

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 779 725**

51 Int. Cl.:

C12N 9/54 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.01.2014 PCT/EP2014/051602**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.07.2014 WO14114810**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.01.2014 E 14702514 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.01.2020 EP 2948547**

54 Título: **Glucosa oxidasas novedosas derivadas de Aspergillus niger**

30 Prioridad:

28.01.2013 EP 13152935

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

19.08.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BOCOLA, MARCO;
DUEFEL, HARTMUT;
ARANGO GUTIERREZ, ERIK UWE;
HEINDL, DIETER;
MEIER, THOMAS;
MUNDHADA, HEMANSHU;
SCHWANEBERG, ULRICH y
TACKE, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 779 725 T3

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

DESCRIPCIÓN

Glucosa oxidasas novedosas derivadas de *Aspergillus niger*

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a variantes de glucosa oxidasas novedosas. Las glucosa oxidasas proporcionadas en el presente documento son específicas para el sustrato glucosa y, de este modo, presentan tasas de consumo de oxígeno significativamente reducidas. En otro aspecto, la presente invención proporciona glucosa oxidasas que son específicas para el sustrato glucosa y, de este modo, presentan tasas de consumo de oxígeno significativamente reducidas y/o actividad enzimática incrementada para mediadores de electrones distintos del oxígeno. Además, la presente invención se refiere a dichas glucosa oxidasas para su uso en un kit y un sensor para la medición de glucosa.

En particular, la presente invención se refiere a glucosa oxidasas derivadas de *Aspergillus niger*, que tienen, además de las dos sustituciones T30V e I94V de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, adicionalmente al menos una sustitución aminoácida en cualquiera de las cinco posiciones seleccionadas del grupo S53; A173; A332; F414; y V560.

Antecedentes científicos

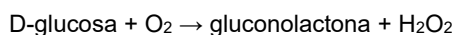
La diabetes *mellitus* refleja una enfermedad metabólica, que se puede encontrar extensamente en todo el mundo. Los diabéticos tienen una producción alterada o deficiente de la hormona insulina, que controla el nivel de glucemia y, por tanto, estos enfermos corren el riesgo de hiperglucemia, así como hipoglucemia, en caso de una aplicación inadecuada de insulina [Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycaemia. WHO e IDF (2006); WHO Document Production service, ISBN 9241594934].

Para garantizar una correcta aplicación de insulina, se necesitan sistemas de medición de glucosa altamente específicos, exactos y fáciles de manipular, tanto para sistemas de automedición como para sistemas de medición de alto rendimiento a escala clínica.

Para permitir la determinación adecuada de las concentraciones de glucosa en la sangre y hacer que la medición sea altamente específica, están implicadas reacciones enzimáticas. En la actualidad, los dos tipos de enzimas que se usan en el análisis de la diabetes están reflejados por las glucosa deshidrogenasas (a continuación en el presente documento GDH) y glucosa oxidasas (a continuación en el presente documento GOx) [Hönes, J., Müller, P., y Surridge, N. (2008). *The Technology Behind Glucose Meters: Test Strips*. DIABETES TECHNOLOGY & THERAPEUTICS 10, 10-26].

La principal ventaja de las GDH es su oxidación de glucosa independiente del oxígeno, pero la enzima muestra ligeras actividades secundarias en otros determinados azúcares clínicamente pertinentes, y, por tanto, la GDH es inespecífica [Olsthoorn, A.J., y Duine, J.A. (1998). *On the mechanism and specificity of soluble, quinoprotein glucose dehydrogenase in the oxidation of aldose sugars*. Biochemistry 37, 13854-13861]. En cambio, las GOx son altamente específicas para glucosa, pero su oxidación es fuertemente dependiente del oxígeno [Bankar, S.B., Bule, M. V., Singhal, R.S. y Ananthanarayan, L. (2009). *Glucose oxidase -- an overview*. Biotechnology Advances 27, 489-501; Bentley, R., y Neuberger, A. (1949). *The mechanism of the action of notation*. Biochem J 45, 584-590].

En más detalle, las GOx, como las flavoproteínas, pertenecen a la familia de las oxidorreductasas (es decir, β -D-glucosa: oxígeno 1-oxidorreductasa). Las GOx naturales (a continuación en el presente documento, WT) catalizan la oxidación de β -D-glucosa a D-glucono- δ -lactona y H₂O₂ empleando oxígeno molecular como un aceptador de electrones [véase, por ejemplo, Pazur, J.H., y Kleppe, K. (1964). *The Oxidation of Glucose and Related Compounds by Glucose Oxidase from Aspergillus Niger*. Biochemistry 3, 578-583]. Dicha reacción se representa por la siguiente fórmula:



Los sustratos de las GOx se pueden dividir en dos grupos: i) los aceptadores de electrones de la semirreacción oxidativa y ii) los donantes de electrones de la semirreacción reductora, véase, por ejemplo, [Leskovac, V., Trivic, S., Wohlfahrt, G., Kandrac, J., y Pericin, D. (2005). *Glucose oxidase from Aspergillus niger: the mechanism of action with molecular oxygen, quinones, and one-electron acceptors*. Int J Biochem Cell Biol 37, 731-750]. El experto en la técnica está al tanto de que, además de D-glucosa, diversos derivados de D-glucosa son sustratos potenciales para la semirreacción reductora de GOx.

Hasta la fecha, se han descrito GOx de diferentes orígenes. Por ejemplo, se describe la GOx de las algas marinas *Chondrus crispus* en los documentos US 7.544.795 y US 6.924.366; se describe la GOx de los hongos filamentosos *Cladosporium spec.* en los documentos WO 95/29996; WO 1998/020136; y se describe la GOx de *Talaromyces flavus* en el documento US 6.054.318.

La GOx mejor descrita en la literatura es de *Aspergillus niger* [Hecht, H.J., Schomburg, D., Kalisz, H., y Schmid, R.D.

(1993). *The 3D structure of glucose oxidase from Aspergillus niger. Implications for the use of GOD as a biosensor enzyme. Biosensors & Bioelectronics* 8, 197-203; Wohlfahrt, G., Witt, S., Hendle, J., Schomburg, D., Kalisz, H.M., y Hecht, H.J. (1999). 1.8 and 1.9 Å resolution structures of the *Penicillium amagasakiense* and *Aspergillus niger* glucose oxidases as a basis for modelling substrate complexes. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* 55, 969-977].

El documento WO89/126675 describe la producción de GOx de *Aspergillus niger* en sistemas recombinantes y el documento WO 2008/079227 A1 se refiere a una GOx obtenida de *Aspergillus niger* formulada en una composición que confiere una estabilidad en almacenamiento mejorada.

Es una proteína bien caracterizada que forma un dímero de 160 kDa de tamaño y se han resuelto estructuras cristalinas de la misma [Hecht, H.J., et al., *Crystal-Structure Of Glucose-Oxidase From Aspergillus-Niger Refined At 2.3 Angstrom Resolution. Journal Of Molecular Biology*, 1993. 229(1): p. 153-172].

Se sabe además que, en particular, la GOx natural de *Aspergillus niger* (a continuación en el presente documento GOx-WT) presenta estabilidad con respecto a la temperatura y especificidad para el sustrato glucosa significativas. La GOx es una glucoproteína con un contenido de carbohidratos de tipo con alta concentración de manosa de un 10-16 % [Hayashi, S., y Nakamura, S. (1981). *Multiple forms of glucose oxidase with different carbohydrate compositions. Biochim Biophys Acta* 657, 40-51; Pazur, J.H., Kleppe, K., y Cepure, A. (1965). *A glycoprotein structure for glucose oxidase from Aspergillus niger. Arch Biochem Biophys* 111, 351-357].

En la actualidad, las GOx se usan comúnmente en biosensores para la detección de glucosa en soluciones industriales o bien en los líquidos corporales de un sujeto, por ejemplo, en sangre y orina.

La mayoría de los dispositivos de automedición disponibles actualmente son sensores electroquímicos que consisten, en principio, en

a) un componente biológico, es decir, la enzima respectiva que tiene glucosa como sustrato,

b) un indicador (el componente electrónico), y

c) un transductor de señales.

En el dispositivo de medición, los electrones de la glucosa se transfieren por el componente biológico (a) a un electrodo (b) por medio de mediadores. A continuación, el transductor de señales (c) convierte la señal eléctrica en la concentración de glucosa en tiempo real, que es proporcional a la cantidad de electrones transferidos.

Además de los sensores electroquímicos descritos anteriormente, también están disponibles sensores fotométricos. La diferencia aquí es que los electrones de la glucosa se transfieren al tinte indicador redox (que sirve como indicador). El cambio de color resultante del tinte reducido se mide fotométricamente.

Otra aplicación principal podría ser el uso de GOx en el compartimento anódico de las pilas de biocombustible implantadas y miniaturizadas que queman glucosa de la circulación sanguínea y, de este modo, suministran energía a dispositivos o bombas de diagnóstico en miniatura.

Además, las aplicaciones de GOx en la industria alimentaria son numerosas, puesto que se puede utilizar su capacidad de generar peróxido de hidrógeno, que tiene un efecto antimicrobiano, para mejorar la estabilidad en almacenamiento de determinados productos alimenticios, incluyendo, por ejemplo, queso, mantequilla y zumo de fruta.

Las aplicaciones de GOx en composiciones cosméticas también pueden utilizar las propiedades antimicrobianas. Se sugirieron usos potenciales de hexosa oxidasas en composiciones farmacéuticas y cosméticas, por ejemplo, en los documentos US 6.924.366; US 6.251.626 y WO 2007/045251 A2.

Además, se sugiere un uso de GOx en la producción de plantas transgénicas y otros organismos con susceptibilidad reducida o resistencia incrementada a plagas o enfermedades (véase, por ejemplo, el documento WO 1995/021924).

Sin embargo, el uso de GOx en biosensores de glucosa es de significativo interés de acuerdo con la presente invención. A este respecto, el documento WO 2009/104836 A1 describe un sensor de glucosa que comprende una variante de GOx genomanipulada mejorada para su fijación a superficies de metal.

Zhu et al. describieron en 2006 y 2007 mutantes de una GOx derivada de *Aspergillus niger*, que está mutada en T30V e/o I94V. Por tanto, también se ha descrito el doble mutante T30V; I94V correspondiente [Zhu, Z., Momeu, C., Zakhartsev, M., y Schwaneberg, U. (2006). *Making glucose oxidase fit for biofuel cell applications by directed protein evolution. Biosensors and Bioelectronics* 21, 2046-2051; Zhu, Z., Wang, M., Gautam, A., Nazor, J., Momeu, C., R, P., y U, S. (2007). *Directed evolution of glucose oxidase from Aspergillus niger for ferrocenemethanol-mediated electron transfer. Biotechnology Journal* 2, 241-248] (a continuación en el presente documento Zhu et al. (2006/2007)).

Específicamente, el doble mutante mencionado anteriormente que tiene las sustituciones T30V e I94V tiene actividad enzimática ligeramente incrementada (k_{cat} de 69,5/s a 137,7/s), presenta una termoestabilidad incrementada en el intervalo de 58 °C a 62 °C, y una estabilidad con respecto al pH mejorada en el intervalo de 8 a 11 en comparación con GOx-WT. Sin embargo, dicho doble mutante derivado de *Aspergillus niger* presenta iguales tasas de consumo de oxígeno en comparación con la GOx-WT.

El documento EP 2 415 863 A1 describe moléculas de ácido nucleico y polipéptidos de las mismas que tienen actividad GOx, pero que están mutadas en al menos tres de las siguientes posiciones de aminoácido 2, 13, 30, 94 y 152. En particular, la variante M12 del documento EP 2 415 863 A1, que tiene las sustituciones N2Y, K13E, T30V, I94V y K152R, muestra, además de un nivel de expresión incrementado en *Saccharomyces cerevisiae*, una actividad doblemente incrementada para oxígeno como aceptador de electrones.

Horaguchi *et al.* [Horaguchi, Y., Saito, S., Ferri, S., Mori, K., Kojima, K., Tsugawa, W., y Sode, K. (2012). *Turning Glucose Oxidase into Essentially Dehydrogenase*. *Meet. Abstr.*, volumen MA2012-02, número 18, páginas 2057] identificaron en 2012 una posición de residuo de aminoácido que está implicada en la semirreacción oxidativa de las variantes de GOx descritas en el mismo, que es la GOx de *Penicillium amagasakiense* y la variante de GOx de *Aspergillus niger*. Dicha posición es S114 de la variante de GOx de *Penicillium amagasakiense*, y la T110 correspondiente de la variante de *Aspergillus niger*. Ambas posiciones se reemplazaron por el aminoácido alanina, lo que dio lugar a una disminución de la actividad para oxígeno como aceptador de electrones. Por ejemplo, la variante de GOx de *Aspergillus niger* presentó un consumo de oxígeno reducido 6,6 veces y, por tanto, tenía una actividad para oxígeno residual de un 30,4 %, además de una actividad para mediador de un 363 %.

Problema subyacente de la invención

Las GDH que son inespecíficas para glucosa y las GOx dependientes del oxígeno representan las enzimas clave de los sistemas de medición de glucosa actuales.

Con el contexto de la presente divulgación, las expresiones "inespecífica para glucosa", "dependiente del oxígeno" y "dependencia del oxígeno" tienen el significado como se expone en la sección Definiciones.

Solución al problema subyacente por la invención

La solución al problema subyacente de la invención es la provisión de variantes de GOx específicamente modificadas y, por tanto, optimizadas derivadas del hongo *Aspergillus niger*.

De forma sorprendente e inesperada, los inventores han descubierto variantes de GOx novedosas derivadas de *Aspergillus niger* que son específicas para glucosa, pero independientes del oxígeno para la oxidación de glucosa y, por tanto, más exactas para las mediciones de glucosa.

Además, la presente invención, de forma sorprendente e inesperada, proporciona variantes de GOx novedosas que son específicas para glucosa y, de este modo, presentan tasas de consumo de oxígeno significativamente reducidas y/o actividad para mediador significativamente incrementada para mediadores de electrones distintos del oxígeno.

La materia objeto de la presente invención son variantes de GOx novedosas que tienen, además de las dos sustituciones T30V e I94V de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, adicionalmente al menos una sustitución aminoacídica en cualquiera de las cinco posiciones seleccionadas del grupo S53; A173; A332; F414; y V560.

En el contexto de la presente divulgación, las expresiones "especificidad enzimática para glucosa" o "específica para glucosa" indican la actividad de las GOx proporcionadas en el presente documento para el sustrato glucosa de > 99,5 %, o > 99,9 %, en particular, un 100 %, cuando se determina por el ensayo de mediador como se explica en Materiales y procedimientos en el punto ff). Por implicación, la actividad residual de las GOx proporcionadas en el presente documento para azúcares distintos de glucosa, tales como galactosa, maltosa, xilosa y maltotriosa, es < 6 %, cuando se determina por el ensayo de mediador como se explica en la sección Materiales y procedimientos en el punto ff).

En el contexto de la presente divulgación, la expresión "tasas de consumo de oxígeno significativamente reducidas" indica, para las variantes de GOx proporcionadas en el presente documento un contenido de oxígeno residual de > 95 % durante un periodo de tiempo de 3 min cuando la dependencia del oxígeno se determina indirectamente por la oxidación del sustrato cromógeno ABTS en virtud del ensayo de ABTS explicado en la sección Materiales y procedimientos en el punto gg).

En el contexto de la presente divulgación, las expresiones "actividad para oxígeno significativamente reducida" o "actividad significativamente reducida para oxígeno como aceptador de electrones" indican una actividad GOx caracterizada por una actividad para oxígeno residual ≤ 30 %, o < 25 %, o < 20 %, en particular, < 15 %, o ≤ 10 %, cuando se determina por el ensayo de ABTS como se explica en la sección Materiales y procedimientos en el punto

gg).

En el contexto de la presente divulgación, las expresiones "actividad para mediador significativamente incrementada" o "actividad significativamente incrementada para mediadores de electrones distintos del oxígeno" indican una actividad GOx caracterizada por al menos una actividad incrementada 1,5 veces para mediadores de electrones distintos del oxígeno de la de la glucosa oxidasa de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 cuando se determina por el ensayo de mediador como se explica en la sección Materiales y procedimientos en el punto ff).

Las variantes de GOx, por tanto, optimizadas de la invención son adecuadas para implementarse en sistemas de medición de glucemia mejorada.

Breve descripción de la invención

De forma sorprendente e inesperada, los inventores descubrieron el doble mutante T30V; I94V de GOx (a continuación en el presente documento abreviado GOx-T30V; I94V) como se describe en Zhu *et al.* (2006; 2007), adecuado como base para otra(s) sustitución/sustituciones aminoacídica(s) específica(s) para obtener variantes de GOx independientes del oxígeno que tienen una actividad oxidasa significativamente reducida y simultáneamente una actividad deshidrogenasa significativamente incrementada mientras que permanecen específicas para el sustrato glucosa. Además, los inventores descubrieron variantes de GOx de acuerdo con la invención que presentan adicional o únicamente una actividad para mediador significativamente incrementada para mediadores de electrones distintos del oxígeno. A este respecto, los inventores también descubrieron variantes de GOx de acuerdo con la invención que aceptan determinados mediadores de electrones distintos del oxígeno para la transferencia de electrones. Por tanto, las variantes de GOx de acuerdo con la invención son adecuadas para mediciones de glucosa mejoradas, en particular, para mediciones de glucemia mejoradas.

Con el contexto de la presente divulgación, la expresión "acepta determinados mediadores de electrones distintos del oxígeno para la transferencia de electrones" indica la capacidad de las variantes de GOx proporcionadas en el presente documento de interactuar y, por tanto, aceptar mediadores seleccionados del grupo que comprende nitrosoanilinas y derivados de las mismas, compuestos azoicos, fenazinas y derivados de las mismas, fenotiazinas y derivados de las mismas, fenoxazinas y derivados de las mismas, ferrocenos y derivados de los mismos, ferricianuro de potasio, complejos de Ru y Os, quinonas y derivados de las mismas, indofenoles, viológenos, tetraiafulvaleno y derivados del mismo, y ftalocianinas para la transferencia de electrones mediada.

La presente invención se refiere a variantes de GOx derivadas de *Aspergillus niger* que tienen, además de las dos sustituciones T30V e I94V de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, adicionalmente al menos una sustitución aminoacídica en cualquiera de las cinco posiciones seleccionadas del grupo S53; A173; A332; F414; y V560.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a variantes de GOx derivadas de *Aspergillus niger* que tienen, además de las dos sustituciones T30V e I94V de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, adicionalmente al menos una sustitución aminoacídica en cualquiera de las cuatro posiciones seleccionadas del grupo A173; A332; F414; y V560.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a variantes de GOx que tienen al menos dos, o tres, o cuatro, o cinco sustituciones aminoacídicas cooperativas, y, por tanto, diversas en cualquiera de las cinco posiciones seleccionadas del grupo S53; A173; A332; F414; y V560 de la GOx de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, lo que da lugar a una disminución significativa de las tasas de consumo de oxígeno.

Además, la presente invención se refiere a variantes de GOx que tienen al menos dos, o tres, o cuatro, o cinco sustituciones aminoacídicas cooperativas, y, por tanto, diversas en cualquiera de las cinco posiciones seleccionadas del grupo S53; A173; A332; F414; y V560 de la GOx de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, lo que da lugar a una disminución significativa de las tasas de consumo de oxígeno y/o un incremento significativo de la actividad para mediador para determinados mediadores de electrones distintos del oxígeno.

Por tanto, los inventores de la presente invención han podido proporcionar variantes de GOx, la actividad oxidasa de las cuales está significativamente reducida en comparación con la GOx-WT y el GOx-T30V; I94V de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, mientras que, al mismo tiempo, la actividad deshidrogenasa de la enzima está significativamente incrementada en comparación con la GOx-WT y el GOx-T30V; I94V.

A este respecto, otro hallazgo inesperado y sorprendente es que las sustituciones aminoacídicas específicas en las posiciones F414 y V560 reduzcan significativamente las tasas de consumo de oxígeno de las variantes de GOx proporcionadas en el presente documento, en comparación con la GOx-WT y el GOx-T30V; I94V en el ensayo de ABTS como se explica en la sección Materiales y procedimientos en el punto gg). Los aminoácidos adecuados para dichas sustituciones son Ile, Leu, Met, Val para la posición F414, y Leu, Pro, Thr para la posición V560. Como otro hallazgo inesperado y sorprendente, las sustituciones aminoacídicas específicas en ambas posiciones F414 y V560 en combinación, además de las dos sustituciones T30V e I94V en las variantes de GOx proporcionadas en el presente documento, incrementan significativamente la actividad para mediador para mediadores de electrones distintos del oxígeno en comparación con el GOx-T30V; I94V. Los aminoácidos adecuados para dichas sustituciones son Ile, Leu,

Met, Val para la posición F414 y Leu, Pro, Thr para la posición V560.

Como otro hallazgo, la presente invención revela que cada una de las posiciones A173 y A332, además de las dos sustituciones T30V e I94V en las variantes de GOx proporcionadas en el presente documento, da lugar, en general, a un incremento de la actividad GOx en comparación con la GOx-WT y el GOx-T30V; I94V. Los aminoácidos adecuados para dichas sustituciones son Ile, Thr y Val para la posición A173, y Ser, Val, Thr para la posición A332.

Por lo tanto, la presente invención posibilita al experto en la técnica obtener variantes de GOx que tengan tasas de consumo de oxígeno significativamente reducidas.

Además, la presente invención posibilita al experto en la técnica obtener variantes de GOx que tengan tasas de consumo de oxígeno significativamente reducidas y/o actividad para mediador significativamente incrementada para determinados mediadores de electrones distintos del oxígeno, individualmente o bien para ambos rasgos característicos en combinación por medio de sustitución/sustituciones aminoacídica(s) específica(s).

Descripción detallada de la invención

Los diabéticos necesitan mediciones de glucemia exactas durante su vida diaria. Como se explica en la sección Antecedentes científicos, los sistemas de medición enzimáticos existentes se basan en GOx dependientes del oxígeno y GDH que son inespecíficas para glucosa.

En la GOx-WT de *Aspergillus niger*, la actividad oxidasa es aproximadamente de tres a cuatro veces mayor que su actividad deshidrogenasa. En consecuencia, cuando está presente oxígeno disuelto en un sistema de ensayo para glucemia, los electrones generados durante la oxidación del sustrato glucosa también se transferirán al oxígeno. Por tanto, la actividad enzimática medida en presencia de un mediador de electrones se puede ver afectada por la concentración de oxígeno disuelto. Sin embargo, la GOx-WT de *Aspergillus niger* es específica para glucosa y presenta suficiente estabilidad con respecto a la temperatura.

En cambio, las GDH son resistentes al oxígeno disuelto en las muestras de sangre, pero no son lo suficientemente específicas para glucosa y, por tanto, también se pueden ver afectadas por otros tipos de azúcar presentes en la muestra de sangre como, por ejemplo, maltosa, galactosa, xilosa y maltotriosa.

Fue un objetivo de la presente invención eliminar los efectos del oxígeno disuelto durante las mediciones de glucemia en base a GOx mientras se conservaban e incrementaban además sus propiedades ventajosas.

Por tanto, los inventores de la presente invención han podido proporcionar variantes de GOx, la actividad oxidasa de las cuales está significativamente reducida en comparación con la GOx-WT y el GOx-T30V; I94V de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, mientras que, al mismo tiempo, la actividad deshidrogenasa de la enzima está significativamente incrementada en comparación con la GOx-WT y el GOx-T30V; I94V.

Como se usa en el presente documento, la "actividad oxidasa" es la actividad enzimática de las variantes de GOx proporcionadas en el presente documento para catalizar la oxidación de glucosa para generar gluconolactona utilizando oxígeno como un aceptador de electrones. La "actividad oxidasa" se puede someter a ensayo midiendo la cantidad de H₂O₂ generada por cualquier procedimiento conocido en la técnica. Por ejemplo, la "actividad oxidasa" se puede someter a ensayo por reactivos para la detección de H₂O₂, tal como 4AA/TODB/POD (sal disódica de 4-aminoantipirina(N,N-bis(4-sulfobutil)-3-metilalanina/peroxidasa de rábano picante) o por electrodo de Pt. Como se usa en el presente documento en el contexto de la actividad relativa o cuantitativa, la actividad oxidasa se define específicamente como la cantidad en moles del sustrato (glucosa) oxidado por unidad de tiempo medida por la cantidad de H₂O₂ generada a 25 °C en PPB 10 mM, pH 7,0, TODB 1,5 mM, 2 U/ml de peroxidasa de rábano picante (POD) y 4-aminoantipirina (4AA) 1,5 mM. Se puede medir espectrofotométricamente la formación de tinte de quinoneimina a 546 nm.

Como se usa en el presente documento, la "actividad deshidrogenasa" es una actividad enzimática de las variantes de GOx proporcionadas en el presente documento para catalizar la oxidación de glucosa para generar gluconolactona utilizando un mediador de electrones distinto del oxígeno como un aceptador de electrones. La "actividad deshidrogenasa" se puede someter a ensayo midiendo la cantidad de electrones transferidos al mediador distinto del oxígeno usado.

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

Con el contexto de la presente divulgación, las expresiones "mediador(es) de electrones" y "mediador(es) distinto(s) del oxígeno" indican una pequeña sustancia química orgánica o inorgánica que puede existir tanto en una forma oxidada como en una reducida, y que reacciona rápidamente para donar o recibir electrones. En particular, las

expresiones "mediador(es) de electrones" y "mediador(es) distinto(s) del oxígeno" indican pequeñas sustancias químicas orgánicas o inorgánicas, que son un aceptador de electrones para glucosa y, de este modo, que se convierten de la forma oxidada en la reducida. Después de esto, dicho mediador transfiere los electrones en forma reducida a un electrodo de trabajo para la medición de glucosa electroquímica o bien a una molécula indicadora para la medición colorimétrica en un sistema de ensayo para glucemia. Algunos aceptadores de electrones actúan como una molécula indicadora por sí mismos y se pueden usar directamente para la medición colorimétrica de glucosa (véase, por ejemplo, el documento EP 8 313 27).

En un aspecto específico de la invención, el mediador de electrones o mediador distinto del oxígeno se selecciona del grupo que comprende nitrosoanilinas y derivados de las mismas, compuestos azoicos, fenazinas y derivados de las mismas, fenotiazinas y derivados de las mismas, fenoxazinas y derivados de las mismas, ferrocenos y derivados de los mismos, ferricianuro de potasio, complejos de Ru y Os, quinonas y derivados de las mismas, indofenoles, viológenos, tetraiafulvaleno y derivados del mismo, y ftalocianinas.

En otro aspecto más específico de la invención, el mediador de electrones o mediador distinto del oxígeno se selecciona del grupo que comprende quinonas, tales como, por ejemplo, fenantrendionas, 1,4-diaminoantraquinona y complejos metálicos de fenantrendiona, y nitrosoanilinas, tales como, por ejemplo, N,N-bis(2-hidroxietil)-4-nitrosoanilina o N,N-bis(2-hidroxietil)-2-metoxi-4-nitrosoanilina. Cualquiera de las dos últimas nitrosoanilinas se denominará a continuación en el presente documento "mediador de nitrosoanilina".

Dichos mediadores de electrones como se menciona anteriormente se han descrito exhaustivamente, por ejemplo, en los documentos US 5.393.615; US 5.498.542; US 5.520.786; WO 2009/129108; US 2009/0095642; WO 93/25898; JP 57-128678; EP 0 441 222 y en *PrevotEAU, A. et al., Electrochemistry Communications (2010), 12(2), 213-215; Berchmans, S. et al., Materials Chemistry and Physics (2003), 77(2), 390-396.*

Son especialmente adecuados para la materia objeto de la presente divulgación mediadores de electrones que se reducen rápidamente con FADH₂, pero que se reducen lentamente o no se reducen con ácidos ascórbicos; dichos mediadores son, por ejemplo, derivados de 2-[4-(dimetilamino)fenil]-diazencarboxamida.

Otro uso de los procedimientos descritos en el presente documento para generar variantes de GOx independientes del oxígeno "a medida" es adaptar la variante de GOx respectiva a un mediador inmovilizado.

A este respecto, el término "a medida" significa que la secuencia de polipéptidos de la variante de GOx respectiva de la invención posibilita que la GOx interactúe y, por tanto, acepte electrones de un determinado mediador inmovilizado.

La expresión "determinado mediador inmovilizado" indica un mediador de electrones o mediador distinto del oxígeno seleccionado del grupo que comprende nitrosoanilinas y derivados de las mismas, compuestos azoicos, fenazinas y derivados de las mismas, fenotiazinas y derivados de las mismas, fenoxazinas y derivados de las mismas, ferrocenos y derivados de los mismos, ferricianuro de potasio, complejos de Ru y Os, quinonas y derivados de las mismas, indofenoles, viológenos, tetraiafulvaleno y derivados del mismo, y ftalocianinas.

En otro aspecto muy específico de la presente divulgación, los mediadores del grupo de nitrosoanilinas, en particular, del grupo de p-nitrosoanilinas o derivados de las mismas, y, en particular, los mediadores de nitrosoanilina o derivados de la misma son preferentes como mediadores de electrones de acuerdo con la invención. En general, los mediadores del grupo de nitrosoanilinas reaccionan *in situ*, por ejemplo, en una tira reactiva con glucosa y la GOx para formar una especie que actúa como mediador de electrones. Se describen en detalle nitrosoanilinas con el contexto de mediciones de glucosa y actividad para mediador en *Hönes, J., Müller, P. y SurrIDGE, N. (2008). The Technology Behind Glucose Meters: Test Strips. Diabetes Technology & Therapeutics 10, 10-26; y en el documento EP 0 354 441.*

El listado anterior no debe estar limitado a mediadores distintos del oxígeno de acuerdo con la invención, ya que también otros mediadores de electrones disponibles comercialmente conocidos por el experto en la técnica están comprendidos completamente por la presente divulgación.

En otro aspecto muy específico de la presente divulgación, las variantes de GOx de acuerdo con las secuencias de la SEQ ID NO: 2 a la SEQ ID NO: 9 presentan al menos una actividad para mediador de un 150 % para el mediador N,N-bis(2-hidroxietil)-4-nitrosoanilina en comparación con la actividad para mediador respectiva del GOx-T30V; I94V de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, cuando se determina por el ensayo de mediador como se explica en la sección Materiales y procedimientos en el punto ff).

En otro aspecto muy específico de la presente divulgación, las variantes de GOx que tienen, además de las dos sustituciones T30V e I94V de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, las sustituciones aminoácidas adicionales

- A173V; A332S; F414Y; y V560A o

- A173V; A332S; y F414Y,

presentan al menos una actividad para mediador de un 150 % para el mediador N,N-bis(2-hidroxi-etil)-2-metoxi-4-nitrosoanilina en comparación con la actividad para mediador respectiva del GOx-T30V; I94V de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, cuando se determina por el ensayo de mediador como se explica en la sección Materiales y procedimientos en el punto ff).

5 Las sustituciones anteriores

• A173V; A332S; F414Y; y V560A o

10 • A173V; A332S; y F414Y

además de las dos sustituciones T30V e I94V de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, reflejan otra característica de las variantes de GOx proporcionadas en el presente documento, a saber, la capacidad de aceptar determinados mediadores de electrones distintos del oxígeno para la transferencia de electrones, en este caso, el mediador N,N-bis(2-hidroxi-etil)-2-metoxi-4-nitrosoanilina.

15 Con este contexto, la expresión "determinado(s) mediador(es) de electrones distinto(s) del oxígeno" indica un mediador de electrones o mediadores de electrones distintos del oxígeno seleccionados del grupo que comprende nitrosoanilinas y derivados de las mismas, compuestos azoicos, fenazinas y derivados de las mismas, fenotiazinas y derivados de las mismas, fenoxazinas y derivados de las mismas, ferrocenos y derivados de los mismos, ferricianuro de potasio, complejos de Ru y Os, quinonas y derivados de las mismas, indofenoles, viológenos, tetratiafulvaleno y derivados del mismo, y ftalocianinas.

20 En el **primer aspecto**, la presente invención se refiere a la materia objeto de

25 una glucosa oxidasa de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, seleccionada del grupo que consiste en

30 a) una glucosa oxidasa de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, que tiene, además de las dos sustituciones aminoacídicas T30V e I94V, al menos una sustitución aminoacídica adicional en cualquiera de las cinco posiciones seleccionadas del grupo S53; A173; A332; F414; V560 en dicha SEQ ID NO: 1; o

35 b) una glucosa oxidasa que presenta al menos un 70 %, en particular, al menos un 80 %, o > 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos con respecto a la glucosa oxidasa de acuerdo con a) siempre que la glucosa oxidasa de b) tenga, además de las dos sustituciones aminoacídicas T30V e I94V, al menos una sustitución aminoacídica adicional en cualquiera de las cinco posiciones seleccionadas del grupo S53; A173; A332; F414; V560 de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, y siempre que la glucosa oxidasa de acuerdo con b) presente al menos un 70 %, en particular, al menos un 80 %, o > 90 % de la actividad enzimática de la glucosa oxidasa de acuerdo con a), y presente al menos un 70 %, en particular, al menos un 80 %, o > 90 % de la especificidad enzimática para glucosa de la glucosa oxidasa de acuerdo con a),

40 y siempre que la glucosa oxidasa de acuerdo con b) presente al menos una actividad reducida 5 veces para oxígeno como aceptador de electrones de la glucosa oxidasa de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 o presente al menos una actividad incrementada 1,5 veces para mediadores de electrones distintos del oxígeno de la glucosa oxidasa de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, o ambas; o

45 c) un fragmento activo de una glucosa oxidasa de acuerdo con a) o b), siempre que en el fragmento activo de acuerdo con c) las sustituciones aminoacídicas como se explica en a) o b) se conserven en comparación con la glucosa oxidasa de acuerdo con a) o b),

50 y siempre que la glucosa oxidasa de acuerdo con c) presente al menos un 70 %, en particular, al menos un 80 %, o > 90 % de la actividad enzimática de la glucosa oxidasa de acuerdo con a), y presente al menos un 70 %, en particular, al menos un 80 %, o > 90 % de la especificidad enzimática para glucosa de la glucosa oxidasa de acuerdo con a),

55 y siempre que la glucosa oxidasa de acuerdo con c) presente al menos una actividad reducida 5 veces para oxígeno como aceptador de electrones de la glucosa oxidasa de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 o presente al menos una actividad incrementada 1,5 veces para mediadores de electrones distintos del oxígeno de la glucosa oxidasa de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, o ambas; y en la que los aminoácidos para sustitución/sustituciones adicional(es) se seleccionan del grupo

60 Phe para la posición S53; e/o

Ile, Thr, Val para la posición A173; y/o

Ser, Val, Thr para la posición A332; e/o

65 Ile, Leu, Met, Val para la posición F414; y/o

Leu, Pro, Thr, para la posición V560.

