

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 807 530**

51 Int. Cl.:

C12N 9/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.04.2007 E 17151869 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.05.2020 EP 3246402**

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

30 Prioridad:

13.04.2006 EP 06007779

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

23.02.2021

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 807 530 T3

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

DESCRIPCIÓN

Mutantes mejorados de glucosa deshidrogenasa soluble dependiente de pirroloquinolina quinona

5 La presente invención se refiere a un mutante de glucosa deshidrogenasa soluble dependiente de PQQ (s-GDH; EC 1.1.5.2) con especificidad mejorada por glucosa en comparación con maltosa, que tiene una sustitución de treonina en la posición 348 por glicina, alanina o bien serina y en el que dicho mutante comprende adicionalmente, al menos una mutación para mejorar la estabilidad del mutante y una o más mutaciones para mejorar la afinidad del mutante por glucosa, en el que dicha mutación para mejorar la afinidad por glucosa se selecciona del grupo que consiste en L110H o Y; N229A, G o S; Q246H, M o N; Y333A; G339T; y V436P, y opcionalmente una o más mutaciones para mejorar además la especificidad del mutante por glucosa en comparación con maltosa, y en el que estas posiciones corresponden a las posiciones aminoácidas conocidas de la secuencia natural de s-GDH de *A. calcoaceticus*. También se divulgan genes que codifican dicha s-GDH mutante, y diferentes aplicaciones de estos mutantes de s-GDH, en particular para determinar la concentración de glucosa en una muestra.

Antecedentes de la invención

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

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

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

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

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

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

El gen de s-GDH de *A. calcoaceticus* se ha clonado en *E. coli*. Después de producirse en la célula, la s-GDH se transloca a través de la membrana citoplásmica en el espacio periplásmico (Duine, J.A., *Energy generation and the glucose dehydrogenase pathway in Acinetobacter*, en "The Biology of *Acinetobacter*", New York, Plenum Press (1991), pp. 295-312; Matsushita, K. y Adachi, O., *Bacterial quinoproteins glucose dehydrogenase and alcohol dehydrogenase*, en "Principles and applications of Quinoproteins", New York, Marcel Dekker (1993) pp. 47-63). Al igual que la s-GDH natural de *A. calcoaceticus*, la s-GDH recombinante expresada en *E. coli* es un homodímero, con una molécula de PQQ y tres iones de calcio por monómero (Dokter, P. *et al.*, *Biochem. J.* 239 (1986) 163-167; Dokter, P. *et al.*, *FEMS Microbiol. Lett.* 43 (1987) 195-200; Dokter, P. *et al.*, *Biochem. J.* 254 (1988) 131-138; Olsthoorn, A.J. y Duine, J.A., *Arch. Biochem. Biophys.* 336 (1996) 42-48; Oubrie, A., *et al.*, *J. Mol. Biol.* 289 (1999) 319-333; Oubrie, A., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 96 (1999) 11787-11791; Oubrie, A., *et al.*, *Embo J.* 18 (1999) 5187-5194). La s-GDH oxida una amplia gama de mono y disacáridos a las correspondientes cetonas que se hidrolizan además en ácidos aldónicos, y también puede donar electrones a PMS (metosulfato de fenacina), DCPIP (2,6-dicloro-fenolindofenol), WB (azul de Wurster) y ubiquinonas de cadena corta tales como ubiquinona Q1 y ubiquinona Q2 (Matsushita, K., *et al.*, *Biochem.* 28 (1989) 6276-6280; Matsushita, K., *et al.*, *Antonie Van Leeuwenhoek* 56 (1989) 63-72), varios aceptadores de electrones artificiales tales como metilsulfato de N-metilfenazonio (Olsthoorn, A.J. y Duine, J.A., *Arch. Biochem. Biophys.* 336 (1996) 42-48; Olsthoorn, A.J. y Duine, J.A., *Biochem.* 37 (1998) 13854-13861) y polímeros electroconductores (Ye, L., *et al.*, *Anal. Chem.* 65 (1993) 238-241). En vista de la actividad específica alta de s-GDH hacia glucosa (Olsthoorn, A.J. y Duine, J.A., (1996) *supra*) y su amplia especificidad de aceptores de electrones artificiales, la enzima es muy adecuada para aplicaciones analíticas, en particular para usarse en tiras reactivas o (bio)sensores para la determinación de glucosa en aplicaciones de diagnóstico (Kaufmann, N. *et al.*, *Development and evaluation of a new system for determining glucose from fresh capillary blood and heparinized blood* en "Glucotrend" (1997) 1-16, Boehringer Mannheim GmbH; Woosuck, S. *et al.*, *Sensors and Actuators B* 100 (2004) 395-402).

La oxidación de glucosa se puede catalizar por al menos tres grupos bastante distintos de enzimas, es decir, por glucosa deshidrogenasas dependientes de NAD/P, por flavoproteínas glucosa oxidasas o por quinoproteínas GDH (Duine, J.A., *Biosens. Bioelectronics* 10 (1995) 17-23). Se ha observado una autooxidación bastante lenta de s-GDH reducida, lo que demuestra que el oxígeno es un aceptor de electrones muy malo para s-GDH (Olsthoorn y Duine, 1996). La s-GDH puede donar eficazmente electrones de la quinona reducida a mediadores tales como PMS, DCPIP, WB y ubiquinonas de cadena corta tales como Q1 y Q2, pero no puede donar eficazmente electrones directamente al oxígeno.

Las tiras reactivas y sensores tradicionales para controlar el nivel de glucosa en sangre, suero y orina, por ejemplo de pacientes diabéticos, usan la glucosa oxidasa. El rendimiento de la enzima depende de la concentración de oxígeno. Las mediciones de glucosa a diferentes altitudes con diferentes concentraciones de oxígeno en el aire pueden dar lugar a resultados falsos. La principal ventaja de las glucosa deshidrogenasas dependientes de PQQ es su independencia del oxígeno. Este rasgo característico importante se analiza, por ejemplo, en el documento US 6.103.509, en el que se han investigado algunos rasgos característicos de GDH unida a membrana.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a mutantes de s-GDH. Se divulga un mutante de glucosa deshidrogenasa soluble dependiente de PQQ (s-GDH; EC 1.1.5.2) con especificidad mejorada por glucosa en comparación con maltosa, que tiene una sustitución de treonina en la posición 348 por glicina, alanina o bien serina y en el que dicho mutante comprende adicionalmente al menos una mutación para mejorar la estabilidad del mutante, al menos una mutación para mejorar la afinidad del mutante por glucosa, en el que dicha mutación para mejorar la afinidad por glucosa se selecciona del grupo que consiste en L110H o Y; N229A, G o S; Q246H, M o N; Y333A; G339T; y V436P, y opcionalmente una o más mutaciones para mejorar además la especificidad del mutante por glucosa en comparación con maltosa, y en el que las posiciones dadas corresponden a las posiciones aminoacídicas conocidas de la secuencia natural de s-GDH de *A. calcoaceticus* (SEQ ID NO: 2).

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

Además se describe un procedimiento para producir mutantes de s-GDH que comprende cultivar la célula huésped

transfectada con un vector de expresión apropiado en condiciones adecuadas para la producción de un mutante de s-GDH.

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

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

Descripción detallada de la invención

15 En un primer modo de realización, la invención se refiere a un mutante de glucosa deshidrogenasa soluble dependiente de PQQ (s-GDH; EC 1.1.5.2) con especificidad mejorada por glucosa en comparación con maltosa, que tiene una sustitución de treonina en la posición 348 por glicina o alanina o bien serina y en el que dicho mutante comprende al menos una mutación para mejorar la estabilidad del mutante y comprende adicionalmente al menos una mutación para mejorar la afinidad del mutante por glucosa, en el que dicha mutación para mejorar la afinidad por glucosa se selecciona del grupo que consiste en L110H o Y; N229A, G o S; Q246H, M o N; Y333A; G339T; y V436P, y opcionalmente una o más mutaciones para mejorar además la especificidad del mutante por glucosa en comparación con maltosa, y en el que las posiciones dadas corresponden a las posiciones aminoacídicas conocidas de la secuencia natural de s-GDH de *A. calcoaceticus* (SEQ ID NO: 2).

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

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

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

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

40 Los logros de la presente invención se describen con gran detalle haciendo referencia a las posiciones aminoacídicas conocidas de SEQ ID NO: 2, la secuencia natural de s-GDH aislada de la cepa LMD 79.41 de tipo *Acinetobacter calcoaceticus*. Las posiciones aminoacídicas en diferentes aislados de s-GDH correspondientes a las posiciones de SEQ ID NO: 2 se identifican fácilmente por una comparación de secuencias apropiada.

