

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 624 805**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/04**

(2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.04.2007 PCT/EP2007/003207**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.10.2007 WO07118647**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.04.2007 E 07724148 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.03.2017 EP 2010649**

54 Título: **Mutantes mejorados de glucosa deshidrogenasa soluble dependiente de pirroloquinolina quinona**

30 Prioridad:

**13.04.2006 EP 06007779**

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

**17.07.2017**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BOENITZ-DULAT, MARA;  
BECK, DANIELA;  
KRATZSCH, PETER;  
SCHMUCK, RAINER y  
VON DER ELTZ, HERBERT**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

ES 2 624 805 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 mejorados de glucosa deshidrogenasa soluble dependiente de pirroloquinolina quinona

La presente invención se refiere a un mutante de glucosa deshidrogenasa soluble dependiente de PQQ (s-GDH; EC 1.1.5.2) con especificidad mejorada por la glucosa en comparación con la maltosa, que tiene una sustitución de treonina en la posición 348 por glicina, alanina o bien serina y en el que dicho mutante comprende adicionalmente al menos una mutación para mejorar la estabilidad del mutante y una o más mutaciones para mejorar la afinidad del mutante por las hexosas, por ejemplo, preferentemente glucosa, y/o una o más mutaciones para mejorar aún más la especificidad del mutante por la glucosa en comparación con la maltosa, y en el que estas posiciones corresponden a las posiciones de aminoácidos conocidas de la secuencia natural de s-GDH de *A. calcoaceticus*. También se divulgan genes que codifican dicha s-GDH mutante, y diferentes aplicaciones de estos mutantes de s-GDH, en particular para determinar la concentración de glucosa en una muestra.

#### Antecedentes de la invención

La determinación de la concentración de glucosa en sangre es extremadamente importante en el diagnóstico clínico y en el tratamiento de la diabetes. Aproximadamente 150 millones de personas en todo el mundo padecen la enfermedad crónica *diabetes mellitus*, una cifra que podría duplicarse para el año 2025 de acuerdo con la OMS. Aunque la diabetes se diagnostica y trata fácilmente, el tratamiento a largo plazo exitoso requiere herramientas de diagnóstico de bajo costo que informen de forma rápida y precisa de las concentraciones de glucosa en sangre. Las glucosa deshidrogenasas dependientes de PQQ (EC 1.1.5.2) catalizan una reacción en la que se oxida la glucosa a gluconolactona. En consecuencia, este tipo de enzima se usa en la medición de azúcar en la sangre. Una de estas herramientas es una tira de diagnóstico basada en la glucosa deshidrogenasa soluble (s-GlucDOR, EC 1.1.5.2), una enzima que contiene pirroloquinolina quinona derivada originalmente de *Acinetobacter calcoaceticus*.

Las quinoproteínas usan quinona como cofactor para oxidar alcoholes, aminas y aldosas a sus lactonas, aldehídos y ácidos aldólicos correspondientes (Duine, J.A., Energy generation and the glucose dehydrogenase pathway in *Acinetobacter*, en "The Biology of *Acinetobacter*" Nueva York, Plenum Press (1991), pp. 295-312; Duine, J.A., Eur. J. Biochem. 200 (1991) 271-284; Davidson, V.L., en "Principles and applications of quinoproteins", todo el libro, Nueva York, Marcel Dekker (1993); Anthony, C., Biochem. J. 320 (1996) 697-711; Anthony, C. y Ghosh, M., Current Science 72 (1997) 716-727; Anthony, C., Biochem. Soc. Trans. 26 (1998) 413-417; Anthony, C. y Ghosh, M., Prog. Biophys. Mol. Biol. 69 (1998) 1-22. Entre las quinoproteínas, las que contienen el cofactor 2,7,9-tricarboxi-1H-pirrolo[2,3-f]quinolin-4,5-diona (PQQ) no unido covalentemente constituyen el mayor subgrupo (Duine 1991, *supra*). Todas las glucosa deshidrogenasas de quinona bacterianas conocidas hasta el momento pertenecen a este subgrupo con PQQ como cofactor (Anthony y Ghosh 1997 *supra*; Goodwin, P.M. y Anthony, C., Adv. Microbiol. Physiol. 40 (1998) 1-80; Anthony, C., Adv. in Phot. and Resp. 15 (2004) 203-225).

Se han caracterizado dos tipos de glucosa deshidrogenasa dependiente de PQQ (EC 1.1.5.2) en las bacterias: Uno está unido a la membrana (m-GDH); el otro es soluble (s-GDH). Ambos tipos no comparten ninguna homología de secuencia significativa (Cleton-Jansen, A.M., *et al.*, Mol. Gen. Genet. 217 (1989) 430-436; Cleton-Jansen, A.M., *et al.*, Antonie Van Leeuwenhoek 56 (1989) 73-79.; Oubrie, A., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96 (1999) 11787-11791. También son diferentes con respecto tanto a su cinética como a sus propiedades inmunológicas (Matsushita, K., *et al.*, Bioscience Biotechnol. & Biochem. 59 (1995) 1548-1555). Las m-GDH están generalizadas en las bacterias gramnegativas, las s-GDH, sin embargo, se han encontrado solo en el espacio periplásmico de cepas de *Acinetobacter*, como *A. calcoaceticus* (Duine, J.A., 1991a; Cleton-Jansen, A.M. *et al.*, J. Bacteriol. 170 (1988) 2121-2125; Matsushita y Adachi, 1993) y *A. baumannii* (documento JP 11243949).

A través de la búsqueda en bases de datos de secuencias, se han identificado dos secuencias homólogas a s-GDH de *A. calcoaceticus* de longitud completa en *E. coli* K-12 y *Synechocystis* sp.. Adicionalmente, también se encontraron dos secuencias incompletas homólogas de s-GDH de *A. calcoaceticus* en el genoma de *P. aeruginosa* y *Bordetella pertussis* (Oubrie *et al.* 1999 a, b, c) y *Enterobacter intermedium* (Kim, C.H. *et al.*, Current Microbiol. 47 (2003) 457-461), respectivamente. Las secuencias de aminoácidos deducidas de estas cuatro proteínas no caracterizadas están estrechamente relacionadas con s-GDH de *A. calcoaceticus*, con muchos residuos en el presunto sitio activo absolutamente conservados. Estas proteínas homólogas es probable que tengan una estructura similar y catalicen reacciones dependientes de PQQ similares (Oubrie *et al.*, 1999 a, b, c; Oubrie A., Biochim. Biophys. Acta 1647 (2003) 143-151; Reddy, S., y Bruce, TC, J. Am. Chem. Soc. 126 (2004) 2431-2438; Yamada, M. *et al.*, Biochim. Biophys. Acta 1647 (2003) 185-192).

Se ha encontrado que las s-GDH y m-GDH bacterianas poseen secuencias bastante diferentes y diferente especificidad de sustrato. Por ejemplo, *A. calcoaceticus* contiene dos glucosa deshidrogenasas dependientes de PQQ diferentes, una designada m-GDH que es activa *in vivo* y la otra designada s-GDH para la que solo se puede mostrar actividad *in vitro*. Cleton-Jansen *et al.*, 1988; 1989 a, b clonaron los genes que codifican las dos enzimas GDH y determinaron las secuencias de ADN de ambos de estos genes de GDH. No hay homología evidente entre m-GDH y s-GDH, corroborando el hecho de que m-GDH y s-GDH representan dos moléculas completamente diferentes (Laurinavičius, V., *et al.*, Biologija (2003) 31-34).

El gen de s-GDH de *A. calcoaceticus* se ha clonado en *E. coli*. Después de producirse en la célula, la s-GDH se transloca a través de la membrana citoplásmica en el espacio periplásmico (Duine, J.A., Energy generation and the glucose dehydrogenase pathway in *Acinetobacter*, en "The Biology of *Acinetobacter*", Nueva York, Plenum Press (1991), pp. 295-312; Matsushita, K. y Adachi, O., Bacterial quinoproteins glucose dehydrogenase and alcohol dehydrogenase, en "Principles and applications of Quinoproteins", Nueva York, Marcel Dekker (1993) pp. 47-63). Al igual que la s-GDH natural de *A. calcoaceticus*, la s-GDH recombinante expresada en *E. coli* es un homodímero, con una molécula de PQQ y tres iones de calcio por monómero (Dokter, P. *et al.*, Biochem. J. 239 (1986) 163-167; Dokter, P. *et al.*, FEMS Microbiol. Lett. 43 (1987) 195-200; Dokter, P. *et al.*, Biochem. J. 254 (1988) 131-138; Olsthoorn, A.J. y Duine, J.A., Arch. Biochem. Biophys. 336 (1996) 42-48; 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; Oubrie, A., *et al.*, EMBO J. 18 (1999) 5187-5194). La s-GDH oxida una amplia gama de mono- y disacáridos a las cetonas correspondientes que se hidrolizan adicionalmente a los ácidos aldónicos, y también puede donar electrones a 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 (1989) 6276-6280; Matsushita, K., *et al.*, Antonie Van Leeuwenhoek 56 (1989) 63-72), varios aceptores de electrones artificiales tales como metilsulfato de N-metilfenazonio (Olsthoorn, A.J. y Duine, J.A., Arch. Biochem. Biophys. 336 (1996) 42-48; Olsthoorn, A.J. y Duine, J.A., Biochem. 37 (1998) 13.854-13.861) y polímeros electroconductores (Ye, L., *et al.*, Anal. Chem. 65 (1993) 238-241). En vista de una alta actividad específica de la s-GDH hacia la glucosa (Olsthoorn, A.J. y Duine, J.A., (1996) *supra*) y su amplia especificidad por aceptores de electrones artificiales, la enzima es muy adecuada para aplicaciones analíticas, particularmente para usarse en (bio)sensores o tiras de prueba para la determinación de glucosa en aplicaciones de diagnóstico (Kaufmann, N. *et al.*, Development and evaluation of a new system for determining glucose from fresh capillary blood and heparinized blood en "Glucotrend" (1997) 1-16, Boehringer Mannheim GmbH; Woosuck, S. *et al.*, Sensors and Actuators B 100 (2004) 395-402).

La oxidación de la glucosa se puede catalizar por al menos tres grupos bastante distintos de enzimas, es decir, por glucosa deshidrogenasas dependientes de NAD/P, por flavoproteína glucosa oxidasas o por GDH de quinoproteína (Duine, J.A., Biosens. Bioelectronics 10 (1995) 17-23). Se ha observado una autooxidación bastante lenta de la s-GDH reducida, demostrando que el oxígeno es un aceptor de electrones muy pobre para s-GDH (Olsthoorn y Duine, 1996). La s-GDH puede donar eficientemente electrones de 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 reactivas y sensores tradicionales para controlar el nivel de glucosa en sangre, suero y orina, por ejemplo de pacientes diabéticos, usan la glucosa oxidasa. El rendimiento de la enzima depende de la concentración de oxígeno. Las mediciones de glucosa a diferentes altitudes con diferentes concentraciones de oxígeno en el aire pueden conducir a resultados falsos. La principal ventaja de las glucosa deshidrogenasas dependientes de PQQ es su independencia del oxígeno. Esta importante característica se analiza, por ejemplo, en el documento US 6.103.509, en el que se han investigado algunas características de la GDH unida a la membrana.

Una contribución importante para el campo ha sido el uso de s-GDH junto con mediadores apropiados. Se divulgan con detalle procedimientos de ensayo y dispositivos de tira de prueba basados en s-GDH en el documento US 5.484.708. Esta patente también contiene información detallada sobre la puesta a punto de ensayos y la producción de tiras reactivas basadas en s-GDH para la medición de la glucosa.

Otras patentes o solicitudes relacionadas con el campo y que comprenden información específica sobre los diversos modos de aplicaciones para enzimas con actividad de glucosa deshidrogenasa son US 5.997.817; US 6.057.120; EP 0 620 283; y JP 11-243949-A.

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

A pesar de las ventajas analizadas anteriormente para el uso de una s-GDH dependiente de PQQ, en la determinación de la glucosa también se ha de considerar una desventaja. La enzima tiene un espectro de sustrato bastante amplio en comparación con m-GDH. Es decir, la s-GDH oxida no solo la glucosa, sino también varios otros azúcares incluyendo maltosa, galactosa, lactosa, manosa, xilosa y ribosa (Dokter *et al.* 1986 a; Oubrie A., Biochim. Biophys. Acta 1647 (2003) 143-151). La reactividad hacia azúcares distintos de la glucosa en determinados casos puede perjudicar la exactitud de la determinación de los niveles de glucosa en sangre. En particular, los pacientes en diálisis peritoneal, tratados con icodextrina (un polímero de glucosa) pueden contener en sus líquidos corporales, por ejemplo, en la sangre, niveles altos de otros azúcares, especialmente de maltosa (Wens, R., *et al.*, Perit. Dial. Int. 18 (1998) 603-609).

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

Hay pocos informes en la literatura sobre intentos de producir s-GDH dependientes de PQQ modificadas con especificidad de sustrato alterada. Igarashi, S., *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 264 (1999) 820-824 informan de que la introducción de una mutación puntual en la posición Glu277 conduce a mutantes con el perfil de especificidad de sustrato alterado.

Sode, documento EP 1.176.202, informa de que ciertas sustituciones de aminoácidos dentro de s-GDH conducen a s-GDH mutante con una afinidad mejorada por la glucosa. En el documento EP 1.167.519, el mismo autor informa sobre s-GDH mutante con estabilidad mejorada. Además, el mismo autor informa en el documento JP2004173538 sobre otros mutantes de s-GDH con afinidad mejorada por la glucosa.

Kratzsch, P. *et al.*, documento WO 02/34919, informan de que la especificidad de s-GDH por la glucosa en comparación con otros sustratos de azúcar, especialmente en comparación con la maltosa, se puede mejorar mediante sustituciones de aminoácidos en ciertas posiciones de s-GDH. Es básico y crucial una sustitución en la posición del aminoácido 348. Una s-GDH mutante que comprende por ejemplo una glicina en la posición 348, en lugar de una treonina como está presente en la s-GDH natural, tiene una selectividad enormemente mejorada por el sustrato glucosa, por ejemplo, en comparación con el sustrato maltosa. También divulgan que un mutante doble que tiene sustituciones en las posiciones 348 y 428 tienen una especificidad aún más mejorada por la glucosa.

En el documento WO 2006/008132, se muestra que una inserción de aminoácido entre los aminoácidos 428 y 429 de s-GDH, especialmente en combinación con una sustitución de aminoácido apropiada en la posición 348, tiene efectos muy favorables sobre la especificidad de sustrato. Los mutantes que comprenden esta inserción son, por ejemplo, más específicos por el sustrato glucosa, en comparación con el sustrato maltosa.

Sin embargo, aunque se ha informado de bastantes mejoras en la especificidad de la glucosa, parece que dichas mejoras con frecuencia y por desgracia van de la mano con desventajas como, por ejemplo, una estabilidad reducida, una actividad reducida y/o una afinidad reducida por la glucosa de dicha s-GDH mutada. Por ejemplo, se ha hecho evidente que la especificidad mejorada de un mutante de s-GDH que comprende una sustitución de aminoácido en la posición 348 va a expensas de la estabilidad, la afinidad y la actividad de dicho mutante en comparación con la enzima natural.

Por lo tanto, existe una gran demanda y necesidad clínica de obtener formas mutantes más mejoradas de s-GDH que tengan una alta especificidad por la glucosa y que cuenten, al mismo tiempo, con una termoestabilidad razonable, así como mejoras en la actividad específica o afinidad por la glucosa, o que cuenten con mejoras tanto en la actividad específica como la afinidad por la glucosa.

