

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 803 273**

51 Int. Cl.:

C12N 9/04

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.12.2016 PCT/EP2016/082257**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.06.2017 WO17109003**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2016 E 16826037 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.04.2020 EP 3394252**

54 Título: **3-hidroxibutirato deshidrogenasa mutante de *Alcaligenes faecalis*, así como procedimientos y usos que implican la misma**

30 Prioridad:

21.12.2015 US 201562270133 P
14.04.2016 EP 16165421

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.01.2021

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

KRATZSCH, PETER;
BOENITZ-DULAT, MARA;
BECK, DANIELA;
STREIDL, THOMAS y
HUNT DUVALL, STACY

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 803 273 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

3-hidroxiacetil-CoA deshidrogenasa mutante de *Alcaligenes faecalis*, así como procedimientos y usos que implican la misma

5 La presente invención se refiere a una 3-hidroxiacetil-CoA deshidrogenasa (3-HADH) mutante con un rendimiento mejorado en relación con la 3-HADH natural, un ácido nucleico que codifica la 3-HADH mutante, una célula que comprende la 3-HADH mutante o el ácido nucleico, un procedimiento de determinación de la cantidad o concentración de 3-hidroxiacetil-CoA en una muestra, el uso de la 3-HADH mutante para determinar la cantidad o concentración de 3-hidroxiacetil-CoA en una muestra, y un dispositivo para determinar la cantidad o concentración de 3-hidroxiacetil-CoA en una muestra.

10 Los cuerpos cetónicos se producen en el hígado, principalmente a partir de la oxidación de los ácidos grasos, y se exportan a los tejidos periféricos para su uso como fuente de energía. Son en particular importantes para el cerebro, que no tiene otra fuente de energía sustancial no derivada de glucosa. Los dos cuerpos cetónicos principales son 3-hidroxiacetil-CoA y acetacetato. Bioquímicamente, las anomalías del metabolismo del cuerpo de la cetona se pueden subdividir en tres categorías: cetosis, hipoglucemia hipocetótica y anomalías de la proporción 3-hidroxiacetil-CoA/acetacetato.

15 Una elevación anómala de la proporción 3-hidroxiacetil-CoA/acetacetato implica normalmente un estado no oxidado de la matriz mitocondrial de los hepatocitos como resultado de hipoxia-isquemia u otras causas.

20 Normalmente, la presencia de cetosis implica que el metabolismo de la energía lipídica se ha activado y que toda la vía de degradación lipídica está intacta. En pocos casos, la cetosis refleja una incapacidad para utilizar cuerpos cetónicos. La cetosis es normal durante el ayuno, después de un ejercicio prolongado y cuando se consume una dieta alta en grasas. Durante el período neonatal, la infancia y el embarazo, momentos en que el metabolismo de la energía lipídica está particularmente activo, la cetosis se desarrolla fácilmente.

25 Las causas patológicas de la cetosis incluyen diabetes, hipoglucemia cetótica de la infancia, deficiencia de corticoesteroides u hormona de crecimiento, intoxicación por alcohol o salicilatos y varios errores innatos del metabolismo.

30 La formación de cuerpos cetónicos se incrementa cuando se incrementa la lipólisis, por ejemplo, en caso de deficiencia de insulina (diabetes mellitus; en particular, diabéticos de tipo I), cuando se incrementa la concentración de glucagón y en ayunas. En dichos casos, la concentración fisiológica normal de menos de 7 mg/dl puede incrementar en más de un factor 10. En los últimos años, el 3-hidroxiacetil-CoA ha demostrado ser un parámetro extremadamente fiable para monitorizar un tratamiento con insulina.

35 La ausencia de cetosis en un paciente con hipoglucemia es anómala y sugiere el diagnóstico de hiperinsulinemia o un error innato del metabolismo energético de las grasas.

40 En consecuencia, los cuerpos cetónicos son una diana diagnóstica interesante, en particular para la diabetes. Por lo tanto, existe una necesidad continua de sistemas de prueba robustos y sensibles para cuerpos cetónicos, especialmente 3-hidroxiacetil-CoA. La proporción de 3-hidroxiacetil-CoA y acetona o ácido acetacético es normalmente de 3:1. En situación de cetoacidosis, la proporción se incrementa hasta 6:1 a 12:1. Una 3-HADH adecuada debería permitir el desarrollo de una prueba cuantitativa para el 3-hidroxiacetil-CoA.

45 Sorprendentemente, se ha encontrado que una variedad de enzimas mutantes de la 3-hidroxiacetil-CoA deshidrogenasa de *Alcaligenes faecalis* muestran un rendimiento mejorado, en particular una estabilidad térmica y/o afinidad por el sustrato y/o cofactor incrementadas. Como se muestra en los ejemplos, existen muchos sitios en la enzima natural que permiten mutaciones, que incrementan la estabilidad térmica y/o la afinidad por el sustrato y/o cofactor de la enzima mutante en relación con la enzima natural.

50 Un sitio que actualmente se considera en particular adecuado para incrementar el rendimiento es el aminoácido en la posición correspondiente a la posición 253 de la SEQ ID NO: 1 (véase a continuación). En particular, el aminoácido se puede sustituir por Ile (253Ile), Ala (253Ala) o Cys (253Cys) para incrementar la afinidad por el sustrato y/o cofactor (por 3-hidroxiacetil-CoA y/o carba-NAD) y opcionalmente la estabilidad térmica (véanse las tablas 1A, 1B y 4).

55 Además, se descubrió que mutaciones en una o más de las posiciones correspondientes a las posiciones 18, 19, 33, 38, 39, 62, 125, 143, 148, 170, 175, 187, 216, 233 y/o 234 de SEQ ID NO: 1, en particular al menos las posiciones 62, 143, 148, 233 y/o 234 de SEQ ID NO: 1 también eran adecuadas (véanse las tablas 1B, 2A-C y 4). El rendimiento de la 3-HADH mutante se podría incrementar aún más combinando mutaciones en los sitios anteriores (véanse las tablas 2A-D y 3). Ejemplos en particular adecuados de esas enzimas mutantes incluyen aquellas con las mutaciones (para las definiciones de abreviaturas, véase a continuación)

- 60
- 253Ile, 233Lys, 234Thr; O
 - 253Ile, 62Val, 233Lys, 234Thr; O
 - 253Ile, 62Val, 147Arg, 233Lys, 234Thr; O

- 253Ile, 39Gly, 62Val, 143Val, 148Gly, 233Lys, 234Thr; O

- 253Ile, 62Val, 143Val, 148Gly, 233Lys, 234Thr; O

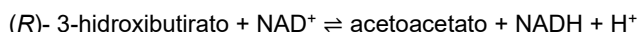
- 62Val, 111Leu, 140Met, 148Gly

(véanse las tablas 2A-D).

Sorprendentemente, la enzima mutante que tiene mutaciones 253Ile, 233Lys y 234Thr denominada AFDH3 mostró un incremento dramático en la termoestabilidad, en comparación con una enzima mutante con mutación 253Ile, solo (denominada AFDH2) (véase la tabla 2D), en el que AFDH2 ya había incrementado su termoestabilidad frente a la enzima natural (denominada AFDH1). Se ha demostrado que mutaciones adicionales, a saber, 18Arg, 18Lys, 18Glu, 18Pro, 19Gly, 33Ala, 33Leu, 33Thr, 38Lys, 39Gly, 62Phe, 62Met, 62Lys, 62Arg, 62Leu, 62Val, 125Gly, 143Val, 147Arg, 148Gly, 170Gly, 175Thr, 175Val, 175Ile, 187Phe y 216Val mejoran aún más el rendimiento de las enzimas mutantes en relación con la 3-HBDH o AFDH2 natural (véanse las tablas 2D, 3 y 4).

En consecuencia, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a una 3-hidroxiacetato deshidrogenasa (3-HBDH) mutante de *Alcaligenes faecalis* con un rendimiento mejorado en relación con la 3-HBDH natural.

La 3-hidroxiacetato deshidrogenasa (3-HBDH) (EC 1.1.1.30) pertenece a la familia de las oxidoreductasas, en concreto es una enzima que cataliza la oxidación estereoespecífica de 3-hidroxiacetato / 3-hidroxiacetato / (R)-3-hidroxiacetato / ácido 3-hidroxiacético (3-HB) a acetato con NAD o derivados como cofactor:



El nombre sistemático de esta clase de enzimas es (R)-3-hidroxiacetato:NAD⁺ oxidoreductasa. Otros nombres de uso común incluyen NAD⁺-*beta*-hidroxiacetato deshidrogenasa, hidroxiacetato oxidoreductasa, *beta*-hidroxiacetato deshidrogenasa, D-*beta*-hidroxiacetato deshidrogenasa, D-3-hidroxiacetato deshidrogenasa, D-(-)-3-hidroxiacetato deshidrogenasa, ácido *beta*-hidroxiacético deshidrogenasa, 3-D-hidroxiacetato deshidrogenasa y *beta*-hidroxiacético deshidrogenasa. Esta enzima participa en la síntesis y degradación de los cuerpos cetónicos y el metabolismo del acetato y se puede usar para determinar los cuerpos cetónicos en muestras, tales como una muestra de sangre.

La expresión "3-HBDH natural" se refiere a una 3-HBDH como se produce típicamente en la naturaleza. Una 3-HBDH natural de la bacteria gram negativa *Alcaligenes faecalis* se clonó en *E. coli* y se describió adicionalmente en 1996 (Jpn. Kokai Tokkyo Koho (1996), documento JP 08070856 A 19960319). Sin embargo, la enzima se caracteriza por una estabilidad bastante baja (dando como resultado una corta duración en almacenamiento), que es desventajoso en aplicaciones biotécnicas, biomédicas y de diagnóstico. En particular, la corta duración en almacenamiento tiene un impacto negativo sobre la aplicabilidad de la enzima, si se pretende el uso de una enzima preparada previamente. En particular, esto incluye productos comerciales tales como preparaciones enzimáticas, kits, tiras reactivas, etc., que normalmente se preparan a gran escala, se almacenan y a continuación se comercializan, por ejemplo, en lotes más pequeños. Adicionalmente, evidentemente es deseable incrementar la afinidad de la enzima por los sustratos y/o cofactores. El incremento de la afinidad y/o estabilidad incrementará el rendimiento de la enzima en aplicaciones y dispositivos biotécnicos. La secuencia de aminoácidos comúnmente aceptada de la 3-HBDH natural típica de *Alcaligenes faecalis* se proporciona a continuación como SEQ ID NO: 1.

La expresión "3-hidroxiacetato deshidrogenasa (3-HBDH) mutante de *Alcaligenes faecalis*" se refiere a una enzima 3-HBDH con una secuencia de aminoácidos que difiere de la de la 3-HBDH natural de *Alcaligenes faecalis*, en particular la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, en al menos una mutación, es decir, una o más sustituciones, adiciones, deleciones aminoacídicas o combinaciones de las mismas, en particular en al menos una sustitución.

La expresión "con un rendimiento mejorado en relación con la 3-HBDH natural" significa que el rendimiento de la enzima mutante se ha mejorado en relación con la 3-HBDH natural de *Alcaligenes faecalis*. El rendimiento mejora si la enzima mutante tiene un rendimiento mayor, por ejemplo, mayor actividad en la conversión de 3-HB en acetato, en cualquier condición (por ejemplo, después del almacenamiento, a un pH particular, con un tampón específico, a una temperatura elegida, con un cofactor particular (por ejemplo, carba-NAD), a una concentración específica de sustrato o cofactor, etc.). Un rendimiento mayor puede ser especialmente una estabilidad (tal como estabilidad térmica) y/o afinidad incrementada por uno o más sustratos/cofactores (por ejemplo, carba-NAD y/o 3-HB). Preferentemente, el rendimiento mejora si la enzima mutante, por ejemplo, tiene una actividad restante relativa mayor en la conversión de 3-HB en acetato al someterse a condiciones más extremas (por ejemplo, almacenamiento, condiciones de tampón, temperatura, concentración de cofactor o sustrato) en comparación con la actividad sin someterse a estas condiciones más extremas y/o si la enzima mutante, por ejemplo, tiene una actividad relativa mayor (es decir, actividad a una concentración de subsaturación/actividad a una concentración de saturación).

La secuencia de la 3-HBDH natural de *Alcaligenes faecalis* se muestra como SEQ ID NO: 1:

SEQ ID NO: 1 (3-HBDH de *Alcaligenes faecalis*)

```
MLKGKKAVVT GSTSGIGLAM ATELAKAGAD VVINGFGQPE DIERERSTLE SKFGVKAYYL      60
NADLSAQAT  RDFIAKAAEA LGGLDILVNN AGIQHTAPIE EFPVDKWNAI IALNLSAVFH      120
GTAAALPIMQ KQGWGRIINI ASAGHLVASV NKSAYVAAKH GVVGLTKVTA LENAGKGITC      180
NAICPGWVRT PLVEKQIEAI SQQKGIDIEA AARELLAEKQ PSLQFVTPEQ LGGAAVFLSS      240
AAADQMTGTT LSLDGGWTAR                                     260
```

5 La figura 1 muestra los diversos dominios (centro catalítico y sitios de unión) de la enzima natural. De acuerdo con estos dominios, se puede determinar la secuencia central de la enzima. Como se detalla anteriormente, se descubrió que las 3-HBDH mutantes con mutaciones en la posición correspondiente a la posición 253 de la SEQ ID NO: 1 son particularmente útiles. En consecuencia, se estableció una secuencia central extendida de 3-HBDH de *Alcaligenes faecalis* que abarca esta posición y se muestra como SEQ ID NO: 2:

10 SEQ ID NO: 2 (secuencia central extendida de 3-HBDH de *Alcaligenes faecalis*)

```
ADLSAQATR  DFIKAAEAL GGLDILVNN GIQHTAPIEE FPDVKWNAI I ALNLSAVFHG      60
TAAALPIMQK QGWGRIINIA SAHGLVASVN KSAYVAAKHG VVGLTKVTAL ENAGKGITCN      120
AICPGWVRTP LVEKQIEAIS QQKGIDIEAA ARELLAEKQP SLQFVTPEQL GGAAVFLSSA      180
AADQMTGTTL SL                                             192
```

15 En consecuencia, un ejemplo preferente de una 3-HBDH natural se da anteriormente, en la figura 1 y como SEQ ID NO: 1.

Si se introduce una o más mutaciones en la secuencia natural, especialmente la secuencia de SEQ ID NO: 1, se obtiene una 3-HBDH mutante. Con respecto a la 3-HBDH mutante de la presente invención, cabe señalar que la enzima mutante es funcionalmente activa y muestra un rendimiento mejorado en relación con la 3-HBDH natural. Esto significa que la enzima mutante ha mantenido su función enzimática de conversión de 3-HB en acetoacetato. Adicionalmente, preferentemente se incrementa al menos una de la estabilidad y la afinidad por el sustrato y/o cofactores. La enzima mutante difiere de la 3-HBDH natural en una o más sustituciones, adiciones y/o deleciones aminoacídicas, especialmente al menos una o más sustituciones.

25 La secuencia de la 3-HBDH mutante de acuerdo con la presente invención comprende (opcionalmente, además de las sustituciones especificadas en el presente documento) una o más sustituciones, deleciones o adiciones aminoacídicas, especialmente una o más sustituciones, en particular una o más sustituciones aminoacídicas conservadoras.

30 En un modo de realización de la presente invención, la 3-HBDH mutante de acuerdo con la presente invención puede comprender una o más sustituciones aminoacídicas, en particular un número limitado de sustituciones (por ejemplo, sustituciones de hasta 50, 40, 30, 20, especialmente 10 aminoácidos). Las sustituciones adecuadas se dan en los ejemplos, en particular en las tablas. Todas las sustituciones identificadas en los ejemplos como adecuadas para incrementar el rendimiento de la 3-HBDH se pueden usar en la invención, ya sea solas o en combinación entre sí y/o con sustituciones adicionales, por ejemplo, sustituciones conservadoras. "Sustitución aminoacídica conservadora" se refiere a una sustitución de un residuo con un residuo diferente que tiene una cadena lateral similar y, por tanto, típicamente implica la sustitución del aminoácido en el polipéptido con aminoácidos dentro de la misma clase de aminoácidos definida o de una clase similar. A modo de ejemplo y no de limitación, un aminoácido con una cadena lateral alifática puede estar sustituido con otro aminoácido alifático, por ejemplo, alanina, valina, leucina e isoleucina; un aminoácido con cadena lateral hidroxilo está sustituido con otro aminoácido con una cadena lateral hidroxilo, por ejemplo, serina y treonina; un aminoácido que tiene cadenas laterales aromáticas está sustituido con otro aminoácido que tiene una cadena lateral aromática, por ejemplo, fenilalanina, tirosina, triptófano e histidina; un aminoácido con una cadena lateral básica está sustituido con otro aminoácido con una cadena lateral básica, por ejemplo, lisina y arginina; un aminoácido con una cadena lateral ácida está sustituido con otro aminoácido con una cadena lateral ácida, por ejemplo, ácido aspártico o ácido glutámico; y un aminoácido hidrófobo o hidrófilo se reemplaza con otro aminoácido hidrófobo o hidrófilo, respectivamente. Los ejemplos de sustituciones aminoacídicas conservadoras incluyen las que se enumeran a continuación:

<u>Residuo original</u>	<u>Sustituciones conservadoras</u>
Ala, Leu, Val, Ile	Otros alifáticos (Ala, Leu, Val, Ile) Otros no polares (Ala, Leu, Val, Ile, Gly, Met)
Gly, Met	Otros no polares (Ala, Leu, Val, Ile, Gly, Met)
Asp, Glu	Otros ácidos (Asp, Glu)
Lys, Arg	Otros básicos (Lys, Arg)
Asn, Gln, Ser, Thr	Otros polares (Asn, Gln, Ser, Thr)

His, Tyr, Trp, Phe
Cys, Pro

Otros aromáticos (His, Tyr, Trp, Phe)
Ninguna

En un modo de realización de la presente invención, la 3-HBDH mutante de acuerdo con la presente invención puede comprender una o más adiciones aminoacídicas, en particular, adiciones aminoacídicas internas pequeñas (por ejemplo, hasta 50, 40, 30, 20, especialmente 10 aminoácidos). De forma alternativa, se pueden lograr adiciones combinando la 3-HBDH mutante en una proteína de fusión que comprende la 3-HBDH mutante de la presente invención.

Las proteínas de fusión son proteínas creadas mediante la unión de dos o más proteínas o péptidos originalmente separados. Este procedimiento da como resultado un polipéptido con propiedades funcionales derivadas de cada una de las proteínas originales. En consecuencia, dependiendo del uso previsto de la 3-HBDH, se puede combinar con un péptido o proteína adicional en una proteína de fusión. Las proteínas se pueden fusionar por medio de un conector o espaciador, lo que incrementa la probabilidad de que las proteínas se plieguen independientemente y se comporten como se espera. Especialmente en el caso en el que los conectores permiten la purificación de proteínas, los conectores en fusiones de proteínas o péptidos a veces se genomanipulan con sitios de escisión para proteasas o agentes químicos que permiten la liberación de las dos proteínas separadas. Se pueden fabricar proteínas de fusión dimericas o multiméricas a través de genomanipulación mediante fusión con las proteínas originales de dominios peptídicos que inducen dimerización o multimerización de proteínas artificiales (por ejemplo, cremalleras de leucina o estreptavidina). También se pueden fabricar proteínas de fusión con toxinas o anticuerpos unidos a ellas. Otras fusiones incluyen la adición de secuencias señal, tales como una secuencia señal de lipidación, una secuencia señal de secreción, una secuencia señal de glucosilación, un péptido señal de traslocación, etc.

Preferentemente, la proteína de fusión de la presente invención comprende una marca. Las marcas se unen a proteínas para diversos propósitos, por ejemplo, para facilitar la purificación, para ayudar en el plegamiento apropiado de las proteínas, para evitar la precipitación de la proteína, para alterar las propiedades cromatográficas, para modificar la proteína o para marcar la proteína. Ejemplos de marcas incluyen la marca de Arg, la marca de His, la marca Strep, la marca Flag, la marca T7, la marca del péptido V5, la marca de GST y la marca de c-Myc.