45 La alineación y comparación múltiple de una secuencia s-GDH con la secuencia natural de SEQ ID NO: 2 se realiza preferentemente con el programa PileUp de GCG Package versión 10.2 (Genetics Computer Group, Inc.). PileUp crea una alineación de secuencia múltiple usando una simplificación del procedimiento de alineación progresiva de Feng, D. F. y Doolittle, R. F., J. Mol. Evol. 25 (1987) 351-360, y las matrices de puntuación para residuos aminoacídicos idénticos, similares o diferentes se definen en consecuencia. Este procedimiento comienza con la alineación por pares de las dos secuencias más similares, produciendo una agrupación de dos secuencias alineadas. Esta agrupación se puede alinear a continuación con la siguiente secuencia o agrupación de secuencias alineadas más relacionada. Dos agrupaciones de secuencias se pueden alinear por una extensión simple de la alineación por pares de dos secuencias individuales. La alineación final se logra por una serie de alineaciones por pares progresivas, que incluyen secuencias y agrupaciones cada vez más distintas, hasta que todas las secuencias se han incluido en la alineación por pares final. De esta forma, las posiciones aminoacídicas en otras moléculas de s-GDH homólogas se pueden identificar fácilmente como correspondientes a las posiciones dadas para s-GDH de *A. calcoaceticus* en SEQ ID NO: 2. Este es el motivo

por el que las posiciones aminoacídicas dadas en el presente documento se entenderán como posiciones aminoacídicas de SEQ ID NO: 2 o como las posiciones correspondientes a las mismas en otra molécula de s-GDH homóloga.

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

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

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

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

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

30 Preferentemente, la mutación para mejorar la estabilidad de una variante de s-GDH que tiene una sustitución de treonina en la posición 348 por glicina, alanina o bien serina es una sustitución. Preferentemente, dicha sustitución se selecciona del grupo que consiste en D87R; N122K; S124K; S146A o G; L187F o M; N267Y; V298L; T313D y L386F.

35 También preferente, dicha sustitución para mejorar la estabilidad de una variante de s-GDH se selecciona del grupo que consiste en D87R; N122K; S124K; S146G; V298L y L386F. En otros modos de realización preferentes, se usan combinaciones de dos, tres o de cuatro de estas sustituciones o también preferente, de todas estas cinco sustituciones, en una s-GDH mutada para mejorar la estabilidad de dicho mutante.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

10 El término "afinidad" por un sustrato es bien conocido en la técnica. Se da en mM como el así denominado valor de Km. Son conocidos diversos procedimientos en la técnica para determinar la afinidad de s-GDH, usando glucosa u otros glúcidos como sustratos, véase, Igarashi, S., *et al.*, Biochem Biophys Res Commun 264 (1999) 820.

15 En el cribado de nuevas variantes con extracto bruto de *E. coli*, se realizó un cálculo en porcentaje del valor de Km para una evaluación más rápida de clones generados. La afinidad hacia glucosa por los mutantes de s-GDH candidatos se calculó de acuerdo con la cinética de Michaelis-Menten bien conocida.

20 El mutante de s-GDH de acuerdo con la presente invención tiene una afinidad mejorada por glucosa en comparación con un mutante que comprende una sustitución de treonina en la posición 348 por glicina, alanina o bien serina. Preferentemente, la afinidad por el sustrato glucosa se determina como se describe en detalle en la sección de ejemplos.

25 La una o más mutaciones para mejorar la afinidad por glucosa de un mutante de s-GDH que ya comprende una sustitución de treonina en la posición 348 por glicina, alanina o bien serina es una sustitución aminoacídica seleccionada del grupo que consiste en L110H o Y; N229A, G o S; Q246H, M o N; Y333A; G339T; y V436P.

30 En caso de que el aminoácido correspondiente a la posición 110 de la secuencia natural de s-GDH conocida de *A. calcoaceticus* (SEQ ID NO: 2) se sustituya en una variante de la presente invención, es preferente que el aminoácido natural leucina se sustituya por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en histidina y tirosina. Es más preferente la sustitución en la posición 110 por histidina.

35 En caso de que el aminoácido correspondiente a la posición 229 de la secuencia natural de s-GDH conocida de *A. calcoaceticus* (SEQ ID NO: 2) se sustituya en una variante de la presente invención, es preferente que el aminoácido natural asparagina se sustituya por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en alanina, glicina y serina. Es más preferente la sustitución en la posición 229 por alanina.

40 También preferente, la mutación para mejorar la afinidad por glucosa se selecciona del grupo que consiste en L110H, Q246H; G339T; y V436P.

También preferente, dicha sustitución para mejorar la afinidad por glucosa se selecciona de Q246H; y G339T. Una s-GDH preferente de acuerdo con la presente invención comprende ambas de estas sustituciones.

45 En otro modo de realización preferente, el mutante de s-GDH descrito anteriormente con especificidad mejorada por glucosa en comparación con maltosa, que tiene una sustitución de treonina en la posición 348 por glicina, alanina o bien serina y que comprende al menos una mutación para mejorar la estabilidad, comprende adicionalmente una o más mutaciones para mejorar la especificidad por sustrato del mutante por glucosa en comparación con maltosa.

50 Para determinadas aplicaciones, la especificidad por sustrato de un mutante de s-GDH con especificidad mejorada por glucosa en comparación con maltosa, que tiene una sustitución de treonina en la posición 348 por glicina, alanina o bien serina, puede no ser aún suficiente para determinadas aplicaciones rutinarias.

55 En determinados modos de realización, se puede requerir generar un mutante de s-GDH que además de la mutación analizada anteriormente en la posición 348 comprenda una o más mutaciones adicionales para mejorar además la especificidad del mutante por glucosa en comparación con maltosa.

El término "especificidad por sustrato" o "especificidad" es bien conocido para el experto.

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

65 El experto en el campo apreciará que la comparación de actividades enzimáticas se realiza mejor a concentraciones equimolares de las moléculas de sustrato investigadas usando condiciones de ensayo bien definidas. De otro modo,

se tienen que hacer correcciones para las diferencias en las concentraciones.

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

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

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

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

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

La especificidad se calcula de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$20 \text{ especificidad} = \frac{\text{actividad de mutante de glucosa}}{\text{actividad de mutante de maltosa}} \times \frac{\text{actividad de maltosa natural}}{\text{actividad de glucosa natural}}$$

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

mejorar la especificidad por sustrato por glucosa en comparación con maltosa se selecciona del grupo que consiste en L169F; Y171G; E245D e inserción 429P. En otros modos de realización preferentes, se usan combinaciones de dos o de las tres sustituciones conjuntamente con la inserción 429 P en una s-GDH mutante para mejorar la especificidad por sustrato por glucosa en comparación con maltosa de dicho mutante.

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

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

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

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

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

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

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

D87R+N122K+S124K+S146G+L169F+Y171G+E245D+Q246H+V298L+

50 M341V+T348S+L386F+ins429P;

D87R+N122K+S124K+S146G+L169F+Y171G+E245D+Q246H+V298L+

+G339T+M341V+T348G+L386F+ins429P;

55 D87R+N122K+S124K+S146G+L169F+Y171G+E245D+Q246H+V298L+

M341V+T348S+L386F+ins429P+V436P;

60 D87R+N122K+S124K+S146G+L169F+Y171G+E245D+Q246H+V298L+

M341V+T348S+V349G+A354T+L386F+ins429P;

D87R+L110H+N122K+S124K+S146G+L169F+Y171G+E245D+Q246H+V298L+

65 M341V+T348S+L386F+ins429P.

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

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

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

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

45 La presente invención incluye además un vector de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención enlazada de forma funcional a una secuencia promotora que puede dirigir su expresión en una célula huésped.

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

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

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

65

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

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

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

20 Una vez que se ha introducido un vector de expresión que contiene una variante de s-GDH en una célula huésped apropiada, la célula huésped se puede cultivar en condiciones que permitan la expresión de las variantes de s-GDH deseadas. Las células huésped que contienen el vector de expresión deseado con la secuencia de ADN que codifica la totalidad o parte de la s-GDH mutante se pueden identificar fácilmente, por ejemplo, por selección antibiótica. La expresión de las variantes de s-GDH se puede identificar por diferentes procedimientos como medir la producción de transcritos de ARNm de s-GDH, detección del producto génico inmunológicamente o detección de la actividad enzimática del producto génico. Preferentemente, se aplica un ensayo enzimático.

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

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

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

45 Es preferente que los polipéptidos de la presente invención se obtengan por producción en células huésped que expresan una secuencia de ADN que codifica la s-GDH mutante. Los polipéptidos de la presente invención también se pueden obtener por traducción *in vitro* del ARNm codificado por una secuencia de ADN que codifica la s-GDH mutante. Por ejemplo, las secuencias de ADN se pueden sintetizar como se describe anteriormente y se insertan en un vector de expresión adecuado, que a su vez se puede usar en un sistema de transcripción/traducción *in vitro*.

50 Un vector de expresión que comprende un polinucleótido aislado como se define y se describe anteriormente enlazado de forma funcional a una secuencia promotora que puede promover su expresión en un sistema de síntesis peptídica sin células representa otro modo de realización preferente de la presente invención.

