



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I482860 B

(45)公告日：中華民國 104 (2015) 年 05 月 01 日

(21)申請案號：098105120

(22)申請日：中華民國 98 (2009) 年 02 月 18 日

(51)Int. Cl. : C12N9/96 (2006.01)

C12N9/06 (2006.01)

C12Q1/32 (2006.01)

(30)優先權：2008/02/19

歐洲專利局

08003054.7

(71)申請人：福 赫夫曼 拉瑞奇股份有限公司 (瑞士) F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (CH)
瑞士(72)發明人：漢德爾 戴特 HEINDL, DIETER (DE) ; 洪恩 卡瑞納 HORN, CARINA (DE) ; 蓋
斯勒戴奇 克勞迪亞 GAESSLER-DIETSCH, CLAUDIA (DE) ; 洪斯 賀琴
HOENES, JOACHIM (DE)

(74)代理人：林志剛

(56)參考文獻：

WO 01/49247A2

WO 2007/012494A1

T. Nagao, et al., "Stability-increasing mutants of glucose dehydrogenase.", FEBS Letters, Aug. 1989, Vol.253, Number 1,2, page 113-116.

Min-Hung Liao & Dong-Hwang Chen, "Characteristics of magnetic nanoparticles-bound YADH in water/AOT/isooctane microemulsions.", J. Molecul. Catal. B: Enzymatics, 13 Sep. 2002, Vol.18 Issue 1-3, page 81-87.

審查人員：張榮興

申請專利範圍項數：32 項 圖式數：21 共 66 頁

(54)名稱

利用安定之輔酶使去氫酶安定之方法

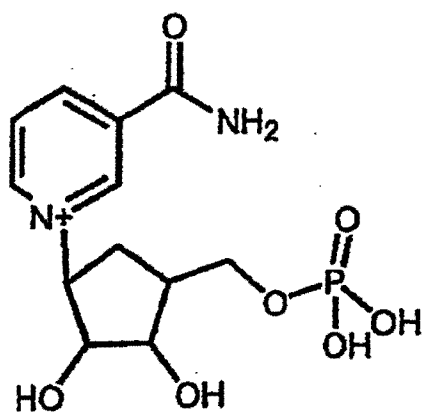
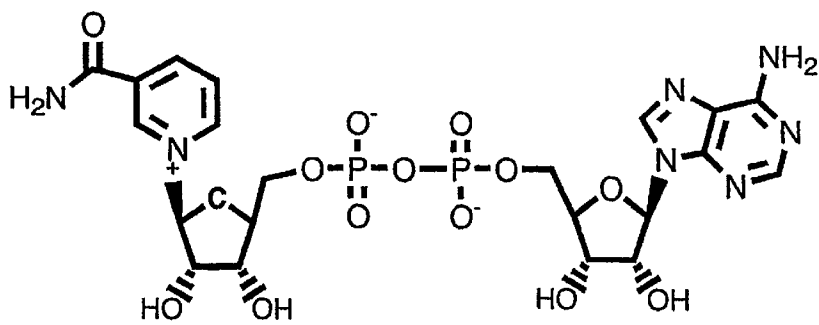
STABILIZATION OF DEHYDROGENASES WITH STABLE COENZYMES

(57)摘要

本發明關於一種藉由於安定之輔酶的存在下儲存酶使該酶安定之方法。本發明進一步關於被安定之輔酶所安定之酶及該酶於供偵測被分析物之測試元件中之用途。

The present invention relates to a method for stabilizing an enzyme by storing the enzyme in the presence of a stable coenzyme. The present invention further relates to an enzyme stabilized with a stable coenzyme, and to the use thereof in test elements for detecting analytes.

圖 1A



(I).

