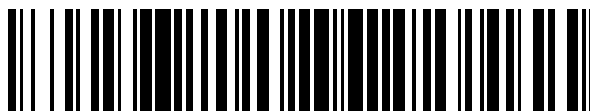


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 556 605**

51 Int. Cl.:

C12N 9/04 (2006.01)

C12Q 1/00 (2006.01)

C12Q 1/26 (2006.01)

C12Q 1/54 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.08.2012 E 12753399 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.09.2015 EP 2748311**

54 Título: **Glucosa oxidasa**

30 Prioridad:

25.08.2011 EP 11006939

27.03.2012 EP 12002193

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

19.01.2016

73 Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (50.0%)

Grenzacherstrasse 124

4070 Basel, CH y

ULTIZYME INTERNATIONAL LTD. (50.0%)

72 Inventor/es:

KOJIMA, KATSUHIRO;

MORI, KAZUSHIGE y

SODE, KOJI

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 556 605 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

Glucosa oxidasa

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a una glucosa oxidasa para su uso en un kit y un sensor para medir la glucosa. Más concretamente, la presente invención se refiere a una glucosa oxidasa mutante que tiene actividad de oxidasa reducida.

10 Antecedentes de la técnica

La concentración de glucosa en sangre es muy importante en los ensayos clínicos para el diagnóstico de la diabetes mellitus y en el control del azúcar en sangre de los pacientes que padecen diabetes mellitus. La concentración de glucosa en sangre se puede medir usando una enzima que tenga especificidad por la glucosa.

Se han aislado glucosa oxidasas de diversos tipos de cepas, y se ha sugerido que es posible analizar la glucosa usando dichas enzimas.

20 La glucosa oxidasa es una enzima dependiente de FAD que cataliza una reacción en la que la glucosa se oxida para generar gluconolactona, con la generación de la forma reducida de FAD (FADH₂). A su vez, FADH₂ transmite electrones a un aceptor de electrones y se convierte en su forma oxidada. En presencia de oxígeno, FADH₂ transmite preferentemente electrones a la molécula de oxígeno, en lugar de a aceptores de electrones artificiales (también conocidos como mediadores o mediadores de electrones). Por lo tanto, cuando se analiza la glucosa mediante glucosa oxidasa con mediadores, los resultados del ensayo se verán enormemente afectados por el nivel de oxígeno disuelto en el sistema de reacción. Dicha desventaja se advertirá particularmente en los ensayos clínicos de muestras de sangre mediante un dispositivo de ensayo de punto de cuidado, utilizando un aceptor de electrones artificial. Lo deseable es que las enzimas usadas para las tiras de los sensores enzimáticos que emplean mediadores de electrones artificiales tengan baja actividad hacia el oxígeno.

30 Por consiguiente, el objeto de la presente invención es proporcionar una enzima, en particular, una glucosa oxidasa, cuya actividad se vea menos afectada por el nivel de oxígeno disuelto.

35 Divulgación de la invención

Los inventores de la presente solicitud han podido proporcionar una enzima, en particular, una glucosa oxidasa, cuya actividad se ve menos afectada por el nivel de oxígeno disuelto. Más concretamente, esto se ha logrado mediante la reducción de la actividad de oxidasa de una enzima que, en su forma de tipo silvestre, muestra predominantemente una actividad de oxidasa y que, preferentemente, al mismo tiempo el aumento de la actividad de deshidrogenasa de la enzima. Como se describirá más detalladamente a continuación, esto se ha logrado mediante la mutación de la enzima de tipo silvestre.

Los presentes inventores han preparado diversos mutantes de una glucosa oxidasa y, sorprendentemente, han encontrado que un cierto tipo de mutantes presenta actividad de oxidasa reducida a la vez que conserva sustancialmente la actividad de deshidrogenasa, en particular, la actividad de deshidrogenasa mediada por colorante.

La presente invención proporciona una glucosa oxidasa mutante según lo definido en la reivindicación independiente 1. Las realizaciones preferidas de la glucosa oxidasa mutante son la materia objeto de las reivindicaciones dependientes de la reivindicación 1.

En particular, la presente invención se refiere a una glucosa oxidasa mutante modificada en una o más posiciones seleccionadas entre:

- 55 (a) una posición correspondiente a la posición 53 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 1 mediante la sustitución del resto de aminoácido Thr con otro resto de aminoácido;
- (b) una posición correspondiente a la posición 116 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 1 mediante la sustitución del resto de aminoácido Ile con otro resto de aminoácido;
- 60 (c) una posición correspondiente a la posición 132 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 1 mediante la sustitución del resto de aminoácido Ser o Thr con otro resto de aminoácido;
- (d) una posición correspondiente a la posición 134 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 1 mediante la sustitución del resto de aminoácido Thr con otro resto de aminoácido;
- (e) una posición correspondiente a la posición 237 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 1 mediante la sustitución del resto de aminoácido Ile o Phe con otro resto de aminoácido;
- 65 (f) una posición correspondiente a la posición 371 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 1 mediante la sustitución del resto de aminoácido Val o Ala con otro resto de aminoácido;
- (g) una posición correspondiente a la posición 373 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 1 mediante la sustitución del resto de aminoácido Phe con otro resto de aminoácido;

- (h) una posición correspondiente a la posición 434 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 1 mediante la sustitución del resto de aminoácido Glu con otro resto de aminoácido;
- (i) una posición correspondiente a la posición 436 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 1 mediante la sustitución del resto de aminoácido Phe con otro resto de aminoácido;
- 5 (j) una posición correspondiente a la posición 448 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 1 mediante la sustitución del resto de aminoácido Trp con otro resto de aminoácido; y
- (k) una posición correspondiente a la posición 537 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 1 mediante la sustitución del resto de aminoácido Trp con otro resto de aminoácido.
- 10 Más concretamente, la glucosa oxidasa mutante de la presente invención está modificada en una o más posiciones seleccionadas entre:
- (a) una posición correspondiente a la posición 53 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 1 mediante la sustitución del resto de aminoácido Thr con Ser;
- 15 (b) una posición correspondiente a la posición 116 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 1 mediante la sustitución del resto de aminoácido Ile con Val;
- (c) una posición correspondiente a la posición 132 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 1 mediante la sustitución del resto de aminoácido Ser con Ala, Thr, Val, Cys o Ile, o mediante la sustitución del resto de aminoácido Thr con Ala, Ser, Val, Trp o Cys;
- 20 (d) una posición correspondiente a la posición 134 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 1 mediante la sustitución del resto de aminoácido Thr con Ala, Ile o Met;
- (e) una posición correspondiente a la posición 237 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 1 mediante la sustitución del resto de aminoácido Ile con Val, o mediante la sustitución del resto de aminoácido Phe con Ile, Ala, Val, Met, Ser, Asp, Leu, Thr, Asn, Arg o Cys;
- 25 (f) una posición correspondiente a la posición 371 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 1 mediante la sustitución del resto de aminoácido Val con Thr, Ala, o mediante la sustitución del resto de aminoácido Ala con Val;
- (g) una posición correspondiente a la posición 373 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 1 mediante la sustitución del resto de aminoácido Phe con Leu, Tyr, Ala, Met, Asn o Trp;
- 30 (h) una posición correspondiente a la posición 434 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 1 mediante la sustitución del resto de aminoácido Glu con Gln;
- (i) una posición correspondiente a la posición 436 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 1 mediante la sustitución del resto de aminoácido Phe con Trp, Ala, Leu, Tyr, Met, Glu o Ile;
- 35 (j) una posición correspondiente a la posición 448 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 1 mediante la sustitución del resto de aminoácido Trp con Ala, Ile, Ser, Val, Met, Thr, Cys, Gly, Leu, Asn, Asp, Lys, Phe, Gln o Tyr; y
- (k) una posición correspondiente a la posición 537 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 1 mediante la sustitución del resto de aminoácido Trp con Ala.
- 40 En una realización preferida, la glucosa oxidasa mutante de la invención tiene una actividad de oxidasa reducida en comparación con la glucosa oxidasa de tipo silvestre y, preferentemente, tiene una mayor actividad de deshidrogenasa en comparación con la glucosa oxidasa de tipo silvestre. Preferentemente, la glucosa oxidasa mutante de la invención tiene una actividad de oxidasa del 30 % o menos de la de la glucosa oxidasa de tipo silvestre, y preferentemente también tiene una actividad de deshidrogenasa del 50 % o más de la glucosa oxidasa de tipo silvestre. También, preferentemente, la glucosa oxidasa mutante de la invención tiene una mayor actividad de deshidrogenasa en comparación con la glucosa oxidasa de tipo silvestre.
- 45 En otro aspecto, la presente invención proporciona un polinucleótido aislado que codifica la glucosa oxidasa mutante de la presente invención.
- 50 En otro aspecto más, la presente invención proporciona un vector que comprende el polinucleótido de la invención.
- En otro aspecto más, la presente invención proporciona una célula hospedadora transformada con un vector de la invención.
- 55 En otro aspecto, la presente invención proporciona un método de determinación de la glucosa en una muestra, que comprende poner en contacto la muestra con la glucosa oxidasa de la invención y medir la cantidad de la glucosa oxidada mediante la glucosa oxidasa.
- 60 En otro aspecto, la presente invención proporciona un dispositivo de determinación de la glucosa en una muestra que comprende la glucosa oxidasa de la invención y, preferentemente, un mediador de electrones.
- En otro aspecto más, la presente invención proporciona un kit de determinación de glucosa en una muestra que comprende la glucosa oxidasa de la invención y, preferentemente, un mediador de electrones.
- 65 En otro aspecto, la presente invención proporciona un electrodo enzimático que tiene la glucosa oxidasa de la invención que está inmovilizada en el electrodo.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un sensor enzimático de determinación de la glucosa que comprende el electrodo enzimático de la invención como un electrodo de trabajo.