En un modo de realización de la presente invención, la 3-HBDH mutante de acuerdo con la presente invención puede comprender una o más deleciones aminoacídicas, en particular deleciones N y/o C terminales, especialmente en las porciones de SEQ ID NO: 1 ausentes en la SEQ ID NO: 2. Las deleciones pueden ser pequeñas (por ejemplo, hasta 50, 40, 30, 20, especialmente 10 aminoácidos).

En otro modo de realización, la secuencia de la 3-HBDH mutante de acuerdo con la presente invención puede comprender, preferentemente además de las sustituciones especificadas en el presente documento, una combinación de una o más deleciones, sustituciones o adiciones como se define anteriormente.

En un modo de realización preferente de la presente invención, la 3-HBDH mutante comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 (3-HBDH de *Alcaligenes faecalis*; 3-HBDH natural) o la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 (secuencia central extendida de 3-HBDH natural).

La expresión "al menos un 80 % idéntica" o "identidad de secuencia de al menos un 80 %", como se usa en el presente documento, significa que la secuencia de la 3-HBDH mutante de acuerdo con la presente invención tiene una secuencia de aminoácidos caracterizada por que, dentro de un tramo de 100 aminoácidos, al menos 80 residuos aminoacídicos son idénticos a los de la secuencia natural correspondiente. Las identidades de secuencia de otros porcentajes se definen en consecuencia.

La identidad de secuencia de acuerdo con la presente invención se puede determinar, por ejemplo, por procedimientos de alineación de secuencias en forma de comparación de secuencias. Los procedimientos de alineación de secuencias son bien conocidos en la técnica e incluyen diversos programas y algoritmos de alineación que se han descrito, por ejemplo, en Pearson y Lipman (1988). Además, la NCBI Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) está disponible de varias fuentes, incluyendo el National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD) y en Internet, para su uso en relación con los programas de análisis de secuencias blastp, blastn, blastx, tblastn y tblastx. El porcentaje de identidad de las enzimas mutantes de acuerdo con la presente invención en relación con la secuencia de aminoácidos de, por ejemplo, SEQ ID NO: 1 se caracteriza típicamente usando blastp de Blast de NCBI con ajustes estándar. De forma alternativa, la identidad de secuencia se puede determinar usando el programa informático GENEious con configuraciones estándar. Los resultados de la alineación se pueden derivar, por ejemplo, del programa informático GENEious (versión R8), usando el protocolo de alineación global con huecos de extremo libre como tipo de alineación y Blosum62 como matriz de costes.

Como se detalla anteriormente, la 3-HBDH mutante de la presente invención en un modo de realización comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o 2. En un modo de realización preferente, la 3-HBDH mutante comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos un 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a cualquiera de las secuencias de aminoácidos de SEQ

ID NO: 1 o 2. La identidad de secuencia se puede determinar como se describe anteriormente.

En otro modo de realización preferente, la enzima mutante de la presente invención tiene al menos una sustitución de aminoácidos en relación con la 3-HBDH natural, en el que el aminoácido en la posición correspondiente a la posición 253 de SEQ ID NO: 1 se sustituye con Ile (253Ile), Ala (253Ala) o Cys (253Cys), en particular Ile (253Ile). Se ha demostrado en los ejemplos que la sustitución del aminoácido en la posición correspondiente a la posición 253 de SEQ ID NO: 1 incrementa la estabilidad y/o afinidad por los sustratos y/o cofactores (véanse, por ejemplo, las tablas 1A, 1B y 4).

Adicionalmente, se podría demostrar que la sustitución en la posición correspondiente a la posición 253 de SEQ ID NO: 1 se puede combinar con una variedad de otras sustituciones para optimizar aún más la enzima. La sustitución de Leu en la posición 253 con Ile (253Ile) es en particular adecuada para incrementar la estabilidad térmica, así como la afinidad por el sustrato, como se muestra en las tablas 1A-C y las tablas 2 a 4 para mutaciones simples y múltiples en relación con la natural, respectivamente. Se podría demostrar que el rendimiento mejora después de las incubaciones previas a diversas temperaturas y en diferentes condiciones (tampones, pH). El efecto positivo de esta sustitución es particularmente sorprendente ya que el aminoácido en la (leucina) natural se sustituye con un aminoácido bastante similar (isoleucina). Ambos aminoácidos son isómeros constitucionales. Ambos se consideran no polares e hidrofóbicos y tienen el mismo peso molecular.

La sustitución de leucina en una posición correspondiente a la posición 253 de SEQ ID NO: 1 con la alanina de aminoácido no polar o la cisteína de aminoácido hidrofílica no cargada, no ácida, no polar incrementó significativamente las afinidades por sustrato y cofactor (véase la tabla 1B). Debido a las diferencias químicas entre los aminoácidos introducidos Ala y Cys, también este resultado es inesperado y sorprendente.

Un modo de realización altamente preferente de la presente invención se refiere a una 3-hidroxibutirato deshidrogenasa (3-HBDH) mutante de *Alcaligenes faecalis* con un rendimiento mejorado en relación con la 3-HBDH natural, en la que la enzima mutante comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 (3-HBDH de *Alcaligenes faecalis*; 3-HBDH natural) o la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 (secuencia central extendida de 3-HBDH natural) y

en la que la enzima mutante tiene al menos tres sustituciones de aminoácidos en relación con la 3-HBDH natural, en la que el aminoácido en la posición correspondiente a

- la posición 253 de SEQ ID NO: 1 se sustituye con Ile (253Ile), Ala (253Ala) o Cys (253Cys),

- la posición 233 de SEQ ID NO: 1 se sustituye con Ser (233Ser), Ile (233Ile), Ala (233Ala), Pro (233Pro), Arg (233Arg), Thr (233Thr), Lys (233Lys) o Cys (233Cys), y

- la posición 234 de SEQ ID NO: 1 se sustituye con Thr (234Thr).

Más preferentemente, el aminoácido en la posición correspondiente a la posición 253 de la SEQ ID NO: 1 se sustituye con Ile (253Ile) y/o el aminoácido en la posición correspondiente a la posición 233 de la SEQ ID NO: 1 se sustituye con Lys (233Lys) en esta enzima mutante altamente preferente y opcionalmente la enzima mutante tiene al menos una sustitución de aminoácido adicional en una o más de las posiciones correspondientes a las posiciones 18, 19, 33, 38, 39, 62, 125, 143, 148, 170, 175, 187 y/o 216 de SEQ ID NO: 1, en particular al menos las posiciones 62, 143 y/o 148 de SEQ ID NO: 1.

Como ya se detalla anteriormente, se podría demostrar que los aminoácidos en una o más posiciones adicionales de SEQ ID NO: 1 se pueden sustituir de forma alternativa o adicionalmente, para mejorar el rendimiento de la enzima. En consecuencia, en otro modo de realización de la presente invención, la enzima mutante de la presente invención tiene al menos una sustitución de aminoácido en una o más de las posiciones correspondientes a las posiciones 18, 19, 33, 38, 39, 62, 125, 143, 148, 170, 175, 187, 216, 233 y/o 234 de SEQ ID NO: 1, en particular al menos las posiciones 62, 143, 148, 233 y/o 234 de SEQ ID NO: 1, especialmente al menos las posiciones 62, 143, 148, 233 y 234 de SEQ ID NO: 1. Las sustituciones en estas posiciones se pueden combinar entre sí, así como con una sustitución en la posición 253, especialmente 253Ile, 253Ala, 253Cys, en particular 253Ile (véanse también los ejemplos).

Los ejemplos en particular adecuados de posiciones para sustituciones, así como combinaciones de las mismas para 3-HBDH mutante de la presente invención se dan a continuación:

- la posición 253 de SEQ ID NO: 1 se sustituye con Ile (253Ile), Ala (253Ala) o Cys (253Cys), especialmente Ile (253Ile);

- la posición 18 de SEQ ID NO: 1 se sustituye con Arg (18Arg), Lys (18Lys), Glu (18Glu) o Pro (18Pro);

- la posición 19 de SEQ ID NO: 1 se sustituye con Gly (19Gly);

- la posición 33 de SEQ ID NO: 1 se sustituye con Ala (33Ala), Leu (33Leu) o Thr (33Thr);

- la posición 38 de SEQ ID NO: 1 se sustituye con Lys (38 Lys);
- la posición 39 de SEQ ID NO: 1 se sustituye con Gly (39Gly);
- 5 - la posición 62 de SEQ ID NO: 1 se sustituye con Phe (62Phe), Met (62Met), Lys (62Lys), Arg (62Arg), Leu (62Leu) o Val (62Val), especialmente Val (62Val);
- la posición 125 de SEQ ID NO: 1 se sustituye con Gly (125Gly);
- 10 - la posición 143 de SEQ ID NO: 1 se sustituye con Val (143Val);
- la posición 148 de SEQ ID NO: 1 se sustituye con Gly (148Gly);
- la posición 170 de SEQ ID NO: 1 se sustituye con Gly (170Gly);
- 15 - la posición 175 de SEQ ID NO: 1 se sustituye con Thr (175Thr), Val (175Val) o Ile (175Ile);
- la posición 187 de SEQ ID NO: 1 se sustituye con Phe (187Phe);
- 20 - la posición 216 de SEQ ID NO: 1 se sustituye con Val (216Val);
- la posición 233 de SEQ ID NO: 1 se sustituye con Ser (233Ser), Ile (233Ile), Ala (233Ala), Pro (233Pro), Arg (233Arg), Thr (233Thr), Lys (233Lys) o Cys (233Cys), especialmente Lys (233Lys); y/o
- 25 - la posición 234 de SEQ ID NO: 1 se sustituye con Thr (234Thr).

En un modo de realización preferente de la presente invención, la 3-HBDH mutante tiene al menos o solo las siguientes mutaciones:

- 30 - 253Ile;
- 253Ile, 233Lys, 234Thr;
- 253Ile, 62Val, 233Lys, 234Thr;
- 35 - 253Ile, 62Val, 147Arg, 233Lys, 234Thr;
- 253Ile, 39Gly, 62Val, 143Val, 148Gly, 233Lys, 234Thr;
- 40 - 253Ile, 62Val, 143Val, 148Gly, 233Lys, 234Thr; o
- 62Val, 111 Leu, 140Met, 148Gly,
- en particular en el que la 3-HBDH mutante tiene al menos o solo las mutaciones 253Ile, 62Val, 143Val, 143Val, 148Gly,
- 45 233Lys, 234Thr, opcionalmente en combinación con
- 19Gly;
- 170Gly;
- 50 - 125Gly, 187Phe;
- 18Glu, 33Leu;
- 55 - 33Leu, 125Gly, 187Phe;
- 33Leu, 125Gly, 187Phe, 216Val;
- 18Glu, 187Phe;
- 60 - 33Leu, 125Gly, 175Val, 187Phe;
- 175Val, 216Val;
- 65 - 175Val, 187Phe, 216Val;

- 19Gly, 125Gly, 187Phe;
- 125Gly, 175Thr, 187Phe;
- 5 - 19Gly, 33Leu;
- 19Gly, 175Ile;
- 19Gly, 175Thr;
- 10 - 170Gly, 175Thr;
- 18Glu, 125Gly, 187Phe;
- 15 - 33Leu, 125Gly, 175Thr, 187Phe;
- 33Leu, 125Gly, 175Ile, 187Phe;
- 33Leu, 125Gly, 170Gly, 187Phe;
- 20 - 18Glu, 175Ile, 187Phe;
- 33Leu, 125Gly, 175Val, 187Phe;
- 25 - 33Leu, 125Gly, 175Val, 187Phe, 216Val;
- 33Leu, 125Gly, 175Thr, 187Phe; o
- 33Leu, 38Lys, 39Gly, 125Gly, 175Val, 187Phe.
- 30

En un modo de realización preferente de la presente invención, la 3-HBDH mutante comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos un 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 1 a 16, en particular en el que la 3-HBDH mutante comprende o consiste en la secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 3 a 16.

35 Como se detalla anteriormente, las secuencias de SEQ ID NO: 1 y 2 se refiere a la 3-HBDH natural y un fragmento de la misma, respectivamente. Las secuencias de SEQ ID NO: 3 a 16 son las secuencias de enzimas mutantes altamente preferentes. Las secuencias de las enzimas mutantes y las sustituciones efectuadas se muestran en la sección "Secuencias". La identidad de secuencia se puede determinar como se describe anteriormente.

40 En un modo de realización preferente de la presente invención, el rendimiento mejorado en relación con la 3-HBDH natural es

- una estabilidad incrementada, especialmente estabilidad térmica, en relación con la 3-HBDH natural; y/o
- 45 - una afinidad por sustrato incrementada, especialmente por 3-hidroxibutirato, en relación con la 3-HBDH natural; y/o
- una afinidad por cofactor incrementada, especialmente por NAD o un derivado del mismo, en particular en el que el derivado es carba-NAD, en relación con la 3-HBDH natural.
- 50

La expresión "estabilidad incrementada, especialmente estabilidad térmica, en relación con la 3-HBDH natural" significa que la 3-HBDH mutante es menos propensa a la pérdida de actividad (enzimática) en unas determinadas condiciones, especialmente a temperaturas elevadas. La estabilización de las enzimas, incluyendo la evitación de los mecanismos de desnaturalización para llevar a cabo todo su potencial como catalizadores, es un objetivo importante en biotecnología. La estabilización de las enzimas tiene una importancia notable debido al creciente número de aplicaciones de las enzimas. El incremento de la estabilidad permite una utilizabilidad mantenida (por ejemplo, almacenamiento más prolongado, utilizabilidad durante más tiempo, etc.). El incremento de la estabilidad de la enzima mutante en relación con la natural se puede determinar comparando la actividad restante de ambas enzimas (natural y mutante), por ejemplo, después del almacenamiento o la exposición a unas condiciones particulares (por ejemplo, temperatura elevada, secado, tampón o sal) (actividad restante absoluta). De forma alternativa, la estabilidad mejora en comparación con la enzima natural, si la enzima mutante, por ejemplo, tiene una actividad restante relativa mayor en la conversión de 3-HB en acetoacetato. La actividad restante relativa se puede determinar comparando la acidez restante o residual después del almacenamiento en condiciones dadas (por ejemplo, tiempo de almacenamiento, temperatura) con la actividad inicial antes del almacenamiento.

65 La expresión "actividad enzimática" y su determinación son bien conocidas por el experto en la técnica. La actividad

enzimática se define en general como la conversión de una cantidad de sustrato por espacio de tiempo. La unidad SI para la actividad enzimática es el katal ($1 \text{ katal} = 1 \text{ mol} \cdot \text{s}^{-1}$). Un valor más práctico y de uso común es la unidad de enzima (U) = $1 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$. 1 U corresponde a 16,67 nanokatales y se define como la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1 micromol de sustrato por minuto. La actividad específica de una enzima es la actividad de una enzima por miligramo de proteína total (expresada en $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$).

La actividad enzimática se puede determinar en un ensayo midiendo el consumo de sustrato o cofactor o la formación de producto a lo largo del tiempo. Existe una gran cantidad de procedimientos diferentes para medir las concentraciones de sustratos y productos, y muchas enzimas se pueden someter a ensayo de varias maneras diferentes, que son conocidas por el experto en la técnica. En la presente invención, la 3-HBDH en cuestión se incubaba, por ejemplo, con 3-hidroxibutirato y cofactor (por ejemplo, NAD o un derivado del mismo tal como carba-NAD) y se monitoriza la conversión del cofactor (NAD a NADH o carba-NAD a carba-NADH). La monitorización se puede hacer, por ejemplo, midiendo la absorbancia de la luz a 340 nm. El cambio de absorción obtenido por minuto (dE/min) representa la actividad enzimática. Para más detalles, véase el ejemplo 2.

En un modo de realización preferente de la presente invención, la estabilidad incrementada de la 3-HBDH mutante en relación con la 3-HBDH respectiva sin mutación se puede expresar como un incremento en la semivida de la enzima mutante ($t_{1/2}(\text{mutante})$) en relación con la semivida de la 3-HBDH natural respectiva ($t_{1/2}(\text{natural})$). La semivida ($t_{1/2}$) de la enzima indica la cantidad de tiempo que tarda en perderse el 50 % de la actividad original (actividad en $t = 0$) y después de lo cual la actividad restante representa el 50 %. En consecuencia, una estabilidad incrementada da como resultado una semivida incrementada de la enzima mutante en relación con la enzima natural respectiva. El incremento de la estabilidad se puede determinar como $t_{1/2}(\text{mutante}) / t_{1/2}(\text{natural})$. El incremento porcentual de la semivida se puede determinar como $[t_{1/2}(\text{mutante}) / t_{1/2}(\text{natural}) - 1] \cdot 100$.

En un modo de realización altamente preferente de la presente invención, la estabilidad incrementada de la 3-HBDH mutante en relación con la 3-HBDH respectiva sin mutación se puede determinar y expresar como actividad restante después de una incubación en condiciones extremas (por ejemplo, 30 min a, por ejemplo, 64 °C o cualquier otra condición dada en los ejemplos) en relación con la actividad inicial antes de la incubación/almacenamiento en condiciones extremas (véanse los ejemplos). Para esto, se puede monitorizar la reacción enzimática (por ejemplo, a temperatura ambiente a 340 nm durante 5 minutos) y se puede calcular el cambio en la absorción por tiempo (por ejemplo, dE/min) para cada muestra. Los valores obtenidos para las muestras sometidas a condiciones extremas se pueden comparar con los de la muestra respectiva no sometida a condiciones extremas (valor establecido como 100 % de actividad) y calcular en porcentaje de actividad ($[(\text{dE/min (muestra en cond. extremas)}) / (\text{dE/min (muestra en cond. no extremas)})] \cdot 100$). En consecuencia, un valor de enzima mutante mayor que el valor obtenido con la enzima natural representa una mejora en la estabilidad térmica. La estabilidad se incrementa si $[\% \text{ de actividad restante de la enzima mutante}] - [\% \text{ de actividad restante de la enzima natural}] > 0$. De forma alternativa, la actividad restante de la enzima mutante también se puede expresar como actividad en porcentaje y se puede calcular como sigue: $[\% \text{ de actividad restante de la enzima mutante}] / [\% \text{ de actividad restante de la enzima natural}] \cdot 100 \%$. La estabilidad de la enzima mutante en relación con la enzima natural se incrementa si el valor resultante es $> 100 \%$. Una prueba adecuada particular para determinar la estabilidad se describe en detalle en el ejemplo 2. De acuerdo con esto, la estabilidad se puede expresar como actividad restante y calcular como $[\text{dE/min (muestra en cond. extremas)}] / [\text{dE/min (muestra en cond. no extremas)}] \cdot 100$. Otros detalles se dan en el ejemplo 2. Un valor obtenido con una enzima mutante que sea mayor que el valor obtenido con la enzima natural representa una estabilidad incrementada de la enzima mutante.

Preferentemente, la estabilidad se incrementa en al menos un 10 %, 20 %, 30 % o 40 %, preferentemente en al menos un 50 %, 75 % o 100 %, todavía más preferentemente en al menos un 125 %, 150 %, 175 % o 200 %, especialmente un 250 % y lo más preferentemente un 300 %.

Además, existen ventajas comerciales en la realización de reacciones enzimáticas a mayores temperaturas. En consecuencia, la estabilidad térmica de la enzima mutante se incrementa preferentemente. Esto significa que la resistencia de la enzima mutante en relación con la enzima natural a temperaturas incrementadas es mayor. El incremento de la estabilidad térmica se puede determinar en particular como se muestra en los ejemplos, por ejemplo, en el ejemplo 3 (tablas 2A-D). En general, la enzima mutante y la enzima natural se pueden preincubar a una temperatura incrementada (por ejemplo, por encima de 50 °C, tal como 64 °C o 68 °C o 75 °C, etc.) durante un periodo de tiempo definido (tal como 10 minutos o 30 minutos), después de lo cual la actividad restante en la conversión de 3-HB en acetoacetato de la enzima mutante se compara con la actividad restante de la enzima natural. Si la actividad restante de la enzima mutante es mayor que la de la enzima natural, la enzima mutante tiene una estabilidad térmica incrementada.