公告本

858646

發明專利說明書

(本申請書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：98105120

※申請日：98年02月18日

※IPC分類：

一、發明名稱：(中文／英文)

利用安定之輔酶使去氫酶安定之方法

Stabilization of dehydrogenases with stable coenzymes

C12N 9/96 (2006.01)
C12N 9/66 (2006.01)
C12Q 1/32 (2006.01)

二、中文發明摘要：

本發明關於一種藉由於安定之輔酶的存在下儲存酶使該酶安定之方法。本發明進一步關於被安定之輔酶所安定之酶及該酶於供偵測被分析物之測試元件中之用途。

三、英文發明摘要：

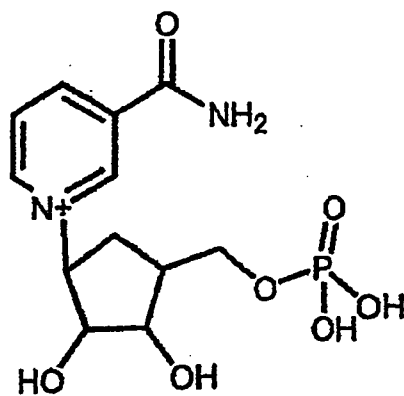
The present invention relates to a method for stabilizing an enzyme by storing the enzyme in the presence of a stable coenzyme. The present invention further relates to an enzyme stabilized with a stable coenzyme, and to the use thereof in test elements for detecting analytes.

四、指定代表圖：

(一) 本案指定代表圖為：第(1A)圖。

(二) 本代表圖之元件符號簡單說明：無

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：



(I).

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明關於一種藉由於安定之輔酶的存在下儲存酶使該酶安定之方法。本發明進一步關於被安定之輔酶所安定之酶及該酶於偵測被分析物之測試元件中之用途。

【先前技術】

生化測量系統係臨床相關分析方法之重要構成成分。此處之優先係測量被分析物(例如代謝物或受質)，該等被分析物係直接或間接地藉由酶之幫助而被測定。於此情況下，該等被分析物係藉由酶-輔酶複合物之幫助而被轉化且隨後被定量。該轉化需要欲被測定之被分析物與適當之酶和輔酶接觸且通常使用催化用量之該酶。藉由該酶催化反應使該輔酶改變(例如被氧化或被還原)。透過媒質可直接或電化學或光測地偵測此反應過程。校準(calibration)提供該測量與欲被測定之被分析物濃度間的直接關係。

輔酶係與酶共價或非共價鍵結且為被分析物之轉化反應而改變之有機分子。輔酶之顯著實例分別為菸鹼胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)和菸鹼胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADP)，且藉由還原反應自該 NAD 和 NADP 分別生成 NADH 和 NADPH。

值得注意的是先前技藝所習知之測量系統係於有限期間及環境之特殊要求(諸如冷卻或乾燥儲存)下呈安定以達到所需之安定性。因此，於特殊應用(例如最終使用者本

身所進行之測試，諸如例如血糖之自我監測)上，經由不正確、未受注意之錯誤儲存而產生不正確的結果係可能的。特別是主要包裝打開太久所導致之乾燥劑耗盡可能會致使產生錯誤之測量，該錯誤之測量經由某些系統可能幾乎不被使用者確認。

一種用於增加生化測量系統之安定性的習知手段係使用安定之酶，例如使用源自嗜熱性生物體之酶。另一可能性係藉由化學修飾(例如交聯)或發生突變使酶安定。此外，亦可加入酶安定劑(諸如例如海藻糖、聚乙烯吡咯啉酮及血清白蛋白)或藉由例如光聚合反應可將酶包封於聚合物網絡中。

亦業已嘗試使用安定之媒質以改善生化測量系統之安定性。因此，經由使用氧化還原電勢儘可能低之媒質，使測試之專一性增加且反應期間之干擾消失。然而，酶/輔酶複合物之氧化還原電勢形成媒質之氧化還原電勢的較低限制。低於此等電勢下，與媒質之反應速率減緩或甚至停止。

使用不含有媒質之生化測量系統亦是一種可替代之可能，其中例如直接偵測輔酶(例如輔酶 NADH)。然而，該測量系統之一個不利處在於輔酶(諸如 NAD 和 NADP)之不安定性。

NAD 和 NADP 係遇鹼不安定之分子且彼等之降解途徑係描述於文獻(N.J.Oppenheimer, The Pyridine Nucleotide Coenzymes, Academic Press New York, London 1982,