Breve descripción de las figuras

5 La Figura 1 muestra las proporciones de las actividades de oxidasa (Ox) y de deshidrogenasa (Dh) de diversos mutantes de glucosa oxidasa (GOx) a una concentración de sustrato de glucosa de 100 mM con respecto a las actividades de tipo silvestre. "nd" de la Fig. 1 y de las tablas significa "no detectado".

10 Descripción detallada de la invención

El término "mutante" de una proteína, como se usa en el presente documento, se refiere a una variante de proteína que contiene la sustitución en uno o más de los restos de aminoácido de la proteína en la/s posición/es indicada/s. El término mutante también se usa para un polinucleótido que codifica dicha proteína mutante.

15 La expresión "una posición correspondiente a", como se usa en el presente documento, significa la posición de un resto de aminoácido de una secuencia de aminoácidos de consulta que se alinea con el resto de aminoácido de una secuencia de aminoácidos de referencia usando un programa informático AlignX de Vector NTI con los parámetros por defecto (disponible en Invitrogen; véase, Lu, G., y Moriyama, E. N. (2004), "Vector NTI, a balanced all-in-one sequence analysis suite". *Brief Bioinform* 5, 378-88). Por lo tanto, "el resto de aminoácido (AA) de una posición correspondiente a la posición Y de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: X" significa el resto de AA de una secuencia de aminoácidos de consulta que está alineado con el AA Y de SEC ID N° X cuando la secuencia de aminoácidos de consulta se alinea con SEC ID N°: X usando AlignX de Vector NTI con los parámetros por defecto. Cabe señalar que dicha expresión también engloba el AA Y de la propia SEC ID N°: X.

25 La glucosa oxidasa mutante de la invención presenta una menor actividad de oxidasa a la vez que conserva sustancialmente la actividad de deshidrogenasa.

30 Como se usa en el presente documento, "actividad de oxidasa" es una actividad enzimática de la glucosa oxidasa para catalizar la oxidación de la glucosa con el fin de generar gluconolactona con la utilización de oxígeno como aceptor de electrones. La actividad de oxidasa se puede ensayar midiendo la cantidad de H₂O₂ generado mediante cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, mediante reactivos para la detección de H₂O₂ tales como 4AA/TODB/POD (4-aminoantipirina/sal disódica de *N,N*-Bis(4-sulfobutil)-3-metil-anilina/peroxidasa de rábano picante) o mediante el electrodo Pt. Como se usa en el presente documento, en el contexto de la actividad relativa o cuantitativa, la actividad de oxidasa se define específicamente como la cantidad en moles del sustrato (glucosa) oxidado por unidad de tiempo medida por la cantidad de H₂O₂ generado a 25 °C en PPB 10 mM, pH 7,0, TODB 1,5 mM, 2 U/ml de peroxidasa de rábano (POD) y 4-aminoanti-pirina (4AA) 1,5 mM. La formación de colorante de quinoneimina se puede medir espectrofotométricamente a 546 nm.

40 Como se usa en el presente documento, "actividad de deshidrogenasa" es una actividad enzimática de la glucosa oxidasa para catalizar la oxidación de la glucosa con el fin de generar gluconolactona con la utilización de un mediador de electrones distinto del oxígeno como aceptor de electrones. La actividad de deshidrogenasa se puede ensayar midiendo la cantidad de electrones transferida al mediador usando, por ejemplo, mPMS/DCIP (metilsulfato de 1-metoxi-5-metilfenazinio/2,6-dicloroindofenol), cPES (trifluoro-acetato-1-(3-carboxi-propoxi)-5-etil-fenanzinio, NA BM31_1144 (clorhidrato de *N,N*-bis-(hidroxietil)-3-metoxi-nitrosoanilina, NA BM31_1008 (*N,N*-bis-hidroxietil-4-nitrosoanilina) y *N,N*-4-dimetil-nitrosoanilina).

45 Como se usa en el presente documento, en el contexto de la actividad relativa o cuantitativa, la actividad de deshidrogenasa se define específicamente como la cantidad en moles del sustrato (glucosa) oxidado por unidad de tiempo medida por la cantidad de electrones transferidos al mediador a 25 °C en PPB 10 mM (pH 7,0), DCIP 0,6 mM y metoxi PMS 6 mM (mPMS).

50 La glucosa oxidasa mutante de la invención tiene una actividad de oxidasa reducida en comparación con la glucosa oxidasa de tipo silvestre, mientras que conserva sustancialmente la actividad de deshidrogenasa.

55 Preferentemente, la glucosa oxidasa mutante de la invención tiene una actividad de oxidasa del 50 % o menos de la de la glucosa oxidasa de tipo silvestre. Más preferentemente, la glucosa oxidasa mutante de la invención tiene una actividad de oxidasa del 40 % o menos, más preferentemente del 30 % o menos, incluso más preferentemente del 20 % o menos, y lo más preferentemente del 15 % o menos de la de la glucosa oxidasa de tipo silvestre. También preferentemente, la glucosa oxidasa mutante de la invención tiene una actividad de deshidrogenasa del 50 % o más de la glucosa oxidasa de tipo silvestre. Más preferentemente, la glucosa oxidasa mutante de la invención tiene una actividad de deshidrogenasa del 70 % o más, más preferentemente del 90 % o más, incluso más preferentemente del 100 % o más, y lo más preferentemente de más del 100 % de la glucosa oxidasa de tipo silvestre.

60 En la glucosa oxidasa de tipo silvestre, la actividad de oxidasa es aproximadamente de 3 a 4 veces superior a la actividad de deshidrogenasa. Cuando hay oxígeno disuelto en el sistema de ensayo, el electrón generado mediante la oxidación del sustrato se transferirá preferentemente al oxígeno. Así pues, la actividad enzimática medida en presencia de mediador de electrones se ve enormemente afectada por la concentración de oxígeno disuelto. Por el contrario, la glucosa oxidasa mutante de la invención tiene una proporción de la actividad de

deshidrogenasa/oxidasa de aproximadamente 2,0 o más, preferentemente de 4,0 o más, más preferentemente de 10 o más. Dado que la actividad de deshidrogenasa supera a la actividad de oxidasa, la actividad enzimática de la glucosa oxidasa de la presente invención se verá menos afectada por la concentración de oxígeno disuelto, lo que es ventajoso en la utilización de la glucosa oxidasa en el diagnóstico clínico con una muestra de sangre.

5 Se ha de entender que la numeración de la secuencia de aminoácidos de la presente solicitud comienza en la Met inicial, y que la glucosa oxidasa mutante reivindicada puede tener o no el péptido señal.

10 En otro aspecto, la presente invención proporciona un polinucleótido aislado que codifica la glucosa oxidasa mutante de la presente invención. La secuencia de nucleótidos de los polinucleótidos que codifican la glucosa oxidasa se puede obtener fácilmente de bases de datos públicas. El polinucleótido que codifica la glucosa oxidasa de tipo silvestre se puede clonar a partir del genoma de los respectivos organismos usando PCR u otras técnicas conocidas. Se pueden introducir mutaciones mediante mutagénesis dirigida, mutagénesis por PCR o cualquier otra técnica bien conocida en la materia. El resto de aminoácido que se va a mutar se puede identificar usando cualquier programa informático de alineación de secuencias disponible en la técnica. Como alternativa, el polinucleótido que codifica la glucosa oxidasa mutante se puede preparar mediante PCR usando una serie de oligonucleótidos sintetizados químicamente o totalmente sintetizados.

20 La glucosa oxidasa mutada se puede preparar mediante la inserción del gen mutante en un vector de expresión apropiado e introduciendo el vector en una célula hospedadora apropiada, tal como células de *E. coli*. El transformante se cultiva, y la glucosa oxidasa expresada en el transformante se puede recoger de las células o del medio de cultivo. Como alternativa, la glucosa oxidasa recombinante se puede recoger y volver a plegar a partir de los cuerpos de inclusión preparados de las células.

25 La glucosa oxidasa recombinante así obtenida se puede purificar mediante cualquiera de las técnicas de purificación conocidas en la materia, incluyendo la cromatografía en columna de intercambio iónico, la cromatografía de afinidad, la cromatografía de líquidos, la filtración, la ultrafiltración, la precipitación de sales, la precipitación con disolvente, la inmunoprecipitación, la electroforesis en gel, la electroforesis isoelectrónica y la diálisis.

30 Así pues, la presente invención también engloba un vector que comprende el polinucleótido que codifica la glucosa oxidasa mutante, una célula hospedadora transformada con dicho vector y un método de preparación de la glucosa oxidasa mutante de la invención mediante el cultivo del transformante, la recogida y la purificación de la glucosa oxidasa mutante del cultivo.

35 La invención también engloba un método de determinación de la glucosa en una muestra. El método comprende poner en contacto la muestra con la glucosa oxidasa de la invención y medir la cantidad de glucosa oxidada por la glucosa oxidasa.