Era tarea de la presente invención proporcionar nuevos mutantes o variantes de s-GDH que mejoren significativamente la termoestabilidad, actividad específica y afinidad por la glucosa en comparación con un mutante con especificidad mejorada que comprende una sustitución en la posición 348.

Se ha descubierto que es posible mejorar significativamente la termoestabilidad, la actividad específica y la afinidad por la glucosa de un mutante de s-GDH que tiene una sustitución en la posición 348 mediante la selección de mutaciones de las posiciones como se indica en las reivindicaciones adjuntas.

Debido a las propiedades mejoradas de las nuevas formas de s-GDH, es posible un avance técnico significativo para las determinaciones de glucosa en diversos campos de aplicaciones. Los mutantes de s-GDH mejorados de acuerdo con la presente invención se pueden usar, por ejemplo, con gran ventaja para la detección específica o la medición de la glucosa en muestras biológicas.

## Sumario de la invención

La presente invención se refiere a mutantes de s-GDH. Se divulga un mutante de glucosa deshidrogenasa soluble dependiente de PQQ (s-GDH; EC 1.1.5.2) con especificidad mejorada por la glucosa en comparación con la maltosa, que tiene una sustitución de treonina en la posición 348 por glicina, alanina o bien serina y en el que dicho mutante comprende adicionalmente al menos una mutación para mejorar la estabilidad del mutante, en el que dicha sustitución para mejorar la estabilidad se selecciona del grupo que consiste en D87R; N122K; S124K; S146G; V298L y L386F, al menos una mutación para mejorar la afinidad del mutante por la glucosa, y opcionalmente una o más mutaciones para mejorar aún más la especificidad del mutante por la glucosa en comparación con la maltosa, y en el que las posiciones dadas corresponden a las posiciones de aminoácidos conocidas de la secuencia natural de s-GDH de *A. calcoaceticus* (SEQ ID NO: 2)

También se divulgan un polinucleótido aislado que codifica una proteína mutante de s-GDH, un vector de expresión que comprende dicho polinucleótido aislado ligado operativamente a una secuencia promotora que puede promover la expresión de dicho polinucleótido en una célula hospedadora y una célula hospedadora que comprende dicho vector de expresión.

Además se describe un proceso para la producción de mutantes de s-GDH que comprende cultivar la célula hospedadora transfectada con un vector de expresión apropiado en condiciones adecuadas para la producción de un mutante de s-GDH.

5 También se divulga un procedimiento para detectar, determinar o medir glucosa en una muestra usando un mutante de s-GDH mejorado de acuerdo con la presente invención, comprendiendo dicha mejora poner en contacto la muestra con dicho mutante.

10 También se describe un dispositivo para la detección o medición de glucosa en una muestra que comprende un mutante de s-GDH mejorado de acuerdo con la presente invención y otros reactivos necesarios para dicha medición.

### Descripción detallada de la invención

15 En un primer modo de realización, la invención se refiere a un mutante de glucosa deshidrogenasa soluble dependiente de PQQ (s-GDH; EC 1.1.5.2) con especificidad mejorada por la glucosa en comparación con la maltosa, que tiene una sustitución de treonina en la posición 348 por glicina, alanina o bien serina y en el que dicho mutante comprende al menos una mutación para mejorar la estabilidad del mutante, en el que dicha sustitución para mejorar la estabilidad se selecciona del grupo que consiste en D87R; N122K; S124K; S146G; V298L y L386F, y comprende adicionalmente al menos una mutación para mejorar la afinidad del mutante por la glucosa, y opcionalmente una o 20 más mutaciones para mejorar aún más la especificidad del mutante por la glucosa en comparación con la maltosa, y en el que las posiciones dadas corresponden a las posiciones de aminoácidos conocidas de la secuencia natural de s-GDH de *A. calcoaceticus* (SEQ ID NO: 2).

25 Como se describe en el documento WO 02/34919, se puede usar una sustitución del aminoácido en la posición 348 de la secuencia de s-GDH correspondiente a la secuencia natural aislada a partir de *A. calcoaceticus* para mejorar significativamente la especificidad por la glucosa de s-GDH. Esta es la razón por la que las mejoras descritas en el marco de la presente invención están todas descritas y basadas en un mutante de s-GDH que comprende una sustitución de aminoácido en la posición 348. Preferentemente, el residuo de treonina en la posición 348 está sustituido con un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en alanina, glicina y serina. En otro 30 modo de realización preferente, se usa glicina para sustituir a la treonina en la posición 348. La terminología T348G es conocida por el experto en la técnica e indica que la treonina en la posición 348 se reemplaza por glicina.

35 Como se analiza anteriormente en el presente documento, se agrupan dos tipos de enzimas de quinoproteína completamente diferentes con actividad de glucosa deshidrogenasa (unido a la membrana y soluble) bajo EC 1.1.5.2. Estos dos tipos no parecen estar relacionados entre sí.

Para el propósito de la presente invención, solamente la forma soluble de GDH (s-GDH) es relevante y los mutantes mejorados de la misma se analizan en el presente documento a continuación.

40 Es conocido en la técnica que la secuencia de ADN natural de una glucosa deshidrogenasa soluble dependiente de PQQ se puede aislar a partir de cepas de *Acinetobacter*. Lo más preferente es el aislamiento de s-GDH de la cepa tipo LMD 79.41 de *Acinetobacter calcoaceticus*. La secuencia de polipéptido de esta s-GDH natural (la proteína madura) se da en la SEQ ID NO: 2 y la secuencia de ADN se da en la SEQ ID NO: 1, respectivamente. Otras cepas LMD de *Acinetobacter* también se pueden usar como fuente s-GDH natural. Dichas secuencias se pueden alinear con la secuencia obtenida de *A. calcoaceticus* y se pueden hacer comparaciones de secuencias. También parece factible cribar colecciones de ADN de otras cepas bacterianas, como por ejemplo se describe para *E. coli* K-12 (Oubrie, A., *et al.*, J. Mol. Biol. 289 (1999) 319-333) e identificar secuencias relacionadas con s-GDH en dicho 45 genomas. Dichas secuencias y secuencias homólogas aún no identificadas se pueden usar para generar mutantes de s-GDH con termoestabilidad mejorada.

50 Los logros de la presente invención se describen con gran detalle haciendo referencia a las posiciones de aminoácidos conocidas de la SEQ ID NO: 2, la secuencia natural de s-GDH aislada de la cepa tipo LMD 79.41 de *Acinetobacter calcoaceticus*. Las posiciones de aminoácidos en diferentes aislamientos de s-GDH correspondientes a las posiciones de SEQ ID NO: 2 son fáciles de identificar por comparación de la secuencia apropiada.

55 La alineación múltiple y la comparación de una secuencia de s-GDH con la secuencia natural de la SEQ ID NO: 2 se realiza preferentemente con el programa PileUp del GCG Package Versión 10.2 (Genetics Computer Group, Inc.). PileUp crea una alineación de secuencias múltiples usando una simplificación del procedimiento de alineación progresiva de Feng, D.F. y Doolittle, R.F., J. Mol. Evol. 25 (1987) 351-360, y las matrices de puntuación para residuos de aminoácidos idénticos, similares o diferentes se definen en consecuencia. Este proceso comienza con la 60 alineación por pares de las dos secuencias más similares, produciendo un agrupamiento de dos secuencias alineadas. Este agrupamiento se puede alinear a continuación con la siguiente secuencia o agrupamiento de secuencias alineadas más relacionado. Dos agrupamientos de secuencias se pueden alinear por una simple extensión de la alineación por pares de dos secuencias individuales. La alineación final se consigue mediante una serie de alineaciones por pares progresivas, que incluyen secuencias y agrupamientos cada vez más distintos, hasta que todas las secuencias se han incluido en la alineación por pares final. De esta manera, las posiciones de 65

aminoácidos en otras moléculas de s-GDH homólogas se pueden identificar fácilmente como correspondientes a las posiciones dadas para s-GDH de *A. calcoaceticus* en la SEQ ID NO: 2. Esta es la razón por la que las posiciones de aminoácidos dadas en el presente documento se entenderán como posiciones de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o como posiciones correspondientes a las mismas en otra molécula de s-GDH homóloga.

El término "mutante" o "variante" en el sentido de la presente invención se refiere a una proteína de s-GDH que, comparada con la secuencia de aminoácidos natural dada en SEQ ID NO: 2, presenta al menos una sustitución, delección o inserción de aminoácidos.

El mutante de s-GDH puede comprender otras sustituciones y/o delecciones y/o inserciones, siempre que un mutante de s-GDH de la invención no difiera en más de 45 aminoácidos de la s-GDH de la SEQ ID NO: 2, por ejemplo, que presente como máximo 45 sustituciones, inserciones o delecciones de aminoácidos en total.

El término "una mutación para mejorar la estabilidad" hace referencia a cualquier sustitución y/o delección y/o inserción de amino que mejore la termoestabilidad de un mutante de s-GDH en un modelo de estrés de temperatura a corto plazo.

Como se mencionó anteriormente, las mejoras en la especificidad de glucosa parecen ser posibles solo y en gran medida a costa de una estabilidad reducida, una afinidad reducida por la glucosa o una actividad específica reducida o a cualquier combinación de estas propiedades desventajosas.

La estabilidad de acuerdo con la presente invención se evalúa en un modelo de estrés a corto plazo de este tipo y la estabilidad de s-GDH determinada en este modelo se denomina termoestabilidad. La termoestabilidad se determina mediante la medición de la actividad enzimática de s-GDH no estresada y estresada de una muestra. Al establecer la actividad de la muestra no estresada como del 100 %, la actividad restante después del tratamiento de estrés se puede calcular en porcentaje. Para los mutantes de s-GDH con especificidad de sustrato mejorada, se eligieron condiciones estresantes de 64 °C durante 30 minutos. Usando estas condiciones, a la enzima natural le queda aproximadamente un 80 % de su actividad original, mientras que a la mayoría de los mutantes con especificidad mejorada por la glucosa les queda solo un 10 % o menos de su actividad enzimática inicial después de someterlos a este modelo de estrés a corto plazo.

Preferentemente, la mutación para mejorar la estabilidad de una variante de s-GDH que tiene una sustitución de treonina en la posición 348 por glicina, alanina o serina es una sustitución. Dicha sustitución se selecciona del grupo que consiste en D87R; N122K; S124K; S146G; V298L y L386F. En otros modos de realización preferentes, se usan combinaciones de dos, tres o cuatro de estas sustituciones o también se prefiere de todas estas cinco sustituciones, en una s-GDH mutada para mejorar la estabilidad de dicho mutante.

En un modo de realización preferente, el mutante de s-GDH de acuerdo con la presente invención comprende una arginina en la posición 87 como es conocido de la s-GDH natural de *A. calcoaceticus* (SEQ ID NO: 2) o en una posición correspondiente a dicha posición 87 en una enzima homóloga.

En otro modo de realización preferente, el mutante de s-GDH de acuerdo con la presente invención comprende una lisina en la posición 122 como es conocido de la s-GDH natural de *A. calcoaceticus* (SEQ ID NO: 2) o en una posición correspondiente a dicha posición 122 en una enzima homóloga.

En otro modo de realización preferente, el mutante de s-GDH de acuerdo con la presente invención comprende una lisina en la posición 124 como es conocido de la s-GDH natural de *A. calcoaceticus* (SEQ ID NO: 2) o en una posición correspondiente a dicha posición 124 en una enzima homóloga.

En otro modo de realización preferente, el mutante de s-GDH de acuerdo con la presente invención comprende glicina en la posición 146, como es conocido de la s-GDH natural de *A. calcoaceticus* (SEQ ID NO: 2) o en una posición correspondiente a dicha posición 146 en una enzima homóloga.

En otro modo de realización preferente, el mutante de s-GDH de acuerdo con la presente invención comprende leucina en la posición 298, como es conocido de la s-GDH natural de *A. calcoaceticus* (SEQ ID NO: 2) o en una posición correspondiente a dicha posición 298 en una enzima homóloga.

En otro modo de realización preferente, el mutante de s-GDH de acuerdo con la presente invención comprende fenilalanina en la posición 386, como es conocido de la s-GDH natural de *A. calcoaceticus* (SEQ ID NO: 2) o en una posición correspondiente a dicha posición 386 en una enzima homóloga.

Se ha descubierto que seis posiciones de s-GDH parecen ser bastante importante para lograr mejoras significativas en términos de termoestabilidad, es decir, las posiciones 87, 122, 124, 146, 298 y 386. Lo que es de relevancia significativa aquí es el hecho de que se ha descubierto que estas sustituciones tienen un efecto pronunciado sobre la termoestabilidad de mutantes que previamente se habían generado para mejorar la especificidad por la glucosa, pero a expensas de una termoestabilidad reducida. En un modo de realización preferente, el mutante de s-GDH de

acuerdo con la presente invención comprende una arginina en la posición 87, una lisina en la posición 122 y 124, una glicina en la posición 146, una leucina en la posición 298 y una fenilalanina en la posición 386 de la SEQ ID NO: 2, o en una posición correspondiente a dichas posiciones si se usa una s-GDH homóloga.

- 5 En otro modo de realización preferente, la presente invención se refiere a un mutante de glucosa deshidrogenasa soluble dependiente de PQQ (s-GDH; EC 1.1.5.2) con especificidad mejorada por la glucosa en comparación con la maltosa, que tiene una sustitución de treonina en la posición 348, ya sea por glicina o por alanina o por serina, en el que dicho mutante comprende adicionalmente al menos una mutación para mejorar la estabilidad del mutante y al menos una mutación para mejorar la afinidad por la glucosa del mutante.
- 10 El término "afinidad" por un sustrato es bien conocido en la técnica. Se da en mM como el así denominado valor de Km. Son conocidos diversos procedimientos en la técnica para determinar la afinidad de s-GDH, usando glucosa u otros azúcares como sustratos, véase, Igarashi, S., *et al.*, Biochem Biophys Res Commun 264 (1999) 820.
- 15 En el cribado de nuevas variantes con el extracto bruto de *E. coli*, se realizó un cálculo del porcentaje del valor de Km para la evaluación más rápida de los clones generados. La afinidad hacia la glucosa por los mutantes de s-GDH candidatos se calculó de acuerdo con la cinética de Michaelis-Menten bien conocida.
- 20 El mutante de s-GDH de acuerdo con la presente invención tiene una afinidad mejorada por la glucosa en comparación con un mutante que comprende una sustitución de treonina en la posición 348 por glicina, alanina o serina. Preferentemente, la afinidad por el sustrato de la glucosa se determina como se describe en detalle en la sección de ejemplos.
- 25 Preferentemente, la una o más mutaciones para mejorar la afinidad por la glucosa de un mutante de s-GDH que ya comprende una sustitución de treonina en la posición 348 por glicina, alanina o bien serina es una sustitución de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en L110H o Y; N229A, G o S; Q246H, M o N; Y333A; G339T; M341V; V349A o G y V436P.
- 30 En caso de que el aminoácido correspondiente a la posición 110 de la secuencia natural de s-GDH conocida de *A. calcoaceticus* (SEQ ID NO: 2) esté sustituido en una variante de la presente invención, es preferente que el aminoácido leucina de origen natural esté sustituido por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en histidina y tirosina. Es más preferente la sustitución en la posición 110 por histidina.
- 35 En caso de que el aminoácido correspondiente a la posición 229 de la secuencia natural de s-GDH conocida de *A. calcoaceticus* (SEQ ID NO: 2) esté sustituido en una variante de la presente invención, es preferente que el aminoácido asparagina de origen natural esté sustituido por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en alanina, glicina y serina. Es más preferente la sustitución en la posición 229 por alanina.
- 40 En caso de que el aminoácido correspondiente a la posición 349 de la secuencia natural de s-GDH conocida de *A. calcoaceticus* (SEQ ID NO: 2) esté sustituido en una variante de la presente invención, es preferente que el aminoácido valina de origen natural esté sustituido por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en alanina y glicina. Es más preferente la sustitución en la posición 349 por glicina.
- 45 También preferente, la mutación para mejorar la afinidad por la glucosa se selecciona del grupo que consiste en L110H, Q246H; G339T; M341V, V349G y V436P.
- 50 También preferente, dicha sustitución para mejorar la afinidad por la glucosa se selecciona de Q246H; G339T; M341V y V349G. Una s-GDH preferente de acuerdo con la presente invención comprende dos o tres de estas sustituciones o todas estas cuatro sustituciones.
- 55 En otro modo de realización preferente, el mutante de s-GDH descrito anteriormente con especificidad mejorada por la glucosa en comparación con la maltosa, que tiene una sustitución de treonina en la posición 348 por glicina, alanina o bien serina y que comprende al menos una mutación para mejorar la estabilidad, comprende adicionalmente una o más mutaciones para mejorar la especificidad de sustrato del mutante por la glucosa en comparación con la maltosa.
- 60 Para ciertas aplicaciones, la especificidad de sustrato de un mutante de s-GDH con especificidad mejorada por la glucosa en comparación con la maltosa, que tiene una sustitución de treonina en la posición 348 por glicina, alanina o bien serina, puede todavía no ser suficiente para ciertas aplicaciones de rutina.
- 65 En ciertos modos de realización, puede ser necesario generar un mutante de s-GDH que, además de la mutación analizada anteriormente en la posición 348, comprenda una o más mutaciones adicionales para mejorar aún más la especificidad del mutante por la glucosa en comparación con la maltosa.
- El término "especificidad de sustrato" o "especificidad" es bien conocido para el técnico experto.