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

60 Una de las principales aplicaciones de las variantes de s-GDH mejoradas de la presente invención es para el uso en tiras reactivas para controlar la glucemia en pacientes diabéticos. La insensibilidad de la glucosa deshidrogenasa dependiente de PQQ hacia oxígeno es, como se analiza anteriormente, una gran ventaja sobre la glucosa oxidasa. La

interferencia debido a, por ejemplo, maltosa, galactosa, y/u otros glúcidos relacionados que pueden estar presentes en una muestra que se va a analizar, se puede reducir significativamente ahora usando las variantes de s-GDH novedosas que tienen tanto termoestabilidad mejorada así como especificidad mejorada hacia glucosa. Por supuesto, se pueden investigar muchas clases de muestras. Los líquidos corporales como suero, plasma, líquido intestinal u orina son las fuentes preferentes para dichas muestras.

La invención también comprende un procedimiento para detectar, determinar o medir glucosa en una muestra usando un mutante de s-GDH de acuerdo con la presente invención. Es en especial preferente que el procedimiento mejorado para la detección de glucosa en una muestra se caracterice por que dicha detección, determinación o medición de glucosa se realice usando un dispositivo sensor o de tira reactiva.

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

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

En los siguientes ejemplos, todos los reactivos, enzimas de restricción y otros materiales se obtuvieron de Roche Diagnostics Alemania, a menos que se especifiquen otras fuentes comerciales, y se usaron de acuerdo con las instrucciones dadas por los proveedores. Las operaciones y procedimientos empleados para la purificación, caracterización y clonación de ADN son bien conocidos en la técnica (Ausubel, F., *et al.*, En " Current protocols in molecular biology" (1994) Wiley Verlag) y se pueden adaptar según se requiera por el experto en la técnica.

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

Los siguientes ejemplos, listado de secuencias y figuras se proporcionan para ayudar a la comprensión de la presente invención, de la que su verdadero alcance se expone en las reivindicaciones adjuntas. Se entiende que se pueden realizar modificaciones en los procedimientos expuestos sin apartarse del alcance de la invención.

Descripción de las figuras

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

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

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

Ejemplo 1

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

Se aisló el gen de s-GDH de la cepa LMD 79.41 de *Acinetobacter calcoaceticus* de acuerdo con procedimientos estándar. Se subclonó el gen de s-GDH natural en un plásmido que contenía el promotor *mgI* para expresión regulable (véase la solicitud de patente WO 88/09373). La nueva construcción se denominó pACSGDH (véanse las figuras 2 y 3, así como SEQ ID NO: 3). Se introdujeron los plásmidos recombinantes en un organismo huésped seleccionado del grupo de *E. coli*. A continuación se cultivaron estos organismos en condiciones apropiadas y se seleccionaron colonias que mostraban actividad de s-GDH.

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

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

Ejemplo 2**Generación de mutante T348G y mutante T348S**

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

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

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

CATTTGCTGG CCAGGGGTTG CACCGTCAT (=SEQ ID NO: 4)

ATGACGGTGC AACCCCTGGC CAGCAAATG (=SEQ ID NO: 5)

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

Ejemplo 3**Cribado**

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

40 De cada placa madre, se transfirieron 5 µl de muestra/pocillo a una MTP que contenía 5 µl por pocillo de B (B = reactivo de extracción de proteínas bacterianas; Pierce, n.º 78248) para la ruptura celular y se añadieron 240 µl de pirroloquinolina quinona (PQQ) 0,0556 mM; Hepes 50 mM, CaCl₂ 15 mM a pH 7,0/pocillo para la activación de s-GDH. Para completar la formación de la holoenzima, se incubó la MTP a 25 °C durante 2 horas y a 10 °C durante la noche. Esta placa se denomina placa de trabajo.

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

55 Se calculó la dE/min y se fijó el valor usando glucosa 30 mM como sustrato a una actividad de un 100 %. El valor obtenido con el otro glúcido se comparó con el valor de glucosa y se calculó en porcentaje de actividad (por ejemplo, para maltosa como: (dE/min de maltosa/dE de glucosa)*100). Esto es equivalente a la reactividad cruzada de la enzima (variante). En las siguientes tablas, se da "M/G", es decir, la reactividad cruzada de s-GDH con maltosa (M) como sustrato en comparación con glucosa (G) como sustrato.

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

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

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

Ejemplo 4

5

Secuenciación de una s-GDH mutante

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

10

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

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

15

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

20

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

25

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

Ejemplo 5

30

Otros mutantes de s-GDH obtenidos por mutagénesis de saturación en base a T348G (mutante A) y T348S (mutante A')

35

Las posiciones aminoacídicas candidatas eran conocidas por los inventores a partir de los estudios previos realizados por ellos. Estas posiciones aminoacídicas candidatas que se sospechaba o se sabía que influyen en las características pertinentes de s-GDH como termoestabilidad, especificidad por sustrato o afinidad por glucosa, se analizaron individualmente en base a T348G (mutante A) o bien en base a T348S (mutante A').

40

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

45

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

50

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

55

Para cada una de las posiciones en investigación, se realizó una reacción de PCR.

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

60

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

Para incrementar la verosimilitud estadística de que todas las 20 sustituciones aminoacídicas posibles estén cubiertas

en esta evaluación, se cribaron 200 clones para cada posición como se describe en el **ejemplo 3**. Se secuenciaron clones de interés de acuerdo con el procedimiento dado en el **ejemplo 4**.

5 **Tabla 2: efecto de las sustituciones aminoacídicas adicionales sobre las características básicas del mutante A (= T348G)**

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

Tabla 3: efecto de las sustituciones aminoacídicas adicionales sobre las características básicas del mutante A' (= T348S)

| Enzima | M/G a glúcido 30 mM en % | % de actividad relativa de glucosa 1,9 mM/30 mM | Estabilidad, 30 min, 64 °C | Intercambio aminoacídico (AA) |
|---------------|-----------------------------|--|----------------------------------|----------------------------------|
| Wt-GlucDOR | 105 % | 70 % | 80 % | - |
| Mutante A' | 50 % | 35 % | 50 % | T 348 S |
| Mutante A'/1 | 55 % | 47 % | - | + L 110 H |
| Mutante A'/2 | 65 % | 70 % | - | + Q 246 H |
| Mutante A'/3 | 58 % | 50 % | - | + Q 246 M |
| Mutante A'/4 | 60 % | 55 % | - | + Q 246 N |
| Mutante A'/5 | 59 % | 50 % | - | + G 339 T |
| Mutante A'/6 | 60 % | 60 % | - | + V 436 P |
| Mutante A'/7 | 40 % | 35 % | - | + A 294 D |
| Mutante A'/8 | 38 % | 32 % | - | + A 294 E |
| Mutante A'/9 | 41 % | 45 % | - | + T 323 V |
| Mutante A'/10 | 43 % | 47 % | - | + R 378 I |
| Mutante A'/11 | 44 % | 47 % | - | + R 378 M |
| Mutante A'/12 | 40 % | 50 % | - | + R 378 A |
| Mutante A'/13 | 40 % | 50 % | - | + R 378 D |
| Mutante A'/14 | - | - | 60 % | + D 87 R |
| Mutante A'/15 | - | - | 80 % | + S 146 A |
| Mutante A'/16 | - | - | 85 % | + S 146 G |
| Mutante A'/17 | - | - | 65 % | + V 298 L |
| Mutante A'/18 | - | - | 60 % | + T 313 D |
| Mutante A'/19 | - | - | 75 % | + L 386 F |

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

5 **Ejemplo 6**

Identificación de mutantes con termoestabilidad mejorada

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

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

Se usaron los siguientes cebadores para introducir estas sustituciones aminoacídicas deseadas:

20 Hebra de sentido 5'- CCTATAAGAAAAAGACAGATACGCTCG -3' (SEQ ID NO: 8)

Hebra de antisentido 5'- CGAGCGTATCTGTCTTTTTCTTATAGG-3' (SEQ ID: NO: 9)

D87R:

25 Hebra de sentido 5'- TTCCATCCTCGAGAGATTGTCAAT-3' (SEQ ID NO: 10)

Hebra de antisentido 5'-ATTGACAATCTCTCTGAGGATGGAA-3' (SEQ ID: NO: 11)

30 N122K y S124K:

Hebra de sentido 5'-CGTTATACCTATAAGAAAAAGACAGATACGCTCG-3' (SEQ ID NO: 12)

ES 2 807 530 T3

Hebra de antisentido 5'-CGAGCGTATCTGTCTTTTTCTTATAGGTATAACG-3' (SEQ ID NO: 13)

S146G:

5

Hebra de sentido 5'-AAAAGACCATCAGGGTGGTCTCGAGAAG -3' (SEQ ID NO: 14)

Hebra de antisentido 5'-CTTCTCGAGACCACCCTGATGGTCTTTT -3' (SEQ ID NO: 15)

10

V298L:

Hebra de sentido 5'-GCTCAAATGGATTAAGTAGCCGCA -3' (SEQ ID NO: 16)

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

15

L386F:

Hebra de sentido 5'-CCGTATTAAGTTCGATCCAATTATAGC -3' (SEQ ID NO: 18)

20

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

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

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

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

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

Ejemplo 7

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

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

Como es conocido de los experimentos resumidos en las tablas 2 y 3, las sustituciones aminoacídicas L110H o Y; N229A, G o S; Q246H, M o N; Y333A; G339T; M341V; V349A o G y V436P parecen apropiadas para potenciar la afinidad de un mutante de s-GDH por glucosa. Los efectos más fuertes sobre la afinidad se observan con los mutantes L110H, Q246H; G339T; M341V; V349G y V436P. Se descubrieron otras fuertes mejoras de afinidad con los intercambios aminoacídicos Q246H, M341V; V349G y V436P. Se introducen mutaciones puntuales en mutantes ya existentes por la misma estrategia que ya se ejemplificó en el ejemplo 6, por lo tanto, aquí se dan solo los cebadores específicos para las sustituciones Q246H.