40 En otro aspecto, la presente invención proporciona un dispositivo de determinación de la glucosa en una muestra que comprende la glucosa oxidasa de la invención y un mediador de electrones.

El dispositivo de ensayo puede tener una estructura similar a cualquiera de las tiras de ensayo de biosensores amperométricos convencionales que se encuentran disponibles en el mercado para monitorizar el nivel de glucosa en sangre. Un ejemplo de dicho dispositivo tiene dos electrodos (electrodo de trabajo y el de referencia o contraelectrodo) situados sobre un sustrato aislante, un puerto de reactivo y un receptor de la muestra. El puerto de reactivo contiene la glucosa oxidasa mutada de la invención y un mediador. Cuando se añade una muestra tal como una muestra de sangre al receptor de muestras, la glucosa contenida en la muestra reaccionará con la glucosa oxidasa para generar corriente, que indica la cantidad de glucosa de la muestra. Los ejemplos típicos de sensores electroquímicos adecuados para la determinación de sustratos enzimáticos se conocen, por ejemplo, por los documentos WO 2004/113900 y US 5.997.817. Como alternativa a los sensores electroquímicos, se podrían usar tecnologías de detección óptica. Por lo general, dichos dispositivos ópticos se basan en los cambios de color que se producen en un sistema de reactivos que comprende la enzima, un mediador de electrones y un indicador. Los cambios de color se pueden cuantificar usando mediciones de fluorescencia, de absorción o de remisión. Los ejemplos típicos de dispositivos ópticos adecuados para la determinación de sustratos enzimáticos se conocen, por ejemplo, por los documentos US 7.008.799, US 6.036.919 y US 5.334.508.

55 En otro aspecto más, la presente invención proporciona un kit para determinar la glucosa en una muestra que comprende la glucosa oxidasa de la invención y un mediador de electrones.

60 Los kit para medir la glucosa se pueden construir usando la enzima de la presente invención. Además de la glucosa oxidasa de la invención, el kit contiene el tampón necesario para la medición, el mediador apropiado y, si es necesario, enzimas tales como la peroxidasa, solución patrón de glucosa para la preparación de una curva de calibración y las instrucciones de uso. La glucosa oxidasa de la presente invención se puede proporcionar en diversas formas, por ejemplo, como un reactivo liofilizado o como una solución en una solución de almacenamiento apropiada.

65 En otro aspecto, la presente invención proporciona un electrodo enzimático que tiene la glucosa oxidasa de la invención inmovilizada en el electrodo.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un sensor enzimático para determinar la glucosa que comprende el electrodo enzimático de la invención como electrodo de trabajo.

La concentración de glucosa en una muestra se puede determinar midiendo la cantidad de electrones generada mediante la reacción enzimática. En la técnica, se conocen diversos sistemas de sensores, entre los que se incluyen el electrodo de carbono, electrodo metálico y electrodo de platino. La glucosa oxidasa mutada de la presente invención se inmoviliza sobre los electrodos. Los ejemplos de los medios para la inmovilización incluyen la reticulación, la encapsulación en una matriz macromolecular, el recubrimiento con una membrana de diálisis, el polímero de reticulación óptico, el polímero electroconductor, el polímero de oxidación-reducción y cualquier combinación de los mismos.

Cuando la medición se realiza en un sistema amperométrico, se usa un electrodo de carbono, electrodo de oro o platino electrodo provisto de una enzima inmovilizada como electrodo de trabajo, junto con un contraelectrodo (tal como electrodo de platino) y un electrodo de referencia (tal como electrodo de Ag/AgCl). Los electrodos se insertan en un tampón que contiene un mediador y se mantienen a una temperatura predeterminada. Se aplica un voltaje predeterminado en el electrodo de trabajo, a continuación, se añade una muestra y se mide el aumento del valor de la corriente eléctrica. Los ejemplos del mediador usado en el ensayo incluyen ferricianuro de potasio, ferroceno, derivado de osmio, derivado de rutenio, metosulfato de fenazina, etc. En general, también se pueden usar los denominados sistemas de dos electrodos con un electrodo de trabajo y un contraelectrodo o electrodo de pseudo-referencia.

Además, la glucosa se puede determinar usando un mediador de electrones inmovilizado en un sistema amperométrico usando electrodo de carbono, electrodo de oro o electrodo de platino. La enzima se inmoviliza sobre el electrodo junto con un mediador de electrones tal como ferricianuro de potasio, ferroceno, derivado de osmio, metosulfato de fenazina en una matriz macromolecular mediante adsorción o enlace covalente para preparar un electrodo de trabajo. Se inserta en tampón junto con un contraelectrodo (tal como electrodo de platino) y un electrodo de referencia (tal como electrodo de Ag/AgCl) y se mantiene a una temperatura predeterminada. Se aplica un voltaje predeterminado al electrodo de trabajo, a continuación, se añade la muestra y se mide el aumento del valor de la corriente eléctrica.

El contenido de todas las patentes y los documentos de referencia citados en la presente memoria descriptiva se incorpora en su totalidad en el presente documento por referencia.

EJEMPLOS

La presente invención se ilustrará detalladamente por medio de los siguientes ejemplos, aunque la presente invención no se limita a dichos ejemplos.

Ejemplo 1: Plásmido que expresa GOx de *Penicillium amagasakiens*

Se usó pET22 gox de tipo silvestre como plásmido de expresión de GOx de *Penicillium amagasakiens* (GenBank AADO1493). Este plásmido tiene un fragmento de ADN que contiene la región del gen estructural de GOx derivado de *Penicillium amagasakiens* a excepción de la secuencia señal, que se inserta en el sitio de clonación *NheI/EcoRI* de un vector pET22. El gen de GOx de este plásmido está controlado por un promotor T7. El pET22 gox de tipo silvestre contiene un gen de resistencia a la ampicilina.

Ejemplo 2: Mutagénesis del gen estructural de GOx derivado de *Penicillium amagasakiens*

(1) Mutagénesis de los restos 132 y 373

Se sometió a mutagénesis el gen estructural de GOx derivado de *Penicillium amagasakiens* contenido en el pET22 gox de tipo silvestre obtenido en el Ejemplo 1, de modo que la serina del resto 132 y la fenilalanina del resto 373 de la GOx codificada por este gen se sustituyeron con otros restos de aminoácidos.

En concreto, se sustituyeron el codón (TCC) para la serina del resto 132 y el codón (TTC) para la fenilalanina del resto 373 del gen estructural de GOx contenido en el plásmido pET22 gox de tipo silvestre descrito en el Ejemplo 1 con otros codones de aminoácidos usando un kit de mutagénesis dirigida disponible en el mercado (Stratagene Corp., kit de mutagénesis dirigida QuikChange II).

Las secuencias de los cebadores directo e inverso usados en la sustitución de los restos de aminoácidos se muestran en las tablas que figuran más adelante.

En la anotación que representa una mutación, el número representa una posición de la secuencia de aminoácidos que contiene la secuencia señal de GOx; el alfabeto descrito antes del número representa un resto de aminoácido antes de la sustitución del aminoácido; y el alfabeto descrito después del número representa un resto de aminoácido después de la sustitución del aminoácido. Por ejemplo, S132A representa la sustitución de la serina del resto 132 con alanina.

ES 2 556 605 T3

En la reacción PCR, se sometió una solución de reacción de la composición que se muestra a continuación a reacción a 95 °C durante 30 segundos y luego a 15 ciclos repetitivos, cada uno de 95 °C durante 30 segundos, 55 °C durante 1 minuto y 68 °C durante 8 minutos, seguidos de 68 °C durante 30 minutos y el mantenimiento a 4 °C.

5 Composición de la solución de reacción

ADN de molde (5 ng/μl)	2 μl
10 x tampón de reacción	5 μl
Cebador directo (100 ng/μl)	1,25 μl
Cebador inverso (100 ng/μl)	1,25 μl
dNTP	1 μl
Agua destilada	38,5 μl
ADN polimerasa	1 μl
Total	50 μl

Tras la reacción PCR, se añadieron 0,5 μl de *DpnI* a la solución de reacción y se incubó a 37 °C durante 1 hora para degradar el plásmido molde.

10 Se transformaron células competente DH5α de *Escherichia coli* (supE44, ΔlacU169 (φ801acZΔM15), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1) con la solución de reacción obtenida. A partir de colonias desarrolladas en un medio agar LB (Bacto triptona al 1 %, extractos de levadura al 0,5 %, cloruro de sodio al 1 %, agar al 1,5 %) que contenía ampicilina (50 μg/ml), se preparó ADN plasmídico y se secuenció para confirmar que la mutación de interés se había introducido en el gen estructural de GOx.

15 Se digirió el plásmido en el que se había confirmado la introducción de la mutación con las enzimas de restricción NdeI y EcoRI para escindir el gen estructural de GOx sometido a mutagénesis, que, a su vez, se había insertado en un vector pET22. Se transformó DH5α con este plásmido, y se extrajo un plásmido de las colonias obtenidas para obtener un plásmido de expresión de DGOx mutante.