Para el cálculo de la especificidad de sustrato o la reactividad cruzada, un modo fácil es establecer la actividad medida con glucosa como sustrato como el 100 % y comparar la actividad medida con el otro azúcar seleccionado con el valor de glucosa. A veces, para no ser redundante, se usa simplemente el término especificidad sin hacer especial referencia a la glucosa por una parte y a otro sustrato de azúcar seleccionado por otra parte.

El experto en el campo apreciará que la comparación de las actividades enzimáticas se realiza mejor a concentraciones equimolares de las moléculas de sustrato investigadas usando condiciones de ensayo bien definidas. De lo contrario, tienen que hacerse correcciones para las diferencias en las concentraciones.

Tienen que elegirse condiciones de ensayo estandarizadas y bien definidas para evaluar (las mejoras en) la especificidad de sustrato. La actividad enzimática de s-GDH por la glucosa como sustrato, así como para otros sustratos de azúcar seleccionados, se mide como se describe en la sección de ejemplos.

Sobre la base de las mediciones de la actividad enzimática por la glucosa o la maltosa, respectivamente, se evalúa la reactividad cruzada (y la mejora de la misma).

La reactividad (cruzada) de s-GDH por la maltosa en porcentaje se calcula como

reactividad cruzada [%] = (actividad de maltosa/actividad de glucosa) x 100 %.

La reactividad (cruzada) por la maltosa de s-GDH natural de acuerdo con la fórmula anterior se ha determinado como aproximadamente del 105 % (véase el documento WO 02/34919).

La especificidad se calcula de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{especificidad} = \frac{\text{actividad por glucosa del mutante}}{\text{actividad por maltosa del mutante}} \times \frac{\text{actividad por maltosa natural}}{\text{actividad por glucosa natural}}$$

Las mejoras en la especificidad de un mutante de s-GDH novedoso son reconocidas como valores más pequeños en el cálculo anterior, en comparación con un mutante de s-GDH con especificidad mejorada por la glucosa en comparación con la maltosa, que tiene una sustitución de treonina en la posición 348 por glicina, alanina o bien serina.

Como el experto en la técnica apreciará, los números absolutos dependerán del número y tipo de mutaciones ya presentes en un mutante. El número y tipo de mutaciones ya presentes en un mutante se pueden denominar el fondo de mutante. Cualquier mutación novedosa se puede comparar directamente con el fondo de mutante.

Preferentemente, la mutación para mejorar aún más la especificidad de sustrato por la glucosa en comparación con la maltosa es una sustitución de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en Q145P; D163G o N; Q164F; L169F; Y171G; I208L o V; T224I; E245D; G276S; A294D o E; V300A, S, N, Y o I; T307G; T323V; A354Y, E o L; R378I, M, A o D; N428P y la inserción 429 P. El término "inserción 429" se usa para indicar que entre la posición 428 y la posición 429 de la SEQ ID NO: 2 se inserta una prolina.

En caso de que el aminoácido correspondiente a la posición 169 de la secuencia natural de s-GDH conocida de *A. calcoaceticus* (SEQ ID NO: 2) esté sustituido en una variante de la presente invención, es preferente que el aminoácido leucina de origen natural esté sustituido por fenilalanina, tirosina o triptófano. Es más preferente la sustitución en la posición 169 por fenilalanina.

En caso de que el aminoácido correspondiente a la posición 171 de la secuencia natural de s-GDH conocida de *A. calcoaceticus* (SEQ ID NO: 2) esté sustituido en una variante de la presente invención, es preferente que el aminoácido tirosina de origen natural esté sustituido por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en el grupo que consiste en alanina, metionina, glicina. Es más preferente la sustitución en la posición 171 por glicina.

En caso de que el aminoácido correspondiente a la posición 245 de la secuencia natural de s-GDH conocida de *A. calcoaceticus* (SEQ ID NO: 2) esté sustituido en una variante de la presente invención, es preferente que el aminoácido ácido glutámico de origen natural esté sustituido por ácido aspártico, asparagina o glutamina. Es más preferente la sustitución en la posición 245 por ácido aspártico.

En caso de que el aminoácido correspondiente a la posición 341 de la secuencia natural de s-GDH conocida de *A. calcoaceticus* (SEQ ID NO: 2) esté sustituido en una variante de la presente invención, es preferente que el aminoácido metionina de origen natural esté sustituido por valina, alanina, leucina o isoleucina. Es más preferente la sustitución en la posición 341 por valina.



También se ha descubierto que es posible mejorar aún más la especificidad de sustrato de una variante de s-GDH que ya comprende una sustitución en la posición 348 por la inserción de un aminoácido, preferentemente una prolina, entre la posición 428 y 429.

- 5 También preferente, la mutación adicional para mejorar la especificidad de sustrato por la glucosa en comparación con la maltosa se selecciona del grupo que consiste en L169F; Y171G; E245D; N428P y la inserción 429P.

Preferentemente, la mutación adicional para mejorar la especificidad de sustrato por la glucosa en comparación con la maltosa se selecciona del grupo que consiste en L169F; Y171G; E245D; y N428P. En otros modos de realización preferentes, se usan combinaciones de dos, tres o todas estas cuatro sustituciones para mejorar la especificidad de sustrato por la glucosa en comparación con la maltosa de dicho mutante. También preferente, la mutación adicional para mejorar la especificidad de sustrato por la glucosa en comparación con la maltosa del grupo se selecciona que consiste en L169F; Y171G; E245D y la inserción 429P. En otros modos de realización preferentes, se usan combinaciones de dos o de todas las tres sustituciones junto con la inserción 429 P en una s-GDH mutante para mejorar la especificidad de sustrato por la glucosa en comparación con la maltosa de dicho mutante.

Como se describe en los documentos WO 02/34919 y WO 2006/008132, respectivamente, una sustitución en la posición 428 mediante la que la asparagina se reemplaza por prolina o una inserción del aminoácido prolina entre la posición 428 y 429, respectivamente, mejora aún más la especificidad de un mutante de s-GDH que ya comprende una sustitución en la posición 348. En otro modo de realización preferente, la presente invención por lo tanto se refiere a un mutante de glucosa deshidrogenasa soluble dependiente de PQQ (s-GDH; EC 1.1.5.2) con especificidad mejorada por la glucosa en comparación con la maltosa, que tiene una sustitución de treonina en la posición 348 por glicina, alanina o bien serina y, o bien una sustitución en la posición 428 mediante la que la asparagina se reemplaza por prolina o una inserción del aminoácido prolina entre la posición 428 y 429, en el que dicho mutante comprende adicionalmente al menos una mutación para mejorar la estabilidad del mutante, al menos una mutación para mejorar la actividad específica del mutante y opcionalmente una o más mutaciones para mejorar la afinidad del mutante por la glucosa y/o una o más mutaciones para mejorar aún más la especificidad del mutante por la glucosa en comparación con la maltosa, y en el que las posiciones dadas corresponden a las posiciones de aminoácidos conocidas de la secuencia natural de s-GDH de *A. calcoaceticus* (SEQ ID NO: 2).

En otro modo de realización, la presente invención se refiere a un mutante de glucosa deshidrogenasa soluble dependiente de PQQ (s-GDH; EC 1.1.5.2) con especificidad mejorada por la glucosa en comparación con la maltosa, que tiene una sustitución de treonina en la posición 348 por glicina, alanina o bien serina, en el que dicho mutante comprende adicionalmente al menos una mutación para mejorar la estabilidad del mutante y al menos una mutación para mejorar la actividad específica del mutante.

El término "actividad específica" es bien conocido en la técnica. Se usa para describir la actividad enzimática por cantidad de proteína. Son conocidos diversos procedimientos en la técnica para determinar la actividad específica de una s-GDH, usando glucosa u otros azúcares como sustratos, véase por ejemplo Igarashi, S., *et al.*, Biochem Biophys Res Commun 264 (1999) 820. El mutante de s-GDH de acuerdo con la presente invención tiene una actividad específica mejorada por el sustrato glucosa en comparación con un mutante que comprende una sustitución de treonina en la posición 348 por glicina, alanina o bien serina.

Preferentemente, la mutación para mejorar la actividad específica por la glucosa es una sustitución de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en H30F o R; A301G o S y A302S o T.

Como el experto en la técnica apreciará, es posible llevar a cabo sustituciones de aminoácidos, por ejemplo, mutaciones imperceptibles, que no influyen en las propiedades de la s-GDH en una extensión significativa. La variante de acuerdo con la presente invención, sin embargo, no tendrá más de 45 intercambios de aminoácidos en comparación con la SEQ ID NO: 2. Preferentemente, la variante comprenderá 20 o menos sustituciones de aminoácidos, más preferentemente estarán presentes solo 15 sustituciones de aminoácidos o menos sustituciones.

Algunas variantes de s-GDH específicas de acuerdo con la presente invención se dan en la sección de ejemplos. Las variantes de s-GDH preferentes con baja interferencia de glucosa y características mejoradas respecto a la termoestabilidad y afinidad de sustrato por la glucosa comprenden los mutantes con las siguientes sustituciones:

N122K+L169F+Y171G+E245D+M341V+T348G+ins429P;

N122K+S124K+L169F+Y171G+E245D+M341V+T348G+ins429P;

N122K+S124K+L169F+Y171G+E245D+M341V+T348G+L386F+ins429P;

N122K+S124K+L169F+Y171G+E245D+Q246H+M341V+T348G+L386F+ins429P;

D87R+N122K+S124K+S146G+L169F+Y171G+E245D+Q246H+V298L+ M341V+T348S+L386F+ins429P;

D87R+N122K+S124K+S146G+L169F+Y171G+E245D+Q246H+V298L+ +G339T+M341V+T348G+L386F+ins429P;

D87R+N122K+S124K+S146G+L169F+Y171G+E245D+Q246H+V298L+ M341V+T348S+L386F+ins429P+V436P;

5 D87R+N122K+S124K+S146G+L169F+Y171G+E245D+Q246H+V298L+M341V+T348S+V349G+A354T+L386F+ins429P;

D87R+L110H+N122K+S124K+S146G+L169F+Y171G+E245D+Q246H+V298L+ M341V+T348S+L386F+ins429P.

10 Son conocidas numerosas posibilidades en la técnica para producir proteínas mutantes. Sobre la base de los hallazgos importantes de la presente invención que divulgan la importancia crítica de ciertos residuos para mejorar la termostabilidad, la afinidad por la glucosa y la especificidad de sustrato de una s-GDH mutante, el experto en la técnica puede ahora producir fácilmente variantes apropiadas adicionales de s-GDH que alberguen estas y otras modificaciones favorables. Dichas variantes se pueden obtener, por ejemplo, por procedimientos conocidos como la mutagénesis aleatoria (Leung, D.W., *et al.*, Technique 1 (1989) 11-15) y/o la mutagénesis dirigida a sitio (Hill, D.E., *et al.*, Methods Enzymol. 155 (1987) 558-568). Un procedimiento alternativo para producir una proteína con las propiedades deseadas es proporcionar construcciones quiméricas que contienen elementos de secuencia de al menos dos fuentes diferentes o sintetizar completamente un gen de s-GDH apropiado. Dichos procedimientos conocidos en la técnica se pueden usar en combinación con la información divulgada en la presente invención para proporcionar mutantes o variantes de s-GDH que comprendan, por ejemplo, sustituciones de aminoácidos adicionales en combinación con la importancia crítica conocida de una sustitución en la posición 348 de la SEQ ID NO: 2.

25 Una variante de s-GDH de acuerdo con la presente invención se puede producir, por ejemplo, partiendo de un gen de s-GDH aislado de la cepa tipo LMD 79.41 de *Acinetobacter calcoaceticus*, así como partiendo de una secuencia homóloga. En el contexto de esta solicitud, el término "homólogo" se entiende que comprende una secuencia de aminoácidos de s-GDH con una identidad de al menos un 90 % en comparación con la SEQ ID NO: 2. En otras palabras, después de la alineación apropiada usando el programa PileUp, al menos un 90 % de los aminoácidos de dicha s-GDH homóloga son idénticos a los aminoácidos descritos en la SEQ ID NO: 2.

30 Se entenderá que las variaciones de las secuencias de ADN y de aminoácidos existen de forma natural, o se pueden introducir de forma intencionada usando procedimientos conocidos en la técnica. Estas variaciones pueden dar como resultado un máximo de un 10 % de diferencias de aminoácidos en la secuencia global, debido a deleciones, sustituciones, inserciones, inversiones o adiciones de uno o más residuos de aminoácidos en dicha secuencia en comparación con la SEQ ID NO: 2. Dichas sustituciones de aminoácidos se pueden realizar, por ejemplo, sobre la base de similitud de polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofiliidad y/o la naturaleza anfipática de los residuos implicados. Por ejemplo, los aminoácidos con carga negativa incluyen ácido aspártico y ácido glutámico; los aminoácidos con carga positiva incluyen lisina y arginina; los aminoácidos con grupos de cabeza polares no cargados o grupos de cabeza no polares que tienen valores de hidrofiliidad similares incluyen los siguientes: leucina, isoleucina, valina, glicina, alanina, asparagina, glutamina, serina, treonina, fenilalanina y tirosina. Otras variaciones contempladas incluyen sales y ésteres de los polipéptidos anteriormente mencionados, así como precursores de los polipéptidos anteriormente mencionados, por ejemplo, precursores que tienen una sustitución N-terminal tales como metionina, N-formilmetionina usados como secuencias líder.

45 De acuerdo con los procedimientos conocidos en el estado de la técnica o de acuerdo con los procedimientos dados en la sección de ejemplos, es posible obtener secuencias de polinucleótidos que codifican cualquiera de los mutantes de s-GDH analizados anteriormente. Por lo tanto, la invención comprende también secuencias de polinucleótidos aisladas que codifican proteínas mutantes de s-GDH de acuerdo con la presente invención como se describe anteriormente.

50 La presente invención incluye además un vector de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención ligada operativamente a una secuencia promotora que puede dirigir su expresión en una célula hospedadora.

