplia especificidad de aceptor electrónico artificial, el enzima resulta muy adecuado para aplicaciones analíticas, particularmente para su utilización en (bio)sensores o tiras de ensayo para la determinación de la glucosa en aplicaciones diagnósticas (Kaufmann N. *et al.*, Development and evaluation of a new system for determining glucose from fresh capillary blood and heparinized blood, en: "Glucotrend", 1-16, 1997, Boehringer Mannheim GmbH; Malinauskas A. *et al.*, *Sensors and Actuators, B: Chemical* 100:395-402, 2004).

La oxidación de la glucosa puede ser catalizada por como mínimo tres grupos de enzimas bastante diferentes, es decir, por las glucosa deshidrogenasas dependientes de NAD/P, por las flavoproteínas glucosa oxidasas o por las quinoproteínas GDH (Duine J.A., *Biosens. Bioelectronics* 10:17-23, 1995). Se ha observado una autooxidación bastante lenta de la s-GDH reducida, demostrando que el oxígeno es un aceptor electrónico muy pobre para la s-GDH (Olsthoorn y Duine, 1996). La s-GDH puede donar eficientemente electrones desde la quinona reducida a mediadores tales como PMS, DCPIP, WB y ubiquinonas de cadena corta tales como Q1 y Q2, pero no puede donar eficientemente electrones directamente al oxígeno.

Las tiras de ensayo y sensores tradicionales para el seguimiento del nivel de glucosa en sangre, suero y orina, por ejemplo de pacientes diabéticos, utilizan la glucosa oxidasa. El rendimiento del enzima depende de la concentración de oxígeno. Las mediciones de la glucosa a diferentes altitudes con diferentes concentraciones de oxígeno en el aire pueden conducir a resultados falsos. La ventaja principal de las glucosa deshidrogenasas dependientes de QPQ es su independencia del oxígeno. Esta importante característica se comenta, por ejemplo, en la patente US nº 6.103.509, en la que se han investigado algunas características de las GDH unidas a membrana.

Una contribución importante al campo ha sido la utilización de s-GDH conjuntamente con mediadores apropiados. Se dan a conocer en detalle en la patente US nº 5.484.708 algunos métodos y dispositivos de tira de ensayo. Esta patente también contiene información detallada sobre la preparación de ensayos y la producción de tiras de ensayo basadas en s-GDH para la medición de la glucosa. Los métodos descritos en dicha patente, así como en los documentos citados, se encuentran comprendidos en la presente memoria como referencia.

Otras patentes o solicitudes relacionadas con el campo y que comprenden información específica sobre diversos modos de aplicaciones para enzimas con actividad de glucosa deshidrogenasa son los documentos nº US 5.997.817, nº US 6.057.120, nº EP 0 620 283 y nº JP 11-243949-A.

Un sistema comercial que utiliza s-GDH y un indicador que produce un cambio de color al producirse la reacción (Kaufmann *et al.*, *supra*, 1997) es el sistema Glucotrend<sup>®</sup> distribuido por Roche Diagnostics GmbH.

A pesar de las ventajas anteriormente comentadas de la utilización de una s-GDH dependiente de QPQ, también debe considerarse una desventaja para la determinación de la glucosa. El enzima presenta un espectro de sustratos bastante amplio en comparación con la m-GDH. Es decir, la s-GDH oxida no sólo la glucosa sino también varios otros azúcares, incluyendo la maltosa, la galactosa, la lactosa, la manosa, la xilosa y la ribosa (Dokter *et al.* 1986a; Oubrie A., *Biochim. Biophys. Acta* 1647:143-151, 2003). La reactividad hacia los azúcares diferentes de la glucosa puede en determinadas casos perjudicar la exactitud de la determinación de los niveles de glucosa en sangre. En particular, los pacientes sometidos a diálisis peritoneal tratados con icodextrina (un polímero de la glucosa) pueden contener en sus líquidos corporales, por ejemplo en la sangre, niveles elevados de otros azúcares, especialmente de maltosa (Wens R. *et al.*, *Perit. Dial. Int.* 18:603-609, 1998).

Por lo tanto, las muestras clínicas, por ejemplo las obtenidas de pacientes diabéticas, especialmente de pacientes con complicaciones renales y especialmente de pacientes sometidos a diálisis, pueden contener niveles significativos de otros azúcares, especialmente de maltosa. Las determinaciones de glucosa en muestras obtenidas de dichos pacientes críticos pueden resultar alteradas por la maltosa (Frampton J.E. y Plosker G.L., *Drugs* 63:2079-2105, 2003).

Existen pocos informes en la literatura sobre intentos para producir s-GDHs dependientes de QPQ modificadas que presenten una especificidad de sustrato alterada. Igarashi S. *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 264:820-824, 1999, informan de que la introducción de una mutación puntual en la posición Glu277 conduce a la producción de mutantes con un perfil alterado de especificidad de sustrato.

Sode, patente EP nº 1.176.202, informa de que determinadas sustituciones de aminoácidos dentro de la s-GDH conducen a una s-GDH mutante con una afinidad mejorada para la glucosa. En la patente EP nº 1.167.519, el mismo autor informa de una s-GDH mutante con una estabilidad mejorada. Además, el mismo autor informa en la patente JP nº 2004/173538 de otras s-GDHs mutantes con afinidad mejorada para la glucosa.

Kratzsch P. *et al.*, documento nº WO 02/34919, informan de que la especificidad de la s-GDH para la glucosa en comparación con otros sustratos azúcares, especialmente en comparación con la maltosa, puede mejorarse mediante sustituciones de aminoácidos en determinadas posiciones de la s-GDH. Resulta crucial una sustitución en la posición aminoácida 348. Una s-GDH mutante que comprende, por ejemplo, una glicina en la posición 348 en lugar de una treonina, tal como se encuentra presente en la s-GDH de tipo salvaje, presenta una selectividad extremadamente mejorada para el sustrato glucosa, comparado con, por ejemplo, el sustrato maltosa.

El documento nº EP-A-1 367 120 da a conocer una glucosa deshidrogenasa dependiente de pirroloquinona (GDQPQ) de *Acinetobacter calcoaceticus* con las mutaciones siguientes: Q76N, Q76E, Q76T, Q76M, Q76G, Q76K; 349. Estos mutantes presentan menos actividad sobre los disacáridos y/o una mayor estabilidad térmica que la GDQPQ de tipo salvaje (ver las Tablas 2, 6, 9 y 14, y las reivindicaciones 1 a 30).

Sin embargo, mientras que se ha informado de bastantes mejoras en la especificidad de glucosa, aparentemente dichas mejoras frecuentemente corren en paralelo con una estabilidad reducida de la s-GDH. Por ejemplo, se ha puesto de manifiesto que la especificidad mejorada de un mutante de s-GDH que comprende una sustitución de aminoácido en la posición 348 se produce a expensas de una menor estabilidad, especialmente a expensas de una menor estabilidad térmica. Sin embargo, la estabilidad resulta crucial, por ejemplo durante la producción y para un almacenamiento de largo plazo, por ejemplo de tiras de ensayo de glucosa.

Por lo tanto, existe una gran demanda y necesidad clínica de formas mutantes de la s-GDH que proporcionen una estabilidad térmica razonable o tanto una estabilidad térmica razonable como una especificidad mejorada para la glucosa como sustrato.

Es el objetivo de la presente invención proporcionar nuevos mutantes o variantes de la s-GDH con una estabilidad térmica mejorada significativamente en comparación con el enzima de tipo salvaje o en comparación con un mutante que presente especificidad mejorada pero una estabilidad reducida.

Se ha encontrado que resulta posible mejorar significativamente la estabilidad térmica de la s-GDH de tipo salvaje, así como de mutantes de s-GDH diseñados para una especificidad mejorada para la glucosa, por ejemplo de una s-GDH mutada en la posición 348, y por lo menos superar parcialmente los problemas anteriormente indicados.

La estabilidad térmica se ha mejorado significativamente al proporcionar una s-GDH mutante según la presente invención tal como se describe en detalle posteriormente en la presente memoria y en las reivindicaciones adjuntas. Debido a la estabilidad térmica mejorada de las nuevas formas de s-GDH, ha resultado posible realizar un avance técnico significativo en las determinaciones de la glucosa en diversos campos de aplicación.

Los mutantes de s-GDH mejorados según la presente invención pueden utilizarse de manera muy ventajosa para la detección o medición específica de la glucosa en muestras biológicas, especialmente utilizando dispositivos de tira de ensayo o biosensores.

#### Descripción resumida de la invención:

La presente invención se refiere a una proteína mutante de s-GDH dependiente de QPG **caracterizada porque** en por lo menos una de las posiciones 122 y 124 se encuentra presente el aminoácido lisina, en la que dichas posiciones corresponden a las posiciones aminoácidas conocidas de la s-GDH de secuencia de tipo salvaje de *A. calcoaceticus* (SEC ID nº 2).

Las secuencias polinucleótidas codificantes de una proteína mutante de s-GDH según la presente invención, así como un vector de expresión que comprende dicha secuencia polinucleótida y una célula huésped que comprende dicho vector de expresión también representan realizaciones preferentes de la invención.

La invención se refiere además a la utilización de un mutante según la presente invención en un método de medición de la glucosa, especialmente utilizando un dispositivo de tiras de ensayo o con un biosensor.

Los ejemplos, referencias, listado de secuencias y figuras siguientes se proporcionan con el fin de ayudar a la comprensión de la presente invención, el alcance real de la cual se proporciona en las reivindicaciones adjuntas.

Debe entenderse que resulta posible llevar a cabo modificaciones de los procedimientos indicados sin apartarse del espíritu de la invención.

Descripción de las figuras

- 5  
 Figura 1: Las secuencias proteicas de la s-GDH dependiente de QPG de *A. calcoaceticus* (parte superior) y de la s-GDH de *A. baumannii* (parte inferior) alineadas según la homología de secuencia.
- 10  
 Figura 2: Ilustración del vector pACSGDH al que se hace referencia en el Ejemplo 1 que contiene las secuencias de ADN de tipo salvaje o mutadas, respectivamente, de la glucosa deshidrogenasa soluble dependiente de QPQ.
- 15  
 Figura 3: Secuencia de nucleótidos (ADN) del vector pACSGDH al que se hace referencia en el Ejemplo 1 que contiene la secuencia de ADN de tipo salvaje de la glucosa deshidrogenasa soluble dependiente de QPQ (SEC ID nº 16).

Descripción detallada de la invención:

20  
 En una primera realización, la invención se refiere a una proteína mutante de s-GDH dependiente de QPQ caracterizada porque en por lo menos una de las posiciones 122 y 124 se encuentra presente el aminoácido lisina, en la que dichas posiciones corresponden a las posiciones aminoácidas conocidas de la s-GDH de secuencia de tipo salvaje de *A. calcoaceticus* (SEC ID nº 2).

25  
 Tal como se ha comentado anteriormente, dos tipos de enzima quinoproteína completamente diferentes con actividad de glucosa deshidrogenasa (unida membrana y soluble) se agrupan juntas bajo EC 1.1.5.2. Estos dos tipos aparentemente no están relacionados entre sí.

30  
 Para el propósito de la presente invención únicamente resulta relevante la forma soluble de GDH (s-GDH) y las variantes mejoradas de la misma se comentan posteriormente en la presente memoria.

35  
 Es conocido de la técnica que la secuencia de ADN de tipo salvaje de una glucosa deshidrogenasa soluble dependiente de QPQ puede aislarse a partir de cepas de *Acinetobacter*. Resulta más preferente el aislamiento a partir de la cepa LMD 79.41 tipo *Acinetobacter calcoaceticus*. La secuencia polipeptídica de dicha s-GDH de tipo salvaje (la proteína madura) se proporciona en SEC ID nº 2 y la secuencia de ADN, en SEC ID nº 1, respectivamente. También pueden utilizarse otras cepas LMD de *Acinetobacter* como fuente de s-GDH de tipo salvaje. Dichas secuencias pueden alinearse con la secuencia obtenida de *A. calcoaceticus* y realizar las comparaciones entre las secuencias. Aparentemente también resulta viable cribar bibliotecas de ADN de otras cepas bacterianas, tales como, por ejemplo, las descritas para *E. coli* K-12 (Oubrie A. *et al.*, J. Mol. Biol. 289:319-333, 1999) e identificar las secuencias relacionadas con s-GDH en dichos genomas. Dichas secuencias y secuencias homólogas no identificadas todavía pueden utilizarse para generar variantes de s-GDH con estabilidad térmica mejorada.