En el contexto de la presente memoria descriptiva, las expresiones "modificación/modificaciones adicional(es) en la secuencia de aminoácidos" y "sustitución/sustituciones aminoacídica(s) adicional(es)" indican una sustitución de al menos un aminoácido con cualquiera de Phe para la posición S53 e/o Ile, Thr, Val para la posición A173; y/o Ser, Val, Thr para la posición A332; e/o Ile, Leu, Met, Val para la posición F414; y/o Leu, Pro, Thr, para la posición V560, de acuerdo con la SEQ ID NO: 1. Además, las expresiones anteriores también engloban sustituciones aminoacídicas cooperativas con cualquiera de Phe para la posición S53 e/o Ile Thr, Val para la posición A173; y/o Ser, Val, Thr para la posición A332; e/o Ile, Leu, Met, Val para la posición F414; y/o Leu, Pro, Thr, para la posición V560, o equivalentes químicos de los mismos, siempre que al menos dos, o tres, o cuatro, o cinco posiciones estén sustituidas en cualquiera de las posiciones seleccionadas del grupo S53; A173; A332; F414; y V560 de acuerdo con la SEQ ID NO: 1.

El término "actividad enzimática" en relación con las variantes de GOx de la invención especifica una proteína que cataliza la oxidación de beta-D-glucosa en D-glucono-1,5-lactona (D-glucosa + O₂ → gluconolactona + H₂O₂), que, a continuación, se puede hidrolizar a ácido glucónico.

En un **segundo aspecto**, la presente invención se refiere a la materia objeto de los siguientes modos de realización que especifican el primer aspecto de la invención:

En un aspecto, la materia objeto de la presente invención es una variante de GOx de acuerdo con el primer aspecto de la invención, en la que

- dicha actividad para oxígeno como aceptador de electrones se determina por el ensayo de ABTS, que comprende las etapas de

- a) se transfieren 75 µl de solución de enzima de muestra a una microplaca de fondo plano de 96 pocillos que contiene 100 µl de tampón fosfato (pH 7)

- b) se añaden 20 µl de mezcla de reacción a cada pocillo, dando como resultado las siguientes concentraciones: 0,91 U/ml de HRP (peroxidasa de rábano picante); ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) 2,3 mM

- c) la reacción comienza añadiendo 25 µl de solución de sustrato de glucosa y posterior agitación de la placa a 1000 rpm durante 30 s

- d) la oxidación de ABTS se determina cinéticamente a 414 nm usando un lector de microplacas

- dicha actividad para mediadores de electrones distintos del oxígeno se determina por un ensayo de mediador, que comprende las etapas de

- a) se transfieren 75 µl de muestra de solución de enzima a una microplaca de fondo plano de 96 pocillos

- b) se añaden 100 µl de solución de mediador (N,N-bis(2-hidroxietil)-4-nitrosoanilina 19,05 mM); polivinilpirrolidona al 5 % (p/p), pH 7, y 20 µl de ácido fosfomolibdico 25 mM

- c) la reacción comienza añadiendo 25 µl de solución de sustrato de glucosa y posterior agitación de la placa a 1000 rpm durante 1 min

- d) la cinética de la reducción de ácido fosfomolibdico se controla a 700 nm usando un lector de microplacas.

En otro aspecto que se relaciona con el aspecto anterior, los mediadores de electrones distintos del oxígeno se seleccionan del grupo que comprende nitrosoanilinas y derivados de las mismas, compuestos azoicos, fenazinas y derivados de las mismas, fenotiazinas y derivados de las mismas, fenoxazinas y derivados de las mismas, ferrocenos y derivados de los mismos, ferricianuro de potasio, complejos de Ru y Os, quinonas y derivados de las mismas, indofenoles, viológenos, tetratiafulvaleno y derivados del mismo, y ftalocianinas.

En otro aspecto que se relaciona con el aspecto anterior, la materia objeto de la presente invención es una variante de GOx, que tiene, además de las dos sustituciones T30V e I94V de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, dos, o tres, o cuatro, o cinco sustituciones aminoacídicas adicionales en cualquiera de las seis posiciones seleccionadas del grupo S53; A173; A332; F414; V560 de acuerdo con la SEQ ID NO: 1.

En otro aspecto que se relaciona con el aspecto anterior, la presente invención proporciona una variante de GOx, en la que los aminoácidos para dicha(s) sustitución/sustituciones adicional(es) se seleccionan del grupo Phe para la posición S53 e/o Ile, Thr, Val para la posición A173; y/o Ser, Val, Thr para la posición A332; e/o Ile, Leu, Met, Val para la posición F414; y/o Leu, Pro, Thr, para la posición V560, de acuerdo con la SEQ ID NO: 1.

- 5 En otro aspecto que se relaciona con cualquiera de los aspectos anteriores, la presente invención proporciona variantes de GOx, en las que, además de las sustituciones T30V e I94V de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, al menos una sustitución aminoacídica adicional en la(s) posición/posiciones F414 y/o V560 se combina(n) con al menos una sustitución aminoacídica en la(s) posición/posiciones A173 y/o A332.
- 10 En otro aspecto que se relaciona con cualquiera de los aspectos anteriores, la presente invención proporciona una variante de GOx de acuerdo con la SEQ ID NO: 4, que tiene, además de las sustituciones T30V e I94V de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, las sustituciones aminoacídicas adicionales A173I; A332S; y F414L.
- 15 En otro aspecto que se relaciona con cualquiera de los aspectos anteriores, la presente invención proporciona una variante de GOx de acuerdo con la SEQ ID NO: 6, que tiene, además de las sustituciones T30V e I94V de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, las sustituciones aminoacídicas adicionales A173V; A332N; F414V; y V560L.
- 20 En otro aspecto que se relaciona con cualquiera de los aspectos anteriores, la presente invención proporciona una variante de GOx, que tiene una actividad reducida al menos 5 veces para oxígeno como aceptador de electrones en comparación con la GOx natural de *Aspergillus niger* y/o en comparación con la GOx de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 por medio del ensayo de ABTS, que comprende las etapas de
- 25 a.) se transfieren 75 µl de solución de enzima de muestra a una microplaca de fondo plano de 96 pocillos que contiene 100 µl de tampón fosfato (pH 7)
- b.) se añaden 20 µl de mezcla de reacción a cada pocillo, dando como resultado las siguientes concentraciones: 0,91 U/ml de HRP (peroxidasa de rábano picante); ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) 2,3 mM
- 30 c.) la reacción comienza añadiendo 25 µl de solución de sustrato de glucosa y posterior agitación de la placa a 1000 rpm durante 30 s
- d.) la oxidación de ABTS se determina cinéticamente a 414 nm usando un lector de microplacas.
- 35 En otro aspecto que se relaciona con cualquiera de los aspectos anteriores, la presente invención proporciona una variante de GOx, con lo que dicha variante de GOx presenta una actividad incrementada al menos 1,5 veces para mediadores distintos del oxígeno en comparación con la GOx de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, cuando se determina por el ensayo de mediador, que comprende las etapas de
- 40 a.) se transfieren 75 µl de muestra de solución de enzima a una microplaca de fondo plano de 96 pocillos
- b.) se añaden 100 µl de solución de mediador (N,N-bis(2-hidroxi-etil)-4-nitrosoanilina 19,05 mM); polivinilpirrolidona al 5 % (p/p), pH 7, y 20 µl de ácido fosfomolibdico 25 mM
- 45 c.) la reacción comienza añadiendo 25 µl de solución de sustrato de glucosa y posterior agitación de la placa a 1000 rpm durante 1 min
- d.) la cinética de la reducción de ácido fosfomolibdico se controla a 700 nm usando un lector de microplacas.
- 50 En otro aspecto que se relaciona con cualquiera de los aspectos anteriores, la presente invención proporciona una variante de GOx, que presenta una especificidad para glucosa de al menos un 99,9 % y/o una especificidad para galactosa < 4 % y/o una especificidad para maltosa < 0,3 % y/o una especificidad para xilosa < 6 % y/o una especificidad para maltotriosa < 0,1 %, cuando se determina por el ensayo de mediador, que comprende las etapas de
- 55 a.) se transfieren 75 µl de muestra de solución de enzima a una microplaca de fondo plano de 96 pocillos
- b.) se añaden 100 µl de solución de mediador (N,N-bis(2-hidroxi-etil)-4-nitrosoanilina 19,05 mM); polivinilpirrolidona al 5 % (p/p), pH 7, y 20 µl de ácido fosfomolibdico 25 mM
- 60 c.) la reacción comienza añadiendo 25 µl de la solución de sustrato de azúcar respectiva y posterior agitación de la placa a 1000 rpm durante 1 min
- d.) la cinética de la reducción de ácido fosfomolibdico se controla a 700 nm usando un lector de microplacas.
- 65 En el contexto de la presente divulgación, la expresión "específica para glucosa o específica para el sustrato glucosa" indica la actividad de las GOx proporcionadas en el presente documento para el sustrato glucosa de un 100 %, cuando

se determina por el ensayo de mediador como se explica en la sección Materiales y procedimientos a continuación. Por implicación, la actividad residual de las GOx proporcionadas en el presente documento para azúcares distintos de glucosa, tales como galactosa, maltosa, xilosa y maltotriosa, es < 6 %, cuando se determina por el ensayo de mediador como se explica en la sección Materiales y procedimientos en el punto ff).

5 En otro aspecto que se relaciona con cualquiera de los aspectos anteriores, la presente invención proporciona variantes de GOx, que presentan una actividad de > 400 %, o > 500 %, o > 600 % para mediador de nitrosoanilina para la transferencia de electrones en comparación con la actividad para mediador de nitrosoanilina de la GOx de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 por medio del ensayo de mediador, que comprende las etapas de

10 a.) se transfieren 75 µl de muestra de solución de enzima a una microplaca de fondo plano de 96 pocillos

15 b.) se añaden 100 µl de solución de mediador (N,N-bis(2-hidroxietil)-4-nitrosoanilina 19,05 mM); polivinilpirrolidona al 5 % (p/p), pH 7, y 20 µl de ácido fosfomolibdico 25 mM

c.) la reacción comienza añadiendo 25 µl de solución de sustrato de glucosa y posterior agitación de la placa a 1000 rpm durante 1 min

20 d.) la cinética de la reducción de ácido fosfomolibdico se controla a 700 nm usando un lector de microplacas.

y una actividad para oxígeno de ≤ 30 %, o < 25 %, o < 20 %, en particular, < 15 %, o ≤ 10 %, en comparación con la actividad para oxígeno de la GOx de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 por medio del ensayo de ABTS, que comprende las etapas de

25 a.) se transfieren 75 µl de solución de enzima de muestra a una microplaca de fondo plano de 96 pocillos que contiene 100 µl de tampón fosfato (pH 7)

30 b.) se añaden 20 µl de mezcla de reacción a cada pocillo, dando como resultado las siguientes concentraciones: 0,91 U/ml de HRP (peroxidasa de rábano picante); ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) 2,3 mM

c.) la reacción comienza añadiendo 25 µl de solución de sustrato de glucosa y posterior agitación de la placa a 1000 rpm durante 30 s

35 d.) la oxidación de ABTS se determina cinéticamente a 414 nm usando un lector de microplacas.

En otro aspecto, la materia objeto de la presente invención se relaciona con un polinucleótido aislado que codifica una variante de GOx de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores o un fragmento activo de la misma.

40 En otro aspecto, la presente invención proporciona un equivalente/fragmento (funcional) activo de las variantes de GOx de acuerdo con la invención.

45 Las expresiones "equivalente(s)/fragmento(s) activo(s) de la misma" o "equivalente(s)/fragmento(s) funcional(es) de la misma" sinónima se refieren a cualquier variante de GOx modificada y, por tanto, optimizada de acuerdo con la presente invención, con lo que al menos un aminoácido está ausente o sustituido con otro aminoácido como en la secuencia correspondiente de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, con la condición de que dicho(s) equivalente(s)/fragmento(s) todavía presente(n) las propiedades esenciales con respecto a actividad enzimática, especificidad enzimática y las tasas de consumo de oxígeno significativamente reducidas y/o actividad significativamente incrementada para mediadores específicos distintos del oxígeno, teniendo presente al menos las sustituciones T30V e I94V de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, y teniendo además al menos una sustitución aminoacídica adicional en cualquiera de las posiciones seleccionadas del grupo que consiste en S53; A173; A332; F414; y V560 de acuerdo con la SEQ ID NO: 1.

55 En un aspecto específico de la presente invención, el/los equivalente(s)/fragmento(s) funcional(es) de las variantes de GOx de acuerdo con la invención engloba(n) secuencia(s) de aminoácidos que son al menos un 70 % homólogas, en particular, al menos un 80 % homólogas, o > 90 % homólogas con respecto a las secuencias de acuerdo con de la SEQ ID NO: 2 a la SEQ ID NO: 9.

60 En otro aspecto, la materia objeto de la presente invención se relaciona con un procedimiento de detección, determinación o medición de glucosa en una muestra *ex vivo* por una variante de GOx de acuerdo con la presente invención o un fragmento activo de la misma; comprendiendo dicha detección, determinación o medición poner en contacto una muestra *ex vivo* con dicha GOx o un fragmento activo de la misma.

65 En otro aspecto que se relaciona con el aspecto anterior, dicha detección, determinación o medición de glucosa se realiza usando un sensor o un dispositivo con tira reactiva.

La presente invención también se refiere a un procedimiento para producir las variantes de GOx de la presente

invención, a ácidos nucleicos que codifican dichas enzimas, a vectores, células huésped, y a un procedimiento de detección, determinación o medición de glucosa en una muestra usando dichas enzimas, y también a dispositivos que comprenden dichas enzimas.

5 En un aspecto específico, la presente invención proporciona un dispositivo para someter a ensayo glucosa en una muestra que comprende al menos una de las variantes de GOx de la invención y un mediador de electrones distinto del oxígeno.

10 En otro aspecto específico de la invención, el mediador de electrones o mediador distinto del oxígeno se selecciona del grupo que comprende nitrosoanilinas y derivados de las mismas, compuestos azoicos, fenazinas y derivados de las mismas, fenotiazinas y derivados de las mismas, fenoxazinas y derivados de las mismas, ferrocenos y derivados de los mismos, ferricianuro de potasio, complejos de Ru y Os, quinonas y derivados de las mismas.

15 Otro aspecto específico de la invención que se relaciona con la materia objeto de cualquiera de los aspectos anteriores es una variante de GOx, que tiene, además de las dos sustituciones T30V e I94V de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, al menos una sustitución aminoacídica adicional en cualquiera de las cuatro posiciones seleccionadas del grupo A173; A332; F414; V560 de la SEQ ID NO: 1.

20 Una de las principales aplicaciones de las variantes de GOx proporcionadas en el presente documento a la que están destinadas por la presente invención es su uso en tiras reactivas para controlar el nivel de glucemia en muestras *ex vivo* de diabéticos. Por supuesto, se pueden investigar muchas clases de muestras. En particular, los líquidos corporales, como sangre, suero y plasma, son las fuentes para dichas muestras.

25 Por tanto, en otro aspecto, la presente invención proporciona un electrodo con enzima que tiene al menos una de las variantes de GOx de la invención, que está inmovilizada en dicho electrodo.

30 En otro aspecto, la presente invención proporciona un sensor para enzima para someter a ensayo glucosa que comprende el electrodo con enzima de la invención como un electrodo de trabajo y, por tanto, que tiene al menos una de las variantes de GOx de la invención.

Aún en otro aspecto, la presente invención proporciona un kit para someter a ensayo glucosa en una muestra que comprende al menos una variante de GOx en virtud de la invención y un mediador de electrones distinto del oxígeno.

35 Se puede construir un kit para la medición de glucosa usando al menos una variante de GOx de la presente invención. Además de la variante de GOx de la invención, el kit contiene el tampón necesario para la medición, un mediador de electrones distinto del oxígeno apropiado, en particular, un mediador de nitrosoanilina y, si fuera necesario, enzimas tales como peroxidasas, y una solución patrón de glucosa para la preparación de una curva de calibración e instrucciones para su uso.

40 La concentración de la glucosa en una muestra se puede determinar midiendo la cantidad de electrones generados por la reacción enzimática. Se han conocido diversos sistemas de sensor en la técnica, incluyendo electrodo de carbono, electrodo de metal y electrodo de platino. La variante de GOx de la presente invención está inmovilizada en el electrodo. Los ejemplos de los medios de inmovilización incluyen reticulación, encapsulación en una matriz macromolecular, recubrimiento con una membrana de diálisis, polímero de reticulación óptica, polímero electroconductor, polímero de oxidación-reducción y cualquier combinación de los mismos.

45 El dispositivo de ensayo puede tener una estructura similar a cualquiera de las tiras reactivas de biosensores amperométricos convencionales disponibles comercialmente para controlar el nivel de glucemia. Un ejemplo de dicho dispositivo tiene dos electrodos (electrodo de trabajo y electrodo de referencia o contraelectrodo) situados en un sustrato aislante, una entrada de reactivo y un receptor de muestras. La entrada de reactivo contiene la variante de GOx de la invención y un mediador distinto del oxígeno. Cuando se añade una muestra, tal como una muestra de sangre, al receptor de muestras, la glucosa contenida en la muestra reaccionará con la variante de GOx, de este modo, la transferencia de electrones es indicativa de la cantidad de glucosa en la muestra. Los ejemplos típicos de sensores electroquímicos adecuados para la determinación de sustratos de enzima son conocidos, por ejemplo, a partir de los documentos WO 2004/113900 y US 5.997.817. Como alternativa a los sensores electroquímicos, se podrían usar tecnologías de detección óptica. Típicamente, dichos dispositivos ópticos se basan en cambios de color que se producen en un sistema de reactivo que comprende la enzima, un mediador de electrones y un indicador. Los cambios de color se pueden cuantificar usando mediciones de fluorescencia, absorción o remisión. Los ejemplos típicos de dispositivos ópticos adecuados para la determinación de sustratos de enzima son conocidos, por ejemplo, a partir de los documentos US 7.008.799; US 6.036.919 y US 5.334.508.

50 En otro aspecto, la presente invención proporciona un vector de expresión que contiene el polinucleótido aislado que codifica una variante de GOx de acuerdo con la invención o un fragmento activo de la misma.

65 En otro aspecto, la presente invención proporciona una célula huésped que comprende el vector de expresión que contiene el polinucleótido aislado que codifica una variante de GOx de acuerdo con la invención o un fragmento activo

de la misma, también denominada en el presente documento transformante.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para producir una variante de GOx de acuerdo con la invención o un fragmento activo de la misma, comprendiendo el procedimiento cultivar el transformante descrito anteriormente.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una variante de GOx de acuerdo con la invención o un fragmento activo de la misma obtenible mediante el procedimiento descrito anteriormente.

En otro aspecto específico, el vector de expresión proporcionado en el presente documento comprende preferentemente toda o una parte de una de las secuencias de ADN que codifican una variante de GOx de la presente invención.

Los vectores de expresión adecuados que contienen las secuencias codificantes y de control deseadas de las variantes de GOx proporcionadas en el presente documento se pueden construir usando técnicas de ADN recombinante estándar conocidas en la técnica, describiéndose muchas de ellas en Sambrook *et al.*, en "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (1989), Cold Spring Harbor, NY Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Las células huésped adecuadas incluyen, por ejemplo, HB101 de *E. coli* (ATCC 33694), disponible de Promega (2800, Woods Hollow Road, Madison, WI, EE. UU.), XL1-Blue MRF', disponible de Stratagene (11011, North Torrey Pine Road, La Jolla, CA, EE. UU.) y similares. Las células huésped de *Pichia* adecuadas incluyen, por ejemplo, X33 de *P. pastoris* o KM71H de *P. pastoris*, disponibles de Invitrogen (5791, Van Allan Way, Carlsbad, CA 92008, EE. UU.).

La producción recombinante de las variantes de GOx de acuerdo con la presente invención se puede realizar en huéspedes conocidos en la técnica. Los huéspedes adecuados se pueden seleccionar de cepas de hongos filamentosos como, por ejemplo, *Aspergillus niger*, *Aspergillus sojae* y *Aspergillus oryzae*. Los huéspedes adecuados se pueden seleccionar de cepas de levadura como, por ejemplo, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Hansenula polymorpha*.

En otro aspecto específico, las variantes de GOx o equivalentes funcionales de las mismas de acuerdo con la presente invención son obtenibles mediante expresión de un polinucleótido que codifica dichas variantes de GOx en levadura, en particular, en *Saccharomyces cerevisiae*.

Los vectores de expresión se pueden introducir en células huésped por diversos procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la transformación de células huésped 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 huésped, por ejemplo, electroporación, biobalística o fusión de protoplastos.

Una vez que se ha introducido un vector de expresión que contiene una variante de GOx en virtud de la invención en una célula huésped apropiada, la célula huésped se puede cultivar en condiciones que permitan la expresión de la variante de GOx deseada en virtud de la invención. Las células huésped que contienen el vector de expresión deseado (y, por tanto, que tienen la secuencia de ADN que codifica la variante de GOx en virtud de la invención) se pueden identificar fácilmente, por ejemplo, por selección de antibióticos o complementación de mutantes auxótrofos y selección de medio mínimo [J. Sambrook, D. W. Russell: "Molecular Cloning: a laboratory manual", 3.^a edición, Cold Spring Harbor, Nueva York (2001)]. La expresión de las variantes de GOx proporcionadas en el presente documento se puede identificar por diferentes procedimientos, como medir la producción de transcritos de ARNm con GOx, detectar inmunológicamente el producto génico o detectar la actividad enzimática del producto génico, conocidos por el experto en la técnica. En particular, se debe aplicar un ensayo enzimático como se explica en el ensayo de mediador en la sección Materiales y procedimientos en el punto ff). Además, las variantes de GOx proporcionadas en el presente documento se pueden identificar por las tasas de consumo de oxígeno significativamente reducidas de acuerdo con la invención cuando se determina por el ensayo de ABTS como se explica en la sección Materiales y procedimientos expuesta en el punto gg).

En otro aspecto de la invención, los polipéptidos descritos en el presente documento para las variantes de GOx según la invención son obtenibles mediante producción en células huésped que expresan una secuencia de ADN que codifica una de las variantes de GOx de la presente invención. Los polipéptidos de la presente invención también se pueden obtener por traducción *in vitro* del ARNm codificado por una secuencia de ADN que codifica una de las variantes de GOx de la presente invención. Por ejemplo, las secuencias de ADN se pueden insertar 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, enlazado de forma funcional a una secuencia promotora que puede promover su expresión en un sistema de síntesis de péptidos libre de células, representa otro aspecto específico de la presente invención.

Los polipéptidos producidos, por ejemplo, por procedimientos como se describe anteriormente, se pueden aislar y

purificar a continuación usando 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.

- 5 En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende al menos una variante de GOx de acuerdo con la invención o un fragmento activo de la misma.

En otro aspecto, las variantes de GOx de acuerdo con la invención retienen su propiedad inherente de ser específicas para el sustrato glucosa, pero, debido a la al menos una sustitución aminoacídica adicional en la secuencia de aminoácidos en posiciones específicas además de las sustituciones T30V e I94V acuerdo con la SEQ ID NO: 1, la máxima actividad para oxígeno residual se reduce a $\leq 30\%$, cuando se determina por el ensayo de ABTS como se explica en la sección Materiales y procedimientos en el punto gg). Simultáneamente, las GOx proporcionadas en el presente documento presentan una actividad enzimática de $> 400\%$, o $> 500\%$, o $> 600\%$ para mediadores de electrones distintos del oxígeno cuando se determina por el ensayo de mediador como se explica en la sección Materiales y procedimientos a continuación en el punto ff).

En vista de lo anterior, la presente invención combina en las variantes de GOx proporcionadas en el presente documento

20 i) las propiedades de especificidad para glucosa de las GOx

ii) con las propiedades de actividad enzimática independiente del oxígeno de las GDH por medio de un cambio de actividad oxidasa hacia actividad deshidrogenasa

25 iii) y opcionalmente una actividad incrementada para determinados mediadores de electrones distintos del oxígeno

para lograr mediciones de glucosa exactas, en particular, mediciones de glucemia exactas.

30 Con el contexto de las variantes de GOx en virtud de la presente invención, la expresión "cambio de actividad oxidasa hacia actividad deshidrogenasa" indica

• una disminución de la actividad para oxígeno comenzando a partir de 1,0 del GOx-T30V; I94V como referencia hacia $\leq 0,3$, o $< 0,25$, o $< 0,2$, en particular, $< 0,15$, o $\leq 0,1$ de actividad para oxígeno residual de las variantes de GOx en virtud de la invención cuando se determina por el ensayo de ABTS como se explica en las secciones Materiales y procedimientos en el punto gg) y

• un incremento simultáneo de la actividad deshidrogenasa comenzando a partir de una actividad para mediador de 1,0 del GOx-T30V; I94V como referencia hacia al menos 1,5 de actividad para mediador de las variantes de GOx en virtud de la invención cuando se determina por el ensayo de mediador como se explica en la sección Materiales y procedimientos en el punto ff).

45 Los valores anteriores representan la proporción (cociente) entre la actividad enzimática de las variantes de GOx de la invención en términos de actividad para oxígeno y actividad para mediador, y la actividad enzimática respectiva del GOx-T30V; I94V como referencias. La proporción (cociente) se basa en ambas actividades GOx (actividad para oxígeno y actividad para mediador en [U/mg]) cuando se determina por ELISA como se explica en la sección Materiales y procedimientos en el punto ee).

50 Cada una de las moléculas de ácido nucleico de acuerdo con las secuencias de SEQ ID NO: 11 a la SEQ ID NO: 17 de acuerdo con la invención codifica un polipéptido modificado o fragmento del mismo, que se deriva de la SEQ ID NO: 10 (GOx-T30V; I94V) que codifica un polipéptido de acuerdo con la SEQ ID NO: 1.

55 El término "GOx-T30V; I94V" como se usa en el presente documento indica una GOx en base a la secuencia natural (WT) de *Aspergillus niger* de acuerdo con la SEQ ID NO: 2, que tiene además las dos sustituciones T30V e I94V en su secuencia de polipéptidos, es decir, la SEQ ID NO: 1.

60 El término "doble mutante de GOx" como se usa en el presente documento indica igualmente una GOx en base a la secuencia WT de *Aspergillus niger* de acuerdo con la SEQ ID NO: 2, que tiene además las dos sustituciones T30V e I94V en su secuencia de polipéptidos, es decir, la SEQ ID NO: 1. Dicho doble mutante de GOx se deriva de Zhu *et al.* (2006; 2007).

65 En virtud de la invención, se usó la molécula de ácido nucleico correspondiente a la SEQ ID NO: 1 (es decir, la SEQ ID NO: 10) para mejorar además las propiedades cinéticas de la enzima GOx de acuerdo con la invención, caracterizada por un cambio de actividad oxidasa hacia actividad deshidrogenasa. Esto se logró por los inventores por medio de modificaciones en la secuencia de nucleótidos específicas que dieron como resultado sustituciones aminoacídicas en al menos una de las posiciones S53; A173; A332; F414; y V560, aunque las dos sustituciones T30V e I94V ya hubieran estado presentes de acuerdo con la SEQ ID NO: 1.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una variante de GOx que tiene, además de las dos sustituciones T30V e I94V de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, dos, o tres, o cuatro, o cinco sustituciones aminoacídicas adicionales en cualquiera de las cinco posiciones seleccionadas del grupo S53; A173; A332; F414; V560 de la SEQ ID NO: 1, presentando, de este modo, efectos cooperativos sobre la actividad enzimática de GOx.

La expresión "efectos cooperativos sobre la actividad enzimática de GOx" con el contexto de la presente invención indica al menos dos sustituciones aminoacídicas adicionales en cualquiera de las posiciones S53; A173; A332; F414; y V560, además de las dos sustituciones T30V e I94V de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, que tienen efectos sobre la actividad enzimática de GOx en términos de disminución de la tasa de consumo de oxígeno de GOx.

Además, "efectos cooperativos sobre la actividad enzimática de GOx" con el contexto de la presente invención indica al menos dos sustituciones aminoacídicas adicionales en cualquiera de las posiciones S53; A173; A332; F414; y V560, además de las dos sustituciones T30V e I94V de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, que tienen efectos sobre la actividad enzimática de GOx en términos de disminución de la tasa de consumo de oxígeno de GOx y/o incremento de la actividad para mediador de GOx para mediadores de electrones distintos del oxígeno.

Además, la expresión "efectos cooperativos sobre la actividad enzimática de GOx" con el contexto de la presente invención indica al menos dos sustituciones aminoacídicas adicionales en cualquiera de las posiciones S53; A173; A332; F414; y V560, además de las dos sustituciones T30V e I94V de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, que tienen efectos sobre la actividad enzimática de GOx en términos de aceptación de determinados mediadores de electrones distintos del oxígeno para la transferencia de electrones. En un aspecto específico, la presente invención proporciona variantes de GOx que tienen, además de las dos sustituciones aminoacídicas T30V e I94V de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, sustituciones aminoacídicas adicionales en las posiciones F414 con Ile, Leu, Met, Val, y V560 con Leu, Pro, Thr, combinadas con sustituciones aminoacídicas en las posiciones A173 con Ile, Thr, Val; y A332 con Ser, Val, Thr.

En un aspecto específico, la presente invención proporciona variantes de GOx que tienen, además de las dos sustituciones aminoacídicas T30V e I94V de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, sustituciones aminoacídicas combinadas adicionales en las posiciones F414 con Ile, Leu, Met, Val, y V560 con Leu, Pro, Thr.

Otro aspecto específico de la invención se relaciona con el aspecto anterior y proporciona variantes de GOx, que tienen, además de las dos sustituciones aminoacídicas T30V e I94V de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, las sustituciones aminoacídicas combinadas adicionales F414M o F414V y V560P o V560L.

En otro aspecto específico, la presente invención proporciona variantes de GOx, que tienen, además de las dos sustituciones aminoacídicas T30V e I94V de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, las sustituciones aminoacídicas adicionales F414M o F414V, combinadas con la(s) sustitución/sustituciones aminoacídica(s) V560P o V560L y/o A173I o A173V y/o A332S o A332V o A332T.

En otro aspecto específico, la presente invención proporciona variantes de GOx, que tienen, además de las dos sustituciones aminoacídicas T30V e I94V de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, las sustituciones aminoacídicas adicionales F414M o F414V, combinadas con la(s) sustitución/sustituciones aminoacídica(s) V560P o V560L y/o A173I o A173V y/o A332S o A332V o A332T.

Otro aspecto específico de la invención se relaciona con el aspecto anterior y proporciona variantes de GOx, que tienen, además de las dos sustituciones aminoacídicas T30V e I94V de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, al menos dos sustituciones aminoacídicas combinadas seleccionadas de cualquiera de las sustituciones mencionadas anteriormente.

La especificidad de GOx para los mediadores de electrones distintos del oxígeno se puede determinar por el ensayo de mediador como se explica en la sección Materiales y procedimientos en el punto ff).

En otro aspecto específico, la presente invención proporciona variantes de GOx que tienen una actividad para mediador de > 400 %, o > 450 %, o > 500 %, o > 550 %, o incluso > 600 % para el mediador de electrones N,N-bis(2-hidroxietil)-4-nitrosoanilina cuando se determina por el ensayo de mediador como se explica en la sección Materiales y procedimientos en el punto ff).

En otro aspecto específico, la presente invención proporciona variantes de GOx, que tienen una actividad reducida al menos 5 veces para oxígeno como aceptador de electrones, o al menos una actividad reducida 6 veces para oxígeno como aceptador de electrones, o al menos una actividad reducida 7 veces para oxígeno como aceptador de electrones en comparación con GOx-WT o en comparación con el GOx-T30V; I94V de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 por medio del ensayo de ABTS como se explica en la sección Materiales y procedimientos en el punto gg).

En otro aspecto específico, la presente invención proporciona variantes de GOx, que tienen una actividad oxidasa restante de $\leq 30\%$ de la de la actividad oxidasa de GOx WT o de la de la actividad oxidasa de GOx-T30V; I94V de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, o, en particular, que tienen una actividad oxidasa restante de < 20 %, o < 15 %, de la

de la actividad oxidasa de GOx-WT o de la de la actividad oxidasa de GOx-T30V; I94V de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, o, incluso más en particular, que tienen una actividad oxidasa restante de < 10 % de la de la actividad oxidasa de GOx-WT o de la de la actividad oxidasa de GOx-T30V; I94V de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, cuando se determina por el ensayo de ABTS como se explica en la sección Materiales y procedimientos en el punto gg).

En otro aspecto más específico de la invención, un equivalente/fragmento funcional de las moléculas de nucleótido como se proporciona en de la SEQ ID NO: 11 a la SEQ ID NO: 17 es una molécula de ARN correspondiente, que está codificada por dicha secuencia de ADN o una secuencia que es sustancialmente complementaria a la secuencia de la SEQ ID NO: 11 a la SEQ ID NO: 17.

En el contexto de la presente invención, el término "molécula de ARN" pretende referirse a un polímero lineal de moléculas de ribonucleótido, que es monocatenario y sirve como molde para la síntesis de proteínas de las variantes de GOx proporcionadas en el presente documento de acuerdo con de la SEQ ID NO: 3 a la SEQ ID NO: 9.