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

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

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

La actividad específica se resolvió como se describe en el ejemplo 8.

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

Tabla 5: combinación de diversas sustituciones aminoacídicas en mutantes de s-GDH con especificidad por sustrato mejorada por glucosa en comparación con maltosa

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

| Enzimas | Valor de Km de cribado en % | Valor de Km ap. en mM de glucosa | Valor de Km ap. en mM de maltosa | M/G en % | Actividad específica U/mg |
|---|-----------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------|---------------------------|
| V436P) | | | | | |
| Mutante 32 (= mutante 29 + V349G + A354T) | 32 | n.d. | n.d. | 3,3 | 220. |
| Mutante 33 (= mutante 29 + L110H) | 28 | n.d. | n.d. | 4,3 | 350 |

Se puede ver claramente que en todos los tipos mutantes el intercambio aminoacídico adicional Q246H produjo una potenciación de la afinidad hacia glucosa y una mejora con respecto a la actividad específica. El mutante 6 tiene los intercambios aminoacídicos en la posición T348G, N122K, L169F, Y171G, E245D, M341V y una inserción de prolina en la posición 429 como el mutante 13 y Q246H adicional. El mutante J tiene los intercambios aminoacídicos en la posición T348G, Y171G, E245D, M341V, N428P como el mutante G y Q246H adicional.

El mutante 22 tiene los intercambios aminoacídicos en la posición T348G, N122K, S124K, L169F, Y171G, E245D, Q246H, M341V, L386F y una inserción de prolina en la posición 429. El mutante 29 tiene todos los intercambios del mutante 22 excepto T348G, que se intercambia a T348S, y dio como resultado una mejora de velocidad. Los mutantes 30 y 31 lograron valores de Km incluso mayores por glucosa intercambiando adicionalmente G339T y V436P.

Ejemplo 8

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

Se cultivaron células de *E. coli* que comprenden un vector de expresión de s-GDH apropiado (4 x levadura-Amp. 37 °C), se recogieron y resuspendieron en tampón fosfato de potasio a pH 7,0. La ruptura celular se realizó por paso por prensa French (70-90 MPa (700-900 bar)). Después de la centrifugación, se aplicó el sobrenadante a una columna de S-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotec) equilibrada con tampón fosfato de potasio 10 mM a pH 7,0. Después del lavado, se eluyó la s-GDH usando un gradiente salino de NaCl 0-1 M. Las fracciones que mostraron actividad de s-GDH se agruparon, dializaron frente a tampón fosfato de potasio a pH 7,0 y se volvieron a cromatografiar en columna de S-Sepharose reequilibrada. Las fracciones activas se agruparon y se sometieron a una filtración en gel usando una columna Superdex® 200 (Amersham). Las fracciones activas se agruparon y después de la adición de CaCl₂ (concentración final 3 mM) se almacenaron a -20 °C.

La determinación de proteínas se realizó usando el reactivo de ensayo de proteínas n.º 23225 de Pierce (curva de calibración con BSA, 30 min. 37 °C).

Para la medición de la actividad enzimática, se diluyeron las muestras de s-GDH a 1 mg de proteína/ml con pirroloquinolina quinona (PQQ) 0,0556 mM; Hepes 50 mM; CaCl₂ 15 mM a pH 7,0 y se incubaron a 25 °C durante 30 minutos para su reconstitución o activación.

Después de la activación, las muestras se diluyeron con Hepes 50 mM; CaCl₂ 15 mM, pH 7,0 a aproximadamente 0,02 U/ml, y se añadieron 50 µl de cada muestra diluida a 1000 µl de una solución tampón de citrato 0,2 M (pH 5,8; a 25 °C) que contenía 0,315 mg de (4-(dimetilfosfinilmetil)-2-metil-pirazolo-[1.5a]-imidazol-3-il)-(4-nitro-sofenil)-amina (véase la patente US 5.484.708)/ml como mediador y glúcido 30 mM.

Se controla la extinción a 620 nm durante los primeros 5 minutos a 25 °C.

Una unidad de actividad enzimática se corresponde con la conversión de 1 mmol de mediador/min en las condiciones de ensayo anteriores

Cálculo:

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

(ε = coeficiente de extinción; ε_{620 nm} = 30[1* mmol⁻¹* cm⁻¹]).

Actividad específica (U/mg) = actividad en volumen U/ml dividida entre concentración de proteína mg/ml, resultados en U/mg

Los ensayos se realizaron con glucosa y maltosa (Merck, Alemania), respectivamente.

Los resultados relacionados con la actividad enzimática así como con actividad específica se han incluido en las tablas dadas en los ejemplos previos.

La presente invención se refiere a los siguientes modos de realización (1) a (16):

- 5 1. Un mutante de glucosa deshidrogenasa soluble dependiente de PQQ (s-GDH; EC 1.1.5.2) con especificidad mejorada por glucosa en comparación con maltosa, que tiene una sustitución de treonina en la posición 348 por glicina, alanina o bien serina, en el que dicho mutante comprende adicionalmente
- a) al menos una mutación para mejorar la estabilidad del mutante,
- 10 b) al menos una mutación para mejorar la afinidad del mutante por glucosa, y opcionalmente
- c) una o más mutaciones para mejorar además la especificidad del mutante por glucosa en comparación con maltosa, y
- 15 en el que estas posiciones corresponden a las posiciones aminoacídicas conocidas de la secuencia natural de s-GDH de *A. calcoaceticus* (SEQ ID NO: 2).
- 20 2. El mutante de s-GDH de acuerdo con el modo de realización 1, en el que dicha mutación para mejorar la estabilidad es una sustitución aminoacídica seleccionada del grupo que consiste en L110H, Q246H; G339T; M341V; V349G y V436P.
3. El mutante de s-GDH de acuerdo con el modo de realización 1, en el que dicha mutación para mejorar la afinidad por glucosa se selecciona del grupo que consiste en L110H o Y; N229A, G o S; Q246H, M o N; Y333A; G339T; M341V; V349A o G y V436P.
- 25 4. El mutante de s-GDH de acuerdo con el modo de realización 1, en el que dicha mutación para mejorar la especificidad del mutante por glucosa en comparación con maltosa es una sustitución aminoacídica seleccionada del grupo que consiste en Q145P; D163G o N; Q164F; L169F; Y171G; I208L o V; T224I; E245D; G276S; A294D o E; V300A, S, N, Y o I; T307G; T323V; A354Y, E o L; R378I, M, A o D; N428P e inserción 429 P.
- 30 5. El mutante de s-GDH de acuerdo con el modo de realización 2, en el que dicha sustitución para mejorar la estabilidad se selecciona del grupo que consiste en D87R; N122K; S124K; S146G; V298L y L386F.
6. El mutante de s-GDH de acuerdo con el modo de realización 3, en el que dicha sustitución para mejorar la afinidad por glucosa se selecciona del grupo que consiste en L110H, Q246H; G339T; M341V; V349G y V436P.
- 35 7. El mutante de s-GDH de acuerdo con el modo de realización 4, en el que dicha sustitución para mejorar la especificidad del mutante por glucosa en comparación con maltosa se selecciona del grupo que consiste en L169F; Y171G; E245D; N428P e inserción 429P.
- 40 8. Un polinucleótido aislado que codifica una proteína mutante de s-GDH de acuerdo con cualquiera de los modos de realización 1 a 7.
9. Un vector de expresión que comprende un polinucleótido aislado como se define en el modo de realización 8 enlazado de forma funcional a una secuencia promotora que puede promover la expresión de dicho polinucleótido en una célula huésped.
- 45 10. Una célula huésped que comprende el vector de expresión del modo de realización 9.
- 50 11. Un procedimiento para producir mutantes de s-GDH que comprende cultivar la célula huésped del modo de realización 10 en condiciones adecuadas para la producción de los mutantes enzimáticos.
12. Un vector de expresión que comprende un polinucleótido aislado como se define en el modo de realización 11 enlazado de forma funcional a una secuencia promotora que puede promover su expresión en un sistema de síntesis peptídica sin células.
- 55 13. Un procedimiento para producir mutantes de s-GDH con la construcción del modo de realización 12 en un sistema de síntesis peptídica sin células en condiciones adecuadas para la producción de dichos mutantes enzimáticos.
- 60 14. Un procedimiento para detectar, determinar o medir glucosa en una muestra usando un mutante de s-GDH de acuerdo con cualquiera de los modos de realización 1 a 7, comprendiendo dicha mejora poner en contacto la muestra con dicho mutante.
15. El procedimiento del modo de realización 14 caracterizado además por que dicha detección, determinación o medición de glucosa se realiza usando un dispositivo sensor o de tira reactiva.
- 65 16. Un dispositivo para la detección o medición de glucosa en una muestra que comprende un mutante de s-GDH de

acuerdo con cualquiera de los modos de realización 1 a 7 y otros reactivos requeridos para dicha medición.