40

45  
 Los resultados de la presente invención se describen en mayor detalle haciendo referencia a las posiciones aminoácidas conocidas de la secuencia SEC ID nº 2, la secuencia de tipo salvaje de s-GDH aislada del tipo de la cepa LMD 79.41 de *Acinetobacter calcoaceticus*. Las posiciones aminoácidas en aislados de diferentes s-GDH correspondientes a las posiciones en la secuencia SEC ID nº 2 se identifican fácilmente mediante la comparación entre las secuencias apropiadas.

50  
 La alineación múltiple y comparación de una secuencia de s-GDH con la secuencia de tipo salvaje de la secuencia SEC ID nº 2 preferentemente se lleva a cabo con el programa PileUp de la versión 10.2 del paquete del GCG (Genetics Computer Group, Inc.). PileUp crea una alineación de múltiples secuencias utilizando una simplificación del método de alineación progresiva de Feng D.F. y Doolittle R.F., J. Mol. Evol. 25:351-360, 1987, y las matrices de puntuación para residuos aminoácidos idénticos, similares o diferentes se definen de acuerdo con lo anteriormente expuesto. Este procedimiento se inicia con la alineación por parejas de las dos secuencias más similares, produciendo una agrupación de dos secuencias alineadas. A continuación, esta agrupación puede alinearse con la siguiente secuencia o agrupación de secuencias alineadas más relacionada. Pueden alinearse dos agrupaciones de secuencias mediante una simple extensión de la alineación por parejas de dos secuencias individuales. La alineación final se consigue mediante una serie de alineaciones progresivas por parejas que incluye secuencias y agrupaciones crecientemente diferentes, hasta incluir todas las secuencias en la alineación por parejas final. De esta manera, las posiciones aminoácidas en otras moléculas homólogas de s-GDH pueden identificarse fácilmente como correspondientes a las posiciones proporcionadas para la s-GDH de *A. calcoaceticus* en la secuencia SEC ID nº 2. Debido a lo anterior, las posiciones aminoácidas proporcionadas en la presente memoria deben entenderse como posiciones aminoácidas de secuencia SEC ID nº 2 ó como las posiciones correspondientes a las mismas en otra molécula homóloga de s-GDH.

55  
 60  
 65

El término “mutante” o “variante” en el sentido de la presente invención se refiere a una proteína de s-GDH que, en comparación con una secuencia de tipo salvaje correspondiente, muestra por lo menos una sustitución de aminoácido en una posición correspondiente a la posición 122 ó 124 de la secuencia SEC ID nº 2, en la que el aminoácido presente en el tipo salvaje se sustituye por lisina. La s-GDH mutante puede comprender otras sustituciones y/o deleciones y/o inserciones, con la condición de que una s-GDH mutante de la invención no difiera en más de 50 aminoácidos de la s-GDH de secuencia SEC ID nº 2, por ejemplo que muestra como máximo 50 sustituciones de aminoácido en total.

Tal como se ha indicado anteriormente, las mejoras de la especificidad de glucosa aparentemente resultan posibles principalmente a expensas de una menor estabilidad. Tal como apreciará el experto en la materia, la estabilidad podría relacionarse con diferentes aspectos, tales como la temperatura de almacenamiento y/o el tiempo de almacenamiento, respectivamente. Los modelos de estrés térmico a corto plazo se utilizan con frecuencia para evaluar la estabilidad. La estabilidad según la presente invención se evalúa en dicho modelo de estrés térmico a corto plazo y se denomina de esta manera, estabilidad térmica. La estabilidad térmica se determina mediante la medición de la actividad del enzima s-GDH no estresado y estresado en una muestra. Fijando la actividad no estresada de la muestra en 10%, puede calcularse en porcentaje la actividad restante tras el tratamiento de estrés. Para los mutantes de s-GDH con especificidad de sustrato mejorada se seleccionaron las condiciones de 65°C durante 30 minutos. Mediante la utilización de estas condiciones, el enzima de tipo salvaje presentaba aproximadamente 80% de su actividad original, mientras que la mayoría de los mutantes con especificidad mejorada para la glucosa presentan únicamente 10% o menos de su actividad enzimática inicial tras llevar a cabo dicho modelo de estrés a corto plazo.

Se ha encontrado que dos posiciones de la s-GDH aparentemente resultan cruciales para conseguir mejoras significativas en términos de estabilidad térmica, es decir, las posiciones 122 y 124. También se ha encontrado que únicamente la sustitución por uno de los 20 aminoácidos naturales, el aminoácido lisina, presenta un efecto drástico sobre la estabilidad térmica. La sustitución por la lisina en la posición 122 y/o 124 mejora la estabilidad térmica del enzima s-GDH de tipo salvaje. El enzima de tipo salvaje es bastante estable pero la estabilidad térmica se mejora adicionalmente con una lisina en la posición 122 y/o 124. Lo que resulta de relevancia significativa es el hecho de que se ha encontrado que dichas sustituciones también presentan un efecto pronunciado sobre la estabilidad térmica de mutantes que previamente habían sido generados para mejorar la especificidad para la glucosa, aunque a expensas de una estabilidad térmica reducida.

En una realización preferente, la s-GDH mutante según la presente invención comprende una lisina en la posición 122, correspondiendo dicha posición a la posición 122 conocida de la s-GDH de *A. calcoaceticus* de tipo salvaje (secuencia SEC ID nº 2).

En una realización preferente, la s-GDH mutante según la presente invención comprende una lisina en la posición 124, correspondiendo dicha posición a la posición 124 conocida de la s-GDH de *A. calcoaceticus* de tipo salvaje (SEC ID nº 2).

En todavía otra realización preferente, la s-GDH mutante según la presente invención comprende una lisina en las posiciones 122 y 124, correspondiendo dichas posiciones a las posiciones 122 y 124, respectivamente, conocidas de la s-GDH de tipo salvaje de *A. calcoaceticus* (SEC ID nº 2).

Tal como se ha indicado anteriormente, resulta crucial que pueda mejorarse la estabilidad térmica de las s-GDH mutantes con especificidad mejorada para la glucosa, por ejemplo de los mutantes dados a conocer en el documento nº WO 02/34919. Se ha encontrado y se ha demostrado que lo anterior puede conseguirse mediante la sustitución de los aminoácidos naturales por una lisina en la posición 122 y/o 124. En una realización muy preferente, por lo tanto, la presente invención se refiere a una s-GDH mutante que comprende una lisina en la posición 122 y/o 124 y que además comprende una o más otras modificaciones que conducen a una especificidad mejorada para la glucosa, especialmente en comparación con la maltosa.

Un mutante preferente según la presente invención **se caracteriza porque**, respecto al enzima s-GDH de tipo salvaje tal como se aísla a partir de *A. calcoaceticus*, presenta una especificidad para el sustrato mejorada en por lo menos dos veces para la glucosa en comparación con por lo menos otro sustrato azúcar seleccionado, y simultáneamente presenta una estabilidad térmica que es por lo menos 20% de la estabilidad térmica medida para el enzima de tipo salvaje.

Con el fin de calcular la especificidad de sustrato o la reactividad cruzada, un modo sencillo es fijar la actividad medida con glucosa como sustrato en 100% y comparar la actividad medida con el otro azúcar seleccionado con el valor obtenido con glucosa. En ocasiones, con el fin de evitar redundancias, se utiliza simplemente el término especificidad sin hacer especial referencia a la glucosa, por una parte, y otro sustrato azúcar seleccionado, por otra parte.

El experto en la materia podrá apreciar que la comparación entre actividades enzimáticas se realiza mejor a concentraciones equimolares de las moléculas de sustrato investigadas utilizando condiciones de ensayo bien definidas. De otro modo deberán realizarse correcciones para las diferencias de concentración.

Deben seleccionarse condiciones de ensayo estandarizadas y bien definidas con el fin de evaluar (las mejoras de) la especificidad de sustrato. La actividad enzimática de la s-GDH para la glucosa como sustrato, así como para otros sustratos azúcar seleccionados, se mide tal como se describe en la sección de Ejemplos.

Basándose en dichas mediciones de la actividad enzimática para la glucosa o para un azúcar diferente seleccionado, preferentemente la maltosa, se evalúa la reactividad cruzada (y las mejoras de la misma).

La reactividad (cruzada) de la s-GDH para un azúcar seleccionado en porcentaje se calcula como:

$$\text{Reactividad cruzada [\%]} = (\text{actividad con azúcar seleccionado} / \text{actividad con glucosa}) \times 100\%$$

Se determinó como aproximadamente 105% la reactividad (cruzada) para la maltosa de la s-GDH de tipo salvaje según la fórmula anteriormente indicada (ver el Ejemplo 7).

La especificidad (mejorada) se calculó según la fórmula siguiente:

$$\text{especificidad (mejora)} = \frac{\text{mutante de actividad con glucosa} \quad \text{actividad con azúcar selec.-tipo salvaje}}{\text{mutante de actividad con azúcar selec.} \quad \text{actividad con glucosa-tipo salvaje}} \times \dots$$

En comparación con el enzima de tipo salvaje, una forma de s-GDH con una mejora de por lo menos 10 veces de especificidad para la glucosa frente a la maltosa (maltosa/glucosa) con maltosa como sustrato presenta, de acuerdo con lo anterior, como máximo 10,5% de la actividad medida con glucosa como sustrato. Alternativamente, en el caso de que, por ejemplo, una s-GDH mutante presente una reactividad cruzada para la maltosa de 20% (determinada y calculada tal como se ha indicado anteriormente), dicho mutante en comparación con la s-GDH de tipo salvaje presenta, por lo tanto, una especificidad de sustrato (maltosa/glucosa) mejorada en 5,25 veces.

La expresión "actividad específica" para un sustrato es bien conocida de la técnica, preferentemente se utiliza para describir la actividad enzimática por unidad de cantidad de proteína. Diversos métodos son conocidos de la técnica para la determinación de la actividad específica de las moléculas de GDH, utilizando glucosa u otros azúcares como sustratos (Igarashi S. *et al.*, *supra*, 1999). Un método preferente disponible para dicha medición se describe en detalle en el Ejemplo 8.

Aunque resulta posible seleccionar muchas moléculas de azúcar diferentes e investigar la especificidad para la glucosa de la sGDH en comparación con cualquiera de dichas moléculas de azúcar seleccionadas, resulta preferente seleccionar una molécula de azúcar clínicamente relevante para dicha comparación. Los azúcares seleccionados preferentes se seleccionan de entre el grupo que consiste de manosa, alosa, galactosa, xilosa y maltosa. Preferentemente, se selecciona la maltosa o la glucosa y se somete a ensayo una s-GDH mutante para especificidad de sustrato mejorada para la glucosa en comparación con la galactosa o la maltosa. En una realización adicionalmente preferente, el azúcar seleccionado es la maltosa.

En una realización preferente, una proteína mutante de la s-GDH dependiente de QPQ según la presente invención comprende una lisina en la posición 122 y/o 124 y además una o más sustituciones de aminoácido en una o más posiciones seleccionadas de entre el grupo que consiste de las posiciones 16, 22, 65, 76, 116, 120, 127, 143, 168, 169, 171, 177, 224, 227, 230, 231, 245, 246, 255, 277, 287, 294, 295, 299, 302, 305, 307, 308, 317, 321, 323, 341, 348, 349, 354, 355, 364, 378, 422, 425, 428 y 438. La mayoría de las posiciones anteriormente indicadas se ha demostrado previamente que influyen sobre la especificidad de la s-GDH para la glucosa en comparación con otros azúcares seleccionados, especialmente en comparación con el sustrato maltosa. La exposición total de la patente WO n° 02/34919 se incluye en la presente memoria como referencia.

Tal como se describe en el documento n° WO 02/34919, una sustitución del aminoácido en la posición 348 de la secuencia de la s-GDH correspondiente a la secuencia de tipo salvaje aislada a partir de *A. calcoaceticus*, puede utilizarse para mejorar significativamente la especificidad para la glucosa de la s-GDH. En una realización especialmente preferente, la presente invención se refiere a una s-GDH mutante que comprende una lisina en la posición 122 y/o 124 y una sustitución de aminoácido en la posición 348. Preferentemente, el residuo treonina en la posición 348 se sustituye por un residuo aminoácido seleccionado de entre el grupo que consiste de alanina, glicina y serina. En una realización más preferente, se utiliza glicina para sustituir la treonina en la posición 348. El término T348G es conocido por el experto en la materia e indica que la treonina en la posición 348 ha sido sustituida por glicina.