En otro aspecto específico de la presente invención, el grado o porcentaje de homología es de al menos un 70 %, o al menos un 80 %, o al menos un 90 %, o al menos un 95 %, o al menos un 99 % o un 100 % con respecto a de la SEQ ID NO: 3 a la SEQ ID NO: 9; siempre que presenten las mismas sustituciones como se explica por toda la memoria descriptiva y presenten además esencialmente las mismas propiedades que las variantes de GOx de acuerdo con la presente invención, siendo esas propiedades esenciales la actividad enzimática, la especificidad enzimática para glucosa y las tasas de consumo de oxígeno significativamente reducidas y/o la actividad significativamente incrementada para mediadores específicos distintos del oxígeno.

La identidad de secuencia se puede determinar por el algoritmo de BLAST, la herramienta de búsqueda de alineación local básica (Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)) [Altschul, S.F. et al. 1990. *J. Mol. Biol.* 215:403; Altschul, S.F. et al. 1997. *Nucleic Acid Res.* 25:3389-3402]. Los porcentajes de identidad de secuencia de aminoácidos mencionados en el presente documento se refieren a la determinación de la identidad de secuencia por dicho algoritmo de BLAST, en la que la región sobre la que se determina la homología es toda la secuencia de las variantes de GOx de la presente invención. La identidad de secuencia se puede determinar por cualquier otro procedimiento conocido por el experto en la técnica con el propósito de alineación y comparación de secuencias.

Un experto en la técnica entiende que las variantes de GOx proporcionadas en el presente documento pueden tener o pueden no tener otras modificaciones diferentes de las sustituciones mencionadas antes sin cambiar las propiedades esenciales de dichas variantes de GOx, es decir, la especificidad para glucosa, las tasas de consumo de oxígeno significativamente reducidas y/o la actividad significativamente incrementada para mediadores específicos distintos del oxígeno como en el sentido de la presente invención.

Otro aspecto específico de la presente invención es un polinucleótido aislado que codifica una variante de GOx o un equivalente/fragmento activo de la misma de acuerdo con la presente invención. El polinucleótido aislado puede ser una molécula de ADN o ARN o un gen correspondiente del mismo que codifica las siguientes secuencias que se enumeran explícitamente en la sección Listado de secuencias, es decir, de la SEQ ID NO: 11 a la SEQ ID NO: 17.

En otro aspecto específico, las variantes de GOx proporcionadas por la presente invención presentan estabilidad con respecto a la temperatura al tener una actividad enzimática residual de al menos un 70 %, en particular, de al menos un 80 % en el intervalo de 30 °C a 47 °C, cuando se determina por el ensayo de mediador como se explica en la sección Materiales y procedimientos en el punto ff).

En otro aspecto específico, las variantes de GOx proporcionadas por la presente invención presentan una estabilidad con respecto a la temperatura al tener una actividad enzimática residual de al menos un 10 % en el intervalo de 48 °C a 60 °C, cuando se determina por el ensayo de mediador como se explica en la sección Materiales y procedimientos en el punto ff).

Las variantes de GOx de la presente invención se pueden proporcionar en diversas formas, por ejemplo, como un reactivo liofilizado o como una solución en una solución de almacenamiento apropiada.

Las variantes de GOx proporcionadas en el presente documento están destinadas predominantemente a su aplicación en dispositivos de análisis de glucemia para diabetes más exactos. Específicamente, las variantes de GOx independientes del oxígeno de la invención utilizan oxígeno para la transferencia de electrones solo en tasas de consumo de oxígeno significativamente reducidas, esto significa que la actividad GOx residual para oxígeno es ≤ 30 %, o < 25 %, o < 20 %, en particular, < 15 %, o ≤ 10 %, cuando se determina por el ensayo de ABTS como se explica en la sección Materiales y procedimientos en el punto gg). En consecuencia, la cantidad significativa de glucosa reacciona en la reacción relacionada con mediador para mediciones de glucemia más adecuadas, aunque la reacción con el contenido de oxígeno disuelto en la muestra de sangre se reduce significativamente. Esto es beneficioso para el diabético cuando la sangre arterial, venosa o capilar es la fuente para las mediciones o en el caso de la medición de las concentraciones de glucemia en diferentes alturas sobre el nivel del mar.

En otro aspecto, la presente invención proporciona variantes de GOx que presentan tasas de consumo de oxígeno

significativamente reducidas y/o actividad para mediador significativamente incrementada para mediadores de electrones distintos del oxígeno, lo que también da como resultado mediciones de glucemia más exactas de las que se beneficia el diabético.

5 Definiciones

Con el contexto de la presente memoria descriptiva, las expresiones "dependiente del oxígeno" y "dependencia del oxígeno" indican una actividad GOx caracterizada por una actividad para oxígeno residual > 30 %, cuando se determina por el ensayo de ABTS como se explica en la sección Materiales y procedimientos en el punto gg).

En cambio, las expresiones "independiente del oxígeno" e "independencia del oxígeno" indican una actividad GOx caracterizada por una actividad para oxígeno residual \leq 30 %, o < 25 %, o < 20 %, en particular, < 15 %, o < 10 %, cuando se determina por el ensayo de ABTS como se explica en la sección Materiales y procedimientos en el punto gg).

Con el contexto de la presente invención, la expresión "inespecífica para glucosa" indica una actividad GOx para el sustrato glucosa de < 100 %, o < 99,9 %, o < 99,5 %, cuando se determina por el ensayo de mediador como se explica en la sección Materiales y procedimientos en el punto ff). Por implicación, las GOx que son "inespecíficas para glucosa" presentan una actividad GOx para azúcares distintos de glucosa, tales como galactosa, maltosa, xilosa y maltotriosa, de > 6 %, cuando se determina por el ensayo de mediador como se explica en la sección Materiales y procedimientos en el punto ff).

Los términos "modificado" o "modificación" en relación con las variantes de GOx de la presente invención se refieren a una proteína GOx que contiene, además de las dos sustituciones aminoacídicas T30V e I94V de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, al menos una sustitución aminoacídica adicional en la secuencia de polipéptidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, en cualquiera de la(s) posición/posiciones S53; A173; A332; F414; y V560. El término también indica el polinucleótido respectivo o las variaciones conservadoras de secuencia del mismo que codifican dicha variante de GOx "modificada".

Las "variaciones conservadoras de secuencia" de una secuencia de polinucleótido son aquellas en las que un cambio de uno o más nucleótidos en una posición de codón dada no da como resultado ninguna alteración en el aminoácido codificado en esa posición.

El término "variante(s) de GOx" indica glucosa oxidasas en virtud de la invención que tienen las dos sustituciones aminoacídicas T30V e I94V de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, y al menos una sustitución aminoacídica adicional en la secuencia de polipéptidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, en cualquiera de la(s) posición/posiciones S53; A173; A332; F414; y V560, caracterizadas por presentar especificidad enzimática para el sustrato glucosa, y tasas de consumo de oxígeno significativamente reducidas y/o actividad incrementada para mediadores específicos distintos del oxígeno.

Se debe entender que la numeración de las secuencias de aminoácidos por toda la presente memoria descriptiva empieza con "1" en la S (Ser, Serina) inicial como en la proteína GOx-T30V; I94V madura de acuerdo con la SEQ ID NO: 1.

El término "enzima" de acuerdo con la invención significa cualquier sustancia compuesta total o mayormente de proteínas o polipéptidos que cataliza o promueve, más o menos específicamente, una o más reacciones químicas o bioquímicas. El término "enzima" también se puede referir a un polinucleótido catalítico (por ejemplo, ARN o ADN).

El término "reacción de oxidación" significa, en términos generales, una reacción química o bioquímica que implica la adición de oxígeno a un sustrato para formar un sustrato o producto oxigenado u oxidado. Una reacción de oxidación típicamente está acompañada de una reacción de reducción (de ahí que el término reacción "rédox" englobe tanto oxidación como reducción). Un compuesto se "oxida" cuando recibe oxígeno o pierde electrones. Un compuesto se "reduce" cuando pierde oxígeno o gana electrones. Las GOx típicamente catalizan la oxidación de un grupo alcohol primario a un aldehído.

El término "glucosa oxidasa(s)" como se usa por toda la memoria descriptiva específica una proteína que cataliza la oxidación de beta-D-glucosa en D-glucono-1,5-lactona (D-glucosa + O₂ → gluconolactona + H₂O₂), que, a continuación, se puede hidrolizar a ácido glucónico. En consecuencia, la glucosa oxidasa es una enzima. Además, la expresión "un polipéptido que tiene la actividad de una glucosa oxidasa" se refiere a un polipéptido que tiene la actividad mencionada anteriormente. La(s) glucosa oxidasa(s) se puede(n) abreviar como "GOx" o "E.C. 1.1.3.4." Los términos "GOx-WT o WT" como se usa por toda la memoria descriptiva, indican la GOx natural del hongo *Aspergillus niger*. Los términos "GOx-T30V; I94V; o T30VI94V; o doble mutante; o mutante original" indican la variante de GOx que tiene las dos sustituciones T30V e I94V de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 como se describe en Zhu *et al.* (2006; 2007).

Todas la(s) variante(s) de GOx en virtud de la invención tienen en común las dos sustituciones T30V e I94V de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, y al menos una sustitución aminoacídica adicional en cualquiera de la(s) posición/posiciones

S53; A173; A332; F414; y V560 con aminoácidos proteinógenos adecuados para el reemplazo de acuerdo con la invención, a saber, Phe para la posición S53 e/o Ile, Thr, Val para la posición A173; y/o Ser, Val, Thr para la posición A332; e/o Ile, Leu, Met, Val para la posición F414; y/o Leu, Pro, Thr, para la posición V560. Los números de "EZ" respectivos pueden abreviar la(s) variante(s) de GOx en virtud de la invención por todo el texto de la memoria descriptiva. "EZ" quiere decir enzima.

La enzima "glucosa oxidasa" es, por tanto, un miembro de la clase de enzimas de oxidación, que cataliza una reacción de oxidación, añadiendo, insertando, contribuyendo o transfiriendo oxígeno de una fuente o donante a un sustrato. Dichas enzimas también se llaman oxidorreductasas o enzimas rédox, y engloban oxigenasas, hidrogenasas o reductasas, oxidasas y peroxidasas.

A este respecto, los términos "donante de oxígeno", "agente oxidante" y "oxidante" significan una sustancia, molécula o compuesto que dona oxígeno a un sustrato en una reacción de oxidación. Típicamente, el donante de oxígeno se reduce (acepta electrones). Los donantes de oxígeno ejemplares incluyen, por ejemplo, oxígeno molecular o dióxígeno (O₂), y los peróxidos incluyen, por ejemplo, peróxidos de alquilo, tales como peróxido de t-butilo, y lo más preferentemente peróxido de hidrógeno (H₂O₂). "Peróxido(s)" es/son cualquier compuesto que tiene dos átomos de oxígeno unidos entre sí.

Como se menciona, la "actividad" o "actividad enzimática" de una glucosa oxidasa o de las variantes de GOx como se usa en el presente documento está dirigida a una medida de su capacidad de catalizar la reacción de oxidación D-glucosa+O₂ → gluconolactona+H₂O₂, y se puede expresar como la tasa a la que se produce el producto de la reacción. Por ejemplo, la actividad glucosa oxidasa se puede representar como la cantidad de producto (gluconolactona y/o H₂O₂) producido por unidad de tiempo, o por unidad (por ejemplo, concentración o peso) de glucosa oxidasa.

En general, el/los polipéptido(s) de la invención también se puede(n) denominar en el presente documento como que es/son un "mutante", "muteína" o "variante" o "una GOx modificada" o una "modificación", lo que significa que se ha preparado, alterado, derivado, o es de algún modo diferente o se ha cambiado de la GOx-WT de *Aspergillus niger* y del GOx-T30V; I94V acuerdo con la SEQ ID NO: 1.

La proteína GOx-WT de *Aspergillus niger* comprende la secuencia natural de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 2. En consecuencia, el "mutante original" o "doble mutante" es un polipéptido de GOx del que se deriva o prepara cualquier otro polipéptido de GOx proporcionada en el presente documento, usando cualquier procedimiento, herramienta o técnica descrita en el presente documento. De acuerdo con la invención, el "mutante original" o "doble mutante" es el polipéptido de acuerdo con la SEQ ID NO: 1.

En consecuencia, un "polinucleótido original" es uno que codifica un polipéptido original, es decir, el polinucleótido de acuerdo con la SEQ ID NO: 10.

El término "mutación" o "variación" o "modificación" significa cualquier cambio detectable del material genético, por ejemplo, ADN o ARN, o cualquier procedimiento, mecanismo o resultado de dicho cambio. Esto incluye mutaciones génicas, en las que se altera la estructura (por ejemplo, la secuencia de ADN o ARN) de un gen, cualquier gen o ADN o ARN que surja de cualquier procedimiento de mutación, y cualquier producto de expresión (por ejemplo, proteína o polinucleótido) expresado por un gen modificado o secuencia de ADN. Dichos cambios también incluyen cambios en el promotor, sitio de unión a ribosoma, etc.

Con el contexto de la presente divulgación, las expresiones "determinados mediadores distintos del oxígeno", "determinados mediadores de electrones distintos del oxígeno", "determinado mediador inmovilizado" y "determinados aceptadores de electrones distintos del oxígeno" indican los mediadores/mediadores de electrones seleccionados del grupo que comprende nitrosoanilinas y derivados de las mismas, compuestos azoicos, fenazinas y derivados de las mismas, fenotiazinas y derivados de las mismas, fenoxazinas y derivados de las mismas, ferrocenos y derivados de los mismos, ferricianuro de potasio, complejos de Ru y Os, quinonas y derivados de las mismas, indofenoles, viológenos, tetratiafulvaleno y derivados del mismo, y ftalocianinas.

En consecuencia, las expresiones "determinados mediadores distintos del oxígeno", "determinados mediadores de electrones distintos del oxígeno", "determinado mediador inmovilizado" y "determinados aceptadores de electrones distintos del oxígeno" de acuerdo con la invención también indican mediadores de electrones, que se reducen rápidamente con FADH₂, pero que se reducen lentamente o no se reducen con ácidos ascórbicos, tales como derivados de 2-[4-(dimetilamino)fenil]-diazencarboxamida.

Abreviaturas

AA: aminoantipirina

HRP: peroxidasa(s) de rábano picante

GOx: glucosa oxidasa(s)

GOx-WT o WT: GOx natural del hongo *Aspergillus niger*

GDH: glucosa deshidrogenasa

5

ABTS: ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)

PMO: ácido fosfomolibdico

10 Descripción de las figuras

Figura 1

15 La fig. 1 muestra el principio de la determinación de la actividad en oxígeno para las variantes de GOx proporcionadas en el presente documento: el H₂O₂ producida durante la semirreacción reductora de GOx y HRP se usa para oxidar el sustrato cromógeno ABTS. El cambio de color de ABTS se controla por absorción a 414 nm. Este principio forma la base del ensayo de ABTS como se explica en la sección Materiales y procedimientos en el punto gg).

Figura 2

20 La fig. 2 representa el ensayo de mediador o ensayo de PMO (ácido fosfomolibdico) para la detección de la transferencia de electrones mediada. El compuesto mediador se reduce en dos etapas durante la semirreacción reductora de GOx. El mediador transfiere dos electrones al indicador rédox PMO que posteriormente se reduce. El cambio de color de PMO durante la reducción se controla por absorción a 700 nm.

Figura 3

25 La fig. 3 muestra la localización distinta de las seis posiciones para las sustituciones aminoacídicas en la estructura de la proteína en virtud de la invención.

Figura 4

30 La fig. 4 muestra tasas de consumo de oxígeno de diferentes variantes de GOx en virtud de la invención: a) progresión de la concentración de oxígeno relativa en función del tiempo; b) tasa de consumo de oxígeno relativa por minuto. La implementación del ensayo se describe en la sección Materiales y procedimientos en el punto hh). Las enzimas se normalizaron a 2 U/l.

Figura 5

35 La fig. 5 representa la cinética de Michaelis-Menten de diferentes variantes de GOx en virtud de la invención. Para la determinación de la actividad, se aplicó el ensayo de mediador para la caracterización como se explica en la sección Materiales y procedimientos en el punto ff). Las líneas discontinuas se calcularon en Microsoft Excel aplicando el procedimiento de mínimos cuadrados.

Figura 6

40 La fig. 6 muestra las propiedades de termoestabilidad de diferentes variantes de GOx en virtud de la invención. El ensayo se realizó como se explica en la sección Materiales y procedimientos en el punto ii). Como controles adicionales, se usaron GOx desglucosiladas e hiperglucosiladas.

Figura 7

45 La fig. 7 muestra la tasa de consumo de oxígeno relativa de la GOx-WT, el GOx-T30V; I94V y la variante de GOx V de la invención (es decir, A173V; A332S; F414I; V560T, además de las sustituciones T30V; I94V). La implementación del ensayo se describe en la sección Materiales y procedimientos en el punto hh). Las concentraciones de enzima se normalizaron a 1,7 mg/l.

50

Figura 8

55 La fig. 8 muestra la actividad residual de GOx-WT, GOx-T30V; I94V y la variante de GOx EZ07 en diferentes azúcares en comparación con glucosa. Para la determinación de las actividades residuales, se aplicó el ensayo de mediador para la caracterización como se describe en la sección Materiales y procedimientos en el punto ff). La concentración de sustrato fue 181,8 mM en las mezclas de reacción.

Figura 9

60 La fig. 9 muestra los parámetros enzimáticos para GOx-WT, GOx-T30V; I94V y la variante de GOx EZ07. Los parámetros se calcularon de acuerdo con la cinética de Michaelis-Menten aplicando el procedimiento de mínimos cuadrados en Microsoft Excel. Para la determinación de la actividad, se aplicó el ensayo de mediador para la caracterización como se describe en la sección Materiales y procedimientos en el punto ff).

Figura 10

65 La fig. 10 muestra la actividad residual de GOx-WT, GOx-T30V; I94V y la variante de GOx EZ07 después de 15 min de incubación a diversas temperaturas entre 25 y 67 °C.

Descripción de las secuencias

Secuencias de polipéptidos

5 SEQ ID NO: 1 (GOx-T30V; I94V)

SNGIEASLLTDPKDVSGRTVDYIIAGGGLVGLTTAARLTENPNISVLVIESGSYESDRGP
 I IEDLNAYGDI FGSSVDHAYETVELATNNQTALVRSNGNGLGGSTLVNNGGTWTRPHKAQVD
 SWETVFGNEGWNWDNVAAYSLQAERARAPNAKQIAAGHYFNASCHGVNGTVHAGPRDTGD
 DYSPIVKALMSAVEDRGVPTKKDFGCGDPHGVSMPFNTLHEDQVRSDAAREWLLPNYQRP
 NLQVLTGQYVGVKVLSSQNGTTPRAVGVEFGTHKGNTHNVAKHEVLLAAGSAVSPTILEY
 SGIGMKSILEPLGIDTVVDLPVGLNLQDQTTATVRSRITSAGAGQGQAAWFATFNETFGD
 YSEKAHELLNNTKLEQWAEAEAVARGGFHNTTALLIQYENYRDWIVNHNVAISELFLDTAGV
 ASFDVWDLPPFTRGYVHILDKDPYLHFFAYDPQYFLNELDLLGQAAATQLARNISNSGAM
 QTYFAGETIPGDNLAYDADLSAWTEYIIPYHFRPNYHGVGTCSMMPKEMGGVVDNAARVYG
 VQGLRVIDGSI PPTQMSSHVMTVIFYAMALKISDAILEDYASMQ

10

SEQ ID NO: 2 (GOx-WT de *Aspergillus niger*) :

SNGIEASLLTDPKDVSGRTVDYIIAGGGLTGLTTAARLTENPNISVLVIESGSYESDRGP
 I IEDLNAYGDI FGSSVDHAYETVELATNNQTALIRSGNGLGGSTLVNNGGTWTRPHKAQVD
 SWETVFGNEGWNWDNVAAYSLQAERARAPNAKQIAAGHYFNASCHGVNGTVHAGPRDTGD
 DYSPIVKALMSAVEDRGVPTKKDFGCGDPHGVSMPFNTLHEDQVRSDAAREWLLPNYQRP
 NLQVLTGQYVGVKVLSSQNGTTPRAVGVEFGTHKGNTHNVAKHEVLLAAGSAVSPTILEY
 SGIGMKSILEPLGIDTVVDLPVGLNLQDQTTATVRSRITSAGAGQGQAAWFATFNETFGD
 YSEKAHELLNNTKLEQWAEAEAVARGGFHNTTALLIQYENYRDWIVNHNVAISELFLDTAGV
 ASFDVWDLPPFTRGYVHILDKDPYLHFFAYDPQYFLNELDLLGQAAATQLARNISNSGAM
 QTYFAGETIPGDNLAYDADLSAWTEYIIPYHFRPNYHGVGTCSMMPKEMGGVVDNAARVYG
 VQGLRVIDGSI PPTQMSSHVMTVIFYAMALKISDAILEDYASMQ

SEQ ID NO: 3 (GOx-EZ07) :

15

SNGIEASLLTDPKDVSGRTVDYIIAGGGLVGLTTAARLTENPNISVLVIESGSYESDRGP
 I IEDLNAYGDI FGSSVDHAYETVELATNNQTALVRSNGNGLGGSTLVNNGGTWTRPHKAQVD
 SWETVFGNEGWNWDNVAAYSLQAERARAPNAKQIAAGHYFNASCHGVNGTVHVGPRDTGD
 DYSPIVKALMSAVEDRGVPTKKDFGCGDPHGVSMPFNTLHEDQVRSDAAREWLLPNYQRP
 NLQVLTGQYVGVKVLSSQNGTTPRAVGVEFGTHKGNTHNVAKHEVLLAAGSAVSPTILEY
 SGIGMKSILEPLGIDTVVDLPVGLNLQDQTTSTVRSRITSAGAGQGQAAWFATFNETFGD
 YSEKAHELLNNTKLEQWAEAEAVARGGFHNTTALLIQYENYRDWIVNHNVAISELILDTAGV
 ASFDVWDLPPFTRGYVHILDKDPYLHFFAYDPQYFLNELDLLGQAAATQLARNISNSGAM
 QTYFAGETIPGDNLAYDADLSAWTEYIIPYHFRPNYHGVGTCSMMPKEMGGVVDNAARVYG
 VQGLRVIDGSI PPTQMSSHTMTVIFYAMALKISDAILEDYASMQ

SEQ ID NO: 4 (GOx-EZ06) :

SNGIEASLLTDPKDVSGRTVDYIIAGGGLVGLTTAARLTENPNISVLVIESGSYESDRGP
I IEDLNAYGDI FGSSVDHAYETVELATNNQTALVRSNGNGLGGSTLVNNGGTWTRPHKAQVD
SWETVFGNEGWNWDNVAAYSLOAERARAPNAKQIAAGHYFNASCHGVNGTVHIGPRDTGD
DYSPIVKALMSAVEDRGVPTKKDFGCGDPHGVSMPFNTLHEDQVRSDAAREWLLPNYQRP
NLQVLTGQYVGKVLLSQNGTTPRAVGVEFGTHKGNTHNVYAKHEVLLAAGSAVSPTILEY
SGIGMKSILEPLGIDTVVDLPVGLNLQDQTTSTVRSRITSAGAGQGQAAWFATFNETFGD
YSEKAHELLNTKLEQWAEAEAVARGGFHNTTALLIQYENYRDWIVNHNVAAYSELFLDTAGV
ASFDVWDLPLPFTRGYVHILDKDPYLHFFAYDPQYFLNELDLLGQAAATQLARNISNSGAM
QTYFAGETIPGDNLAYDADLSAWTEYI PYHFRPNYHGVTCSMMPKEMGGVVDNAARVYG
VQGLRVIDGSIPPTQMSSHVMTVFYAMALKISDAILEDYASMQ

5 SEQ ID NO: 5 (GOx-EZ8) :

SNGIEASLLTDPKDVSGRTVDYIIAGGGLVGLTTAARLTENPNISVLVIESGSYESDRGP
I IEDLNAYGDI FGSSVDHAYETVELATNNQTALVRSNGNGLGGSTLVNNGGTWTRPHKAQVD
SWETVFGNEGWNWDNVAAYSLOAERARAPNAKQIAAGHYFNASCHGVNGTVHVGPRDTGD
DYSPIVKALMSAVEDRGVPTKKDFGCGDPHGVSMPFNTLHEDQVRSDAAREWLLPNYQRP
NLQVLTGQYVGKVLLSQNGTTPRAVGVEFGTHKGNTHNVYAKHEVLLAAGSAVSPTILEY
SGIGMKSILEPLGIDTVVDLPVGLNLQDQTTNTVRSRITSAGAGQGQAAWFATFNETFGD
YSEKAHELLNTKLEQWAEAEAVARGGFHNTTALLIQYENYRDWIVNHNVAAYSELFLDTAGV
ASFDVWDLPLPFTRGYVHILDKDPYLHFFAYDPQYFLNELDLLGQAAATQLARNISNSGAM
QTYFAGETIPGDNLAYDADLSAWTEYI PYHFRPNYHGVTCSMMPKEMGGVVDNAARVYG
VQGLRVIDGSIPPTQMSSHPMTVIFYAMALKISDAILEDYASMQ

SEQ ID NO: 6 (GOx-EZ10) :

10

SNGIEASLLTDPKDVSGRTVDYIIAGGGLVGLTTAARLTENPNISVLVIESGSYESDRGP
I IEDLNAYGDI FGSSVDHAYETVELATNNQTALVRSNGNGLGGSTLVNNGGTWTRPHKAQVD
SWETVFGNEGWNWDNVAAYSLOAERARAPNAKQIAAGHYFNASCHGVNGTVHVGPRDTGD
DYSPIVKALMSAVEDRGVPTKKDFGCGDPHGVSMPFNTLHEDQVRSDAAREWLLPNYQRP
NLQVLTGQYVGKVLLSQNGTTPRAVGVEFGTHKGNTHNVYAKHEVLLAAGSAVSPTILEY
SGIGMKSILEPLGIDTVVDLPVGLNLQDQTTNTVRSRITSAGAGQGQAAWFATFNETFGD
YSEKAHELLNTKLEQWAEAEAVARGGFHNTTALLIQYENYRDWIVNHNVAAYSELVLDTAGV
ASFDVWDLPLPFTRGYVHILDKDPYLHFFAYDPQYFLNELDLLGQAAATQLARNISNSGAM
QTYFAGETIPGDNLAYDADLSAWTEYI PYHFRPNYHGVTCSMMPKEMGGVVDNAARVYG
VQGLRVIDGSIPPTQMSSHLMTVIFYAMALKISDAILEDYASMQ

SEQ ID NO: 7 (GOx-EZ11) :

SNGIEASLLTDPKDVSGRTVDYIIAGGGLVGLTTAARLTENPNISVLVIESGSYESDRGP
I IEDLNAYGDI FGSSVDHAYETVELATNNQTALVRSNGNGLGGSTLVNNGGTWTRPHKAQVD
SWETVFGNEGWNWDNVAAYSLOAERARAPNAKQIAAGHYFNASCHGVNGTVHAGPRDTGD
DYSPIVKALMSAVEDRGVPTKKDFGCGDPHGVSMPFNTLHEDQVRSDAAREWLLPNYQRP
NLQVLTGQYVGKVLLSQNGTTPRAVGVEFGTHKGNTHNVYAKHEVLLAAGSAVSPTILEY
SGIGMKSILEPLGIDTVVDLPVGLNLQDQTTSTVRSRITSAGAGQGQAAWFATFNETFGD
YSEKAHELLNTKLEQWAEAEAVARGGFHNTTALLIQYENYRDWIVNHNVAAYSELFLDTAGV
ASFDVWDLPLPFTRGYVHILDKDPYLHFFAYDPQYFLNELDLLGQAAATQLARNISNSGAM
QTYFAGETIPGDNLAYDADLSAWTEYI PYHFRPNYHGVTCSMMPKEMGGVVDNAARVYG
VQGLRVIDGSIPPTQMSSHPMTVIFYAMALKISDAILEDYASMQ

15

SEQ ID NO: 8 (GOx-EZ12) :

SNGIEASLLTDPKDVSGRTVDYIIAGGGLVGLTTAARLTENPNI SVLVIESGFYESDRGP
 I IEDLNAYGDI FGSSVDHAYETVELATNNQTALVRSNGNLGGSTLVNNGGTWTRPHKAQVD
 SWETVFGNEGWNWDNVAAYSLQAERARAPNAKQIAAGHYFNASCHGVNGTVHAGPRDRTGD
 DYSPIVKALMSAVEDRGVPTKKDFGCGDPHGVSMPFNTLHEDQVRSDAAREWLLPNYQRP
 NLQVLTGQYVGVKVLSSQNGTTPRAVGVEFGTHKGNTHNVYAKHEVLLAAGSAVSPTILEY
 SGIGMKSILEPLGIDTVVDLPVGLNLQDQTTSTVRSRITSAGAGQGQAAWFATFNETFGD
 YSEKAHELLNTKLEQWAEAEAVARGGFHNTTALLIQYENYRDWIVNHNVAISELFLDTAGV
 ASFDVWDLPLPFRGYVHILDKDPYLHFFAYDPQYFLNELDLLGQAAATQLARNISNSGAM
 QTYFAGETIPGDNLAYDADLSAWTEYIIPYHFRPNYHGVGTCSMMPKEMGGVVDNAARVYG
 VQGLRVIDGSIPTQMSHVMVTFYAMALKISDAILEDYASMQ

5 SEQ ID NO: 9 (GOx-EZ15) :

SNGIEASLLTDPKDVSGRTVDYIIAGGGLVGLTTAARLTENPNI SVLVIESGSYESDRGP
 I IEDLNAYGDI FGSSVDHAYETVELATNNQTALVRSNGNLGGSTLVNNGGTWTRPHKAQVD
 SWETVFGNEGWNWDNVLAYSLSQAERARAPNAKQIAAGHYFNASCHGVNGTVHAGPRDRTGD
 DYSPIVKALMSAVEDRGVPTKKDFGCGDPHGVSMPFNTLHEDQVRSDAAREWLLPNYQRP
 NLQVLTGQYVGVKVLSSQNGTTPRAVGVEFGTHKGNTHNVYAKHEVLLAAGSAVSPTILEY
 SGIGMKSILEPLGIDTVVDLPVGLNLQDQTTATVRSRITSAGAGQGQAAWFATFNETFGD
 YSEKAHELLNTKLEQWAEAEAVARGGFHNTTALLIQYENYRDWIVNHNVAISELFLDTAGV
 ASFDVWDLPLPFRGYVHILDKDPYLHFFAYDPQYFLNELDLLGQAAATQLARNISNSGAM
 QTYFAGETIPGDNLAYDADLSAWTEYIIPYHFRPNYHGVGTCSMMPKEMGGVVDNAARVYG
 VQGLRVIDGSIPTQMSHVMVTFYAMALKISDAILEDYASMQ

10 Secuencias de nucleótidos

SEQ ID NO: 10 (GOx-T30; I94V) :

AGCAATGGCATTGAAGCCAGCCTCCTGACTGATCCCAAGGATGTCTCCGGCCGCACGGTC
 GACTACATCATCGCTGGTGGAGGTCTGGTTGGACTCACCACCGCTGCTCGTCTGACGGAG
 AACCCCAACATCAGTGTCTCGTCATCGAAAGTGGCTCCTACGAGTCGGACAGAGGTCTCT
 ATCATTGAGGACCTGAACGCCACGGCGACATCTTTGGCAGCAGTGTAGACCACGCCTAC
 GAGACCGTGGAGCTCGCTACCAACAATCAAACCGCGCTGGTCCGCTCCGGAATGGTCTC
 GGTGGCTCTACTCTAGTGAATGGTGGCACCCTGGACTCGCCCCACAAGGCACAGGTTGAC
 TCTTGGGAGACTGTCTTTGGAAATGAGGGCTGGAAC TGGGACAATGTGGCCGCCTACTCC
 CTCCAGGCTGAGCGTGTCTCGCGCACCAATGCCAAACAGATCGCTGCTGGCCACTACTTC
 AACGCATCCTGCCATGGTGTAAATGGTACTGTCCATGCCGGACCCCGCGACACCCGGCGAT
 GACTATTCTCCATCGTCAAGGCTCTCATGAGCGCTGTCTGAAGACCCGGGGCGTTCCCAAC
 AAGAAAGACTTCGGATCGGTCACCCCATGGTGTGTCCATGTTCCCAACACCTTGCAC
 GAAGACCAAGTGGCTCCGATGCCGCTCGCGAATGGCTACTTCCCAACTACCAACGTCCC
 AACCTGCAAGTCTTGACCGGACAGTATGTTGGTAAGGTGCTCCTTAGCCAGAACGGCACC
 ACCCCTCGTGCCGTTGGCGTGGAAATTCGGCACCCACAAGGGCAACACCCACAACGTTTAC
 GCTAAGCACGAGGTCTCTTGCCCGCGGGCTCCGCTGTCTCTCCCAATCCTCGAATAT
 TCCGGTATCGGAATGAAGTCCATCCTGGAGCCCCTTGGTATCGACACCGTCTGTTGACCTG
 CCCGTCGGCTTGAACTGCAGGACCAGACCACCGCTACCGTCCGCTCCCGCATCACCTCT
 GCTGGTGCAGGACAGGGACAGGCCGCTTGGTTCGCCACCTTCAACGAGACCTTTGGTGAC
 TATTCCGAAAAGGCACACGAGCTGCTCAACACCAAGCTGGAGCAGTGGGCCGAAGAGGCC
 GTCGCCCCTGGCGGATTCACAAACACCACCCCTTGTCTATCCAGTACGAGAACTACCCGC
 GACTGATTGTCAACCACAACGTCGCTCGGTAACCTCGGAACCTTCTCTCGACACTGCCGGAGTA
 GCCAGCTTCGATGTGTGGGACCTTCTGCCCTTACCCCGAGGATACGTTACATCCTCGAC
 AAGGACCCCTACCTTACCACCTTCGCTACGACCCTCAGTACTTCTCAACGAGCTGGAC
 CTGCTCGGTGAGGCTGCCGCTACTCAACTGGCCCGCAACATCTCCAACCTCCGGTGCCATG
 CAGACCTACTTCGCTGGGAGACTATCCCCGGTGATAACCTCGCGTATGATGCCGATTTG
 AGCGCTGGACTGAGTACATCCCCTACCCTTCCGTCCTAACTACCATGGCGTGGGTACT
 TGCTCCATGATGCCGAAGGAGATGGGCGGTGTTGTTGATAATGCTGCCCGTGTGTATGGT
 GTGCAGGGACTGCGTGTCTATGATGGTTCTATTCTCCTACGCAAATGTCGTCCCATGTC
 ATGACGGTGTCTATGCCATGGCGCTAAAAATTTCCGGATGCTATCTTGAAGATTATGCT
 TCCATGCAG