J.Everese, B.Anderson, K.You 等編輯，第 3 章，第 56-65 頁)中。經由切割核糖單元與吡啶單元間之糖基鍵聯，NAD 和 NADP 之降解本質上分別產生 ADP-核糖。另一方面，還原型式 NADH 和 NADPH 係遇酸不安定：例如差向異構化係一種習知之降解途徑。對該兩種情況，NAD/NADP 和 NADH/NADPH 之不安定性係出自該核糖單元與吡啶單元間之糖基鍵聯的不穩定性。然而，即使在非嚴峻之條件下(諸如例如於水溶液中)，該等輔酶 NAD 和 NADP 經由周遭濕氣係分別被完全水解。此不安定性可能導致被分析物之測量不正確。

許多 NAD/NADP 衍生物係描述於例如文獻 B.M.Anderson, The Pyridine Nucleotide Coenzymes, Academic Press New York, London 1982, J.Everese, B.Anderson, K.You 等編輯，第 4 章中。然而，大多數該等衍生物並未被酶完全接受。因此，迄今已被用於診斷測試之唯一衍生物係 3-乙醯基吡啶腺嘌呤二核苷酸(乙醯基 NAD)，該化合物最先係於西元 1956 年被揭露(參閱文獻 N.O.Kaplan, J.Biol.Chem. (1956), 221, 823)。同時，該輔酶顯現不佳之酶接受性及氧化還原電勢之改變。

WO 01/94370 描述使用含有經修飾之吡啶基的其他 NAD 衍生物。然而，修飾菸醯胺基通常對催化反應有直接的影響。對大多數之情況，該影響係負面的。

於另一安定化概念中，該核糖單元已經改變以因此影響該糖基鍵聯之安定性。此方法並未直接干擾該菸醯胺基

之催化反應。然而，一旦該酶對該核糖單元顯現強且專一之結合，則可能存有間接影響。對此，Kaufmann et al.分別於文獻 WO 98/33936 和 US 5,801,006 以及 WO 01/49247 中揭示許多硫核糖-NAD 衍生物。然而，迄今尚未揭露對該菸鹼胺-核糖單元之修飾作用與該等衍生物於酶催化反應中之活性間之關係。

CarbaNAD(即一種不含有糖基鍵聯之衍生物)最先係於西元 1988 年被揭露(參閱文獻 J.T.Slama, Biochemistry 1989, 27, 183 和 Biochemistry 1989, 28, 7688)。其中之核糖係被碳環型糖單元替代。雖然 carbaNAD 被描述為去氫酶之受質，但是該 carbaNAD 於許多生化偵測方法中之活性迄今尚未於臨床上被證實。

為利用亞甲基雙磷酸酯化合物替代天然之焦磷酸以製備 carbaNAD，一種類似之方法稍後係描述於文獻 G.M.Blackburn, Chem.Comm., 1996, 2765 中。該亞甲基雙磷酸酯顯現對磷酸酶增加之安定性並作為 ADP-核糖基環化酶之抑制劑。水解反應安定性之增加並不是目標(參閱文獻 J.T.Slama, G.M.Blackburn)。

WO 2007/012494 和 US 11/460,366 分別揭示安定之 NAD/NADH 和 NADP/NADPH 衍生物、彼等衍生物之酶複合物及彼等酶複合物於生化偵測方法和試劑套組中之用途。

【發明內容】

本發明所基於之目標係提供使酶安定之方法，特別係使酶長期安定之方法。

達成此目標係藉由一種使酶安定之方法，其中係於安定之輔酶的存在下儲存該酶。已令人驚訝地發現藉由安定之輔酶的幫助，於高相對濕度或甚至於液相中且於升高之溫度下，數周或數月之長期安定係可能的。此認知係令人驚訝的，因為習知的是雖然多數酶於天然之輔酶的存在下具有增加之短期安定性達數小時(參閱文獻 Bertoldi et al., Biochem.J.389,(2005), 885-898 ; van den Heuvel et al., J.Biol.Chem.280(2005), 32115-32121 ; 及 Pan et al., J.Chin.Biochem.Soc.Vol.3(1974), pp.1-8)，但是該等酶經較長之時間後顯現較低之安定性(參閱文獻 Nutrition Reviews 36(1978), 251-254)。

與此等與先前技藝有關之認知相比較，令人驚訝的是酶於安定之輔酶的存在下比該酶於天然之輔酶的存在下具有顯著增加之長期安定性，特別係因為該安定之輔酶比該天然之輔酶具有與該酶較低之結合常數。