55 La presente invención incluye además un vector de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención ligada operativamente a una secuencia promotora que puede dirigir su expresión en una célula hospedadora. Los vectores preferentes son plásmidos tales como pACSGDH mostrados en las figuras 2 y 3.

60 Los vectores de expresión útiles en la presente invención típicamente contienen un origen de replicación, una resistencia a antibióticos 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 en la técnica, como secuencias señal (para un mejor plegamiento, transporte al periplasma o secreción), inductores para una mejor modulación de la expresión o sitios de escisión para clonación.

65

Las características del vector de expresión seleccionado deben ser compatibles con la célula hospedadora que se va a emplear. Por ejemplo, cuando se clona en un sistema de células *E. coli*, el vector de expresión debería contener promotores aislados del genoma de células *E. coli* (por ejemplo, *lac* o *trp*). Se pueden usar orígenes de replicación adecuados como el origen de replicación del plásmido ColE1. Los promotores adecuados incluyen, por ejemplo, *lac* y *trp*. También es preferente que el vector de expresión incluya una secuencia que codifica un marcador de selección como un gen de resistencia a antibióticos. Como marcadores seleccionables, se pueden emplear convenientemente resistencia a ampicilina o resistencia a canamicina. Todos estos materiales son conocidos en la técnica y están disponibles comercialmente.

Los vectores de expresión adecuados que contienen las secuencias codificantes y de control deseadas se pueden construir usando técnicas de ADN recombinante estándares conocidas en la técnica, de las que muchas se describen en Sambrook *et al*, en "Molecular Cloning.: A Laboratory Manual "(1989) Cold Spring Harbor, Nueva York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

La presente invención se refiere adicionalmente a células hospedadoras que contienen un vector de expresión que comprende una secuencia de ADN que codifica la totalidad o parte de la s-GDH mutante. Las células hospedadoras contienen preferentemente un vector de expresión que comprende toda o parte de una de las secuencias de ADN que codifican una s-GDH mutante que tiene una o más mutaciones mostradas en los ejemplos 2-8. Las células hospedadoras adecuadas incluyen, por ejemplo, *E. coli* HB101 (ATCC 33694) disponible de Promega (2800 Woods, Hollow Road, Madison, WI, EE.UU.), XL1-Blue MRF<sup>+</sup> disponible de Stratagene (11011 North Torrey Pine Road, La Jolla, CA, EE.UU.) y similares.

Los vectores de expresión se pueden introducir en células hospedadoras mediante diversos procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la transformación de células hospedadoras con vectores de expresión se puede llevar a cabo por el procedimiento de transformación de protoplastos mediada por polietilenglicol (Sambrook *et al.* 1989, *supra*). Sin embargo, también se pueden emplear otros procedimientos para introducir vectores de expresión en células hospedadoras, por ejemplo, electroporación, inyección biolística o fusión de protoplastos.

Una vez que se ha introducido un vector de expresión que contiene una variante de s-GDH en una célula hospedadora apropiada, la célula hospedadora se puede cultivar en condiciones que permitan la expresión de las variantes de s-GDH deseadas. Las células hospedadoras que contienen el vector de expresión deseado con la secuencia de ADN que codifica toda o parte de la s-GDH mutante se pueden identificar fácilmente por, es decir, selección de antibióticos. La expresión de las variantes de s-GDH se puede identificar por diferentes procedimientos 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 aplica un ensayo enzimático.

La presente invención también enseña la generación y cribado de mutantes de s-GDH. La mutagénesis aleatoria y mutagénesis de saturación se realizan como es conocido en la técnica. Se criban las variantes para detectar la termoestabilidad (actividad sin tratamiento de estrés por calor en comparación con actividad restante después del tratamiento de estrés por calor). Las condiciones de ensayo elegidas están adaptadas para garantizar que se puedan medir las pequeñas mejoras esperadas causadas, por ejemplo, por una sola sustitución de aminoácido. Se da un modo preferente de selección o cribado de mutantes apropiados en el Ejemplo 3. Cualquier cambio o mejora en comparación con la enzima de partida (mutante o natural) se puede detectar claramente.

Debería entenderse, por supuesto, que no todos los vectores de expresión y secuencias reguladoras de ADN funcionarían igualmente bien para expresar las secuencias de ADN de la presente invención. Tampoco funcionarían todas las células hospedadoras igualmente bien con el mismo sistema de expresión. Sin embargo, un experto ordinario en la técnica hará una selección apropiada entre los vectores de expresión, secuencias reguladoras de ADN y células hospedadoras usando la guía proporcionada en el presente documento sin excesiva experimentación.

La invención también se refiere a un proceso para la producción de variantes de s-GDH de la invención actual que comprende cultivar una célula hospedadora de la invención bajo condiciones adecuadas para la producción de s-GDH mutantes de la invención. Para las células hospedadoras bacterianas, las condiciones de cultivo típicas son medio líquido que contiene fuentes de carbono y nitrógeno, el agente antibiótico y de inducción apropiado (dependiendo del vector de expresión usado). Los antibióticos apropiados típicos incluyen ampicilina, canamicina, cloranfenicol, tetraciclina y similares. Los agentes de inducción típicos incluyen IPTG, glucosa, lactosa y similares.

Es preferente que los polipéptidos de la presente invención se obtengan mediante la producción en células hospedadoras que expresan una secuencia de ADN que codifica la s-GDH mutante. Los polipéptidos de la presente invención también se pueden obtener por traducción *in vitro* del ARNm codificado por una secuencia de ADN que codifica la s-GDH mutante.

Por ejemplo, las secuencias de ADN se pueden sintetizar como se describe anteriormente y se insertan en un vector de expresión adecuado, que a su vez se puede usar en un sistema de transcripción/traducción *in vitro*.

Un vector de expresión que comprende un polinucleótido aislado como se define y se describe anteriormente, ligado operativamente a una secuencia promotora que puede promover su expresión en un sistema de síntesis de péptido libre de células, representa otro modo de realización preferente de la presente invención.

5 Los polipéptidos producidos, por ejemplo, por procedimientos como se describe anteriormente, se pueden aislar y purificar a continuación mediante diversas técnicas de purificación de proteínas rutinarias. Por ejemplo, se pueden emplear procedimientos cromatográficos tales como cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel y cromatografía de afinidad.

10 Una de las principales aplicaciones de las variantes mejoradas de s-GDH de la presente invención es para el uso en tiras de prueba para controlar el nivel de glucosa en sangre en pacientes diabéticos. La insensibilidad de la glucosa deshidrogenasa dependiente de PQQ hacia el oxígeno es, como se analiza anteriormente, una gran ventaja sobre la glucosa oxidasa. La interferencia debido a, por ejemplo, maltosa, galactosa, y/u otros azúcares relacionados que pueden estar presentes en una muestra a analizar, se puede reducir significativamente ahora usando las variantes de s-GDH novedosas que tienen tanto termoestabilidad mejorada como mejor especificidad hacia la glucosa. Por supuesto, se pueden investigar muchos tipos de muestras. Los líquidos corporales como suero, plasma, líquido intestinal u orina son las fuentes preferentes para dichas muestras.

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

25 También está dentro del alcance de la presente invención un dispositivo para la detección o medición de glucosa en una muestra que comprende un mutante de s-GDH de acuerdo con la presente invención, así como otros reactivos necesarios para dicha medición.

30 Las variantes de s-GDH con termoestabilidad mejorada de la presente invención también se pueden usar con gran ventaja en biosensores (D'Costa, E.J., *et al*, Biosensores 2 (1986) 71-87; Laurinavicius, V., *et al*, Analytical Letters 32 (1999) 299-316; Laurinavicius, V., *et al*, Monatshefte fuer Chemie 130 (1999) 1269-1281; Woosuck, S. *et al*, Sensors and Actuators B 100 (2004) 395-402) para el control en línea de la glucosa en una muestra o un reactor. Con este propósito, las variantes de s-GDH se pueden usar, por ejemplo, para recubrir un electrodo vítreo insensible al oxígeno con un complejo de osmio que contiene una red epoxi conductora redox (Ye *et al.*, 1993 *supra*) para la determinación más exacta de la concentración de glucosa.

35 En los siguientes ejemplos, 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 usaron de acuerdo con las instrucciones dadas por los proveedores. Las operaciones y procedimientos empleados para la purificación, caracterización y clonación de ADN son bien conocidos en la técnica (Ausubel, F., *et al.*, En "Current protocols in molecular biology" (1994) Wiley Verlag) y se pueden adaptar según sea necesario por el experto en la técnica.

40 Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la presente invención. Estos ejemplos no están destinados a limitar el alcance de la presente invención, sino que proporcionan una mayor comprensión de la invención.

45 Los siguientes ejemplos, listado de secuencias y figuras se proporcionan para ayudar a la comprensión de la presente invención, cuyo verdadero alcance se expone en las reivindicaciones adjuntas.

### Descripción de las figuras

50 **Figura 1:** Secuencias de proteínas de s-GDH dependiente de PQQ de *A. calcoaceticus* (parte superior) y s-GDH de *A. baumannii* (parte inferior) alineadas de acuerdo con la homología de secuencia.

**Figura 2:** Ilustración del vector pACSGDH al que se hace referencia en el ejemplo 1 que contiene las secuencias de ADN natural o mutado, respectivamente, de glucosa deshidrogenasa dependiente de PQQ soluble.

55 **Figura 3:** Secuencia de nucleótidos (ADN) del vector pACSGDH al que se hace referencia en el ejemplo 1 que contiene la secuencia de ADN natural de glucosa deshidrogenasa dependiente de PQQ soluble.

### Ejemplo 1

60 **Clonación y expresión de glucosa deshidrogenasa soluble dependiente de PQQ natural de *A. calcoaceticus* en *E. coli***

65 Se aisló el gen de s-GDH de la cepa LMD 79.41 de *Acinetobacter calcoaceticus* de acuerdo con procedimientos estándares. Se subclonó el gen de s-GDH natural en un plásmido que contenía el promotor *mgI* para expresión regulable (véase la solicitud de patente WO 88/09373). La nueva construcción se denominó pACSGDH (véanse las

figuras 2 y 3, así como la SEQ ID NO: 3). Se introdujeron los plásmidos recombinantes en un organismo hospedador seleccionado del grupo de *E. coli*. Se cultivaron entonces estos organismos en condiciones apropiadas y se seleccionaron las colonias que mostraban actividad de s-GDH.

- 5 Se aisló el plásmido pACSGDH de un cultivo de una noche de 200 ml del clon mencionado anteriormente usando el kit QIAGEN Plasmid Maxi (Qiagen) de acuerdo con el protocolo de los fabricantes. Se resuspendió el plásmido en 1 ml de agua bidestilada. Se determinó la concentración del plásmido usando un fotómetro Beckman DU 7400.

10 El rendimiento fue de 600 µg. A continuación, se determinó la calidad del plásmido por electroforesis en gel de agarosa.

## Ejemplo 2

### Generación de mutante T348G y mutante T348S

- 15 Como moldes de partida para la generación de variantes mejoradas adicionalmente, se fabricó s-GDH mutada con las mutaciones T348G o T348S, respectivamente. Estos mutantes de s-GDH se eligieron porque son conocidos por tener especificidad de sustrato mejorada por la glucosa en comparación con el sustrato maltosa (véase el documento WO 02/34919).

20 Se usó el kit de mutagénesis dirigida a sitio QuickChange (Stratagene, Cat. 200518) para sustituir la treonina en la posición 348 por una glicina o una serina. Se diseñaron los cebadores apropiados.

- 25 Los cebadores 5' y 3' usados para la mutagénesis eran complementarios entre sí y contenían el codón modificado para el intercambio de treonina a glicina (ACA a GGG) o de treonina a serina (ACA a TCA) en una posición central. Estos nucleótidos se flanquearon por de 12 a 16 nucleótidos en cada extremo. Las secuencias de los nucleótidos eran idénticas a la hebra de ADN codificante y anticodificante que flanquea el codón para el intercambio de aminoácidos. En lugar de los codones ACA = treonina para la hebra codificante y TGT para la anticodificante, respectivamente, los cebadores contenían GGG = glicina o TCA = serina, respectivamente, para la hebra codificante y CCC = glicina o AGT = serina, respectivamente, para la anticodificante. Se dan la hebra codificante y anticodificante para el intercambio T348G como las SEQ ID NO: 3 y 4, respectivamente.

catttgctgg ccaggggttg caccgtcat (=SEQ ID NO: 4)

- 35 atgacggtgc aacccttggc cagcaaatg (=SEQ ID NO: 5)

40 La reacción de PCR y la digestión con *DpnI* se realizaron de acuerdo con el manual. Después de eso, se usó 1 µl de muestra para la electroporación de células XL-MRF'. La electroporación se logró con 2,5 KV en cubetas de 0,2 cm usando un Pulser BioRad en *E. coli* (BioRad). Después del crecimiento en 1 ml de LB a 37 °C durante una hora, se sembraron las bacterias en medio "4 x levadura" (20 g de extracto de levadura + 5 g de NaCl, pH 7,0 hasta 1 l de agua dest.)-placas de agar de ampicilina (100 µg/ml de ampicilina) y se hicieron crecer durante la noche a 37 °C. Se examinaron los clones de s-GDH mutados usando el siguiente procedimiento de cribado.

## Ejemplo 3

### Cribado

50 Las colonias mutantes en las placas de agar descritas anteriormente se recolectaron en placas de microvaloración (MTP) que contenían 200 µl de medio "4 x levadura"-ampicilina por pocillo y se incubaron durante la noche a 37 °C. Estas placas se denominan placas maestras.

55 De cada placa maestra, se transfirieron 5 µl de muestra/pocillo a una MTP que contenía 5 µl por pocillo de B (B = reactivo de extracción de proteínas bacterianas; Pierce N.º 78248) para la ruptura de células y se añadieron 240 µl de pirroloquinolina quinona (PQQ) 0,0556 mM; Hepes 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 15 mM a pH 7,0/pocillo para la activación de s-GDH. Para completar la formación de la 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.

60 De la placa de trabajo, se transfirieron 4 x 10 µl de muestra por pocillo a cuatro MTP vacías. A continuación, se ensayó la primera parte alícuota con glucosa a una concentración estándar (es decir, 30 mM), la segunda con una concentración de glucosa reducida (1,9 mM en lugar de 30 mM), la tercera con maltosa como sustrato y la cuarta se estresó 30 min a 64 °C antes de ensayar esa alícuota igual que la primera alícuota. Todas las otras moléculas de azúcar seleccionadas se usaron en concentración equimolar estándar, es decir, a 30 mM. Para todos los ensayos, se aplicaron 90 µl de solución de mediador (véase el ejemplo 8) que ya contenía el azúcar a analizar.

65 Se calculó el dE/min y se fijó el valor usando glucosa 30 mM como sustrato a una actividad del 100 %. El valor obtenido con el otro azúcar se comparó con el valor de glucosa y se calculó en porcentaje de actividad (por ejemplo,

para maltosa como:  $(dE/min \text{ maltosa} / dE \text{ glucosa}) * 100$ ). Esto es equivalente a la reactividad cruzada de la enzima (variante). En las siguientes tablas, se da la "M/G", es decir, la reactividad cruzada de s-GDH con maltosa (M) como sustrato en comparación con la glucosa (G) como sustrato.

- 5 El valor obtenido con la glucosa 1,9 mM se comparó con el valor de glucosa 30 mM y se calculó en porcentaje de actividad relativa  $((dE/min \text{ glucosa } 1,9 \text{ mM} / dE/min \text{ glucosa } 30 \text{ mM}) * 100)$ . Esto da un valor de % que es un indicador indirecto del valor de Km para la variante analizada. De acuerdo con este cálculo, un valor de % más alto indica un valor de Km menor (= mejor).