SEQ ID NO: 11 (GOx-EZ07) :

AGCAATGGCATTGAAGCCAGCCTCCTGACTGATCCCAAGGATGTCCTCCGGCCGCACGGTC
 GACTACATCATCGCTGGTGGAGGTCTGGTTGGACTCACCACCGCTGCTCGTCTGACGGAG
 AACCCCAACATCAGTGTGCTCGTCATCGAAAGTGGCTCCTACGAGTCGGACAGAGGTCCT
 ATCATTGAGGACCTGAACGCCTACGGCGACATCTTTGGCAGCAGTGTAGACCACGCCTAC
 GAGACCGTGGAGCTCGCTACCAACAATCAAACCGCGCTGGTCCGCTCCGGAAATGGTCTC
 GGTGGCTCTACTCTAGTGAATGGTGGCACCTGGACTCGCCCCACAAGGCACAGGTTGAC
 TCTTGGGAGACTGTCCTTTGGAAATGAGGGCTGGAACGGGACAATGTGGCCGCCTACTCC
 CTCCAGGCTGAGCGTGTCTCGCGCACCAAAATGCCAAACAGATCGCTGCTGGCCACTACTTC
 AACGCATCCTGCCATGGTGTAAATGGTACTGTCCATGTTGGACCCCGCGACACCGGCGAT
 GACTATTCCTCCATCGTCAAGGCTCTCATGAGCGCTGTGCAAGACCGGGGCGTTCCCACC
 AAGAAAGACTTCGGATGCGGTGACCCCATGGTGTGTCCATGTTCCCCAACACCTTGAC
 GAAGACCAAGTGCCTCGATGCCGCTCGCGAATGGCTACTTCCCAACTACCAACGTCCC
 AACCTGCAAGTCTGACCGGACAGTATGTTGGTAAGGTGCTCCTTAGCCAGAACGGCACC
 ACCCCTCGTGCCGTTGGCGTGGAAATTCGGCACCCACAAGGGCAACACCCACAACGTTTAC
 GCTAAGCACGAGGTCTCCTGGCCGCGGGCTCCGCTGTCTCTCCACAATCCTCGAATAT
 TCCGGTATCGGAATGAAGTCCATCCTGGAGCCCCTTGGTATCGACACCGTCGTTGACCTG
 CCCGTCGGCTTGAACCTGCAGGACCAGACCACAGTACCGTCCGCTCCCGCATCACCTCT
 GCTGGTGCAGGACAGGGACAGGCCGCTTGGTTCGCCACCTTCAACGAGACCTTTGGTGAC
 TATTCGAAAAGGCACACGAGCTGCTCAACACCAAGCTGGAGCAGTGGGCCGAAGAGGCC
 GTCGCCCGTGGCGGATTCACACAACACCACCGCCTTGCTCATCCAGTACGAGAACTACCGC
 GACTGGATTGTCAACCACAACGTCGCGTACTCGGAACTCATTCCTCGACACTGCCGGAGTA
 GCCAGCTTCGATGTGTGGGACCTTCTGCCCTTACCCGAGGATACGTTACATCCTCGAC
 AAGGACCCCTACCTTCACCACTTCGCCTACGACCCTCAGTACTTCCTCAACGAGCTGGAC
 CTGCTCGGTCAGGCTGCCGCTACTCAACTGGCCCGCAACATCTCCAACCTCCGGTGCCATG
 CAGACCTACTTCGCTGGGGAGACTATCCCCGGTGATAACCTCGCGTATGATGCCGATTTG
 AGCGCTGGACTGAGTACATCCCGTACCCTTCCGTCCTAACTACCATGGCGTGGGTACT
 TGCTCCATGATGCCGAAGGAGATGGGCGGTGTTGTTGATAATGCTGCCCGTGTGTATGGT
 GTGCAGGGACTGCGTGTTCATTGATGGTTCATTCCTCCTACGCAAATGTCGTCCCATACG
 ATGACGGTGTCTATGCCATGGCGCTAAAAATTTCCGGATGCTATCTTGAAGATTATGCT
 TCCATGCAG

5

SEQ ID NO: 12 (GOx-EZ06) :

AGCAATGGCATTGAAGCCAGCCTCCTGACTGATCCCAAGGATGTCTCCGGCCGCACGGTC
 GACTACATCATCGCTGGTGGAGGTCTGGTTGGACTCACCACCGCTGCTCGTCTGACGGAG
 AACCCCAACATCAGTGTGCTCGTCATCGAAAGTGGCTCCTACGAGTCGGACAGAGGTCTCT
 ATCATTGAGGACCTGAACGCCACCGGCACATCTTTGGCAGCAGTGTAGACCACGCCTAC
 GAGACCGTGGAGCTCGCTACCAACAATCAAACCGCGCTGGTCCGCTCCGAAAATGGTCTC
 GGTGGCTCTACTCTAGTGAATGGTGGCACCTGGACTCGCCCCACAAGGCACAGGTTGAC
 TCTTGGGAGACTGTCTTTGGAAAATGAGGGCTGGAAGTGGGACAATGTGGCCGCCTACTCC
 CTCCAGGCTGAGCGTGTCTCGCGCACCAATGCCAAACAGATCGCTGCTGGCCACTACTTC
 AACGCATCCTGCCATGGTGTAAATGGTACTGTCCATATTGGACCCCGCGACACCGGCGAT
 GACTATTCTCCCATCGTCAAGGCTCTCATGAGCGCTGTCAAGACCGGGGCGTTCCCACC
 AAGAAAAGACTTCGGATGCGGTGACCCCATGGTGTGTCCATGTTCCCAACACCTTGCAC
 GAAGACCAAGTGGCTCCGATGCCGCTCGCGAATGGCTACTTCCCAACTACCAACGTCCC
 AACCTGCAAGTCTTGACCGGACAGTATGTTGGTAAGGTGCTCCTTAGCCAGAACGGCACC
 ACCCCTCGTGCCGTTGGCGTGGAAATTCGGCACCCACAAGGGCAACACCCACAACGTTTAC
 GCTAAGCACGAGGTCTCTCGCCGCGGGCTCCGCTGTCTCTCCACAATCCTCGAATAT
 TCCGGTATCGGAATGAAGTCCATCCTGGAGCCCCCTTGGTATCGACACCGTTCGTTGACCTG
 CCCGTCGGCTTGAACCTGCAGGACCAGACCACAGTACCGTCCGCTCCCGCATCACCTCT
 GCTGGTGCAGGACAGGGACAGGCCGCTTGGTTCGCCACCTTCAACGAGACCTTTGGTGAC
 TATTCGAAAAGGCACACGAGCTGTCAACACCAAGCTGGAGCAGTGGGCCGAAGAGGCC
 GTCGCCCGTGGCGGATTCACACAACACCACCGCCTTGCTCATCCAGTACGAGAACTACCGC
 GACTGGATTGTCAACCACAACGTCGCGTACTCGGAACCTCTCTCGACACTGCCGGAGTA
 GCCAGCTTCGATGTGTGGGACCTTCTGCCCTTACCCGAGGATACGTTACATCCTCGAC
 AAGGACCCCTACCTTACCACCTTCGCCCTACGACCCTCAGTACTTCTCAACGAGCTGGAC
 CTGCTCGGTGAGGCTGCCGCTACTCAACTGGCCCGCAACATCTCCAACCTCCGGTGCCATG
 CAGACCTACTTCGCTGGGGAGACTATCCCCGGTGATAACCTCGCGTATGATGCCGATTTG
 AGCGCCTGGACTGAGTACATCCCGTACCACCTCCGTCTTAACCTACCATGGCGTGGGTACT
 TGCTCCATGATGCCGAAGGAGATGGGCGGTGTTGTTGATAATGCTGCCCGTGTGTATGGT
 GTGCAGGGACTGCGTGTCTATTGATGGTTCTATTCTCTACGCAAATGTCGTCCCATGTC
 ATGACGGTGTCTATGCCATGGCGCTAAAAATTTCCGGATGCTATCTTGAAGATTATGCT
 TCCATGCAG

5 SEQ ID NO: 13 (GOx-EZ08) :

AGCAATGGCATTGAAGCCAGCCTCCTGACTGATCCCAAGGATGTCTCCGGCCGCACGGTC
 GACTACATCATCGCTGGTGGAGGTCTGGTTGGACTCACCACCGCTGCTCGTCTGACGGAG
 AACCCCAACATCAGTGTGCTCGTCATCGAAAGTGGCTCCTACGAGTCGGACAGAGGTCTCT
 ATCATTGAGGACCTGAACGCCACCGGCACATCTTTGGCAGCAGTGTAGACCACGCCTAC
 GAGACCGTGGAGCTCGCTACCAACAATCAAACCGCGCTGGTCCGCTCCGAAAATGGTCTC
 GGTGGCTCTACTCTAGTGAATGGTGGCACCTGGACTCGCCCCACAAGGCACAGGTTGAC
 TCTTGGGAGACTGTCTTTGGAAAATGAGGGCTGGAAGTGGGACAATGTGGCCGCCTACTCC
 CTCCAGGCTGAGCGTGTCTCGCGCACCAATGCCAAACAGATCGCTGCTGGCCACTACTTC
 AACGCATCCTGCCATGGTGTAAATGGTACTGTCCATGTTGGACCCCGCGACACCGGCGAT
 GACTATTCTCCCATCGTCAAGGCTCTCATGAGCGCTGTCAAGACCGGGGCGTTCCCACC
 AAGAAAAGACTTCGGATGCGGTGACCCCATGGTGTGTCCATGTTCCCAACACCTTGCAC

GAAGACCAAGTGCCTCCGATGCCGCTCGCGAATGGCTACTTCCCAACTACCAACGTCCC
AACCTGCAAGTCTTGACCGGACAGTATGTTGGTAAGGTGCTCCTTAGCCAGAACGGCACC
ACCCCTCGTGCCGTTGGCGTGGAATTCGGCACCCACAAGGGCAACACCCACAACGTTTAC
GCTAAGCACGAGGTCTCTGGCCGCGGGCTCCGCTGTCTCTCCACAATCCTCGAATAT
TCCGGTATCGGAATGAAGTCCATCCTGGAGCCCCTTGGTATCGACACCGTCTGTTGACCTG
CCCGTCCGCTTGAACCTGCAGGACCAGACCACCAATACCGTCCGCTCCCGCATCACCTCT
GCTGGTGCAGGACAGGGACAGGCCGCTTGGTTCGCCACCTTCAACGAGACCTTTGGTGAC
TATTCGAAAAGGCACACGAGCTGCTCAACACCAAGCTGGAGCAGTGGGCCGAAGAGGCC
GTCGCCCGTGGCGGATTCCACAACACCACCGCCTTGCTCATCCAGTACGAGAACTACCGC
GACTGGATTGTCAACCACAACGTCCGCTACTCGGAACCTTTCTCGACACTGCCGGAGTA
GCCAGCTTCGATGTGTGGGACCTTCTGCCCTTACCCGAGGATACGTTTACATCCTCGAC
AAGGACCCCTACCTTACCACCTTCGCCCTACGACCCTCAGTACTTCTCAACGAGCTGGAC
CTGCTCGGTCAGGCTGCCGCTACTCAACTGGCCCGCAACATCTCCAACCTCCGGTGCCATG
CAGACCTACTTCGCTGGGGAGACTATCCCCGGTGATAACCTCGCGTATGATGCCGATTTG
AGCGCCTGGACTGAGTACATCCCGTACCCTTCCGCTCCTAACTACCATGGCGTGGGTACT
TGCTCCATGATGCCGAAGGAGATGGGCGGTGTGTTGATAATGCTGCCCGTGTGTATGGT
GTGCAGGGACTGCGTGTCAATTGATGGTTCTATTCTCCTACGCAAATGTCGTCCCATCCG
ATGACGGTGTCTATGCCATGGCGCTAAAAATTCGGATGCTATCTTGGAAGATTATGCT
TCCATGCAG

SEQ ID NO: 14 (GOx-EZ10) :

AGCAATGGCATTGAAGCCAGCCTCCTGACTGATCCCAAGGATGTCTCCGGCCGCACGGTC
GACTACATCATCGCTGGTGGAGGTCTGGTTGGACTCACCACCGCTGCTCGTCTGACGGAG
AACCCCAACATCAGTGTGCTCGTCATCGAAAGTGGCTCCTACGAGTCCGACAGAGGTCTT
ATCATTGAGGACCTGAACGCCACGGCGACATCTTTGGCAGCAGTGTAGACCACGCCCTAC
GAGACCGTGGAGCTCGCTACCAACAATCAAACCGCGCTGGTCCGCTCCGGAAATGGTCTC
GGTGGCTTACTCTAGTGAATGGTGGCACCTGGACTCGCCCCACAAGGCACAGGTGAC
TCTTGGGAGACTGTCTTTGGAAATGAGGGCTGGAACCTGGGACAATGTGGCCGCCTACTCC
CTCCAGGCTGAGCGTGTCTCGCGCACCAATGCCAAACAGATCGCTGCTGGCCACTACTTC
AACGCATCCTGCCATGGTGTAAATGGTACTGTCCATGTTGGACCCCGGACACCCGGCGAT
GACTATTCTCCCATCGTCAAGGCTCTCATGAGCGCTGTGCAAGACCGGGCGTTCCCACC
AAGAAAAGACTTCGGATGCGGTGACCCCATGGTGTGTCCATGTTCCCCAACACCTTGCAC
GAAGACCAAGTCCGCTCCGATGCCGCTCGCGAATGGCTACTTCCCAACTACCAACGTCCC
AACCTGCAAGTCTTGACCGGACAGTATGTTGGTAAGGTGCTCCTTAGCCAGAACGGCACC
ACCCCTCGTGCCGTTGGCGTGGAATTCGGCACCCACAAGGGCAACACCCACAACGTTTAC
GCTAAGCACGAGGTCTCTGGCCGCGGGCTCCGCTGTCTCTCCACAATCCTCGAATAT
TCCGGTATCGGAATGAAGTCCATCCTGGAGCCCCTTGGTATCGACACCGTCTGTTGACCTG
CCCGTCCGCTTGAACCTGCAGGACCAGACCACCAATACCGTCCGCTCCCGCATCACCTCT
GCTGGTGCAGGACAGGGACAGGCCGCTTGGTTCGCCACCTTCAACGAGACCTTTGGTGAC
TATTCGAAAAGGCACACGAGCTGCTCAACACCAAGCTGGAGCAGTGGGCCGAAGAGGCC
GTCGCCCGTGGCGGATTCCACAACACCACCGCCTTGCTCATCCAGTACGAGAACTACCGC
GACTGGATTGTCAACCACAACGTCCGCTACTCGGAACCTGTTCTCGACACTGCCGGAGTA
GCCAGCTTCGATGTGTGGGACCTTCTGCCCTTACCCGAGGATACGTTTACATCCTCGAC
AAGGACCCCTACCTTACCACCTTCGCCCTACGACCCTCAGTACTTCTCAACGAGCTGGAC
CTGCTCGGTCAGGCTGCCGCTACTCAACTGGCCCGCAACATCTCCAACCTCCGGTGCCATG
CAGACCTACTTCGCTGGGGAGACTATCCCCGGTGATAACCTCGCGTATGATGCCGATTTG
AGCGCCTGGACTGAGTACATCCCGTACCCTTCCGCTCCTAACTACCATGGCGTGGGTACT
TGCTCCATGATGCCGAAGGAGATGGGCGGTGTTGTTGATAATGCTGCCCGTGTGTATGGT
GTGCAGGGACTGCGTGTCAATTGATGGTTCTATTCTCCTACGCAAATGTCGTCCCATCTG
ATGACGGTGTCTATGCCATGGCGCTAAAAATTCGGATGCTATCTTGGAAGATTATGCT
TCCATGCAG

SEQ ID NO: 15 (GOx-EZ11) :

AGCAATGGCATTGAAGCCAGCCTCCTGACTGATCCCAAGGATGTCTCCGGCCGCACGGTC
GACTACATCATCGCTGGTGGAGGTCTGGTTGGACTCACCACCGCTGCTCGTCTGACGGAG
AACCCCAACATCAGTGTGCTCGTCATCGAAAGTGGCTCCTACGAGTCGGACAGAGGTCCT
ATCATTTGAGGACCTGAACGCCTACGGCGACATCTTTGGCAGCAGTGTAGACCACGCCTAC
GAGACCGTGGAGCTCGCTACCAACAATCAAACCGCGCTGGTCCGCTCCGGAAATGGTCTC
GGTGGCTCTACTCTAGTGAATGGTGGCACCTGGACTCGCCCCACAAGGCACAGGTTGAC
TCTTGGGAGACTGTCTTTGGAAATGAGGGCTGGAACTGGGACAATGTGGCCGCCTACTCC
CTCCAGGCTGAGCGTGTCTCGCGCACCAATGCCAAACAGATCGCTGCTGGCCACTACTTC
AACGCATCCTGCCATGGTGTAAATGGTACTGTCCATGCCGGACCCCGCGACACCGGGCGAT
GACTATTTCCCATCGTCAAGGCTCTCATGAGCGCTGTGGAAGACCGGGGCGTTCCACC
AAGAAAGACTTCGGATGCGGTGACCCCATGGTGTGTCCATGTTCCCAACACCTTGCAC
GAAGACCAAGTGCCTCCGATGCCGCTCGCGAATGGCTACTTCCCAACTACCAACGTCCC
AACCTGCAAGTCTGACCGGACAGTATGTTGGTAAGGTGCTCCTTAGCCAGAACGGCACC
ACCCCTCGTGCCGTTGGCGTGAATTCGGCACCCACAAGGGCAACACCCACAACGTTTAC
GCTAAGCACGAGGTCTCCTGGCCGCGGGCTCCGCTGTCTCTCCACAATCCTCGAATAT
TCCGCTATCGGAATGAAGTCCATCCTGGAGCCCCTTGGTATCGACACCGTCGTTGACCTG
CCCGTCGGCTTGAACCTGCAGGACCAGACCACAGTACCGTCCGCTCCCGCATCACCTCT
GCTGGTGCAGGACAGGGACAGGCCGCTTGGTTCGCCACCTTCAACGAGACCTTTGGTGAC
TATTCGAAAAGGCACACGAGCTGCTCAACACCAAGCTGGAGCAGTGGGCCGAAGAGGCC
GTCGCCCCTGGCGGATTCACACAACACCACCGCCTTGCTCATCCAGTACGAGAACTACCGC
GACTGGATTGTCAACCACAACGTCGCGTACTCGGAACTCTTCCTCGACACTGCCGGAGTA
GCCAGCTTCGATGTGTGGGACCTTCTGCCCTTCACCCGAGGATACGTTCCACATCCTCGAC
AAGGACCCCTACCTTACCACCTTCGCCTACGACCCCTCAGTACTTCCCAACGAGCTGGAC
CTGCTCGGTCAGGCTGCCGCTACTCAACTGGCCCCGAACATCTCCAACCTCCGGTGCCATG
CAGACCTACTTCGCTGGGGAGACTATCCCCGGTGATAACCTCGCGTATGATGCCGATTTG
AGCGCCTGGACTGAGTACATCCCGTACCACCTCCGTCCTAACTACCATGGCGTGGGTACT
TGCTCCATGATGCCGAAGGAGATGGGCGGTGTTGTTGATAATGCTGCCCGTGTGTATGGT
GTGCAGGGACTGCGTGTCAATTGATGGTTCTATTCTCCTACGCAAATGTCGTCCCATCCG
ATGACGGTGTTCATGCCATGGCGCTAAAAATTTCCGGATGCTATCTTGAAGATTATGCT
TCCATGCAG

5

SEQ ID NO: 16 (GOx-EZ12) :

AGCAATGGCATTGAAGCCAGCCTCCTGACTGATCCCAAGGATGTCTCCGGCCGCACGGTC
GACTACATCATCGCTGGTGGAGGTC'TGGTTGGACTCACCACCGCTGCTCGTCTGACGGAG
AACCCCAACATCAGTGTGCTCGTCAATCGAAAGTGGCTTCTACGAGTCGGACAGAGGTCCT
ATCATTGAGGACCTGAACGCCACGGCGACATCTTTGGCAGCAGTGTAGACCACGCCTAC
GAGACCGTGGAGCTCGCTACCAACAATCAAACCGCGCTGGTCCGCTCCGGAAATGGTCTC
GGTGGCTCTACTCTAGTGAATGGTGGCACCTGGACTCGCCCCACAAGGCACAGGTTGAC
TCTTGGGAGACTGTCTTTGGAAATGAGGGCTGGAAC'TGGGACAATGTGGCCGCCTACTCC
CTCCAGGCTGAGCGTGTCTCGCGCACCAATGCCAAACAGATCGCTGCTGGCCACTACTTC
AACGCATCCTGCCATGGTGTAAATGGTACTGTCCATGCCGGACCCCGCGACACCGGGCAT
GACTATTCTCCCATCGTCAAGGCTCTCATGAGCGCTGTGCAAGACCGGGGCGTTCCACC
AAGAAAAGACTTCGGATGCCGTGACCCCATGGTGTGTCCATGTTCCCAACACCTTGAC
GAAGACCAAGTGCCTCCGATGCCGCTCGCGAATGGCTACTTCCCAACTACCAACGTCCC
AACCTGCAAGTCTGACCGGACAGTATGTTGGTAAGGTGCTCCTTAGCCAGAACGGCACC
ACCCCTCGTGCCGTGGCGTGGAAATTCGGCACCCACAAGGGCAACACCCACAACGTTTAC
GCTAAGCACGAGGTCCTCCTGGCCGCGGGCTCCGCTGTCTCTCCACAATCCTCGAATAT
TCCGGTATCGGAATGAAGTCCATCCTGGAGCCCCTTGGTATCGACACCGTCCGTTGACCTG
CCCGTCGGCTTGAACCTGCAGGACCAGACCAGTACCCTCCGCTCCCGCATCACCTCT
GCTGGTGCAGGACAGGGACAGGCCGCTTGGTTCCGCCACCTTCAACGAGACCTTTGGTGC
TATTCCGAAAAGGCACACGAGCTGCTCAACACCAAGCTGGAGCAGTGGGCCGAAGAGGCC
GTCGCCCCGTGGCGGATTCACACAACACCACCGCCTTGCTCATCCAGTACGAGAACTACCGC
GACTGGATTGTCAACCACAACGTCGCGTACTCGGAACCTTTCCTCGACACTGCCGGAGTA
GCCAGCTTCGATGTGTGGGACCTTCTGCCCTTACCCGAGGATACGTTACATCCTCGAC
AAGGACCCCTACCTTACCACCTTCGCCTACGACCTCAGTACTTCTCAACGAGCTGGAC
CTGCTCGGTCAGGCTGCCGCTACTCAACTGGCCCGCAACATCTCCAACCTCCGGTGCCATG
CAGACCTACTTCGCTGGGGAGACTATCCCCGGTGATAACCTCGCGTATGATGCCGATTTG
AGCGCCTGGACTGAGTACATCCCGTACCACCTCCGTCCTAACTACCATGGCGTGGGTACT
TGCTCCATGATGCCGAAGGAGATGGGCGGTGTTGTTGATAATGCTGCCCGTGTGTATGGT
GTGCAGGGACTGCGTGTCAATTGATGGTTCTATTCCCTCCTACGCAAATGTCGTCCCATGTC
ATGACGGTGTTCATGCCATGGCGCTAAAAATTTCCGGATGCTATCTTGGAAGATTATGCT
TCCATGCAG

5 SEQ ID NO: 17 (GOx-EZ15) :

AGCAATGGCATTGAAGCCAGCCTCCTGACTGATCCCAAGGATGTCTCCGGCCGCACGGTC

GACTACATCATCGCTGGTGGAGGTCTGGTTGGACTCACCACCGCTGCTCGTCTGACGGAG
 AACCCCAACATCAGTGTGCTCGTCATCGAAAGTGGCTCCTACGAGTCGGACAGAGGTCTT
 ATCATTGAGGACCTGAACGCCCTACGGCGACATCTTTGGCAGCAGTGTAGACCACGCCTAC
 GAGACCGTGGAGCTCGCTACCAACAATCAAACCGCGCTGGTCCGCTCCGGAAATGGTCTC
 GGTGGCTCTACTCTAGTGAATGGTGGCACCTGGACTCGCCCCACAAGGCACAGGTTGAC
 TCTTGGGAGACTGTCTTTGGAAATGAGGGCTGGAAGTGGGACAATGTGTTGGCCTACTCC
 CTCCAGGCTGAGCGTGTCTCGCGCACCAATGCCAAACAGATCGCTGCTGGCCACTACTTC
 AACGCATCCTGCCATGGTGTAAATGGTACTGTCCATGCCGGACCCCGCGACACCGGGCGAT
 GACTATCTCCCATCGTCAAGGCTCTCATGAGCGCTGTCTGAAGACCGGGGCGTTCCCACC
 AAGAAAAGACTTCGGATGCGGTGACCCCATGGTGTGTCCATGTTCCCAACACCTTGACAC
 GAAGACCAAGTGGCTCCGATGCCGCTCGCGAATGGCTACTTCCCAACTACCAACGTCCC
 AACCTGCAAGTCTTGACCGGACAGTATGTTGGTAAGGTGCTCCTTAGCCAGAACGGCACC
 ACCCTCGTGCCGTTGGCGTGGAAATTCGGCACCCACAAGGGCAACACCCACAACGTTTAC
 GCTAAGCACGAGGTCTTCTGGCCGCGGGCTCCGCTGTCTCTCCACAATCCTCGAATAT
 TCCGGTATCGGAATGAAGTCCATCCTGGAGCCCCTTGGTATCGACACCGTCCGTTGACCTG
 CCCGTCCGCTTGAACCTGCAGGACCAGACCACCGCTACCGTCCGCTCCCGCATCACCTCT
 GCTGGTGCAGGACAGGGACAGGCCGCTTGGTTCGCCACCTTCAACGAGACCTTTGGTGAC
 TATTCCGAAAAGGCACACGAGCTGCTCAACACCAAGCTGGAGCAGTGGGCCCAGAGAGGCC
 GTCGCCCGTGGCGGATTCACACAACACCACCGCCTTGTCTCATCCAGTACGAGAACTACCGC
 GACTGGATTGTCAACCACAACGTCGCGTACTCGGAAGTCTTCTCGACACTGCCGGAGTA
 GCCAGCTTCGATGTGTGGGACCTTCTGCCCTTACCCGAGGATACGTTACACATCCTCGAC
 AAGGACCCCTACCTTACCACCTTCGCCCTACGACCCTCAGTACTTCTCAACGAGCTGGAC
 CTGCTCGGTGACGGTCCGCTACTCAACTGGCCCGCAACATCTCCAACCTCCGGTGCCATG
 CAGACCTACTTCGCTGGGGAGACTATCCCCGGTGATAACCTCGCGTATGATGCCGATTTG
 AGCGCTGGACTGAGTACATCCCGTACCCTTCCGTCCTAACTACCATGGCGTGGGTACT
 TGCTCCATGATGCCGAAGGAGATGGGCGGTGTTGTTGATAATGCTGCCCGTGTGTATGGT
 GTGCAGGGACTGCGTGTGATGATGGTCTATTCTCCTACGCAAATGTCGTCCCATGTC
 ATGACGGTGTCTATGCCATGGCGCTAAAAATTTCCGGATGCTATCTTGAAGATTATGCT
 TCCATGCAG

5 En la siguientes sección 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] y se pueden adaptar como se requiera por el experto en la técnica.

10 Ejemplos

La presente invención se ilustrará en detalle por medio de los ejemplos a continuación, aunque la presente invención no estará limitada a esos ejemplos específicos.

15 La esencia de la presente invención es el hallazgo inesperado y sorprendente de variantes de GOx específicas que presentan propiedades mejoradas sobre GOx conocidas en el campo de las mediciones de glucemia, es decir, manteniendo su especificidad para el sustrato glucosa y reduciendo significativamente las tasas de consumo de oxígeno por medio de un cambio de actividad oxidasa hacia actividad deshidrogenasa y/o teniendo una actividad incrementada para mediadores de electrones distintos del oxígeno específicos.

20 Para demostrar las propiedades de GOx de las variantes de GOx de acuerdo con la invención, los inventores no pudieron confiar en la mayoría de los ensayos de actividad disponibles que indican la reducción de oxígeno molecular a peróxido de hidrógeno. Específicamente, para la transferencia de electrones mediada, Zhu et al. (2006; 2007) establecieron un ensayo de detección por GOx basado en producto (a continuación en el presente documento GODA) [Zhu, Z., Momeu, C., Zakhartsev, M. y Schwaneberg, U. (2006). Making glucose oxidase fit for biofuel cell applications by directed protein evolution. *Biosensors and Bioelectronics* 21, 2046-2051; Zhu, Z., Wang, M., Gautam, A., Nazor, J., Momeu, C., R, P., y U, S. (2007). Directed evolution of glucose oxidase from *Aspergillus niger* for ferrocenemethanol-mediated electron transfer. *Biotechnology Journal* 2, 241-248]. Esos ensayos, de hecho, permiten la detección independiente del oxígeno de gluconolactona, pero todavía en presencia de oxígeno no es posible detectar específicamente la transferencia de electrones mediada por mediadores distintos del oxígeno, lo que es altamente
 30 pertinente en el caso de dispositivos analíticos para glucemia en tiempo real.

En los siguientes ejemplos, los inventores sometieron a prueba, por lo tanto, variantes de GOx específicas de la invención, por separado para determinar su transferencia de electrones mediada, la transferencia de electrones por oxígeno y su especificidad para glucosa para demostrar la esencia de la invención. Además, también se sometieron a
 35 prueba las propiedades en términos de termoestabilidad.

En consecuencia, los inventores usaron ensayo de ABTS bien conocido [Sun, L., Bulter, T., Alcalde, M., Petrounia, I.P. y Arnold, F.H. (2002). *Modification of galactose oxidase to introduce glucose 6-oxidase activity. Chembiochem* 3, 781-783] para detectar la actividad de las variantes de GOx en oxígeno. La figura 1 muestra el principio de la determinación de la actividad en oxígeno.

Pruebas para variantes de GOx

Para someter a prueba las sustituciones aminoacídicas apropiadas para determinar su mejora sobre las propiedades de GOx en términos de especificidad para glucosa, tasas de consumo de oxígeno reducidas y/o actividad incrementada para mediadores específicos distintos del oxígeno, se sometieron a prueba variantes de GOx específicas de la invención

(i) para determinar sus tasas de consumo de oxígeno, es decir, la actividad enzimática usando oxígeno como un aceptador de electrones en un ensayo de ABTS colorimétrico y

(ii) para determinar la transferencia de electrones mediada por el mediador de nitrosoanilina como mediador ejemplar

(iii) para determinar la transferencia de electrones mediada por el mediador de nitrosoanilina como mediador ejemplar en presencia de diferentes azúcares como sustrato, es decir, glucosa, galactosa, maltosa, xilosa, maltotriosa.

Para dicha transferencia de electrones mediada se usó un compuesto de p-nitrosoanilina [Becker, O. (2005). *Die Glucose-Dye-Oxidoreduktase in der klinischen Diagnostik. Tesis DOCTORAL, Technische Universität Kaiserslautern, Kaiserslautern*]. La figura 2 muestra el principio del ensayo de mediador, es decir, un ensayo de PMO (ácido fosfomolibdico), en el que se aplica el mediador de nitrosoanilina N,N-bis(2-hidroxietil)-4-nitrosoanilina.

En el ensayo anterior, dos electrones, que resultan de la reacción con mediador, se transfieren al PMO. El PMO se reduce posteriormente. El cambio de color de amarillo pálido, del PMO oxidado, a azul oscuro, del PMO reducido, se controló por absorción a 700 nm.

Para demostrar las variantes de GOx específicas de acuerdo con la invención, el ensayo de mediador descrito anteriormente se adaptó a bajas actividades GOx en sobrenadantes de células de levadura que muestran un amplio intervalo de detección lineal de 0,65 U/l a 22 U/l en tampón fosfato de potasio (0,2 M, pH 7,0). Se obtuvo una desviación estándar en una placa de 96 pocillos de un 10,2 % en dichas condiciones. Para el cálculo de la desviación estándar, se consideró el fondo restando los valores del control negativo (desviación estándar real).

Variantes de glucosa oxidasas

De acuerdo con la invención, el doble mutante como se describe en Zhu *et al.* (2006; 2007) se eligió como material de partida para las sustituciones aminoacídicas específicas proporcionadas en el presente documento. Este doble mutante tiene las dos sustituciones T30V e I94V presentes de forma inherente (SEQ ID NO: 1). El GOx-T30V; I94V muestra una estabilidad térmica mejorada, una estabilidad con respecto al pH mejorada, así como un valor de k_{cat} incrementado (de 69,5/s a 137,7/s) [Zhu, Z., Wang, M., Gautam, A., Nazor, J., Momeu, C., R, P. y U, S. (2007). *Directed evolution of glucose oxidase from Aspergillus niger for ferrocenemethanol-mediated electron transfer. Biotechnology Journal* 2, 241-248].

Se eligió una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* hipoglucosilante como huésped de expresión [Lehle, L., Eiden, A., Lehnert, K., Haselbeck, A., y Kopetzki, E. (1995). *Glycoprotein biosynthesis in Saccharomyces cerevisiae: ngd29, an N-glycosylation mutant allelic to ochl having a defect in the initiation of outer chain formation. FEBS Lett* 370, 41-45].