藉由本發明之方法所安定之酶係一種輔酶依賴性酶。適當之酶的實例係選自葡萄糖去氫酶(E.C.1.1.1.47)、乳酸去氫酶(E.C.1.1.1.27, 1.1.1.28)、蘋果酸去氫酶(E.C.1.1.1.37)、甘油去氫酶(E.C.1.1.1.6)、(乙)醇去氫酶(E.C.1.1.1.1)、 α -羥基丁酸去氫酶、山梨醇去氫酶或胺基酸去氫酶(例如 L-胺基酸去氫酶(E.C.1.4.1.5))之去氫酶。其他適當之酶分別為氧化酶(諸如例如葡萄糖氧化酶(E.C.1.1.3.4)或膽固醇

氧化酶 (E.C.1.1.3.6)) 和胺基轉移酶 (諸如例如天冬胺酸或丙胺酸胺基轉移酶)、5'-核苷酸酶或肌酸激酶。該酶較佳地係葡萄糖去氫酶。

已證實於本發明之方法中特別較佳的是使用經突變之葡萄糖去氫酶。本發明所使用之“突變體”一詞係指天然酶經基因修飾之變異體，該變異體與野生型酶相比較雖含有相同之胺基酸數目，但是具有經修飾之胺基酸序列，即該變異體與該野生型酶於至少一個胺基酸上係不同的。可藉由位置專一性或非位置專一性之方式導入突變，其中較佳的係藉由使用此技藝所習知之重組方法導入位置專一性突變，然而對特定要求和條件為適當的是於天然酶之胺基酸序列中產生至少一個胺基酸交換。與該野生型酶相比較，該突變體特別較佳地具有增加之熱安定性或水解安定性。

大體上，與對應之野生型葡萄糖去氫酶相比較，該經突變之葡萄糖去氫酶於其胺基酸序列中之任何位置上可包含一或多個經修飾之胺基酸。該經突變之葡萄糖去氫酶較佳地包括於野生型葡萄糖去氫酶之胺基酸序列的位置 96、170 及 252 中至少一者上之突變，其中特佳的是於位置 96 和 170 上突變之突變體及於位置 170 和 252 上突變之突變體。已證實有利的是除了此等突變外，該經突變之葡萄糖去氫酶未包含其他之突變。

原則上，該於位置 96、170 及 252 上之突變可包括導致野生型酶安定 (例如增加熱安定性或水解安定性) 之任何胺基酸交換。位置 96 上之突變較佳地包括以谷胺酸換甘

胺酸之胺基酸交換，然而對位置 170 較佳的是以谷胺酸換精胺酸或離胺酸之胺基酸交換，特別是以谷胺酸換離胺酸之胺基酸交換。位置 252 上之突變較佳地包括以離胺酸換亮胺酸之胺基酸交換。

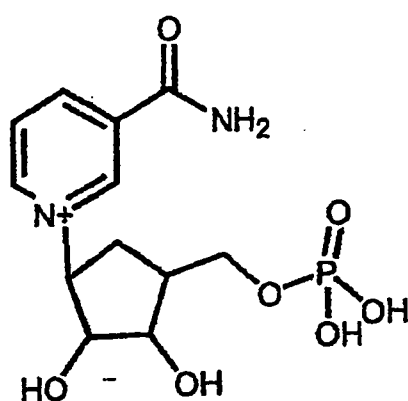
藉由使源自任何生物來源之野生型葡萄糖去氫酶發生突變可得到該經突變之葡萄糖去氫酶，其中於本發明中該“生物來源”包括原核生物(諸如例如細菌)和真核生物(諸如例如哺乳動物和其他動物)。該野生型葡萄糖去氫酶較佳地係源自細菌，特佳地係源自巨大芽胞桿菌(*Bacillus megaterium*)、枯草芽胞桿菌(*Bacillus subtilis*)或蘇力菌(*Bacillus thuringiensis*)之葡萄糖去氫酶，特別是源自枯草芽胞桿菌之葡萄糖去氫酶。

於本發明之一特佳體系中，該經突變之葡萄糖去氫酶係藉由使源自枯草芽胞桿菌之野生型葡萄糖去氫酶發生突變所得之葡萄糖去氫酶，其具有 SEQ ID No.1 所示之胺基酸序列(GlucDH_E96G_E170K)或 SEQ ID No.2 所示之胺基酸序列(GlucDH_E170K_K252L)。