En una realización preferente adicional, la s-GDH variante que comprende una lisina en la posición 122 y/o 124 **se caracteriza porque** el residuo aminoácido asparagina en la posición 428 se sustituye por un residuo aminoácido seleccionado de entre el grupo que consiste de leucina, prolina y valina. Resulta más preferente la sustitución en la posición 428 por prolina.

Un grupo de variantes de s-GDH preferentes según la presente invención que comprenden una lisina en la posición 122 y/o 124 adicionalmente **se caracteriza porque** el residuo aminoácido treonina en la posición 348 y el aminoácido asparagina en la posición 428 han sido sustituidos, en el que las sustituciones preferentes son las que se han indicado de manera general anteriormente.

Los mutantes según la presente invención que comprenden una lisina en la posición 122 y/o 124 opcionalmente pueden modificarse adicionalmente para que comprendan una o más sustituciones de aminoácido en las posiciones aminoácidas correspondientes a las posiciones 169, 171, 245, 341 y/o 349 de la s-GDH de secuencia de tipo salvaje conocida de *A. calcoaceticus* (SEC ID nº 2).

En el caso de que el aminoácido correspondiente a la posición 169 de la s-GDH de secuencia de tipo salvaje conocida de *A. calcoaceticus* (SEC ID nº 2) se haya sustituido en una variante de la presente invención, resulta preferente que el aminoácido natural leucina se sustituya por fenilalanina, tirosina o triptófano. Resulta más preferente la sustitución en la posición 169 por fenilalanina.

En el caso de que el aminoácido correspondiente a la posición 171 de la s-GDH de secuencia de tipo salvaje conocida de *A. calcoaceticus* (SEC ID nº 2) se haya sustituido en una variante de la presente invención, resulta preferente que se sustituya el aminoácido natural tirosina por un aminoácido seleccionado de entre el grupo que consiste de alanina, metionina y glicina. Resulta más preferente la sustitución en la posición 171 por la glicina.

En el caso de que el aminoácido correspondiente a la posición 245 de la s-GDH de secuencia de tipo salvaje conocida de *A. calcoaceticus* (SEC ID nº 2) se haya sustituido en una variante de la presente invención, resulta preferente que se sustituya el aminoácido natural ácido glutámico por ácido aspártico, asparagina o glutamina. Resulta más preferente la sustitución en la posición 245 por ácido aspártico.

En el caso de que el aminoácido correspondiente a la posición 341 de la s-GDH de secuencia de tipo salvaje conocida de *A. calcoaceticus* (SEC ID nº 2) se haya sustituido en una variante de la presente invención, resulta preferente que se sustituya el aminoácido natural metionina por valina, alanina, leucina o isoleucina. Resulta más preferente la sustitución en la posición 341 por valina.

En el caso de que el aminoácido correspondiente a la posición 349 de la s-GDH de secuencia de tipo salvaje conocida de *A. calcoaceticus* (SEC ID nº 2) se haya sustituido en una variante de la presente invención, resulta preferente que se sustituya el aminoácido natural valina por alanina o glicina. Resulta más preferente la sustitución en la posición 349 por alanina.

También se ha encontrado que resulta posible mejorar adicionalmente la especificidad de sustrato de una variante de s-GDH mediante la inserción de un aminoácido entre la posición 428 y 429. Dichos mutantes que comprenden una inserción de aminoácido entre el aminoácido 428 y el aminoácido 429 también representan un material de partida preferente para generar mutantes que muestran tanto una estabilidad mejorada como también una especificidad mejorada. En una realización preferente, la presente invención se refiere a una s-GDH mutante que comprende una lisina en la posición 122 y/o 124, así como una inserción de aminoácido entre la posición 428 y la posición 429 de la s-GDH.

En todavía otra realización preferente, la s-GDH mutante según la presente invención, además de presentar una lisina en la posición 122 y/o 124, porta una inserción entre los residuos aminoácidos 428 y 429 y comprende por lo menos dos sustituciones de aminoácido seleccionadas de entre el grupo que consiste de las posiciones 171, 245, 341, 348 y 349, correspondientes a las posiciones aminoácidas de la s-GDH de secuencia de tipo salvaje conocida de *A. calcoaceticus* (SEC ID nº 2).

En todavía otra realización preferente adicional, la s-GDH mutante según la presente invención, además de presentar una lisina en la posición 122 y/o 124, porta una inserción entre los residuos aminoácidos 428 y 429 y comprende por lo menos tres sustituciones de aminoácido seleccionadas de entre el grupo que consiste de las posiciones 171, 245, 341, 348 y 349, correspondientes a las posiciones aminoácidas de la s-GDH de secuencia de tipo salvaje conocida de *A. calcoaceticus* (SEC ID nº 2).

Tal como apreciará el experto en la materia, resulta posible realizar sustituciones de aminoácidos, por ejemplo mutaciones silenciosas, que no influyan sobre las propiedades de la s-GDH en grado significativo. La variante según la presente invención presentará, sin embargo, no más de 50 intercambios de aminoácidos en comparación con la secuencia SEC ID nº 2. Preferentemente, la variante comprenderá 20 ó menos sustituciones de aminoácidos, más preferentemente comprenderá sólo 10 sustituciones de aminoácidos o un número todavía inferior de sustituciones.



Se proporcionan algunas variantes específicas de s-GDH según la presente invención en la sección de Ejemplos. Las variantes de s-GDH con baja interferencia de glucosa y estabilidad térmica aceptable comprenden mutantes con sustituciones en las posiciones siguientes: 65+122+124+171+245+341+348+426+428+430+436, 65+122+124+171+245+341+348+426+428+430 y 122+124+171+245+246+341+348+425+428, respectivamente. Dichas tres variantes representan realizaciones preferentes adicionales de la presente invención.

El análisis de secuencias de aminoácidos ha revelado que los motivos de secuencia encontrados en la s-GDH de tipo salvaje de *A. calcoaceticus*, por una parte, y en *A. baumannii*, por la otra, aparentemente resultan muy conservadoras en torno a las posiciones 122 y 124, que resultan de gran relevancia para mejorar la estabilidad térmica tal como se ha identificado y mostrado en la presente invención.

Una variante de s-GDH dependiente de QPQ, que comprende la secuencia de aminoácidos TYNKSTD (SEC ID nº 3), en la que se sustituye la asparagina (N) o la serina (S) por una lisina representa una realización preferente de la presente invención. SEC ID nº 3 corresponde a las posiciones 120 a 126 de la s-GDH de tipo salvaje de *A. calcoaceticus* o a las posiciones 120 a 126 de la s-GDH de tipo salvaje de *A. baumannii*, aunque comprende una lisina en la posición 122 (=Xaa<sub>1</sub>) o en la posición 124 (=Xaa<sub>2</sub>) o en ambas posiciones, sustituyendo de esta manera los aminoácidos naturales asparagina y/o serina, respectivamente (*A. calcoaceticus*).

Son conocidas de la técnica numerosas posibilidades para producir proteínas mutantes. Basándose en los importantes resultados de la presente invención, que da a conocer la importancia crítica de una lisina en la posición 122 y/o 124 de una s-GDH mutante, el experto en la materia ahora podría producir fácilmente variantes apropiadas adicionales de s-GDH que porten ésta y otras modificaciones favorables. Dichas variantes pueden obtenerse, por ejemplo, mediante los métodos conocidos como mutagénesis aleatoria (Leung D.W. *et al.*, Technique 1:11-15, 1989) y/o mutagénesis sitio-dirigida (Hill D.E. *et al.*, Methods Enzymol. 155 (1987) 558-568). Un método alternativo para producir una proteína con las propiedades deseadas es proporcionar constructos quiméricos que contienen elementos de secuencia procedentes de por lo menos dos fuentes diferentes o para sintetizar por completo un gen de s-GDH apropiado. Dichos procedimientos conocidos de la técnica pueden utilizarse en combinación con la información dada a conocer en la presente invención para proporcionar mutantes o variantes de s-GDH que comprenden, por ejemplo, sustituciones adicionales de aminoácidos en combinación con la importancia crítica dada a conocer de una lisina en la posición 122 y/o 124, por ejemplo de la secuencia SEC ID nº 2.

Una variante de s-GDH según la presente invención puede producirse, por ejemplo, partiendo de un gen de s-GDH aislado de la cepa LMD 79.41 de tipo *Acinetobacter calcoaceticus*, así como partiendo de una secuencia homóloga. En el contexto de la presente solicitud, el término "homólogo" pretende comprender una secuencia de aminoácidos de s-GDH con una identidad de por lo menos 90% en comparación con la secuencia SEC ID nº 2. En otras palabras, tras la alineación correcta utilizando el programa PileUp, por lo menos 90% de los aminoácidos de dicha s-GDH homóloga son idénticos a los aminoácidos indicados en la secuencia SEC ID nº 2.

Se entenderá que las variaciones de las secuencias de ADN y de aminoácidos existen naturalmente, o pueden introducirse intencionadamente utilizando métodos conocidos de la técnica. Dichas variaciones pueden resultar en como máximo 10% de diferencias de aminoácidos en la secuencia total debidas a deleciones, sustituciones, inserciones, inversiones o adiciones de uno o más residuos aminoácidos en dicha secuencia en comparación con la secuencia SEC ID nº 2. Pueden realizarse dichas sustituciones de aminoácidos basándose, por ejemplo, en la similitud de polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofiliidad y/o la naturaleza anfipática de los residuos implicados. Por ejemplo, entre los aminoácidos de carga negativa se incluyen el ácido aspártico y el ácido glutámico; entre los aminoácidos de carga positiva se incluyen la lisina y la arginina; entre los aminoácidos con grupos de cabeza polar sin carga o grupos de cabeza no polares que presentan valores de hidrofiliidad similares se incluyen los siguientes: leucina, isoleucina, valina, glicina, alanina, asparagina, glutamina, serina, treonina, fenilalanina y tirosina. Entre otras variaciones contempladas se incluyen las sales y ésteres de los polipéptidos anteriormente indicados, así como los precursores de los polipéptidos anteriormente indicados, por ejemplo precursores que presentan una sustitución N-terminal, tal como metionina o N-formilmetionina que se utiliza como secuencia líder. Pueden realizarse dichas variaciones sin apartarse innecesariamente del alcance y espíritu de la presente invención.

Según procedimientos conocidos del estado de la técnica o según procedimientos proporcionados en la sección de ejemplos, resulta posible obtener secuencias polinucleótidas codificantes de cualquiera de las s-GDHs mutantes tal como se ha comentado anteriormente. Por lo tanto, la invención comprende también secuencias polinucleótidas aisladas codificantes de proteínas s-GDH mutantes según la presente invención tal como se ha indicado anteriormente.

La presente invención incluye además un vector de expresión que comprende una secuencia de ácidos nucleicos según la presente invención operablemente ligada 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 ácidos nucleicos según la presente invención operablemente ligada a una secuencia promotora capaz de dirigir su expresión en una célula huésped. Los vectores preferentes son plásmidos tales como pACSGDH mostrados en las figuras 2 y 3.

Los vectores de expresión que resultan útiles en la presente invención típicamente contienen un origen de replicación, una resistencia antibiótica para la selección, un promotor para la expresión y la totalidad o parte de la variante del gen de s-GDH. Los vectores de expresión también pueden incluir otras secuencias de ADN conocidas de la técnica, tales como secuencias de señal (para una mejora del plegado, transporte hacia el periplasma o secreción), inductores para una modulación mejor de la expresión, o sitios de corte para la clonación.

Las características del vector de expresión seleccionado deben ser compatibles con la célula huésped que debe utilizarse. Por ejemplo, durante la clonación en un sistema de células *E. coli*, el vector de expresión debería contener promotores aislados a partir del genoma de células de *E. coli* (por ejemplo *lac* o *trp*). Pueden utilizarse orígenes de replicación adecuados, tales como el origen de replicación ColE1 de plásmido. Entre los promotores adecuados se incluyen, por ejemplo, *lac* y *trp*.

También resulta preferente que el vector de expresión incluya una secuencia codificante de un marcador de selección tal como un gen de resistencia antibiótica. A modo de marcadores seleccionables puede utilizarse convenientemente la resistencia a la ampicilina o la resistencia a la canamicina. Todos dichos materiales son conocidos de la técnica y se encuentran disponibles comercialmente.

Pueden construirse vectores de expresión adecuados que contengan las secuencias codificantes y de control deseados, utilizando técnicas de ADN recombinante estándares conocidas de la técnica, muchas de las cuales se describen en Sambrook *et al.*, en: "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989.