ES 2 807 530 T3

| | |
|---|------|
| cag tca ggt cgt ctt gtc att ggg cca gat caa aag att tat tat acg Gln Ser Gly Arg Leu Val Ile Gly Pro Asp Gln Lys Ile Tyr Tyr Thr 145 150 155 160 | 480 |
| att ggt gac caa ggg cgt aac cag ctt gct tat ttg ttc ttg cca aat Ile Gly Asp Gln Gly Arg Asn Gln Leu Ala Tyr Leu Phe Leu Pro Asn 165 170 175 | 528 |
| caa gca caa cat acg cca act caa caa gaa ctg aat ggt aaa gac tat Gln Ala Gln His Thr Pro Thr Gln Gln Glu Leu Asn Gly Lys Asp Tyr 180 185 190 | 576 |
| cac acc tat atg ggt aaa gta cta cgc tta aat ctt gat gga agt att His Thr Tyr Met Gly Lys Val Leu Arg Leu Asn Leu Asp Gly Ser Ile 195 200 205 | 624 |
| cca aag gat aat cca agt ttt aac ggg gtg gtt agc cat att tat aca Pro Lys Asp Asn Pro Ser Phe Asn Gly Val Val Ser His Ile Tyr Thr 210 215 220 | 672 |
| ctt gga cat cgt aat ccg cag ggc tta gca ttc act cca aat ggt aaa Leu Gly His Arg Asn Pro Gln Gly Leu Ala Phe Thr Pro Asn Gly Lys 225 230 235 240 | 720 |
| tta ttg cag tct gaa caa ggc cca aac tct gac gat gaa att aac ctc Leu Leu Gln Ser Glu Gln Gly Pro Asn Ser Asp Asp Glu Ile Asn Leu 245 250 255 | 768 |
| att gtc aaa ggt ggc aat tat ggt tgg ccg aat gta gca ggt tat aaa Ile Val Lys Gly Gly Asn Tyr Gly Trp Pro Asn Val Ala Gly Tyr Lys 260 265 270 | 816 |
| gat gat agt ggc tat gct tat gca aat tat tca gca gca gcc aat aag Asp Asp Ser Gly Tyr Ala Tyr Ala Asn Tyr Ser Ala Ala Ala Asn Lys 275 280 285 | 864 |
| tca att aag gat tta gct caa aat gga gta aaa gta gcc gca ggg gtc Ser Ile Lys Asp Leu Ala Gln Asn Gly Val Lys Val Ala Ala Gly Val 290 295 300 | 912 |
| cct gtg acg aaa gaa tct gaa tgg act ggt aaa aac ttt gtc cca cca Pro Val Thr Lys Glu Ser Glu Trp Thr Gly Lys Asn Phe Val Pro Pro 305 310 315 320 | 960 |
| tta aaa act tta tat acc gtt caa gat acc tac aac tat aac gat cca Leu Lys Thr Leu Tyr Thr Val Gln Asp Thr Tyr Asn Tyr Asn Asp Pro 325 330 335 | 1008 |
| act tgt gga gag atg acc tac att tgc tgg cca aca gtt gca ccg tca Thr Cys Gly Glu Met Thr Tyr Ile Cys Trp Pro Thr Val Ala Pro Ser 340 345 350 | 1056 |
| tct gcc tat gtc tat aag ggc ggt aaa aaa gca att act ggt tgg gaa Ser Ala Tyr Val Tyr Lys Gly Gly Lys Lys Ala Ile Thr Gly Trp Glu 355 360 365 | 1104 |
| aat aca tta ttg gtt cca tct tta aaa cgt ggt gtc att ttc cgt att Asn Thr Leu Leu Val Pro Ser Leu Lys Arg Gly Val Ile Phe Arg Ile 370 375 380 | 1152 |
| aag tta gat cca act tat agc act act tat gat gac gct gta ccg atg Lys Leu Asp Pro Thr Tyr Ser Thr Thr Tyr Asp Asp Ala Val Pro Met | 1200 |

ES 2 807 530 T3

| | | | | | | | |
|---|--|-----|--|-----|--|-----|------|
| 385 | | 390 | | 395 | | 400 | |
| ttt aag agc aac aac cgt tat cgt gat gtg att gca agt cca gat ggg | | | | | | | 1248 |
| Phe Lys Ser Asn Asn Arg Tyr Arg Asp Val Ile Ala Ser Pro Asp Gly | | | | | | | |
| | | 405 | | 410 | | 415 | |
| aat gtc tta tat gta tta act gat act gcc gga aat gtc caa aaa gat | | | | | | | 1296 |
| Asn Val Leu Tyr Val Leu Thr Asp Thr Ala Gly Asn Val Gln Lys Asp | | | | | | | |
| | | 420 | | 425 | | 430 | |
| gat gcc tca gta aca aat aca tta gaa aac cca gga tct ctc att aag | | | | | | | 1344 |
| Asp Gly Ser Val Thr Asn Thr Leu Glu Asn Pro Gly Ser Leu Ile Lys | | | | | | | |
| | | 435 | | 440 | | 445 | |
| ttc acc tat aag gct aag | | | | | | | 1362 |
| Phe Thr Tyr Lys Ala Lys | | | | | | | |
| | | 450 | | | | | |

<210> 2

<211> 454

5 <212> PRT

<213> Acinetobacter calcoaceticus

<400> 2

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|--|----|-----|----|--|----|----|----|-----|----|----|----|----|-----|----|
| Asp Val Pro Leu Thr Pro Ser Gln Phe Ala Lys Ala Lys Ser Glu Asn | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1 | | | | 5 | | | | 10 | | | | | | 15 | |
| Phe Asp Lys Lys Val Ile Leu Ser Asn Leu Asn Lys Pro His Ala Leu | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | | 30 | |
| Leu Trp Gly Pro Asp Asn Gln Ile Trp Leu Thr Glu Arg Ala Thr Gly | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | 35 | | | | | 40 | | | | | | 45 | | |
| Lys Ile Leu Arg Val Asn Pro Glu Ser Gly Ser Val Lys Thr Val Phe | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | 50 | | | | 55 | | | | | | 60 | | | |
| Gln Val Pro Glu Ile Val Asn Asp Ala Asp Gly Gln Asn Gly Leu Leu | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | 65 | | | | 70 | | | | | 75 | | | | 80 |
| Gly Phe Ala Phe His Pro Asp Phe Lys Asn Asn Pro Tyr Ile Tyr Ile | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | 85 | | | | | | 90 | | | | 95 | |
| Ser Gly Thr Phe Lys Asn Pro Lys Ser Thr Asp Lys Glu Leu Pro Asn | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | 100 | | | | | | 105 | | | | | 110 | |
| Gln Thr Ile Ile Arg Arg Tyr Thr Tyr Asn Lys Ser Thr Asp Thr Leu | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | 115 | | | | | | 120 | | | | | 125 | |
| Glu Lys Pro Val Asp Leu Leu Ala Gly Leu Pro Ser Ser Lys Asp His | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | 130 | | | | | | 135 | | | | | 140 | |
| Gln Ser Gly Arg Leu Val Ile Gly Pro Asp Gln Lys Ile Tyr Tyr Thr | | | | | | | | | | | | | | | |