Tabla 1

Cebador para S132	Nombre del cebador	Secuencia	SEC ID Nº
Sustitución de aminoácido S132A	S132AFw	5'CTTGATAAACGGTGACGCGTGGACTCGCCC 3'	22
S132A	S132ARv	5'GGGCGAGTCCACGCGTCACCGTTTATCAAG 3'	23

Tabla 2

Cebador para F373	Nombre del cebador	Secuencia	SEC ID Nº
Sustitución de aminoácido F373A	F373AFw	5'CAGGCCGTCTTCGCGGCCAATTTCACTGAG 3'	24
F373A	F373ARv	5'CTCAGTGAAATTGGCCGCGAAGACGGCCTG 3'	25
F373L	F373Lfw	5'GTCAGGCCGTCTTCCTGGCCAATTTCACTGAG 3'	26
F373L	F373LRv	5'CTCAGTGAAATTGGCCAGGAAGACGGCCTGAC 3'	27
F373P	F373Pfw	5'CAGGCCGTCTTCGCGGCCAATTTCACTGAG 3'	28
F373P	F373PRv	5'CTCAGTGAAATTGGCCGGGAAGACGGCCTG 3'	29
F373W	F373Wfw	5'CAGGCCGTCTTCGGGCCAATTTCACTGAG 3'	30
F373W	F373WRv	5'CTCAGTGAAATTGGCCGAGAAGACGGCCTG 3'	31
F373Y	F373Yfw	5'CAGGCCGTCTTCTACGCCAATTTTAC 3'	32
F373Y	F373YRv	5'GTGAAATTGGCGTAGAAGACGGCCTG 3'	33

25 Ejemplo 3: Análisis de la actividad enzimática de la GOx mutante

Se produjo GOx mutante usando el plásmido de expresión de GOx mutante obtenido en el Ejemplo 2, y se estudió su actividad enzimática.

30 (1) Cultivo

35 Se transformó la cepa BL21 de *Escherichia coli* (DE3) con el plásmido de expresión de GOx de tipo silvestre preparado en el Ejemplo 1 o el plásmido de expresión de GOx mutante preparado en el Ejemplo 2. Se cultivaron estos transformantes por separado con agitación a 37 °C durante 12 horas en 3 ml de un medio LB (que contenía 100 μg/ml ampicilina) usando un tubo en forma de L. Se inoculó 1 ml de cada una de estas soluciones de cultivo a un matraz Erlenmeyer de 500 ml con un deflector que contenía 100 ml de un medio LB (que contenía 100 μg/ml de ampicilina), y se cultivó con rotación a 37 °C. En el punto temporal en el que se alcanzó una DE600 de

aproximadamente 0,6, se añadió IPTG (isopropil-β-D-tiogalactopiranosido), a una concentración final de 0,5 mM, tras lo que se cultivó a 20 °C durante 24 horas.

(2) Preparación de la fracción de cuerpo de inclusión

Se recogieron y se lavaron células bacterianas de la solución de cultivo así cultivada. A continuación, se suspendieron las células bacterianas húmedas obtenidas en un tampón de fosfato de potasio 20 mM (pH 6,8), y se sonicaron. A continuación, se centrifugó el homogeneizado a 17.400 xg a 4 °C durante 20 minutos, y se usó el precipitado como una fracción insoluble. Se lavó la fracción insoluble obtenida con una solución de lavado (1) (tampón de fosfato de potasio pH 6,8 + NaCl 100 mM + EDTA 1 mM + Triton X-100 al 1 %) y se centrifugó a 10.000 xg a 4 °C durante 10 minutos. Se lavó el precipitado con una solución de lavado (2) (tampón de fosfato de potasio, pH 6,8 + NaCl 100 mM + EDTA 1 mM) y se centrifugó a 10.000 xg a 4 °C durante 10 minutos. Se lavó el precipitado adicionalmente con una solución de lavado (3) (urea 20 mM + tampón de fosfato de potasio 2 mM, pH 6,8) y se centrifugó a 10.000 xg a 4 °C durante 10 minutos. El cuerpo de inclusión se recogió como un precipitado. La mayor parte de este cuerpo de inclusión es GOx.

(3) Replegamiento del cuerpo de inclusión

Se suspendió el cuerpo de inclusión preparado de esta manera en un tampón de solubilización (urea 8 M + ditiotreitól (DTT) 30 mM + tampón de fosfato de potasio 20 mM, pH 6,8), y se usó esta suspensión como una fracción de cuerpo de inclusión solubilizada. Se diluyó el cuerpo de inclusión solubilizado con un tampón de solubilización a una concentración de proteína de 0,1 mg/ml, y se sometió a diálisis frente a un volumen de 100 veces o superior de un tampón de replegamiento (glutatiól 1 mM (forma reducida) + glutatiól 1 mM (forma oxidada) + dinucleótido flavina adenina 0,05 mM + glicerol al 10 % (p/v) (vol/vol) + tampón de fosfato de potasio 20 mM, pH 6,8) durante 24 horas. A continuación, se volvió a someter a diálisis la solución resultante contra tampón de fosfato de potasio 20 mM (pH 6,8) durante 12 horas y se centrifugó a 17.400xg a 4 °C durante 3 minutos para eliminar los agregados de proteínas. Se usó el sobrenadante como una muestra de GOx para determinar las actividades de la glucosa oxidasa (GOx) y la glucosa deshidrogenasa (GDH) a 25 °C para la GOx de tipo silvestre y la GOx mutante.

(4) Determinación de la actividad de GOx

La actividad de GOx se determinó mediante la determinación del cambio de absorbancia a 546 nm con el tiempo derivado de un colorante generado usando peroxidasa, un reactivo de Trinder (TODB) y 4-aminoantipirina de peróxido del hidrógeno generado a través de la reacción con el sustrato. La reacción se realizó en las condiciones mostradas a continuación.

La reacción se inició mediante la adición de sustrato a una solución de reacción (tampón de fosfato de potasio 10 mM, pH 7,0 + 4-aminoantipirina 1,5 mM + TODB 1,5 mM + 2 U/ml de peroxidasa; todas las concentraciones siendo concentraciones finales) que contenía la solución de enzima, y se determinó el cambio de absorbancia a 546 nm. Se usaron diversas concentraciones de glucosa como sustrato. 1 U se define como la cantidad de una enzima que forma 1 μmol de peróxido de hidrógeno durante 1 minuto. Se usó 38 mM⁻¹ cm⁻¹ como coeficiente de absorción molar de TODB a pH 7,0. A continuación, se muestra la fórmula para calcular un valor de actividad a partir del cambio en la absorbancia.

$$U/ml = \Delta ABS_{546}/min \times 2/38 \times 10$$

$$U/mg = U/ml/mg \text{ de proteína/ml}$$

(5) Determinación de la actividad de GDH

La actividad de GDH se determinó mediante la cuantificación del cambio de absorbancia a 600 nm con el tiempo derivado del desvanecimiento de DCIP reducido a través de la reacción con el sustrato. La reacción se realizó en las condiciones mostradas a continuación.

La reacción se inició mediante la adición de sustrato a una solución de reacción (tampón de fosfato de potasio 10 mM, pH 7,0 + PMS 0,6 mM + DCIP 0,06 mM; todas las concentraciones siendo concentraciones finales) que contenía la solución de enzima, y se determinó el cambio en la absorbancia a 600 nm. Como sustrato, se usaron los usados en la determinación de la actividad de GOx. 1 U se define como la cantidad de una enzima que reduce 1 μmol de DCIP. El valor de la actividad se calculó de acuerdo con la fórmula mostrada a continuación. Se usó 16,3 mM⁻¹ cm⁻¹ como coeficiente de absorción molar de DCIP a pH 7,0.

$$U/ml = \Delta ABS_{600}/min \times 1/16,3 \times 10$$

$$U/mg = U/ml/mg \text{ de proteína/ml}$$

En las Tablas 3 y 4, se muestran los resultados de la determinación de la actividad de la GOx de tipo silvestre y la GOx mutante (diferentes series). Por otra parte, en la Figura 1, se muestra un gráfico que presenta las proporciones de las actividades de oxidasa y deshidrogenasa de diversos mutantes a una concentración de sustrato de glucosa

ES 2 556 605 T3

de 10 mM con respecto a las actividades de tipo silvestre. Los mutantes S132 y F373 resultaron tener una menor actividad de oxidasa y una mayor actividad de deshidrogenasa en comparación con el tipo silvestre. Entre ellos, el mutante S132A resultó tener una mayor actividad de deshidrogenasa, 4 veces superior o más a la del tipo silvestre, y una actividad de oxidasa aproximadamente un 40 % inferior a la del tipo silvestre.