10 **Tabla 1: Características básicas de los mutantes T348G y T348S, en comparación con s-GDH natural (WT)**

| Enzima     | M/G a azúcar 30 mM en % | % de actividad relativa de glucosa 1,9 mM/30 mM | Estabilidad, 30 min, 64 °C | Intercambio de aminoácidos (AA) |
|------------|-------------------------|-------------------------------------------------|----------------------------|---------------------------------|
| WT         | 105 %                   | 70 %                                            | 80 %                       | -                               |
| Mutante A  | 22 %                    | 25 %                                            | 40 %                       | T348G                           |
| Mutante A' | 50 %                    | 35 %                                            | 50 %                       | T348S                           |

#### Ejemplo 4

#### 15 Secuenciación de una s-GDH mutante

El procedimiento se ejemplifica para T348G de s-GDH. La secuenciación detallada a continuación también se puede usar para la secuenciación de otros mutantes de s-GDH.

- 20 Los siguientes cebadores se usaron para la secuenciación de un mutante de s-GDH:

Hebra codificante: 5'-TTA ACG TGC TGA ACA GCC GG-3' (= SEQ ID NO:6)

Hebra anticodificante: 5'-ATA TGG GTA AAG TAC TAC GC -3' (= SEQ ID NO: 7)

- 25 Se aislaron los plásmidos que contenían el gen del mutante T348G de s-GDH, mutante que tiene aproximadamente un 22 % de reactividad cruzada de maltosa/glucosa, y T348S de s-GDH, mutante que tiene un 50 % de reactividad cruzada de maltosa/glucosa, respectivamente (kit High Pure Plasmid Isolation, Roche Diagnostics GmbH, N.º 1754785) y se secuenciaron usando un kit ABI Prism Dye Terminator Sequencing y un secuenciador ABI 3/73 y 3/77 (Amersham Pharmacia Biotech).

La secuenciación confirmó que se han conseguido las mutaciones deseadas en el ADN y a nivel de aminoácidos para ambos mutantes. Esto dio como resultado un intercambio de T a G o a S, respectivamente, en la posición 348. No se ha encontrado ninguna mutación adicional en los dos genes.

#### 35 Ejemplo 5

#### Otros mutantes de s-GDH obtenidos por mutagénesis de saturación sobre la base de T348G (mutante A) y T348S (mutante A')

- 40 Las posiciones de aminoácidos candidatos eran conocidas por los inventores a partir de los estudios previos realizados por ellos. Estas posiciones de aminoácidos candidatos que se sospechaba o se sabía que influyen en las características relevantes de s-GDH como termoestabilidad, especificidad de sustrato o afinidad por la glucosa, se analizaron de forma individual sobre la base de cualquiera de T348G (mutante A) o sobre la base de T348S (mutante A').

Se realizó la mutagénesis de saturación para las posiciones de aminoácidos individuales con el fin de evaluar qué efecto podría tener dicha sustitución de aminoácido individual sobre el mutante T348G o T348S, respectivamente.

- 50 Se usó el kit de mutagénesis dirigida a sitio QuickChange (Stratagene, Cat. 200518) para sustituir sucesivamente los aminoácidos naturales en las posiciones 87, 110, 122, 124, 145, 146, 169, 171, 187, 246, 294, 298, 300, 313, 323, 333, 339, 341, 349, 378, 428 y 436 de la proteína s-GDH natural, respectivamente.

- 55 Se eligieron los cebadores 5' y 3' usados para la mutagénesis para ser complementarios entre sí y contenían NNN (N = A, C, G o T) en una posición central. Los tres nucleótidos incorporados aleatoriamente N, que están en la posición deseada y que codifican la posición de aminoácido bajo investigación, se flanquearon por de 12 a 16 nucleótidos en cada extremo que eran idénticos a la hebra de ADN codificante y anticodificante del molde. En lugar del codón natural, los cebadores contenían NNN, por lo tanto los oligonucleótidos codificaban cada posible codón.

- 60 Para cada una de las posiciones bajo investigación, se llevó a cabo una reacción de PCR.

Las reacciones de PCR y las digestiones de endonucleasa de restricción DpnI se llevaron a cabo de acuerdo con el manual proporcionado con el kit de mutagénesis dirigida a sitio QuickChange (Stratagene, Cat. 200518).

- 5 A partir de cada reacción de PCR, se usó 1 µl para la electroporación de células XL1F. Se hicieron crecer las células y se determinaron las actividades de s-GDH de los clones como se describe anteriormente.

- 10 Para aumentar la probabilidad estadística de que todas las 20 posibles sustituciones de aminoácidos estén cubiertas en esta evaluación, se criaron 200 clones para cada posición como se describe en el **ejemplo 3**. Se secuenciaron los clones de interés de acuerdo con el procedimiento dado en el **ejemplo 4**.

**Tabla 2: Efecto de las sustituciones de aminoácidos adicionales sobre las características básicas del mutante A (= T348G)**

| Enzima       | M/G a azúcar 30 mM en % | % de actividad relativa de glucosa 1,9 mM / 30 mM | Estabilidad, 30 min, 64 °C | Intercambio de aminoácidos (AA) |
|--------------|-------------------------|---------------------------------------------------|----------------------------|---------------------------------|
| Wt-GlucDOR   | 105 %                   | 70 %                                              | 80 %                       | -                               |
| Mutante A    | 22 %                    | 25 %                                              | 40 %                       | T348G                           |
| Mutante A/1  | -                       | 30 %                                              | -                          | + L 110 H                       |
| Mutante A/2  | -                       | 28 %                                              | -                          | + L110 Y                        |
| Mutante A/3  | 40 %                    | 50 %                                              | -                          | + Q 246 H                       |
| Mutante A/4  | 33 %                    | 30 %                                              | -                          | + Q 246 M                       |
| Mutante A/5  | 35 %                    | 33 %                                              | -                          | + Q 246 N                       |
| Mutante A/6  | -                       | 30 %                                              | -                          | + Y 333 A                       |
| Mutante A/7  | 55 %                    | 40 %                                              | -                          | + G 339 T                       |
| Mutante A/8  | 30 %                    | 45 %                                              | -                          | + V 436 P                       |
| Mutante A/9  | 28 %                    | 30 %                                              | -                          | + M 341 V                       |
| Mutante A/10 | 25 %                    | 28 %                                              | 40 %                       | + V 349 A                       |
| Mutante A/11 | 26 %                    | 28 %                                              | 40 %                       | + V 349 G                       |
| Mutante A/12 | 20 %                    | 27 %                                              | -                          | + Q 145 P                       |
| Mutante A/13 | 17 %                    | 30 %                                              | -                          | + A 294 D                       |
| Mutante A/14 | 15 %                    | 30 %                                              | -                          | + A 294 E                       |
| Mutante A/15 | 20 %                    | 28 %                                              | -                          | + V 300 A                       |
| Mutante A/16 | 20 %                    | 28 %                                              | -                          | + V 300 S                       |
| Mutante A/17 | 20 %                    | 28 %                                              | -                          | + V 300 N                       |
| Mutante A/18 | 20 %                    | 28 %                                              | -                          | + V 300 Y                       |
| Mutante A/19 | 20 %                    | 28 %                                              | -                          | + V 300 I                       |
| Mutante A/20 | 17 %                    | 25 %                                              | -                          | + T 323 V                       |
| Mutante A/21 | 18 %                    | 26 %                                              | -                          | + R 378 I                       |
| Mutante A/22 | 19 %                    | 26 %                                              | -                          | + R 378 M                       |
| Mutante A/23 | 17 %                    | 26 %                                              | -                          | + R 378 A                       |
| Mutante A/24 | 17 %                    | 28 %                                              | -                          | + R 378 D                       |
| Mutante A/25 | 15 %                    | 22 %                                              | -                          | + E 245 D                       |
| Mutante A/26 | 18 %                    | 32 %                                              | 30 %                       | + L 169 F                       |
| Mutante A/27 | 18 %                    | 31 %                                              | 28 %                       | + Y 171 G                       |
| Mutante A/28 | 12 %                    | 20 %                                              | 20 %                       | + Ins 429 P                     |
| Mutante A/29 | -                       | -                                                 | 50 %                       | + D 87 R                        |
| Mutante A/30 | -                       | -                                                 | 70 %                       | + S 146 A                       |
| Mutante A/31 | -                       | -                                                 | 75 %                       | + S 146 G                       |
| Mutante A/32 | -                       | -                                                 | 45 %                       | + L 187 F                       |
| Mutante A/33 | -                       | -                                                 | 50 %                       | + N 122 K                       |
| Mutante A/34 | -                       | -                                                 | 45 %                       | + S 124 K                       |
| Mutante B    | 10 %                    | 35 %                                              | 50 %                       | T 348 G+N 428 P                 |

**Tabla 3: Efecto de las sustituciones de aminoácidos adicionales sobre las características básicas del mutante A' (= T348S)**

| Enzima       | M/G a azúcar 30 mM en % | % de actividad relativa de glucosa 1,9 mM / 30 mM | Estabilidad, 30 min, 64 °C | Intercambio de aminoácidos (AA) |
|--------------|-------------------------|---------------------------------------------------|----------------------------|---------------------------------|
| Wt-GlucDOR   | 105 %                   | 70 %                                              | 80 %                       | -                               |
| Mutante A'   | 50 %                    | 35 %                                              | 50 %                       | T348S                           |
| Mutante A'/1 | 55 %                    | 47 %                                              | -                          | + L 110 H                       |

| Enzima        | M/G a azúcar 30 mM en % | % de actividad relativa de glucosa 1,9 mM / 30 mM | Estabilidad, 30 min, 64 °C | Intercambio de aminoácidos (AA) |
|---------------|-------------------------|---------------------------------------------------|----------------------------|---------------------------------|
| Mutante A'/2  | 65 %                    | 70 %                                              | -                          | + Q 246 H                       |
| Mutante A'/3  | 58 %                    | 50 %                                              | -                          | + Q 246 M                       |
| Mutante A'/4  | 60 %                    | 55 %                                              | -                          | + Q246 N                        |
| Mutante A'/5  | 59 %                    | 50 %                                              | -                          | + G 339 T                       |
| Mutante A'/6  | 60 %                    | 60 %                                              | -                          | + V 436 P                       |
| Mutante A'/7  | 40 %                    | 35 %                                              | -                          | + A 294 D                       |
| Mutante A'/8  | 38 %                    | 32 %                                              | -                          | + A 294 E                       |
| Mutante A'/9  | 41 %                    | 45 %                                              | -                          | + T 323 V                       |
| Mutante A'/10 | 43 %                    | 47 %                                              | -                          | + R 378 I                       |
| Mutante A'/11 | 44 %                    | 47 %                                              | -                          | + R 378 M                       |
| Mutante A'/12 | 40 %                    | 50 %                                              | -                          | + R 378 A                       |
| Mutante A'/13 | 40 %                    | 50 %                                              | -                          | + R 378 D                       |
| Mutante A'/14 | -                       | -                                                 | 60 %                       | + D 87 R                        |
| Mutante A'/15 | -                       | -                                                 | 80 %                       | + S 146 A                       |
| Mutante A'/16 | -                       | -                                                 | 85 %                       | + S 146 G                       |
| Mutante A'/17 | -                       | -                                                 | 65 %                       | + V 298 L                       |
| Mutante A'/18 | -                       | -                                                 | 60 %                       | + T 313 D                       |
| Mutante A'/19 | -                       | -                                                 | 75 %                       | + L 386 F                       |

Los intercambios de aminoácidos con un efecto positivo sobre la especificidad del sustrato, afinidad por la glucosa y/o termoestabilidad del mutante A o mutante A', respectivamente, se pueden derivar de las tablas 2 y 3.

## 5 Ejemplo 6

### Identificación de mutantes con termoestabilidad mejorada

Los experimentos se han ampliado a los mutantes que tienen una especificidad de sustrato por la glucosa bastante buena en comparación con la maltosa, pero a costa de desventajas como termoestabilidad demasiado baja o afinidad por la glucosa demasiado baja.

El así denominado mutante 6 tiene una reactividad cruzada baja bastante favorable por la maltosa que es solo aproximadamente un 1,5 % de la reactividad medida para la glucosa. El mutante 6 se caracteriza por las sustituciones de aminoácidos Y171G, E245D, M341V y T348G y tiene una inserción de una prolina (ins429P) entre las posiciones 428 y 429.

Se usaron los siguientes cebadores para introducir estas sustituciones de aminoácidos deseadas:

20 Hebra codificante 5'- CCTATAAGAAAAAGACAGATACGCTCG -3' (SEQ ID NO: 8)  
Hebra anticodificante 5'- CGAGCGTATCTGTCTTTTCTTATAGG-3' (SEQ ID: NO: 9)

D87R:

Hebra codificante 5'- TTCCATCCTCGAGAGATTGTCAAT-3' (SEQ ID NO: 10)  
25 Hebra anticodificante 5'-ATTGACAATCTCTCTGAGGATGGAA-3' (SEQ ID: NO: 11)

N122K y S124K:

Hebra codificante 5'-CGTTATACCTATAAGAAAAAGACAGATACGCTCG-3' (SEQ ID NO: 12)  
30 Hebra anticodificante 5'- CGAGCGTATCTGTCTTTTCTTATAGGTATAACG-3' (SEQ ID NO: 13 )

S146G:

Hebra codificante 5'-AAAAGACCATCAGGGTGGTCTCGAGAAG -3' (SEQ ID NO: 14)  
35 Hebra anticodificante 5'-CTTCTCGAGACCACCCTGATGGTCTTTT -3' (SEQ ID: NO: 15)

V298L:

Hebra codificante 5'-GCTCAAAATGGATTAAAAGTAGCCGCA -3' (SEQ ID NO: 16)



Hebra anticodificante 5'-TGCGGCTACTTTATTTCCATTTTGAGC -3' (SEQ ID: NO: 17)

L386F:

Hebra codificante 5'- CCGTATTAAGTTTCGATCCAACCTTATAGC -3' (SEQ ID NO: 18)

5 Hebra anticodificante 5'- GCTATAAGTTGGATCGAACTTAATACGG -3' (SEQ ID: NO: 19)

**Tabla 4: Mutaciones con un impacto positivo sobre la termoestabilidad de los mutantes de s-GDH que ya comprenden otros mutantes para, por ejemplo, mejorar la especificidad por la glucosa**

| Enzima     | % M/G a azúcar 30 mM en | Estabilidad, 30 min, 64 °C | Intercambios de aminoácidos                                                                                                      |
|------------|-------------------------|----------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| WT         | 105 %                   | 80 %                       | -                                                                                                                                |
| Mutante A  | 25 %                    | 40 %                       | T348G                                                                                                                            |
| Mutante V  | 25 %                    | 50 %                       | T348G+ <b>T313D</b>                                                                                                              |
| Mutante VI | 25 %                    | 45 %                       | T348G+ <b>N267Y</b>                                                                                                              |
| Mutante 6  | 1,5 %                   | 5 %                        | N122K+L169F+Y171G+E245D+M341V+ T348G+ins429P                                                                                     |
| Mutante 19 | 2 %                     | 10 %                       | N122K+ <b>S124K</b> +L169F+Y171G+E245D+M341V+T348G+ins429P                                                                       |
| Mutante 21 | 2 %                     | 15 %                       | N122K+S124K+L169F+Y171G+E245D+M341V+T348G+ <b>L386F</b> +ins429P                                                                 |
| Mutante 24 | 2 %                     | 25 %                       | N122K+S124K+L169F+Y171G+E245D+M341V+T348G+ <b>L386F</b> +ins429P                                                                 |
| Mutante 22 | 2,5 %                   | 20 %                       | N122K+S124K+L169F+Y171G+E245D+Q246H+M341V+T348G+ <b>L386F</b> +ins429P                                                           |
| Mutante 25 | 2,5 %                   | 55 %                       | N122K+S124K+L169F+Y171G+E245D+Q246H+M341V+T348G+ <b>L386F</b> +ins429P                                                           |
| Mutante 29 | 2,5 %                   | 75 %                       | <b>D87R</b> +N122K+S124K+ <b>S146G</b> +L169F+Y171G+E245D+Q246H+ <b>V298L</b> +M341V+ <b>T348S</b> + <b>L386F</b> +ins429P       |
| Mutante 30 | 2,5 %                   | 60 %                       | <b>D87R</b> +N122K+S124K+ <b>S146G</b> +L169F+Y171G+E245D+Q246H+ <b>V298L</b> +G339T+M341V+T348G+ <b>L386F</b> +ins429P          |
| Mutante 31 | 3 %                     | 80 %                       | <b>D87R</b> +N122K+S124K+ <b>S146G</b> +L169F+Y171G+E245D+Q246H+ <b>V298L</b> +M341V+ <b>T348S</b> + <b>L386F</b> +ins429P+V436P |
| Mutante 32 | 3,3 %                   | 67 %                       | D87R+N122K+S124K+S146G+L169F+Y171G+E245D+Q246H+V298L+M341V+T348S+ <b>V349G</b> + <b>A354T</b> +L386F+ ins429P                    |
| Mutante 33 | 4,3 %                   | 80 %                       | D87R+ <b>L110H</b> +N122K+S124K+S146G+L169F+Y171G+E245D+Q246H+V298L+ M341V+T348S+L386F+ins429P                                   |

Los resultados anteriores muestran que los intercambios de aminoácidos D87R, N122K, S124K, S146A o G, preferentemente G, S146G, L187F o M; N267Y, V298L, T313D y L386F mejoran la termoestabilidad del mutante 6 básico.