En los ejemplos se detalla un procedimiento adecuado para la determinación de la estabilidad térmica incrementada. Condiciones ejemplares de condiciones extremas pueden ser preincubación a 60-90 °C (por ejemplo, 64 °C o 68 °C o 75 °C) durante 30 minutos y, a continuación, someter a prueba con 3-hidroxibutirato 62,22 mM; cNAD 4,15 mM; Triton X-100 al 0,1 %; Hepes 200 mM a pH 9,0 o 3-hidroxibutirato 150 mM; cNAD 5 mM; Triton X-100 al 0,1 %; Mops 70 mM a pH 7,5.

La expresión "afinidad por sustrato incrementada, especialmente por 3-hidroxibutirato, en relación con la 3-HBDH natural" significa que la afinidad de la enzima mutante por el sustrato ácido 3-hidroxibutírico / 3-hidroxibutirato / 3-hidroxibutanoato

- (3-HB) que se convierte en acetoacetato se incrementa. Para la determinación, la reacción enzimática se puede monitorizar (por ejemplo, a temperatura ambiente a 340 nm durante 5 minutos) y se puede calcular el dE/min para cada muestra. La afinidad de la enzima mutante se incrementa en comparación con la enzima natural si la enzima mutante, por ejemplo, tiene una mayor afinidad absoluta o relativa por el sustrato, en particular, 3-HB. La afinidad de la enzima mutante en comparación con la enzima natural se puede determinar comparando las afinidades absolutas de ambas enzimas (natural y mutante) (comparación absoluta) y se puede calcular en porcentaje de actividad ($(\text{dE/min (mutante)} / \text{dE (natural)}) * 100$) (%). De forma alternativa, la afinidad de la enzima mutante en comparación con la enzima natural se puede determinar comparando las afinidades relativas de ambas enzimas (natural y mutante) (comparación relativa). La afinidad relativa de la enzima natural o mutante se puede determinar ajustando la afinidad a la concentración de sustrato de subsaturación en relación con la afinidad a la concentración de sustrato de saturación. Como se detalla en los ejemplos 2-4, la afinidad por 3-hidroxibutirato se puede determinar en un ensayo de actividad con una cantidad reducida de sustrato (es decir, a una concentración de subsaturación), por ejemplo, con 3-hidroxibutirato 1,94 mM (otras condiciones ejemplares: cNAD 4,15 mM; Triton X-100 al 0,1 %; Hepes 200 mM a pH 9,0) o 3-hidroxibutirato 5mM (otras condiciones ejemplares: cNAD 5 mM; Triton X-100 al 0,1 %; Mops 70 mM a pH 7,5). Una prueba adecuada particular para determinar la afinidad se describe en detalle en el ejemplo 2. De acuerdo con esto, la afinidad se puede expresar como actividad relativa y calcular como $[\text{dE/min (concentración de sustrato de subsaturación)}] / [\text{dE/min (concentración de sustrato de saturación)}] * 100$. Otros detalles se dan en el ejemplo 2. Un valor obtenido con una enzima mutante que sea mayor que el valor obtenido con la enzima natural representa un incremento de la afinidad para la enzima mutante.
- Una afinidad incrementada se correlaciona con un valor de Km menor. La constante de Michaelis Km es la concentración del sustrato a la que la velocidad de reacción de la enzima es la mitad del máximo y es una medida inversa de la afinidad del sustrato por la enzima.
- La expresión "afinidad por cofactor incrementada, especialmente por NAD o un derivado del mismo, en particular en el que el derivado es carba-NAD, en relación con la 3-HBDH natural" significa que la afinidad de la enzima mutante por el cofactor (NAD o un derivado del mismo, especialmente carba-NAD) necesaria para convertir 3-HB en acetoacetato se incrementa. Como se detalla en los ejemplos 2-4, la afinidad por el cofactor se puede determinar en un ensayo de actividad con una cantidad reducida de cofactor (es decir, por debajo del nivel de saturación), por ejemplo, con cNAD 0,032 mM (otras condiciones ejemplares: 3-hidroxibutirato 62,22 mM; Triton X-100 al 0,1 %; Hepes 200 mM a pH 9,0) o cNAD 0,5 mM (otras condiciones ejemplares: 3-Hidroxibutirato 150 mM; Triton X-100 al 0,1 %; Mops 70 mM a pH 7,5). Los detalles anteriores dados con respecto a la afinidad por el sustrato son análogamente aplicables a la afinidad por el cofactor. Una prueba adecuada particular para determinar la afinidad se describe en detalle en el ejemplo 2.
- En particular, la 3-HBDH mutante de la presente invención se caracteriza por que la 3-HBDH mutante tiene una estabilidad incrementada en al menos un factor 2 en relación con la 3-HBDH natural, preferentemente una estabilidad incrementada en al menos un factor 3, preferentemente una estabilidad incrementada en al menos un factor 4, más preferentemente una estabilidad incrementada en al menos un factor 5; y/o se caracteriza por que la 3-HBDH mutante tiene una afinidad incrementada por el sustrato y/o cofactor en relación con la 3-HBDH natural, en particular una afinidad incrementada por (i) 3-hidroxibutirato y/o (ii) dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD) o un derivado funcionalmente activo del mismo y/o en particular en el que la afinidad por el sustrato y/o cofactor se incrementa en al menos un 5 %, más en particular en al menos un 10 %, todavía más en particular en al menos un 15 % o 20 %.
- En otro aspecto, la presente invención se refiere a un ácido nucleico que codifica la 3-HBDH mutante de la presente invención como se describe anteriormente.
- La expresión "ácido nucleico", como se usa en el presente documento, se refiere en general a cualquier molécula de nucleótidos que codifica la 3-HBDH mutante de la invención y que puede ser de longitud variable. Los ejemplos de un ácido nucleico de la invención incluyen, pero no se limitan a, plásmidos, vectores, o cualquier tipo de fragmento(s) de ADN y/o ARN que se puedan aislar mediante procedimientos estándar de biología molecular, incluyendo, por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico. Se puede usar un ácido nucleico de la invención para la transfección o transducción de una célula u organismo particular.
- La molécula de ácido nucleico de la presente invención puede estar en forma de ARN, tal como ARNm o ARNc, o en forma de ADN, incluyendo, por ejemplo, ADNc y ADN genómico, por ejemplo, obtenido por clonación o producido por técnicas de síntesis química o por combinación de las mismas. El ADN puede ser tricatenario, bicatenario o monocatenario. El ADN monocatenario puede ser la cadena codificante, también conocida como la cadena sentido, o puede ser la cadena no codificante, también conocida como la cadena antisentido. Molécula de ácido nucleico, como se usa en el presente documento, también se refiere a, entre otros, ADN monocatenario y bicatenario, ADN que es una mezcla de ARN monocatenario y bicatenario y ARN que es una mezcla de regiones monocatenarias y bicatenarias, moléculas híbridas que comprenden ADN y ARN que pueden ser monocatenarios o, más típicamente, bicatenarios o tricatenarios, o una mezcla de regiones monocatenarias y bicatenarias. Además, la molécula de ácido nucleico, como se usa en el presente documento, se refiere a regiones tricatenarias que comprenden ARN o ADN o tanto ARN como ADN.
- Además, el ácido nucleico puede contener una o más bases modificadas. Dichos ácidos nucleicos también pueden contener modificaciones, por ejemplo, en la cadena principal de ribosa-fosfato para incrementar la estabilidad y la semivida de dichas moléculas en entornos fisiológicos. Por tanto, los ADN o ARN con cadenas principales modificadas por

- estabilidad o por otras razones son "moléculas de ácido nucleico" como ese rasgo característico se pretende en el presente documento. Además, los ADN o ARN que comprenden bases inusuales, tal como inosina, o bases modificadas, tales como bases tritiladas, por nombrar solo dos ejemplos, son moléculas de ácido nucleico dentro del contexto de la presente invención. Se apreciará que se ha preparado una gran variedad de modificaciones al ADN y al ARN que sirven para muchos propósitos útiles conocidos por los expertos en la técnica. El término molécula de ácido nucleico, tal como se emplea en el presente documento, engloba dichas formas modificadas química, enzimática o metabólicamente de la molécula de ácido nucleico, así como las formas químicas de ADN y ARN características de virus y células, incluyendo células simples y complejas, entre otras.
- Además, la molécula de ácido nucleico que codifica la 3-HBDH mutante de la invención se puede enlazar de forma funcional, usando técnicas estándar tales como técnicas de clonación estándar, a cualquier secuencia deseada, tal como una secuencia reguladora, secuencia líder, secuencia marcadora heteróloga o una secuencia codificante heteróloga para crear una proteína de fusión.
- El ácido nucleico de la invención se puede formar originalmente *in vitro* o en una célula en cultivo, en general, mediante la manipulación de ácidos nucleicos por endonucleasas y/o exonucleasas y/o polimerasas y/o ligasas y/o recombinasas u otros procedimientos conocidos por el experto en la técnica para producir los ácidos nucleicos.
- El ácido nucleico de la invención puede estar comprendido en un vector de expresión, en el que el ácido nucleico está enlazado de forma funcional a una secuencia promotora que puede promover la expresión del ácido nucleico en una célula huésped.
- Como se usa en el presente documento, el término "vector de expresión" se refiere, en general, a cualquier tipo de molécula de ácido nucleico que se puede usar para expresar una proteína de interés en una célula (véanse también detalles anteriores sobre los ácidos nucleicos de la presente invención). En particular, el vector de expresión de la invención puede ser cualquier plásmido o vector conocido por el experto en la técnica que sea adecuado para expresar una proteína en una célula huésped particular, incluyendo, pero sin limitarse a, células de mamíferos, células bacterianas y células de levaduras. Una construcción de expresión de la presente invención también puede ser un ácido nucleico que codifica una 3-HBDH de la invención, y que se usa para la clonación posterior en un vector respectivo para garantizar la expresión. Los plásmidos y vectores para la expresión de proteínas son bien conocidos en la técnica, y se pueden adquirir comercialmente de diversos proveedores, incluyendo, por ejemplo, Promega (Madison, WI, EE. UU.), Qiagen (Hilden, Alemania), Invitrogen (Carlsbad, CA, EE. UU.) o MoBiTec (Alemania). Los procedimientos de expresión de proteínas son bien conocidos por los expertos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Sambrook et al., 2000 (Molecular Cloning: A laboratory manual, Tercera Edición).
- El vector puede incluir adicionalmente secuencias de ácido nucleico que le permiten replicarse en la célula huésped, tal como un origen de replicación, uno o más genes terapéuticos y/o genes marcadores seleccionables y otros elementos genéticos conocidos en la técnica, tales como elementos reguladores que dirigen la transcripción, traducción y/o secreción de la proteína codificada. El vector se puede usar para transducir, transformar o infectar una célula, provocando de este modo que la célula exprese ácidos nucleicos y/o proteínas distintos de los naturales de la célula. El vector incluye opcionalmente materiales para ayudar a lograr la entrada del ácido nucleico en la célula, tal como una partícula vírica, liposoma, recubrimiento de proteína o similar. Son conocidos en la técnica numerosos tipos de vectores de expresión apropiados para la expresión de proteínas, mediante técnicas estándar de biología molecular. Dichos vectores se seleccionan de tipos de vectores convencionales que incluyen insectos, por ejemplo, expresión de baculovirus, o sistemas de expresión de levaduras, fúngicos, bacterianos o víricos. Otros vectores de expresión apropiados, de los cuales son conocidos en la técnica numerosos tipos, también se pueden usar para este propósito. Los procedimientos para obtener dichos vectores de expresión son bien conocidos (véase, por ejemplo, Sambrook et al., supra).
- Como se detalla anteriormente, el ácido nucleico que codifica una 3-HBDH mutante de la invención se enlaza de forma funcional a una secuencia que es adecuada para dirigir la expresión de una proteína en una célula huésped, para garantizar la expresión de la proteína. Sin embargo, se engloba dentro de la presente invención que la construcción de expresión reivindicada puede representar un producto intermedio, que posteriormente se clona en un vector de expresión adecuado para garantizar la expresión de la proteína. El vector de expresión de la presente invención puede comprender además todo tipo de secuencias de ácido nucleico, incluyendo, pero sin limitarse a, señales de poliadenilación, señales de donante de ajuste y aceptor de ajuste, secuencias intermedias, secuencias potenciadoras de la transcripción, secuencias potenciadoras de la traducción, genes de resistencia a fármacos o similar. Opcionalmente, el gen de resistencia a fármacos puede estar enlazado de forma funcional a un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES), que podría ser específico del ciclo celular o independiente del ciclo celular.
- El término "enlazado de forma funcional" como se usa en el presente documento significa, en general, que los elementos genéticos están dispuestos de modo que funcionan en concierto para sus propósitos previstos, por ejemplo, en el que la transcripción se inicia por el promotor y procede a través de la secuencia de ADN que codifica la proteína de la presente invención. Es decir, la ARN polimerasa transcribe la secuencia que codifica la proteína de fusión en ARNm, que a continuación se ajusta y se traduce en una proteína.
- El término "secuencia promotora" como se usa en el contexto de la presente invención se refiere, en general, a cualquier

tipo de secuencia reguladora de ADN enlazada de forma funcional a una secuencia codificante en dirección 3', en la que dicho promotor se puede unir la ARN polimerasa e iniciar la transcripción del marco de lectura abierto codificado en una célula, dirigiendo de este modo la expresión de dicha secuencia codificante en dirección 3'. La secuencia promotora de la presente invención puede ser cualquier tipo de secuencia promotora conocida por el experto en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, promotores constitutivos, promotores inducibles, promotores específicos del ciclo celular y promotores específicos del tipo celular.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una célula que comprende la 3-HBDH mutante de la presente invención o el ácido nucleico de la presente invención. En un modo de realización de la presente invención, una célula que comprende la enzima mutante se usa en el contexto de la presente invención. La célula es preferentemente una célula huésped. Una "célula huésped" de la presente invención puede ser cualquier tipo de organismo adecuado para su aplicación en tecnología de ADN recombinante, e incluye, pero no se limita a, todo tipo de cepas bacterianas y de levadura que sean adecuadas para expresar una o más proteínas recombinantes. Los ejemplos de células huésped incluyen, por ejemplo, diversas cepas de *Bacillus subtilis* o *E. coli*. Un experto en la técnica conoce una variedad de células huésped bacterianas de *E. coli* e incluye, pero no se limita a, cepas tales como DH5-alfa, HB101, MV1190, JM109, JM101 o XL-1 blue que se pueden adquirir comercialmente de diversos proveedores, incluyendo, por ejemplo, Stratagene (CA, EE. UU.), Promega (WI, EE. UU.) o Qiagen (Hilden, Alemania). Una célula huésped en particular adecuada también se describe en los ejemplos, a saber, células XL-1 Blue de *E. coli*. Las cepas de *Bacillus subtilis* que se pueden usar como célula huésped incluyen, por ejemplo, 1012 natural: leuA8 metB5 trpC2 hsdRM1 y 168 Marburg: trpC2 (Trp-), que están disponibles comercialmente en MoBiTec (Alemania).

El cultivo de células huésped de acuerdo con la invención es un procedimiento rutinario conocido por el experto en la técnica. Es decir, un ácido nucleico que codifica una 3-HBDH mutante de la invención se puede introducir en una célula o células huésped adecuadas para producir la proteína respectiva por medios recombinantes. Estas células huésped pueden ser cualquier tipo de células adecuadas, preferentemente células bacterianas tales como *E. coli*, que se pueden cultivar fácilmente. En una primera etapa, este enfoque puede incluir la clonación del gen respectivo en un vector plasmídico adecuado. Los vectores plasmídicos se usan ampliamente para la clonación génica y se pueden introducir fácilmente, es decir, transformar, en células bacterianas que se han hecho competentes. Después de que la proteína se haya expresado en la célula huésped respectiva, las células se pueden romper por medio de lisis celular química o mecánica que el experto en la técnica conoce bien e incluye, pero no se limita a, por ejemplo, tratamiento con solución salina hipotónica, tratamiento con detergentes, homogeneización o ultrasonidos.

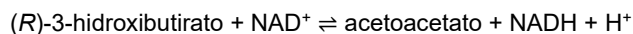
En otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de determinación de la cantidad o concentración de 3-hidroxibutirato en una muestra, comprendiendo el procedimiento

a) poner en contacto la muestra con la 3-HBDH mutante de la presente invención en condiciones propicias para la actividad de la 3-HBDH;

b) hacer reaccionar el 3-hidroxibutirato con dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD) o un derivado funcionalmente activo del mismo; y

c) determinar el cambio del estado de oxidorreducción de NAD o el derivado del mismo, determinando de este modo la cantidad o concentración de 3-hidroxibutirato en la muestra.

El procedimiento anterior se basa en el hecho de que la 3-HBDH se puede usar para catalizar la conversión de 3-HB en acetoacetato de acuerdo con el siguiente esquema:



En una primera etapa del procedimiento de la presente invención, se pone en contacto una muestra con la 3-HBDH de la presente invención. El contacto de la muestra con la 3-HBDH mutante puede ser directo (por ejemplo, en ensayos con líquidos) o indirecto (por ejemplo, en sistemas de sensores en los que solo una fracción de la muestra (que contiene el analito) está en contacto con la 3-HBDH).

Es evidente que el contacto se debe llevar a cabo en condiciones propicias para la actividad de la 3-HBDH, es decir, que permitan que la enzima convierta el 3-HB en acetoacetato. La etapa de incubación puede variar de aproximadamente 5 segundos a varias horas, preferentemente de aproximadamente 10 segundos a aproximadamente 10 minutos. Sin embargo, el tiempo de incubación dependerá del formato del ensayo, el volumen de la solución, las concentraciones y similares. Normalmente, el ensayo se llevará a cabo a temperatura ambiente o a la temperatura requerida para otros formatos de prueba llevados a cabo de manera concomitante (por ejemplo, de 25 °C a 38 °C; tal como 30 °C o 37 °C), aunque se puede realizar en un intervalo de temperaturas, tal como de 10 °C a 40 °C.

Opcionalmente, la enzima se puede fijar a o inmovilizar en una capa de soporte antes del contacto con la muestra para facilitar el ensayo. Los ejemplos de capas de soporte incluyen vidrio o plástico en forma de, por ejemplo, una placa de microvaloración, un portaobjetos de vidrio o un cubreobjetos, una varilla, una microesfera o una microperla, membranas (por ejemplo, usadas en tiras reactivas) y capas de biosensores.

La muestra puede ser cualquier muestra sospechosa de contener 3-HB, en particular una muestra de un sujeto. La expresión "muestra de un sujeto" incluye todos los líquidos biológicos, excreciones y tejidos aislados de cualquier sujeto dado, en particular un ser humano. En el contexto de la presente invención, dichas muestras incluyen, pero no se limitan a, muestras de sangre, suero sanguíneo, plasma sanguíneo, aspirado de pezón, orina, semen, líquido seminal, plasma seminal, líquido prostático, excreciones, lágrimas, saliva, sudor, pieza de biopsia, líquido ascítico, líquido cefalorraquídeo, leche, linfa, muestras de lavado bronquial y otros lavados, o muestras de un extracto de tejido. Preferentemente, el sujeto es un animal (incluyendo un ser humano), más preferentemente un mamífero, todavía más preferentemente un ser humano. Preferentemente, la muestra es un líquido corporal, en particular una muestra de sangre o una muestra de orina.

Típicamente, las muestras de sangre son muestras de prueba preferentes para su uso en el contexto de la presente invención. Para esto, se puede extraer sangre de una vena, normalmente del interior del codo o del dorso de la mano o de la yema de un dedo. En particular, en bebés o niños pequeños, se puede usar una herramienta afilada llamada bisturí para perforar la piel y hacerla sangrar. La sangre se puede recoger, por ejemplo, en una pipeta o cánula, o en un portaobjetos o tira reactiva.