5

Tabla 3

	GOx (U/mg)		GDH (U/mg)		GDH/GOx (%)	
	Sustrato (mM)		Sustrato (mM)		Sustrato (mM)	
	10	100	10	100	10	100
Tipo silvestre	9,05 (100 %)	15,0 (100 %)	2,25 (100 %)	3,83 (100 %)	24,8	25,6
F373A	1,38 (15,2 %)	1,53 (10,3 %)	2,68 (119 %)	3,38 (88,2 %)	194	220
F373L	7,62 (84,2 %)	10,0 (67,1 %)	4,38 (195 %)	6,27 (164 %)	57,5	62,4
F373W	2,91 (32,2 %)	-	0,496 (22,0 %)	-	17,0	-
F373Y	6,94 (76,7 %)	10,2 (68,0 %)	1,35 (60,0 %)	2,03 (53,0 %)	19,4	20,0

Tabla 4

	GOx (U/mg)		GDH (U/mg)		GDH/GOx (%)	
	Sustrato (mM)		Sustrato (mM)		Sustrato (mM)	
	10	100	10	100	10	100
Tipo silvestre	31,3 (100 %)	47,4 (100 %)	8,13 (100 %)	13,1 (100 %)	26	27,7
S132A	10,8 (34,50 %)	14,9 (31,40 %)	24,3 (299 %)	53,5 (408 %)	225	360
S132C	0,592 (1,89 %)	1,86 (3,92 %)	0,779 (9,58 %)	4,21 (32,10 %)	132	226
S132I	0,171 (0,55 %)	1,16 (2,46 %)	0,319 (3,92 %)	2,74 (20,90 %)	186	236
S132N	0,0098 (0,03 %)	0,0514 (0,11 %)	0,0169 (0,21 %)	0,185 (1,41 %)	173	360
S132R	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-	-
S132D	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-	-
S132T	6,94 (29,10 %)	11,2 (28,90 %)	1,84 (27,70 %)	3,02 (26,90 %)	26,5	27,1
S132V	0,0858 (0,36 %)	0,531 (1,38 %)	0,298 (4,49 %)	1,37 (12,20 %)	347	259
S132Y	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-	-
S132E	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-	-
S132H	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-	-
S132M	n.d.	0,0265 (0,06 %)	n.d.	0,101 (0,84 %)	-	380
S132Q	n.d.	0,0399 (0,08 %)	n.d.	0,17 (1,42 %)	-	426
S132A/F373A	0,358 (3,96 %)	0,434 (2,90 %)	3,55 (158 %)	8,07 (211 %)	991	1,86 x 10 ³
S132A/F373L	2,65 (29,30 %)	3,2 (21,40 %)	8,75 (389 %)	19,7 (515 %)	330	616

10 Ejemplo 4: Preparación y análisis de la actividad enzimática de GOx de tipo silvestre y mutante derivada de *Aspergillus niger*

15 Se prepararon GOx de tipo silvestre y mutante de *A. niger* (SwissProt P13006) como se describe en los Ejemplos 1 y 2. El resto de treonina situado en 132 y el resto de fenilalanina situado en 373 de *A. niger* (SwissProt P13006) corresponden al resto de serina situado en 132 y al resto de fenilalanina situado en 373 de *Penicillium amagasakiensis* (GenBank AADO1493), respectivamente.

20 Se preparó GOx mutante de *A. niger*, y se analizó su actividad enzimática como se describe en el Ejemplo 3. Los resultados de las GOx de tipo silvestre y mutante se resumen en la siguiente Tabla 5.

Tabla 5

	GOx (U/mg)		GDH (U/mg)		GDH/GOx (%)	
	Sustrato (mM)		Sustrato (mM)		Sustrato (mM)	
	50 mM	200 mM	50 mM	200 mM	50 mM	200 mM
Tipo silvestre	3,43 (100 %)	5,01 (100 %)	1,37 (100 %)	2 (100 %)	40 (100 %)	40 (100 %)
T132A	2,46 (71,70 %)	3,82 (76,20 %)	4,04 (295 %)	10,1 (502 %)	164 (411 %)	263 (658 %)
T132S	6,64 (193 %)	10,2 (204 %)	4,43 (322 %)	7,13 (356 %)	66,7 (167 %)	69,7 (174 %)
F373Y	2,05 (59,80 %)	3,14 (62,80 %)	1,16 (84,10 %)	2,08 (104 %)	56,3 (141 %)	66,2 (165 %)

ES 2 556 605 T3

La Tabla 6 y 7 muestran el alineamiento de las secuencias de aminoácidos que están anotadas como glucosa oxidadas. Las secuencias enteras de estas glucosa oxidadas mutadas se exponen en SEC ID N°: 1-21. El alineamiento se creó usando la aplicación AlignX de Vector NTI Suite 6.0. Los expertos en la materia apreciarán que otros programas informáticos de alineamiento tales como BLAST proporcionarán el mismo o sustancialmente el mismo alineamiento.

De la Tabla 6, se desprende que Ser132 de SEC ID N°: 1 se conserva entre las secuencias de aminoácidos enumeradas en la Tabla 6. Por consiguiente, el experto en la materia puede identificar fácilmente el resto de Ser o Thr que corresponde a la Ser132 de la SEC ID N°: 1 dentro de la región conservada usando cualquiera de los programas informáticos disponibles en el mercado para el alineamiento de secuencias, y comprender que se prepara fácilmente una glucosa oxidasa mutante mediante la introducción de la modificación en el resto de Ser o Thr. (Nota: *Bases de datos: gb: GenBank; sp: Swissprot; ref: RefSeq; emb: EMBL; pdb: Protein Data Bank; **SEC ID N° representan la secuencia de longitud completa).

Tabla 6

Origen*	Posición de la mutación				SEC ID N°**
gb AAD01493	S132	122	LGGSTLINGD <u>S</u> WTRPDKVQID	142	1
gb ABM63225	S132	122	LGGSTLINGD <u>S</u> WTRPDKVQID	142	2
sp Q92452	S132	122	LGGSTLINGD <u>S</u> WTRPDKVQID	142	3
ref XP_002482295	S163	153	LGGSTLINGD <u>S</u> WTRPDKIQID	173	4
emb CAE47418	S132	122	LGGSTLINGD <u>S</u> WTRPDKVQID	142	5
ref XP_002563451	S132	122	LGGSTLINGD <u>S</u> WTRPDKVQID	142	6
ref XP_001217613	S156	146	LGGSTLINGD <u>S</u> WTRPDKVQID	166	7
ref XP_001215424	S130	120	LGGSTLINGD <u>S</u> WTRPDKVQID	140	8
ref XP_001727544	S133	123	LGGSTLINGG <u>S</u> WTRPDKVQID	143	9
ref XP_002375824	S133	123	LGGSTLINGG <u>S</u> WTRPDKVQID	143	10
ref XP_001216461	S133	123	LGGSTLVNGG <u>S</u> WTSPDKVQLD	143	11
gb ADP03053	T110	100	LGGSTLVNGG <u>T</u> WTRPHKAQVD	120	12
gb ACR56326	T132	122	LGGSTLVNGG <u>T</u> WTRPHKAQVD	142	13
sp P13006	T132	122	LGGSTLVNGG <u>T</u> WTRPHKAQVD	142	14
gb ABG54443	T108	98	LGGSTLVNGG <u>T</u> WTRPHKAQVD	118	15
gb AAV68194	T108	98	LGGSTLVNGG <u>T</u> WTRPHKAQVD	118	16
gb AAF59929	T132	122	LGGSTLVNGG <u>T</u> WTRPHKAQVD	142	17
gb ABG66642	T108	98	LGGSSLVNGG <u>T</u> WTRPHKAQVD	118	18
emb CAC12802	T131	121	LGGSTLVNGG <u>T</u> WTRPHKVQVD	141	19
ref XP_001588502	T130	120	LGGSTLINGA <u>T</u> WTRPHKIQVD	140	20
ref XP_001395420	T163	153	LGGSTLINGG <u>T</u> WTRPHKSQLD	173	21

De la Tabla 7, se desprende que Phe373 de SEC ID N°: 1 se conserva entre las secuencias de aminoácidos enumeradas en la Tabla 7. Por consiguiente, el experto en la materia puede identificar fácilmente el resto de Phe correspondiente a Phe373 de SEC ID N°: 1 dentro de la región conservada usando cualquiera de los programas informáticos disponibles en el mercado para el alineamiento de secuencias, y comprender que se prepara fácilmente una glucosa oxidasa mutante mediante la introducción de la modificación en que el resto de Phe. (Nota: *Bases de datos: gb: GenBank; sp: Swissprot; ref: RefSeq; emb: EMBL; pdb: Protein Data Bank; **SEC ID N° representan la secuencia de longitud completa).

Tabla 7

Origen*	Posición de la mutación				SEC ID N°**
gb AAD01493	F373	363	AGAGQQGQ--AVFFANFTETFGDY	383	1
gb ABM63225	F373	363	AGAGQQGQ--AVFFANFTETFGDY	383	2
sp Q92452	F373	363	AGAGQGO--AVFFANFTETFGDY	383	3
ref XP_002482295	F404	394	AGAGQQGQ--AVFFANFTETFGDY	414	4
emb CAE47418	F373	363	AGTQQGQ--AVFFANFTEVFGDY	383	5
ref XP_002563451	F372	363	A-PGQQGQ--AAYFANFTEVLGDH	382	6
ref XP_001217613	F397	387	AGFGQQGQ--AVYFANFTETFGED	407	7
ref XP_001215424	F371	361	AGFGQQGQ--AVYFANFTETFEED	381	8
ref XP_001727544	F374	364	SGAGQQGQ--AVYFASFNETFGDY	384	9
ref XP_002375824	F374	364	SGAGQQGQ--AVYFASFNETFGDY	384	10
ref XP_001216461	F374	364	TGAGQQGQ--AVYFANFTETFGDH	384	11
gb ADP03053	F351	341	AGAGQQGQ--AAWFATFNETFGDY	361	12
gb ACR56326	F373	363	AGAGQQGQ--AAWFATFNETFGDY	383	13
sp P13006	F373	363	AGAGQQGQ--AAWFATFNETFGDY	383	14
gb ABG54443	F349	339	AGAGQQGQ--AAWFATFNETFGDY	359	15
gb AAV68194	F349	339	AGAGQQGQ--AAWFATFNETFGDY	359	16
gb AAF59929	F373	363	AGAGQQGQ--AAWFATFNETFGDY	383	17
gb ABG66642	F349	339	AGAGQQGQ--AAWFATFNETLGDY	359	18
emb CAC12802	F372	362	AGAGQQGQ--VAIFATFNETFGDY	382	19
ref XP_001588502	F373	363	LGYGQQGQ--AIYFATFNETFGKY	383	20
ref_XP_001395420	F422	412	EANGQQGQ--AAYFATFAEIFGKD	432	21