Después del cultivo de los clones celulares que tienen sustituciones aminoacídicas específicas de acuerdo con la invención, se aplicaron en paralelo el ensayo de mediador y el ensayo de ABTS. Los clones, que mostraron actividad para mediador incrementada, actividad para oxígeno reducida, o ambas, se seleccionaron para su investigación adicional. Por lo tanto, los clones seleccionados y los controles se cultivaron y cribaron 12 veces. Posteriormente, los genes de GOx de variantes mejoradas de acuerdo con la invención se aislaron y secuenciaron. Posteriormente, dichos genes de variantes seleccionadas sirvieron como moldes para otras sustituciones aminoacídicas específicas.

Caracterización de las posiciones de aminoácido

Los inventores caracterizaron además las posiciones de aminoácido específicas de las variantes de GOx proporcionadas en el presente documento, es decir, S53; A137; A173; A332; F414; y V560. Estas posiciones se representan en la figura 3.

Precaracterización

Para investigar adicionalmente variantes de GOx específicas, los inventores realizaron una precaracterización,

considerando las siguientes propiedades:

1) consumo de oxígeno

5 2) especificidad para glucosa como sustrato

3) cinética de Michaelis-Menten (actividad para mediador/afinidad por glucosa) y

4) estabilidad térmica.

10 El cultivo de los clones celulares correspondientes tuvo lugar en matraces de agitación convencionales. Los sobrenadantes se concentraron y tamponaron en fosfato de potasio 0,2 M, pH 7.

1) Tasa de consumo de oxígeno

15 El consumo de oxígeno se determinó indirectamente por la oxidación del sustrato cromógeno ABTS como se explica en el punto gg) en la sección Materiales y procedimientos a continuación. Para demostrar estos datos, el consumo de oxígeno se midió directamente usando una sonda óptica de oxígeno. Las variantes de GOx se normalizaron a 2 U/l en el enfoque de la reacción.

2) Especificidad

20 Como ya se explica anteriormente, la especificidad de GOx para el sustrato glucosa desempeña un papel importante en la determinación de glucosa enzimática, puesto que existen azúcares clínicamente pertinentes junto a la glucosa, tales como los cuatro azúcares galactosa, maltosa, xilosa y maltoriosa. Por lo tanto, para demostrar la especificidad de las variantes de GOx proporcionadas en el presente documento, se eligieron dichos azúcares y se compararon con glucosa. Para estos estudios se usó el ensayo de mediador, se aplicó 181,8 mM de cada azúcar.

3) Actividad para mediador/afinidad por glucosa

30 Para un estudio más detallado sobre la actividad para mediador y para una determinación de la afinidad por glucosa, los inventores aplicaron pruebas de las variantes divulgadas en el presente documento para la cinética de Michaelis-Menten.

4) Termoestabilidad

35 La termoestabilidad de las variantes de GOx seleccionadas de la invención se analizó aplicando el ensayo de mediador como se explica en la sección Materiales y procedimientos en el punto ff). Como controles adicionales, también se analizaron una GOx hiperglucosilada, expresada en *Aspergillus niger* y la GOx-WT desglucosilada.

Caracterización final de la variante de GOx GOx-EZ07

40 Para la caracterización final, se cultivó la cepa de *S. cerevisiae* que expresaba GOx-EZ07 respectiva en un fermentador de 10 l, la GOx-EZ07 obtenida se purificó posteriormente. La pureza de la preparación enzimática final fue mayor de un 90 % en tampón fosfato de potasio 50 mM, pH 7. Como en la fase de precaracterización, se estudiaron el consumo de oxígeno, la especificidad, la actividad y la afinidad por glucosa. Para la determinación específica de la concentración de GOx, se aplicó un ELISA (véase la sección Materiales y procedimientos en el punto ee). La variante GOx-EZ07 también se caracterizó en términos de

50 1a) consumo de oxígeno

2a) especificidad para glucosa como sustrato

3a) cinética de Michaelis-Menten (actividad para mediador/afinidad por glucosa) y

55 4a) termoestabilidad.

1a) Consumo de oxígeno de GOx-EZ07

60 La medición se implementó como se describe en 1). Todas las enzimas sometidas a prueba (GOx-WT; GOx-T30V; I94V, y la GOx-EZ07) se purificaron por un protocolo estándar como se explica en la sección Materiales y procedimientos en el punto dd) y se ajustaron a una concentración de proteína de 5 µg/ml.

65 Se detectaron las siguientes tasas de consumo de oxígeno [%/min]: GOx-WT: 17,44; GOx-T30V; I94V: 24,22 y la GOx-EZ07 de la invención: 3,86. La actividad para oxígeno residual de la GOx-EZ07 es de un 15,9 % en comparación con GOx-T30V; I94V, y de un 22,13 % en comparación con GOx-WT.

2a) Especificidad de GOx-EZ07

La medición se implementó como se describe en 2).

3a) Cinética de Michaelis-Menten de GOx-EZ07

La medición se implementó como se describe en 3).

4a) Termoestabilidad

La medición se implementó como se describe en 4).

Resultados

Los inventores descubrieron las seis posiciones de aminoácido distintas S53; A137; A173; A332; F414; y V560, que son responsables de las tasas de consumo de oxígeno reducidas y/o actividad para mediador incrementada para mediadores distintos del oxígeno. Además, los inventores descubrieron efectos cooperativos entre las seis posiciones de aminoácido que posibilitan al experto en la técnica diseñar variantes de GOx en términos de especificidad para glucosa, tasas de consumo de oxígeno significativamente reducidas y/o actividad incrementada para mediadores distintos del oxígeno.

En particular, los inventores descubrieron que las posiciones V560 y F414, solas o bien en combinación, son responsables de reducir significativamente las tasas de consumo de oxígeno y/o son responsables de incrementar significativamente la actividad para mediador. Además, se descubrió que las posiciones A173 y A332 eran responsables de ambas en combinación, es decir, un incremento significativo de la actividad para mediador y simultáneamente una reducción significativa de las tasas de consumo de oxígeno de las variantes de GOx proporcionadas en el presente documento. Se descubrió que las posiciones S53 y A137 eran responsables de incrementar significativamente la actividad para mediador para mediadores específicos distintos del oxígeno. Además, los inventores descubrieron que aminoácidos específicos eran adecuados para las variantes de GOx proporcionadas por la presente invención.

La tabla 1 muestra de forma ejemplar un conjunto adecuado de aminoácidos para las posiciones 173, 332, 414 y 560 y los codones redundantes correspondientes.

Residuo	Conjunto reducido de aminoácidos	Codones redundantes
173	AITV	RYT
332	SN	ART
414	RNDCGHILFSTV	NDT
560	AILMPTV	VYK

Las actividades específicas de las variantes de GOx sometidas a prueba de acuerdo con la invención se muestran en la tabla 2 mediante una numeración de EZ respectiva. La tabla es una comparación de las variantes de GOx sometidas a prueba de acuerdo con la invención con respecto a la actividad para mediador por medio del ensayo de mediador y las propiedades de consumo de oxígeno por medio del ensayo de ABTS.

Los resultados se muestran en forma de una proporción (cociente) entre las variantes de GOx de acuerdo con la invención y el mutante original, es decir, el GOx-T30V; I94V como material de partida. Los resultados de las diferentes placas de microvaloración fueron comparables. La proporción se basa en las actividades específicas [U/mg], determinadas por la técnica de ELISA convencional como se explica en la sección Materiales y procedimientos en el punto ee). La tabla también muestra las sustituciones exactas de las posiciones de aminoácido sometidas a prueba de acuerdo con la presente invención.

Tabla 2: Variantes de GOx específicas de la invención con un código numérico de EZ, sometidas a prueba para determinar la actividad para mediador y para determinar la actividad para oxígeno (residual).

Variante de GOx	A 173	A 332	A 137	F 414	V 560	S 53	Variante de GOx con respecto a actividad para mediador/GOx-T30V; I94V	Variante de GOx con respecto a actividad para oxígeno/GOx-T30V; I94V
Gox-T30V; I94V (referencia)	-	-	-	-	-	-	1,0	1,0
EZ03	T	-	-	L	-	-	1,5	0,1
EZ05	-	S	-	-	A	-	1,1	0,1
EZ12	-	S	-	-	-	F	1,7	1,5
EZ06	I	S	-	L	-	-	1,6	0,3
EZ07	V	S	-	I	T	-	4,4	0,1
EZ08	V	N	-	-	P	-	1,0	0,1
EZ10	V	N	-	V	L	-	2,2	0,1
EZ11	-	S	-	-	P	-	1,2	0,1
EZ15	-	-	L	-	-	-	6,0	4,0

5 Los resultados muestran las diferentes variantes específicas (EZ03, EZ05, EZ12, EZ06, EZ07, EZ08, EZ10, EZ11, EZ15) que tienen las propiedades esenciales de acuerdo con la invención, es decir, la afinidad por oxígeno reducida que da lugar a tasas de consumo de oxígeno significativamente reducidas y/o la actividad para mediador incrementada en comparación con el mutante original GOx-T30V; I94V. Las variantes EZ03, EZ05, EZ07, EZ08 y EZ10 estaban sometidas a otros estudios.

10 Por ejemplo, los inventores descubrieron que tanto la GOx-EZ07 como EZ10 muestran mejoras significativas en cuanto a actividad para mediador incrementada, así como una disminución significativa en el ensayo de oxígeno en comparación con el mutante original.

15 En particular, los inventores descubrieron que la variante EZ07 como que era una variante de GOx significativamente mejorada de acuerdo con la invención sin ninguna limitación a las sustituciones aminoacídicas específicas correspondientes de dicha variante. EZ07 muestra un incremento en 4,4 veces en el ensayo de mediador en comparación con el mutante original y solo una actividad para oxígeno en 0,1 veces de la actividad para oxígeno del mutante original en el ensayo de ABTS. En cambio, las variantes de GOx EZ12 y EZ15 muestran incrementos simultáneos tanto para actividad para mediador como para oxígeno en comparación con el mutante original. EZ12 tiene una sustitución adicional en la posición S53 en comparación con el mutante original (véase la tabla 2). Además, se descubrió que EZ15 tenía un incremento en 6 veces de la actividad para mediador debido a la sustitución aminoacídica A137L.

25 Caracterización de las posiciones de aminoácido

30 Las posiciones A173 y A332 están lejos del sitio activo. A173 es una posición en superficie; A332 se localiza cerca del canal de entrada de sustrato. Las dos posiciones F414 y V560, que influyen en la actividad para oxígeno, se localizan cerca del sitio activo. F414 está por encima del sitio de unión a glucosa y V560 se sitúa junto a glucosa y FAD. Las dos posiciones de actividad A137 y S53 son posiciones en superficie cerca del FAD.

Precharacterización

35 Los resultados para las variantes precharacterizadas seleccionadas son como sigue:

1) Tasa de consumo de oxígeno

40 La figura 4 muestra la progresión del contenido de oxígeno en la mezcla de reacción como una función del tiempo (a) y la tasa de consumo de oxígeno por minuto (b). Como controles, también se analizaron el GOx-T30V; I94V, GOx-WT y el sobrenadante de la cepa de control negativo.

45 La GOx-WT y GOx-T30V; I94V muestran un comportamiento similar. Por tanto, todas las variantes de GOx sometidas a prueba aquí (EZ03, EZ05, EZ07, EZ08, EZ10) tienen una tasa de consumo de oxígeno significativamente reducida. Además, como hallazgo sorprendente e inesperado de la presente invención, las variantes sometidas a prueba no se pueden distinguir claramente del control negativo, lo que indica que las actividades para oxígeno respectivas están

incluso por debajo del intervalo de detección del ensayo en las condiciones seleccionadas.

2) Especificidad

5 La tabla 3 muestra las actividades enzimáticas de GOx residuales que hacen referencia a glucosa.

Tabla 3: Actividad residual de las variantes de GOx de la invención para diferentes azúcares. Para la determinación de las actividades residuales se aplicó el ensayo de mediador para la caracterización. La concentración de sustrato fue 181,8 mM en las mezclas de reacción respectivas. Las actividades GOx-WT y GOx-T30V; I94V sirvieron como referencias.

Actividad residual [%]	Glucosa	Galactosa	Maltosa	Xilosa	Maltotriosa
GOx-WT	100	1,4	0	2,6	0
GOx-T30V; I94V	100	1,6	0	2,6	0
EZ03	100	2,9	0	5,3	0
EZ05	100	3,3	0,3	3,8	0
EZ10	100	1,1	0	3,1	0
EZ08	100	4,0	0,2	4,7	0
EZ07	100	0	0	3,6	0

En comparación con la GOx-WT y el mutante original GOx-T30V; I94V de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, ninguna de las variantes de GOx de la invención mostró interferencias significativas con maltosa o maltotriosa. EZ07 y EZ10 tienen los mejores resultados para todos los azúcares sometidos a prueba.

3) Actividad para mediador/afinidad por glucosa

La cinética de Michaelis-Menten se representa en la figura 5. La tabla 4 muestra los valores calculados para $V_{m\acute{a}x}$ y K_M .

Tabla 4: Parámetros enzimáticos para diferentes variantes de GOx. Los parámetros se calcularon de acuerdo con Michaelis-Menten aplicando el procedimiento de mínimos cuadrados en Microsoft Excel.

Variante de GOx	$V_{m\acute{a}x}$	K_M
GOx-WT	0,53	25,90
GOx-T30V; I94V	0,83	21,84
EZ03	2,00	46,62
EZ05	0,57	24,83
EZ07	6,35	40,26
EZ08	1,37	49,69
EZ10	3,75	40,14

La tabla 4 muestra que EZ07 tiene, por una parte, un valor de $V_{m\acute{a}x}$ aproximadamente 7,5 veces mayor en comparación con el mutante original GOx-T30V; I94V, pero, por otra parte, un valor de K_M casi dos veces mayor. Sin embargo, el alto valor de K_M es un resultado del alto valor de $V_{m\acute{a}x}$. En la figura 5 se puede observar claramente que el rendimiento de GOx-EZ07 a bajas concentraciones de sustrato es comparable a la WT y al mutante original T30V, I94V. La GOx-EZ10 obtuvo resultados similares, pero un menor valor de $V_{m\acute{a}x}$.

4) Termoestabilidad

En la figura 6, se representa en diagrama la actividad residual para ocho temperaturas diferentes.

Las variantes de GOx sometidas a prueba en virtud de la invención, la GOx-WT y el mutante original GOx-T30V; I94V muestran resultados similares. Se puede observar un descenso significativo de la termoestabilidad para la GOx-WT desglucosilada; sin embargo, la molécula hiperglucosilada muestra una mayor termoestabilidad.

Conclusión

En conclusión de las pruebas específicas de 1) a 4) durante todos los estudios de precaracterización, la variante GOx-EZ07 y la GOx-EZ10 mostraron los resultados más significativos. Se logró un descenso significativo de la actividad para oxígeno, así como un incremento significativo de la actividad para mediador de acuerdo con los resultados de precaracterización. La especificidad de GOx-EZ07 y GOx-EZ10 casi no ha cambiado, solo se detectó un ligero cambio de actividad en la xilosa. Puesto que la actividad de la EZ07 es aproximadamente 1,7 veces mayor que la actividad de EZ10, se eligió la GOx-EZ07 para la caracterización final.

Se debe enfatizar que los resultados anteriores se generaron usando variantes de GOx no purificadas de la invención. En consecuencia, el experto en la técnica está al tanto de que los resultados pueden variar después de usar variantes de GOx purificadas similares. Además, la determinación de proteína específica en sobrenadantes de células aplicando ELISA se puede ver afectada por las impurezas.

Caracterización final de la variante GOx-EZ07

Para la caracterización final se eligió la variante GOx-EZ07 purificada.

1a) Consumo de oxígeno de GOx-EZ07

La tasa de consumo de oxígeno relativa de la GOx-WT, GOx-T30V; I94V y la GOx-EZ07 se representan en la figura 7.

En las condiciones seleccionadas, la tasa de consumo de oxígeno de GOx-EZ07 se reduce más de 10 veces en comparación con la GOx-WT, lo que confirma los datos del estudio de precaracterización.

2a) Especificidad de GOx EZ07

La figura 8 muestra la actividad residual de la GOx-WT, GOx-T30V; I94V y la GOx-EZ07 que hacen referencia a glucosa (100 %). La figura 8 muestra que no existe ningún cambio significativo de la especificidad de GOx-EZ07 en comparación con GOx-T30V; I94V y GOx-WT.

3a) Cinética de Michaelis-Menten de la variante de GOx EZ07

La figura 9 compara la cinética de GOx-WT, GOx-T30V; I94V y la GOx-EZ07 en el ensayo de mediador.

De acuerdo con la figura 9, la variante de GOx EZ07 muestra una actividad residual de un 641,5 % en el ensayo de mediador y una actividad residual de un 17,5 % en el ensayo de ABTS en comparación con la GOx-WT, dando como resultado una actividad oxidasa reducida 37 veces.

4a) Termoestabilidad de la GOx-EZ07

La figura 10 indica que la estabilidad térmica de la GOx-EZ07 se mantuvo por las sustituciones respectivas, en comparación con la GOx-WT y el GOx-T30V; I94V.

Sumario para las variantes de GOx

Se identificaron seis posiciones de aminoácido en el mutante original GOx-T30V, I94V, que muestran efectos sobre la especificidad para glucosa de las variantes de GOx proporcionadas en el presente documento, sobre la actividad enzimática para la transferencia de electrones mediada y sobre la actividad para oxígeno. Todas las posiciones se saturaron individualmente. Para estudiar los efectos cooperativos, se saturaron simultáneamente las posiciones agrupadas alrededor del sitio activo (S53; A137; A173; A332; F414; V560). Las variantes más significativas en cuanto a una actividad para mediador mejorada y/o tasas de consumo de oxígeno reducidas en comparación con las propiedades del mutante original se eligieron para la precaracterización. Lo que ocurrió es que la variante GOx-EZ07 (que tiene las sustituciones adicionales A173V; A332S; F414I; y V560T) muestra los resultados más significativos para las propiedades sometidas a prueba especificidad para glucosa, actividad para mediador y tasas de consumo de oxígeno en el sentido de la presente invención.

Por tanto, se estudió intensamente la GOx-EZ07 en cuanto a su actividad para mediador, actividad oxidasa, especificidad para glucosa, así como sus propiedades de estabilidad térmica. La variante muestra un incremento en 6,4 veces de la actividad específica para la transferencia de electrones mediada (GOx-WT: 7,4; GOx-EZ07: 47,5 U/mg) y una actividad reducida 5,7 veces en el ensayo de ABTS (GOx-WT: 451,1 U/mg; GOx-EZ07: 78,86 U/mg), dando como resultado una actividad oxidasa reducida 36,5 veces. GOx-EZ07 no tiene cambios significativos en la estabilidad térmica o especificidad.

Materiales y procedimientos

Todos los productos químicos fueron de calidad analítica y se adquirieron de Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Alemania),

Applichem (Darmstadt, Alemania) o Carl Roth (Karlsruhe, Alemania). Todas las enzimas se adquirieron de New England Biolabs (Reino Unido) y Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Alemania). El vector transportador pYES2 y la cepa DH5 α de *Escherichia coli* se adquirieron de Invitrogen (Karlsruhe, Alemania). La cepa 7087 de *Saccharomyces cerevisiae* (ngd29mnn1) se proporcionó por Roche Diagnostics [Lehle, L., Eiden, A., Lehnert, K., Haselbeck, A. y Kopetzki, E. (1995). *Glycoprotein biosynthesis in Saccharomyces cerevisiae: ngd29, an N-glycosylation mutant allelic to och1 having a defect in the initiation of outer chain formation. FEBS Lett 370, 41-45*]. El ADN se cuantificó usando un fotómetro NanoDrop (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, EE. UU.). La secuenciación y síntesis de oligonucleótidos se realizó por Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Alemania). Los cebadores usados se mencionan en la tabla 5 (información de apoyo).

aa) Mutagénesis de saturación de sitios múltiples y únicos

Para la mutagénesis de saturación de sitios múltiples se aplicó el protocolo de Omnichange [Dennig, A., Shivange, A.V., Marienhagen, J., y Schwaneberg, U. (2011). *Omnichange: The Sequence Independent Method for Simultaneous Site-Saturation of Five Codons. PLoS ONE 6, e26222*]. 400 μ l de mezcla de reacción para PCR contenían 1 ng/ μ l de molde plasmídico, 1x tampón Phusion (New England Biolabs, Fráncfort, Alemania), 1 U de polimerasa Phusion y dNTP 200 μ M. La mezcla de reacción se dividió en cuatro volúmenes iguales y se añadió 250 nM de cebador directo y cebadores inversos, que seleccionan como diana sitios específicos, para las amplificaciones de fragmentos. En la mezcla para la amplificación del esqueleto del vector, se añadieron dNTP adicionales para obtener una concentración final de 300 μ M. Para el fragmento 1, que selecciona como diana A173, se añadieron los cebadores P7 y P8 en la mezcla maestra. Mientras que para la saturación de A332, se usaron P9 y P10. Se seleccionó como diana el sitio F414 usando P11 y P12. El sitio V560 se incluyó en el esqueleto del vector, ya que se amplificó por P13 y P14. El programa de PCR para la amplificación de fragmentos fue de 98 °C durante 45 s (1 ciclo); 98 °C durante 15 s; 65 °C durante 30 s; 72 °C durante 30 s (20 ciclos); 72 °C durante 5 min (1 ciclo). Para la amplificación del esqueleto del vector, se aplicó un tiempo de extensión de 4 min. Todos los fragmentos se purificaron en columna y la concentración se midió en un fotómetro NanoDrop (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, EE. UU.). A continuación, el producto de PCR se sometió a digestión con *DpnI* durante la noche (5 U de cada).

Digestión y unión de fragmentos: La concentración de los fragmentos de inserto se ajustó a 0,06 pmol/ μ l. Mientras, la concentración del esqueleto del vector se ajustó a 0,02 pmol/ μ l (también se tomó en consideración el factor de dilución con digestión con *DpnI*). Se añadió 1 μ l de solución de escisión (50 % de (Tris 500 mM, pH 9,0), 30 % de (yodo 100 mM en etanol) y 20 % de dH₂O) a 4 μ l de cada fragmento. A continuación, la reacción se incubó a 70 °C durante 5 min. Los fragmentos escindidos se mezclaron entre sí y se incubaron a temperatura ambiente (TA) durante 5 min antes de la transformación de DH5 α de *E. coli* químicamente competente para la amplificación de la colección. Para la transformación de la levadura, la genoteca se aisló de DH5 α de *E. coli* usando el kit de aislamiento de plásmidos "NucleoSpin® Plasmid" (MACHERY-NAGEL, Düren, Alemania).

Para la mutagénesis de saturación de sitios individuales (SSM) se ha seguido un protocolo de PCR en dos etapas [Sambrook, J., y Russel, D. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual, volumen 2 (Cold Spring Harbor Laboratory Press)*], 50 μ l de mezcla de reacción para PCR contenían 1 ng/ μ l de molde plasmídico, 1x tampón Phusion (New England Biolabs, Fráncfort, Alemania), 1 U de polimerasa Phusion y dNTP 300 μ M. La mezcla de reacción se dividió en dos volúmenes iguales y se añadió 400 nM de cebador directo y cebador inverso del sitio seleccionado como diana a mezclas de reacción separadas. El programa de PCR fue de 98 °C durante 45 s (1 ciclo); 98 °C durante 15 s; 65 °C durante 30 s; 72 °C durante 4 min (5 ciclos); 72 °C durante 5 min (1 ciclo). Después de la primera etapa, ambas reacciones se agruparon y se llevó a cabo el mismo programa con 15 repeticiones más para los ciclos de amplificación. Se usaron los siguientes cebadores: P15/P16 para la posición 173, P17/P18 para la posición 332, P19/P20 para la posición 414 y P21/P22 para la posición 560. El producto de PCR se purificó en columna y posteriormente se sometió a digestión con *DpnI*.

bb) Clonación génica y transformación de células de levadura

La clonación de los genes de GOx mutada en el esqueleto del vector pYES2 se realizó de acuerdo con un procedimiento libre de ligasa mediado por recombinación [Oldenburg, K.R., Vo, K.T., Michaelis, S., y Paddon, C. (1997). *Recombination-mediated PCR-directed plasmid construction in vivo in yeast. Nucleic Acids Research 25, 451-452*]. En primer lugar, se linealizaron 2 μ g de doble mutante T30V; I94V de GOx en pYES2 por digestión con Sall/BamHI (10 U/ μ g de ADN, 6 h, 37 °C) y posteriormente se purificó por extracción en gel empleando el kit NucleoSpin® Extract II (MACHERY-NAGEL, Düren, Alemania). Los cebadores, usados para la amplificación de la colección, se diseñaron de modo que toda la secuencia de cebador sea complementaria al esqueleto del vector linealizado.

En segundo lugar, el vector pYES2 linealizado y la genoteca amplificada se mezclaron en una proporción de 1:3 (250/750 ng). Esta mezcla de ADN se usó para la transformación de 7087 de *Saccharomyces cerevisiae* empleando un procedimiento con acetato de litio [Gietz, R.D. y Schiestl, R.H. (2007). *High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. Nature Protocols 2, 31-34*]. Los transformantes se cultivaron en placas selectivas con SC-U que contenían glucosa al 2 %. Para la transformación de plásmidos circulares se usaron 300 ng de ADN.

cc) Cultivo y expresión en placas de 96 pocillos

Se transfirieron las colonias únicas cultivadas en placas de agar selectivas con SC-U que contenían glucosa al 2 % a placas de microvaloración de 96 pocillos (fondo P de PS, Greiner Bio-One) que contenían 100 µl de medios SC-U (glucosa al 1 %) por pocillo usando palillos de dientes. El cultivo del precultivo tuvo lugar en un agitador de placas (Infors GmbH, Eisenach, Alemania) en las siguientes condiciones: 900 rpm, 30 °C, 70 % de humedad, 24 h. Se transfirió una determinada cantidad de precultivo de cada pocillo a 500 µl de medios de autoinducción SC-U (glucosa al 0,5 %/galactosa al 2 %) en una placa de pocillos profundos (Riplate rectangular, de Ritter). El cultivo principal se cultivó en las mismas condiciones que el precultivo, pero durante 72 h. Las placas se centrifugaron a 4000 rpm y TA durante 20 min. Los sobrenadantes resultantes se usaron para las determinaciones de la actividad.

dd) Producción y purificación de GOx recombinante

Precultivo: Se inocularon 500 ml de medios SynY (glucosa al 2 %) a una DO a 600 = 0,2 usando un cultivo durante la noche de Sc7087/GOx en pYES2, los cultivos tuvieron lugar en matraces de agitación de 5 l durante 12 h a 30 °C y 250 rpm. Cultivo principal: Se inocularon 10 l de medios SynY (glucosa al 1 %) con 500 ml de precultivo. Para el cultivo se usó un fermentador de 10 l aplicando las siguientes condiciones: Temperatura: 30 °C; agitador: 400 rpm; flujo de aire: 1 vvm; tiempo: 48 h.

Separación celular e intercambio de tampón: El sobrenadante que contenía GOx se recuperó por microfiltración. Para este propósito, se usó la unidad de filtración de flujo cruzado Sartojet (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Gotinga, Alemania) con un casete con filtro (SARTOCON Slice, Hydrosart 0,45 µm, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Gotinga, Alemania). La presión de alimentación se ajustó a 2,0 bar (0,2 MPa) y la presión de retenido a 1,0 bar (0,1 MPa). Se usó el mismo sistema de filtración para el intercambio de tampón y la concentración de muestra aplicando un casete de ultrafiltración (SARTOCON Slice, Hydrosart 10 kDa, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Gotinga, Alemania) en las siguientes condiciones: tampón NaH₂PO₄ 50 mM, pH 6; volúmenes de intercambio de tampón: 7; presión de alimentación: 2,0 bar (0,2 MPa); presión de retenido: 1,0 bar (0,1 MPa); volumen final de 0,5 l.

Para la purificación de la enzima, se aplicó cromatografía de intercambio aniónico, usando el sistema piloto ÄKTA y una columna FinLine Pilot 35 (GE Healthcare, Múnich, Alemania). La columna se rellenó con 220 ml de resina (Fractogel TSK DEAE-650s, Merck), se seleccionó un caudal de 62,5 cm/h. Equilibrado: 440 ml de tampón fosfato de sodio 50 mM, pH 6; carga de muestra: 0,5 l de retenido; lavado: 440 ml de tampón fosfato de sodio 50 mM, pH 6; elución: 95 % de tampón fosfato de sodio 50 mM, pH 6/5 % de NaCl 1 M (gradiente escalonado). Las fracciones que contenían GOx se agruparon, posteriormente tuvo lugar un intercambio de tampón final frente a tampón fosfato de potasio 50 mM, pH 7 (Amicon® Ultracel-30k Millipore, Cork, Irlanda).

ee) Normalización de las concentraciones de proteína

Se usó un ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA) para la determinación específica de las concentraciones de GOx. Cada pocillo de una placa de microvaloración recubierta con estreptavidina (Roche, n.º de material 11643673001) se llenó con 100 µl de la solución de anticuerpo primario (2 µg/ml; Rabbit PAK GOD-Biotin Acris R1083B), la placa se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Después de una etapa de lavado posterior (4 veces 350 µl 9 g/l NaCl_Tween 20 al 0,1 %) se pipetearon 100 ml de muestra de enzima en los pocillos, seguido de una segunda etapa de incubación. La etapa de lavado se repitió y la placa se llenó con 100 µl de la solución de anticuerpo secundario (10 µg/ml; Rabbit PAK GOD-HRP Acris R1083HRP). Después de una tercera etapa de incubación y lavado, se llenó la placa con 100 µl de una solución de ABTS/H₂O₂ (11684302001, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania). La placa se incubó durante 30 min a temperatura ambiente antes de que se determinara la absorción a 405 nm. Se usó glucosa oxidasa de *Aspergillus niger* como patrón interno (G7141-50KU SIGMA-ALDRICH).

ff) Ensayo de mediador

Para la manipulación de líquidos se usaron pipetas de múltiples canales de Brand (Transferpette S-8) y Eppendorf (Research pro). Se transfirieron 75 µl de muestra (sobrenadantes preparados/solución de enzima) a una microplaca de fondo plano de 96 pocillos (Greiner Bio-One). Se añadieron 100 µl de solución de mediador (N,N-bis(2-hidroxietil)-4-nitrosoanilina 19,05 mM [Becker, O. (2005). *Die Glucose-Dye-Oxidoreduktase in der klinischen Diagnostik. Tesis DOCTORAL, Technische Universität Kaiserslautern, Kaiserslautern*], Roche, n.º de material 100088314; polivinilpirrolidona al 5 % (p/p), Roche, 10003476964; pH 7) y 20 µl de ácido fosfomolibdico 25 mM (Roche, n.º de Genisys: 11889893001). Las reacciones comenzaron añadiendo 25 µl de solución de sustrato y posteriormente agitando la placa a 1000 rpm durante 1 min. La cinética de la reducción de ácido fosfomolibdico se controló a 700 nm usando el lector de microplacas Tecan Sunrise (Tecan Trading AG, Suiza). Para el análisis cinético, se determinaron los valores de V_{máx} y K_M de los datos de velocidad inicial representados como una función de las concentraciones de sustrato con un coeficiente de correlación lineal de > 0,99.

gg) Ensayo de ABTS

Para la manipulación de líquidos se usaron pipetas de múltiples canales de Brand (Transferpette S-8) y Eppendorf

(Research pro). Se transfirieron 75 µl de muestra (sobrenadantes preparados/solución de enzima) a una microplaca de fondo plano de 96 pocillos (Greiner Bio-One) que contenía 100 µl de tampón fosfato (pH 7). Se añadieron 20 µl de mezcla de reacción a cada pocillo, dando como resultado las siguientes concentraciones: 0,91 U/ml de HRP; ABTS 2,3 mM. Las reacciones comenzaron añadiendo 25 µl de solución de sustrato y posteriormente agitando la placa a 1000 rpm durante 30 s. La oxidación de ABTS se determinó cinéticamente a 414 nm usando el lector de microplacas FLUOstar Omega (BMG LABTECH). Para el análisis cinético, se determinaron los valores de $V_{m\acute{a}x}$ y K_M de los datos de velocidad inicial representados como una función de las concentraciones de sustrato con un coeficiente de correlación lineal de $> 0,99$.

10 **hh) Ensayo de consumo de oxígeno**

Para la determinación directa del consumo de oxígeno se usó la sonda óptica de oxígeno "Fibox3 - Minisensor Oxygen Meter" (Precision Sensing GmbH, Ratisbona, Alemania). Los 1540 µl de mezcla de reacción consistían en 840 µl de tampón fosfato (0,2 M/pH 7), 175 µl de solución de sustrato y 525 µl de solución de GOx. El consumo de oxígeno (%/min) se determinó cinéticamente.

ii) **Estabilidad térmica**

Se incubaron 100 µl de la solución de enzima a la temperatura correspondiente durante 15 min y posteriormente se enfriaron en hielo durante 5 min. Se usaron 75 µl para las determinaciones de la actividad. Se estudiaron las siguientes temperaturas: 30-, 35-, 40-, 45-, 50-, 55-, 60- y 65 °C.