ES 2 807 530 T3

Phe Lys Ser Asn Asn Arg Tyr Arg Asp Val Ile Ala Ser Pro Asp Gly
 405 410 415

Asn Val Leu Tyr Val Leu Thr Asp Thr Ala Gly Asn Val Gln Lys Asp
 420 425 430

Asp Gly Ser Val Thr Asn Thr Leu Glu Asn Pro Gly Ser Leu Ile Lys
 435 440 445

Phe Thr Tyr Lys Ala Lys
 450

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

<220>
 <223> Secuencia del vector pACSGDH

<400> 3

cactaactga ttacgcaccg catgtaaccg ttttcaatct gtgagtaaata tcacagttta 60
 ttaacattgt gatagctatg atgacaacgt ttgtcgcact gtaactaacg tgtaacagtt 120
 agttgtcagt tttgctgggg tatttgcgtt ataaaaaccg ttatcacaat atcccgcgac 180
 taccggacaa aaataaagag ttgaataaga gcttatccca ttagggctat tttacttgcc 240
 attttgacc tgggcagtcg tcgccaaaac gcgttagcgt tttgaacgcg ctagcggcgg 300
 cccgaagggc gagcgtagcg agtcaaacct cacgtactac gtgtacgctc cggtttttgc 360
 gcgctgtcgg tgtccaaact gctgcgcaa taacgcctgg tgggataggc tctaaatagc 420
 cttcggcgtt cagtaacacg cgtaaacgtg ctgaacagcc gggcattttt ttacgtata 480
 ccctacataa taaaaccgga gctaccatga ataagaaggt actgaccctt tctgccgtga 540
 tggcaagtct gttattcggc gcgcacgcgc atgccgcgca tgttcctcta actccatctc 600
 aatttgctaa agcgaatca gagaactttg acaagaaagt tattctatct aatctaaata 660
 agccgcacgc gttgttatgg ggaccagata atcaaatttg gttaactgag cgagcaacag 720
 gtaagattct aagagttaat ccagagtcgg gtagtgtaaa aacagttttt caggtaccag 780
 agattgtcaa tgatgctgat gggcagaatg gtttattagg ttttgccttc catcctgatt 840
 ttaaaaataa tccttatatc tatatttcag gtacatttaa aaatccgaaa tctacagata 900
 aagaattacc gaaccaaacg attattcgtc gttataocta taataaatca acagatacgc 960
 tcgagaagcc agtcgattta ttagcaggat taccttcacg aaaagacat cagtcaggtc 1020
 gtcttgcgat tgggccagat caaaagattt attatacagat tggtgaccaa gggcgtaacc 1080
 agcttgctta tttgttcttg ccaaatcaag cacaacatac gccaaactca caagaactga 1140

ES 2 807 530 T3

atggtaaaga ctatcacacc tatatgggta aagtactacg cttaaactctt gatggaagta 1200
 ttccaaagga taatccaagt tttaacgggg tggttagcca tatttataca cttggacatc 1260
 gtaatccgca gggcttagca ttcactccaa atggtaaatt attgcagtct gaacaaggcc 1320
 caaactctga cgatgaaatt aacctcattg tcaaaggtgg caattatggt tggccgaatg 1380
 tagcaggtta taaagatgat agtggctatg cttatgcaaa ttattcagca gcagccaata 1440
 agtcaattaa ggatttagct caaaatggag taaaagtagc cgcaggggtc cctgtgacga 1500
 aagaatctga atggactggg aaaaactttg tcccaccatt aaaaacttta tataccgttc 1560
 aagataccta caactataac gatccaactt gtggagagat gacctacatt tgctggccaa 1620
 cagttgcacc gtcactctgcc tatgtctata agggcggtaa aaaagcaatt actggttggg 1680
 aaaatacatt attggttcca tctttaaacc gtggtgtcat tttccgtatt aagttagatc 1740
 caacttatag cactacttat gatgacgctg taccgatgtt taagagcaac aaccgttatc 1800
 gtgatgtgat tgcaagtcca gatgggaatg tcttatatgt attaactgat actgccgaa 1860
 atgtccaaaa agatgatggc tcagtaacaa atacattaga aaaccagga tctctcatta 1920
 agttcaccta taaggctaag taatacagtc gcattaaaaa accgatctat aaagatcggg 1980
 ttttttagtt ttagaaaaga attcactggc cgtcgtttta caacgctgtg actgggaaaa 2040
 ccctggcgtt acccaactta atcgccttgc agcacatccc cctttcgcca gctggcgtaa 2100
 tagcgaagag gcccgcaccg atcgccttcc ccaacagttg cgcagcctga atggcgaatg 2160
 gcgcctgatg cggatatttc tccttacgca tctgtgcggg atttcacacc gcatatggtg 2220
 cactctcagt acaatctgct ctgatgccgc atagttaagc cagccccgac acccgccaac 2280
 acccgctgac gcgccctgac gggcttgtct gctcccggca tccgcttaca gacaagctgt 2340
 gaccgtctcc gggagctgca tgtgtcagag gttttcaccg tcatcaccga aacgcgcgag 2400
 acgaaagggc ctctgtgatac gcctatTTTT ataggttaat gtcataataa taatggtttc 2460
 ttagacgtca ggtggcactt ttcggggaaa tgtgcgcgga acccctattt gtttattttt 2520
 ctaaatacat tcaaatatgt atccgctcat gagacaataa cctgataaa tgcttcaata 2580
 atattgaaaa aggaagagta tgagtattca acatttccgt gtcgccctta ttcctttttt 2640
 tgccgcattt tgccctcctg tttttgctca cccagaaacg ctggtgaaag taaaagatgc 2700
 tgaagatcag ttgggtgcac gagtgggtta catcgaactg gatctcaaca gcggtaagat 2760
 ccttgagagt tttcgccccg aagaacgttt tccaatgatg agcactttta aagttctgct 2820
 atgtggcgcg gtattatccc gtattgacgc cgggcaagag caactcggtc gccgcataca 2880
 ctattctcag aatgacttgg ttgagtactc accagtcaca gaaaagcatc ttacggatgg 2940
 catgacagta agagaattat gcagtgtctc cataaccatg agtgataaca ctgcccga 3000
 cttacttctg acaacgatcg gaggaccgaa ggagctaacc gcttttttgc acaacatggg 3060

ES 2 807 530 T3

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

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

10 <220>
 <223> cebador
 <400> 4

catttgctgg ccaggggttg caccgtcat 29

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

20 <220>
 <223> cebador
 <400> 5

| | | |
|----|--|-----------|
| | atgacgggtgc aaccocctggc cagcaaatg | 29 |
| | <210> 6 | |
| | <211> 20 | |
| 5 | <212> ADN | |
| | <213> Artificial | |
| | <220> | |
| | <223> cebador | |
| 10 | <400> 6 | |
| | ttaacgtgct gaacagccgg | 20 |
| 15 | <210> 7 | |
| | <211> 20 | |
| | <212> ADN | |
| | <213> Artificial | |
| 20 | <220> | |
| | <223> cebador | |
| | <400> 7 | |
| 25 | atatgggtaa agtactacgc | 20 |
| | <210> 8 | |
| | <211> 27 | |
| 30 | <212> ADN | |
| | <213> Artificial | |
| 35 | <220> | |
| | <223> cebador | |
| | <400> 8 | |
| 40 | cctataagaa aaagacagat acgctcg | 27 |
| | <210> 9 | |
| | <211> 27 | |
| 45 | <212> ADN | |
| | <213> Artificial | |
| | <220> | |
| | <223> cebador | |
| 50 | <400> 9 | |
| | cgagcgtatc tgtctttttc ttatagg | 27 |
| 55 | <210> 10 | |
| | <211> 24 | |
| | <212> ADN | |
| | <213> Artificial | |
| 60 | <220> | |
| | <223> cebador | |
| | <400> 10 | |

| | | |
|----|---|-----------|
| | ttccatcctc gagagattgt caat | 24 |
| | <210> 11 | |
| | <211> 25 | |
| 5 | <212> ADN | |
| | <213> Artificial | |
| | <220> | |
| | <223> cebador | |
| 10 | <400> 11 | |
| | attgacaatc tctctgagga tggaa | 25 |
| 15 | <210> 12 | |
| | <211> 34 | |
| | <212> ADN | |
| | <213> Artificial | |
| 20 | <220> | |
| | <223> cebador | |
| | <400> 12 | |
| 25 | cgttatacct ataagaaaaa gacagatagc ctgcg | 34 |
| | <210> 13 | |
| | <211> 34 | |
| | <212> ADN | |
| 30 | <213> Artificial | |
| | <220> | |
| | <223> cebador | |
| 35 | <400> 13 | |
| | cgagcgtatc tgtctttttc ttataggtat aacg | 34 |
| 40 | <210> 14 | |
| | <211> 28 | |
| | <212> ADN | |
| | <213> Artificial | |
| | <220> | |
| 45 | <223> cebador | |
| | <400> 14 | |
| 50 | aaaagaccat caggggtggtc tcgagaag | 28 |
| | <210> 15 | |
| | <211> 28 | |
| | <212> ADN | |
| | <213> Artificial | |
| 55 | <220> | |
| | <223> cebador | |
| | <400> 15 | |
| 60 | cttctcgaga ccaccctgat ggtctttt | 28 |
| | <210> 16 | |

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

5 <220>
 <223> cebador
 <400> 16

10 **gctcaaaatg gattaaaagt agccgca** **27**
 <210> 17
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> cebador
 <400> 17