Ejemplo 5: GOx mutantes adicionales

- 5 Se prepararon GOx mutantes adicionales derivadas de GOx de *Penicillium amagasakiens* (GenBank AADO1493) y *Aspergillus niger* (SwissProt P13006), y se analizó su actividad enzimática como se describe en los Ejemplos 1-4. La proporción de la actividad de la glucosa deshidrogenasa con respecto a la actividad de la glucosa oxidasa de cada mutante se resume en las siguientes Tablas 8a, 8b, 9a y 9b, siendo la proporción de la glucosa oxidada de tipo silvestre del 100 %. Las SEC ID N° de las secuencias de aminoácidos de cada GOx de tipo silvestre se muestran en las Tablas 6 y 7. También se muestra el alineamiento de las secuencias de aminoácidos en torno a las posiciones mutadas en las Tablas 10a-h.

Tabla 8a

1GPE (AADO1493)			
	Tipo de enzima	Proporción de Dh/Ox frente al tipo silvestre	
		Glucosa 10 mM	Glucosa 100 mM
	Tipo silvestre	100 %	100 %
Thr53	Thr53Ser	125 %	-
Ile116	Ile116Val	101 %	-
Ser132	Ser132Ala	839 %	1.235 %
	Ser132Thr	95 %	93 %
	Ser132Val	1.248 %	888 %
	Ser132Cys	508 %	817 %
	Ser132Ile	715 %	851 %
Ile237	Ile237Val	-	182 %
Val371	Val371Thr	118 %	113 %
	Val371Ala	111 %	107 %
Phe373	Phe373Leu	246 %	231 %
	Phe373Tyr	171 %	165 %
	Phe373Ala	862 %	885 %
Glu434	Glu434Gln	215 %	134 %
Phe436	Phe436Trp	-	1365 %
	Phe436Ala	544 %	592 %

ES 2 556 605 T3

1GPE (AAD01493)			
	Tipo de enzima	Proporción de Dh/Ox frente al tipo silvestre	
		Glucosa 10 mM	Glucosa 100 mM
	Phe436Leu	-	127 %
	Phe436Tyr	-	783 %
Trp448	Trp448Ala	1.630 %-	1440 %
	Trp448Ile	-	4382 %
	Trp448Ser	-	644 %
Trp537	Trp537Ala	546 %	550 %

Tabla 8b

1GPE (AAD01493)			
	Tipo de enzima	Proporción de Dh/Ox frente al tipo silvestre	
		Glucosa 10 mM	Glucosa 100 mM
	Tipo silvestre	100 %	100 %
Phe373	Phe373Met	-	195 %
	Phe373Trp	-	111 %
Phe436	Phe436Met	-	155
	Phe436Glu	-	<no oxidasa>
Trp448	Trp448Val	-	4011 %
	Trp448Met	-	<no oxidasa>
	Trp448Thr	-	2290 %
	Trp448Cys	-	4427 %

Tabla 9a

1CF3 (P13006)			
	Tipo de enzima	Proporción de Dh/Ox frente al tipo silvestre	
		Glucosa 50 mM	Glucosa 200 mM
	Tipo silvestre	100 %	100 %
Thr132	Thr132Ala	403 %	537 %
	Thr132Ser	155 %	112 %
	Thr132Val	323 %	503 %
	Thr132Trp	545 %	416 %
	Thr132Cys	1013 %	875 %
Thr134	Thr134Ala	373 %	445 %
Phe237	Phe237Ile	142 %	120 %
Ala371	Ala371Val	223 %	180 %
Phe373	Phe373Leu	293 %	316 %
	Phe373Tyr	170 %	159 %
	Phe373Met	149 %	141 %
	Phe373Asn	235 %	206 %
Trp448	Trp448Ala	488 %	610 %
Mutante doble	Thr132Ala/Phe373Tyr	928 %	1511 %
Mutante doble	Thr132Ser/Phe373Leu	633 %	794 %

5

Tabla 9b

1CF3 (P13006)			
	Tipo de enzima	Proporción de Dh/Ox frente al tipo silvestre	
		Glucosa 50 mM	Glucosa 200 mM
	Tipo silvestre	100 %	100 %
Thr134	Thr134Ile	-	300 %

ES 2 556 605 T3

1CF3 (P13006)			
	Tipo de enzima	Proporción de Dh/Ox frente al tipo silvestre	
		Glucosa 50 mM	Glucosa 200 mM
	Thr134Met	-	170 %
Phe237	Pre237Ala		<no oxidasa>
	Phe237Val	-	210 %
	Phe237Met	-	280 %
	Phe237Ser	-	780 %
	Phe237Asp	-	1.600 %
	Phe237Leu	-	170 %
	Phe237Thr	-	2.900 %
	Phe237Asn	-	600 %
	Phe237Arg	-	<no oxidasa>
	Phe237Cys	-	650 %
	Phe436	Phe436Leu	-
Phe436Ile		-	1.818 %
Phe436Met		-	140 %
Trp448	Trp448Gly	-	819 %
	Trp448Val	-	11.134 %
	Trp448Leu	-	7742 %
	Trp448Ser	-	426 %
	Trp448Asn	-	642 %
	Trp448Asp	-	4.368 %
	Trp448Lys	-	<no oxidasa>
	Trp448Ile	-	940 %
	Trp448Met	-	1.100 %
		Trp448Phe	-
Trp448Thr		-	310 %
Trp448Cys		-	590 %
Trp448Gln		-	680 %
Trp448Tyr		-	270 %

Tabla 10a. Secuencia de aminoácidos en torno a Thr535

Origen	Posición de la mutación	Secuencias de aminoácidos en torno a la/s posición/es mutada/s		
gbAAD01493	T53	43	YDYIIAGGGGLTGLTVAAKLTE	63
gbABM63225	T53	43	YDYIIAGGGGLTGLTVAAKLTE	63
spQ92452	T53	43	YDYIIAGGGGLTGLTVAAKLTE	63
refXP_002482295	T84	74	YDYIIAGGGGLTGLTVAAKLTE	94
embCAE47418	T53	43	YDYIIAGGGGLTGLTVAAKLSE	63
refXP_002563451	T53	43	YDYVIAGGGGLTGLTVAAKLSE	63
refXP_001217613	T77	67	FDYIIAGGGGLTGLTVAAKLTE	87
refXP_001215424	T51	41	FDYIIAGGGGLTGLTVAAKLTE	61
refXP_001727544	T53	43	FDYVIAGGGGLTGLTVATKLTE	63
refXP_002375824	T53	43	FDYVIAGGGGLTGLTVATKLTE	63
refXP_001216461	T53	43	VDYIIAGGGGLTGLTVAAKLTE	63
gbADP03053	T30	20	VDYIIAGGGGLTGLTTAARLTE	40
gbACR56326	T52	42	VDYIIAGGGGLTGLTTAARLTE	62
spP13006	T52	42	VDYIIAGGGGLTGLTTAARLTE	62
gbABG54443	T28	18	VDYIIAGGGGLTGLTTAARLTE	38
gbAAV68194	T28	18	VDYIIAGGGGLTGLTTAARLTE	38
gbAAF59929	T52	42	VDYIIAGGGGLTGLTTAARLTE	62
gbABG66642	T28	18	VDYIIAGGGGLTGLTTAARLTE	38
embCAC12802	T51	41	VDDIIAGGGGLTGLTTAARLTE	61

ES 2 556 605 T3

Origen	Posición de la mutación	Secuencias de aminoácidos en torno a la/s posición/es mutada/s		
refXP_001588502	T50	40	FDYIVAGGGLTGLTAAAILSK	60

Tabla 10b. Secuencia de aminoácidos en torno a Ile116

Origen	Posición de la mutación	Secuencias de aminoácidos en torno a la/s posición/es mutada/s		
gbAAD01493	I116	106	VPL--INNRTNNIKAGKGLGGST	126
gbABM63225	I116	106	VPL--INNRTNNIKAGKGLGGST	126
spQ92452	I116	106	VPL--INNRTNNIKAGKGLGGST	126
refXP_002482295	I147	137	VPL--INNRTNNIKAGKGLGGST	157
embCAE47418	I116	106	VPL--INNRTSSIKSG KG LGGST	126
refXP_002563451	I116	106	VPL--INNRTGEIKSGLGGST	126
refXP_001217613	I140	130	VPL--INNRTDNIKSGKGLGGST	150
refXP_001215424	I114	104	VPL--INNRTDNIKSGKGLGGST	124
refXP_001727544	I117	106	VPLA-VNNRTELIRSGNGLGGST	127
refXP_002375824	I117	106	VPLA-VNNRTELIRSGNGLGGST	127
refXP_001216461	I117	106	VPMG-INNRDLIKSGKGLGGST	127
gbADP03053	I94	83	VELA-TNNQTALIRSGNGLGGST	104
gbACR56326	I116	105	VELA-TNNQTALIRSGNGLGGST	126
spP13006	I116	105	VELA-TNNQTALIRSGNGLGGST	126
gbABG54443	I92	81	VELA-TNNQTALIRSGNGLGGST	102
gbAAV68194	I92	81	VELA-TNNQTALIRSGNGLGGST	102
gbAAF59929	I116	105	VELA-TNNQTALIRSGNGLGGST	126
gbABG66642	I92	81	VELA-TNNQTALIRSGNGLGGSS	102
embCAC12802	I115	104	VELA-TNNLTELIRSGNGLGGST	125
refXP_001588502	I114	103	LNQT-ADIPQQTIRSGRGLGGST	124