該安定之輔酶係與天然之輔酶相比較已經化學修飾之輔酶且係比天然之輔酶具有較高之安定性(例如水解安定性)。該安定之輔酶較佳地係對測試條件下之水解作用呈安定。與天然之輔酶相比較，該安定之輔酶可具有降低之酶結合常數，例如降低因數為 2 或大於 2 之結合常數。

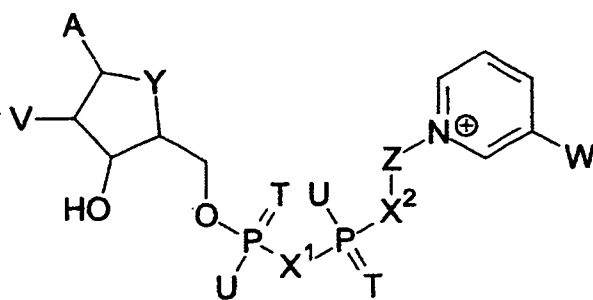
安定之輔酶的較佳實例係菸鹼胺腺嘌呤二核苷酸(NAD/NADH)或菸鹼胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADP/NADPH)

之安定衍生物或截短之 NAD 衍生物，例如不含有 AMP 部分或含有非核苷殘基(例如疏水性殘基)者。同樣較佳地於本發明中為安定之輔酶者係式(I)化合物：



(I)

NAD/NADH 和 NADP/NADPH 之較佳的安定衍生物係描述於上述之參考文獻中，該等參考文獻所揭示之內容係清楚地併入本文作為參考。特佳之經安定之輔酶係分別描述於 WO 2007/012494 和 US 11/460366 中，該等文獻所揭示之內容係清楚地併入本文作為參考。該安定之輔酶係特別較佳地選自通式(II)之化合物：



(II)

其中

A=腺嘌呤或其類似物，

T=各別獨立地 O 或 S，

U=各別獨立地 OH、SH、 BH_3^- 或 BCNH_2^- ，

V=各別獨立地 OH 或磷酸基，或兩個基所形成之環磷酸基，

W=COOR、CON(R)₂、COR 或 CSN(R)₂，其中 R=各別獨立地 H 或 C₁-C₂-烷基，

X¹，X²=各別獨立地 O、CH₂、CHCH₃、C(CH₃)₂、NH 或 NCH₃，

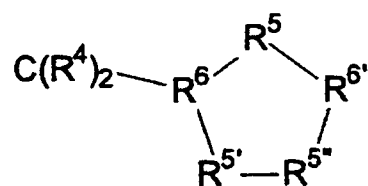
Y=NH、S、O 或 CH₂，

Z=直鏈或環狀有機基，唯其 Z 和該吡啶殘基並非藉由糖苷鍵聯連接，

或其鹽或適當之還原型式。

於該式(II)化合物中，Z 較佳地係具有 4 至 6 個碳原子(較佳地 4 個碳原子)之直鏈基(其中 1 或 2 個碳原子係可選擇地經一或多個選自 O、S 或 N 之雜原子替代)、或包括環狀基和 CR⁴₂ 基之基，其中該環狀基含有 5 或 6 個碳原子且可選擇地包含選自 O、S 或 N 之雜原子及可選擇地一或多個取代基，且其中 CR⁴₂ 係與該環狀基和 X² 基鍵結，其中 R⁴=各別獨立地 H、F、Cl 或 CH₃。

Z 特別較佳地係飽和或未飽和 5 員碳環或雜環，特別是通式(III)之化合物：



(III)

其中 $\text{R}^{5'}$ 與 $\text{R}^{5''}$ 之間可存有單鍵或雙鍵，

R^4 = 各別獨立地 H、F、Cl 或 CH_3 ，

$\text{R}^5 = \text{CR}^4_2$ ，

其中若 $\text{R}^{5'}$ 與 $\text{R}^{5''}$ 之間存在單鍵，則 $\text{R}^{5'} = \text{O}$ 、S、NH、 $\text{NC}_1\text{-C}_2$ -烷基、 CR^4_2 、CHOH 或 CHOCH_3 ，且 $\text{R}^{5''} = \text{CR}^4_2$ 、CHOH 或 CHOCH_3 ，且