Tabla 5: Cebador usado en la sección experimental

Cebador	Secuencia
P1	GGC GTG AAT GTA AGC GTG ACA TA
P2	CACACTACCGCACTCCGTCG CCG GAT CGG ACT ACT AGC AG
P3	CCG GAT CGG ACT ACT AGC AG
P4	GTGTGATGGCGTGAGGCAGC GGC GTG AAT GTA AGC GTG ACA TA
P5	GTGGTCTCCCTCGCTGCGGCCCTGCCACACTACATCAGGAGCAATGGCA TTGAAGCCAG
P6	ATTACATGATGCGGCCCTCTAGATGCATGCTCGAGCGGCCGCCAGTGTG ATGGATATCTG
P7	ggtactgtccatRYTGGACCCCGCGACAC
P8	ggtggtctggctCTGCAGGTTCAAG
P9	gaccagaccaccARTACCGTCCGCTCCC
P10	gagttccgagtaCGCGACGTTGTGG
P11	tactcggaactcNDTCTCGACACTGCC
P12	atgggacgacatTTGCGTAGGAGG
P13	atgtcgtccatVYKATGACGGTGTCTA
P14	atggacagtaccATTAACACCATG
P15	GGT ACT GTC CAT NNK GGA CCC CGC GAC AC
P16	GTG TCG CGG GGT CCM NNA TGG ACA GTA CC
P17	GAC CAG ACC ACC NNK ACC GTC CGC TCC C
P18	GGG AGC GGA CGG TMN NGG TGG TCT GGT C
P19	TAC TCG GAA CTC NNK CTC GAC ACT GCC
P20	GGC AGT GTC GAG MNN GAG TTC CGA GTA
P21	ATG TCG TCC CAT NNK ATG ACG GTG TTC TA
P22	TAG AAC ACC GTC ATM NNA TGG GAC GAC AT

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Roche Diagnostics GmbH
 5 F. Hoffmann-La Roche AG
 <120> Glucosa oxidasas novedosas derivadas de *Aspergillus niger*
 <130> R75001WO
 10 <150> 13152935.6
 <151> 28-01-2013
 <160> 17
 15 <170> PatentIn versión 3.3
 <210> 1
 <211> 583
 20 <212> PRT
 <213> *Aspergillus niger*
 <400> 1

Ser Asn Gly Ile Glu Ala Ser Leu Leu Thr Asp Pro Lys Asp Val Ser
 1 5 10 15

Gly Arg Thr Val Asp Tyr Ile Ile Ala Gly Gly Gly Leu Val Gly Leu
 20 25 30

Thr Thr Ala Ala Arg Leu Thr Glu Asn Pro Asn Ile Ser Val Leu Val
 35 40 45

Ile Glu Ser Gly Ser Tyr Glu Ser Asp Arg Gly Pro Ile Ile Glu Asp
 50 55 60

Leu Asn Ala Tyr Gly Asp Ile Phe Gly Ser Ser Val Asp His Ala Tyr
 65 70 75 80

Glu Thr Val Glu Leu Ala Thr Asn Asn Gln Thr Ala Leu Val Arg Ser
 85 90 95

Gly Asn Gly Leu Gly Gly Ser Thr Leu Val Asn Gly Gly Thr Trp Thr
 100 105 110

Arg Pro His Lys Ala Gln Val Asp Ser Trp Glu Thr Val Phe Gly Asn
 115 120 125

Glu Gly Trp Asn Trp Asp Asn Val Ala Ala Tyr Ser Leu Gln Ala Glu
 130 135 140

Arg Ala Arg Ala Pro Asn Ala Lys Gln Ile Ala Ala Gly His Tyr Phe
 145 150 155 160

25

ES 2 779 725 T3

Asn Ala Ser Cys His Gly Val Asn Gly Thr Val His Ala Gly Pro Arg
 165 170 175
 Asp Thr Gly Asp Asp Tyr Ser Pro Ile Val Lys Ala Leu Met Ser Ala
 180 185 190
 Val Glu Asp Arg Gly Val Pro Thr Lys Lys Asp Phe Gly Cys Gly Asp
 195 200 205
 Pro His Gly Val Ser Met Phe Pro Asn Thr Leu His Glu Asp Gln Val
 210 215 220
 Arg Ser Asp Ala Ala Arg Glu Trp Leu Leu Pro Asn Tyr Gln Arg Pro
 225 230 235 240
 Asn Leu Gln Val Leu Thr Gly Gln Tyr Val Gly Lys Val Leu Leu Ser
 245 250 255
 Gln Asn Gly Thr Thr Pro Arg Ala Val Gly Val Glu Phe Gly Thr His
 260 265 270
 Lys Gly Asn Thr His Asn Val Tyr Ala Lys His Glu Val Leu Leu Ala
 275 280 285
 Ala Gly Ser Ala Val Ser Pro Thr Ile Leu Glu Tyr Ser Gly Ile Gly
 290 295 300
 Met Lys Ser Ile Leu Glu Pro Leu Gly Ile Asp Thr Val Val Asp Leu
 305 310 315 320
 Pro Val Gly Leu Asn Leu Gln Asp Gln Thr Thr Ala Thr Val Arg Ser
 325 330 335
 Arg Ile Thr Ser Ala Gly Ala Gly Gln Gly Gln Ala Ala Trp Phe Ala
 340 345 350
 Thr Phe Asn Glu Thr Phe Gly Asp Tyr Ser Glu Lys Ala His Glu Leu
 355 360 365
 Leu Asn Thr Lys Leu Glu Gln Trp Ala Glu Glu Ala Val Ala Arg Gly
 370 375 380
 Gly Phe His Asn Thr Thr Ala Leu Leu Ile Gln Tyr Glu Asn Tyr Arg
 385 390 395 400
 Asp Trp Ile Val Asn His Asn Val Ala Tyr Ser Glu Leu Phe Leu Asp
 405 410 415

ES 2 779 725 T3

Thr Ala Gly Val Ala Ser Phe Asp Val Trp Asp Leu Leu Pro Phe Thr
 420 425 430

Arg Gly Tyr Val His Ile Leu Asp Lys Asp Pro Tyr Leu His His Phe
 435 440 445

Ala Tyr Asp Pro Gln Tyr Phe Leu Asn Glu Leu Asp Leu Leu Gly Gln
 450 455 460

Ala Ala Ala Thr Gln Leu Ala Arg Asn Ile Ser Asn Ser Gly Ala Met
 465 470 475 480

Gln Thr Tyr Phe Ala Gly Glu Thr Ile Pro Gly Asp Asn Leu Ala Tyr
 485 490 495

Asp Ala Asp Leu Ser Ala Trp Thr Glu Tyr Ile Pro Tyr His Phe Arg
 500 505 510

Pro Asn Tyr His Gly Val Gly Thr Cys Ser Met Met Pro Lys Glu Met
 515 520 525

Gly Gly Val Val Asp Asn Ala Ala Arg Val Tyr Gly Val Gln Gly Leu
 530 535 540

Arg Val Ile Asp Gly Ser Ile Pro Pro Thr Gln Met Ser Ser His Val
 545 550 555 560

Met Thr Val Phe Tyr Ala Met Ala Leu Lys Ile Ser Asp Ala Ile Leu
 565 570 575

Glu Asp Tyr Ala Ser Met Gln
 580

<210> 2
 <211> 583
 <212> PRT

5

<213> *Aspergillus niger*

<400> 2

10

Ser Asn Gly Ile Glu Ala Ser Leu Leu Thr Asp Pro Lys Asp Val Ser
 1 5 10 15

Gly Arg Thr Val Asp Tyr Ile Ile Ala Gly Gly Gly Leu Thr Gly Leu
 20 25 30

Thr Thr Ala Ala Arg Leu Thr Glu Asn Pro Asn Ile Ser Val Leu Val
 35 40 45

ES 2 779 725 T3

Ile Glu Ser Gly Ser Tyr Glu Ser Asp Arg Gly Pro Ile Ile Glu Asp
50 55 60

Leu Asn Ala Tyr Gly Asp Ile Phe Gly Ser Ser Val Asp His Ala Tyr
65 70 75 80

Glu Thr Val Glu Leu Ala Thr Asn Asn Gln Thr Ala Leu Ile Arg Ser
85 90 95

Gly Asn Gly Leu Gly Gly Ser Thr Leu Val Asn Gly Gly Thr Trp Thr
100 105 110

Arg Pro His Lys Ala Gln Val Asp Ser Trp Glu Thr Val Phe Gly Asn
115 120 125

Glu Gly Trp Asn Trp Asp Asn Val Ala Ala Tyr Ser Leu Gln Ala Glu
130 135 140

Arg Ala Arg Ala Pro Asn Ala Lys Gln Ile Ala Ala Gly His Tyr Phe
145 150 155 160

Asn Ala Ser Cys His Gly Val Asn Gly Thr Val His Ala Gly Pro Arg
165 170 175

Asp Thr Gly Asp Asp Tyr Ser Pro Ile Val Lys Ala Leu Met Ser Ala
180 185 190

Val Glu Asp Arg Gly Val Pro Thr Lys Lys Asp Phe Gly Cys Gly Asp
195 200 205

Pro His Gly Val Ser Met Phe Pro Asn Thr Leu His Glu Asp Gln Val
210 215 220

Arg Ser Asp Ala Ala Arg Glu Trp Leu Leu Pro Asn Tyr Gln Arg Pro
225 230 235 240

Asn Leu Gln Val Leu Thr Gly Gln Tyr Val Gly Lys Val Leu Leu Ser
245 250 255

Gln Asn Gly Thr Thr Pro Arg Ala Val Gly Val Glu Phe Gly Thr His
260 265 270

Lys Gly Asn Thr His Asn Val Tyr Ala Lys His Glu Val Leu Leu Ala
275 280 285

Ala Gly Ser Ala Val Ser Pro Thr Ile Leu Glu Tyr Ser Gly Ile Gly
290 295 300

ES 2 779 725 T3

Met Lys Ser Ile Leu Glu Pro Leu Gly Ile Asp Thr Val Val Asp Leu
305 310 315 320

Pro Val Gly Leu Asn Leu Gln Asp Gln Thr Thr Ala Thr Val Arg Ser
325 330 335

Arg Ile Thr Ser Ala Gly Ala Gly Gln Gly Gln Ala Ala Trp Phe Ala
340 345 350

Thr Phe Asn Glu Thr Phe Gly Asp Tyr Ser Glu Lys Ala His Glu Leu
355 360 365

Leu Asn Thr Lys Leu Glu Gln Trp Ala Glu Glu Ala Val Ala Arg Gly
370 375 380

Gly Phe His Asn Thr Thr Ala Leu Leu Ile Gln Tyr Glu Asn Tyr Arg
385 390 395 400

Asp Trp Ile Val Asn His Asn Val Ala Tyr Ser Glu Leu Phe Leu Asp
405 410 415

Thr Ala Gly Val Ala Ser Phe Asp Val Trp Asp Leu Leu Pro Phe Thr
420 425 430

Arg Gly Tyr Val His Ile Leu Asp Lys Asp Pro Tyr Leu His His Phe
435 440 445

Ala Tyr Asp Pro Gln Tyr Phe Leu Asn Glu Leu Asp Leu Leu Gly Gln
450 455 460

Ala Ala Ala Thr Gln Leu Ala Arg Asn Ile Ser Asn Ser Gly Ala Met
465 470 475 480

Gln Thr Tyr Phe Ala Gly Glu Thr Ile Pro Gly Asp Asn Leu Ala Tyr
485 490 495

Asp Ala Asp Leu Ser Ala Trp Thr Glu Tyr Ile Pro Tyr His Phe Arg
500 505 510

Pro Asn Tyr His Gly Val Gly Thr Cys Ser Met Met Pro Lys Glu Met
515 520 525

Gly Gly Val Val Asp Asn Ala Ala Arg Val Tyr Gly Val Gln Gly Leu
530 535 540

Arg Val Ile Asp Gly Ser Ile Pro Pro Thr Gln Met Ser Ser His Val

ES 2 779 725 T3

Arg Gly Tyr Val His Ile Leu Asp Lys Asp Pro Tyr Leu His His Phe
 435 440 445

Ala Tyr Asp Pro Gln Tyr Phe Leu Asn Glu Leu Asp Leu Leu Gly Gln
 450 455 460

Ala Ala Ala Thr Gln Leu Ala Arg Asn Ile Ser Asn Ser Gly Ala Met
 465 470 475 480

Gln Thr Tyr Phe Ala Gly Glu Thr Ile Pro Gly Asp Asn Leu Ala Tyr
 485 490 495

Asp Ala Asp Leu Ser Ala Trp Thr Glu Tyr Ile Pro Tyr His Phe Arg
 500 505 510

Pro Asn Tyr His Gly Val Gly Thr Cys Ser Met Met Pro Lys Glu Met
 515 520 525

Gly Gly Val Val Asp Asn Ala Ala Arg Val Tyr Gly Val Gln Gly Leu
 530 535 540

Arg Val Ile Asp Gly Ser Ile Pro Pro Thr Gln Met Ser Ser His Thr
 545 550 555 560

Met Thr Val Phe Tyr Ala Met Ala Leu Lys Ile Ser Asp Ala Ile Leu
 565 570 575

Glu Asp Tyr Ala Ser Met Gln
 580

- <210> 4
- <211> 583
- <212> PRT
- <213> *Aspergillus niger*

<400> 4

Ser Asn Gly Ile Glu Ala Ser Leu Leu Thr Asp Pro Lys Asp Val Ser
 1 5 10 15

Gly Arg Thr Val Asp Tyr Ile Ile Ala Gly Gly Gly Leu Val Gly Leu
 20 25 30

Thr Thr Ala Ala Arg Leu Thr Glu Asn Pro Asn Ile Ser Val Leu Val
 35 40 45

Ile Glu Ser Gly Ser Tyr Glu Ser Asp Arg Gly Pro Ile Ile Glu Asp
 50 55 60

5

10

ES 2 779 725 T3

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

ES 2 779 725 T3

Pro Val Gly Leu Asn Leu Gln Asp Gln Thr Thr Ser Thr Val Arg Ser
 325 330 335

Arg Ile Thr Ser Ala Gly Ala Gly Gln Gly Gln Ala Ala Trp Phe Ala
 340 345 350

Thr Phe Asn Glu Thr Phe Gly Asp Tyr Ser Glu Lys Ala His Glu Leu
 355 360 365

Leu Asn Thr Lys Leu Glu Gln Trp Ala Glu Glu Ala Val Ala Arg Gly
 370 375 380

Gly Phe His Asn Thr Thr Ala Leu Leu Ile Gln Tyr Glu Asn Tyr Arg
 385 390 395 400

Asp Trp Ile Val Asn His Asn Val Ala Tyr Ser Glu Leu Leu Leu Asp
 405 410 415

Thr Ala Gly Val Ala Ser Phe Asp Val Trp Asp Leu Leu Pro Phe Thr
 420 425 430

Arg Gly Tyr Val His Ile Leu Asp Lys Asp Pro Tyr Leu His His Phe
 435 440 445

Ala Tyr Asp Pro Gln Tyr Phe Leu Asn Glu Leu Asp Leu Leu Gly Gln
 450 455 460

Ala Ala Ala Thr Gln Leu Ala Arg Asn Ile Ser Asn Ser Gly Ala Met
 465 470 475 480

Gln Thr Tyr Phe Ala Gly Glu Thr Ile Pro Gly Asp Asn Leu Ala Tyr
 485 490 495

Asp Ala Asp Leu Ser Ala Trp Thr Glu Tyr Ile Pro Tyr His Phe Arg
 500 505 510

Pro Asn Tyr His Gly Val Gly Thr Cys Ser Met Met Pro Lys Glu Met
 515 520 525

Gly Gly Val Val Asp Asn Ala Ala Arg Val Tyr Gly Val Gln Gly Leu
 530 535 540

Arg Val Ile Asp Gly Ser Ile Pro Pro Thr Gln Met Ser Ser His Val
 545 550 555 560

Met Thr Val Phe Tyr Ala Met Ala Leu Lys Ile Ser Asp Ala Ile Leu
 565 570 575

ES 2 779 725 T3

Glu Asp Tyr Ala Ser Met Gln
580

<210> 5
<211> 583
<212> PRT
<213> *Aspergillus niger*

5

<400> 5

Ser Asn Gly Ile Glu Ala Ser Leu Leu Thr Asp Pro Lys Asp Val Ser
1 5 10 15

Gly Arg Thr Val Asp Tyr Ile Ile Ala Gly Gly Gly Leu Val Gly Leu
20 25 30

Thr Thr Ala Ala Arg Leu Thr Glu Asn Pro Asn Ile Ser Val Leu Val
35 40 45

Ile Glu Ser Gly Ser Tyr Glu Ser Asp Arg Gly Pro Ile Ile Glu Asp
50 55 60

Leu Asn Ala Tyr Gly Asp Ile Phe Gly Ser Ser Val Asp His Ala Tyr
65 70 75 80

Glu Thr Val Glu Leu Ala Thr Asn Asn Gln Thr Ala Leu Val Arg Ser
85 90 95

Gly Asn Gly Leu Gly Gly Ser Thr Leu Val Asn Gly Gly Thr Trp Thr
100 105 110

Arg Pro His Lys Ala Gln Val Asp Ser Trp Glu Thr Val Phe Gly Asn
115 120 125

Glu Gly Trp Asn Trp Asp Asn Val Ala Ala Tyr Ser Leu Gln Ala Glu
130 135 140

Arg Ala Arg Ala Pro Asn Ala Lys Gln Ile Ala Ala Gly His Tyr Phe
145 150 155 160

Asn Ala Ser Cys His Gly Val Asn Gly Thr Val His Val Gly Pro Arg
165 170 175

Asp Thr Gly Asp Asp Tyr Ser Pro Ile Val Lys Ala Leu Met Ser Ala
180 185 190

Val Glu Asp Arg Gly Val Pro Thr Lys Lys Asp Phe Gly Cys Gly Asp
195 200 205

10

ES 2 779 725 T3

Pro His Gly Val Ser Met Phe Pro Asn Thr Leu His Glu Asp Gln Val
 210 215 220

Arg Ser Asp Ala Ala Arg Glu Trp Leu Leu Pro Asn Tyr Gln Arg Pro
 225 230 235 240

Asn Leu Gln Val Leu Thr Gly Gln Tyr Val Gly Lys Val Leu Leu Ser
 245 250 255

Gln Asn Gly Thr Thr Pro Arg Ala Val Gly Val Glu Phe Gly Thr His
 260 265 270

Lys Gly Asn Thr His Asn Val Tyr Ala Lys His Glu Val Leu Leu Ala
 275 280 285

Ala Gly Ser Ala Val Ser Pro Thr Ile Leu Glu Tyr Ser Gly Ile Gly
 290 295 300

Met Lys Ser Ile Leu Glu Pro Leu Gly Ile Asp Thr Val Val Asp Leu
 305 310 315 320

Pro Val Gly Leu Asn Leu Gln Asp Gln Thr Thr Asn Thr Val Arg Ser
 325 330 335

Arg Ile Thr Ser Ala Gly Ala Gly Gln Gly Gln Ala Ala Trp Phe Ala
 340 345 350

Thr Phe Asn Glu Thr Phe Gly Asp Tyr Ser Glu Lys Ala His Glu Leu
 355 360 365

Leu Asn Thr Lys Leu Glu Gln Trp Ala Glu Glu Ala Val Ala Arg Gly
 370 375 380

Gly Phe His Asn Thr Thr Ala Leu Leu Ile Gln Tyr Glu Asn Tyr Arg
 385 390 395 400

Asp Trp Ile Val Asn His Asn Val Ala Tyr Ser Glu Leu Phe Leu Asp
 405 410 415

Thr Ala Gly Val Ala Ser Phe Asp Val Trp Asp Leu Leu Pro Phe Thr
 420 425 430

Arg Gly Tyr Val His Ile Leu Asp Lys Asp Pro Tyr Leu His His Phe
 435 440 445

Ala Tyr Asp Pro Gln Tyr Phe Leu Asn Glu Leu Asp Leu Leu Gly Gln

ES 2 779 725 T3

450

455

460

Ala Ala Ala Thr Gln Leu Ala Arg Asn Ile Ser Asn Ser Gly Ala Met
465 470 475 480

Gln Thr Tyr Phe Ala Gly Glu Thr Ile Pro Gly Asp Asn Leu Ala Tyr
485 490 495

Asp Ala Asp Leu Ser Ala Trp Thr Glu Tyr Ile Pro Tyr His Phe Arg
500 505 510

Pro Asn Tyr His Gly Val Gly Thr Cys Ser Met Met Pro Lys Glu Met
515 520 525

Gly Gly Val Val Asp Asn Ala Ala Arg Val Tyr Gly Val Gln Gly Leu
530 535 540

Arg Val Ile Asp Gly Ser Ile Pro Pro Thr Gln Met Ser Ser His Pro
545 550 555 560

Met Thr Val Phe Tyr Ala Met Ala Leu Lys Ile Ser Asp Ala Ile Leu
565 570 575

Glu Asp Tyr Ala Ser Met Gln
580

<210> 6
<211> 583
<212> PRT
<213> *Aspergillus niger*

5

<400> 6

Ser Asn Gly Ile Glu Ala Ser Leu Leu Thr Asp Pro Lys Asp Val Ser
1 5 10 15

Gly Arg Thr Val Asp Tyr Ile Ile Ala Gly Gly Gly Leu Val Gly Leu
20 25 30

Thr Thr Ala Ala Arg Leu Thr Glu Asn Pro Asn Ile Ser Val Leu Val
35 40 45

Ile Glu Ser Gly Ser Tyr Glu Ser Asp Arg Gly Pro Ile Ile Glu Asp
50 55 60

Leu Asn Ala Tyr Gly Asp Ile Phe Gly Ser Ser Val Asp His Ala Tyr
65 70 75 80

10

Glu Thr Val Glu Leu Ala Thr Asn Asn Gln Thr Ala Leu Val Arg Ser

ES 2 779 725 T3

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

ES 2 779 725 T3

Arg Ile Thr Ser Ala Gly Ala Gly Gln Gly Gln Ala Ala Trp Phe Ala
 340 345 350

Thr Phe Asn Glu Thr Phe Gly Asp Tyr Ser Glu Lys Ala His Glu Leu
 355 360 365

Leu Asn Thr Lys Leu Glu Gln Trp Ala Glu Glu Ala Val Ala Arg Gly
 370 375 380

Gly Phe His Asn Thr Thr Ala Leu Leu Ile Gln Tyr Glu Asn Tyr Arg
 385 390 395 400

Asp Trp Ile Val Asn His Asn Val Ala Tyr Ser Glu Leu Val Leu Asp
 405 410 415

Thr Ala Gly Val Ala Ser Phe Asp Val Trp Asp Leu Leu Pro Phe Thr
 420 425 430

Arg Gly Tyr Val His Ile Leu Asp Lys Asp Pro Tyr Leu His His Phe
 435 440 445

Ala Tyr Asp Pro Gln Tyr Phe Leu Asn Glu Leu Asp Leu Leu Gly Gln
 450 455 460

Ala Ala Ala Thr Gln Leu Ala Arg Asn Ile Ser Asn Ser Gly Ala Met
 465 470 475 480

Gln Thr Tyr Phe Ala Gly Glu Thr Ile Pro Gly Asp Asn Leu Ala Tyr
 485 490 495

Asp Ala Asp Leu Ser Ala Trp Thr Glu Tyr Ile Pro Tyr His Phe Arg
 500 505 510

Pro Asn Tyr His Gly Val Gly Thr Cys Ser Met Met Pro Lys Glu Met
 515 520 525

Gly Gly Val Val Asp Asn Ala Ala Arg Val Tyr Gly Val Gln Gly Leu
 530 535 540

Arg Val Ile Asp Gly Ser Ile Pro Pro Thr Gln Met Ser Ser His Leu
 545 550 555 560

Met Thr Val Phe Tyr Ala Met Ala Leu Lys Ile Ser Asp Ala Ile Leu
 565 570 575

Glu Asp Tyr Ala Ser Met Gln
 580

ES 2 779 725 T3

<210> 7
 <211> 583
 <212> PRT
 <213> *Aspergillus niger*

5

<400> 7

Ser Asn Gly Ile Glu Ala Ser Leu Leu Thr Asp Pro Lys Asp Val Ser
 1 5 10 15

Gly Arg Thr Val Asp Tyr Ile Ile Ala Gly Gly Gly Leu Val Gly Leu
 20 25 30

Thr Thr Ala Ala Arg Leu Thr Glu Asn Pro Asn Ile Ser Val Leu Val
 35 40 45

Ile Glu Ser Gly Ser Tyr Glu Ser Asp Arg Gly Pro Ile Ile Glu Asp
 50 55 60

Leu Asn Ala Tyr Gly Asp Ile Phe Gly Ser Ser Val Asp His Ala Tyr
 65 70 75 80

Glu Thr Val Glu Leu Ala Thr Asn Asn Gln Thr Ala Leu Val Arg Ser
 85 90 95

Gly Asn Gly Leu Gly Gly Ser Thr Leu Val Asn Gly Gly Thr Trp Thr
 100 105 110

Arg Pro His Lys Ala Gln Val Asp Ser Trp Glu Thr Val Phe Gly Asn
 115 120 125

Glu Gly Trp Asn Trp Asp Asn Val Ala Ala Tyr Ser Leu Gln Ala Glu
 130 135 140

Arg Ala Arg Ala Pro Asn Ala Lys Gln Ile Ala Ala Gly His Tyr Phe
 145 150 155 160

Asn Ala Ser Cys His Gly Val Asn Gly Thr Val His Ala Gly Pro Arg
 165 170 175

Asp Thr Gly Asp Asp Tyr Ser Pro Ile Val Lys Ala Leu Met Ser Ala
 180 185 190

Val Glu Asp Arg Gly Val Pro Thr Lys Lys Asp Phe Gly Cys Gly Asp
 195 200 205

Pro His Gly Val Ser Met Phe Pro Asn Thr Leu His Glu Asp Gln Val
 210 215 220

ES 2 779 725 T3

Arg Ser Asp Ala Ala Arg Glu Trp Leu Leu Pro Asn Tyr Gln Arg Pro
 225 230 235 240

Asn Leu Gln Val Leu Thr Gly Gln Tyr Val Gly Lys Val Leu Leu Ser
 245 250 255

Gln Asn Gly Thr Thr Pro Arg Ala Val Gly Val Glu Phe Gly Thr His
 260 265 270

Lys Gly Asn Thr His Asn Val Tyr Ala Lys His Glu Val Leu Leu Ala
 275 280 285

Ala Gly Ser Ala Val Ser Pro Thr Ile Leu Glu Tyr Ser Gly Ile Gly
 290 295 300

Met Lys Ser Ile Leu Glu Pro Leu Gly Ile Asp Thr Val Val Asp Leu
 305 310 315 320

Pro Val Gly Leu Asn Leu Gln Asp Gln Thr Thr Ser Thr Val Arg Ser
 325 330 335

Arg Ile Thr Ser Ala Gly Ala Gly Gln Gly Gln Ala Ala Trp Phe Ala
 340 345 350

Thr Phe Asn Glu Thr Phe Gly Asp Tyr Ser Glu Lys Ala His Glu Leu
 355 360 365

Leu Asn Thr Lys Leu Glu Gln Trp Ala Glu Glu Ala Val Ala Arg Gly
 370 375 380

Gly Phe His Asn Thr Thr Ala Leu Leu Ile Gln Tyr Glu Asn Tyr Arg
 385 390 395 400

Asp Trp Ile Val Asn His Asn Val Ala Tyr Ser Glu Leu Phe Leu Asp
 405 410 415

Thr Ala Gly Val Ala Ser Phe Asp Val Trp Asp Leu Leu Pro Phe Thr
 420 425 430

Arg Gly Tyr Val His Ile Leu Asp Lys Asp Pro Tyr Leu His His Phe
 435 440 445

Ala Tyr Asp Pro Gln Tyr Phe Leu Asn Glu Leu Asp Leu Leu Gly Gln
 450 455 460

Ala Ala Ala Thr Gln Leu Ala Arg Asn Ile Ser Asn Ser Gly Ala Met
 465 470 475 480

ES 2 779 725 T3

Gln Thr Tyr Phe Ala Gly Glu Thr Ile Pro Gly Asp Asn Leu Ala Tyr
 485 490 495

Asp Ala Asp Leu Ser Ala Trp Thr Glu Tyr Ile Pro Tyr His Phe Arg
 500 505 510

Pro Asn Tyr His Gly Val Gly Thr Cys Ser Met Met Pro Lys Glu Met
 515 520 525

Gly Gly Val Val Asp Asn Ala Ala Arg Val Tyr Gly Val Gln Gly Leu
 530 535 540

Arg Val Ile Asp Gly Ser Ile Pro Pro Thr Gln Met Ser Ser His Pro
 545 550 555 560

Met Thr Val Phe Tyr Ala Met Ala Leu Lys Ile Ser Asp Ala Ile Leu
 565 570 575

Glu Asp Tyr Ala Ser Met Gln
 580

<210> 8
 <211> 583
 <212> PRT
 <213> *Aspergillus niger*

5

<400> 8

Ser Asn Gly Ile Glu Ala Ser Leu Leu Thr Asp Pro Lys Asp Val Ser
 1 5 10 15

Gly Arg Thr Val Asp Tyr Ile Ile Ala Gly Gly Gly Leu Val Gly Leu
 20 25 30

Thr Thr Ala Ala Arg Leu Thr Glu Asn Pro Asn Ile Ser Val Leu Val
 35 40 45

Ile Glu Ser Gly Phe Tyr Glu Ser Asp Arg Gly Pro Ile Ile Glu Asp
 50 55 60

Leu Asn Ala Tyr Gly Asp Ile Phe Gly Ser Ser Val Asp His Ala Tyr
 65 70 75 80

Glu Thr Val Glu Leu Ala Thr Asn Asn Gln Thr Ala Leu Val Arg Ser
 85 90 95

Gly Asn Gly Leu Gly Gly Ser Thr Leu Val Asn Gly Gly Thr Trp Thr
 100 105 110

10

ES 2 779 725 T3

Arg Pro His Lys Ala Gln Val Asp Ser Trp Glu Thr Val Phe Gly Asn
 115 120 125

Glu Gly Trp Asn Trp Asp Asn Val Ala Ala Tyr Ser Leu Gln Ala Glu
 130 135 140

Arg Ala Arg Ala Pro Asn Ala Lys Gln Ile Ala Ala Gly His Tyr Phe
 145 150 155 160

Asn Ala Ser Cys His Gly Val Asn Gly Thr Val His Ala Gly Pro Arg
 165 170 175

Asp Thr Gly Asp Asp Tyr Ser Pro Ile Val Lys Ala Leu Met Ser Ala
 180 185 190

Val Glu Asp Arg Gly Val Pro Thr Lys Lys Asp Phe Gly Cys Gly Asp
 195 200 205

Pro His Gly Val Ser Met Phe Pro Asn Thr Leu His Glu Asp Gln Val
 210 215 220

Arg Ser Asp Ala Ala Arg Glu Trp Leu Leu Pro Asn Tyr Gln Arg Pro
 225 230 235 240

Asn Leu Gln Val Leu Thr Gly Gln Tyr Val Gly Lys Val Leu Leu Ser
 245 250 255

Gln Asn Gly Thr Thr Pro Arg Ala Val Gly Val Glu Phe Gly Thr His
 260 265 270

Lys Gly Asn Thr His Asn Val Tyr Ala Lys His Glu Val Leu Leu Ala
 275 280 285

Ala Gly Ser Ala Val Ser Pro Thr Ile Leu Glu Tyr Ser Gly Ile Gly
 290 295 300

Met Lys Ser Ile Leu Glu Pro Leu Gly Ile Asp Thr Val Val Asp Leu
 305 310 315 320

Pro Val Gly Leu Asn Leu Gln Asp Gln Thr Thr Ser Thr Val Arg Ser
 325 330 335

Arg Ile Thr Ser Ala Gly Ala Gly Gln Gly Gln Ala Ala Trp Phe Ala
 340 345 350

Thr Phe Asn Glu Thr Phe Gly Asp Tyr Ser Glu Lys Ala His Glu Leu

ES 2 779 725 T3

<400> 9

Ser Asn Gly Ile Glu Ala Ser Leu Leu Thr Asp Pro Lys Asp Val Ser
 1 5 10 15

Gly Arg Thr Val Asp Tyr Ile Ile Ala Gly Gly Gly Leu Val Gly Leu
 20 25 30

Thr Thr Ala Ala Arg Leu Thr Glu Asn Pro Asn Ile Ser Val Leu Val
 35 40 45

Ile Glu Ser Gly Ser Tyr Glu Ser Asp Arg Gly Pro Ile Ile Glu Asp
 50 55 60

Leu Asn Ala Tyr Gly Asp Ile Phe Gly Ser Ser Val Asp His Ala Tyr
 65 70 75 80

Glu Thr Val Glu Leu Ala Thr Asn Asn Gln Thr Ala Leu Val Arg Ser
 85 90 95

Gly Asn Gly Leu Gly Gly Ser Thr Leu Val Asn Gly Gly Thr Trp Thr
 100 105 110

Arg Pro His Lys Ala Gln Val Asp Ser Trp Glu Thr Val Phe Gly Asn
 115 120 125

Glu Gly Trp Asn Trp Asp Asn Val Leu Ala Tyr Ser Leu Gln Ala Glu
 130 135 140

Arg Ala Arg Ala Pro Asn Ala Lys Gln Ile Ala Ala Gly His Tyr Phe
 145 150 155 160

Asn Ala Ser Cys His Gly Val Asn Gly Thr Val His Ala Gly Pro Arg
 165 170 175

Asp Thr Gly Asp Asp Tyr Ser Pro Ile Val Lys Ala Leu Met Ser Ala
 180 185 190

Val Glu Asp Arg Gly Val Pro Thr Lys Lys Asp Phe Gly Cys Gly Asp
 195 200 205

Pro His Gly Val Ser Met Phe Pro Asn Thr Leu His Glu Asp Gln Val
 210 215 220

Arg Ser Asp Ala Ala Arg Glu Trp Leu Leu Pro Asn Tyr Gln Arg Pro
 225 230 235 240

ES 2 779 725 T3

Asn Leu Gln Val Leu Thr Gly Gln Tyr Val Gly Lys Val Leu Leu Ser
 245 250 255
 Gln Asn Gly Thr Thr Pro Arg Ala Val Gly Val Glu Phe Gly Thr His
 260 265 270
 Lys Gly Asn Thr His Asn Val Tyr Ala Lys His Glu Val Leu Leu Ala
 275 280 285
 Ala Gly Ser Ala Val Ser Pro Thr Ile Leu Glu Tyr Ser Gly Ile Gly
 290 295 300
 Met Lys Ser Ile Leu Glu Pro Leu Gly Ile Asp Thr Val Val Asp Leu
 305 310 315 320
 Pro Val Gly Leu Asn Leu Gln Asp Gln Thr Thr Ala Thr Val Arg Ser
 325 330 335
 Arg Ile Thr Ser Ala Gly Ala Gly Gln Gly Gln Ala Ala Trp Phe Ala
 340 345 350
 Thr Phe Asn Glu Thr Phe Gly Asp Tyr Ser Glu Lys Ala His Glu Leu
 355 360 365
 Leu Asn Thr Lys Leu Glu Gln Trp Ala Glu Glu Ala Val Ala Arg Gly
 370 375 380
 Gly Phe His Asn Thr Thr Ala Leu Leu Ile Gln Tyr Glu Asn Tyr Arg
 385 390 395 400
 Asp Trp Ile Val Asn His Asn Val Ala Tyr Ser Glu Leu Phe Leu Asp
 405 410 415
 Thr Ala Gly Val Ala Ser Phe Asp Val Trp Asp Leu Leu Pro Phe Thr
 420 425 430
 Arg Gly Tyr Val His Ile Leu Asp Lys Asp Pro Tyr Leu His His Phe
 435 440 445
 Ala Tyr Asp Pro Gln Tyr Phe Leu Asn Glu Leu Asp Leu Leu Gly Gln
 450 455 460
 Ala Ala Ala Thr Gln Leu Ala Arg Asn Ile Ser Asn Ser Gly Ala Met
 465 470 475 480
 Gln Thr Tyr Phe Ala Gly Glu Thr Ile Pro Gly Asp Asn Leu Ala Tyr
 485 490 495