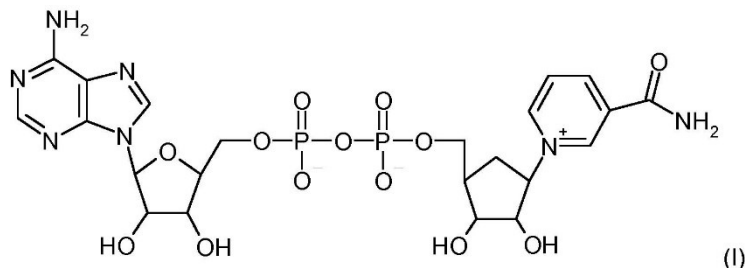
Después del contacto y la conversión de 3-HB, si está presente, se determina el cambio del estado de oxidorreducción de NAD o derivado mediado por la 3-HBDH, determinando de este modo el 3-HB en la muestra. Evidentemente, la cantidad de NADH o derivado del mismo producida y la cantidad de NAD o derivado del mismo consumida se correlacionan con la cantidad de 3-HB presente en la muestra. En consecuencia, el cambio del estado de oxidorreducción de NAD incluye la determinación de la cantidad o concentración de NAD y/o NADH, así como la proporción de los dos. Lo mismo se aplica a los derivados de NAD.

Se conoce en la técnica una variedad de procedimientos para determinar NADH/NAD o derivado del mismo y se puede usar cualquiera de ellos.

Los procedimientos ejemplares para determinar el NADH/NAD o derivado del mismo incluyen procedimientos electroquímicos (por ejemplo, como se describe en el documento US 6.541.216) o procedimientos ópticos (por ejemplo, midiendo la conversión de NAD/NADH por absorbancia de luz a, por ejemplo, 340 nm o 365 nm o por ensayos basados en una reductasa para formar luciferina, que se cuantifica a continuación ópticamente). Si se usan procedimientos electroquímicos, el NADH/NAD o derivado del mismo puede a) reaccionar directamente en un electrodo de medición o b) el NADH/NAD o derivado del mismo reacciona en una primera etapa con una sustancia mediadora oxidorreductora adicional que cambia su estado de oxidorreducción en una relación definida con el estado de oxidorreducción del NADH/NAD o derivado del mismo y este mediador oxidorreductor reacciona en una etapa posterior en el electrodo de medición.

Tanto el NAD como el NADP son moléculas lábiles en una base cuyas vías de degradación se describen en la literatura (véase, por ejemplo, N.J. Oppenheimer en *The Pyridine Nucleotide Coenzymes* Academic Press, Nueva York, Londres 1982, J. Everese, B. Anderson, K. You, autores de la edición, capítulo 3, páginas 56-65). Por lo tanto, los derivados de NADH/NAD se han desarrollado y están disponibles comercialmente. Algunos derivados se describen en *The Pyridine Nucleotide Coenzymes*, Academic Press, Nueva York, Londres 1982, autores de la edición J. Everese, B. Anderson, K. You, capítulo 4, los documentos WO 01/94370, documento WO 98/33936 y US 5.801.006.

Preferentemente, carba-NAD (cNAD) se usa como un derivado de NAD. En carba-NAD, la ribosa se sustituye por una unidad de azúcar carbacíclico. Carba-NAD tiene la siguiente estructura (I):



El compuesto, su producción y uso se describen en detalle en los documentos WO 2007/012494, WO 2011/012270 y WO 2014/195363. El cofactor en la presente invención es preferentemente carba-NAD. En un modo de realización de la presente invención, el cofactor es un derivado funcionalmente activo de NAD como se divulga en la fórmula III del documento WO 2011/012270 al que se hace referencia explícitamente. En un modo de realización de la presente invención, se usa NADP en lugar de NAD.

El procedimiento de la presente invención se puede llevar a cabo en una llamada prueba líquida o húmeda, por ejemplo, en una cubeta, o como una llamada prueba seca en un soporte de reactivo apropiado, estando presentes de este modo los reactivos de prueba necesarios en o sobre un soporte sólido, que es preferentemente un material absorbente o hinchable.

De forma alternativa o adicionalmente, la 3-HBDH puede formar parte de un sensor, una tira reactiva, un elemento de prueba, un dispositivo de tiras reactivas o una prueba líquida.

- 5 Un sensor es una entidad que mide una cantidad física/química y la convierte en una señal que puede leer un observador o un instrumento. En la presente invención, la 3-HBDH puede formar parte de un sensor. El sensor convierte 3-HB y NAD o un derivado del mismo en acetoacetato y NADH o un derivado del mismo, que luego se convierte en una señal tal como un cambio de color o un valor mostrado, por ejemplo, en una pantalla o monitor.
- 10 En un modo de realización, el sensor puede comprender 3-HBDH y un dispositivo amperométrico para determinar 3-HB de una muestra. Además, se podría usar un sistema de microdiálisis acoplado a una cubeta de lectura electroquímica para la monitorización continua de 3-HB en una muestra o sujeto. El electrodo de trabajo de la cubeta de lectura se podría preparar con la 3-HBDH inmovilizada en una película de polímero oxidorreductor sobre la superficie del electrodo. El acoplamiento de un sensor electroquímico con 3-HB directamente con microdiálisis elimina la necesidad de transferir partes alícuotas de muestra a un sistema de cromatografía de líquidos con un reactor de enzima oxidasa poscolumna. El 3-HB en el dializado de la sonda de microdiálisis se puede detectar selectivamente en el electrodo enzimático sin ninguna interferencia significativa de otras especies oxidables. Además, los biosensores acoplados a enzimas se han descrito en la técnica. De acuerdo con esto, la 3-HBDH se puede acoplar a una superficie (por ejemplo, imprimiendo una mezcla de 3-HBDH y grafito en almohadillas de grafito electrodepositado o mediante adsorción o inmovilización de la 3-HBDH mutante en partículas de carbono, partículas de carbono platinado, partículas de carbono/dióxido de manganeso, carbono vítreo o mezclándola con electrodos de pasta de carbono, etc.)
- 15 20

- Una tira reactiva o un elemento de prueba es un dispositivo analítico o de diagnóstico usado para determinar la presencia y/o cantidad de una sustancia objetivo dentro de una muestra. Una tira reactiva estándar puede comprender una o más zonas de reacción o almohadillas diferentes que comprenden reactivos que reaccionan (por ejemplo, cambian de color) cuando se ponen en contacto con una muestra. Las tiras reactivas son conocidas en muchos modos de realización, por ejemplo, de los documentos US 6.541.216, EP 262445 y US 4816224. Se sabe comúnmente que uno o más reactivos (por ejemplo, enzimas) necesarios para llevar a cabo los procedimientos de determinación están presentes sobre o en capas de soporte sólido. Como capas de soporte, existen materiales absorbentes y/o hinchables especialmente preferentes que se humedecen con el líquido de muestra que se va a analizar. Los ejemplos incluyen capas de gelatina, celulosa y lana sintética (forro polar).
- 25 30

- La 3-HBDH de la presente invención también puede formar parte de una prueba líquida. Una prueba líquida es una prueba en la que los componentes de prueba reaccionan en un medio líquido. Normalmente, en el campo de la analítica de laboratorio, los reactivos líquidos son a base de agua, por ejemplo, una solución salina tamponada para proporcionar la actividad de la(s) enzima(s) involucrada(s). El líquido se adapta normalmente al uso específico previsto. Para llevar a cabo una prueba líquida, todos los componentes de la prueba se disuelven en un líquido y se combinan (o viceversa). Los contenedores típicos para llevar a cabo dichas pruebas incluyen viales, placas multipocillo, cubetas, recipientes, vasos de reactivos, tubos, etc.
- 35 40

- En un modo de realización de la presente invención, la 3-HBDH de la presente invención se puede inmovilizar. Los procedimientos típicos de inmovilización incluyen la unión covalente, por ejemplo, a una membrana, la encapsulación en un polímero, la reticulación a una matriz de soporte o la inmovilización en una matriz de sol-gel (por ejemplo, vidrios tales como vidrios de silicato) o la adsorción en sustratos porosos. Los procedimientos adecuados para inmovilizar enzimas son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Lillis et al., 2000, Sensors and Actuators B 68: 109-114).
- 45

- En un modo de realización preferente de la presente invención, el procedimiento comprende además determinar la cantidad o concentración de glucosa. En otro modo de realización de la presente invención, el procedimiento comprende determinar la cantidad o concentración de acetona y/o acetoacetato; y/o determinar la cantidad o concentración de glucosa. La determinación de estos compuestos es de particular relevancia en el diagnóstico de las enfermedades y afecciones médicas anteriores. Los procedimientos para determinar estos compuestos son bien conocidos en la técnica. Adicionalmente, los sistemas y procedimientos para el análisis de múltiples analitos se conocen del documento WO 2014/068024.
- 50

- En consecuencia y preferentemente, el procedimiento de la presente invención se caracteriza además por que
- a) en el que la determinación del cambio de estado de oxidorreducción de NAD o el derivado del mismo incluye la determinación de la concentración de (i) NAD o el derivado del mismo y/o (ii) NADH o el derivado del mismo; y/o
- 60 b) en el que la determinación del cambio de estado de oxidorreducción de NAD o el derivado del mismo es electroquímica u óptica; y/o
- c) en el que el procedimiento comprende además determinar la cantidad o concentración de acetoacetato y/o acetona; y/o
- 65 d) en el que el procedimiento comprende además determinar la cantidad o concentración de glucosa; y/o

e) en el que el derivado de NAD es carba-NAD; y/o

f) en el que la 3-HBDH mutante forma parte de un sensor, una tira reactiva, un elemento de prueba, un dispositivo de tiras reactivas o una prueba líquida; y/o

g) en el que la muestra es un líquido corporal, en particular una muestra de sangre o una muestra de orina.

Todavía en otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de la 3-HBDH mutante de la presente invención para determinar la cantidad o concentración de 3-hidroxibutirato en una muestra.

Con respecto al uso de la presente invención, se refiere a los términos, ejemplos y modos de realización específicos usados en el contexto de los otros aspectos de la presente divulgación, que también son aplicables a este aspecto. En particular, la 3-HBDH mutante de acuerdo con la presente invención se puede usar como se detalla con respecto a los procedimientos de la presente invención.

Todavía en otro aspecto, la presente invención se refiere a un dispositivo para determinar la cantidad o concentración de 3-hidroxibutirato en una muestra que comprende la 3-HBDH mutante de la presente invención y opcionalmente un componente adicional requerido para dicha determinación.

Con respecto al dispositivo de la presente invención, se hace referencia a los términos, ejemplos y modos de realización específicos usados en el contexto de los otros aspectos de la presente divulgación, que también son aplicables a este aspecto. En particular, la 3-HBDH mutante de acuerdo con la presente invención se puede emplear como se detalla anteriormente.

La 3-HBDH de la presente invención puede formar parte de un dispositivo para determinar el 3-HB en una muestra. El dispositivo puede ser cualquier dispositivo adecuado para este propósito. El dispositivo puede ser una máquina o herramienta que se puede usar para determinar el 3-HB. Preferentemente, el dispositivo es un sensor, preferentemente un sensor electroquímico o una tira reactiva. Los dispositivos ejemplares se describen anteriormente y a continuación:

El dispositivo puede ser un sensor, por ejemplo, un biosensor, que es un dispositivo analítico para la detección de un analito que combina un componente biológico (aquí, la 3-HBDH de acuerdo con la presente invención) con un componente detector, en particular un componente detector fisicoquímico.

Los biosensores son en particular útiles para determinar la concentración de diversos analitos (incluyendo 3-HB) de muestras biológicas, en particular de sangre. Biosensores ejemplares basados en un formato de tira reactiva electroquímica se describen en las patentes de EE. UU. n.º 5.413.690; 5.762.770 y 5.997.817.

En el (bio)sensor de la presente invención, el 3-HB convertido en acetoacetato en presencia de la 3-HBDH y NAD o derivado y el cambio del estado de oxidorreducción de NAD o derivado se pueden monitorizar por el transductor o elemento detector.

En particular, los sensores con 3-HB se han combinado con otros sensores, por ejemplo, para determinar glucosa, acetona, acetoacetato, colesterol, triglicéridos, urea, gases en sangre o electrolitos, etc. Evidentemente, la 3-HBDH mutante de la presente invención también se podría usar en estos dispositivos multianalito.

Como se detalla anteriormente, el sensor es preferentemente un sensor electroquímico u óptico. Un sensor electroquímico se basa en la traducción de una señal química (aquí, la presencia de 3-HB) en una señal eléctrica (por ejemplo, corriente). Un electrodo adecuado puede medir la producción mediada por 3-HB de NADH o derivado del mismo como una señal eléctrica.

Un sensor óptico adecuado puede medir el cambio mediado por 3-HBDH del estado de oxidorreducción de NAD o derivado del mismo. La señal puede ser la absorbancia/emisión de luz mediada por NAD/NADH.

El dispositivo de la presente invención puede comprender, además de la 3-HBDH de la presente invención, uno o más componentes adicionales, tales como otros reactivos, requeridos para o útiles en dicha determinación. Los componentes pueden ser cualquiera de los descritos en el contexto de los procedimientos y dispositivos de la presente invención. Adicionalmente, esto puede incluir un manual de instrucciones, un dispositivo de bisturí, una pipeta capilar, una enzima adicional, un sustrato y/o una solución de control, etc.

Preferentemente, el dispositivo de la presente invención se caracteriza por que el dispositivo es o comprende un sensor, preferentemente un sensor electroquímico o un sensor óptico, o una tira reactiva, en particular una tira reactiva y/o permite determinar la cantidad o concentración de glucosa en la muestra. Con respecto al dispositivo de la presente invención, también se hace referencia a los términos, ejemplos y modos de realización específicos descritos anteriormente.

A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos y cualquier acrónimo usados en el presente

documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica en el campo de la invención. Se pueden encontrar definiciones de términos comunes en biología molecular en Benjamin Lewin, *Genes V*, publicado por Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew et al. (eds.), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, publicado por Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); y Robert A. Meyers (ed.), *Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference*, publicado por VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8).

La invención no se limita a la metodología, protocolos y reactivos particulares descritos en el presente documento porque pueden variar. Aunque cualquier procedimiento y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento se puede usar en la práctica de la presente invención, en el presente documento se describen los procedimientos y materiales preferentes. Además, la terminología usada en el presente documento es para el propósito de describir solo modos de realización particulares y no pretende limitar el alcance de la presente invención.

Como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen las referencias plurales a menos que el contexto lo indique claramente de otro modo. De forma similar, las palabras "comprender", "contener" y "englobar" se deben interpretar de forma inclusiva en lugar de exclusiva. De forma similar, la palabra "o" pretende incluir "y" a menos que el contexto lo indique claramente de otro modo. El término "pluralidad" se refiere a dos o más.

Las siguientes figuras y ejemplos pretenden ilustrar diversos modos de realización de la invención.

FIGURAS

La **figura 1** muestra la secuencia de aminoácidos y los dominios de la 3-HBDH natural de *Alcaligenes faecalis*

EJEMPLOS

Ejemplo 1 Establecimiento de una colección de enzimas mutantes de 3-HBDH

El gen para la 3-hidroxi-butarato deshidrogenasa (3-HBDH) de *Alcaligenes faecalis* (base de datos UniProtKB - D0VWQ0) se sintetizó, se clonó en el vector pKKT5 y se transformó en la cepa XL-1 Blue de *E. coli* mediante procedimientos conocidos de biología molecular.

Se aplicó mutagénesis de saturación en muchas posiciones de aminoácidos de la enzima. La mutagénesis se logró mediante la aplicación de cebadores sintetizados aleatoriamente con el kit de mutagénesis dirigida al sitio QuikChange (Agilent Technologies Cat. 200518).

El cebador en 5' y el cebador en 3' usados para la mutagénesis eran complementarios entre sí y contenían NNN (nucleótidos sintetizados aleatoriamente) para el intercambio de aminoácidos en una posición central. Este codón creado aleatoriamente estaba flanqueado por 12 a 16 nucleótidos en cada extremo. Las secuencias de estos nucleótidos eran idénticas a la hebra de ADNc o a la hebra de ADNc complementaria que flanquea el codón para la aminosustitución. La colección de enzimas mutantes se creó mediante la transformación de genes mutados en la cepa XL-Blue de *E. coli* y el cultivo en placas de agar durante la noche a 37 °C.

Ejemplo 2 Determinación de las propiedades de las enzimas mutantes 3-HBDH de la primera ronda de mutagénesis (enzimas mutantes con sustituciones de aminoácidos individuales)

Una colección de enzimas mutantes 3-HBDH producidas como se describe en el ejemplo 1 se examinó para determinar las siguientes propiedades enzimáticas:

- Estabilidad térmica
- Afinidad para 3-hidroxi-butarato
- Afinidad para c-NAD (carba-NAD = cofactor artificial, véase el documento US20120130062A1)

Las colonias mutantes en las placas de agar descritas anteriormente se recogieron en placas de microvaloración (pmv) que contenían 200 µl de medio LB-ampicilina/cavidad y se incubaron a 37 °C durante la noche. Estas placas se denominaron placas fundamentales. Para cada posición de aminoácido, se seleccionaron dos placas fundamentales para garantizar que se incluyeran todos los intercambios posibles.

De cada placa fundamental se transfirieron 40 µl de muestra/cavidad a una pmv que contenía 200 µl de Triton X-100 al 0,1 %; NaCl 500 mM; Hepes 200 mM a pH 9,0; B-Per al 2 %/cavidad (B-Per = reactivo de extracción de proteína bacteriana de Pierce n.º 78248) y se incubaron para la disgregación celular a 40 °C durante 30 minutos. Esta placa se denominó placa de trabajo.

De la placa de trabajo se transfirieron 4 x 20 µl de muestra/cavidad a cuatro pmv vacías. Una de estas se sometió a

prueba con 3-hidroxibutirato 62,22 mM; cNAD 4,15 mM; Triton X-100 al 0,1 %; Hepes 200 mM, pH 9,0 a temperatura ambiente y se denomina medición de referencia. Las otras pmv se sometieron a prueba en diferentes condiciones y los valores obtenidos se compararon con la placa de referencia en porcentaje.

5 Se midieron los siguientes parámetros:

- Estabilidad térmica: La pmv se incubó durante 30 min a 64 °C y se sometió a prueba posteriormente con 3-hidroxibutirato 62,22 mM; cNAD 4,15 mM; Triton X-100 al 0,1 %; Hepes 200 mM a pH 9,0

10 - Afinidad por 3-hidroxibutirato: Ensayo de actividad con una cantidad reducida de sustrato (es decir, por debajo de la saturación del sustrato). Medición con 3-hidroxibutirato 1,94 mM; cNAD 4,15 mM; Triton X-100 al 0,1 %; Hepes 200 mM a pH 9,0

15 - Afinidad por cNAD: Ensayo de actividad con una cantidad reducida de cofactor (es decir, por debajo de la saturación). Medición con 3-hidroxibutirato 62,22 mM; cNAD 0,032 mM; Triton X-100 al 0,1 %; Hepes 200 mM a pH 9,0

20 La reacción enzimática se monitorizó a temperatura ambiente a 340 nm durante 5 minutos y se calculó el dE/min para cada placa de trabajo. El valor de la medición de referencia se estableció como 100 % de actividad. Los valores obtenidos con las otras tres placas (estabilidad térmica, afinidad por 3-hidroxibutirato o por cNAD) se compararon con la referencia y se calculó el porcentaje de actividad $((\text{dE/min Parámetro} / \text{dE/min Referencia}) * 100)$. Cada placa fundamental contenía, además de las enzimas mutantes, la enzima natural como control para estimar mejor las mejoras o el deterioro de las propiedades.

25 La estabilidad térmica expresada como actividad restante se calculó como sigue:

$$\left(\frac{\text{dE/ min muestra en cond. extremas (es decir, en el ejemplo 2: 30 min. 64 °C)}}{\text{dE/ min muestra en cond. no extremas}} \right) * 100 = \text{actividad restante en porcentaje}$$

30 Un valor obtenido con una enzima mutante que sea mayor que el valor obtenido con la enzima natural representa un incremento de la estabilidad térmica de la enzima mutante.