La presente invención se refiere además a células huésped que contienen un vector de expresión que comprende una secuencia de ADN codificante de la totalidad o parte de la s-GDH mutante. Las células huésped preferentemente contienen un vector de expresión que comprende la totalidad o parte de una de las secuencias de ADN codificantes de una s-GDH mutante que presenta una o más mutaciones mostradas en los Ejemplos 2 a 8. Entre las células huésped adecuadas se incluyen, por ejemplo, *E. coli* HB101 (ATCC nº 33694) disponibles de Promega (2800 Woods Hollow Road, Madison, WI, USA), XL1-Blue MRF', disponible de Stratagene (11011 North Torrey Pine Road, La Jolla, CA, USA) y similares.

Pueden introducirse vectores de expresión en células huésped mediante diversos métodos conocidos de la técnica. Por ejemplo, la transformación de células huésped con vectores de expresión puede llevarse a cabo mediante el método de transformación de protoplasto mediada por polietilenglicol (Sambrook *et al.*, *supra*, 1989). Sin embargo, también pueden utilizarse otros métodos para introducir vectores de expresión en células huésped, por ejemplo la electroporación, la inyección de bolo, o la fusión de protoplasto.

Tras introducir un vector de expresión que contiene una variante de s-GDH en una célula huésped apropiada, ésta puede cultivarse bajo condiciones que permitan la expresión de las variantes de s-GDH deseadas. Las células huésped que contienen el vector de expresión deseado con la secuencia de ADN codificante de la totalidad o parte de la s-GDH mutante pueden identificarse fácilmente mediante selección con antibióticos. La expresión de las variantes de s-GDH puede identificarse mediante diferentes métodos, tales como la medición de la producción de transcritos de ARNm de s-GDH, la detección del producto génico inmunológicamente, o la detección de la actividad enzimática del producto génico. Preferentemente se utiliza un ensayo enzimático.

La presente invención también enseña la generación y cribado de mutantes de s-GDH. La mutagénesis aleatoria y la mutagénesis de saturación se llevan a cabo tal como es conocido de la técnica. Las variantes se criban para estabilidad térmica (actividad sin tratamiento de estrés térmico en comparación con la actividad restante tras el tratamiento de estrés térmico). Las condiciones de ensayo seleccionadas se adaptan para garantizar que puedan medirse las pequeñas mejoras esperadas producidas por, por ejemplo, la sustitución de un único aminoácido. Un modo preferente de selección o cribado de mutantes apropiados se proporciona en el Ejemplo 3. Cualquier cambio o mejora en comparación con el enzima de partida (mutante o de tipo salvaje) puede detectarse claramente.

Evidentemente debe entenderse que no todos los vectores de expresión y secuencias reguladoras de ADN funcionarán igualmente bien para expresar las secuencias de ADN de la presente invención. Asimismo, tampoco funcionarán bien con el mismo sistema de expresión todas las células huésped. Sin embargo, un experto ordinario en la materia realizará una selección apropiada de entre los vectores de expresión, secuencias reguladoras de ADN y células huésped utilizando las guías proporcionadas en la presente memoria sin necesidad de experimentación indebida.

La invención también se refiere a un procedimiento para producir variantes de s-GDH de la presente invención, que comprende cultivar una célula huésped de la invención bajo condiciones adecuadas para la producción de la s-GDH mutante de la invención. Para las células huésped bacterianas, las condiciones de cultivo típicas son un medio líquido que contiene fuentes de carbono y nitrógeno, y el agente antibiótico y de inducción adecuado (dependiendo del vector de expresión utilizado). Entre los antibióticos apropiados típicos se incluyen ampicilina, canamicina,

cloranfenicol, tetraciclina y similares. Entre los agentes de inducción típicos se incluyen IPTG, glucosa, lactosa y similares.

5 Resulta preferente que los polipéptidos de la presente invención se obtengan mediante la producción en células huésped que expresan una secuencia de ADN codificante de la s-GDH mutante. Los polipéptidos de la presente invención también pueden obtenerse mediante traducción *in vitro* del ARNm codificado por una secuencia de ADN codificante de la s-GDH mutante. Por ejemplo, las secuencias de ADN pueden sintetizarse tal como se ha indicado anteriormente e insertarse en un vector de expresión adecuado que, a su vez, puede utilizarse en un sistema de transcripción/traducción *in vitro*.

10 Un vector de expresión que comprende un polinucleótido aislado tal como se ha definido e indicado anteriormente operablemente ligado a una secuencia promotora capaz de promover su expresión en un sistema de síntesis de péptidos libre de células representa otra realización preferente de la presente invención.

15 Los polipéptidos producidos mediante, por ejemplo, procedimientos tales como los indicados anteriormente, seguidamente pueden aislarse y purificarse utilizando diversas técnicas rutinarias de purificación de proteínas. Por ejemplo pueden utilizarse procedimientos cromatográficos tales como la cromatografía de intercambio iónico, la cromatografía de filtración en gel y la cromatografía de afinidad.

20 Unas de las aplicaciones principales de las variantes de s-GDH mejoradas de la presente invención es la utilización en tiras de ensayo para el seguimiento del nivel de glucosa en sangre en pacientes diabéticos. La insensibilidad de la glucosa deshidrogenasa dependiente de QPQ al oxígeno resulta, tal como se ha comentado anteriormente, una gran ventaja sobre la glucosa oxidasa. La interferencia debido a, por ejemplo, la maltosa, la galactosa y/o otros azúcares relacionados que pueden encontrarse presentes en una muestra que debe analizarse, ahora puede reducirse significativamente utilizando las nuevas variantes de s-GDH que presentan tanto una estabilidad térmica mejorada como también una especificidad mejorada hacia la glucosa. Evidentemente deben investigarse muchos tipos de muestra. Los líquidos corporales tales como suero, plasma, líquido intestinal u orina son fuentes preferentes para dichas muestras.

30 La invención también comprende un método para detectar, determinar o medir la glucosa en una muestra utilizando una s-GDH mutante según la presente invención. Resulta especialmente preferente que el método mejorado de detección de glucosa en una muestra **se caracteriza porque** dicha detección, determinación o medición de la glucosa se lleva a cabo utilizando un dispositivo sensor o de tira de ensayo.

35 También se encuentra comprendido dentro del alcance de la presente invención un dispositivo para la detección o medición de glucosa en una muestra que comprende una s-GDH mutante según la presente invención, así como otros reactivos necesarios para dicha medición.

40 Las variantes de s-GDH con estabilidad térmica mejorada de la presente invención también pueden utilizarse muy ventajosamente en biosensores (D'Costa E.J. *et al.*, Biosensores 2:71-87, 1986; Laurinavicius V. *et al.*, Analytical Letters 32:299-316, 1999; Laurinavicius V. *et al.*, Monatshefte fuer Chemie 130:1269-1281, 1999; Malinauskas A. *et al.*, Sensors and Actuators, B: Chemical 100:395-402, 2004) para el seguimiento en línea de la glucosa en una muestra o en un reactor. Con este fin, las variantes de s-GDH pueden utilizarse, por ejemplo, para recubrir un electrodo vítreo insensible al oxígeno con un complejo de osmio que contiene una red epoxi de conducción redox (Ye *et al.*, *supra*, 1993) para la determinación más exacta de la concentración de glucosa.

50 En los ejemplos siguientes, todos los reactivos, enzimas de restricción y otros materiales se obtuvieron de Roche Diagnostics Alemania, a menos que se especifiquen otras fuentes comerciales, y se utilizaron según las instrucciones proporcionadas por los proveedores. Las operaciones y métodos utilizados para la purificación, caracterización y clonación del ADN son bien conocidos de la técnica (Ausubel F. *et al.*, en: "Current protocols in molecular biology" (Wiley, 1994)) y pueden adaptarse según requiera el experto en la materia.

55 Los ejemplos siguientes ilustran en mayor detalle la presente invención. Estos ejemplos no pretenden limitar el alcance de la presente invención, sino proporcionar una mejor comprensión de la misma.

### Ejemplo 1

#### **Clonación y expresión en *E. coli* de glucosa deshidrogenasa soluble dependiente de QPQ de tipo salvaje de *A. calcoaceticus***

60 El gen s-GDH se aisló a partir de la cepa LMD 79.41 de *Acinetobacter calcoaceticus* siguiendo procedimientos estándares. Se subclonó el gen s-GDH de tipo salvaje en un plásmido que contenía el promotor *mgI* para la expresión ajustable (ver la solicitud de patente nº WO 88/09373). El nuevo constructo se denominó pACSGDH (ver las figuras 2 y 3). Se introdujeron los plásmidos recombinantes en un organismo huésped seleccionado del grupo de *E. coli*. A continuación estos organismos se cultivaron bajo condiciones apropiadas y se seleccionan las colonias que mostraban actividad de s-GDH.

Se aisló el plásmido pACSGDH a partir de un cultivo de durante la noche de 200 ml del clon indicado anteriormente, utilizando el kit QIAGEN Plasmid Maxi (Qiagen) siguiendo el protocolo del fabricante. Se resuspendió el plásmido en 1 ml de agua bidestilada. Se determinó la concentración del plásmido utilizando un fotómetro DU 7400 de Beckman.

El rendimiento fue de 600 mg. A continuación, se determinó la calidad del plásmido mediante electroforesis de gel de agarosa.

### Ejemplo 2:

#### PCR mutagénica

Para generar mutaciones aleatorias en el gen de s-GDH, se llevó a cabo una PCR (reacción en cadena de la polimerasa) mutagénica. Se digirieron el plásmido pACSGDH y la secuencia de ADN codificante de los enzimas mutados (producto de PCR de la PCR mutagénica) con los enzimas de restricción *SphI* y *EcoRI*. Los productos se purificaron en gel. Las secuencias de ADN digeridas se ligaron nuevamente y se utilizó una alícuota de la mezcla de reacción de ligación para transformar células *E. coli* competentes. A continuación, se seleccionaron los transformantes en placas LB que contenían ampicilina. Se seleccionaron colonias individuales, se cultivaron durante la noche en medio LB que contenía ampicilina y se sometieron a cribado (ver el Ejemplo 3).

Mezcla de reacción de PCR mutagénica:

40 ng de pACSGDH 1x tampón sin MgCl<sub>2</sub> (Roche Diagnostics GmbH, nº de cat. 1699 105) dCTP, dTTP 1 mM dATP, dGTP 0,2 mM (Roche Diagnostics GmbH, nº de cat. 1969 064)

40 pmoles de cebador GF23 (5'-CGC GCA CGC GCA TGC CGC CGA TGT TC) (= SEC ID nº 4)

40 pmoles de GR23 (5'-GAC GGC CAG TGA ATT CTT TTC TA) (= SEC ID nº 5)

MnCl<sub>2</sub> 7 mM

MnCl<sub>2</sub> 0,6 mM

5 U de ADN polimerasa Taq (Roche Diagnostics GmbH, nº de cat. 1146 165) sistema de PCR de amp. genica 2400 (Perkin Elmer),

30 ciclos: 95°C durante 1 minuto, 45°C durante 2 minutos, 72°C durante 2 minutos

- Purificación de los productos de PCR utilizando el kit de purificación de productos de PCR de alta pureza de Roche Diagnostics GmbH (nº de cat. 1.732.676) siguiendo el protocolo del fabricante.

- Digestión de los fragmentos de PCR con 25 U de *SphI* (Roche Diagnostics GmbH, nº de cat. 606 120) en 1x tampón H (Roche Diagnostics GmbH, nº de cat. 1.417.991) a 37°C durante la noche; adición de 25 U de *EcoRI* (Roche Diagnostics GmbH, nº de cat. 703.737) y la digestión adicional durante 3,5 horas.

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

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

- Extracción de las moléculas de ADN utilizando el kit de extracción en gel QIAquick (Qiagen, nº de cat. 28706) siguiendo el protocolo del fabricante.

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

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

- Ligación de 100 ng de vector digerido con 140 ng de fragmentos de mPCR utilizando 1 U de ADN ligasa de T4 (Roche Diagnostics 481 220) en un volumen de 20 µl a 16°C durante la noche.

- Electroporación de células XL1F electrocompetentes (Stratagene) con 1 µl de la reacción de ligación con 2,5 kV en cubetas de 0,2 cm utilizando un *E. coli* Pulser (BioRad).

- Tras el cultivo en 1 ml de LB a 37°C durante una hora, se sembraron bacterias en placas de LB-agar más ampicilina (100 µg/ml de ampicilina) y se cultivaron durante la noche a 37°C.

- 50 % de los clones expresados produjeron s-GDH enzimáticamente activa que se sometió al método de cribado siguiente.