Tabla 10c. Secuencia de aminoácidos en torno a S/T132, W133 y T134

Origen	Posición de la mutación	Secuencias de aminoácidos en torno a la/s posición/es mutada/s		
gbAAD01493	S132,W133,T134	122	LGGSTLINGDSWTRPDKVQID	142
gbABM63225	S132,W133,T134	122	LGGSTLINGDSWTRPDKVQID	142
spQ92452	S132,W133,T134	122	LGGSTLINGDSWTRPDKVQID	142
refXP_002482295	S163,W164,T165	153	LGGSTLINGDSWTRPDKIQID	173
embCAE47418	S132,W133,T134	122	LGGSTLINGDSWTRPDKVQID	142
refXP_002563451	S132,W133,T134	122	LGGSTLINGDSWTRPDKVQID	142
refXP_001217613	S156,W157,T158	146	LGGSTLINGDSWTRPDKVQID	166
refXP_001215424	S130,W131,T132	120	LGGSTLINGDSWTRPDKVQID	140
refXP_001727544	S133,W134,T135	123	LGGSTLINGGSWTRPDKVQID	143
refXP_002375824	S133,W134,T135	123	LGGSTLINGGSWTRPDKVQID	143
refXP_001216461	S133,W134,T135	123	LGGSTLVNGGSWTSPDKVQLD	143
gbADP03053	T110,W111,T112	100	LGGSTLVNGGTWTRPHKAQVD	120
gbACR56326	T132,W133,T134	122	LGGSTLVNGGTWTRPHKAQVD	142
spP13006	T132,W133,T134	122	LGGSTLVNGGTWTRPHKAQVD	142
gbABG54443	T108,W109,T110	98	LGGSTLVNGGTWTRPHKAQVD	118
gbAAV68194	T108,W109,T110	98	LGGSTLVNGGTWTRPHKAQVD	118
gbAAF59929	T132,W133,T134	122	LGGSTLVNGGTWTRPHKAQVD	142
gbABG66642	T108,W109,T110	98	LGGSSLVNGGTWTRPHKAQVD	118
embCAC12802	T131,W132,T133	121	LGGSTLVNGGTWTRPHKQVD	141
refXP_001588502	T130,W131,T132	120	LGGSTLINGATWTRPHKIQVD	140

ES 2 556 605 T3

Tabla 10d. Secuencia de aminoácidos en torno a I/F237

Origen	Posición de la mutación	Secuencias de aminoácidos en torno a la/s posición/es mutada/s		
gbAAD01493	I237	227	LCGHPRGVSMIMNNLDE--NQVR	247
gbABM63225	I237	227	LCGHPRGVSMIMNNLDE--NQVR	247
spQ92452	I237	227	LCGHPRGVSMIMNNVDE--NQVR	247
refXP_002482295	I268	258	LCGHPRGVSMIMNNVDE--NQVR	278
embCAE47418	I237	227	LCGHPRGVSMIYNLDE--NQVR	247
refXP_002563451	I237	227	HCGHPRGVSMIPNNLHE--NQIR	247
refXP_001217613	I261	251	HCGHPRGVSMIPNNLLE--DQVR	271
refXP_001215424	I235	225	HCGHPRGVSMIPNNLLE--DQVR	245
refXP_001727544	I238	228	HCGHPRGVSMIPNAVHE--DQTR	248
refXP_002375824	I238	228	HCGHPRGVSMIPNAVHE--DQTR	248
refXP_001216461	I238	228	HCGHPRGVSMILNSLHE--DQTR	248
gbADP03053	F215	205	GCGDPHGVSMFPNTLHE--DQVR	225
gbACR56326	F237	227	GCGDPHGVSMFPNTLHE--DQVR	247
spP13006	F237	227	GCGDPHGVSMFPNTLHE--DQVR	247
gbABG54443	F213	203	GCGDPHGVSMFPNTLHE--DQVR	223
gbAAV68194	F213	203	GCGDPHGVSMFPNTLHE--DQVR	223
gbAAF59929	F237	227	GCGDPHGVSMFPNTLHE--DQVR	247
gbABG66642	F213	203	GCGDPHGVSMFPNTLHE--DQVR	223
embCAC12802	F236	226	GCGDPHGVSMFPNTLHE--DQVR	246
refXP_001588502	F235	225	SCGNPHGVSMFPNSLHANWNQTR	247

Tabla 10e. Secuencia de aminoácidos en torno a V/A/I371 y F373

Origen	Posición de la mutación	Secuencias de aminoácidos en torno a la/s posición/es mutada/s		
gbAAD01493	V371,F373	363	AGAGQQGQ--AVFFANFTETFGDY	383
gbABM63225	V371,F373	363	AGAGQQGQ--AVFFANFTETFGDY	383
spQ92452	V371 ,F373	363	AGAGQQGQ--AVFFANFTETFGDY	383
refXP_002482295	V402,F404	394	AGAGQQGQ--AVFFANFTETFGDY	414
embCAE47418	V371,F373	363	AGTGQQGQ--AVFFANFTEVFGDY	383
refXP_002563451	A370,F372	363	A-PGQQGQ--AAYFANFTEVLGDH	382
refXP_001217613	V395,F397	387	AGFGQQGQ--ABVYFANFTETFGED	407
refXP_001215424	V369,F371	361	AGFGQQGQ--AVYFANFTETFEED	381
refXP_001727544	V372,F374	364	SGAGQQGQ--AVYFASFNETFGDY	384
refXP_002375824	V372,F374	364	SGAGQQGQ--AVYFASFNETFGDY	384
refXP_001216461	V372,F374	364	TGAGQQGQ--AVYFANFTETFGDH	384
gbADP03053	A349,F351	341	AGAGQQGQ--AAWFATFNETFGDY	361
gbACR56326	A371 ,F373	363	AGAGQQGQ--AAWFATFNETFGDY	383
spP13006	A371 ,F373	363	AGAGQQGQ--AAWFATFNETFGDY	383
gbABG54443	A347,F349	339	AGAGQQGQ--AAWFATFNETFGDY	359
gbAAV68194	A347,F349	339	AGAGQQGQ--AAWFATFNETFGDY	359
gbAAF59929	A371 ,F373	363	AGAGQQGQ--AAWFATFNETFGDY	383
gbABG66642	A347,F349	339	AGAGQQGQ--AAWFATFNETLGDY	359
embCAC12802	A370,F372	362	AGAGQQGQ--VAIFATFNETFGDY	382
refXP_001588502	1371,F373	363	LGYGQQGQ--AIYFATFNETFGKY	383

5

Tabla 10f. Secuencia de aminoácidos en torno a E434 y F436

Origen	Posición de la mutación	Secuencias de aminoácidos en torno a la/s posición/es mutada/s		
gbAAD01493	E434,F436	426	LDED--VAFAELFMDT--EGKINFD	446
gbABM63225	E434,F436	426	LDED--VAFAELFMDT--EGKINFD	446
spQ92452	E434,F436	426	LDED--VAFAELFMDT--EGKINFD	446
refXP_002482295	E435,F467	457	LDED--VAFAELFMDT--EGKINFD	477

ES 2 556 605 T3

Origen	Posición de la mutación	Secuencias de aminoácidos en torno a la/s posición/es mutada/s		
embCAE47418	E434,F436	426	LEED--VAYA <u>EL</u> FM DT--SGKINFD	446
refXP_002563451	E433,F435	425	LDED--VAFA <u>EL</u> FFDT--EGKINFD	445
refXP_001217613	E458,F460	450	LNED--VAYA <u>EL</u> FLDT--SGQINFD	470
refXP_001215424	E432,F434	424	LNED--VAYA <u>EL</u> FLDT--SGQINFD	444
refXP_001727544	E435,F437	427	LNED--VAFA <u>EL</u> FLDT--EGKINFD	447
refXP_002375824	E435,F437	427	LNED--VAFA <u>EL</u> FLDT--EGKINFD	447
refXP_001216461	E435,F437	427	LEDD--VAFV <u>EF</u> FFDS--NGMINFD	447
gbADP03053	E412,F414	404	VNHN--VAY <u>SEL</u> FLDT--AGVASFD	424
gbACR56326	E434,F436	426	VKDN--VAY <u>SEL</u> FLDT--AGVASFD	446
spP13006	E434,F436	426	VNHN--VAY <u>SEL</u> FLDT--AGVASFD	446
gbABG54443	E410,F412	402	VKDN--VAY <u>SEL</u> FLDT--AGVASFD	422
gbAAV68194	E410,F412	402	VKDN--VAY <u>SEL</u> FLDT--AGVASFD	422
gbAAF59929	E434,F436	426	VNHN--VAY <u>SEL</u> FLDT--AGVASFD	426
gbABG66642	E410,F412	402	VKDN--VAY <u>SEL</u> FLDT--AGVASFG	422
embCAC12802	E433,F435	425	VNHN--VAY <u>SEL</u> FLDT--AGAVSFT	445
refXP_001588502	E434,F436	426	TKDN--IAY <u>SEL</u> FMDT--EGAINFD	446