La afinidad por el sustrato expresada como proporción de actividad se calculó como sigue:

$$\left(\frac{\text{dE/ min obtenido con menos sustrato}}{\text{dE/ min obtenido con sustrato en saturación}} \right) * 100 = \text{actividad en porcentaje}$$

35 Una enzima mutante con mayor afinidad por el sustrato mostrará mayor actividad cuando reaccione con menos sustrato (por debajo de la saturación del sustrato) que una enzima mutante con menor afinidad por el sustrato. Un valor obtenido con una enzima mutante que sea mayor que el valor obtenido con la enzima natural representa un incremento de la afinidad del sustrato por la enzima mutante.

40 La afinidad por el cofactor expresada como proporción de actividad se calculó en consecuencia:

$$\left(\frac{\text{dE/ min obtenido con menos cofactor}}{\text{dE/ min obtenido con cofactor en saturación}} \right) * 100 = \text{actividad en porcentaje}$$

45 Los datos por debajo de 0,001 dE/min se establecieron como cero, dando como resultado valores "cero", como en las tablas 1B y 1C.

Los resultados relativos a la enzima natural se resumen en las tablas 1A, 1B y 1C.

50 **Tabla 1A: Estabilidad térmica y afinidad de diversas enzimas mutantes individuales en relación con la 3-HBDH natural denominada AFDH1**

Clon	Afinidad por		Estabilidad térmica
	3-HB	cNAD	
AFDH1 + M1V	+	o	-
AFDH1 + L2C	+	o	o
AFDH1 + L2Q	+	o	o
AFDH1 + L2R	+	+	-
AFDH1 + L2D	+	o	o
AFDH1 + L2M	+	o	-

Clon	Afinidad por		Estabilidad térmica
	3-HB	cNAD	
AFDH1 + L2S	+	+	-
AFDH1 + K3C	o	-	++
AFDH1 + K6V	o	-	+
AFDH1 + K6G	+	-	+
AFDH1 + T10S	+	-	+
AFDH1 + T10G	o	o	+
AFDH1 + T13S	-	-	+
AFDH1 + L18R	+	o	-
AFDH1 + L18K	+	o	-
AFDH1 + L18E	+	o	+
AFDH1 + L18P	-	-	++
AFDH1 + A19G	+	o	++
AFDH1 + A21G	+	o	++
AFDH1 + V31C	+	o	+
AFDH1 + V33A	o	o	+
AFDH1 + I33T	+	+	-
AFDH1 + V33L	+	o	+
AFDH1 + P39G	o	o	+
AFDH1 + E40G	o	o	+
AFDH1 + E41F	+	o	-
AFDH1 + I42T	o	o	++
AFDH1 + I42R	-	-	++
AFDH1 + I42L	-	-	++
AFDH1 + E43I	+	+	+
AFDH1 + E43G	-	-	+
AFDH1 + E43C	-	-	+
AFDH1 + E43L	-	-	+
AFDH1 + E45H	+	o	-
AFDH1 + E45Q	+	o	-
AFDH1 + A62M	+	+	-
AFDH1 + A62K	+	+	-
AFDH1 + A62F	+	+	-
AFDH1 + A62R	+	+	o
AFDH1 + A62L	+	+	-
AFDH1 + A62V	o	o	+
AFDH1 + A69V	+	+	-
AFDH1 + A69T	+	+	-
AFDH1 + T70P	o	-	++
AFDH1 + D72P	+	o	+
AFDH1 + F73T	+	o	-
AFDH1 + A109Y	+	o	-
AFDH1 + I111V	+	+	-
AFDH1 + I111L	-	o	+
AFDH1 + A112E	o	-	+
AFDH1 + A112R	-	-	+
AFDH1 + A112T	-	-	+
AFDH1 + A112C	o	-	+
AFDH1 + N114D	-	+	+

Clon	Afinidad por		Estabilidad térmica
	3-HB	cNAD	
AFDH1 + S116D	0	-	+
AFDH1 + A117T	-	-	+
AFDH1 + V118S	-	-	+
AFDH1 + A124V	+	0	-
AFDH1 + A124I	+	0	++
AFDH1 + A124V	+	0	+
AFDH1 + A124C	+	-	+
AFDH1 + A125G	+	-	+
AFDH1 + I140M	-	-	++
AFDH1 + A141S	+	+	-
AFDH1 + A143V	-	-	++
AFDH1 + V147R	0	0	++
AFDH1 + A148G	0	-	++
AFDH1 + S153I	+	0	-
AFDH1 + V156T	-	-	+
AFDH1 + V168A	-	-	++
AFDH1 + A170G	+	0	+
AFDH1 + N173K	+	0	+
AFDH1 + G175T	+	0	+
AFDH1 + G175V	+	0	+
AFDH1 + G175I	+	0	+
AFDH1 + G177P	+	++	-
AFDH1 + G177Q	+	+	-
AFDH1 + W187F	+	0	+
AFDH1 + P191R	+	+	-
AFDH1 + P191A	+	0	-
AFDH1 + L192M	+	+	-
AFDH1 + V193T	+	0	-
AFDH1 + K195V	+	0	-
AFDH1 + I200R	+	0	-
AFDH1 + Q203I	-	-	+
AFDH1 + R213Y	+	0	-
AFDH1 + R213W	+	0	-
AFDH1 + R213D	+	0	-
AFDH1 + L216V	+	+	-
AFDH1 + A217L	+	+	-
AFDH1 + E218P	-	-	++
AFDH1 + Q220M	++	+	-
AFDH1 + Q220T	++	+	-
AFDH1 + L223H	+	0	-
AFDH1 + L223N	+	0	-
AFDH1 + Q224T	+	0	-
AFDH1 + Q224A	+	0	-
AFDH1 + Q224V	+	0	-
AFDH1 + T227E	-	+	+
AFDH1 + T227N	++	++	-
AFDH1 + T227A	+	++	-
AFDH1 + T227R	+	++	-

Clon	Afinidad por		Estabilidad térmica
	3-HB	cNAD	
AFDH1 + T227G	+	++	-
AFDH1 + T227V	+	++	-
AFDH1 + T227K	+	++	-
AFDH1 + P228R	+	o	-
AFDH1 + P228V	+	o	-
AFDH1 + P228G	+	o	-
AFDH1 + G233S	+	+	-
AFDH1 + G233I	+	+	-
AFDH1 + G233A	o	+	-
AFDH1 + G233P	+	+	-
AFDH1 + G233R	o	+	-
AFDH1 + G233T	o	+	-
AFDH1 + G233K	+	+	-
AFDH1 + A241P	o	o	+
AFDH1 + A242T	-	-	+
AFDH1 + A242Y	+	o	++
AFDH1 + L251W	+	o	-
AFDH1 + L251M	o	o	+
AFDH1 + S252V	o	o	+
AFDH1 + L253I	+	o	+
AFDH1 + L253A	+	++	-
AFDH1 + L253C	+	++	-
AFDH1 + G256A	+	o	-
AFDH1 + A259S	+	+	-
AFDH1 + R260I	+	+	-
AFDH1 + R260G	+	+	-
AFDH1 + R260W	+	+	-

(+ = mejorada; o = similar; - = disminuida)

Tabla 1B: Estabilidad térmica y afinidad de diversas enzimas mutantes individuales de 3-HBDH

Clon	Afinidad por*		Estabilidad térmica**
	3-HB	cNAD	
AFDH1	19	6	7
AFDH1 + K3C	10	0	100
AFDH1 + L18K	41	3	0
AFDH1 + L18E	31	3	96
AFDH1 + L18P	11	0	107
AFDH1 + A19G	34	5	100
AFDH1 + V33A	20	3	80
AFDH1 + I33T	29	7	0
AFDH1 + V33L	25	4	78
AFDH1 + P39G	16	4	84
AFDH1 + A62M	30	10	5
AFDH1 + A62K	31	10	6
AFDH1 + A62F	31	6	8
AFDH1 + A62R	32	11	11
AFDH1 + A62L	30	9	6

Clon	Afinidad por*		Estabilidad térmica**
	3-HB	cNAD	
AFDH1 + A62V	13	4	44
AFDH1 + A125G	23	3	34
AFDH1 + A143V	12	2	93
AFDH1 + A148G	17	3	113
AFDH1 + A170G	22	4	91
AFDH1 + G175T	25	4	91
AFDH1 + G175V	26	4	72
AFDH1 + G175I	26	4	55
AFDH1 + W187F	27	4	75
AFDH1 + L216V	25	20	0
AFDH1 + G233S	23	19	0
AFDH1 + G233I	27	38	0
AFDH1 + G233A	19	41	0
AFDH1 + G233P	35	44	0
AFDH1 + G233R	18	40	0
AFDH1 + G233T	17	38	0
AFDH1 + G233K	20	41	0
AFDH1 + L253I	32	7	76
AFDH1 + L253A	30	53	0
AFDH1 + L253C	30	51	0

* dado como proporción de actividad (%) con 3-HB 1,94/62,22 mM y cNAD 0,032/4,15 mM

** dado como actividad restante (%) después de una incubación de 30 minutos a 64 °C

5

Tabla 1C: Diversas enzimas mutantes individuales con estabilidad térmica altamente mejorada en relación con la 3-HBDH natural

Clon	Afinidad*		Estabilidad térmica**
	3-HB	cNAD	
AFDH1	19	6	7
AFDH1 +K3C	10	0	100
AFDH1 + L18P	11	0	107
AFDH1 + A19G	34	5	100
AFDH1 + A21G	18	3	102
AFDH1 + V31C	18	4	84
AFDH1 + V33A	20	3	80
AFDH1 + V33L	25	4	78
AFDH1 + P39G	16	4	84
AFDH1 + E40G	12	3	95
AFDH1 + I42T	19	4	100
AFDH1 + I42R	9	0	100
AFDH1 + I42L	15	3	105
AFDH1 + T70P	20	0	100
AFDH1 + D72P	30	4	77
AFDH1 + I111L	12	5	84
AFDH1 + A112E	21	3	78
AFDH1 + A112R	15	3	70
AFDH1 + A124I	26	5	99
AFDH1 + A124V	22	4	52

Clon	Afinidad*		Estabilidad térmica**
	3-HB	cNAD	
AFDH1 + I140M	13	4	100
AFDH1 + A143V	12	2	93
AFDH1 + V147R	19	4	122
AFDH1 + A148G	17	3	100
AFDH1 + A170G	22	4	91
AFDH1 + G175T	25	4	91
AFDH1 + W187F	27	4	75
AFDH1 + E218P	6	0	100
AFDH1 + A241P	20	4	80
AFDH1 + A242Y	20	4	100
AFDH1 + L251M	19	4	50
AFDH1 + S252V	19	7	59
AFDH1 + L253I	32	7	100

* dado como proporción de actividad (%) con 3-HB 1,94/62,22 mM y 0,032/4,15 mM

* dado como actividad restante (%) después de una incubación de 30 minutos a 64 °C

Se eligió una enzima mutante ejemplar con intercambio L253I para una optimización adicional mediante la combinación de posiciones encontradas adicionales.

Ejemplo 3 Cribado de enzimas mutantes 3-HBDH de la segunda ronda de mutagénesis (enzimas mutantes con sustitución de aminoácidos L253I y opcionalmente una o más sustituciones de aminoácidos adicionales)

A menos que se indique de otro modo, los experimentos se han llevado a cabo como se detalla en el ejemplo 2. En una segunda ronda de mutagénesis, las mutaciones seleccionadas se introdujeron en la variante AFDH1 + L253I. Los resultados se resumen en la tabla 2A:

Tabla 2A: Estabilidad térmica (68 °C, 30 min) y afinidad de diversas enzimas mutantes con sustitución de aminoácidos L253I

Clon	Afinidad por*		Estabilidad térmica**
	3-HB	cNAD	
AFDH1 + L253I	32	8	91
AFDH1 + L253I+E43G	29	6	104
AFDH1 + L253I+E43V	25	5	101
AFDH1 + L253I+G233M	27	6	57
AFDH1 + L253I+G233K+A234T	29	6	101
AFDH1 + L253I+G233C	29	5	78
AFDH1 + L253I+L2C	37	7	41
AFDH1 + L253I+V157R	30	7	71

* dado como proporción de actividad (%) con 3-HB 1,94/62,22 mM y cNAD 0,032/4,15 mM

* dado como actividad restante (%) después de una incubación de 30 minutos a 68 °C

La variante ejemplar AFDH1 + L253I + G233K + A234T se combinó además con otras posiciones encontradas. Los resultados se resumen en la tabla 2B:

Tabla 2B: Estabilidad térmica (75°C, 30 min) y afinidad de diversas enzimas mutantes con sustituciones aminoacídicas L253I, G233K y A234T

Clon	Afin. 3-HB*	Estabilidad térmica**
AFDH1 + L253I+G233K+A234T	14	5

Clon	Afin. 3-HB*	Estabilidad térmica**
AFDH1 + A62V+L253I+G233K+A234T	16	17
AFDH1 + L253I+G233K+A234T+148G	11	78
AFDH1 + L253I+G233K+A234T+124I+148G	13	91
AFDH1 + L253I+G233K+A234T+39G+124I+148G	12	98
AFDH1 + L253I+G233K+A234T+124I	16	37
AFDH1 + L253I+G233K+A234T+38K+39G+124I	17	33
AFDH1 + L253I+G233K+A234T+39G+124I	15	32
AFDH1 + L253I+G233K+A234T+39G	12	29
AFDH1 + L253I+G233K+A234T+39G+124I	16	31
AFDH1 + L253I+G233K+A234T+175V	18	56
AFDH1 + L253I+G233K+A234T+39G+62R+148G	12	83
AFDH1 + L253I+G233K+A234T+39G+124I	15	38
AFDH1 + L253I+G233K+A234T+62R+175V+242Y	23	0
AFDH1 + L253I+G233K+A234T+39G+124I+148G+175V+242Y	18	52
AFDH1 + A62V+L253I+G233K+A234T+39G+111L	14	79
AFDH1 + A62V+L253I+G233K+A234T+143V	13	95
AFDH1 + A62V+L253I+G233K+A234T+33L	19	0
AFDH1 + A62V+L253I+G233K+A234T+175I	28	54
AFDH1 + A62V+L253I+G233K+A234T+175V	24	68
AFDH1 + A62V+L253I+G233K+A234T+175V+242Y	22	0
AFDH1 + A62V+L253I+G233K+A234T+175T	23	78
AFDH1 + A62V+L253I+G233K+A234T+18E	25	36
AFDH1 + A62V+L253I+G233K+A234T+39G+187F	17	26

* dado como proporción de actividad (%) con 3-HB 1,94/62,22 mM

* dado como actividad restante (%) después de una incubación de 30 minutos a 75 °C

Las enzimas mutantes seleccionadas se eligieron y sometieron a condiciones extremas a 80 ° C durante 30 minutos. Los resultados se resumen en la tabla 2C:

Tabla 2C: Estabilidad térmica (80 °C, 30 min) y afinidad de enzimas mutantes seleccionadas

Clon	Afinidad 3-HB*	Estabilidad térmica**
AFDH1 + L253I+G233K+A234T+124I+148G	13	54
AFDH1 + L253I+G233K+A234T+39G+124I+148G	12	52
AFDH1 + L253I+G233K+A234T+39G+62R+148G	12	7
AFDH1 + A62V+L253I+G233K+A234T+143V	13	94

* dado como proporción de actividad (%) con 3-HB 1,94/62,22 mM

** dado como actividad restante (%) después de una incubación de 30 minutos a 80°C

Ejemplo 4 Cribado de enzimas mutantes 3-HBDH con sustituciones de aminoácidos A62V+A143V+A148G+G233K+A234T+L253I y opcionalmente una o más sustituciones de aminoácidos adicionales)

Las enzimas mutantes seleccionadas del ejemplo 3 se midieron a pH 7,5 y se seleccionó la mejor variante para mutagénesis adicional.

A menos que se indique de otro modo, los experimentos se han llevado a cabo como se detalla en el ejemplo 2. Las enzimas mutantes encontradas se seleccionaron de forma análoga al ejemplo 3 pero con diferentes soluciones a pH 7,5. La pmv de referencia se sometió a prueba con 3-hidroxibutirato 150 mM; cNAD 5 mM; Triton X-100 al 0,1 %; Mops 70 mM a pH 7,5.

Se midieron los siguientes parámetros:

- La pmv se incubó para estabilidad térmica durante 30 min a 60-90 °C (dependiendo de la estabilidad de la variante enzimática) y se sometió a prueba posteriormente con 3-hidroxibutirato 150 mM; cNAD 5 mM; Triton X-100 al 0,1 %; Mops 70 mM a pH 7,5

- La pmv para afinidad por β -hidroxibutirato se midió con 3-hidroxibutirato 5 mM; cNAD 5 mM; Triton X-100 al 0,1 %; Mops 70 mM a pH 7,5

- La pmv para afinidad por cNAD se midió con 3-hidroxibutirato 150 mM; cNAD 0,5 mM; Triton X-100 al 0,1 %; Mops 70 mM a pH 7,5

Tabla 2D: Estabilidad térmica (diversas temperaturas, 30 min) y afinidad de enzimas mutantes seleccionadas

Clon	Afinidad por*		Estabilidad térmica**					
	3-HB	cNAD	60 °C	70 °C	73 °C	75 °C	87 °C	90 °C
AFDH1	14	28	17	1	0	0	0	0
AFDH2	21	29	19	15				
AFDH3	24	22	100	68	53			
AFDH4	25	29	100	88	70	4	0	0
AFDH4 + 147R	29	29	100			76		
AFDH5	19	29					78	3
AFDH6	29	29					91	41
AFDHx	15	17				91		

* dado como proporción de actividad (%) con 3-HB 5/150 mM y cNAD 0,5/5 mM

** dado como actividad restante (%) después de una incubación de 30 minutos a la temperatura indicada

AFDH1: natural
 AFDH2: AFDH1 + L253I
 AFDH3: AFDH1 + G233K+A234T+L253I
 AFDH4: AFDH1 + A62V+G233K+A234T+L253I
 AFDH4 + 147R: AFDH1 + A62V+V147R+G233K+A234T+L253I
 AFDH5: AFDH1 + P39G+A62R+A143V+A148G+G233K+A234T+L253I
 AFDH6: AFDH1 + A62V+A143V+A148G+G233K+A234T+L253I
 AFDHx: AFDH1 + A62V+ E111L+ I140M + A148G

En base a AFDH6 mutante (es decir, AFDH1 más mutaciones A62V + A143V + A148G + G233K + A234T + L253I) se realizaron rondas adicionales de mutagénesis con las siguientes enzimas mutantes enumeradas en la tabla 3

Tabla 3: Estabilidad térmica (87 °C y 90 °C, 30 min) y afinidad de enzimas mutantes seleccionadas

Clon	Afinidad por*		Estabilidad térmica**	
	3-HB	cNAD	87 °C	90 °C
AFDH1	14	17	0	0
AFDH6	29	29		
AFDH6 +19G	35	40		4 (13)
AFDH6 + 170G	34	36		4 (13)
AFDH6 + 125G + 187F	35	34		24 (13)
AFDH6 + 18E+33L	29	33		34 (13)
AFDH6 + 33L+125G+187F	35	39	86 (60)	
AFDH6 + 33L+125G+187F+216V	37	40	14 (60)	
AFDH6 + 18E+187F	34	40	80 (60)	
AFDH6 + 33L+125G+175V+187F	41	40	97 (60)	

Clon	Afinidad por*		Estabilidad térmica**	
	3-HB	cNAD	87 °C	90 °C
AFDH6 + 175V+216V	43	47	7 (60)	
AFDH6 +175V+187F+216V	34	40	54 (60)	
AFDH6 +19G+125G+187F	41	42		5 (50)
AFDH6 +125G+175T+187F	45	38		92 (50)
AFDH6 +19G+33L	42	48		0 (50)
AFDH6 +19G+175I	47	52		0 (50)
AFDH6 + 19G+175T	37	42		95 (50)
AFDH6 + 170G+175T	39	37		101 (50)
AFDH6 + 18E+125G+187F	47	42		67 (3)
AFDH6 + 33L+125G+175T+187F	37	32		95 (3)
AFDH6 + 33L+125G+175I+187F	47	40		100 (3)
AFDH6 + 33L+125G+170G+187F	45	39		41 (3)
AFDH6 + 18E+175I+187F	41	39		58 (3)
AFDH6 + 33L+125G+175V+187F	36	31		90 (3)
AFDH6 + 33L+125G+175V+187F+216V	49	48		23 (3)
AFDH6 + 33L+125G+175T+187F	35	35		94 (3)
AFDH6 + 33L+38K+39G+125G+175V+187F	47	40		51 (3)

* dado como proporción de actividad (%) con 3-HB 5/150 mM y cNAD 0,5/5 mM

** dado como actividad restante (%) después de una incubación de 30 minutos a la temperatura indicada

5

Nota: Los valores en () son datos de AFDH6 medidos en la misma serie de pruebas que el control.