20 **tgcggtact ttattccat tttgagc** **27**
 <210> 18
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> cebador
 <400> 18

30 **cogtattaag ttogatcaa cttatagc** **28**
 <210> 19
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> cebador
 <400> 19

40 **gctataagtt ggatogaact taatacgg** **28**
 <210> 20
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> cebador
 <400> 20

50 **ggtaaattat tgcagctcga tcatggccc** **29**
 <210> 21
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>

<223> cebador

<400> 21

5 gggccatgat cagactgcaa taatttacc

29

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un mutante de glucosa deshidrogenasa soluble dependiente de PQQ (s-GDH; EC 1.1.5.2) con especificidad mejorada por glucosa en comparación con maltosa, que tiene una sustitución de treonina en la posición 348 por glicina, alanina o bien serina, en el que dicho mutante comprende adicionalmente
- a) al menos una mutación para mejorar la estabilidad del mutante,
- 10 b) al menos una mutación para mejorar la afinidad del mutante por glucosa, en el que dicha mutación para mejorar la afinidad por glucosa se selecciona del grupo que consiste en L110H o Y; N229A, G o S; Q246H, M o N; Y333A; G339T; y V436P, y opcionalmente
- c) una o más mutaciones para mejorar además la especificidad del mutante por glucosa en comparación con maltosa, y
- 15 en el que estas posiciones corresponden a las posiciones aminoacídicas conocidas de la secuencia natural de s-GDH de *A. calcoaceticus* (SEQ ID NO: 2).
- 20 2. El mutante de s-GDH de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha sustitución para mejorar la afinidad por glucosa se selecciona del grupo que consiste en L110H, Q246H; G339T; y V436P.
3. El mutante de s-GDH de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que dicha mutación para mejorar la especificidad del mutante por glucosa en comparación con maltosa es una sustitución aminoacídica seleccionada del grupo que consiste en Q145P; D163G o N; Q164F; L169F; Y171G; I208L o V; T224I; E245D; G276S; A294D o E; V300A, S, N, Y o I; T307G; T323V; A354Y, E o L; R378I, M, A o D; N428P e inserción 429 P.
- 25 4. El mutante de s-GDH de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicha sustitución para mejorar la estabilidad se selecciona del grupo que consiste en D87R; N122K; S124K; S146G; V298L y L386F.
- 30 5. El mutante de s-GDH de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicha sustitución para mejorar la especificidad del mutante por glucosa en comparación con maltosa se selecciona del grupo que consiste en L169F; Y171G; E245D; N428P e inserción 429P.
- 35 6. Un polinucleótido aislado que codifica una proteína mutante de s-GDH de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
7. Un vector de expresión que comprende un polinucleótido aislado como se define en la reivindicación 6 enlazado de forma funcional a una secuencia promotora que puede promover la expresión de dicho polinucleótido en una célula huésped.
- 40 8. Una célula huésped que comprende el vector de expresión de la reivindicación 7.
9. Un procedimiento para producir mutantes de s-GDH que comprende cultivar la célula huésped de la reivindicación 8 en condiciones adecuadas para la producción de los mutantes enzimáticos.
- 45 10. Un vector de expresión que comprende un polinucleótido aislado como se define en la reivindicación 6 enlazado de forma funcional a una secuencia promotora que puede promover su expresión en un sistema de síntesis peptídica sin células.
- 50 11. Un procedimiento para producir mutantes de s-GDH con la construcción de 10 en un sistema de síntesis peptídica sin células en condiciones adecuadas para la producción de dichos mutantes enzimáticos.
12. Un procedimiento para detectar, determinar o medir glucosa en una muestra usando un mutante de s-GDH de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, comprendiendo dicha mejora poner en contacto la muestra con dicho mutante.
- 55 13. El procedimiento de la reivindicación 12 caracterizado además por que dicha detección, determinación o medición de glucosa se realiza usando un dispositivo sensor o de tira reactiva.
- 60 14. Un dispositivo para la detección o medición de glucosa en una muestra que comprende un mutante de s-GDH de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y otros reactivos requeridos para dicha medición.

Fig. 1

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

```

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

51 LRVNPESGSVKTQVPEIVNDADGQNGLLGFAPDFKNNPYIYISGTF 100
||||| ||| |||||
51 LRVNPVSGSAKTQVPEIVSDADGQNGLLGFAPDFKHNPIYIYISGTF 100

101 KNPKSTDKELPNQTIIRRYTYNKSTDTLEKPVDLLAGLPSSKDHQSGRLV 150
|||||
101 KNPKSTDKELPNQTIIRRYTYNKTTDTFEKPIDLIAGLPSSKDHQSGRLV 150

151 IGPDQKIYYTIGDQGRNQLAYLFLPNQAQHTPTQQELNGKDYHTYMGKVL 200
|||||
151 IGPDQKIYYTIGDQGRNQLAYLFLSNQAQHTPTQQELNSKDYHTYMGKVL 200

201 RLNLDGSIKPDNPSFNGVVSHIYTLGHRNPQGLAFTPNGKLLQSEQGPNS 250
|||||
201 RLNLDGSIKPDNPSFNGVVSHIYTLGHRNPQGLAFAPNGKLLQSEQGPNS 250

251 DDEINLIVKGGNYGWPVAGYKDDSGYAYANYSAAANKS.IKDLAQNQGVK 299
|||||:|||||
251 DDEINLVKGGNYGWPVAGYKDDSGYAYANYSAAATNKSQIKDLAQNQGIK 300

300 VAAGVPVTKSEWGTGKNFVPLKTLTYVQDTYNYNDPTCGEMTYICWPTV 349
|| |||
301 VATGVPVTKSEWGTGKNFVPLKTLTYVQDTYNYNDPTCGEMAYICWPTV 350

350 APSSAYVYKGGKKAITGWENTLLVPSLKRGVIFRIKLDPTYSTTYDDAVP 399
||||| ||| |||
351 APSSAYVYKGGKKAIPGWENTLLVPSLKRGVIFRIKLDPTYSTTLDDAIP 400

400 MFKSNNRYRDVIASPDGNVLYVLTDTAGNVQKDDGSVTNTLENPGSLIKF 449
|||||:|| |||
401 MFKSNNRYRDVIASPEGNTLYVLTDTAGNVQKDDGSVTHLENPGSLIKF 450

450 TYKAK 454
|| |
451 TYNGK 455