Las sustituciones D87R; N122K; S124K; S146G; V298L y L386F tienen efectos bastante fuertes sobre las mejoras en la termoestabilidad.

#### Ejemplo 7

#### Generación de mutantes con alta especificidad de sustrato por la glucosa en comparación con la maltosa y mejora de la afinidad hacia la glucosa

En el documento WO 02/34919, se han identificado varios intercambios de aminoácidos en diferentes posiciones de s-GDH y se muestra que potencian la especificidad de sustrato por la glucosa en comparación con, por ejemplo, la maltosa. Las combinaciones del intercambio de aminoácidos T348G con sustituciones de aminoácidos en otras posiciones, por ejemplo, en las posiciones 169, 171, 245, 341 y/o 349, potenciaban la especificidad de sustrato además. Se seleccionaron varios mutantes de s-GDH diferentes con especificidad mejorada por la glucosa, pero en comparación con la maltosa con una afinidad bastante baja por el sustrato glucosa, y se hicieron intentos por mejorar su afinidad por la glucosa.

Como es conocido a partir de los experimentos resumidos en las tablas 2 y 3, las sustituciones de aminoácidos L110H o Y; N229A, G o S; Q246H, M o N; Y333A; G339T; M341V; V349A o G y V436P parecen apropiadas para

potenciar la afinidad de un mutante de s-GDH por la glucosa. Se observan los efectos más fuertes sobre la afinidad con los mutantes L110H, Q246H; G339T; M341V; V349G y V436P. Se encontraron otras fuertes mejoras de afinidad con los intercambios de aminoácidos Q246H, M341V; V349G y V436P. Se introducen mutaciones puntuales en los mutantes ya existentes mediante la misma estrategia que ya se ejemplifica en el ejemplo 6, por lo tanto, aquí se dan solo los cebadores específicos para las sustituciones Q246H.

Hebra codificante 5'- GGTAATTATTGCAGTCTGATCATGGCCC -3' (SEQ ID NO: 20)

Hebra anticodificante 5'- GGGCCATGATCAGACTGCAATAATTTACC -3' (SEQ ID: NO: 21)

Se realizó la determinación de la afinidad por la glucosa a través del cribado de la medición del valor de Km como se describe en el ejemplo 3. Se calculó el valor de Km aparente a partir de las gráficas de diferente concentración de sustrato frente a la actividad enzimática.

La actividad específica se resolvió como se ha descrito en el ejemplo 8.

Las combinaciones de los intercambios identificados como apropiados para mejorar la especificidad de sustrato, afinidad y/o estabilidad se han introducido en s-GDH mutada con especificidad claramente mejorada por la glucosa en comparación con la maltosa.

**Tabla 5: Combinación de diversas sustituciones de aminoácidos en mutantes de s-GDH con especificidad de sustrato mejorada por la glucosa en comparación con la maltosa**

| Enzimas                                     | Valor de Km de cribado en % | Valor de Km ap. en mM de glucosa | Valor de Km ap. en mM de maltosa | M/G en % | Actividad específica U/mg |
|---------------------------------------------|-----------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------|---------------------------|
| WT                                          | 70                          | 0,7                              | 1,4                              | 105      | 800                       |
| Mutante 6                                   | 8                           | 64,7                             | 714                              | 1,5      | 268                       |
| Mut.13 (= mutante 6+Q246H)                  | 20                          | 17,1                             | 208                              | 3        | 430                       |
| Mutante G                                   | 12                          | 11                               | 110                              | 2        | 351                       |
| Mut.J (= mutante G+Q246H)                   | 18                          | 8                                | 143                              | 3        | 489                       |
| Mutante 22                                  | 18                          | 11                               | n.d.                             | 2,5      | 400                       |
| Mutante 23 (= Mutante 22+Q246N)             | 15                          | 13                               | n.d.                             | 2        | 350                       |
| Mutante 29 (como el mutante 22, pero T348S) | 21                          | 11                               | n.d.                             | 2,5      | 400                       |
| Mutante 30 (= mutante 22+G339T)             | 26                          | 9                                | n.d.                             | 2,5      | 350                       |
| Mutante 31 (= mutante 29+V436P)             | 33                          | 6                                | n.d.                             | 3        | 380                       |
| Mutante 32 (= mutante 29+V349G+A354T)       | 32                          | n.d.                             | n.d.                             | 3,3      | 220.                      |
| Mutante 33 (= mutante 29+L110H)             | 28                          | n.d.                             | n.d.                             | 4,3      | 350                       |

Se puede ver claramente que, en todos los tipos mutantes, el intercambio de aminoácidos adicional Q246H producía un potenciamiento de la afinidad hacia la glucosa y una mejora sobre la actividad específica. El mutante 6 tiene los intercambios de aminoácidos en la posición T348G, N122K, L169F, Y171G, E245D, M341V y una inserción de prolina en la posición 429 como el mutante 13 y Q246H adicional. El mutante J tiene los intercambios de aminoácidos en la posición T348G, Y171G, E245D, M341V, N428P como el mutante G y Q246H adicional.

El mutante 22 tiene los intercambios de aminoácidos en la posición T348G, N122K, S124K, L169F, Y171G, E245D, Q246H, M341V, L386F y una inserción de prolina en la posición 429. El mutante 29 tiene todos los intercambios del mutante 22 excepto T348G, que se intercambia a T348S, y daba lugar a una mejora de la velocidad. Los mutantes 30 y 31 conseguían valores aún más altos de Km por la glucosa intercambiando adicionalmente G339T y V436P.

## Ejemplo 8

**Purificación de s-GDH natural o variante y análisis de la actividad enzimática y la actividad específica, respectivamente**

- Se hacen crecer células de *E. coli* que comprenden un vector de expresión apropiado de s-GDH (4 x levadura-Amp. 37 °C), se recogen y se resuspenden en tampón de fosfato de potasio a pH 7,0. La ruptura celular se llevó a cabo mediante el paso por prensa French (70-90 MPa). Después de la centrifugación, se aplicó el sobrenadante a una columna de S-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotec) equilibrada con tampón de fosfato de potasio 10 mM a pH 7,0. Después del lavado, se eluyó la s-GDH usando un gradiente salino de NaCl 0-1 M. Las fracciones que mostraban actividad de s-GDH se agruparon, se dializaron frente a tampón de fosfato de potasio a pH 7,0 y se volvieron a cromatografiar en columna de S-Sepharose reequilibrada. Las fracciones activas se reunieron y se sometieron a una filtración en gel usando una columna de Superdex® 200 (Amersham). Las fracciones activas se agruparon y, después de la adición de CaCl<sub>2</sub> (concentración final 3 mM), se almacenaron a -20 °C.
- La determinación de proteínas se realizó utilizando el reactivo de ensayo de proteínas n.º 23225 de Pierce (curva de calibración con BSA, 30 min. 37 °C).
- Para la medición de la actividad enzimática, se diluyeron las muestras de s-GDH a 1 mg de proteína/ml con pirroloquinolina quinona (PQQ) 0,0556 mM; Hepes 50 mM; CaCl<sub>2</sub> 15 mM a pH 7,0 y se incubaron a 25 °C durante 30 minutos para reconstitución o activación.
- Después de la activación, se diluyeron las muestras con Hepes 50 mM; CaCl<sub>2</sub> 15 mM a pH 7,0 a aproximadamente 0,02 U/ml, y se añadieron 50 µl de cada muestra diluida a 1000 µl de una solución tampón de 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-nitrosofenil)-amina (véase la patente de EE.UU. 5.484.708)/ml como mediador y azúcar 30 mM.
- Se monitoriza la extinción a 620 nm durante los primeros 5 minutos a 25 °C.
- Una unidad de actividad enzimática corresponde a la conversión de 1 mmol de mediador/min en las condiciones de ensayo anteriores
- Cálculo:
- Actividad en volumen (U/ml) = (volumen total \* dE/min [U/ml]) : (ε \* volumen de muestra \* 1)
- (ε = coeficiente de extinción; ε<sub>620 nm</sub> = 30[1 \* mmol<sup>-1</sup> \* cm<sup>-1</sup>]).
- Actividad específica (U/mg) = actividad en volumen U/ml dividida entre concentración de proteína mg/ml, resultados en U/mg
- Los ensayos se realizaron con glucosa y maltosa (Merck, Alemania), respectivamente.
- Los resultados relacionados con la actividad enzimática, así como con la actividad específica, se han incluido en las tablas dadas en los ejemplos anteriores.

## REIVINDICACIONES

1. Un mutante de glucosa deshidrogenasa soluble dependiente de PQQ (s-GDH; EC 1.1.5.2) con especificidad mejorada por la glucosa en comparación con la maltosa, que tiene una sustitución de treonina en la posición 348 por glicina, alanina o bien serina, en el que dicho mutante comprende adicionalmente
  - a) al menos una mutación para mejorar la estabilidad del mutante, en el que dicha sustitución para mejorar la estabilidad se selecciona del grupo que consiste en D87R; N122K; S124K; S146G; V298L y L386F,
  - b) al menos una mutación para mejorar la afinidad del mutante por la glucosa, y opcionalmente
  - c) una o más mutaciones para mejorar aún más la especificidad del mutante por la glucosa en comparación con la maltosa,
 y en el que estas posiciones corresponden a las posiciones de aminoácidos conocidas de la secuencia natural de s-GDH de *A. calcoaceticus* (SEQ ID NO: 2).
2. El mutante de s-GDH de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha mutación para mejorar la afinidad por la glucosa se selecciona del grupo que consiste en L110H o Y; N229A, G o S; Q246H, M o N; Y333A; G339T; M341V; V349A o G y V436P.
3. El mutante de s-GDH de acuerdo con la reivindicación 2, en el que dicha mutación se selecciona del grupo que consiste en L110H, Q246H; G339T; M341V; V349G y V436P.
4. El mutante de s-GDH de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha mutación para mejorar la especificidad del mutante por la glucosa en comparación con la maltosa es una sustitución de aminoácidos es una sustitución de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en Q145P; D163G o N; Q164F; L169F; Y171G; I208L o V; T224I; E245D; G276S; A294D o E; V300A, S, N, Y o I; T307G; T323V; A354Y, E o L; R378I, M, A o D; N428P y la inserción 429 P.
5. El mutante de s-GDH de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende dos, tres, cuatro o cinco sustituciones para mejorar la estabilidad seleccionadas del grupo que consiste en D87R; N122K; S124K; S146G; V298L y L386F.
6. El mutante de s-GDH de acuerdo con la reivindicación 3, en el que dicha sustitución para mejorar la afinidad por la glucosa se selecciona del grupo que consiste en L110H, Q246H; G339T; M341V; V349G y V436P.
7. El mutante de s-GDH de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dicha sustitución para mejorar la especificidad del mutante por la glucosa en comparación con la maltosa se selecciona del grupo que consiste en L169F; Y171G; E245D; N428P y la inserción 429P.
8. Un polinucleótido aislado que codifica una proteína mutante de s-GDH de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
9. Un vector de expresión que comprende un polinucleótido aislado como se define en la reivindicación 8 ligado operativamente con una secuencia promotora que puede promover la expresión de dicho polinucleótido en una célula hospedadora.
10. Una célula hospedadora que comprende el vector de expresión de la reivindicación 9.
11. Un proceso para producir mutantes de s-GDH que comprende cultivar la célula hospedadora de la reivindicación 10 en condiciones adecuadas para la producción de los mutantes de la enzima.
12. Un vector de expresión que comprende un polinucleótido aislado como se define en la reivindicación 8 ligado operativamente con una secuencia promotora que puede promover su expresión en un sistema de síntesis de péptido libre de células.
13. Un proceso para producir mutantes de s-GDH con la construcción de la reivindicación 12 en un sistema de síntesis de péptido libre de células en condiciones adecuadas para la producción de dichos mutantes de la enzima.
14. Un procedimiento para detectar, determinar o medir glucosa en una muestra usando un mutante de s-GDH de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, comprendiendo dicha mejora poner en contacto la muestra con dicho mutante.