其中若 $\text{R}^{5'}$ 與 $\text{R}^{5''}$ 之間存在雙鍵，則 $\text{R}^{5'} = \text{R}^{5''} = \text{CR}^4$ ，且

R^6 、 $\text{R}^{6'}$ = 各別獨立地 CH 或 CCH_3 。

於一較佳體系中，本發明之化合物包含腺嘌呤或腺嘌呤類似物，諸如例如 C_8 -和 N_6 -經取代之腺嘌呤、去氮變異體（諸如 7-去氮變異體）、氮變異體（諸如 8-氮變異體）或組合變異體（諸如 7-去氮或 8-氮變異體）、或碳環類似物（諸如間型黴素），然而該 7-去氮變異體於第 7 位置上可經鹵素、 $\text{C}_1\text{-C}_6$ -炔基、-烯基或-烷基取代。

於另一較佳體系中，該等化合物包含腺苷類似物，其分別包含替代核糖之例如 2-甲氧基去氧核糖、2'-氟去氧核糖、己糖醇、阿卓糖醇 (altritol) 及多環類似物，諸如雙環-、LNA-及三環-糖類。

特別於該式(II)化合物中，(二)磷酸之多個氧亦可等滲地被替代，諸如例如 O^- 分別被 S^- 和 BH_3^- 替代、 O 分別被 NH 、 NCH_3 及 CH_2 替代及 $=O$ 被 $=S$ 替代。

於本發明之式(II)化合物中， W 較佳地係 $CONH_2$ 或 $COCH_3$ 。

於式(III)化合物中， R^5 較佳地係 CH_2 。進一步較佳的是 $R^{5'}$ 選自 CH_2 、 $CHOH$ 或 NH 。於一特定較佳體系中， $R^{5'}$ 和 $R^{5''}$ 皆為 $CHOH$ 。再於另一較佳體系中， $R^{5'}$ 係 NH 且 $R^{5''}$ 係 CH_2 。較佳的經安定之輔酶的特定實例係示於圖 1A 和 1B。

於最適之體系中，該安定之輔酶係 *carba*NAD。

本發明之方法係特別適合酶之長期安定。此意謂著被安定之輔酶所安定之酶，當例如以乾燥物儲存達例如至少 2 週(較佳地至少 4 週且特佳地至少 8 週)之期間，顯現相對於起初之酶活性，酶活性衰退較佳地低於 50%，特佳地低於 30% 且最佳地低於 20%。

本發明之方法進一步包括於升高之溫度(例如於至少 20°C 之溫度，較佳地至少 25°C 之溫度且特佳地至少 30°C 之溫度)下儲存被安定之輔酶所安定之酶。於此情況下，相對於起初之酶活性，酶活性衰退較佳地係低於 50%，特佳地係低於 30% 且最佳地係低於 20%。

藉由本發明之安定化方法，如上所述般甚至於不存有乾燥劑之情況下可長期儲存被安定之輔酶所安定之酶及 / 或如上所述般可於高溫下儲存被安定之輔酶所安定之酶。

進一步，被安定之酶亦可於高相對濕度(例如至少 50%之相對濕度)下儲存，對此相對於起初之酶活性，酶活性衰退較佳地係低於 50%，特佳地係低於 30%且最佳地係低於 20%。

一方面可以乾燥物之型式且另一方面可以液態之型式儲存被安定之輔酶所安定之酶。較佳地係於適用於測定被分析物之測試元件上或其中儲存該被安定之酶。對此，被安定之輔酶所安定之酶較佳地係偵測試劑之成分，該偵測試劑適當地亦可包含其他成分，諸如例如鹽、緩衝劑等。於此情況下，該偵測試劑較佳地不含有媒質。

被安定之輔酶所安定之酶可被用於偵測被分析物，例如分別是體液(諸如例如血液、血清、血漿或尿液)及污穢物樣品或食品之參數。

可被測定之被分析物係可藉由氧化還原反應加以測定之任何生物或化學物質，例如係輔酶依賴性酶之受質的物質或本身係輔酶依賴性酶之物質。被分析物之較佳實例係葡萄糖、乳酸、蘋果酸、甘油、醇、膽固醇、甘油三酸酯、抗壞血酸、半胱胺酸、谷胱甘肽、肽、脲、鉍、水楊酸、丙酮酸、5'-核苷酸酶、肌酸激酶(CK)、乳酸去氫酶(LDH)、二氧化碳等。該被分析物較佳地係葡萄糖。