ES 2 779 725 T3

Asp Ala Asp Leu Ser Ala Trp Thr Glu Tyr Ile Pro Tyr His Phe Arg
 500 505 510

Pro Asn Tyr His Gly Val Gly Thr Cys Ser Met Met Pro Lys Glu Met
 515 520 525

Gly Gly Val Val Asp Asn Ala Ala Arg Val Tyr Gly Val Gln Gly Leu
 530 535 540

Arg Val Ile Asp Gly Ser Ile Pro Pro Thr Gln Met Ser Ser His Val
 545 550 555 560

Met Thr Val Phe Tyr Ala Met Ala Leu Lys Ile Ser Asp Ala Ile Leu
 565 570 575

Glu Asp Tyr Ala Ser Met Gln
 580

<210> 10
 <211> 1749
 <212> ADN
 <213> *Aspergillus niger*

<400> 10

agcaatggca ttgaagccag cctcctgact gatcccaagg atgtctccgg cgcacggtc 60
 gactacatca tcgctggtgg aggtctggtt ggactcacca ccgctgctcg tctgacggag 120
 aacccaaca tcagtgtgct cgctcatcgaa agtggctcct acgagtcgga cagaggtcct 180
 atcattgagg acctgaacgc ctacggcgac atctttggca gcagtgtaga ccacgcctac 240
 gagaccgtgg agctcgtctac caacaatcaa accgcgctgg tccgctccgg aaatggtctc 300
 ggtggctcta ctctagttaa tgggtggcacc tggactcgcc cccacaaggc acaggttgac 360
 tcttgggaga ctgtctttgg aaatgagggc tggaaactggg acaatgtggc cgcctactcc 420
 ctccaggctg agcgtgctcg cgcaccaaat gccaaacaga tcgctgctgg ccaactcttc 480
 aacgcctcct gccatggtgt taatggtact gtccatgccg gaccccgga caccggcgat 540
 gactattctc ccatcgtcaa ggctctcatg agcgctgtcg aagaccgggg cgttcccacc 600
 aagaaagact tcggatgcgg tgacccccat ggtgtgtcca tgttccccaa caccttgac 660
 gaagaccaag tgcgctccga tgcogctcgc gaatggctac ttcccaacta ccaacgtccc 720
 aacctgcaag tctgaccgg acagtatggt ggtaagggtc tccttagcca gaacggcacc 780
 acccctcgtg ccgttggcgt ggaattcggc acccacaagg gcaacacca caacgtttac 840
 gctaagcacg agtcctcct ggccgctggc tccgctgtct ctcccacaat cctcgaatat 900
 tccggtatcg gaatgaagtc catcctggag ccccttggtc tcgacaccgt cgttgacctg 960

5

10

ES 2 779 725 T3

ccgctcggct tgaacctgca ggaccagacc accgctaccg tccgctcccg catcacctct 1020
 gctggtgcag gacagggaca ggcogcttgg ttcgccacct tcaacgagac ctttggtgac 1080
 tattccgaaa aggcacacga gctgctcaac accaagctgg agcagtgggc cgaagaggcc 1140
 gtcgcccgtg gcggtattcca caacaccacc gccttgctca tccagtacga gaactaccgc 1200
 gactggattg tcaaccacaa cgtgcgctac tcggaactct tcctcgacac tgccggagta 1260
 gccagcttcg atgtgtggga ccttctgccc ttcacccgag gatacgttca catcctcgac 1320
 aaggaccctt accttcacca ctctgcctac gaccctcagt acttcctcaa cgagctggac 1380
 ctgctcggtc aggctgccgc tactcaactg gcccgcaaca tctccaactc cggtgccatg 1440
 cagacctact tcgctgggga gactatcccc ggtgataacc tcgctgatga tgccgatttg 1500
 agcgcctgga ctgagtacat cccgtaccac ttccgtccta actaccatgg cgtgggtact 1560
 tgctccatga tgccgaagga gatgggcggt gttgttgata atgctgcccg tgtgtatggt 1620
 gtgcagggac tgctgtcat tgatggttct attcctccta cgcaaatgtc gtcccatgtc 1680
 atgacggtgt tctatgccat ggcgctaaaa atttcggatg ctatcttggga agattatgct 1740
 tccatgcag 1749

<210> 11
 <211> 1749
 <212> ADN
 <213> *Aspergillus niger*

5

<400> 11

agcaatggca ttgaagccag cctcctgact gatcccaagg atgtctccgg ccgcacggtc 60
 gactacatca tcgctggtgg aggtctggtt ggactcacca ccgctgctcg tctgacggag 120
 aacccaaca tcagtgtgct cgctcatcga agtggctcct acgagtccga cagaggctct 180
 atcattgagg acctgaacgc ctacggcgac atctttggca gcagtgtaga ccacgcctac 240
 gagaccgtgg agctcgttac caacaatcaa accgcgctgg tccgctccgg aatggtctc 300
 ggtggtctta ctctagttaa tgggtggcacc tggactcgcc cccacaagge acaggttgac 360
 tcttgggaga ctgtctttgg aaatgagggc tggaaactggg acaatgtggc cgcctactcc 420
 ctccaggctg agcgtgctcg cgcaccaa at gccaaacaga tcgctgctgg cactacttc 480
 aacgcatcct gccatggtgt taatggtact gtccatgttg gaccccgga caccggcgat 540
 gactattctc ccctcgtcaa ggctctcatg agcgtgtcag aagaccgggg cgttcccacc 600
 aagaaagact tcggatgcgg tgaccccat ggtgtgtcca tgttcccaa caccttgac 660
 gaagaccaag tgctctccga tgccgctcgc gaatggctac ttcccaacta ccaacgtccc 720
 aacctgcaag tcctgaccgg acagtatggt ggtaaggtgc tccttagcca gaacggcacc 780
 acccctcgtg ccgttggcgt ggaattcggc acccacaagg gcaacacca caacgtttac 840

10

ES 2 779 725 T3

gctaagcacg aggtcctcct ggccgcgggc tccgctgtct ctcccacaat cctcgaatat 900
 tccggtatcg gaatgaagtc catcctggag ccccttggtg tgcacaccgt cgttgacctg 960
 cccgctcggct tgaacctgca ggaccagacc accagtaccg tccgctcccg catcacctct 1020
 gctggtgcag gacagggaca ggccgcttgg ttccgccacct tcaacgagac ctttggtgac 1080
 tattccgaaa aggcacacga gctgctcaac accaagctgg agcagtgggc cgaagaggcc 1140
 gtcgcccgtg gcggtattca caacaccacc gccttgctca tccagtacga gaactaccgc 1200
 gactggattg tcaaccacaa cgtcgcgtac tcggaactca ttctcgacac tgccggagta 1260
 gccagcttcg atgtgtggga ccttctgccc ttcaccgag gatacgttca catcctcgac 1320
 aaggaccctt accttcacca cttcgcctac gaccctcagt acttcctcaa cgagctggac 1380
 ctgctcggtc aggtgcgcg tactcaactg gcccgcaaca tctccaactc cggtgccatg 1440
 cagacctact tcgctgggga gactatcccc ggtgataacc tcgctatga tgccgatttg 1500
 agcgcctgga ctgagtacat cccgtaccac ttccgtccta actaccatgg cgtgggtact 1560
 tgctccatga tgccgaagga gatgggagg gttgttgata atgctgcccg tgtgtatggt 1620
 gtgcagggac tgcgtgtcat tgatggttct attcctccta cgcaaatgtc gtcccatagc 1680
 atgacggtgt tctatgccat ggcgctaaaa atttcggatg ctatcttggga agattatgct 1740
 tccatgcag 1749

<210> 12
 <211> 1749
 <212> ADN
 <213> *Aspergillus niger*

5

<400> 12
 agcaatggca ttgaagccag cctcctgact gatcccaagg atgtctccgg ccgcacggtc 60
 gactacatca tcgctggtgg aggtctggtt ggactcacca ccgctgctcg tctgacggag 120
 aacccaaca tcagtgtgct cgtcatcgaa agtggctcct acgagtggga cagaggtcct 180
 atcattgagg acctgaacgc ctacggcgac atctttggca gcagtgtaga ccacgcctac 240
 gagaccgtgg agctcgtac caacaatcaa accgcgctgg tccgctccgg aaatggtctc 300
 ggtggctcta ctctagttaa tgggtggcacc tggactcgcc cccacaaggc acaggttgac 360
 tcttgggaga ctgtctttgg aaatgagggc tggaaactggg acaatgtggc cgcctactcc 420
 ctccaggctg agcgtgctcg cgcaccaaata gccaaacaga tcgctgctgg cactacttc 480
 aacgcctcct gccatggtgt taatgggtact gtccatattg gaccccgga caccggcgat 540
 gactattctc ccacgtcaa ggctctcatg agcgtgctcg aagaccgggg cgttcccacc 600
 aagaaagact tcggtgctgg tgacccccat ggtgtgtcca tgttccccaa caccttgac 660
 gaagaccaag tgcgtccga tgccgctcgc gaatggctac ttcccaacta ccaacgtccc 720

10

ES 2 779 725 T3

aacctgcaag tcctgaccgg acagtatggt ggtaaggtgc tccttagcca gaacggcacc 780
 acccctcgtg ccgttggcgt ggaattcggc acccacaagg gcaacaccca caacgtttac 840
 gctaagcacg agtcctcct ggccgcgggc tccgctgtct ctcccacaat cctcgaatat 900
 tccggtatcg gaatgaagtc catcctggag ccccttggtg tcgacaccgt cgttgacctg 960
 cccgtcggct tgaacctgca ggaccagacc accagtaccg tccgctcccg catcacctct 1020
 gctggtgcag gacagggaca ggccgcttgg ttccgccact tcaacgagac ctttggtgac 1080
 tattccgaaa aggcacacga gctgctcaac accaagctgg agcagtgggc cgaagaggcc 1140
 gtcgcccgtg gcggattcca caacaccacc gccttgctca tccagtacga gaactaccgc 1200
 gactggattg tcaaccacaa cgtcgcgtac tcggaactcc ttctcgacac tgccggagta 1260
 gccagcttgc atgtgtggga ccttctgccc ttcaccgcag gatacgttca catcctcgac 1320
 aaggaccctt accttcacca ctctgcctac gaccctcagt acttctcaa cgagctggac 1380
 ctgctcggtc aggtgcccgc tactcaactg gcccgcaaca tctccaactc cggtgccatg 1440
 cagacctact tcgctgggga gactatcccc ggtgataacc tcgctatga tgccgatttg 1500
 agcgcctgga ctgagtacat cccgtaccac ttccgtccta actaccatgg cgtgggtact 1560
 tgctccatga tgccgaagga gatgggcggt gttggtgata atgctgcccg tgtgtatggt 1620
 gtgcagggac tcgctgtcat tgatggttct attcctccta cgcaaatgtc gtcccatgtc 1680
 atgacggtgt tctatgccat ggcgctaaaa atttcggatg ctatcttggga agattatgct 1740
 tccatgcag 1749

<210> 13
 <211> 1749
 <212> ADN
 <213> *Aspergillus niger*

5

<400> 13

agcaatggca ttgaagccag cctcctgact gatoccaagg atgtctccgg ccgcacggtc 60
 gactacatca tcgctgggtg aggtctgggt ggactcacca ccgctgctcg tctgacggag 120
 aacccaaca tcagtgtgct cgtcatcgaa agtggctcct acgagtcgga cagaggtcct 180
 atcattgagg acctgaacgc ctacggcgac atctttggca gcagtgtaga ccacgcctac 240
 gagaccgtgg agctcgtac caacaatcaa accgcgctgg tccgctcccg aatggtctc 300
 ggtggctcta ctctagtga tgggtgcacc tggactcgcc cccacaaggc acaggttgac 360
 tcttgggaga ctgtctttgg aatgagggc tggaaactggg acaatgtggc cgcctactcc 420
 ctccaggctg agcgtgctcg cgcaccaa atgccaaacaga tcgctgctgg ccactacttc 480
 aacgcacctt gccatggtgt taatggtact gtccatggtg gaccccgca caccggcgat 540
 gactattctc ccacgtcaa ggtctcatg agcgtgctcg aagaccgggg cgttcccacc 600

10

ES 2 779 725 T3

aagaaagact tcggatgCGG tgacccccat ggtgtgtcca tgttccccaa caccttgCAC 660
 gaagaccaag tgcgctccga tgcCGctcgc gaatggctac ttcccaacta ccaacgtccc 720
 aacctgcaag tcctgaccgg acagtatggt ggtaaggTgc tccttagcca gaacggcacc 780
 acccctcgtg ccgttggcgt ggaattcggc acccacaagg gcaacacca caacgtttac 840
 gctaagcaCG aggtcctcct ggccgCGggc tccgctgtct ctcccacaat cctcgaatat 900
 tccggtatCG gaatgaagtc catcctggag ccccttggta tcgacacCGt cgttgacctg 960
 cccgctcggct tgaacctgca ggaccagacc accaatacCG tccgctcccg catcacctct 1020
 gctggtgcag gacagggaca ggccgcttgg ttCGccacct tcaacgagac ctttggtgac 1080
 tattccgaaa aggcacacga gctgctcaac accaagctgg agcagtgggc cgaagaggcc 1140
 gtcgcccgtg gcggattcca caacaccacc gccttgetca tccagtacga gaactaccgc 1200
 gactggattg tcaaccacaa cgtcgcgtac tcggaactct ttctcgacac tgccggagta 1260
 gccagcttCG atgtgtggga ctttctgccc ttcaccCGag gatacgttca catcctcGac 1320
 aaggaccctt accttcacca cttcgcctac gaccctcagt acttcctcaa cgagctggac 1380
 ctgctcggtc aggttgcCGc tactcaactg gccCGcaaca tctccaactc cggtgccatg 1440
 cagacctact tcgctgggga gactatcccc ggtgataacc tcgCGtatga tgccgatttg 1500
 agcgcctgga ctgagtacat cccgtaccac ttccgtccta actaccatgg cgtgggtact 1560
 tgctccatga tgccgaagga gatgggCGgt gttgttgata atgctgcccg tgtgtatggT 1620
 gtgcagggac tgcgtgtcat tgatggttct attcctccta cGcaaatgtc gtcccatccg 1680
 atgacggtgt tctatgCCat ggCGctaaaa atttcggatg ctatcttGga agattatgct 1740
 tccatgcag 1749

<210> 14
 <211> 1704
 <212> ADN
 <213> *Aspergillus niger*

5

<400> 14

agcaatggca ttgaagccag cctcctgact gatcccaagg atgtctccgg ccgcaCGgtc 60
 gactacatca tcgctggtgg aggtctggtt ggactcacca ccgctgctCG tctgacggag 120
 aaccccaaca tcagtgtgct cgtcatcGaa agtggtcctt acgagtCGga cagaggctct 180
 atcattgagg acctgaacgc ctacggcGac atctttggca gcagtgtaga ccacgcctac 240
 gagaccgtgg agctcGctac caacaatcaa accgCGctgg tccgctccgg aaatggtctc 300
 ggtggtctta ctctagtGaa tggTggcacc tggactCGcc cccacaaggc acaggttgac 360
 tcttgggaga ctgtctttgg aaatgagggc tggaactggg acaatgtggc cgcctactcc 420
 ctccaggetg agcgtgctCG cgcaccaaat gccaacaga tcgctgctgg ccactacttc 480

10

ES 2 779 725 T3

aacgcacccct gccatggtgt taatggtact gtccatggtg gaccccgcca caccggcgat 540
gactattctc ccacgctcaa ggctctcatg agcgctgtcg aagaccgggg cgttcccacc 600
aagaaagact tcggatgctg tgacccccat ggtgtgtcca tgttccccaa caccttgac 660
gaagaccaag tgcgctccga tgcgctcgc gaatggctac ttcccaacta ccaacgtccc 720
aacctgcaag tcctgaccgg acagtatggt ggtaagggtc tccttagcca gaacggcacc 780
accctcgtg ccggtggcgt ggaattcggc acccacaagg gcaacaccca caacgtttac 840
gctaagcacg aggtcctcct ggccgctggc tccgctgtct ctcccacaat cctcgaatat 900
tccggtatcg gaatgaagtc catcctggag ccccttggtc tcgacaccgt cgttgacctg 960
cccgctcgtc tgaacctgca ggaccagacc accaataccg tccgctcccg catcacctct 1020
gctggtgcag gacagggaca ggccgcttgg ttccgcccct tcaacgagac ctttggtgac 1080
tattccgaaa aggcacacga gctgctcaac accaagctgg agcagtgggc cgaagaggcc 1140
gtcggccgtg gcggtattca caacaccacc gccttgctca tccagtacga gaactaccgc 1200
gactggattg tcaaccacaa cgtcgcgtac tcggaactcg ttctcgacac tgccggagta 1260
gccagcttcc atgtgtggga ccttctgccc ttcacccgag gatacgttca catcctcgac 1320
aaggaccctt accttcacca ctctgcctac gaccctcagt acttcctcaa cgagctggac 1380
ctgctcggtc aggtgcccgc tactcaactg gcccgcaaca tctccaactc cggtgccatg 1440
cagacctact tcgctgggga gactatcccc ggtgataacc tcgctgatga tgccgatttg 1500
agcgcttggc ctgagtacat cccgtaccac ttccgtccta actaccatgg cgtgggtact 1560
tgctccatga tgccgaagga gatgggctgt gttggtgata atgctgcccg tgtgtatggt 1620
gtgcagggac tgcgtgtcat tgatggttct attcctccta cgcaaagtgc gtcccactcg 1680
atgacggtgt tctatgccc atgccc 1704

<210> 15
<211> 1749
5 <212> ADN
<213> *Aspergillus niger*

<400> 15

agcaatggca ttgaagccag cctcctgact gatcccaagg atgtctccgg ccgcacggtc 60
gactacatca tcgctggtgg aggtctggtt ggactcacca ccgctgctcg tctgacggag 120
aaccacaaca tcagtgtgct cgtcatcgaa agtggctcct acgagtcgga cagaggtcct 180
atcattgagg acctgaacgc ctacggcgac atctttggca gcagtgtaga ccacgcctac 240
gagaccgtgg agctcgttac caacaatcaa accgcgctgg tccgctccgg aatggtctc 300
ggtggctcta ctctagttaa tgggtggcacc tggactcggc cccacaaggc acaggttgac 360
10 tcttgggaga ctgtctttgg aatgaggggc tggactggg acaatgtggc cgcctactcc 420

ES 2 779 725 T3

ctccaggctg agcgtgctcg cgcaccaaat gccaaacaga tcgctgctgg ccaactacttc 480
aacgcatcct gccatggtgt taatggtact gtccatgccg gaccccgga caccggcgat 540
gactattctc ccatcgtcaa ggctctcatg agcgtgctcg aagaccggg cgttcccacc 600
aagaaagact tcggatgcgg tgacccccat ggtgtgtcca tgttcccaa caccttgac 660
gaagaccaag tgcgctccga tgcogctcgc gaatggctac ttcccacta ccaacgtccc 720
aacctgcaag tcctgaccgg acagtatggt ggtaagggtc tccttagcca gaacggcacc 780
accctcgtg ccgttggcgt ggaattcggc acccacaagg gcaacacca caacgtttac 840
gctaagcacg agtcctcct ggccgcgggc tccgctgtct ctcccacaat cctcgaatat 900
tccggtatcg gaatgaagtc catcctggag ccccttggtc tcgacaccgt cgttgacctg 960
cccgctcggc tgaacctgca ggaccagacc accagtagcg tccgctccc catcacctct 1020
gctggtgcag gacagggaca ggccgcttg ttcgccacct tcaacgagac ctttgggtgac 1080
tattccgaaa aggcacacga gctgctcaac accaagctgg agcagtgggc cgaagaggcc 1140
gtcggcctg gcggattcca caacaccacc gccttgctca tccagtacga gaactaccgc 1200
gactggattg tcaaccacaa cgtcgcgtac tcggaactct tcctcgacac tgccggagta 1260
gccagcttgc atgtgtggga ccttctgccc ttcaccgag gatacgttca catcctcgac 1320
aaggaccct accttcacca ctctgcctac gaccctcagt acttctcaa cgagctggac 1380
ctgctcggtc agcgtgccgc tactcaactg gcccgcaaca tctccaactc cgttgccatg 1440
cagacctact tcgctgggga gactatcccc ggtgataacc tcgctatga tgccgatttg 1500
agcgcctgga ctgagtacat cccgtaccac ttccgtccta actaccatgg cgtgggtact 1560
tgctccatga tgccgaagga gatgggcggg gttgttgata atgctgccc tgtgtatggt 1620
gtgcagggac tgcgtgtcat tgatggttct attcctccta cgcaaatgtc gtcccatccg 1680
atgacggtgt tctatgccat ggcgctaaaa atttcggatg ctatcttga agattatgct 1740
tccatgcag 1749

<210> 16
<211> 1749
5 <212> ADN
<213> *Aspergillus niger*

<400> 16

agcaatggca ttgaagccag cctcctgact gatcccaagg atgtctccgg ccgcacggtc 60
gactacatca tcgctggtgg aggtctggtt ggactcacca ccgctgctcg tctgacggag 120
aaccccaaca tcagtgtgct cgtcatcgaa agtggcttct acgagtogga cagaggtcct 180
atcattgagg acctgaacgc ctacggcgac atctttggca gcagttaga ccacgcctac 240
10 gagaccgtgg agctcgtac caacaatcaa accgcgctgg tccgctccgg aaatggtctc 300

ES 2 779 725 T3

ggtggctcta ctctagttaa tggtaggcacc tggactcgcc cccacaaggc acaggttgac 360
 tcttgggaga ctgtctttgg aaatgagggc tggaaactggg acaatgtggc cgcctactcc 420
 ctccaggctg agcgtgctcg cgcaccaaact gccaaacaga tcgctgctgg ccaactactc 480
 aacgcacact gccatggtgt taatggtact gtccatgccc gaccccgca caccggcgat 540
 gactattctc ccatcgtcaa ggctctcatg agcgtgctcg aagaccgggg cgttcccacc 600
 aagaaagact tcggtatgag tgacccccat ggtgtgtcca tgttcccaa caccttgac 660
 gaagaccaag tgcgctccga tgcgctcgc gaatggctac ttcccaacta ccaacgtccc 720
 aacctgcaag tcctgaccgg acagtatgtt ggtaagggtc tccttagcca gaacggcacc 780
 acccctcgtg ccgttggcgt ggaattcggc accacaagg gcaaacacca caacgtttac 840
 gctaagcaag aggtcctcct ggccgctggc tccgctgtct ctcccacaat cctogaatat 900
 tccggtatcg gaatgaagtc catcctggag ccccttggta tcgacaccgt cgttgacctg 960
 cccgtcggct tgaacctgca ggaccagacc accagtaccg tccgctcccg catcacctct 1020
 gctggtgcag gacagggaca ggccgcttgg ttccgacct tcaacgagac ctttggtgac 1080
 tattccgaaa aggcacacga gctgctcaac accaagctgg agcagtgggc cgaagaggcc 1140
 gtcgcccgtg gcggattcca caacaccacc gccttgcctc tccagtacga gaactaccgc 1200
 gactggattg tcaaccacaa cgctgcgtac tcggaactct tcctcgacac tgccggagta 1260
 gccagcttcg atgtgtggga ccttctgccc ttcaccgag gatcagttca catcctcgac 1320
 aaggaccctt accttcacca ctctgcctac gaccctcagt acttcctcaa cgagctggac 1380
 ctgctcggtc aggtgcccgc tactcaactg gcccgcaaca tctccaactc cggtgccatg 1440
 cagacctact tcgctgggga gactatcccc ggtgataaac tcgctgatga tgccgatttg 1500
 agcgcctgga ctgagtacat cccgtaccac ttccgtccta actaccatgg cgtgggtact 1560
 tgctccatga tgccgaagga gatgggctgt gttgttgata atgctgcccg tgtgtatggt 1620
 gtgcagggac tgcgtgtcat tgatggttct attcctccta cgcaaatgtc gtccatgtc 1680
 atgacggtgt tctatgccc ggcgctaaaa atttcggatg ctatcttggga agattatgct 1740
 tccatgcag 1749

<210> 17
 <211> 1749
 <212> ADN
 <213> *Aspergillus niger*

<400> 17

agcaatggca ttgaagccag cctcctgact gatcccaagg atgtctccgg ccgcacggtc 60
 gactacatca tcgctggtgg aggtctggtt ggactacca ccgctgctcg tctgacggag 120
 aacccaaca tcagtgtgct cgtcatcgaa agtggtcctt acgagtcgga cagaggtcct 180

ES 2 779 725 T3

atcattgagg acctgaacgc ctacggcgac atctttggca gcagtgtaga ccacgcctac 240
 gagaccgtgg agctcgctac caacaatcaa accgcgctgg tccgctccgg aaatggctctc 300
 ggtggctcta ctctagttaa tgggtggcacc tggactcgcc cccacaaggc acaggttgac 360
 tcttgggaga ctgtctttgg aaatgagggc tggaaactggg acaatgtgtt ggctactcc 420
 ctccaggctg agcgtgctcg cgcaccaaat gccaaacaga tcgctgctgg ccaactactc 480
 aacgcatcct gccatggtgt taatggtact gtccatgccg gaccccgga caccggcgat 540
 gactattctc ccatcgctca ggctctcatg agcgtgtcg aagaccgggg cgttcccacc 600
 aagaaagact tcggatgctg tgacccccat ggtgtgtcca tgttcccaa caccttgac 660
 gaagaccaag tgcgctccga tgccgctcgc gaatggctac ttcccaacta ccaacgtccc 720
 aacctgcaag tcctgaccgg acagtatgtt ggtaagggtc tccttagcca gaacggcacc 780
 acccctcgtg ccgttggcgt ggaattcgcc acccacaagg gcaacacca caacgtttac 840
 gctaagcaag aggtcctcct ggccgctggc tccgctgtct ctcccacaat cctogaatat 900
 tccggtatcg gaatgaagtc catcctggag ccccttggtc tcgacaccgt cgttgacctg 960
 ccgctcggct tgaacctgca ggaccagacc accgctaccg tccgctcccg catcacctct 1020
 gctggtgcag gacagggaca ggccgcttgg ttccgccact tcaacgagac ctttgggtgac 1080
 tattccgaaa aggcacacga gctgctcaac accaagctgg agcagtgggc cgaagaggcc 1140
 gtgccccgtg gcggattcca caacaccacc gccttgcctc tccagtacga gaactaccgc 1200
 gactggattg tcaaccacaa cgtcgcgtac tcggaactct tcctcgacac tgccggagta 1260
 gccagcttcg atgtgtggga ccttctgccc ttcaccgag gatacgttca catcctcgac 1320
 aaggaccctt accttcacca ctctgcctac gaccctcagt acttcctcaa cgagctggac 1380
 ctgctcggtc aggtgcccgc tactcaactg gcccgcaaca tctccaactc cggtgccatg 1440
 cagacctact tcgctgggga gactatcccc ggtgataacc tcgctatga tgccgatttg 1500
 agcgcctgga ctgagtacat ccogtaccac ttccgtccta actaccatgg cgtgggtact 1560
 tgctccatga tgccgaagga gatgggctgt gttgttgata atgtgcccg tgtgtatggt 1620
 gtgcagggac tgcgtgtcat tgatggttct attcctccta cgcaaagtgc gtcccatgct 1680
 atgacgggtg tctatgcat ggccgtaaaa atttcggatg ctatcttggga agattatgct 1740
 tccatgcag 1749

REIVINDICACIONES

1. Una glucosa oxidasa de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, seleccionada del grupo que consiste en

5 a) una glucosa oxidasa de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, que tiene, además de las dos sustituciones aminoacídicas T30V e I94V, al menos una sustitución aminoacídica adicional en cualquiera de las cinco posiciones seleccionadas del grupo S53; A173; A332; F414; V560 en dicha SEQ ID NO: 1; o

10 b) una glucosa oxidasa que presenta al menos un 70 %, en particular, al menos un 80 %, o > 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos con respecto a la glucosa oxidasa de acuerdo con a) siempre que la glucosa oxidasa de b) tenga, además de las dos sustituciones aminoacídicas T30V e I94V, al menos una sustitución aminoacídica adicional en cualquiera de las cinco posiciones seleccionadas del grupo S53; A173; A332; F414; V560 de acuerdo con la SEQ ID NO: 1,

15 y siempre que la glucosa oxidasa de acuerdo con b) presente al menos un 70 %, en particular, al menos un 80 %, o > 90 % de la actividad enzimática de la glucosa oxidasa de acuerdo con a), y presente al menos un 70 %, en particular, al menos un 80 %, o > 90 % de la especificidad enzimática para glucosa de la glucosa oxidasa de acuerdo con a),

20 y siempre que la glucosa oxidasa de acuerdo con b) presente al menos una actividad reducida 5 veces para oxígeno como aceptador de electrones de la glucosa oxidasa de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 o presente al menos una actividad incrementada 1,5 veces para mediadores de electrones distintos del oxígeno de la glucosa oxidasa de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, o ambas; o

25 c) un fragmento activo de una glucosa oxidasa de acuerdo con a) o b), siempre que en el fragmento activo de acuerdo con c) las sustituciones aminoacídicas como se explica en a) o b) se conserven en comparación con la glucosa oxidasa de acuerdo con a) o b),

30 y siempre que la glucosa oxidasa de acuerdo con c) presente al menos un 70 %, en particular, al menos un 80 %, o > 90 % de la actividad enzimática de la glucosa oxidasa de acuerdo con a), y presente al menos un 70 %, en particular, al menos un 80 %, o > 90 % de la especificidad enzimática para glucosa de la glucosa oxidasa de acuerdo con a),

35 y siempre que la glucosa oxidasa de acuerdo con c) presente al menos una actividad reducida 5 veces para oxígeno como aceptador de electrones de la glucosa oxidasa de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 o presente al menos una actividad incrementada 1,5 veces para mediadores de electrones distintos del oxígeno de la glucosa oxidasa de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, o ambas; y en la que los aminoácidos para sustitución/sustituciones adicional(es) se seleccionan del grupo

Phe para la posición S53; e/o

40 Ile, Thr, Val para la posición A173; y/o

Ser, Val, Thr para la posición A332; e/o

45 Ile, Leu, Met, Val para la posición F414; y/o

Leu, Pro, Thr, para la posición V560.