15. El procedimiento de la reivindicación 14, caracterizado además por que dicha detección, determinación o medición de glucosa se lleva a cabo usando un dispositivo sensor o de tira de prueba.
  16. Un dispositivo para la detección o medición de glucosa en una muestra que comprende un mutante de s-GDH de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y otros reactivos necesarios para dicha medición.
- 5

Fig. 1

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

```

1 DVPLTPSQFAKAKSENFDDKKVILSNLNKPHALLWGPDNQIWLTERATGKI 50
  |||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.
1 DIPLTPAQFAKAKTENFDKKVILSNLNKPHALLWGPDNQIWLTERATGKI 50
51 LRVNPESGVSVKTVFQVPEIVNDADGQNGLLGFAPHPDFKNNPYIYISGTF 100
  |||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.
51 LRVNPVSGSAKTVFQVPEIVSDADGQNGLLGFAPHPDFKNNPYIYISGTF 100
101 KNPKSTDKELPNQTIIRRYTYNKSTDITLEKPVDLLAGLPSSKDHQSGRLV 150
  |||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.
101 KNPKSTDKELPNQTIIRRYTYNKTTDTFEKPIDLIAGLPSSKDHQSGRLV 150
151 IGFQDKIYYTIGDQGRNQIAYLFLPNQAQHTPTQQELNGKDYHTYMGKVL 200
  |||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.
151 IGFQDKIYYTIGDQGRNQIAYLFLSNQAQHTPTQQELNSKDYHTYMGKVL 200
201 RLNLDSIPKDNPSFNGVVSIIYTLGHRNPQGLAFTPNGKLLQSEQGPNS 250
  |||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.
201 RLNLDSIPKDNPSFNGVVSIIYTLGHRNPQGLAFAPNGKLLQSEQGPNS 250
251 DDEINLIVKGGNYGWPVNVAGYKDDSGYAYANYSAANKS.IKDLAQNGVK 299
  |||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.
251 DDEINLVLKGGNYGWPVNVAGYKDDSGYAYANYSAATNKSQIKDLAQNGIK 300
300 VAAGVPVTKSEWTKGNFVPLKTLTYVQDTYNYNDPTCGEMTYICWPTV 349
  |||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.
301 VATGVVTKSEWTKGNFVPLKTLTYVQDTYNYNDPTCGEMAYICWPTV 350
350 APSSAYVYKGGKKAITGWENTLLVPSLKRGVIFRIKLDPTYSTTYDDAVP 399
  |||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.
351 APSSAYVYTGGKKAIPGWENTLLVPSLKRGVIFRIKLDPTYSTTLDDAIP 400
400 MFKSNNRYRDVIASPDGNVLYVLTDTAGNVQKDDGSVTNTLENPGSLIKF 449
  |||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.
401 MFKSNNRYRDVIASPEGNTLYVLTDTAGNVQKDDGSVTHTLENPGSLIKF 450
450 TYKAK 454
  |||
451 TYNGK 455

```

Fig. 2

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

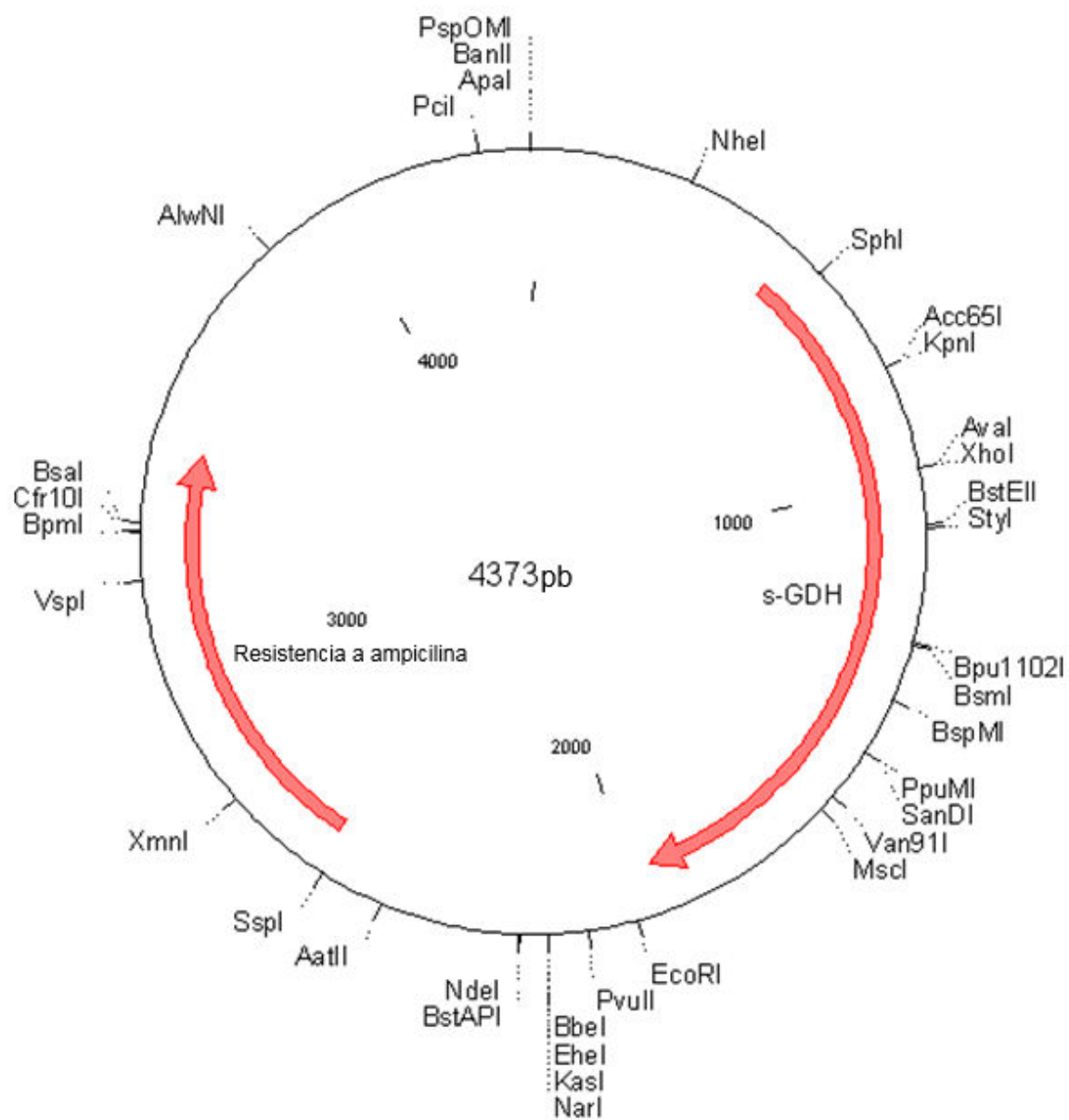


Fig. 3a

Secuencia del vector pACSGDH

```

cactaactga ttacgcaccg catgtaaccg ttttcaatct gtgagtaaat tcacagttta 60
ttaacattgt gatagctatg atgacaacgt ttgtcgact gtaactaacg tgtaacagtt 120
agttgtcagt tttgctgggg tatttgcgtt ataaaaaccg ttatcacaat atcccgcgac 180
taccggacaa aaataaagag ttgaataaga gcttatccca ttagggctat ttactttgcc 240
atthtggacc tgggcagtgc tcgcaaaaac gcgttagcgt tttgaacgag ctacggcgcg 300
cccgaggggc gagcgtagcg agtcaaacct cacgtactac gtgtacgctc cgggttttgc 360
gcgctgtccg tgtccaaact gctgcgcaa taacgcctgg tgggataggc tctaaatacg 420
cttcggcggt cagtaacacg cgtaaacgtg ctgaacagcc gggcattttt ttacgctata 480
ccctacataa taaaaccgga gctaccatga ataagaaggc actgaccctt tctgccgtga 540
tggcaagtct gttattcggc gcgcacggcg atgcgcgca tgttccctca actccatctc 600
aatttgctaa agcgaaatca 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
ttaaaaaata tccttatatc tatatttcag gtacatttaa aaatccgaaa tctacagata 900
aagaattacc gaaccaaacg attattcgtc gttataccta taataaatca acagatacgc 960
tcgagaagcc agtcgattta ttagcaggat taccttcac aaagaccat cagtcaggtc 1020
gtcttgtcat tgggccagat caaaagattt attatacgat tgggtaccaa gggcgtaacc 1080
agcttgctta tttgttcttg ccaaatcaag cacaacatac gccaaactca caagaactga 1140
atggtaaaga ctatcacacc tatatgggta aagtaactac cttaaatctt gatggaagta 1200
ttccaaagga taatccaagt ttaacggggg tgggttagcca tatttataca ctggacatc 1260
gtaatccgca gggcttagca ttcactccaa atggtaaatt attgcagtc gaacaaggcc 1320
caaactctga cgatgaatt aacctcattg tcaaagggtg caattatggt tggccgaatg 1380
tagcaggtta taaagatgat agtggctatg cttatgcaa ttattcagca gcagccaata 1440
agtcaattaa ggatttagct caaaatggag taaaagtagc cgcaggggtc cctgtgacga 1500
aagaatctga atggactggg aaaaactttg tcccaccat aaaaacttta tataccgttc 1560
aagataccta caactataac gatccaactt gtggagagat gacctacatt tgctggccaa 1620
cagttgcacc gtcactctgc tatgtctata agggcggtta aaaagcaatt actggttggg 1680
aaaatacatt attggttcca tctttaaaac gtggtgtcat tttcogtatt aagttagatc 1740
caacttatag cactacttat gatgacgctg taccgatgtt taagagcaac aaccgttata 1800
gtgatgtgat tgcaagtcca gatgggaatg tcttatatgt attaaactgat actgccggaa 1860
atgtccaaaa agatgatggc tcagtaacaa atacattaga aaaccagga tctctcatta 1920
agttcaccta taaggctaag taatacagtc gcattaaaaa accgatctat aaagatcggg 1980
tttttttagt ttagaaaaga attcactggc cgtcggtttt caacgtcgtg actgggaaaa 2040
ccctggcggt acccaactta atcgccctgc agcacatccc cctttcgcca gctggcgtaa 2100
tagcgaagag gcccgcacg atcgcccttc ccaacagttg cgcagcctga atggcgaaatg 2160
gcgctgatg cgggtatttt tccctacgca tctgtgcggg atttcacacc gcatatgggtg 2220
cactctcagt acaatctgct ctgatgccgc atagttaage cagccccgac acccgccaac 2280
acccgctgac gcgcctgac gggcttgtct gctcccggca tccgcttaca gacaagctgt 2340
gaccgtctcc gggagctgca tgtgtcagag gttttcaccg tcatcacga aacgcgcgag 2400
acgaaagggc ctgctgatac gcctattttt atagggttaat gtcattgataa taatggtttc 2460
ttagacgtca ggtggcactt ttcggggaaa tgtgcgcgga accctattt gtttattttt 2520
ctaaatacat tcaaatatgt atcgctcat gagacaataa cctgataaa tgcttcaata 2580
atattgaaaa aggaagagta tgagtattca acatttcctg gtgccttcta ttcctttttt 2640
tgccgcatth tgcttctctg tttttgctca ccagaaacg ctgggtgaaag taaaagatgc 2700
tgaagatcag ttgggtgcac gagtgggtta catcgaaact gatctcaaca gcggttaagat 2760
ccttgagagt ttteggcccg aagaacgttt tccaatgatg agcaatttta aagttctgct 2820
atgtggcgcg gtattatccc gtattgacgc cgggcaagag caactcggtc gccgcataca 2880

```



Fig. 3b

```

ctattctcag aatgacttgg ttgagtactc accagtcaca gaaaagcatc ttacggatgg 2940
catgacagta agagaattat gcagtgtctgc cataaccatg agtgataaca ctgcggccaa 3000
cttactttctg acaacgatcg gaggaccgaa ggagctaacc gcttttttgc acaacatggg 3060
ggatcatgta actcgccttg atcgttggga accggagctg aatgaagcca taccaaacga 3120
cgagcgtgac accacgatgc ctgtagcaat ggcaacaacg ttgcgcaaac tattaaactgg 3180
cgaactactt actctagctt cccggcaaca attaatagac tggatggagg cggataaagt 3240
tgcaggacca cttctgcgct cggcccttcc ggctggctgg ttatttgctg ataaatctgg 3300
agccggtgag cgtgggtctc gcggtatcat tgcagcactg gggccagatg gtaagccctc 3360
ccgtatcgta gttatctaca cgacggggag tcaggcaact atggatgaac gaaatagaca 3420
gatcgtgag ataggtgcct cactgattaa gcattggtaa ctgtcagacc aagtttactc 3480
atatatactt tagattgatt taaaacttca tttttaattt aaaaggatct aggtgaagat 3540
cctttttgat aatctcatga ccaaaatccc ttaacgtgag ttttcgttcc actgagcgtc 3600
agaccccgta gaaaagatca aaggatcttc ttgagatcct tttttctgc 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
gttgactca agacgatagt taccggataa ggcgcagcgg tcgggctgaa cgggggggttc 3960
gtgcacacag ccagcttgg agcgaacgac ctacaccgaa ctgagatacc tacagcgtga 4020
gctatgagaa agcgccacgc ttcccgaagg gagaaaggcg gacaggatc cggtaagcgg 4080
cagggtcggg acaggagagc gcacgaggga 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 gagtgaactg ataccgctcg ccgcagccga acgacggggc ccg 4373

```

## LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> Roche Diagnostics GmbH  
 F. Hoffmann La Roche AG

<120> Mutantes mejorados de glucosa deshidrogenasa soluble dependiente de  
 pirroloquinolina quinona

10 <130> 23713 WO

<150> EP06007779  
 <151> 13/04/2006

15 <160> 21

<170> PatentIn versión 3.2

20 <210> 1  
 <211> 1362  
 <212> ADN  
 <213> Acinetobacter calcoaceticus

25 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1362)

<400> 1

|                                                                 |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|
| 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 tgg 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                                                     |     |
| ggt ttt gcc ttc cat cct gat ttt aaa aat aat cct tat atc tat att | 288 |
| Gly Phe Ala Phe His Pro Asp Phe Lys Asn Asn Pro Tyr Ile Tyr Ile |     |
| 85 90 95                                                        |     |
| tca ggt aca ttt aaa aat ccg aaa tct aca gat aaa gaa tta ccg aac | 336 |
| Ser Gly Thr Phe Lys Asn Pro Lys Ser Thr Asp Lys Glu Leu Pro Asn |     |
| 100 105 110                                                     |     |
| caa acg att att cgt cgt tat acc tat aat aaa tca aca gat acg ctc | 384 |
| Gln Thr Ile Ile Arg Arg Tyr Thr Tyr Asn Lys Ser Thr Asp Thr Leu |     |
| 115 120 125                                                     |     |

|                                                                                                                                                       |      |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| gag aag cca gtc gat tta tta gca gga tta cct tca tca aaa gac cat<br>Glu Lys Pro Val Asp Leu Leu Ala Gly Leu Pro Ser Ser Lys Asp His<br>130 135 140     | 432  |
| cag tca ggt cgt ctt gtc att ggg cca gat caa aag att tat tat acg<br>Gln Ser Gly Arg Leu Val Ile Gly Pro Asp Gln Lys Ile Tyr Tyr Thr<br>145 150 155 160 | 480  |
| att ggt gac caa ggg cgt aac cag ctt gct tat ttg ttc ttg cca aat<br>Ile Gly Asp Gln Gly Arg Asn Gln Leu Ala Tyr Leu Phe Leu Pro Asn<br>165 170 175     | 528  |
| caa gca caa cat acg cca act caa caa gaa ctg aat ggt aaa gac tat<br>Gln Ala Gln His Thr Pro Thr Gln Gln Glu Leu Asn Gly Lys Asp Tyr<br>180 185 190     | 576  |
| cac acc tat atg ggt aaa gta cta cgc tta aat ctt gat gga agt att<br>His Thr Tyr Met Gly Lys Val Leu Arg Leu Asn Leu Asp Gly Ser Ile<br>195 200 205     | 624  |
| cca aag gat aat cca agt ttt aac ggg gtg gtt agc cat att tat aca<br>Pro Lys Asp Asn Pro Ser Phe Asn Gly Val Val Ser His Ile Tyr Thr<br>210 215 220     | 672  |
| ctt gga cat cgt aat ccg cag ggc tta gca ttc act cca aat ggt aaa<br>Leu Gly His Arg Asn Pro Gln Gly Leu Ala Phe Thr Pro Asn Gly Lys<br>225 230 235 240 | 720  |
| tta ttg cag tct gaa caa ggc cca aac tct gac gat gaa att aac ctc<br>Leu Leu Gln Ser Glu Gln Gly Pro Asn Ser Asp Asp Glu Ile Asn Leu<br>245 250 255     | 768  |
| att gtc aaa ggt ggc aat tat ggt tgg ccg aat gta gca ggt tat aaa<br>Ile Val Lys Gly Gly Asn Tyr Gly Trp Pro Asn Val Ala Gly Tyr Lys<br>260 265 270     | 816  |
| gat gat agt ggc tat gct tat gca aat tat tca gca gca gcc aat aag<br>Asp Asp Ser Gly Tyr Ala Tyr Ala Asn Tyr Ser Ala Ala Asn Lys<br>275 280 285         | 864  |
| tca att aag gat tta gct caa aat gga gta aaa gta gcc gca ggg gtc<br>Ser Ile Lys Asp Leu Ala Gln Asn Gly Val Lys Val Ala Ala Gly Val<br>290 295 300     | 912  |
| cct gtg acg aaa gaa tct gaa tgg act ggt aaa aac ttt gtc cca cca<br>Pro Val Thr Lys Glu Ser Glu Trp Thr Gly Lys Asn Phe Val Pro Pro<br>305 310 315 320 | 960  |
| tta aaa act tta tat acc gtt caa gat acc tac aac tat aac gat cca<br>Leu Lys Thr Leu Tyr Thr Val Gln Asp Thr Tyr Asn Tyr Asn Asp Pro<br>325 330 335     | 1008 |
| act tgt gga gag atg acc tac att tgc tgg cca aca gtt gca ccg tca<br>Thr Cys Gly Glu Met Thr Tyr Ile Cys Trp Pro Thr Val Ala Pro Ser<br>340 345 350     | 1056 |
| tct gcc tat gtc tat aag ggc ggt aaa aaa gca att act ggt tgg gaa<br>Ser Ala Tyr Val Tyr Lys Gly Gly Lys Lys Ala Ile Thr Gly Trp Glu                    | 1104 |