### Ejemplo 3:

#### Cribado para estabilidad térmica

Las colonias mutantes en las placas de agar indicadas anteriormente se introdujeron en placas de microtitulación (MTP) que contenían 200 µl de medio LB-ampicilina/pocillo y se incubaron durante la noche a 37°C. Estas placas se denominaron placas maestras.

De cada placa maestra, se transfirieron 5 µl de muestra/pocillo a una MTP que contenía 5 µl per/pocillo de B (B=reactivo de extracción de proteínas bacterianas; Pierce nº 78248) para la rotura celular y se añadieron 240 µl de quinona de pirroloquinolina (QPQ) 0,0556 mM, Hepes 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 15 mM, pH 7,0/pocillo para la activación de s-GDH. Para completar la formación del holoenzima, se incubó la MTP a 25°C durante 2 horas y a 10°C durante la noche. Esta placa se denomina placa de trabajo.

De la placa de trabajo se transfirieron 2x10 µl de muestra/cavidad a dos MTP vacías. Se sometió una MTP a un estrés térmico de corta duración (30 minutos a 70°C/incubador). Tras enfriar hasta la temperatura ambiente, se sometieron a ensayo las MTP sometidas a estrés y no tratadas con 90 µl de solución de mediador que contenía glucosa 30 mM (ver el Ejemplo 8).

Se calculó la dE/minuto y se fijó en 100% de actividad los valores de las muestras no sometidas a estrés. Los valores obtenidos con la MTP sometida a estrés térmico se compararon con los valores no tratados y se calcularon como porcentaje de actividad (por ejemplo: dE/minuto tratamiento térmico/dE no tratado)\*100). Esto es equivalente a la estabilidad térmica del enzima (variante) expresada en porcentaje de actividad restante. Con el fin de compensar las desviaciones de los resultados debidas a una fluctuación en la distribución del calor en las MTP durante la incubación, se añadió enzima de tipo salvaje como referencia a cada placa en cavidades dedicadas.

Se identificó el mutante siguiente:

Enzima	% de actividad restante tras 30 minutos a 70°C	Intercambios de aminoácidos
Tipo salvaje	3-20 %	-
Mutante A	9-30 %	N122K, L202I

La variabilidad de la actividad restante se debe a la distribución irregular del calor en los pocillos en la MTP y a la degradación del holoenzima durante el calentamiento a apoenzima y coenzima y el reensamblado espontáneo a holoenzima tras el estrés térmico. Sin embargo, el mutante A mostró consistentemente un valor más alto de la actividad enzimática restante que el enzima de tipo salvaje.

#### Ejemplo 4:

##### Secuenciación del gen codificante de la s-GDH mutante A

Se aisló el plásmido que contenía el gen para la s-GDH mutante A, que presentaba una estabilidad térmica más alta que el tipo salvaje (kit de aislamiento de plásmido de alta pureza, Roche Diagnostics GmbH, nº 1754785) y se secuenció utilizando un kit de secuenciación de pigmento-terminador ABI Prism y secuenciador ABI 3/73 y 3/77 (Amersham Pharmacia Biotech).

Se utilizaron los cebadores siguientes:

Cadena de sentido:

GDH 1: 5'-TTA ACG TGC TGA ACA GCC GG-3' (= SEC ID nº 6) GDH 2: 5'-ATA TGG GTA AAG TAC TAC GC -3' (= SEC ID nº 7)

#### Resultado:

Se encontraron los intercambios de aminoácidos del mutante A ya listados en la tabla del Ejemplo 3.

#### Ejemplo 5:

##### s-GDH mutantes obtenidos mediante mutagénesis de saturación

Se llevó a cabo la mutagénesis de saturación para ver si uno o ambos intercambios de aminoácidos en el mutante A eran responsables de la mejora de la estabilidad térmica. Además, el método permite averiguar si el efecto encontrado puede potenciarse con otros intercambios de aminoácidos en las posiciones identificadas. El kit de

## ES 2 537 106 T3

mutagénesis sitio-dirigida QuikChange (Stratagene, nº de cat. 200518) se utilizó para sustituir sucesivamente aminoácidos de tipo salvaje en las posiciones 122 y 202 de la proteína s-GDH de tipo salvaje, respectivamente.

5 Los cebadores 5' y 3' utilizados para la mutagénesis eran complementarios entre sí y contenían NNN en una posición central. Dichos 3 nucleótidos sintetizados aleatoriamente, que se encuentran en la posición deseada (122 ó 202, respectivamente) se encontraban flanqueados por 12 a 16 nucleótidos en cada extremo que eran idénticos a las cadenas de ADN de sentido y antisentido del molde. En lugar del codón, el cebador contenía NNN, por lo tanto los oligonucleótidos codifican todos los codones posibles.

10 Para cada una de las posiciones 122 y 202, respectivamente, se llevó a cabo una reacción de PCR.

Las reacciones de PCR y las digestiones con endonucleasa de restricción DpnI se llevaron a cabo según el manual.

15 A continuación, se utilizó 1 µl de cada reacción para la electroporación de las células XL1F-. Se cultivaron las células y se determinaron las actividades de s-GDH tal como se ha indicado anteriormente.

Para incrementar la probabilidad estadística de que la totalidad de las 20 posibles sustituciones de aminoácidos se encontrasen cubiertas en dicha evaluación, se cribaron 200 clones (ver el Ejemplo 3) para cada posición.

20 Se utilizaron los cebadores siguientes:

para la posición 122:

Cadena de sentido 5'-TCGTTATACCTATNNNAAATCAACAGATA -3' (SEC ID nº 8) Cadena antisentido 5'-TATCTGTTGATTTNNNATAGGTATAACGA-3' (SEC ID nº 9)

25 para la posición 202:  
Cadena de sentido 5'-TAAAGTACTACGCNNNAATCTTGATGGAA-3' (SEC ID nº 10) Cadena antisentido: 5'-TTCCATCAAGATTNNNGCGTAGTACTTTA -3' (SEC ID nº 11)

### 30 Resultados:

El intercambio de aminoácido en la posición 202 no modificó la estabilidad térmica. Únicamente el tambaleo en la posición 122 produjo clones con una estabilidad térmica incrementada. El mejor intercambio era N122K.

### 35 Ejemplo 6:

#### Generación de mutantes con elevada especificidad de sustrato para la glucosa en comparación con la maltosa y estabilidad térmica incrementada

40 En el documento nº WO 02/34919 se han identificado varios intercambios de aminoácidos en diferentes posiciones de la s-GDH y se ha demostrado que incrementan la especificidad de sustrato para la glucosa en comparación con, por ejemplo, la maltosa. Las combinaciones del intercambio de aminoácido T348G con sustituciones de aminoácidos en otras posiciones, por ejemplo en las posiciones 169, 171, 245, 341 y/o 349 incrementó la especificidad de sustrato adicionalmente. Se seleccionaron algunos de dichos mutantes descritos con el fin de mejorar su estabilidad térmica mediante la introducción del intercambio de aminoácido N122K encontrado. Se consiguió la mutación puntual mediante la utilización de los cebadores siguientes. Cadena de sentido: 5'-TCGTTATACCTATAAGAAATCAACAGATA -3' (SEC ID nº 12) Cadena antisentido: 5'-TATCTGTTGATTTCTTATAGGTATAACGA-3' (SEC ID nº 13)

50 Se aplicó el mismo cribado para la estabilidad térmica, tal como en el Ejemplo 3 descrito, aunque se redujo la temperatura de incubación de 70°C a 65°C en 30 minutos.

### Resultados:

Enzima	Maltosa/Glucosa (30 mM de azúcar en %)	% de actividad restante tras 30 minutos a 65°C	Intercambios de aminoácidos
Tipo salvaje	105 %	80 %	-
Molde B/0	4 %	5 %	Y171G+E245D+M341V+ T348G+in429P
Mutante B/1	4 %	10 %	N122K+Y171G+E245D+M341V+ T348G+in429P
Molde C/0	2 %	10 %	Y171G+E245D+M341V+ T348G+A426S+N428P+Q430M
Mutante C/1	2 %	20 %	N122K+Y171G+E245D+M341V+ T348G+A426S+N428P+Q430M
Molde D/0	4 %	20 %	Y171G+E245D+Q246H+M341V+

			T348G+T425V+N428P
Mutante D/1	4 %	30 %	Y171G+N122K+E245D+Q246H+M341V+ T348G+T425V+N428P

Puede observarse claramente que en todos los tipos de mutante, el intercambio de aminoácido adicional N122K produjo un incremento de la estabilidad térmica en el modelo de estrés seleccionado sin afectar a la especificidad de sustrato.

5

#### Ejemplo 7:

#### Generación de mutantes de elevada especificidad de sustrato y estabilidad térmica adicionalmente incrementada

10

Durante el cribado para una especificidad de sustrato incrementada, tal como se describe en, por ejemplo, el documento n° WO 02/34919, la utilización de m-PCR y la mutagénesis de saturación en posiciones aleatorias, se expandió el espectro de los parámetros de cribado para la estabilidad térmica tal como se ha indicado anteriormente.

15

Partiendo de un mutante E/0 con elevada especificidad de sustrato para la glucosa en comparación con la maltosa (2%) con los intercambios de aminoácidos Y171G+E245D+M341V+ T348G+N428P, se encontró un nuevo intercambio de aminoácido S124K.

20

A continuación, se aplicó dicho nuevo intercambio a los mutantes ya mejorados que contenían N122K del Ejemplo 6, utilizando los cebadores siguientes:

Cadena de sentido: 5'-CCTATAAGAAAAGACAGATACGCTCG-3' (SEC ID n° 14)

Cadena antisentido: 5'-CGAGCGTATCTGTCTTTTCTTATAGG-3' (SEC ID n° 15)

25

#### Resultados:

Enzima	Maltosa/Glucosa (30 mM de azúcar en %)	% de actividad restante tras 30 minutos a 65°C	Intercambios de aminoácidos
Tipo salvaje	105 %	80 %	-
Mutante B/1	4 %	10 %	N122K+Y171G+E245D+M341V+ T348G+in429P
Mutante B/2	4 %	15 %	N122K+S124K+Y171G+E245D+M341 V+ T348G+in429P
Mutante C/1	2 %	20 %	N122K+Y171G+E245D+M341V+ T348G+A426S+N428P+Q430M
Mutante C/2	2 %	25 %	N122K+S124K+Y171G+E245D+M341 V+ T348G+A426S+N428P+Q430M
Mutante D/1	4 %	30 %	N122K+Y171G+E245D+Q246H+M341 V+ T348G+T425V+N428P
Mutante D/2	4 %	40 %	N122K+124K+Y171G+E245D+Q246H +M341V+ T348G+T425V+N428P
Mutante E/0	2 %	10 %	Y171G+E245D+M341V+ T348G+N428P
Mutante E/1	2 %	20 %	Y171G+S124K+E245D+M341V+T348 G+N428P

30

Los resultados anteriormente proporcionados demuestran que los intercambios de aminoácidos en las posiciones N122K y S124K presentan un efecto positivo aditivo sobre la estabilidad térmica de los mutantes.

#### Ejemplo 8:

#### Purificación de s-GDH de tipo salvaje o variante y análisis de la actividad enzimática, respectivamente

35

Se cultivaron células de *E. coli* (LB-Amp., 37°C), se recolectaron y se resuspendieron en tampón fosfato potásico, pH 7,0. Se llevó a cabo la rotura celular mediante paso a través de una prensa francesa (700 a 900 bar). Tras la centrifugación, se aplicó el sobrenadante a una columna de S-sefarosa (Amersham Pharmacia Biotec) equilibrada con tampón de fosfato potásico 10 mM, pH 7,0. Tras el lavado, se eluyó la s-GDH utilizando un gradiente salino de NaCl 0 a 1 M. Las fracciones que mostraban actividad de s-GDH se agruparon, se dializaron frente a tampón de fosfato potásico, pH 7,0, y se cromatografiaron nuevamente en una columna de S-sefarosa reequilibrada. Las fracciones activas se agruparon y se sometieron a una filtración en gel utilizando una columna Superdex® 200 (Amersham). Las fracciones activas se agruparon y tras la adición de CaCl<sub>2</sub> (concentración final: 3 mM), se

40

almacenaron a -20°C.

Ensayo enzimático y determinación de proteínas de s-GDH de tipo salvaje purificada y variante, respectivamente.

- 5 Se llevó a cabo la determinación de proteínas utilizando el reactivo de ensayo de proteínas nº 23225 de Pierce (curva de calibración con BSA, 30 min. a 37°C).