Tabla 10g. Secuencia de aminoácidos en torno a W448

Origen	Posición de la mutación	Secuencias de aminoácidos en torno a la/s posición/es mutada/s		
gbAAD01493	W448	438	DT--EGKINFDL <u>W</u> DLIPFTRGSV	458
gbABM63225	W448	438	DT--EGKINFDL <u>W</u> DLIPFTRGSV	458
spQ92452	W448	438	DT--EGKINFDL <u>W</u> DLIPFTRGSV	458
refXP_002482295	W479	469	DT--EGKINFDL <u>W</u> DLIPFTRGSV	489
embCAE47418	W448	438	DT--SGKINFDL <u>W</u> DLIPFTRGSV	458
refXP_002563451	W447	437	DT--EGKINFDI <u>W</u> NLIPFTRGSV	457
refXP_001217613	W472	462	DT--SGQINFDL <u>W</u> DLIPFTRGST	482
refXP_001215424	W446	436	DT--SGQINFDL <u>W</u> DLIPFTRGST	456
refXP_001727544	W449	439	DT--EGKINFDL <u>W</u> DLIPFTRGSV	459
refXP_002375824	W449	439	DT--EGKINFDL <u>W</u> DLIPFTRGSV	459
refXP_001216461	W449	439	DS--NGMINFDL <u>W</u> DLIPFTRGST	459
gbADP03053	W426	416	DT--AGVASFDV <u>W</u> DLLPFTRGYV	436
gbACR56326	W448	438	DT--AGVASFDV <u>W</u> DLLPFTRGYV	458
spP13006	W448	438	DT--AGVASFDV <u>W</u> DLLPFTRGYV	458
gbABG54443	W424	414	DT--AGVASFDV <u>W</u> DLLPFTRGYV	434
gbAAV68194	W424	414	DT--AGVASFDV <u>W</u> DLLPFTRGYV	434
gbAAF59929	W448	438	DT--AGVASFDV <u>W</u> DLLPFDRGYV	458
gbABG66642	W424	414	DT--AGVASFGV <u>W</u> DLLPFTRGYV	434
embCAC12802	W447	437	DT--AGAVSFTI <u>W</u> DLIPFTRGYV	457
refXP_001588502	W448	438	DT--EGAINFDL <u>W</u> TLPFTRGFV	458

Tabla 10h. Secuencia de aminoácidos en torno a W/Y537

Origen	Posición de la mutación	Secuencias de aminoácidos en torno a la/s posición/es mutada/s		
gbAAD01493	W537	527	DYVLQN-FRPN <u>W</u> HAVSSCSMMS	547
gbABM63225	W537	527	DYVLQN-FRPN <u>W</u> HAVSSCSMMS	547
spQ92452	W537	527	DYVLQN-FRPN <u>W</u> HAVSSCSMMS	547
refXP_002482295	W568	558	AYVLQN-FRPN <u>W</u> HAVSSCSMMS	578
embCAE47418	W537	527	DYVIQN-FRPN <u>W</u> HAVSSCSMMA	547
refXP_002563451	W536	526	DYVMN-FRPN <u>W</u> HAVSTCSMMS	546
refXP_001217613	W561	551	EYVKDN-FRAN <u>W</u> HAVGTCSMMS	571
refXP_001215424	W535	525	EYVKDN-FRAN <u>W</u> HAVGTCSMMS	545
refXP_001727544	W538	528	DYVKEN-FRAN <u>W</u> HAVSSCSMMS	548

ES 2 556 605 T3

Origen	Posición de la mutación	Secuencias de aminoácidos en torno a la/s posición/es mutada/s		
refXP_002375824	W538	528	DYVKEN-FRAN W HAVSSCSMMS	548
refXP_001216461	W539	529	EYVKQN-FRAN W HAVSTCAMMS	549
gbADP03053	Y515	505	EYIPYH-FRP N YHGVGTCSMMP	525
gbACR56326	Y537	527	EYIPYN-FRP N YHGVGTCSMMP	547
spP13006	Y537	527	EYIPYH-FRP N YHGVGTCSMMP	547
gbABG54443	Y513	503	EYIPYN-FRP N YHGVGTCSMMP	523
gbAAV68194	Y513	503	EYIPYN-FRP N YHGVGTCSMMP	523
gbAAF59929	Y537	527	EYIPYH-FRP N YHDVGTCSMMP	547
gbABG66642	Y513	503	EYIPYN-FRP N YHGVGTCSMMP	523
embCAC12802	Y536	526	EYIKYN-FRP N YHGVGTCSMMK	546
refXP_001588502	Y538	528	SYVKQN-FRP N YHNVGSCSMMA	548

Aplicabilidad Industrial

5 La glucosa oxidasa mutada de la invención se puede usar para la medición de la glucosa, lo que es de utilidad clínica en el diagnóstico y el control de las afecciones diabéticas.

REIVINDICACIONES

1. Una glucosa oxidasa mutante modificada en una o más posiciones seleccionadas entre:
 - 5 (a) una posición correspondiente a la posición 53 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 1 mediante la sustitución del resto de aminoácido Thr con Ser;
 - (b) una posición correspondiente a la posición 116 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 1 mediante la sustitución del resto de aminoácido Ile con Val;
 - 10 (c) una posición correspondiente a la posición 132 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 1 mediante la sustitución del resto de aminoácido Ser con Ala, Thr, Val, Cys o Ile, o mediante la sustitución del resto de aminoácido Thr con Ala, Ser, Val, Trp o Cys;
 - (d) una posición correspondiente a la posición 134 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 1 mediante la sustitución del resto de aminoácido Thr con Ala, Ile o Met;
 - 15 (e) una posición correspondiente a la posición 237 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 1 mediante la sustitución del resto de aminoácido Ile con Val, o mediante la sustitución del resto de aminoácido Phe con Ile, Ala, Val, Met, Ser, Asp, Leu, Thr, Asn, Arg o Cys;
 - (f) una posición correspondiente a la posición 371 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 1 mediante la sustitución del resto de aminoácido Val con Thr, Ala, o mediante la sustitución del resto de aminoácido Ala con Val;
 - 20 (g) una posición correspondiente a la posición 373 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 1 mediante la sustitución del resto de aminoácido Phe con Leu, Tyr, Ala, Met, Asn o Trp;
 - (h) una posición correspondiente a la posición 434 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 1 mediante la sustitución del resto de aminoácido Glu con Gln;
 - 25 (i) una posición correspondiente a la posición 436 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 1 mediante la sustitución del resto de aminoácido Phe con Trp, Ala, Leu, Tyr, Met, Glu o Ile;
 - (j) una posición correspondiente a la posición 448 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 1 mediante la sustitución del resto de aminoácido Trp con Ala, Ile, Ser, Val, Met, Thr, Cys, Gly, Leu, Asn, Asp, Lys, Phe, Gln o Tyr; y
 - 30 (k) una posición correspondiente a la posición 537 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 1 mediante la sustitución del resto de aminoácido Trp con Ala.
2. La glucosa oxidasa mutante de la reivindicación 1, que tiene una actividad de oxidasa reducida en comparación con la glucosa oxidasa de tipo silvestre.
- 35 3. La glucosa oxidasa mutante de la reivindicación 1, que tiene una actividad de oxidasa inferior a su actividad de deshidrogenasa.
4. La glucosa oxidasa mutante de la reivindicación 1, que tiene una actividad de deshidrogenasa del 50 % o más de la glucosa oxidasa de tipo silvestre.
- 40 5. La glucosa oxidasa mutante de la reivindicación 1, que tiene una proporción de actividad de glucosa deshidrogenasa con respecto a la actividad de glucosa oxidasa superior a la de la glucosa oxidasa de tipo silvestre.
- 45 6. La glucosa oxidasa mutante de la reivindicación 1 que tiene la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID N° 1-21 modificadas en una o más posiciones correspondientes a las posiciones 53, 116, 132, 134, 237, 371, 373, 434, 436, 448 o 537 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 1.
7. Un polinucleótido aislado que codifica la glucosa oxidasa mutante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6.
- 50 8. Un vector que comprende el polinucleótido de la reivindicación 7.
9. Una célula hospedadora transformada con un vector de la reivindicación 8.
- 55 10. Un método de determinación de la glucosa en una muestra que comprende poner en contacto la muestra con la glucosa oxidasa de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 y medir la cantidad de la glucosa oxidada por la glucosa oxidasa.
- 60 11. Un dispositivo para determinar la glucosa en una muestra que comprende la glucosa oxidasa de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 y un mediador de electrones.
- 65 12. Un kit para determinar la glucosa en una muestra que comprende la glucosa oxidasa de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 y un mediador de electrones
13. Un electrodo enzimático que tiene la glucosa oxidasa de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 que está inmovilizado en el electrodo.
14. Un sensor enzimático para determinar la glucosa que comprende el electrodo enzimático de la reivindicación 13 como electrodo de trabajo.

Fig. 1