Tabla 4: Se descubrió que las sustituciones de aminoácidos mejoran el rendimiento de 3-HBDH, en particular cuando se combinan con AFDH6 (es decir, AFDH1 más mutaciones A62V + A143V + A148G + G233K + A234T + L253I)

10

Posición de aminoácido en enzima natural	Aminoácido en enzima natural	Sustituciones de aminoácidos en enzimas mutantes mejoradas
18	L	R/K/E/P
19	A	G
33	I	A/L/T
38	Q	K
39	P	G
62	A	F/M/K/R/L/V
125	A	G
143	A	V
148	A	G
170	A	G
175	G	T/V/I
187	W	F
216	L	V
233	G	S/I/A/P/R/T/K/C
234	A	T
253	L	I/A/C

SECUENCIAS**AFDH1: 3-HBDH natural de *Alcaligenes faecalis***

(SEQ ID NO: 1)

MLKGKKAVVT	GSTSGIGLAM	ATELAKAGAD	VVINGFGQPE	DIERERSTLE	SKFGVKAYYL	60
NADLSDAQAT	RDFIAKAAEA	LGGLDILVNN	AGIQHTAPIE	EFPPVDKWNAI	IALNLSAVFH	120
GTAAALPIMQ	KQGWGRIINI	ASAHGLVASV	NKSAYVAAKH	GVVGLTKVTA	LENAGKGITC	180
NAICPGWVRT	PLVEKQIEAI	SQQKGIDIEA	AARELLAEKQ	PSLQFVTPEQ	LGGAAVFLSS	240
AAADQMTGTT	LSLDGGWTAR					260

5

Secuencia central extendida de A FDH1

(SEQ ID NO: 2)

ADLSDAQATR	DFIAKAAEAL	GGLDILVNNA	GIQHTAPIEE	FPVDKWNAIL	ALNLSAVFHG	60
TAAALPIMQK	QGWGRIINIA	SAHGLVASVN	KSAYVAAKHG	VVGLTKVTAL	ENAGKGITCN	120
AICPGWVRTP	LVEKQIEAIS	QQKGIDIEAA	ARELLAEKQP	SLQFVTPEQL	GGAAVFLSSA	180
AADQMTGTTL	SL					192

10

AFDH2: AFDH1 + L253I

(SEQ ID NO: 3)

MLKGKKAVVT	GSTSGIGLAM	ATELAKAGAD	VVINGFGQPE	DIERERSTLE	SKFGVKAYYL	60
NADLSDAQAT	RDFIAKAAEA	LGGLDILVNN	AGIQHTAPIE	EFPPVDKWNAI	IALNLSAVFH	120
GTAAALPIMQ	KQGWGRIINI	ASAHGLVASV	NKSAYVAAKH	GVVGLTKVTA	LENAGKGITC	180
NAICPGWVRT	PLVEKQIEAI	SQQKGIDIEA	AARELLAEKQ	PSLQFVTPEQ	LGGAAVFLSS	240
AAADQMTGTT	LSIDGGWTAR					260

15

AFDH3: AFDH1 + G233K+A234T+L253I

(SEQ ID NO: 4)

MLKGKKAVVT	GSTSGIGLAM	ATELAKAGAD	VVINGFGQPE	DIERERSTLE	SKFGVKAYYL	60
NADLSDAQAT	RDFIAKAAEA	LGGLDILVNN	AGIQHTAPIE	EFPPVDKWNAI	IALNLSAVFH	120
GTAAALPIMQ	KQGWGRIINI	ASAHGLVASV	NKSAYVAAKH	GVVGLTKVTA	LENAGKGITC	180
NAICPGWVRT	PLVEKQIEAI	SQQKGIDIEA	AARELLAEKQ	PSLQFVTPEQ	LGKTAVFLSS	240
AAADQMTGTT	LSIDGGWTAR					260

20

AFDH4: AFDH1 + A62V+G233K+A234T+L253I

(SEQ ID NO: 5)

MLKGKKAVVT	GSTSGIGLAM	ATELAKAGAD	VVINGFGQPE	DIERERSTLE	SKFGVKAYYL	60
NVDLSDAQAT	RDFIAKAAEA	LGGLDILVNN	AGIQHTAPIE	EFPPVDKWNAI	IALNLSAVFH	120
GTAAALPIMQ	KQGWGRIINI	ASAHGLVASV	NKSAYVAAKH	GVVGLTKVTA	LENAGKGITC	180
NAICPGWVRT	PLVEKQIEAI	SQQKGIDIEA	AARELLAEKQ	PSLQFVTPEQ	LGKTAVFLSS	240
AAADQMTGTT	LSIDGGWTAR					260

AFDH4 + 147R: AFDH1 + A62V+ V147R + G233K+A234T+L253I

(SEQ ID NO: 6)

MLKGKKAVVT	GSTSGIGLAM	ATELAKAGAD	VVINGFGQPE	DIERERSTLE	SKFGVKAYYL	60
NVDLSDAQAT	RDFIAKAAEA	LGGLDILVNN	AGIQHTAPIE	EFPPVDKWNAI	IALNLSAVFH	120
GTAAALPIMQ	KQGWGRIINI	ASAHGLRASV	NKSAYVAAKH	GVVGLTKVTA	LENAGKGITC	180
NAICPGWVRT	PLVEKQIEAI	SQQKGIDIEA	AARELLAEKQ	PSLQFVTPEQ	LGKTAVFLSS	240
AAADQMTGTT	LSIDGGWTAR					260

25

AFDH5: AFDH1 + P39G+A62R+A143V+A148G+G233K+A234T+L253I

(SEQ ID NO: 7)

MLKGKKAVVT	GSTSGIGLAM	ATELAKAGAD	VVINGFGQGE	DIERERSTLE	SKFGVKAYYL	60
NRDLSDAQAT	RDFIAKAAEA	LGGLDILVNN	AGIQHTAPIE	EFPPVDKWNAI	IALNLSAVFH	120
GTAAALPIMQ	KQGWGRIINI	ASVHGLVGSV	NKSAYVAAKH	GVVGLTKVTA	LENAGKGITC	180
NAICPGWVRT	PLVEKQIEAI	SQQKGIDIEA	AARELLAEKQ	PSLQFVTPEQ	LGKTAVFLSS	240
AAADQMTGTT	LSIDGGWTAR					260

30

AFDH6: AFDH1 + A62V+A143V+A148G+G233K+A234T+L253I

(SEQ ID NO: 8)

MLKGKKAVVT	GSTSGIGLAM	ATELAKAGAD	VVINGFGQPE	DIERERSTLE	SKFGVKAYYL	60
NVDLSDAQAT	RDFIAKAAEA	LGGLDILVNN	AGIQHTAPIE	EFPPVDKWNAI	IALNLSAVFH	120
GTAAALPIMQ	KQGWGRIINI	ASVHGLVGSV	NKSAYVAAKH	GVVGLTKVTA	LENAGKGITC	180
NAICPGWVRT	PLVEKQIEAI	SQQKGIDIEA	AARELLAEKQ	PSLQFVTPEQ	LGKTAVFLSS	240
AAADQMTGTT	LSIDGGWTAR					260

35

AFDH A: AFDH6 + 33L+125G+175V+187F

(SEQ ID NO: 9)

ES 2 803 273 T3

MLKGKKAVVT	GSTSGIGLAM	ATELAKAGAD	VVLNGFGQPE	DIERERSTLE	SKFGVKAYYL	60
NVDLSDAQAT	RDFIAKAAEA	LGGLDILVNN	AGIQHTAPIE	EFPPVDKWNAI	IALNLSAVFH	120
GTAAGLPIMQ	KQGWGRIINI	ASVHGLVGSV	NKSAYVAAKH	GVVGLTKVTA	LENAVKGITC	180
NAICPGFVRT	PLVEKQIEAI	SQQKGIDIEA	AARELLAEKQ	PSLQFVTPEQ	LGKTAVFLSS	240
AAADQMTGTT	LSIDGGWTAR					260

AFDH B: AFDH6 + 125G+175T+187F (SEQ ID NO: 10)

5

MLKGKKAVVT	GSTSGIGLAM	ATELAKAGAD	VVINGFGQPE	DIERERSTLE	SKFGVKAYYL	60
NVDLSDAQAT	RDFIAKAAEA	LGGLDILVNN	AGIQHTAPIE	EFPPVDKWNAI	IALNLSAVFH	120
GTAAGLPIMQ	KQGWGRIINI	ASVHGLVGSV	NKSAYVAAKH	GVVGLTKVTA	LENATKGITC	180
NAICPGFVRT	PLVEKQIEAI	SQQKGIDIEA	AARELLAEKQ	PSLQFVTPEQ	LGKTAVFLSS	240
AAADQMTGTT	LSIDGGWTAR					260

AFDH C: AFDH6 + 170G+175T (SEQ ID NO: 11)

10

MLKGKKAVVT	GSTSGIGLAM	ATELAKAGAD	VVINGFGQPE	DIERERSTLE	SKFGVKAYYL	60
NVDLSDAQAT	RDFIAKAAEA	LGGLDILVNN	AGIQHTAPIE	EFPPVDKWNAI	IALNLSAVFH	120
GTAAGLPIMQ	KQGWGRIINI	ASVHGLVGSV	NKSAYVAAKH	GVVGLTKVTG	LENATKGITC	180
NAICPGWVRT	PLVEKQIEAI	SQQKGIDIEA	AARELLAEKQ	PSLQFVTPEQ	LGKTAVFLSS	240
AAADQMTGTT	LSIDGGWTAR					260

AFDH D: AFDH6 + 18E+125G+187F (SEQ ID NO: 12)

15

MLKGKKAVVT	GSTSGIGEAM	ATELAKAGAD	VVINGFGQPE	DIERERSTLE	SKFGVKAYYL	60
NVDLSDAQAT	RDFIAKAAEA	LGGLDILVNN	AGIQHTAPIE	EFPPVDKWNAI	IALNLSAVFH	120
GTAAGLPIMQ	KQGWGRIINI	ASVHGLVGSV	NKSAYVAAKH	GVVGLTKVTA	LENAGKGITC	180
NAICPGFVRT	PLVEKQIEAI	SQQKGIDIEA	AARELLAEKQ	PSLQFVTPEQ	LGKTAVFLSS	240
AAADQMTGTT	LSIDGGWTAR					260

AFDH E: AFDH6 + 33L+125G+175I+187F (SEQ ID NO: 13)

MLKGKKAVVT	GSTSGIGLAM	ATELAKAGAD	VVLNGFGQPE	DIERERSTLE	SKFGVKAYYL	60
NVDLSDAQAT	RDFIAKAAEA	LGGLDILVNN	AGIQHTAPIE	EFPPVDKWNAI	IALNLSAVFH	120
GTAAGLPIMQ	KQGWGRIINI	ASVHGLVGSV	NKSAYVAAKH	GVVGLTKVTA	LENAIKGITC	180
NAICPGFVRT	PLVEKQIEAI	SQQKGIDIEA	AARELLAEKQ	PSLQFVTPEQ	LGKTAVFLSS	240
AAADQMTGTT	LSIDGGWTAR					260

20

AFDH F: AFDH6 + 33L+125G+170G+187F (SEQ ID NO: 14)

MLKGKKAVVT	GSTSGIGLAM	ATELAKAGAD	VVLNGFGQPE	DIERERSTLE	SKFGVKAYYL	60
NVDLSDAQAT	RDFIAKAAEA	LGGLDILVNN	AGIQHTAPIE	EFPPVDKWNAI	IALNLSAVFH	120
GTAAGLPIMQ	KQGWGRIINI	ASVHGLVGSV	NKSAYVAAKH	GVVGLTKVTG	LENAGKGITC	180
NAICPGFVRT	PLVEKQIEAI	SQQKGIDIEA	AARELLAEKQ	PSLQFVTPEQ	LGKTAVFLSS	240
AAADQMTGTT	LSIDGGWTAR					260

25

AFDH G: AFDH6 + 33L+125G+175V+187F+216V (SEQ ID NO: 15)

MLKGKKAVVT	GSTSGIGLAM	ATELAKAGAD	VVLNGFGQPE	DIERERSTLE	SKFGVKAYYL	60
NVDLSDAQAT	RDFIAKAAEA	LGGLDILVNN	AGIQHTAPIE	EFPPVDKWNAI	IALNLSAVFH	120
GTAAGLPIMQ	KQGWGRIINI	ASVHGLVGSV	NKSAYVAAKH	GVVGLTKVTA	LENAVKGITC	180
NAICPGFVRT	PLVEKQIEAI	SQQKGIDIEA	AARELVAEKQ	PSLQFVTPEQ	LGKTAVFLSS	240
AAADQMTGTT	LSIDGGWTAR					260

AFDH H: AFDH6 + 33I+38K+39G+125G+175V+187F (SEQ ID NO: 16)

30

MLKGKKAVVT	GSTSGIGLAM	ATELAKAGAD	VVLNGFGKGE	DIERERSTLE	SKFGVKAYYL	60
NVDLSDAQAT	RDFIAKAAEA	LGGLDILVNN	AGIQHTAPIE	EFPPVDKWNAI	IALNLSAVFH	120
GTAAGLPIMQ	KQGWGRIINI	ASVHGLVGSV	NKSAYVAAKH	GVVGLTKVTA	LENAVKGITC	180
NAICPGFVRT	PLVEKQIEAI	SQQKGIDIEA	AARELLAEKQ	PSLQFVTPEQ	LGKTAVFLSS	240
AAADQMTGTT	LSIDGGWTAR					260

LISTADO DE SECUENCIAS

	<110>	Roche Diabetes Care GmbH et al.
5	<120>	3-hidroxibutirato deshidrogenasa mutante de <i>Alcaligenes faecalis</i> , así como procedimientos y usos que implican la misma
	<130>	R69992PC
10	<160>	16
	<170>	PatentIn versión 3.5
	<210>	1
15	<211>	260
	<212>	PRT
	<213>	<i>Alcaligenes faecalis</i>
20	<400>	1
	Met Leu Lys Gly Lys Lys Ala Val Val Thr Gly Ser Thr Ser Gly Ile	
	1 5 10 15	
	Gly Leu Ala Met Ala Thr Glu Leu Ala Lys Ala Gly Ala Asp Val Val	
	20 25 30	
	Ile Asn Gly Phe Gly Gln Pro Glu Asp Ile Glu Arg Glu Arg Ser Thr	
	35 40 45	
	Leu Glu Ser Lys Phe Gly Val Lys Ala Tyr Tyr Leu Asn Ala Asp Leu	
	50 55 60	
	Ser Asp Ala Gln Ala Thr Arg Asp Phe Ile Ala Lys Ala Ala Glu Ala	
	65 70 75 80	
	Leu Gly Gly Leu Asp Ile Leu Val Asn Asn Ala Gly Ile Gln His Thr	
	85 90 95	
	Ala Pro Ile Glu Glu Phe Pro Val Asp Lys Trp Asn Ala Ile Ile Ala	
	100 105 110	
	Leu Asn Leu Ser Ala Val Phe His Gly Thr Ala Ala Ala Leu Pro Ile	
	115 120 125	
	Met Gln Lys Gln Gly Trp Gly Arg Ile Ile Asn Ile Ala Ser Ala His	
	130 135 140	
	Gly Leu Val Ala Ser Val Asn Lys Ser Ala Tyr Val Ala Ala Lys His	
	145 150 155 160	
	Gly Val Val Gly Leu Thr Lys Val Thr Ala Leu Glu Asn Ala Gly Lys	
	165 170 175	

ES 2 803 273 T3

Gly Ile Thr Cys Asn Ala Ile Cys Pro Gly Trp Val Arg Thr Pro Leu
180 185 190

Val Glu Lys Gln Ile Glu Ala Ile Ser Gln Gln Lys Gly Ile Asp Ile
195 200 205

Glu Ala Ala Ala Arg Glu Leu Leu Ala Glu Lys Gln Pro Ser Leu Gln
210 215 220

Phe Val Thr Pro Glu Gln Leu Gly Gly Ala Ala Val Phe Leu Ser Ser
225 230 235 240

Ala Ala Ala Asp Gln Met Thr Gly Thr Thr Leu Ser Leu Asp Gly Gly
245 250 255

Trp Thr Ala Arg
260

<210> 2
<211> 192
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia central extendida de 3-HBDH de Alcaligenes faecalis
<400> 2

Ala Asp Leu Ser Asp Ala Gln Ala Thr Arg Asp Phe Ile Ala Lys Ala
1 5 10 15

Ala Glu Ala Leu Gly Gly Leu Asp Ile Leu Val Asn Asn Ala Gly Ile
20 25 30

Gln His Thr Ala Pro Ile Glu Glu Phe Pro Val Asp Lys Trp Asn Ala
35 40 45

Ile Ile Ala Leu Asn Leu Ser Ala Val Phe His Gly Thr Ala Ala Ala
50 55 60

Leu Pro Ile Met Gln Lys Gln Gly Trp Gly Arg Ile Ile Asn Ile Ala
65 70 75 80

Ser Ala His Gly Leu Val Ala Ser Val Asn Lys Ser Ala Tyr Val Ala
85 90 95

Ala Lys His Gly Val Val Gly Leu Thr Lys Val Thr Ala Leu Glu Asn
100 105 110

ES 2 803 273 T3

Ala Gly Lys Gly Ile Thr Cys Asn Ala Ile Cys Pro Gly Trp Val Arg
115 120 125

Thr Pro Leu Val Glu Lys Gln Ile Glu Ala Ile Ser Gln Gln Lys Gly
130 135 140

Ile Asp Ile Glu Ala Ala Ala Arg Glu Leu Leu Ala Glu Lys Gln Pro
145 150 155 160

Ser Leu Gln Phe Val Thr Pro Glu Gln Leu Gly Gly Ala Ala Val Phe
165 170 175

Leu Ser Ser Ala Ala Ala Asp Gln Met Thr Gly Thr Thr Leu Ser Leu
180 185 190

<210> 3
<211> 260
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 3-HBDH mutante

<400> 3

Met Leu Lys Gly Lys Lys Ala Val Val Thr Gly Ser Thr Ser Gly Ile
1 5 10 15

Gly Leu Ala Met Ala Thr Glu Leu Ala Lys Ala Gly Ala Asp Val Val
20 25 30

Ile Asn Gly Phe Gly Gln Pro Glu Asp Ile Glu Arg Glu Arg Ser Thr
35 40 45

Leu Glu Ser Lys Phe Gly Val Lys Ala Tyr Tyr Leu Asn Ala Asp Leu
50 55 60

Ser Asp Ala Gln Ala Thr Arg Asp Phe Ile Ala Lys Ala Ala Glu Ala
65 70 75 80

Leu Gly Gly Leu Asp Ile Leu Val Asn Asn Ala Gly Ile Gln His Thr
85 90 95

Ala Pro Ile Glu Glu Phe Pro Val Asp Lys Trp Asn Ala Ile Ile Ala
100 105 110

Leu Asn Leu Ser Ala Val Phe His Gly Thr Ala Ala Ala Leu Pro Ile
115 120 125

ES 2 803 273 T3

Met Gln Lys Gln Gly Trp Gly Arg Ile Ile Asn Ile Ala Ser Ala His
130 135 140

Gly Leu Val Ala Ser Val Asn Lys Ser Ala Tyr Val Ala Ala Lys His
145 150 155 160

Gly Val Val Gly Leu Thr Lys Val Thr Ala Leu Glu Asn Ala Gly Lys
165 170 175

Gly Ile Thr Cys Asn Ala Ile Cys Pro Gly Trp Val Arg Thr Pro Leu
180 185 190

Val Glu Lys Gln Ile Glu Ala Ile Ser Gln Gln Lys Gly Ile Asp Ile
195 200 205

Glu Ala Ala Ala Arg Glu Leu Leu Ala Glu Lys Gln Pro Ser Leu Gln
210 215 220

Phe Val Thr Pro Glu Gln Leu Gly Gly Ala Ala Val Phe Leu Ser Ser
225 230 235 240

Ala Ala Ala Asp Gln Met Thr Gly Thr Thr Leu Ser Ile Asp Gly Gly
245 250 255

Trp Thr Ala Arg
260

<210> 4
<211> 260
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 3-HBDH mutante