Las muestras de s-GDH se diluyeron a 1 mg de proteína/ml con quinona de pirroloquinolina (QPQ) 0,0556 mM, Hepes 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 15 mM, pH 7,0, y se incubaron a 25°C durante 30 minutos para la reconstitución o activación.

10 Tras la activación, las muestras se diluyeron con Hepes 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 15 mM, pH 7,0, hasta aproximadamente 0,02 U/ml y se añadieron 50 µl de cada muestra diluida a 1.000 µl de una solución de tampón citrato 0,2 M (pH 5,8, a 25°C) que contenía 0,315 mg de (4-(dimetilfosfinilmetil)-2-metil-pirazolo[1.5a]-imidazol-3-il)-(4-nitrosfenil)-amina (ver la patente US nº 5.484.708)/ml como mediador y azúcar 30 mM).

15 Se realizó un seguimiento de la extinción a 620 nm durante los primeros 5 minutos a 25°C.

Una actividad enzimática de una unidad corresponde al a conversión de 1 mmol de mediador/min. bajo las condiciones de ensayo anteriormente indicadas.

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

$$(\epsilon = \text{coeficiente de extinción; } \epsilon_{620 \text{ nm}} = 30[1 * \text{mmol}^{-1} * \text{cm}^{-1}])$$

Se llevó a cabo el ensayo con glucosa y maltosa (Merck, Alemania), respectivamente.

25 **Resultados:**

Enzima	M/G (30 mM de azúcar, en %)	U/mg de proteína	Intercambios de aminoácidos
Tipo salvaje	105 %	800	-
B/2	4 %	106	N122K+S124K+Y171G+E245D+M341V+ T348G+in429P
C/0	2 %	435	Y171G+E245D+M341V+ T348G+A426S+N428P+Q430M
C/2	2 %	450	N122K+S124K+Y7G+E245D+M341V+ T348G+A426S+N428P+Q430M
D/2	4 %	441	N122K+S124K+Y171G+E245D+Q246H+M 341V+ T348G+T425V+N428P

**Ejemplo 9:**

30 **Estabilidad térmica comparativa de mutantes purificados con y sin los intercambios de aminoácidos N122K y S124K**

35 Las muestras de s-GDH purificadas de tipo salvaje, y mutantes C/0 y C/2 (Ejemplo 8) se sometieron a un modelo de estrés térmico alternativo que imitaba las condiciones de estrés térmico de producción y/o transporte. Se prepararon soluciones de 1 mg de proteína enzima/fosfato potásico 20 mM, pH 7,0, 0,016 mg de QPQ/ml con el fin de activar las s-GDHs. Tras la incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente, se determinó la actividad inicial hacia la glucosa (ver el Ejemplo 8) y se incubaron las muestras en el baño de agua a 48°C. Tras 30 minutos de estrés térmico, se midió la actividad restante y se calculó en porcentaje (en comparación con la actividad inicial).

40 **Resultados:**

Enzima	Actividad restante
Tipo salvaje	99 %
C/0	66 %
C/2	94 %



El impacto de los intercambios de aminoácidos en las posiciones N122K y S124K y la mejora resultante de la estabilidad térmica pueden observarse claramente, también bajo dichas condiciones alternativas de estrés térmico.

#### Ejemplo 10:

5

#### Determinación de la glucosa en presencia o en ausencia de maltosa

La s-GDH de tipo salvaje y las variantes B/2, C/2 y D/2 de la s-GDH, respectivamente, pueden aplicarse a la determinación de la glucosa en presencia o en ausencia de maltosa. La muestra de referencia contenía 50 mg de glucosa/dl. Las muestras "de ensayo" contenían 50 mg de glucosa/dl y 100 ó 200 mg/dl de maltosa, respectivamente. Se utilizaron soluciones enzimáticas con las mismas cantidades de actividad de s-GDH (por ejemplo 5 U/ml; actividad según se determinó en el Ejemplo 8) para cada ensayo.

10

Se mezclaron en una cubeta:

15

1 ml 0,315 mg de (4-(dimetilfosfinilmetil)-2-metil-pirazolo-[1.5a]-imidazol-3-il)-(4-nitrosifenil)-amina ml/citrato 0,2 M, pH 5,8

20

0,033 ml de referencia o muestra de ensayo

25

Se inició el ensayo mediante la adición de 0,050 ml de la solución de enzima s-GDH (que presenta un exceso de s-GDH para la conversión de la glucosa) a la cubeta. Se realizó un seguimiento del cambio de la absorbancia a 620 nm. Tras 2 a 5 minutos, se observaron valores constantes y se calculó la dE/5 minutos. Se fijó en 100% el valor obtenido mediante la medición de la muestra de referencia con s-GDH de tipo salvaje. Se compararon los otros valores a dicho valor de referencia y se calcularon en %. Se detectó un nivel claramente inferior de interferencia de la maltosa en las muestras de ensayo al utilizar las nuevas variantes, también más estables, de s-GDH según la presente invención.

30

Lista de referencias

35

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) 413-417

Anthony, C., *Adv. in Phot. and Resp.* 15 (2004) 203-225

Ausubel, F., *et al.*, in "Current protocols in molecular biology" (1994), Wiley

Cleton-Jansen, A. M., *et al.*, *Antonie Van Leeuwenhoek* 56 (1989) 73-79

Cleton-Jansen, A. M., *et al.*, *J. Bacteriol.* 170 (1988) 2121-2125

Cleton-Jansen, A. M., *et al.*, *Mol. Gen. Genet* 217 (1989) 430-436

40 Davidson, V. L. in "Principles and applications of quinoproteins" (1993) the whole book, New York, Marcel Dekker

D'Costa, E. J., *et al.*, *Biosensors* 2 (1986) 71-87

Dokter, P., *et al.*, *FEMS Microbiology Letters* 43 (1987) 195-200

Dokter, P., *et al.*, *Biochem J.* 239 (1986) 163-167

Dokter, P., *et al.*, *Biochem J.* 254 (1988) 131-138

45 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., *Eur. J. Biochem.* 200 (1991) 271-284

50

EP 0 620 283

EP 1 167 519

EP 1 176 202

EP 1 367 120

Feng, D. F. and Doolittle, R. F., *J. Mol. Evol.* 25 (1987) 351-360

55 Frampton, J. E. and Plosker, G. L., *Drugs* 63 (2003) 2079-2105

Goodwin, P. M. and Anthony, C., *Adv. Microbiol. Physiol.* 40 (1998) 1-80

Hill, D. E., *et al.*, *Methods Enzymol.* 155 (1987) 558-568

Igarashi, S., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 264 (1999) 820-824

JP 11-243949-A

60

JP 2004173538

Kaufmann, N., *et al.* Development and evaluation of a new system for determining glucose from fresh capillary blood and heparinised venous blood in "Glucotrend" (1997) 1-16, Mannheim, Boehringer Mannheim GmbH

Kim, C. H. *et al.*, *Current Microbiology* 47 (2003) 457-461

Laurinavicius, V., *et al.*, *Analytical Letters* 32 (1999) 299-316

65 Laurinavicius, V., *et al.*, *Monatshefte fuer Chemie* 130 (1999) 1269-1281

Laurinavicius, V. *et al.*, *Biologija* (2003) 31-34

- Leung, D. W., *et al.*, *Technique* 1 (1989) 11-15  
 Malinauskas, A. *et al.*, *Sensors and Actuators, B: Chemical* 100 (2004) 395-402  
 Matsushita, K. and Adachi, O. Bacterial quinoproteins glucose dehydrogenase and alcohol dehydrogenase in  
 "Principles and applications of Quinoproteins" (1993) 47-63, New York, Marcel Dekker  
 5 Matsushita, K., *et al.*, *Antonie Van Leeuwenhoek* 56 (1989) 63-72  
 Matsushita, K., *et al.*, *Biochemistry* 28 (1989) 6276-6280  
 Matsushita, K., *et al.*, *Bioscience Biotechnology & Biochemistry* 59 (1995) 1548-1555  
 Olsthoorn, A. J. and Duine, J. A., *Arch. Biochem. Biophys.* 336 (1996) 42-48  
 Olsthoorn, A. J. and Duine, J. A., *Biochemistry* 37 (1998) 13854-13861  
 10 Oubrie A., *Biochim. Biophys. Acta* 1647 (2003) 143-151  
 Oubrie, A. and Dijkstra, B. W., *Protein Sci.* 9 (2000) 1265-1273  
 Oubrie, A., *et al.*, *Embo J.* 18 (1999) 5187-5194  
 Oubrie, A., *et al.*, *J. Mol. Biol.* 289 (1999) 319-333  
 Oubrie, A., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 96 (1999) 11787-11791  
 15 Reddy S, and Bruice, T.C., *J. Am. Chem. Soc.* 126 (2004) 2431-2438  
 Sambrook, J., *et al.*, in "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (1989) -, Cold Spring Harbour, NY, Cold Spring  
 Harbour Laboratory Press  
 US 5,484,708  
 US 5,997,817  
 20 US 6,057,120  
 US 6,103,509  
 Wens, R., *et al.*, *Perit. Dial. Int.* 18 (1998) 603-609  
 WO 02/34919  
 WO 88/09373  
 25 Yamada, M. *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* 1647 (2003) 185-192  
 Ye, L., *et al.*, *Anal. Chem.* 65 (1993) 238-241

LISTADO DE SECUENCIAS

- 30 <110> Roche Diagnostics GmbH F. Hoffmann-La Roche AG  
 <120> Mutantes de glucosa deshidrogenasa dependiente de quinona de pirroloquinolina  
 <130> 22804 WO  
 35 <150> EP04024593  
 <151> 2004-10-15  
 <160> 16  
 40 <170> PatentIn versión 3.2  
 <210> 1  
 <211> 1362  
 45 <212> ADN  
 <213> *Acinetobacter calcoaceticus*  
 <220>  
 <221> CDS  
 50 <222> (1)..(1362)  
 <400> 1

ES 2 537 106 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	
ggg 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	

ES 2 537 106 T3

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	
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	

ES 2 537 106 T3

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> 2  
 <211> 454  
 <212> PRT  
 <213> Acinetobacter calcoaceticus

5

<400> 2

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  
 35 40 45

Lys Ile Leu Arg Val Asn Pro Glu Ser Gly Ser Val Lys Thr Val Phe  
 50 55 60

10

ES 2 537 106 T3

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

ES 2 537 106 T3

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

Leu Lys Thr Leu Tyr Thr Val Gln Asp Thr Tyr Asn Tyr Asn Asp Pro  
 325 330 335

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

<210> 3  
 <211> 7  
 5 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220><223> secuencia de aminoácidos modificada de s-GDH entre las posiciones 120 y 126

10 <220>  
 <221> misc feature  
 <223> Asn en la posición 3 (122) y/o Ser en la posición 5 (124) se sustituyen por Lys

<400> 3

15 Thr Tyr Asn Lys Ser Thr Asp  
 1 5

<210> 4  
 <211> 26  
 20 <212> ADN

# ES 2 537 106 T3

<213> Artificial

<220>  
<220> <223> Cebador para la cadena de sentido de m-PCR

5 <400> 4  
cgcgcacgcg catgccgccg atgttc 26

<210> 5  
10 <211> 23  
<212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
15 <223> Cebador para la cadena antisentido de m-PCR

<400> 5  
gacggccagt gaattctttt cta 23

20 <210> 6  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Artificial

25 <220>  
<223> Cadena de sentido de cebador de secuenciación de GDH 1

<400> 6  
30 ttaacgtgct gaacagccgg 20

<210> 7  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Artificial

35 <220>  
<223> Cadena de sentido de cebador de secuenciación de GDH 2

<400> 7  
40 atatgggtaa agtactacgc 20

<210> 8  
<211> 29  
<212> ADN  
45 <213> Artificial

<220>  
<223> Cebador para tambaleo en la posición 122 (cadena de sentido)

50 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (14)..(16)  
<223> n is a, c, g ó t

55 <400> 8  
tcgtatacc tatnnnaaat caacagata 29

<210> 9  
<211> 29  
60 <212> ADN  
<213> Artificial

<220> <223> Cebador para tambaleo en la posición 122 (cadena antisentido)

65 <220>  
<221> misc\_feature



# ES 2 537 106 T3

<222> (14)..(16)  
<223> n is a, c, g, or t

5 <400> 9  
tatctgtga tttnnnatag gtataacga 29

10 <210> 10  
<211> 29  
<212> ADN  
<213> Artificial

<220> <223> Cebador para tambaleo en la posición 202 (cadena de sentido)