2. Una glucosa oxidasa de acuerdo con la reivindicación 1, en la que

50 • dicha actividad para oxígeno como aceptador de electrones se determina por el ensayo de ABTS, que comprende las etapas de

55 a) se transfieren 75 µl de solución de enzima de muestra a una microplaca de fondo plano de 96 pocillos que contiene 100 µl de tampón fosfato (pH 7)

b) se añaden 20 µl de mezcla de reacción a cada pocillo, dando como resultado las siguientes concentraciones: 0,91 U/ml de HRP; ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) 2,3 mM

60 c) la reacción comienza añadiendo 25 µl de solución de sustrato de glucosa y posterior agitación de la placa a 1000 rpm durante 30 s

d) la oxidación de ABTS se determina cinéticamente a 414 nm usando un lector de microplacas

65 • dicha actividad para mediadores de electrones distintos del oxígeno se determina por un ensayo de mediador, que comprende las etapas de

ES 2 779 725 T3

- a) se transfieren 75 µl de muestra de solución de enzima a una microplaca de fondo plano de 96 pocillos
- b) se añaden 100 µl de solución de mediador (N,N-bis(2-hidroxietil)-4-nitrosoanilina 19,05 mM); polivinilpirrolidona al 5 % (p/p), pH 7, y 20 µl de ácido fosfomolibdico 25 mM
- 5 c) la reacción comienza añadiendo 25 µl de solución de sustrato de glucosa y posterior agitación de la placa a 1000 rpm durante 1 min
- d) la cinética de la reducción de ácido fosfomolibdico se controla a 700 nm usando un lector de microplacas.
- 10 3. Una glucosa oxidasa de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que dichos mediadores de electrones distintos del oxígeno se seleccionan del grupo que comprende nitrosoanilinas y derivados de las mismas, compuestos azoicos, fenazinas y derivados de las mismas, fenotiazinas y derivados de las mismas, fenoxazinas y derivados de las mismas, ferrocenos y derivados de los mismos, ferricianuro de potasio, complejos de Ru y Os, quinonas y derivados de las mismas, indofenoles, viológenos, tetraiafulvaleno y derivados del mismo, y ftalocianinas.
- 15 4. Una glucosa oxidasa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que tiene, además de las dos sustituciones T30V e I94V de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, dos, o tres, o cuatro, o cinco sustituciones aminoacídicas adicionales en cualquiera de las cinco posiciones seleccionadas del grupo S53; A173; A332; F414; V560 de acuerdo con la SEQ ID NO: 1.
- 20 5. Una glucosa oxidasa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que, además de las sustituciones T30V e I94V de acuerdo con la SEQ ID NO: 1, al menos una sustitución aminoacídica adicional en la(s) posición/posiciones F414 y/o V560 se combina(n) con al menos una sustitución aminoacídica en la(s) posición/posiciones A173 y/o A332.
- 25 6. Una glucosa oxidasa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que tiene, además de las sustituciones T30V e I94V, las sustituciones aminoacídicas adicionales A173I; A332S; y F414L de acuerdo con la SEQ ID NO: 4.
- 30 7. Una glucosa oxidasa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que tiene, además de las sustituciones T30V e I94V, las sustituciones aminoacídicas adicionales A173V; A332S; F414I; y V560T de acuerdo con la SEQ ID NO: 3.
- 35 8. Una glucosa oxidasa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que tiene, además de las sustituciones T30V e I94V, las sustituciones aminoacídicas adicionales A173V; A332N; F414V; y V560L de acuerdo con la SEQ ID NO: 6.
- 40 9. Una glucosa oxidasa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que presenta una especificidad para glucosa de al menos un 99,9 % y/o una especificidad para galactosa < 4 % y/o una especificidad para maltosa < 0,3 % y/o una especificidad para xilosa < 6 % y/o una especificidad para maltotriosa < 0,1 %, cuando se determina por el ensayo de mediador, que comprende las etapas de
- 45 a) se transfieren 75 µl de muestra de solución de enzima a una microplaca de fondo plano de 96 pocillos
- b) se añaden 100 µl de solución de mediador (N,N-bis(2-hidroxietil)-4-nitrosoanilina 19,05 mM); polivinilpirrolidona al 5 % (p/p), pH 7, y 20 µl de ácido fosfomolibdico 25 mM
- 50 c) la reacción comienza añadiendo 25 µl de la solución de sustrato de azúcar respectiva y posterior agitación de la placa a 1000 rpm durante 1 min
- d) la cinética de la reducción de ácido fosfomolibdico se controla a 700 nm usando un lector de microplacas.
- 55 10. Una glucosa oxidasa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que presenta una actividad de > 400 %, o > 500 %, o > 600 % para mediador de nitrosoanilina para la transferencia de electrones en comparación con la actividad para mediador de nitrosoanilina de la GOx de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 por medio del ensayo de mediador, que comprende las etapas de
- 60 a) se transfieren 75 µl de muestra de solución de enzima a una microplaca de fondo plano de 96 pocillos
- b) se añaden 100 µl de solución de mediador (N,N-bis(2-hidroxietil)-4-nitrosoanilina 19,05 mM); polivinilpirrolidona al 5 % (p/p), pH 7, y 20 µl de ácido fosfomolibdico 25 mM
- 65 c) la reacción comienza añadiendo 25 µl de solución de sustrato de glucosa y posterior agitación de la placa a 1000 rpm durante 1 min

d) la cinética de la reducción de ácido fosfomolibdico se controla a 700 nm usando un lector de microplacas.

y una actividad para oxígeno de $\leq 30\%$, o $< 25\%$, o $< 20\%$, en particular, $< 15\%$, o $\leq 10\%$, en comparación con la actividad para oxígeno de la GOx de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 por medio del ensayo de ABTS, que comprende las etapas de

5 a) se transfieren 75 μl de solución de enzima de muestra a una microplaca de fondo plano de 96 pocillos que contiene 100 μl de tampón fosfato (pH 7)

10 b) se añaden 20 μl de mezcla de reacción a cada pocillo, dando como resultado las siguientes concentraciones: 0,91 U/ml de HRP; ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) 2,3 mM

15 c) la reacción comienza añadiendo 25 μl de solución de sustrato de glucosa y posterior agitación de la placa a 1000 rpm durante 30 s

d) la oxidación de ABTS se determina cinéticamente a 414 nm usando un lector de microplacas.

20 11. Un polinucleótido aislado que codifica una glucosa oxidasa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes o un fragmento activo de la misma.

12. Un procedimiento de detección, determinación o medición de glucosa en una muestra *ex vivo* por una glucosa oxidasa de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 11 o un fragmento activo de la misma, comprendiendo dicha detección, determinación o medición poner en contacto una muestra *ex vivo* con dicha glucosa oxidasa o un fragmento activo de la misma.

25 13. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que dicha detección, determinación o medición de glucosa se realiza usando un sensor o un dispositivo con tira reactiva.

Fig. 1

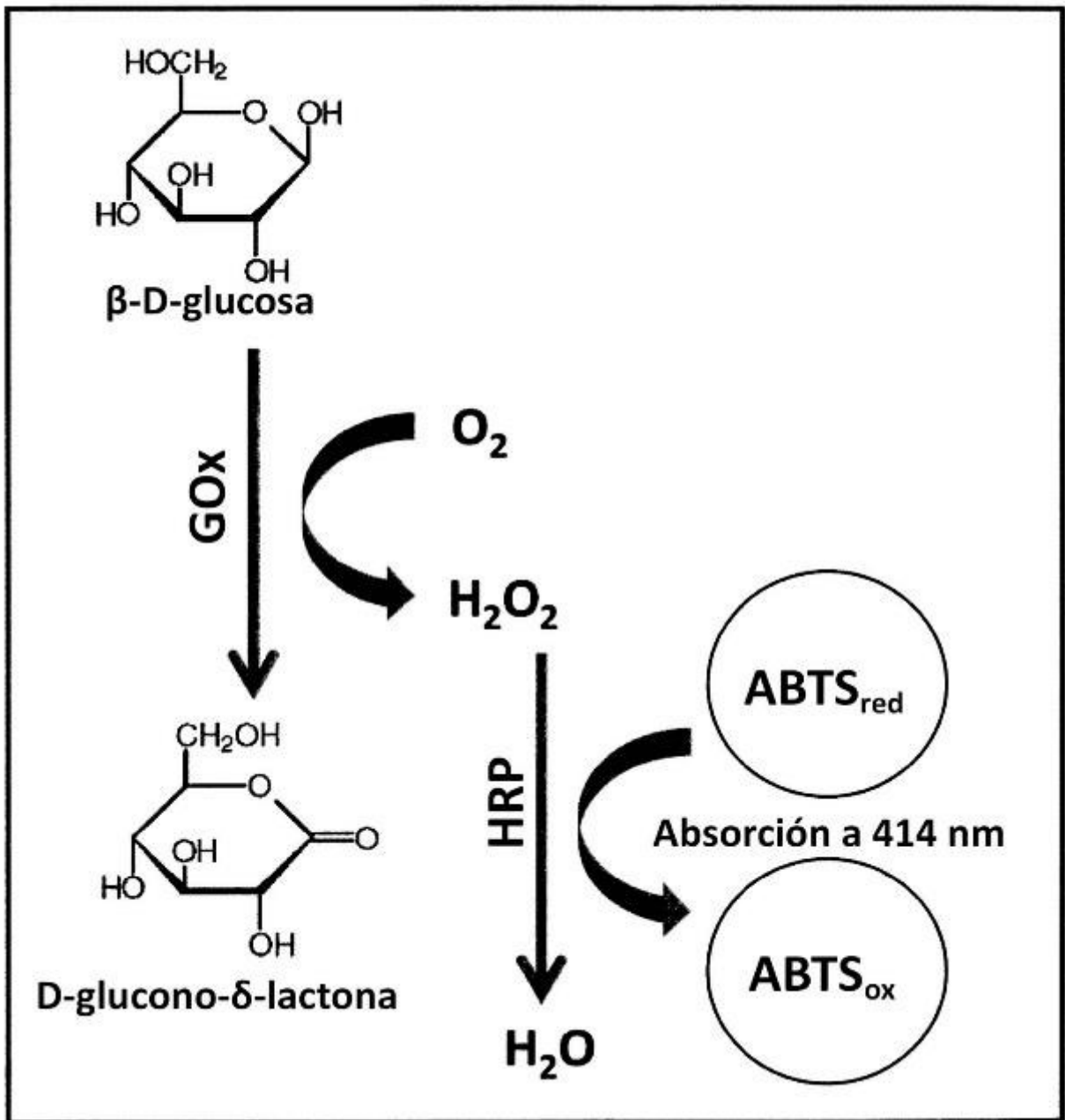
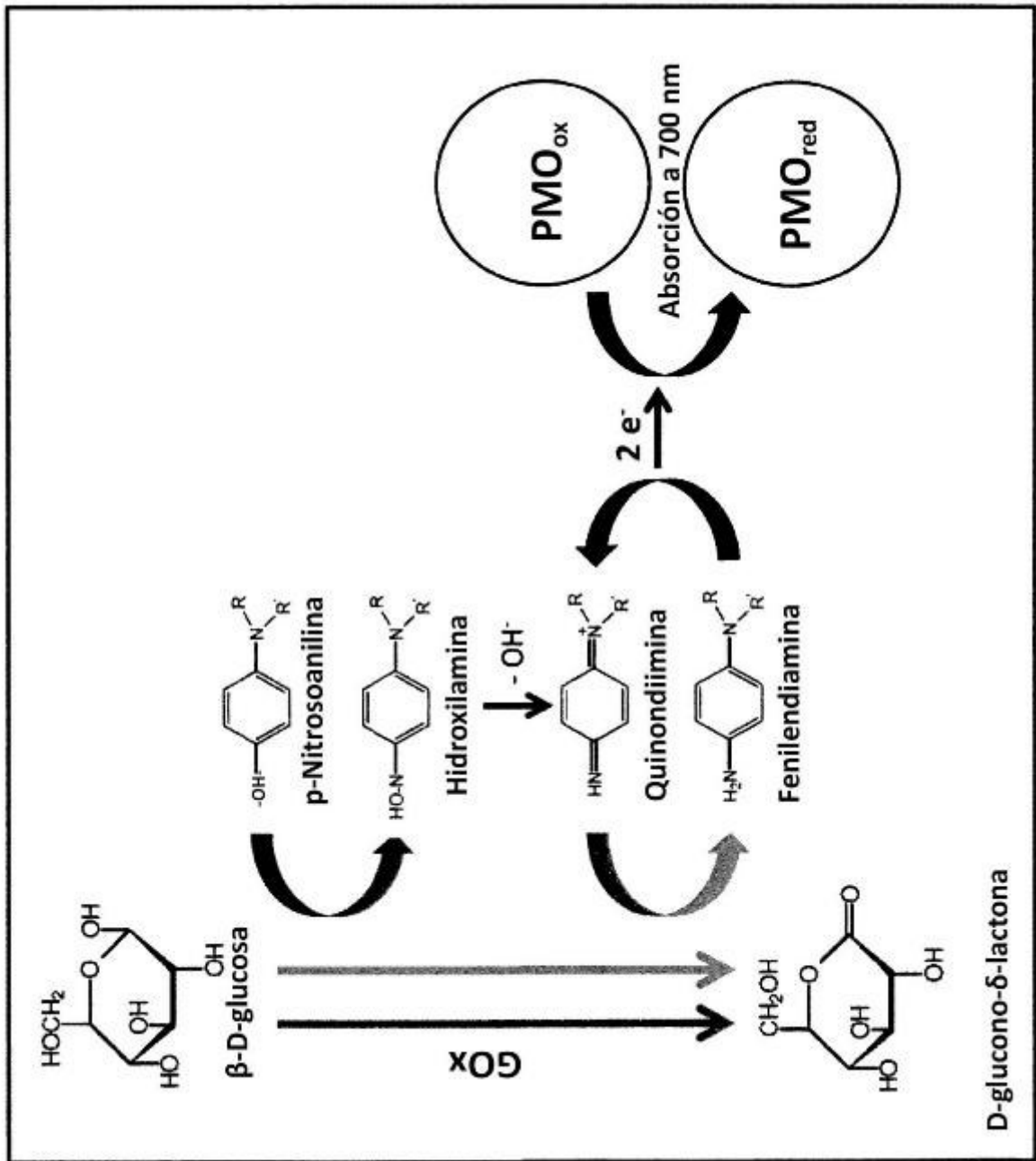


Fig. 2



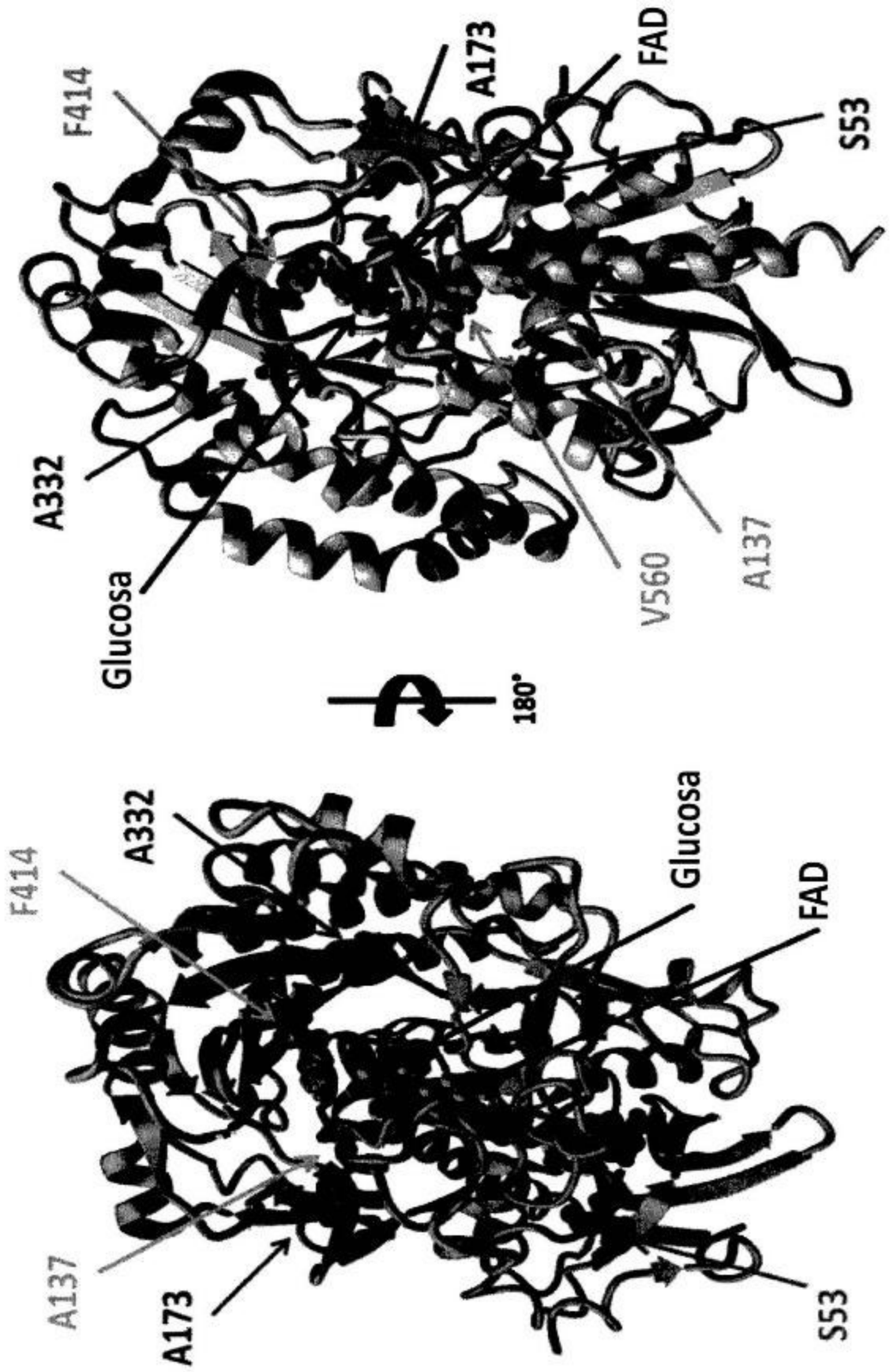


Fig 3.

Fig. 4

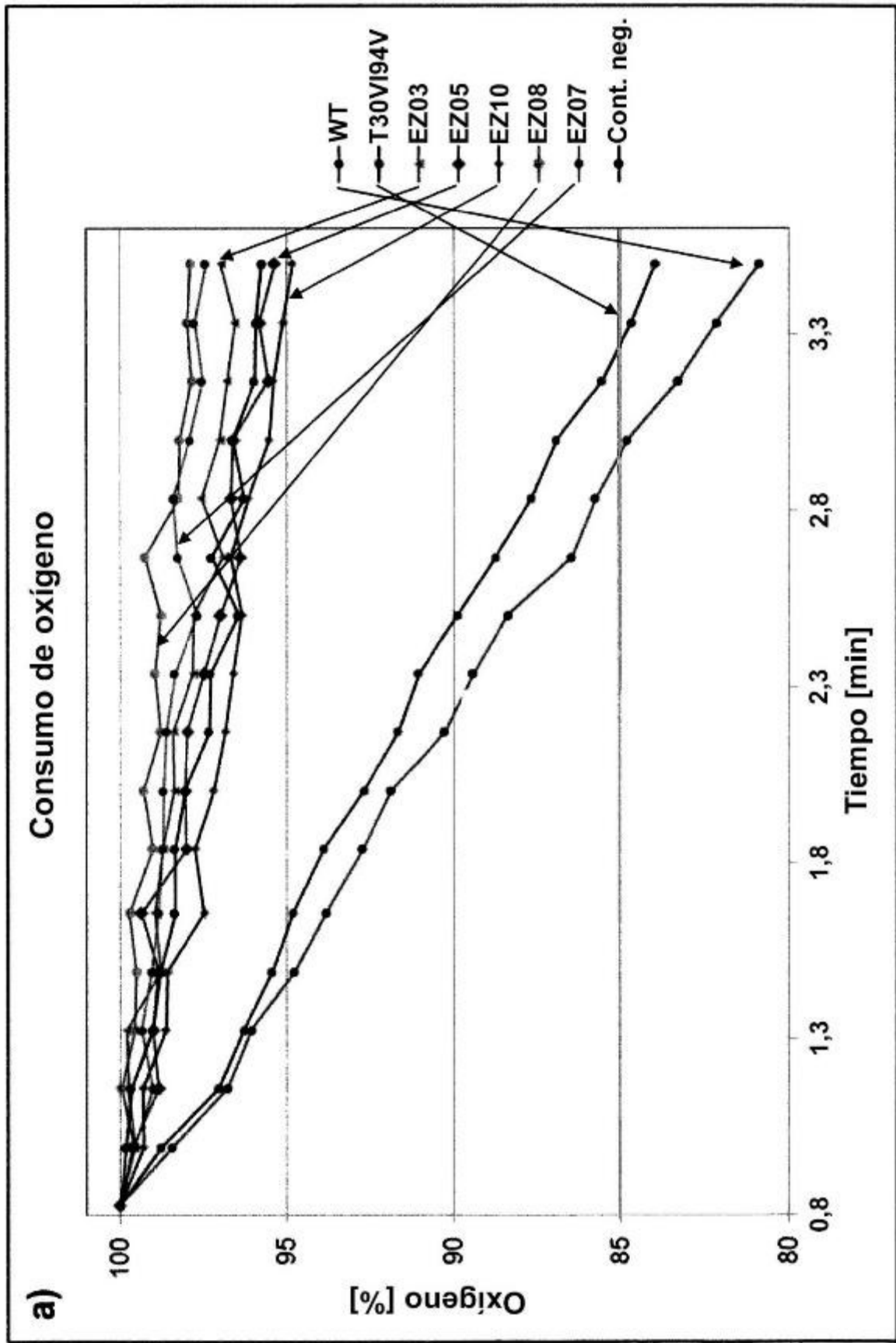


Fig. 4 (continuación)

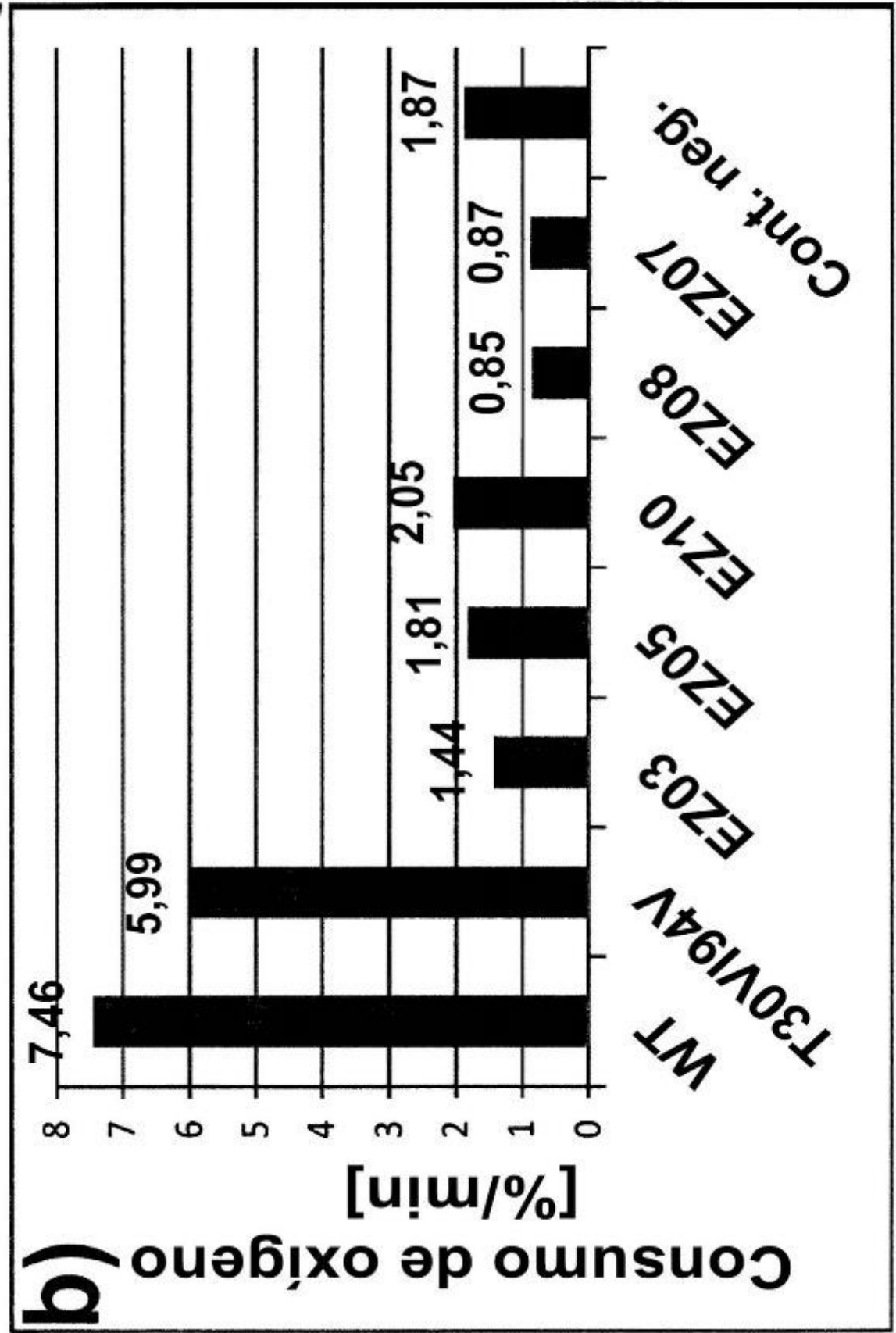
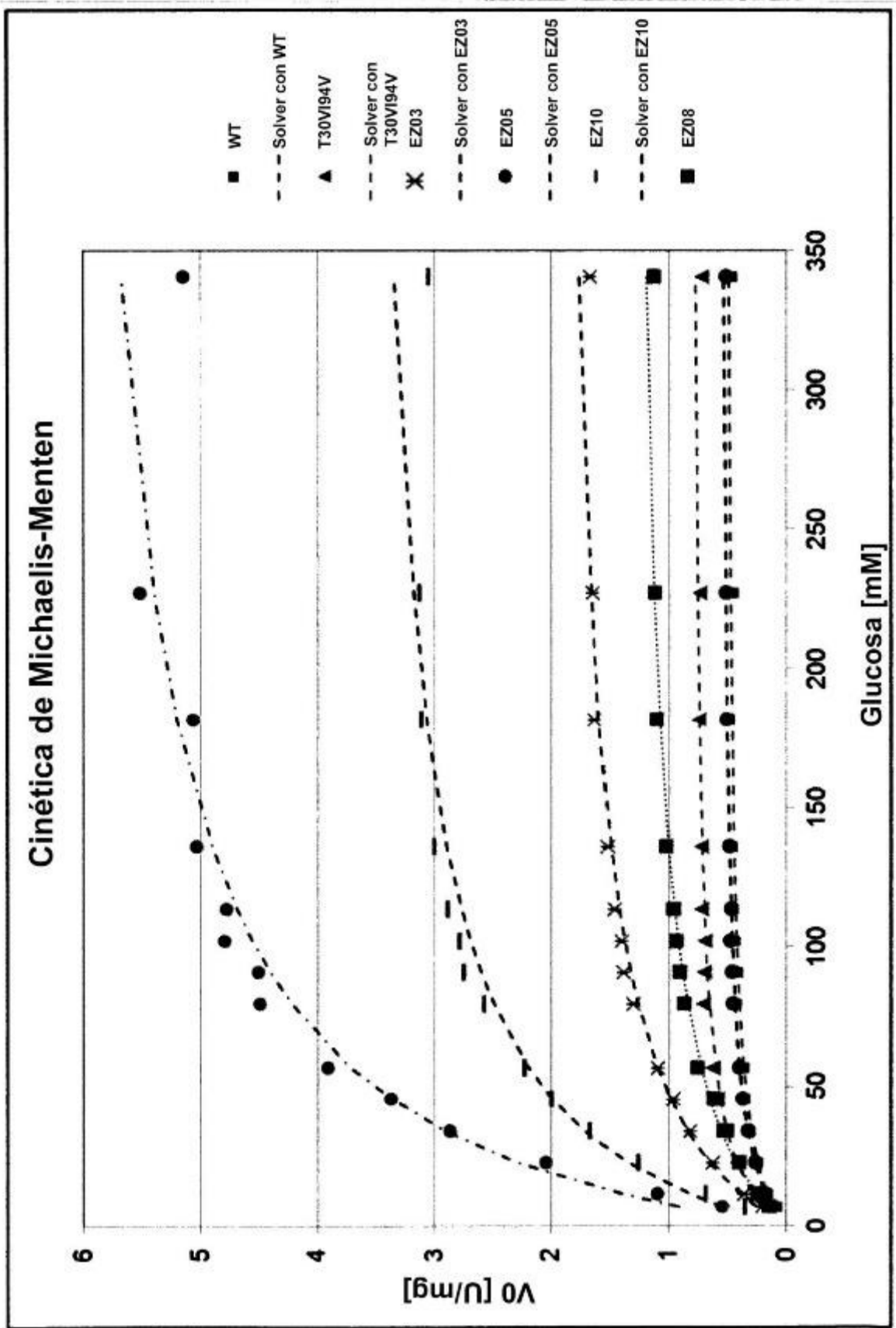


Fig. 5



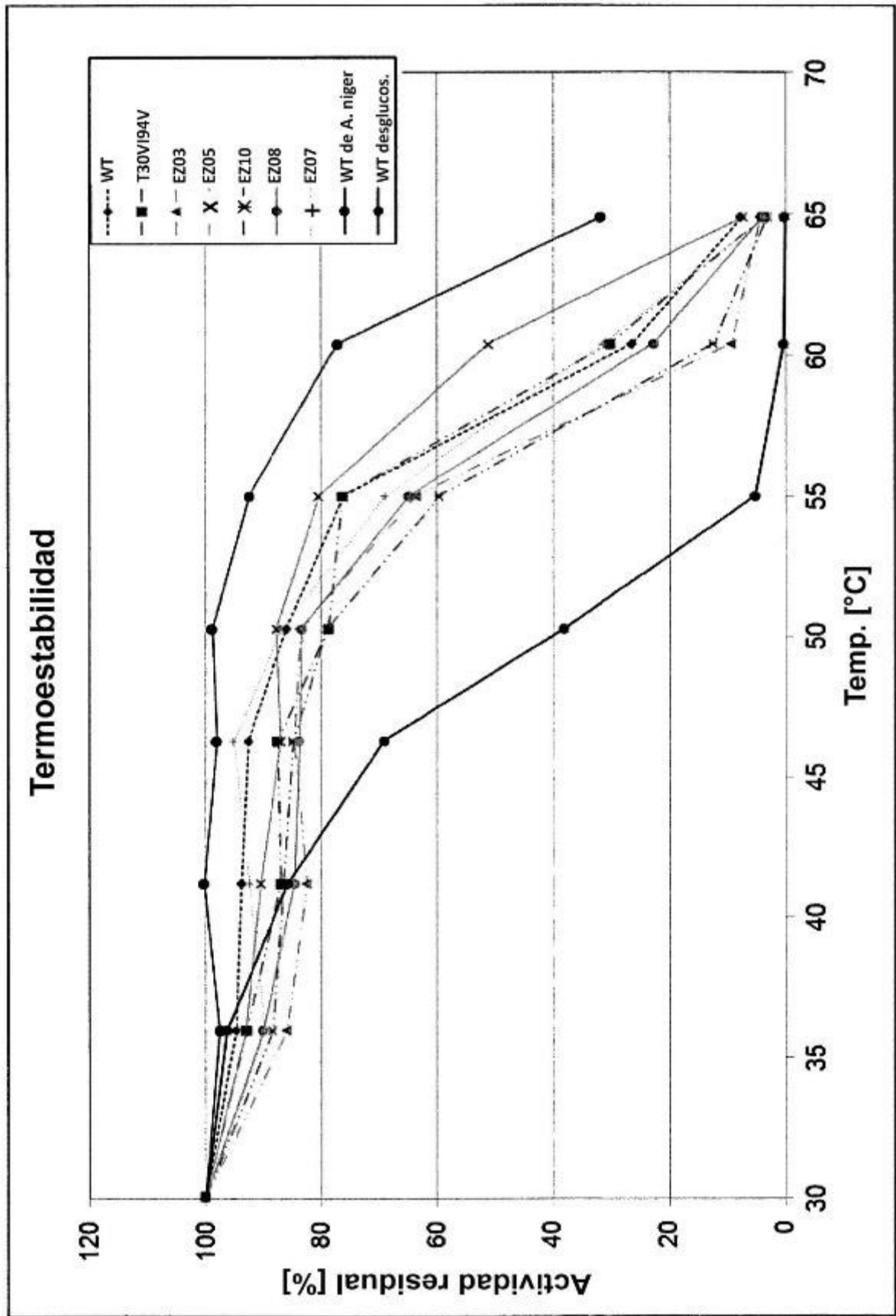


Fig. 6

Fig. 7

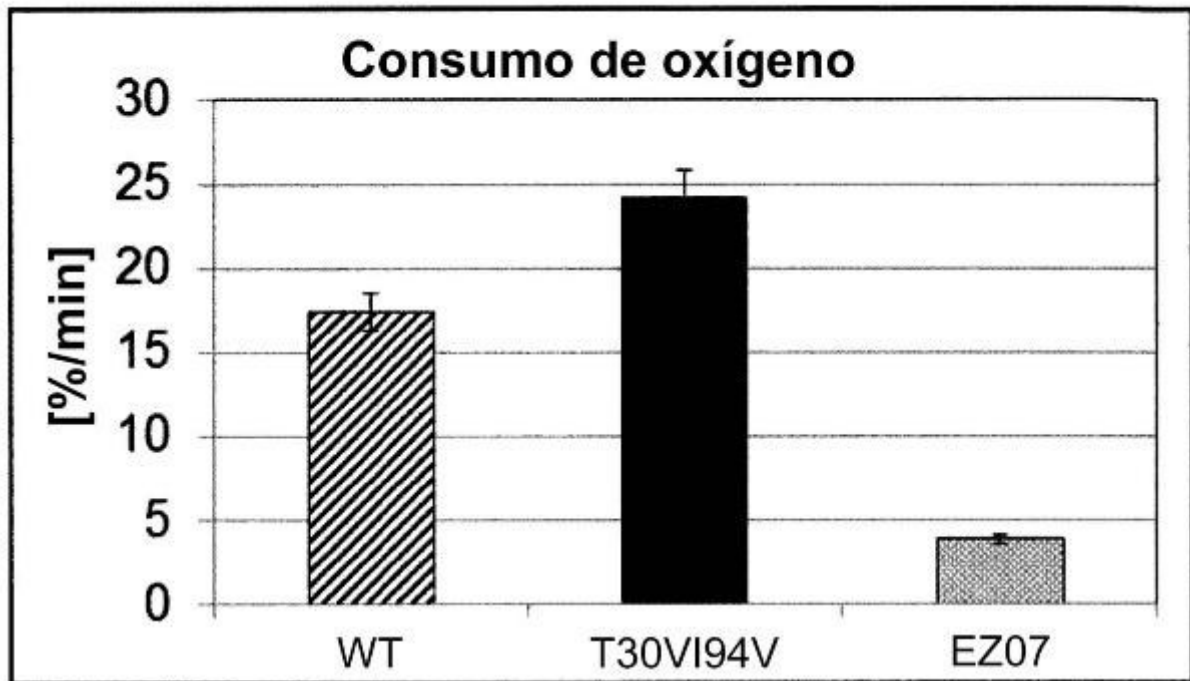


Fig. 8

Actividad residual [%]	GOx-WT	GOx-T30V; 194V	Variante de GOx EZ07
Glucosa	100 ± 1,05	100 ± 2,1	100 ± 0,3
Maltosa	n.d.	n.d.	n.d.
Galactosa	1,08 ± 0,08	1,03 ± 0,02	0,42 ± 0,02
Xilosa	0,38 ± 0,04	0,33 ± 0,02	1,66 ± 0,01
Maltotriosa	0,17 ± 0,01	0,82 ± 0,03	0,26 ± 0,01

Fig. 9

	$V_{\text{máx}}$ [U/mg] Ensayo de mediador	K_M [mM] Ensayo de mediador	$V_{\text{máx}}$ [U/mg] Ensayo de ABTS	K_M [mM] Ensayo de ABTS
GOx-WT	7,40 ± 0,12	13,18 ± 1,03	451,10 ± 10,98	14,20 ± 1,28
GOx-T30V; 194V	13,70 ± 0,19	11,85 ± 0,86	586,40 ± 16,98	8,82 ± 1,12
Variante de GOx EZ07	47,47 ± 1,00	28,20 ± 1,98	78,86 ± 0,58	1,31 ± 0,07

Fig. 10