<400> 4

Met Leu Lys Gly Lys Lys Ala Val Val Thr Gly Ser Thr Ser Gly Ile
1 5 10 15

Gly Leu Ala Met Ala Thr Glu Leu Ala Lys Ala Gly Ala Asp Val Val
20 25 30

Ile Asn Gly Phe Gly Gln Pro Glu Asp Ile Glu Arg Glu Arg Ser Thr
35 40 45

Leu Glu Ser Lys Phe Gly Val Lys Ala Tyr Tyr Leu Asn Ala Asp Leu
50 55 60

Ser Asp Ala Gln Ala Thr Arg Asp Phe Ile Ala Lys Ala Ala Glu Ala

ES 2 803 273 T3

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

5

<210> 5
 <211> 260
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> 3-HBDH mutante
 <400> 5

ES 2 803 273 T3

Met	Leu	Lys	Gly	Lys	Lys	Ala	Val	Val	Thr	Gly	Ser	Thr	Ser	Gly	Ile
1			5						10					15	
Gly	Leu	Ala	Met	Ala	Thr	Glu	Leu	Ala	Lys	Ala	Gly	Ala	Asp	Val	Val
		20						25					30		
Ile	Asn	Gly	Phe	Gly	Gln	Pro	Glu	Asp	Ile	Glu	Arg	Glu	Arg	Ser	Thr
		35					40					45			
Leu	Glu	Ser	Lys	Phe	Gly	Val	Lys	Ala	Tyr	Tyr	Leu	Asn	Val	Asp	Leu
	50					55					60				
Ser	Asp	Ala	Gln	Ala	Thr	Arg	Asp	Phe	Ile	Ala	Lys	Ala	Ala	Glu	Ala
65					70					75					80
Leu	Gly	Gly	Leu	Asp	Ile	Leu	Val	Asn	Asn	Ala	Gly	Ile	Gln	His	Thr
			85					90						95	
Ala	Pro	Ile	Glu	Glu	Phe	Pro	Val	Asp	Lys	Trp	Asn	Ala	Ile	Ile	Ala
			100					105					110		
Leu	Asn	Leu	Ser	Ala	Val	Phe	His	Gly	Thr	Ala	Ala	Ala	Leu	Pro	Ile
		115					120					125			
Met	Gln	Lys	Gln	Gly	Trp	Gly	Arg	Ile	Ile	Asn	Ile	Ala	Ser	Ala	His
	130					135					140				
Gly	Leu	Val	Ala	Ser	Val	Asn	Lys	Ser	Ala	Tyr	Val	Ala	Ala	Lys	His
145					150					155					160
Gly	Val	Val	Gly	Leu	Thr	Lys	Val	Thr	Ala	Leu	Glu	Asn	Ala	Gly	Lys
			165						170					175	
Gly	Ile	Thr	Cys	Asn	Ala	Ile	Cys	Pro	Gly	Trp	Val	Arg	Thr	Pro	Leu
			180					185					190		
Val	Glu	Lys	Gln	Ile	Glu	Ala	Ile	Ser	Gln	Gln	Lys	Gly	Ile	Asp	Ile
		195					200					205			
Glu	Ala	Ala	Ala	Arg	Glu	Leu	Leu	Ala	Glu	Lys	Gln	Pro	Ser	Leu	Gln
	210					215					220				
Phe	Val	Thr	Pro	Glu	Gln	Leu	Gly	Lys	Thr	Ala	Val	Phe	Leu	Ser	Ser
225					230					235					240
Ala	Ala	Ala	Asp	Gln	Met	Thr	Gly	Thr	Thr	Leu	Ser	Ile	Asp	Gly	Gly
			245						250					255	

Trp Thr Ala Arg
260

5 <210> 6
<211> 260
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> 3-HBDH mutante
<400> 6

Met Leu Lys Gly Lys Lys Ala Val Val Thr Gly Ser Thr Ser Gly Ile
1 5 10 15

Gly Leu Ala Met Ala Thr Glu Leu Ala Lys Ala Gly Ala Asp Val Val
20 25 30

Ile Asn Gly Phe Gly Gln Pro Glu Asp Ile Glu Arg Glu Arg Ser Thr
35 40 45

Leu Glu Ser Lys Phe Gly Val Lys Ala Tyr Tyr Leu Asn Val Asp Leu
50 55 60

Ser Asp Ala Gln Ala Thr Arg Asp Phe Ile Ala Lys Ala Ala Glu Ala
65 70 75 80

Leu Gly Gly Leu Asp Ile Leu Val Asn Asn Ala Gly Ile Gln His Thr
85 90 95

Ala Pro Ile Glu Glu Phe Pro Val Asp Lys Trp Asn Ala Ile Ile Ala
100 105 110

Leu Asn Leu Ser Ala Val Phe His Gly Thr Ala Ala Ala Leu Pro Ile
115 120 125

Met Gln Lys Gln Gly Trp Gly Arg Ile Ile Asn Ile Ala Ser Ala His
130 135 140

Gly Leu Arg Ala Ser Val Asn Lys Ser Ala Tyr Val Ala Ala Lys His
145 150 155 160

Gly Val Val Gly Leu Thr Lys Val Thr Ala Leu Glu Asn Ala Gly Lys
165 170 175

Gly Ile Thr Cys Asn Ala Ile Cys Pro Gly Trp Val Arg Thr Pro Leu
180 185 190

ES 2 803 273 T3

Val Glu Lys Gln Ile Glu Ala Ile Ser Gln Gln Lys Gly Ile Asp Ile
195 200 205

Glu Ala Ala Ala Arg Glu Leu Leu Ala Glu Lys Gln Pro Ser Leu Gln
210 215 220

Phe Val Thr Pro Glu Gln Leu Gly Lys Thr Ala Val Phe Leu Ser Ser
225 230 235 240

Ala Ala Ala Asp Gln Met Thr Gly Thr Thr Leu Ser Ile Asp Gly Gly
245 250 255

Trp Thr Ala Arg
260

5 <210> 7
<211> 260
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> 3-HBDH mutante

<400> 7

Met Leu Lys Gly Lys Lys Ala Val Val Thr Gly Ser Thr Ser Gly Ile
1 5 10 15

Gly Leu Ala Met Ala Thr Glu Leu Ala Lys Ala Gly Ala Asp Val Val
20 25 30

Ile Asn Gly Phe Gly Gln Gly Glu Asp Ile Glu Arg Glu Arg Ser Thr
35 40 45

Leu Glu Ser Lys Phe Gly Val Lys Ala Tyr Tyr Leu Asn Arg Asp Leu
50 55 60

Ser Asp Ala Gln Ala Thr Arg Asp Phe Ile Ala Lys Ala Ala Glu Ala
65 70 75 80

Leu Gly Gly Leu Asp Ile Leu Val Asn Asn Ala Gly Ile Gln His Thr
85 90 95

Ala Pro Ile Glu Glu Phe Pro Val Asp Lys Trp Asn Ala Ile Ile Ala
100 105 110

Leu Asn Leu Ser Ala Val Phe His Gly Thr Ala Ala Ala Leu Pro Ile
115 120 125

ES 2 803 273 T3

Met Gln Lys Gln Gly Trp Gly Arg Ile Ile Asn Ile Ala Ser Val His
130 135 140

Gly Leu Val Gly Ser Val Asn Lys Ser Ala Tyr Val Ala Ala Lys His
145 150 155 160

Gly Val Val Gly Leu Thr Lys Val Thr Ala Leu Glu Asn Ala Gly Lys
165 170 175

Gly Ile Thr Cys Asn Ala Ile Cys Pro Gly Trp Val Arg Thr Pro Leu
180 185 190

Val Glu Lys Gln Ile Glu Ala Ile Ser Gln Gln Lys Gly Ile Asp Ile
195 200 205

Glu Ala Ala Ala Arg Glu Leu Leu Ala Glu Lys Gln Pro Ser Leu Gln
210 215 220

Phe Val Thr Pro Glu Gln Leu Gly Lys Thr Ala Val Phe Leu Ser Ser
225 230 235 240

Ala Ala Ala Asp Gln Met Thr Gly Thr Thr Leu Ser Ile Asp Gly Gly
245 250 255

Trp Thr Ala Arg
260

5 <210> 8
<211> 260
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> 3-HBDH mutante

<400> 8

Met Leu Lys Gly Lys Lys Ala Val Val Thr Gly Ser Thr Ser Gly Ile
1 5 10 15

Gly Leu Ala Met Ala Thr Glu Leu Ala Lys Ala Gly Ala Asp Val Val
20 25 30

Ile Asn Gly Phe Gly Gln Pro Glu Asp Ile Glu Arg Glu Arg Ser Thr
35 40 45

Leu Glu Ser Lys Phe Gly Val Lys Ala Tyr Tyr Leu Asn Val Asp Leu
50 55 60

ES 2 803 273 T3

Ser Asp Ala Gln Ala Thr Arg Asp Phe Ile Ala Lys Ala Ala Glu Ala
65 70 75 80

Leu Gly Gly Leu Asp Ile Leu Val Asn Asn Ala Gly Ile Gln His Thr
85 90 95

Ala Pro Ile Glu Glu Phe Pro Val Asp Lys Trp Asn Ala Ile Ile Ala
100 105 110

Leu Asn Leu Ser Ala Val Phe His Gly Thr Ala Ala Ala Leu Pro Ile
115 120 125

Met Gln Lys Gln Gly Trp Gly Arg Ile Ile Asn Ile Ala Ser Val His
130 135 140

Gly Leu Val Gly Ser Val Asn Lys Ser Ala Tyr Val Ala Ala Lys His
145 150 155 160

Gly Val Val Gly Leu Thr Lys Val Thr Ala Leu Glu Asn Ala Gly Lys
165 170 175

Gly Ile Thr Cys Asn Ala Ile Cys Pro Gly Trp Val Arg Thr Pro Leu
180 185 190

Val Glu Lys Gln Ile Glu Ala Ile Ser Gln Gln Lys Gly Ile Asp Ile
195 200 205

Glu Ala Ala Ala Arg Glu Leu Leu Ala Glu Lys Gln Pro Ser Leu Gln
210 215 220

Phe Val Thr Pro Glu Gln Leu Gly Lys Thr Ala Val Phe Leu Ser Ser
225 230 235 240

Ala Ala Ala Asp Gln Met Thr Gly Thr Thr Leu Ser Ile Asp Gly Gly
245 250 255

Trp Thr Ala Arg
260

5 <210> 9
<211> 260
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> 3-HBDH mutante

<400> 9

Met Leu Lys Gly Lys Lys Ala Val Val Thr Gly Ser Thr Ser Gly Ile

ES 2 803 273 T3

1	5	10	15
Gly	Leu	Ala	Met
Ala	Thr	Glu	Leu
Ala	Lys	Ala	Gly
Ala	Asp	Val	Val
20	25	30	
Leu	Asn	Gly	Phe
35	40	45	
Gln	Pro	Glu	Asp
Ile	Glu	Arg	Glu
Arg	Ser	Thr	
Leu	Glu	Ser	Lys
50	55	60	
Phe	Gly	Val	Lys
Ala	Tyr	Tyr	Leu
Asn	Val	Asp	Leu
65	70	75	80
Ser	Asp	Ala	Gln
Ala	Thr	Arg	Asp
Phe	Ile	Ala	Lys
Ala	Ala	Glu	Ala
Leu	Gly	Gly	Leu
85	90	95	
Asp	Ile	Leu	Val
Asn	Asn	Ala	Gly
Ile	Gln	His	Thr
Ala	Pro	Ile	Glu
100	105	110	
Glu	Glu	Phe	Pro
Val	Asp	Lys	Trp
Asn	Ala	Ile	Ile
Ala	Gly	Leu	Pro
115	120	125	
Leu	Asn	Leu	Ser
Ala	Val	Phe	His
Gly	Thr	Ala	Ala
Gly	Leu	Pro	Ile
Met	Gln	Lys	Gln
130	135	140	
Gly	Arg	Ile	Ile
Asn	Ile	Ala	Ser
Val	His		
Gly	Leu	Val	Gly
145	150	155	160
Ser	Val	Asn	Lys
Ser	Ala	Tyr	Val
Ala	Ala	Lys	His
Gly	Val	Val	Gly
165	170	175	
Leu	Thr	Lys	Val
Thr	Ala	Leu	Glu
Asn	Ala	Val	Lys
Gly	Ile	Thr	Pro
180	185	190	
Cys	Asn	Ala	Ile
Cys	Pro	Gly	Phe
Val	Arg	Thr	Pro
Leu			
Val	Glu	Lys	Gln
195	200	205	
Ile	Glu	Ala	Ile
Ser	Gln	Gln	Lys
Gly	Ile	Asp	Ile
Glu	Ala	Ala	Ala
210	215	220	
Arg	Glu	Leu	Leu
Ala	Glu	Lys	Gln
Pro	Ser	Leu	Gln
Phe	Val	Thr	Pro
225	230	235	240
Glu	Gln	Leu	Gly
Lys	Thr	Ala	Val
Phe	Leu	Ser	Ser
Ala	Ala	Ala	Asp
245	250	255	
Gln	Met	Thr	Gly
Thr	Thr	Leu	Ser
Ile	Asp	Gly	Gly

Trp Thr Ala Arg
260

<210> 10
<211> 260
<212> PRT
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> 3-HBDH mutante

10 <400> 10

Met Leu Lys Gly Lys Lys Ala Val Val Thr Gly Ser Thr Ser Gly Ile
1 5 10 15

Gly Leu Ala Met Ala Thr Glu Leu Ala Lys Ala Gly Ala Asp Val Val
20 25 30

Ile Asn Gly Phe Gly Gln Pro Glu Asp Ile Glu Arg Glu Arg Ser Thr
35 40 45

Leu Glu Ser Lys Phe Gly Val Lys Ala Tyr Tyr Leu Asn Val Asp Leu
50 55 60

Ser Asp Ala Gln Ala Thr Arg Asp Phe Ile Ala Lys Ala Ala Glu Ala
65 70 75 80

Leu Gly Gly Leu Asp Ile Leu Val Asn Asn Ala Gly Ile Gln His Thr
85 90 95

Ala Pro Ile Glu Glu Phe Pro Val Asp Lys Trp Asn Ala Ile Ile Ala
100 105 110

Leu Asn Leu Ser Ala Val Phe His Gly Thr Ala Ala Gly Leu Pro Ile
115 120 125

Met Gln Lys Gln Gly Trp Gly Arg Ile Ile Asn Ile Ala Ser Val His
130 135 140

Gly Leu Val Gly Ser Val Asn Lys Ser Ala Tyr Val Ala Ala Lys His
145 150 155 160

Gly Val Val Gly Leu Thr Lys Val Thr Ala Leu Glu Asn Ala Thr Lys
165 170 175

Gly Ile Thr Cys Asn Ala Ile Cys Pro Gly Phe Val Arg Thr Pro Leu
180 185 190

Val Glu Lys Gln Ile Glu Ala Ile Ser Gln Gln Lys Gly Ile Asp Ile
195 200 205

ES 2 803 273 T3

Glu Ala Ala Ala Arg Glu Leu Leu Ala Glu Lys Gln Pro Ser Leu Gln
 210 215 220

Phe Val Thr Pro Glu Gln Leu Gly Lys Thr Ala Val Phe Leu Ser Ser
 225 230 235 240

Ala Ala Ala Asp Gln Met Thr Gly Thr Thr Leu Ser Ile Asp Gly Gly
 245 250 255

Trp Thr Ala Arg
 260

<210> 11
 <211> 260
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> 3-HBDH mutante
 <400> 11

Met Leu Lys Gly Lys Lys Ala Val Val Thr Gly Ser Thr Ser Gly Ile
 1 5 10 15

Gly Leu Ala Met Ala Thr Glu Leu Ala Lys Ala Gly Ala Asp Val Val
 20 25 30

Ile Asn Gly Phe Gly Gln Pro Glu Asp Ile Glu Arg Glu Arg Ser Thr
 35 40 45

Leu Glu Ser Lys Phe Gly Val Lys Ala Tyr Tyr Leu Asn Val Asp Leu
 50 55 60

Ser Asp Ala Gln Ala Thr Arg Asp Phe Ile Ala Lys Ala Ala Glu Ala
 65 70 75 80

Leu Gly Gly Leu Asp Ile Leu Val Asn Asn Ala Gly Ile Gln His Thr
 85 90 95

Ala Pro Ile Glu Glu Phe Pro Val Asp Lys Trp Asn Ala Ile Ile Ala
 100 105 110

Leu Asn Leu Ser Ala Val Phe His Gly Thr Ala Ala Ala Leu Pro Ile
 115 120 125

Met Gln Lys Gln Gly Trp Gly Arg Ile Ile Asn Ile Ala Ser Val His
 130 135 140

Gly Leu Val Gly Ser Val Asn Lys Ser Ala Tyr Val Ala Ala Lys His
145 150 155 160

Gly Val Val Gly Leu Thr Lys Val Thr Gly Leu Glu Asn Ala Thr Lys
165 170 175

Gly Ile Thr Cys Asn Ala Ile Cys Pro Gly Trp Val Arg Thr Pro Leu
180 185 190

Val Glu Lys Gln Ile Glu Ala Ile Ser Gln Gln Lys Gly Ile Asp Ile
195 200 205

Glu Ala Ala Ala Arg Glu Leu Leu Ala Glu Lys Gln Pro Ser Leu Gln
210 215 220

Phe Val Thr Pro Glu Gln Leu Gly Lys Thr Ala Val Phe Leu Ser Ser
225 230 235 240

Ala Ala Ala Asp Gln Met Thr Gly Thr Thr Leu Ser Ile Asp Gly Gly
245 250 255

Trp Thr Ala Arg
260

5 <210> 12
<211> 260
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> 3-HBDH mutante
<400> 12

Met Leu Lys Gly Lys Lys Ala Val Val Thr Gly Ser Thr Ser Gly Ile
1 5 10 15

Gly Glu Ala Met Ala Thr Glu Leu Ala Lys Ala Gly Ala Asp Val Val
20 25 30

Ile Asn Gly Phe Gly Gln Pro Glu Asp Ile Glu Arg Glu Arg Ser Thr
35 40 45

Leu Glu Ser Lys Phe Gly Val Lys Ala Tyr Tyr Leu Asn Val Asp Leu
50 55 60

Ser Asp Ala Gln Ala Thr Arg Asp Phe Ile Ala Lys Ala Ala Glu Ala
65 70 75 80

Leu Gly Gly Leu Asp Ile Leu Val Asn Asn Ala Gly Ile Gln His Thr
85 90 95

15

ES 2 803 273 T3

Ala Pro Ile Glu Glu Phe Pro Val Asp Lys Trp Asn Ala Ile Ile Ala
100 105 110

Leu Asn Leu Ser Ala Val Phe His Gly Thr Ala Ala Gly Leu Pro Ile
115 120 125

Met Gln Lys Gln Gly Trp Gly Arg Ile Ile Asn Ile Ala Ser Val His
130 135 140

Gly Leu Val Gly Ser Val Asn Lys Ser Ala Tyr Val Ala Ala Lys His
145 150 155 160

Gly Val Val Gly Leu Thr Lys Val Thr Ala Leu Glu Asn Ala Gly Lys
165 170 175

Gly Ile Thr Cys Asn Ala Ile Cys Pro Gly Phe Val Arg Thr Pro Leu
180 185 190

Val Glu Lys Gln Ile Glu Ala Ile Ser Gln Gln Lys Gly Ile Asp Ile
195 200 205

Glu Ala Ala Ala Arg Glu Leu Leu Ala Glu Lys Gln Pro Ser Leu Gln
210 215 220

Phe Val Thr Pro Glu Gln Leu Gly Lys Thr Ala Val Phe Leu Ser Ser
225 230 235 240

Ala Ala Ala Asp Gln Met Thr Gly Thr Thr Leu Ser Ile Asp Gly Gly
245 250 255

Trp Thr Ala Arg
260

<210> 13
<211> 260
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 3-HBDH mutante