15 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (14)..(16)  
<223> n is a, c, g, or t

20 <400> 10  
taaagtacta cgcnnnaatc ttgatgaa 29

25 <210> 11  
<211> 29  
<212> ADN  
<213> Artificial

<220> <223> Cebador para tambaleo en la posición 202 (cadena antisentido)

30 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (14)..(16)  
<223> n is a, c, g ó t

35 <400> 11  
ttccatcaag atnnngcgt agtactta 29

40 <210> 12  
<211> 29  
<212> ADN  
<213> Artificial

<220> <223> Secuencia de cebador para la cadena de sentido N122K

45 <400> 12  
tcgtataacc tataagaaat caacagata 29

50 <210> 13  
<211> 29  
<212> ADN  
<213> Artificial

<220> <223> Secuencia de cebador para la cadena antisentido N122K

55 <400> 13  
tatctgtga tttcttatag gtataacga 29

60 <210> 14  
<211> 27  
<212> ADN  
<213> Artificial

<220><223> Secuencia de cebador de la cadena de sentido N122K y S124K

65 <400> 14  
cctataagaa aaagacagat acgctcg 27

ES 2 537 106 T3

<210> 15  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

5

<220><223> Secuencia de cebador de la cadena antisentido N122K y S124K

<400> 15  
 cgagcgtatc tgccttttc ttatagg 27

10

<210> 16  
 <211> 4373  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

15

<220> <223> Vector de secuencia pACSGDH

<400> 16

```

cactaactga ttacgcaccg catgtaaccg ttttcaatct gtgagtaa at 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 gcgtagcgt tttgaacgcg ctagcggcgg      300
cccgaagggc gagcgtagcg agtcaaacct cacgtactac gtgtacgctc cggtttttgc      360
gcgctgtccg tgtccaaact gctgcgcaa taacgcctgg tgggataggc tctaaatagc      420
cttcggcgtt cagtaacacg cgttaacgtg ctgaacagcc gggcattttt ttacgctata      480
ccctacataa taaaaccgga gctaccatga ataagaaggt actgaccctt tctgccgtga      540
tggcaagtct gttattcggc gcgcacgcgc atgccgccga tgttcctcta actccatctc      600

aatthtgctaa agcgaatca gagaactttg acaagaaagt tattctatct aatctaaata      660
agccgcacgc gttgttatgg ggaccagata atcaaatthg gttactgag cgagcaacag      720
gtaagattct aagagttaat ccagagtcgg gtagtgtaaa aacagttttt caggtaccag      780
agattgtcaa tgatgctgat gggcagaatg gtttattagg ttttgccttc catcctgatt      840
ttaaaaataa tccttatatc tatatttcag gtacatttaa aaatccgaaa tctacagata      900
aagaattacc gaaccaaacg attattcgtc gttataccta taataaatca acagatacgc      960
tcgagaagcc agtcgattta ttagcaggat taccttcac taaaagacat cagtcaggtc     1020
gtcttgctcat tgggccagat caaaagattt attatacgat tggtgaccaa gggcgtaacc     1080
agcttgctta tttgttcttg ccaaatcaag cacaacatac gccaaactcaa caagaactga     1140
atggtaaaga ctatcacacc tatatgggta aagtactacg cttaaactct gatggaagta     1200
ttccaaagga taatccaagt tttaacgggg tggtagcca tatttataca cttggacatc     1260
    
```

20

ES 2 537 106 T3

gtaatccgca gggcttagca ttcactccaa atggtaaatt attgcagtct gaacaaggcc 1320  
 caaactctga 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 tctttaaabc gtggtgtcat tttccgtatt aagttagatc 1740  
 caacttatag cactacttat gatgacgctg taccgatggt taagagcaac aaccgttatc 1800  
 gtgatgtgat tgcaagtcca gatgggaatg tcttatatgt attaactgat actgccggaa 1860  
 atgtccaaaa agatgatggc tcagtaacaa atacattaga aaaccagga tctctcatta 1920  
 agttcaccta taaggctaag taatacagtc gcattaaaaa accgatctat aaagatcgg 1980  
 ttttttagtt ttagaaaaga attcactggc cgtcgtttta caacgtcgtg actgggaaaa 2040  
 ccctggcggt acccaactta atcgccttgc agcacatccc cctttcgcca gctggcgtaa 2100  
 tagcgaagag gcccgaccg atcgccttc ccaacagttg cgcagcctga atggcgaatg 2160  
 gcgcctgatg cggtatcttc tccttacgca tctgtgcggt atttcacacc gcatatggtg 2220  
 cactctcagt acaatctgct ctgatgccgc atagttaagc cagccccgac acccgccaac 2280  
 acccgctgac gcgcctgac gggcttgtct gctcccggca tccgcttaca gacaagctgt 2340  
 gaccgtctcc gggagctgca tgtgtcagag gttttcaccg tcatcaccga aacgcgcgag 2400  
 acgaaagggc ctcgtgatac gcctatcttt ataggttaat gtcataataa taatggtttc 2460  
 ttagacgtca ggtggcactt ttcggggaaa tgtgcgcgga acccctattt gtttatcttt 2520  
 ctaaatacat tcaaataatgt atccgctcat gagacaataa ccctgataaa tgcttcaata 2580  
 atattgaaaa aggaagagta tgagtattca acatttccgt gtcgccctta ttcccttttt 2640  
 tgcggcattt tgcccttctg tttttgctca cccagaaacg ctggtgaaag taaaagatgc 2700  
 tgaagatcag ttgggtgcac gagtgggtta catcgaactg gatctcaaca gcggttaagat 2760  
 ccttgagagt tttcgccccg aagaacgttt tccaatgatg agcactttta aagttctgct 2820  
 atgtggcgcg gtattatccc gtattgacgc cgggcaagag caactcggtc gccgcataca 2880  
 ctattctcag aatgacttgg ttgagtactc accagtcaca gaaaagcatc ttacggatgg 2940  
 catgacagta agagaattat gcagtgtctc cataaccatg agtgataaca ctgcggccaa 3000

ES 2 537 106 T3

cttacttctg acaacgatcg gaggaccgaa ggagctaacc gcttttttgc acaacatggg 3060  
 ggatcatgta actcgccttg atcgttgga accggagctg aatgaagcca taccaaacga 3120  
 cgagcgtgac accacgatgc ctgtagcaat ggcaacaacg ttgcgcaaac tattaactgg 3180  
 cgaactactt actctagctt cccggcaaca attaatagac tggatggagg cggataaagt 3240  
 tgcaggacca cttctgcgct cggcccttcc ggctggctgg tttattgctg ataaatctgg 3300  
 agccggtgag cgtgggtctc gcggtatcat tgcagcactg gggccagatg gtaagcctc 3360  
 ccgtatcgta gttatctaca cgacggggag tcaggcaact atggatgaac gaaatagaca 3420  
 gatcgcctgag ataggtgcct cactgattaa gcattggtaa ctgtcagacc aagtttactc 3480  
 atatatactt tagattgatt taaaacttca tttttaattt aaaaggatct aggtgaagat 3540  
 cctttttgat aatctcatga ccaaaatccc ttaacgtgag ttttcgcttcc actgagcgtc 3600  
 agaccccgta gaaaagatca aaggatcttc ttgagatcct ttttttctgc gcgtaatctg 3660  
 ctgcttgcaa acaaaaaaac caccgctacc agcggtggtt tgtttgccgg atcaagagct 3720  
 accaactctt tttccgaagg taactggctt cagcagagcg cagataccaa atactgtcct 3780  
 tctagtgtag ccgtagttag gccaccactt caagaactct gtagcaccgc ctacatacct 3840  
 cgctctgcta atcctgttac cagtggctgc tgccagtggc gataagtcgt gtcttaccgg 3900  
 gttggactca agacgatagt taccggataa ggcgcagcgg tcgggctgaa cgggggggtc 3960  
 gtgcacacag cccagcttgg agcgaacgac ctacaccgaa ctgagatacc tacagcgtga 4020  
 gctatgagaa agcgcacgc ttcccgaagg gagaaaggcg gacaggtatc cggtaagcgg 4080  
 cagggtcgga acaggagagc gcacgagggg gcttccaggg ggaaacgcct ggtatcttta 4140  
 tagtcctgtc gggtttcgcc acctctgact tgagcgtcga tttttgtgat gctcgtcagg 4200  
 ggggcggagc ctatggaaaa acgccagcaa cgcggccttt ttacggttcc tggccttttg 4260  
 ctggcctttt gctcacatgt tctttcctgc gttatccctt gattctgtgg ataaccgtat 4320  
 taccgccttt gagtgagctg ataccgctcg ccgcagccga acgacggggc ccg 4373

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Proteína mutante de s-GDH dependiente de QPQ caracterizada por que en por lo menos una de las posiciones 122 y 124 se encuentra presente el aminoácido lisina, en la que dichas posiciones corresponden a las posiciones aminoácidas conocidas de la GDH de secuencia de tipo salvaje de *A. calcoaceticus* (SEC ID nº 2, en la que dicho mutante presenta una mayor estabilidad que la proteína que no presenta dichas sustituciones y en la que dicha proteína es por lo menos 90% idéntica a SEC ID nº 2.
- 10 2. Mutante según la reivindicación 1, en el que el aminoácido en la posición 122 es una lisina.
3. Mutante según la reivindicación 1, en el que el aminoácido en la posición 124 es una lisina.
- 15 4. Mutante según la reivindicación 1, en el que el aminoácido lisina se encuentra presente tanto en la posición 122 como en la posición 124.
- 20 5. Mutante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende además una o más sustituciones de aminoácidos en una o más posiciones seleccionadas de entre el grupo que consiste de las posiciones 16, 22, 65, 76, 116, 120, 127, 143, 168, 169, 171, 177, 224, 227, 230, 231, 245, 246, 255, 277, 287, 294, 295, 299, 302, 305, 307, 308, 317, 321, 323, 341, 348, 349, 354, 355, 364, 378, 422, 425, 428 y 438.
- 25 6. Mutante según la reivindicación 5, en el que dicha sustitución o sustituciones adicionales de aminoácidos son una sustitución en la posición 348.
7. Mutante según la reivindicación 5, en el que dicha sustitución o sustituciones adicionales de aminoácidos son una sustitución en la posición 428.
- 30 8. Mutante según la reivindicación 5, en el que dicha sustitución o sustituciones adicionales de uno o más aminoácidos son una sustitución tanto en la posición 348 como en la posición 428.
9. Mutante según la reivindicación 6, en el que la treonina en la posición 348 se sustituye por alanina, glicina o serina.
10. Polinucleótido aislado codificante de la proteína mutante s-GDH según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
- 35 11. Vector de expresión que comprende un polinucleótido aislado según la reivindicación 10, operablemente ligado a una secuencia de promotor capaz de inducir la expresión de dicho polinucleótido en una célula huésped.
12. Célula huésped que comprende el vector de expresión según la reivindicación 11.
- 40 13. Método de detección, determinación o medición de la glucosa en una muestra utilizando un mutante s-GDH según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, comprendiendo dicha mejora la puesta en contacto de la muestra con el mutante.
- 45 14. Método según la reivindicación 13, que se caracteriza además por que dicha detección, determinación o medición de la glucosa se lleva a cabo utilizando un dispositivo sensor o de tira de ensayo.
- 50 15. Dispositivo para la detección, determinación o medición de la glucosa en una muestra que comprende un mutante s-GDH según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y otros reactivos necesarios para dicha medición.