| 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

<400> 2

|                                                                 |    |
|-----------------------------------------------------------------|----|
| Asp Val Pro Leu Thr Pro Ser Gln Phe Ala Lys Ala Lys Ser Glu Asn |    |
| 1                                                               | 15 |
| Phe Asp Lys Lys Val Ile Leu Ser Asn Leu Asn Lys Pro His Ala Leu |    |
| 20                                                              | 30 |
| Leu Trp Gly Pro Asp Asn Gln Ile Trp Leu Thr Glu Arg Ala Thr Gly |    |
| 35                                                              | 45 |
| Lys Ile Leu Arg Val Asn Pro Glu Ser Gly Ser Val Lys Thr Val Phe |    |
| 50                                                              | 60 |
| Gln Val Pro Glu Ile Val Asn Asp Ala Asp Gly Gln Asn Gly Leu Leu |    |
| 65                                                              | 80 |
| Gly Phe Ala Phe His Pro Asp Phe Lys Asn Asn Pro Tyr Ile Tyr Ile |    |
| 85                                                              | 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<br>115 120 125     |     |     |
| Glu Lys Pro Val Asp Leu Leu Ala Gly Leu Pro Ser Ser Lys Asp His<br>130 135 140     |     |     |
| Gln Ser Gly Arg Leu Val Ile Gly Pro Asp Gln Lys Ile Tyr Tyr Thr<br>145 150 155 160 |     |     |
| Ile Gly Asp Gln Gly Arg Asn Gln Leu Ala Tyr Leu Phe Leu Pro Asn<br>165 170 175     |     |     |
| Gln Ala Gln His Thr Pro Thr Gln Gln Glu Leu Asn Gly Lys Asp Tyr<br>180 185 190     |     |     |
| His Thr Tyr Met Gly Lys Val Leu Arg Leu Asn Leu Asp Gly Ser Ile<br>195 200 205     |     |     |
| Pro Lys Asp Asn Pro Ser Phe Asn Gly Val Val Ser His Ile Tyr Thr<br>210 215 220     |     |     |
| Leu Gly His Arg Asn Pro Gln Gly Leu Ala Phe Thr Pro Asn Gly Lys<br>225 230 235 240 |     |     |
| Leu Leu Gln Ser Glu Gln Gly Pro Asn Ser Asp Asp Glu Ile Asn Leu<br>245 250 255     |     |     |
| Ile Val Lys Gly Gly Asn Tyr Gly Trp Pro Asn Val Ala Gly Tyr Lys<br>260 265 270     |     |     |
| Asp Asp Ser Gly Tyr Ala Tyr Ala Asn Tyr Ser Ala Ala Ala Asn Lys<br>275 280 285     |     |     |
| Ser Ile Lys Asp Leu Ala Gln Asn Gly Val Lys Val Ala Ala Gly Val<br>290 295 300     |     |     |
| Pro Val Thr Lys Glu Ser Glu Trp Thr Gly Lys Asn Phe Val Pro Pro<br>305 310 315 320 |     |     |
| Leu Lys Thr Leu Tyr Thr Val Gln Asp Thr Tyr Asn Tyr Asn Asp Pro<br>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

- 5 <210> 3  
<211> 4373  
<212> ADN  
<213> Artificial

- 10 <220>  
<223> Secuencia del vector pACSGDH

<400> 3  
cactaactga ttacgcaccg catgtaaccg ttttcaatct gtgagtaaatt tcacagttta 60  
ttaacattgt gatagctatg atgacaacgt ttgtcgcact gtaactaacg tgtaacagtt 120  
agttgtcagt tttgctgggg tatttcgctt ataaaaaccg ttatcacaat atcccgcgac 180  
taccggacaa aaataaagag ttgaataaga gcttatccca ttagggctat tttacttgcc 240  
atthtggacc tgggcagtgc tcgccaaaac gcgttagcgt tttgaacgcg ctacggcgcg 300  
cccgaagggc gagcgtagcg agtcaaacct cacgtactac gtgtacgctc cggtttttgc 360  
gcgtgtccg tgtccaaact gctgcgccaa taacgcctgg tgggataggc tctaaatacg 420  
cttcggcgctt cagtaacacg cgtaaacgtg ctgaacagcc gggcattttt ttacgctata 480  
ccctacataa taaaaccgga gctaccatga ataagaaggt actgaccctt tctgccgtga 540

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| tggaagtct gttattcggc gcgcacggc atgccgccga tgttcctcta actccatctc    | 600  |
| aatttgctaa agcgaaatca gagaactttg acaagaaagt tattctatct aatctaaata  | 660  |
| agccgcacgc gttgttatgg ggaccagata atcaaatctg gttaactgag cgagcaacag  | 720  |
| gtaagattct aagagttaat ccagagtcgg gtagtgtaaa aacagttttt caggtaccag  | 780  |
| agattgtcaa tgatgctgat gggcagaatg gtttattagg ttttgccttc catcctgatt  | 840  |
| ttaaaaataa tccttatatc tatatttcag gtacatttaa aaatccgaaa tctacagata  | 900  |
| aagaattacc gaaccaaacy attattcgtc gttataccta taataaatca acagatacgc  | 960  |
| tcgagaagcc agtcgattta ttagcaggat taccttcac aaaagaccat cagtcaggtc   | 1020 |
| gtcttgctat tgggccagat caaaagattt attatacgat tggtgaccaa gggcgtaacc  | 1080 |
| agcttgctta tttgttcttg ccaaatcaag cacaacatac gccaaactca caagaactga  | 1140 |
| atggtaaaga ctatcacacc tatatgggta aagtactacg cttaaactct gatggaagta  | 1200 |
| ttccaaagga taatccaagt tttaacgggg tggtagcca tatttataca cttggacac    | 1260 |
| gtaatccgca gggcttagca ttcactccaa atggtaaatt attgcagtct gaacaaggcc  | 1320 |
| caaaactctga cgatgaaatt aacctcattg tcaaagggtg caattatggt tggccgaatg | 1380 |
| tagcaggtta taaagatgat agtggctatg cttatgcaaa ttattcagca gcagccaata  | 1440 |
| agtcaattaa ggatttagct caaaatggag taaaagtagc cgcaggggtc cctgtgacga  | 1500 |
| aagaatctga atggactggt aaaaactttg tcccaccatt aaaaacttta tataccgttc  | 1560 |
| aagataccta caactataac gatccaactt gtggagagat gacctacatt tgctggccaa  | 1620 |
| cagttgcacc gtcactctgc tatgtctata agggcggtaa aaaagcaatt actggttggg  | 1680 |
| aaaatacatt attggttcca tctttaaaac gtggtgtcat tttccgtatt aagttagatc  | 1740 |
| caacttatag cactacttat gatgacgctg taccgatgtt taagagcaac aaccgttacc  | 1800 |
| gtgatgtgat tgcaagtcca gatgggaatg tcttatatgt attaaactgat actgccggaa | 1860 |
| atgtccaaaa agatgatggc tcagtaacaa atacattaga aaaccagga tctctcatta   | 1920 |
| agttcaccta taaggctaag taatacagtc gcattaaaa accgatctat aaagatcggg   | 1980 |
| ttttttagtt ttagaaaaga attcactggc cgtcgtttta caacgtcgtg actgggaaaa  | 2040 |
| ccctggcggt acccaactta atcgcttgc agcacatccc cctttcgcca gctggcgtaa   | 2100 |
| tagcgaagag gcccgaccg atcgcccttc ccaacagttg cgcagcctga atggcgaatg   | 2160 |
| gcgcctgatg cgggtatttc tcttacgca tctgtcggt atttcacacc gcatatgggt    | 2220 |
| cactctcagt acaatctgct ctgatgccgc atagttaagc cagccccgac acccgccaac  | 2280 |
| accgctgac gcgcctgac gggcttgtct gctcccgga tccgcttaca gacaagctgt     | 2340 |

gaccgtctcc gggagctgca tgtgtcagag gttttcaccg tcatcaccga aacgcgcgag 2400  
acgaaagggc ctctgatac gcctatTTTT ataggTTaat gtcataataa taatggTTtc 2460  
ttagacgtca ggtggcactt ttcggggaaa tgtgcgcgga acccctatTT gTTtattTTt 2520  
ctaaatacat tcaaatatgt atccgctcat gagacaataa ccctgataaa tgcttcaata 2580  
atattgaaaa aggaagagta tgagtattca acatttccgt gtcgccctta ttccctTTTT 2640  
tgccggcattt tgccctccctg tttttgctca cccagaaaacg ctggtgaaag taaaagatgc 2700  
tgaagatcag ttgggtgcac gagtgggtta catcgaactg gatctcaaca gcggtaaagat 2760  
ccttgagagt tttcgcctcg aagaacgTTt tccaatgatg agcactTTta aagttctgct 2820  
atgtggcgcg gtattatccc gtattgacgc cgggcaagag caactcggtc gccgcataca 2880  
ctattctcag aatgacttgg ttgagtactc accagtcaca gaaaagcatc ttacggatgg 2940  
catgacagta agagaattat gcagtgtgc cataaccatg agtgataaca ctgcggccaa 3000  
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 cggcccttc ggctggctgg tttattgtg ataaatctgg 3300  
agccggtgag cgtgggtctc gcggtatcat tgcagcactg gggccagatg gtaagccctc 3360  
cgtatcgtg gttatctaca cgacggggag tcaggcaact atggatgaac gaaatagaca 3420  
gatcgtgag atagggtcct cactgattaa gcattggtaa ctgtcagacc aagtttactc 3480  
atatatactt tagattgatt taaaacttca tttttaattt aaaaggatct aggtgaagat 3540  
cctttttgat aatctcatga ccaaaatccc ttaacgtgag ttttcgTTcc actgagcgtc 3600  
agaccccgta gaaaagatca aaggatcttc ttgagatcct tttttctgc 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 cggggggTtc 3960  
gtgcacacag ccagcttgg agcgaacgac ctacaccgaa ctgagatacc tacagcgtga 4020  
gctatgagaa agcggcacgc tttccgaagg gagaaaggcg gacaggtatc cggtaaaggc 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

5 <210> 4  
<211> 29  
<212> ADN  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> cebador

<400> 4  
**catttgctgg ccaggggttg caccgtcat** 29

15 <210> 5  
<211> 29  
<212> ADN  
<213> Artificial

20 <220>  
<223> cebador

<400> 5  
**atgacggtgc aaccctggc cagcaaattg** 29

30 <210> 6  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Artificial

35 <220>  
<223> cebador

<400> 6  
**ttaacgtgct gaacagccgg** 20

40 <210> 7  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Artificial

45 <220>  
<223> cebador

<400> 7  
**atatgggtaa agtactacgc** 20

5 <210> 8  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 10 <220>  
 <223> cebador  
 <400> 8  
**cctataagaa aaagacagat acgctcg** 27  
  
 15 <210> 9  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 20 <220>  
 <223> cebador  
 <400> 9  
**cgagcgtatc tgtctttttc ttatagg** 27  
  
 25  
 <210> 10  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 30 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> cebador  
 35 <400> 10  
**ttccatcctc gagagattgt caat** 24  
  
 40 <210> 11  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 45 <223> cebador  
 <400> 11  
**attgacaatc tctctgagga tggaa** 25  
  
 50 <210> 12  
 <211> 34  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 55 <220>  
 <223> cebador

|    |                                              |  |    |
|----|----------------------------------------------|--|----|
|    | <400> 12                                     |  |    |
|    | <b>cgttatacct ataagaaaaa gacagatacg ctcg</b> |  | 34 |
| 5  | <210> 13                                     |  |    |
|    | <211> 34                                     |  |    |
|    | <212> ADN                                    |  |    |
|    | <213> Artificial                             |  |    |
| 10 | <220>                                        |  |    |
|    | <223> cebador                                |  |    |
|    | <400> 13                                     |  |    |
| 15 | <b>cgagcgtatc tgtctttttc ttataggtat aacg</b> |  | 34 |
|    | <210> 14                                     |  |    |
|    | <211> 28                                     |  |    |
| 20 | <212> ADN                                    |  |    |
|    | <213> Artificial                             |  |    |
|    | <220>                                        |  |    |
|    | <223> cebador                                |  |    |
| 25 | <400> 14                                     |  |    |
|    | <b>aaaagaccat cagggtggtc tcgagaag</b>        |  | 28 |
| 30 | <210> 15                                     |  |    |
|    | <211> 28                                     |  |    |
|    | <212> ADN                                    |  |    |
|    | <213> Artificial                             |  |    |
| 35 | <220>                                        |  |    |
|    | <223> cebador                                |  |    |
|    | <400> 15                                     |  |    |
|    | <b>cttctcgaga ccacctgat ggtctttt</b>         |  | 28 |
| 40 | <210> 16                                     |  |    |
|    | <211> 27                                     |  |    |
|    | <212> ADN                                    |  |    |
| 45 | <213> Artificial                             |  |    |
|    | <220>                                        |  |    |
|    | <223> cebador                                |  |    |
| 50 | <400> 16                                     |  |    |
|    | <b>gctcaaaatg gattaaaagt agccgca</b>         |  | 27 |
| 55 | <210> 17                                     |  |    |
|    | <211> 27                                     |  |    |
|    | <212> ADN                                    |  |    |

|    |                                         |    |
|----|-----------------------------------------|----|
|    | <213> Artificial                        |    |
|    | <220>                                   |    |
|    | <223> cebador                           |    |
| 5  | <400> 17                                |    |
|    | <b>tgcggctact ttatttccat ttgagc</b>     | 27 |
| 10 | <210> 18                                |    |
|    | <211> 28                                |    |
|    | <212> ADN                               |    |
|    | <213> Artificial                        |    |
| 15 | <220>                                   |    |
|    | <223> cebador                           |    |
|    | <400> 18                                |    |
|    | <b>ccgtattaag ttcgatccaa cttatagc</b>   | 28 |
| 20 |                                         |    |
|    | <210> 19                                |    |
|    | <211> 28                                |    |
|    | <212> ADN                               |    |
| 25 | <213> Artificial                        |    |
|    | <220>                                   |    |
|    | <223> cebador                           |    |
| 30 | <400> 19                                |    |
|    | <b>gctataagtt ggaicgaact taatacgg</b>   | 28 |
| 35 | <210> 20                                |    |
|    | <211> 29                                |    |
|    | <212> ADN                               |    |
|    | <213> Artificial                        |    |
|    | <220>                                   |    |
| 40 | <223> cebador                           |    |
|    | <400> 20                                |    |
|    | <b>ggtaaattat tgcagctctga tcatggccc</b> | 29 |
| 45 |                                         |    |
|    | <210> 21                                |    |
|    | <211> 29                                |    |
|    | <212> ADN                               |    |
|    | <213> Artificial                        |    |
| 50 | <220>                                   |    |
|    | <223> cebador                           |    |
|    | <400> 21                                |    |
|    | <b>gggccatgat cagactgcaa taatttacc</b>  | 29 |
| 55 |                                         |    |