<400> 13

Met Leu Lys Gly Lys Lys Ala Val Val Thr Gly Ser Thr Ser Gly Ile
1 5 10 15

Gly Leu Ala Met Ala Thr Glu Leu Ala Lys Ala Gly Ala Asp Val Val
20 25 30

ES 2 803 273 T3

Leu Asn Gly Phe Gly Gln Pro Glu Asp Ile Glu Arg Glu Arg Ser Thr
 35 40 45
 Leu Glu Ser Lys Phe Gly Val Lys Ala Tyr Tyr Leu Asn Val Asp Leu
 50 55 60
 Ser Asp Ala Gln Ala Thr Arg Asp Phe Ile Ala Lys Ala Ala Glu Ala
 65 70 75 80
 Leu Gly Gly Leu Asp Ile Leu Val Asn Asn Ala Gly Ile Gln His Thr
 85 90 95
 Ala Pro Ile Glu Glu Phe Pro Val Asp Lys Trp Asn Ala Ile Ile Ala
 100 105 110
 Leu Asn Leu Ser Ala Val Phe His Gly Thr Ala Ala Gly Leu Pro Ile
 115 120 125
 Met Gln Lys Gln Gly Trp Gly Arg Ile Ile Asn Ile Ala Ser Val His
 130 135 140
 Gly Leu Val Gly Ser Val Asn Lys Ser Ala Tyr Val Ala Ala Lys His
 145 150 155 160
 Gly Val Val Gly Leu Thr Lys Val Thr Ala Leu Glu Asn Ala Ile Lys
 165 170 175
 Gly Ile Thr Cys Asn Ala Ile Cys Pro Gly Phe Val Arg Thr Pro Leu
 180 185 190
 Val Glu Lys Gln Ile Glu Ala Ile Ser Gln Gln Lys Gly Ile Asp Ile
 195 200 205
 Glu Ala Ala Ala Arg Glu Leu Leu Ala Glu Lys Gln Pro Ser Leu Gln
 210 215 220
 Phe Val Thr Pro Glu Gln Leu Gly Lys Thr Ala Val Phe Leu Ser Ser
 225 230 235 240
 Ala Ala Ala Asp Gln Met Thr Gly Thr Thr Leu Ser Ile Asp Gly Gly
 245 250 255
 Trp Thr Ala Arg
 260

<210> 14
 <211> 260
 <212> PRT

5

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 3-HBDH mutante

<400> 14

```

Met Leu Lys Gly Lys Lys Ala Val Val Thr Gly Ser Thr Ser Gly Ile
1          5          10          15

Gly Leu Ala Met Ala Thr Glu Leu Ala Lys Ala Gly Ala Asp Val Val
          20          25          30

Leu Asn Gly Phe Gly Gln Pro Glu Asp Ile Glu Arg Glu Arg Ser Thr
          35          40          45

Leu Glu Ser Lys Phe Gly Val Lys Ala Tyr Tyr Leu Asn Val Asp Leu
          50          55          60

Ser Asp Ala Gln Ala Thr Arg Asp Phe Ile Ala Lys Ala Ala Glu Ala
65          70          75          80

Leu Gly Gly Leu Asp Ile Leu Val Asn Asn Ala Gly Ile Gln His Thr
          85          90          95

Ala Pro Ile Glu Glu Phe Pro Val Asp Lys Trp Asn Ala Ile Ile Ala
          100          105          110

Leu Asn Leu Ser Ala Val Phe His Gly Thr Ala Ala Gly Leu Pro Ile
          115          120          125

Met Gln Lys Gln Gly Trp Gly Arg Ile Ile Asn Ile Ala Ser Val His
          130          135          140

Gly Leu Val Gly Ser Val Asn Lys Ser Ala Tyr Val Ala Ala Lys His
145          150          155          160

Gly Val Val Gly Leu Thr Lys Val Thr Gly Leu Glu Asn Ala Gly Lys
          165          170          175

Gly Ile Thr Cys Asn Ala Ile Cys Pro Gly Phe Val Arg Thr Pro Leu
          180          185          190

Val Glu Lys Gln Ile Glu Ala Ile Ser Gln Gln Lys Gly Ile Asp Ile
          195          200          205

Glu Ala Ala Ala Arg Glu Leu Leu Ala Glu Lys Gln Pro Ser Leu Gln
          210          215          220

```

ES 2 803 273 T3

Phe Val Thr Pro Glu Gln Leu Gly Lys Thr Ala Val Phe Leu Ser Ser
225 230 235 240

Ala Ala Ala Asp Gln Met Thr Gly Thr Thr Leu Ser Ile Asp Gly Gly
245 250 255

Trp Thr Ala Arg
260

<210> 15
<211> 260
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 3-HBDH mutante
<400> 15

Met Leu Lys Gly Lys Lys Ala Val Val Thr Gly Ser Thr Ser Gly Ile
1 5 10 15

Gly Leu Ala Met Ala Thr Glu Leu Ala Lys Ala Gly Ala Asp Val Val
20 25 30

Leu Asn Gly Phe Gly Gln Pro Glu Asp Ile Glu Arg Glu Arg Ser Thr
35 40 45

Leu Glu Ser Lys Phe Gly Val Lys Ala Tyr Tyr Leu Asn Val Asp Leu
50 55 60

Ser Asp Ala Gln Ala Thr Arg Asp Phe Ile Ala Lys Ala Ala Glu Ala
65 70 75 80

Leu Gly Gly Leu Asp Ile Leu Val Asn Asn Ala Gly Ile Gln His Thr
85 90 95

Ala Pro Ile Glu Glu Phe Pro Val Asp Lys Trp Asn Ala Ile Ile Ala
100 105 110

Leu Asn Leu Ser Ala Val Phe His Gly Thr Ala Ala Gly Leu Pro Ile
115 120 125

Met Gln Lys Gln Gly Trp Gly Arg Ile Ile Asn Ile Ala Ser Val His
130 135 140

Gly Leu Val Gly Ser Val Asn Lys Ser Ala Tyr Val Ala Ala Lys His
145 150 155 160

ES 2 803 273 T3

Gly Val Val Gly Leu Thr Lys Val Thr Ala Leu Glu Asn Ala Val Lys
165 170 175

Gly Ile Thr Cys Asn Ala Ile Cys Pro Gly Phe Val Arg Thr Pro Leu
180 185 190

Val Glu Lys Gln Ile Glu Ala Ile Ser Gln Gln Lys Gly Ile Asp Ile
195 200 205

Glu Ala Ala Ala Arg Glu Leu Val Ala Glu Lys Gln Pro Ser Leu Gln
210 215 220

Phe Val Thr Pro Glu Gln Leu Gly Lys Thr Ala Val Phe Leu Ser Ser
225 230 235 240

Ala Ala Ala Asp Gln Met Thr Gly Thr Thr Leu Ser Ile Asp Gly Gly
245 250 255

Trp Thr Ala Arg
260

5 <210> 16
<211> 260
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> 3-HBDH mutante

<400> 16

Met Leu Lys Gly Lys Lys Ala Val Val Thr Gly Ser Thr Ser Gly Ile
1 5 10 15

Gly Leu Ala Met Ala Thr Glu Leu Ala Lys Ala Gly Ala Asp Val Val
20 25 30

Leu Asn Gly Phe Gly Lys Gly Glu Asp Ile Glu Arg Glu Arg Ser Thr
35 40 45

Leu Glu Ser Lys Phe Gly Val Lys Ala Tyr Tyr Leu Asn Val Asp Leu
50 55 60

Ser Asp Ala Gln Ala Thr Arg Asp Phe Ile Ala Lys Ala Ala Glu Ala
65 70 75 80

Leu Gly Gly Leu Asp Ile Leu Val Asn Asn Ala Gly Ile Gln His Thr
85 90 95

ES 2 803 273 T3

Ala	Pro	Ile	Glu	Glu	Phe	Pro	Val	Asp	Lys	Trp	Asn	Ala	Ile	Ile	Ala		
			100					105					110				
Leu	Asn	Leu	Ser	Ala	Val	Phe	His	Gly	Thr	Ala	Ala	Gly	Leu	Pro	Ile		
		115					120					125					
Met	Gln	Lys	Gln	Gly	Trp	Gly	Arg	Ile	Ile	Asn	Ile	Ala	Ser	Val	His		
	130					135					140						
Gly	Leu	Val	Gly	Ser	Val	Asn	Lys	Ser	Ala	Tyr	Val	Ala	Ala	Lys	His		
145					150					155					160		
Gly	Val	Val	Gly	Leu	Thr	Lys	Val	Thr	Ala	Leu	Glu	Asn	Ala	Val	Lys		
				165					170						175		
Gly	Ile	Thr	Cys	Asn	Ala	Ile	Cys	Pro	Gly	Phe	Val	Arg	Thr	Pro	Leu		
			180					185						190			
Val	Glu	Lys	Gln	Ile	Glu	Ala	Ile	Ser	Gln	Gln	Lys	Gly	Ile	Asp	Ile		
		195						200				205					
Glu	Ala	Ala	Ala	Arg	Glu	Leu	Leu	Ala	Glu	Lys	Gln	Pro	Ser	Leu	Gln		
	210					215					220						
Phe	Val	Thr	Pro	Glu	Gln	Leu	Gly	Lys	Thr	Ala	Val	Phe	Leu	Ser	Ser		
225					230					235					240		
Ala	Ala	Ala	Asp	Gln	Met	Thr	Gly	Thr	Thr	Leu	Ser	Ile	Asp	Gly	Gly		
				245					250					255			
Trp	Thr	Ala	Arg														
			260														

REIVINDICACIONES

1. Una 3-hidroxiubutirato deshidrogenasa (3-HBDH) mutante de *Alcaligenes faecalis* con un rendimiento mejorado en relación con la 3-HBDH natural, en la que la enzima mutante comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 (3-HBDH de *Alcaligenes faecalis*; 3-HBDH natural) o la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 (secuencia central extendida de 3-HBDH natural) y
 - en la que la enzima mutante tiene al menos tres sustituciones de aminoácidos en relación con la 3-HBDH natural, en la que el aminoácido en la posición correspondiente a
 - la posición 253 de SEQ ID NO: 1 se sustituye con Ile (253Ile), Ala (253Ala) o Cys (253Cys),
 - la posición 233 de SEQ ID NO: 1 se sustituye con Ser (233Ser), Ile (233Ile), Ala (233Ala), Pro (233Pro), Arg (233Arg), Thr (233Thr), Lys (233Lys) o Cys (233Cys), y
 - la posición 234 de SEQ ID NO: 1 se sustituye con Thr (234Thr).
2. La 3-HBDH mutante de la reivindicación 1, en la que el aminoácido en la posición correspondiente a la posición 253 de SEQ ID NO: 1 se sustituye con Ile (253Ile) y/o en la que el aminoácido en la posición correspondiente a la posición 233 de SEQ ID NO: 1 se sustituye con Lys (233Lys).
3. La 3-HBDH mutante de la reivindicación 1 o 2, en la que la enzima mutante tiene al menos una sustitución de aminoácido adicional en una o más de las posiciones correspondientes a las posiciones 18, 19, 33, 38, 39, 62, 125, 143, 148, 170, 175, 187 y/o 216 de SEQ ID NO: 1, en particular al menos las posiciones 62, 143 y/o 148 de SEQ ID NO: 1.
4. La 3-HBDH mutante de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el aminoácido en la posición correspondiente a
 - la posición 18 de SEQ ID NO: 1 se sustituye con Arg (18Arg), Lys (18Lys), Glu (18Glu) o Pro (18Pro);
 - la posición 19 de SEQ ID NO: 1 se sustituye con Gly (19Gly);
 - la posición 33 de SEQ ID NO: 1 se sustituye con Ala (33Ala), Leu (33Leu) o Thr (33Thr);
 - la posición 38 de SEQ ID NO: 1 se sustituye con Lys (38 Lys);
 - la posición 39 de SEQ ID NO: 1 se sustituye con Gly (39Gly);
 - la posición 62 de SEQ ID NO: 1 se sustituye con Phe (62Phe), Met (62Met), Lys (62Lys), Arg (62Arg), Leu (62Leu) o Val (62Val), especialmente Val (62Val);
 - la posición 125 de SEQ ID NO: 1 se sustituye con Gly (125Gly);
 - la posición 143 de SEQ ID NO: 1 se sustituye con Val (143Val);
 - la posición 148 de SEQ ID NO: 1 se sustituye con Gly (148Gly);
 - la posición 170 de SEQ ID NO: 1 se sustituye con Gly (170Gly);
 - la posición 175 de SEQ ID NO: 1 se sustituye con Thr (175Thr), Val (175Val) o Ile (175Ile);
 - la posición 187 de SEQ ID NO: 1 se sustituye con Phe (187Phe); y/o
 - la posición 216 de SEQ ID NO: 1 se sustituye con Val (216Val).
5. La 3-HBDH mutante de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la 3-HBDH mutante tiene al menos las mutaciones, correspondientes a las posiciones de SEQ ID NO: 1
 - 253Ile, 233Lys, 234Thr;
 - 253Ile, 62Val, 233Lys, 234Thr;
 - 253Ile, 62Val, 147Arg, 233Lys, 234Thr;
 - 253Ile, 39Gly, 62Val, 143Val, 148Gly, 233Lys, 234Thr; o

- 253Ile, 62Val, 143Val, 148Gly, 233Lys, 234Thr,
- en particular en la que la 3-HBDH mutante tiene al menos las mutaciones 253Ile, 62Val, 143Val, 148Gly, 233Lys, 234Thr, opcionalmente en combinación con
- 5 - 19Gly;
- 170Gly;
- 10 - 125Gly, 187Phe;
- 18Glu, 33Leu;
- 33Leu, 125Gly, 187Phe;
- 15 - 33Leu, 125Gly, 187Phe, 216Val;
- 18Glu, 187Phe;
- 20 - 33Leu, 125Gly, 175Val, 187Phe;
- 175Val, 216Val;
- 175Val, 187Phe, 216Val;
- 25 - 19Gly, 125Gly, 187Phe;
- 125Gly, 175Thr, 187Phe;
- 30 - 19Gly, 33Leu;
- 19Gly, 175Ile;
- 19Gly, 175Thr;
- 35 - 170Gly, 175Thr;
- 18Glu, 125Gly, 187Phe;
- 40 - 33Leu, 125Gly, 175Thr, 187Phe;
- 33Leu, 125Gly, 175Ile, 187Phe;
- 33Leu, 125Gly, 170Gly, 187Phe;
- 45 - 18Glu, 175Ile, 187Phe;
- 33Leu, 125Gly, 175Val, 187Phe;
- 50 - 33Leu, 125Gly, 175Val, 187Phe, 216Val;
- 33Leu, 125Gly, 175Thr, 187Phe; o
- 33Leu, 38Lys, 39Gly, 125Gly, 175Val, 187Phe.
- 55 6. La 3-HBDH mutante de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la 3-HBDH mutante comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos un 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 1 a 16,
- 60 en particular en la que la 3-HBDH mutante comprende o consiste en la secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4 a 16.
7. La 3-HBDH mutante de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el rendimiento mejorado en relación con la 3-HBDH natural es
- 65 - una estabilidad incrementada, especialmente estabilidad térmica, en relación con la 3-HBDH natural; y/o

- una afinidad por sustrato incrementada, especialmente por 3-hidroxiбутирато, en relación con la 3-HBDH natural; y/o
 - una afinidad por cofactor incrementada, especialmente por NAD o un derivado del mismo, en particular en el que el derivado es carba-NAD, en relación con la 3-HBDH natural.
- 5
8. La 3-HBDH mutante de la reivindicación 7,
- 10
- caracterizada por que la 3-HBDH mutante tiene una estabilidad incrementada en al menos un factor 2 en relación con la 3-HBDH natural, preferentemente una estabilidad incrementada en al menos un factor 3, preferentemente una estabilidad incrementada en al menos un factor 4, más preferentemente una estabilidad incrementada en al menos un factor 5; y/o
- 15
- caracterizada por que la 3-HBDH mutante tiene una afinidad incrementada por el sustrato y/o cofactor en relación con la 3-HBDH natural, en particular una afinidad incrementada por (i) 3-hidroxiбутирато y/o (ii) dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD) o un derivado funcionalmente activo del mismo y/o en particular en la que la afinidad por el sustrato y/o cofactor se incrementa en al menos un 5 %, más en particular en al menos un 10 %, todavía más en particular en al menos un 15 % o 20 %.
- 20
9. Un ácido nucleico que codifica la 3-HBDH mutante de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
10. Una célula que comprende la 3-HBDH mutante de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o el ácido nucleico de la reivindicación 9.
- 25
11. Un procedimiento de determinación de la cantidad o concentración de 3-hidroxiбутирато en una muestra, comprendiendo el procedimiento
- a) poner en contacto la muestra con la 3-HBDH mutante de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en condiciones propicias para la actividad de la 3-HBDH;
- 30
- b) hacer reaccionar el 3-hidroxiбутирато con dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD) o un derivado funcionalmente activo del mismo; y
- c) determinar el cambio del estado de oxidorreducción de NAD o el derivado del mismo;
- 35
- determinando de este modo la cantidad o concentración de 3-hidroxiбутирато en la muestra.
12. El procedimiento de la reivindicación 11,
- 40
- a) en el que la determinación del cambio de estado de oxidorreducción de NAD o el derivado del mismo incluye la determinación de la concentración de (i) NAD o el derivado del mismo y/o (ii) NADH o el derivado del mismo; y/o
- b) en el que la determinación del cambio de estado de oxidorreducción de NAD o el derivado del mismo es electroquímica u óptica; y/o
- 45
- c) en el que el procedimiento comprende además determinar la cantidad o concentración de acetoacetato y/o acetona; y/o
- d) en el que el procedimiento comprende además determinar la cantidad o concentración de glucosa; y/o
- 50
- e) en el que el derivado funcionalmente activo de NAD es carba-NAD; y/o
- f) en el que la 3-HBDH mutante forma parte de un sensor, una tira reactiva, un elemento de prueba, un dispositivo de tiras reactivas o una prueba líquida; y/o
- 55
- g) en el que la muestra es un líquido corporal, en particular una muestra de sangre o una muestra de orina.
13. Uso de la 3-HBDH mutante de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para determinar la cantidad o concentración de 3-hidroxiбутирато en una muestra.
- 60
14. Un dispositivo para determinar la cantidad o concentración de 3-hidroxiбутирато en una muestra que comprende la 3-HBDH mutante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y opcionalmente un componente adicional requerido para dicha determinación.
- 65
15. El dispositivo de acuerdo con la reivindicación 14, en el que el dispositivo se caracteriza por que el dispositivo es o comprende un sensor, preferentemente un sensor electroquímico o un sensor óptico, o una tira reactiva, en particular una tira reactiva y/o en el que el dispositivo permite además determinar la cantidad o concentración de glucosa en la muestra.

SEQ ID NO: 1 (3-HBDH de *Alcaligenes faecalis*):

MLKGKKAVVTGSTSGIGLAMATELAKAGADVINGF
 GQPEDIERERSTLESKFVKAYYLNADLSDAQATRD
 FIAKAAEALGGLDILVNNAGI**QH**TAPIEEFPVDKWN
 AIIA[LN]LSAVFHGTAAALPIMQKQGWGRIINI[ASA]**H**
GLVASV**NKS**[AYVA][AKH]GVVGLTKVTALENAGKGITC
 NAICCPGWVRTPLV**EKQI**EAISSQQKGIDIEAAARELL
 AEKQPSLQFVTPEQLGGAAVFLSSAAADQMTGTTLS
 LDGGWTAR

- ☒ Centro catalítico
- x** Unión a 3-HB
- x Unión al cofactor

Figura 1