**Fig. 1**

Secuencias de aminoácidos de *A. calcoaceticus* (parte superior) y de *A. baumannii* (parte inferior)

```

1 DVPLTPSQFAKAKSENFDKKVILSNLNKPHALLWGPDNQIWLTERATGKI 50
  |:||||.|||||.|||||
1 DIPLTPAQFAKAKTENFDKKVILSNLNKPHALLWGPDNQIWLTERATGKI 50

51 LRVPESGSGVKTVEFQVPEIVNDADGQNGLLGFAFHPDFKNNPYIYISGTF 100
  ||||| ||| |||||
51 LRVPVSGSAKTVEFQVPEIVSDADGQNGLLGFAFHPDFKNNPYIYISGTF 100

101 KNPKSTDKELPNQTIIRRYTYNKSTDTLEKPVDLLAGLPSKDHQSGRLV 150
  |||||
101 KNPKSTDKELPNQTIIRRYTYNKTTDTFEKPIDLIAGLPSKDHQSGRLV 150

151 IGPDQKIYYTIGDQGRNQLAYLFLPNQAQHTPTQQELNGKDYHTYMGKVL 200
  |||||
151 IGPDQKIYYTIGDQGRNQLAYLFLSNQAQHTPTQQELNSKDYHTYMGKVL 200

201 RLNLDGSIPKDNPSFNGVVSIIYTLGHRNPQGLAFTPNGKLLQSEQGPNS 250
  |||||
201 RLNLDGSIPKDNPSFNGVVSIIYTLGHRNPQGLAFAPNGKLLQSEQGPNS 250

251 DDEINLIVKGGNYGWPVNAVAGYKDDSGYAYANYSAANKS.IKDLAQNGVK 299
  |||||.|||||
251 DDEINLVKGGNYGWPVNAVAGYKDDSGYAYANYSAATNKSQIKDLAQNGLK 300

300 VAAGVPVTKSEWVTGKNFVPLKTLTYVQDTYNYNDPTCGEMTYICWPTV 349
  ||
301 VATGVPVTKSEWVTGKNFVPLKTLTYVQDTYNYNDPTCGEMAYICWPTV 350

350 APSSAYVYKGGKKAITGWENTLLVPSLKRGVIFRIKLDPTYSTTYDDAVP 399
  |||||
351 APSSAYVYTGKKAIPGWENTLLVPSLKRGVIFRIKLDPTYSTTLDDAIP 400

400 MFKSNNRYRDVIASPDGNVLYVLTDTAGNVQKDDGSVTNTLENPGSLIKF 449
  |||||
401 MFKSNNRYRDVIASPEGNTLYVLTDTAGNVQKDDGSVTHNTLENPGSLIKF 450

450 TYKAK 454
  ||
451 TYNGK 455

```

**Fig. 2**

Diagrama esquemático del plásmido con el gen para s-GDH (pACSGDH)

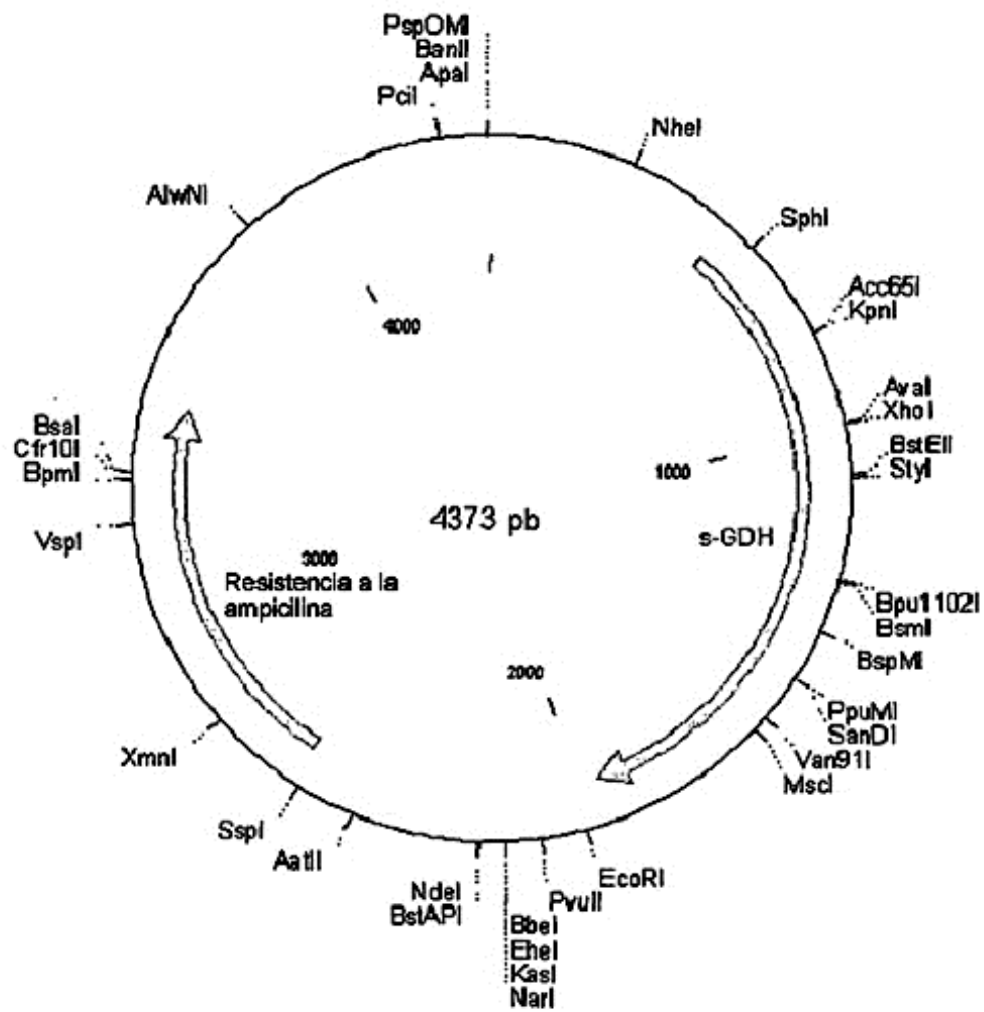


Fig. 3a

## Secuencia del vector pACSGDH

```

cactaactga ttacgcaccg catgtaaccg ttttcaatct gtgagtaaat tcacagtta 60
ttaacattgt gatagctatg atgacaacgt ttgtcgcact gtaactaacg tgtaacagtt 120
agttgtcagt tttgctgggg tatttcgctt ataaaaaccg ttatcacaat atcccgcgac 180
taccggacaa aaataaagag ttgaataaga gcttatccca ttagggctat tttacttggc 240
atthttggacc tgggcagtg ccccaaaac gcggttagcgt tttgaacggc ctagcggcgg 300
ccogaagggc gagcgtagcg agtcaaacct cacgtactac gtgtacgctc cggtttttgc 360
gogctgtccg tgtccaaact gctgocccaa taacgcctgg tgggataggc tctaaatacg 420
cttcggcggt cagtaacacg cgtaaacgtg ctgaacagcc gggcattttt ttacgctata 480
ccctacataa taaaaccgga gctaccatga ataagaaggt actgaccctt tctgccgtga 540
tggcaagtct gttattggc ggcacggc atgcgcgga tgttctctc actccatctc 600
aatttgctaa agcgaatca gagaactttg acaagaaagt tattctatct aatctaaata 660
agccgcacgc gttggtatgg ggaccagata atcaaatttg gttaactgag cgagcaacag 720
gtaagattct aagagttaat ccagagtgg gtagtgtaaa aacagttttt caggtaccag 780
agattgtcaa tgatgctgat gggcagaatg gtttattagg ttttgcctc catcctgatt 840
ttaaaaaata tccttatatc tatatttcag gtacatttaa aaatccgaaa tctacagata 900
aagaattacc gaaccaaaacg attattcgtc gttataccta taataaatca acagatacgc 960
tcgagaagcc agtcgattta ttagcaggat taccttcac aaaagaccat cagtcaggtc 1020
gtcttgtcat tgggccagat caaaagattt attatacgat tggtgaccaa gggcgtaacc 1080
agcttgctta tttgttcttg ccaaatcaag cacaacatac gccaaactca caagaactga 1140
atggtaaaga ctatcacacc tataatgggta aagtactacg cttaaactct gatggaagta 1200
ttccaaagga taatccaagt ttaacgggg tgggttagcca ttttataca cttggacatc 1260
gtaatccgca gggcttagca tcaactcaa atggtaaatt attgcagtct gaacaaggcc 1320
caaactctga cgatgaaat aacctcattg tcaaagggtg caattatggt tggccgaatg 1380
tagcaggtta taaagatgat agtggtatg 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 tctttaaacc gtggtgtcat tttccgtatt aagttagatc 1740
caacttatag cactacttat gatgacgctg taccgatgtt taagagcaac aaccgttatc 1800
gtgatgtgat tgcaagtcca gatgggaatg tcttatatgt attaactgat actgccggaa 1860
atgtccaaaa agatgatggc tcagtaacaa atacattaga aaaccaggga tctctatta 1920
agttcaccta taaggctaag taatacagtc gcattaaaaa accgatctat aaagatcggg 1980
tttttagtt ttagaaaaga attcactggc cgtcgtttta caacgtcgtg actgggaaaa 2040
cctggcggtt acccaactta atcgcttgc agcacatccc cctttcgcca gctggcgtaa 2100
tagcgaagag gcccgcacog atcgcccttc ccaacagttg cgcagcctga atggcgaatg 2160
gogcctgatg cggatthttc tcttacgca tctgtcgggt atttcacacc gcatagggtg 2220
cactctcagt acaatctgct ctgatgcgc atagttaagc cagccccgac acccgccaac 2280
accgctgac ggcacctgac gggcttgtct gctcccggca tccgcttaca gacaagctgt 2340
gaccgtctcc gggagctgca tgtgtcagag gttttcacog tcatcaccga aacgcgogag 2400
acgaaagggc ctctgtgatac gctatthttt ataggttaat gtcatgataa taatggthtt 2460
ttagacgtca ggtggcactt ttoggggaaa tgtgcgcgga acccctattt gtttattttt 2520
ctaaatacat tcaaataatg atccgctcat gagacaataa cctgatataa tgcttcaata 2580
atattgaaaa aggaagagta tgagtattca acatttccgt gtgcgcttca ttcccttttt 2640
tgccgcattt tgccctcctg tttttgctca ccagaaaacg ctggtgaaag taaaagatgc 2700
tgaagatcag ttgggtgcac gagtgggta catcgaactg gatctcaaca gcggtaaagat 2760
ccttgagagt tttcgccccg aagaaagttt tccaatgatg agcactttta aagttctgct 2820
atgtggcgcg gtattatccc gtattgacgc cgggcaagag caactcggtc gccgcataca 2880

```



Fig. 3b

```

ctattotcag aatgacttgg ttgagtactc accagtcaca gaaaagcacc ttacggatgg 2940
catgacagta agagaattat gcagtgctgc cataaccatg agtgataaca ctgcggccaa 3000
cttacttctg acaacgatcg gaggaccgaa ggagctaacc gctttttgac acaacatggg 3060
ggatcatgta actogccttg atcgttggga aceggagctg aatgaagcca taccaaacga 3120
cgagcgtgac accacgatgc ctgtagcaat ggcaacaacg ttgcgcaaac tattaactgg 3180
cgaactactt actctagctt cccggcaaca attaatagac tggatggagg cggataaagt 3240
tgcaggacca cttctgeget oggccccttc ggetggctgg tttattgctg ataaatctgg 3300
agccgggtgag cgtgggtctc ggggtatcat tgcagcactg gggccagatg gtaagccctc 3360
ccgtatcgta gttatctaca cgacggggag tcaggcaact atggatgaac gaaatagaca 3420
gatcgctgag ataggtgcct cactgattaa gcattggtaa ctgtcagacc aagtttactc 3480
atataactt tagattgatt taaaacttca tttttaattt aaaaggatct aggtgaagat 3540
cctttttgat aatctcatga ccaaaatccc ttaacgtgag ttttctgtcc actgagcgtc 3600
agaccccgta gaaaagatca aaggatcttc ttgagatcct tttttctgac gcgtaactctg 3660
ctgcttgcaa acaaaaaaac caocgctacc agcgggtggt tgtttgcagg atcaagagct 3720
accaactcct tttccgaagg taactggcct cagcagagcg cagataccaa atactgtcct 3780
tctagtgtag ccgtagttag gccaccactt caagaactct gtagcacogc ctacatacct 3840
cgctctgcta atcctgttac cagtggctgc tgcacgtggc gataagtctg gtcttaccgg 3900
ggtggactca agacgatagt tacoggataa ggccgagcgg tcgggctgaa cgggggggtc 3960
gtgcacacag ccagcttgg agcgaacgac ctacacogaa ctgagatacc tacagcgtga 4020
gctatgagaa agcgcacgac ttcccgaagg gagaaaggcg gacaggtatc cggtaaagcg 4080
cagggtcgga acaggagagc gcacgagggg gettccaggg ggaaacgoot ggtatcttta 4140
tagtctgtc gggtttggcc acctctgact tgagcgtoga tttttgtgat gctcgtcagg 4200
ggggcggagc ctatggaaaa acgcccagcaa ogggccttt ttacggttcc tggccttttg 4260
ctggcctttt gctcacatgt tctttcctgc gttatcccct gattctgtgg ataaccgtat 4320
taccgccttt gagtgagctg ataccgctcg ccgcagccga acgacggggc ccg 4373

```