```

Fig. 2

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

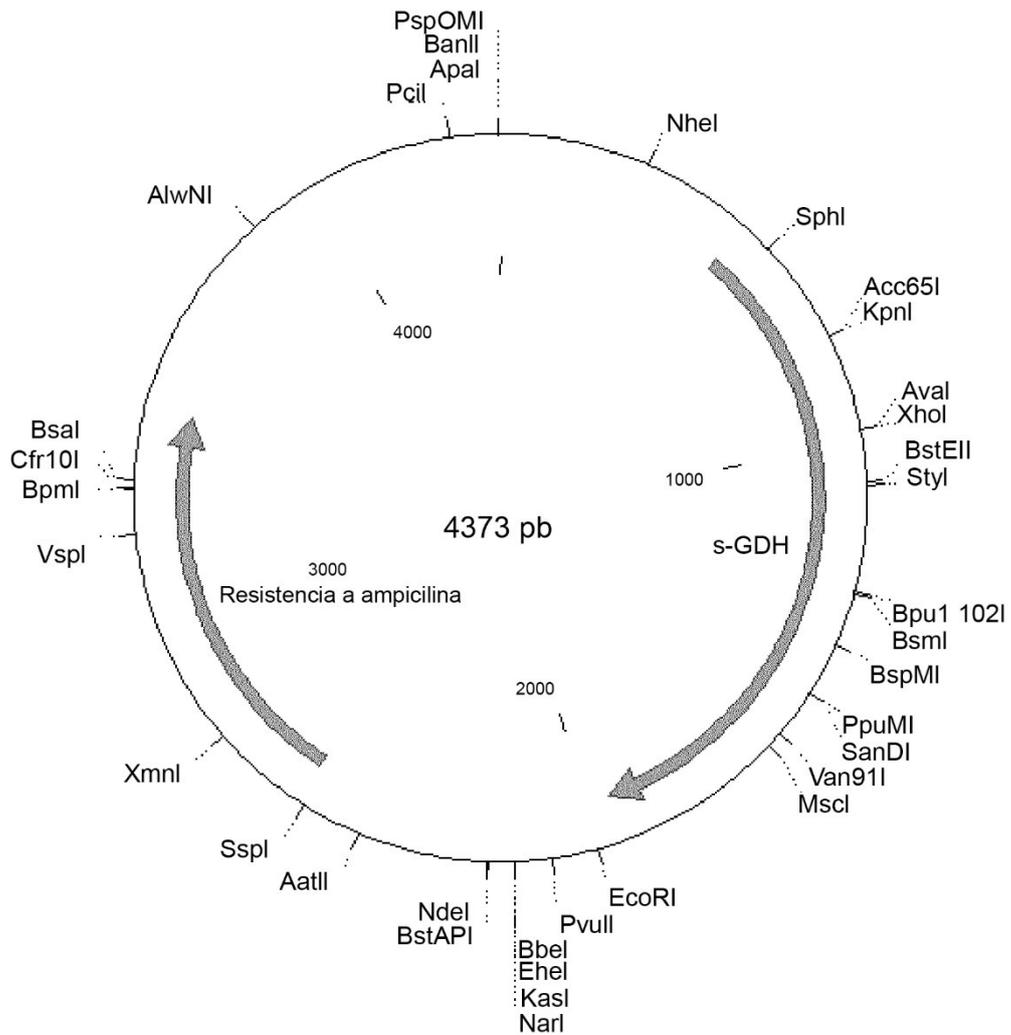


Fig. 3a

Secuencia del vector pACSGDH

```

cactaactga ttacgcaccg catgtaaccg ttttcaatct gtgagtaaat tcacagttta 60
ttaacattgt gatagctatg atgacaacgt ttgtcgcact gtaactaacg tgtaacagtt 120
agttgtcagt tttgctgggg tatttgcgct ataaaaaccg ttatcacaat atcccgcgac 180
taccggacaa aaataaagag ttgaataaga gcctatccca ttagggtat tttacttgcc 240
atthttggacc tgggcagtg cgcctaaaac gcgttagcgt tttgaacgcg ctageggcgg 300
cccgaagggc gagcgtagcg agtcaaacct cacgtactac gtgtacgctc cgggtttttgc 360
gcgctgtccg tgtccaaact gctgcgcca taacgcctgg tgggatagc tctaaatacg 420
cttcggcggt cagtaacacg cgttaacgtg ctgaacagcc gggcattttt ttacgctata 480
ccctacataa taaaaccgga gctaccatga ataagaaggt actgaccctt tctgccgtga 540
tggcaagtct gttattcggc gcgcacgcgc atgccgccga tgttcctcta actccatctc 600
aatttgctaa agcgaatca gagaactttg acaagaaagt tattctatct aatctaaata 660
agccgcacgc gttgttatgg ggaccagata atcaaatgg gttactgag cgagcaacag 720
gtaagattct aagagttaat ccagagtcgg gtagtgtaa aacagttttt caggtaccag 780
agattgtcaa tgatgctgat gggcagaatg gtttattagg ttttgccttc catcctgatt 840
ttaaaaataa tccttataatc tatatttcag gtacatttaa aaatccgaaa tctacagata 900
aagaattacc gaaccaaaccg attattcgtc gttataccta taataaatca acagatacgc 960
tcgagaagcc agtcgattta ttacgaggat tacctcacc aaaagaccat cagtcaggtc 1020
gtcttgctat tgggccagat caaaagattt attatacgat tggtgacca gggcgtaacc 1080
agcttgctta tttgttcttg ccaaatcaag cacaacatac gccaaactca caagaactga 1140
atggtaaaga ctatcacacc tatatgggta aagtactacg cttaaactct gatggaagta 1200
ttccaaagga taatccaagt tttaacgggg tggttagcca tatttataca cttggacatc 1260
gtaatccgca gggcttagca ttactccaa atggtaaatt attgcagtct gaacaaggcc 1320
caactctga cgatgaaatt aacctcattg tcaaaggtgg caattatggt tggccgaatg 1380
tagcaggtta taaagatgat agtggtatg cttatgcaa ttattcagca gcagccaata 1440
agtcaattaa ggatttagct caaaatggag taaaagtagc cgcaggggtc cctgtgacga 1500
aagaatctga atggactggg aaaaactttg tcccaccatt aaaaacttta tataccgttc 1560
aagataccta caactataac gatccaactt gtggagagat gacctacatt tgcgtggcca 1620
cagttgcacc gtcactctgcc tatgtctata agggcggtaa aaaagcaatt actggttggg 1680
aaaatacatt attggttcca tctttaaacc gtggtgtcat tttccgtatt aagttagatc 1740
caacttatag cactacttat gatgacgctg taccgatgtt taagagcaac aaccgttatc 1800
gtgatgtgat tgcaagtcca gatgggaatg tcttatatgt attaactgat actgccggaa 1860
atgtccaaa agatgatggc tcagtaacaa atacattaga aaaccagga tctctcatta 1920
agttcaccta taaggctaag taatacagtc gcattaaaa accgatctat aaagatcgg 1980
tttttagtt tttagaaaaga atcactggc cgtcgtttta caacgctgtg actgggaaaa 2040
ccctggcggt acccaactta atcgccttg agcacatccc ctttcgcca gctggcgtaa 2100
tagcgaagag gccgcaccg atcgccttc ccaacagttg cgcagcctga atggcgatg 2160
gcgctgatg cggatatttc tccttacgca tctgtgcggt atttcacacc gcatatggtg 2220
cactctcagt acaatctgct ctgatgcgc atagttaagc cagccccgac acccgccaac 2280
accgctgac gcgcctgac gggcttgtct gctcccggca tccgcttaca gacaagctgt 2340
gaccgtctcc gggagctgca tgtgtcagag gtttccaccg tcatcaccga aacgcgcgag 2400
acgaaagggc ctctgatac gcctatthtt ataggttaat gtcatagata taatggtttc 2460
ttagacgtca ggtggcactt ttcggggaaa tgtgcgcgga acccctattt gtttattttt 2520
ctaaatacat tcaaatatgt atccgctcat gagacaataa ccctgataaa tgettcaata 2580
atattgaaaa aggaagagta tgagtattca acatttccgt gtcgccctta ttcccttttt 2640
tgccgcattt tgccctctctg tttttgctca ccagaaaacg ctgggtgaaag taaaagatgc 2700
tgaagatcag ttgggtgcac gagtgggtta catcgaactg gatctcaaca gcggtaagat 2760
ccttgagagt tttcgcctccg aagaacgttt tccaatgatg agcactttta aagttctgct 2820
atgtggcgcg gtattatccc gtattgacgc cgggcaagag caactcggtc gccgcataca 2880

```

Fig. 3b

```

ctattctcag aatgacttgg ttgagtactc accagtcaca gaaaagcatc ttacggatgg 2940
catgacagta agagaattat gcagtgctgc cataaccatg agtgataaca ctgcggccaa 3000
cttacttctg acaacgatcg gaggaccgaa ggagctaacc gcttttttgc acaacatggg 3060
ggatcatgta actcgccttg atcgttggga accggagctg aatgaagcca taccaaacga 3120
cgagcgtgac accacgatgc ctgtagcaat ggcaacaacg ttgcgcaaac tattaactgg 3180
cgaactactt actctagctt cccggcaaca attaatagac tggatggagg cggataaagt 3240
tgcaggacca cttctgcgct cggcccttcc ggctggctgg tttattgctg ataaatctgg 3300
agccggtgag cgtgggtctc gcggtatcat tgcagcactg gggccagatg gtaagccctc 3360
ccgtatcgta gttatctaca cgacggggag tcaggcaact atggatgaac gaaatagaca 3420
gatcgtgag ataggtgcct cactgattaa gcattggtaa ctgtcagacc aagtttactc 3480
atatatactt tagattgatt taaaacttca tttttaattt aaaaggatct aggtgaagat 3540
cctttttgat aatctcatga ccaaaatccc ttaacgtgag ttttcgttcc actgagcgtc 3600
agaccccgta gaaaagatca aaggatcttc ttgagatcct ttttttctgc gcgtaatctg 3660
ctgcttgcaa acaaaaaaac caccgctacc agcggtggtt tgtttgccgg atcaagagct 3720
accaactctt tttccgaagg taactggctt cagcagagcg cagataccaa atactgtcct 3780
tctagtgtag ccgtagttag gccaccactt caagaactct gtagcaccgc ctacatacct 3840
cgctctgcta atcctgttac cagtggctgc tgccagtggc gataagtcgt gtcttaccgg 3900
gttggactca agacgatagt taccggataa ggcgagcgg tcgggctgaa cgggggggtc 3960
gtgcacacag cccagcttgg agcgaacgac ctacaccgaa ctgagatacc tacagcgtga 4020
gctatgagaa agcgcacgc ttcccgaagg gagaaaggcg gacaggtatc cggtaagcgg 4080
cagggtcgga acaggagagc gcacgagggg gcttccaggg ggaaacgcct ggtatcttta 4140
tagtcctgct gggtttcgcc acctctgact tgagcgtcga tttttgtgat gctcgtcagg 4200
ggggcgagc ctatggaaaa acgccagcaa cgcggccttt ttacggttcc tggccttttg 4260
ctggcctttt gctcacaatgt tctttcctgc gttatcccct gattctgtgg ataaccgtat 4320
taccgccttt gagtgagctg ataccgctcg ccgcagccga acgacggggc ccg 4373

```