本發明之另一較佳體系關於本發明之化合物或依據本發明的被安定之輔酶所安定之酶於藉由酶催化反應偵測樣品中的被分析物之用途。對此，特佳的是藉由利用葡萄糖去氫酶(GlucDH)以偵測葡萄糖。

原則上可以任何方式偵測安定之輔酶藉由與被分析物反應而產生之變化。於本發明中，對偵測酶催化反應，原則上可使用所有自先前技藝所習知之方法。然而，較佳地係藉由光學方法偵測輔酶之變化。光學偵測方法包括例如測量吸光性、螢光、圓振二向色性(CD)、旋光色散(ORD)、折射性等。

較佳地用於本發明之一種光學偵測方法係光測法。然而，光度測量輔酶因與被分析物反應所產生之變化需要額外存在至少一種媒質，該媒質增加被還原之輔酶的反應性且使電子可被轉移至適當之光學指示劑或光學指示劑系統上。

適合本發明之目的的媒質特別係亞硝基苯胺類(諸如例如[(4-亞硝基苯基)亞胺基]二甲醇氫氧化物)、醌類(諸如例如菲醌類、菲繞啉醌類或苯並[h]喹啉醌類)、吩嗪類(諸如例如 1-(3-羧基丙氧基)-5-乙基三氟甲磺酸吩嗪鎢)、或/及心肌黃酶(EC 1.6.99.2)。菲繞啉醌類之較佳實例包括 1,10-菲繞啉-5,6-醌類、1,7-菲繞啉-5,6-醌類、4,7-菲繞啉-5,6-醌類及彼等之 N-烷基化和 N,N'-二烷基化鹽類，且分別對 N-烷基化和 N,N'-二烷基化鹽類之情況較佳地係作為增加溶解性之鹵化物、三氟甲磺酸鹽或其他陰離子之抗衡離子。

可使用可被還原且於還原過程中光學性質(諸如例如顏色、螢光、反射性、透射率、偏極化或/及折射率)之改變可被偵測之任何物質以作為光學指示劑或光學指示劑系

統。可藉由肉眼或 / 及利用熟習此技藝之人士視為適當之光測方法的偵測裝置測定樣品中被分析物是否存在或 / 及其量。

較佳地使用雜多酸且特別是 2,18-磷鉬酸作為光學指示劑且彼等係被還原為對應之雜多藍(heteropoly blue)。

特佳地係藉由測量螢光以偵測輔酶之變化。螢光測量具高度敏感性且甚至可於小型化系統中偵測低濃度之被分析物。

利用適當之測試元件(諸如例如電化學測試條)以偵測輔酶電化學上的變化亦是一種可替代之可能。對此，先決條件再次係使用適當之媒質，其可藉由電子轉移被還原之輔酶轉化為還原型式。藉由測量使被還原之媒質再氧化所需之電流以測定被分析物且該電流係與樣品中被分析物之濃度有關。可供電化學測量使用之媒質的實例包括特別是上述供光測測量所使用之媒質。

可使用液態測試以偵測被分析物，其中試劑係例如呈水溶性或非水溶性液體之溶液或懸浮液型式或為粉末或冷凍乾燥物。然而，亦可使用乾燥測試，其中試劑係被施於載體(測試條)上。該載體可包括例如測試條，該測試條包括吸收劑或 / 及可膨脹材料，該可膨脹材料係藉由待分析之樣品液潤濕。

一種特佳之測試型式包括使用葡萄糖去氫酶和適當之 NAD 衍生物以偵測葡萄糖，其中生成被還原之輔酶 NADH 之衍生物。藉由光學方法(例如經紫外線(UV)激發後之光

度測定或螢光測定)偵測 NADH。一種特佳之測試系統係描述於作為本文之特別文獻 US 2005/0214891 中。

進一步，本發明亦關於被安定之輔酶所安定之酶，其中被安定之酶於較佳地至少 20°C (特佳地至少 25°C 且最佳地至少 30°C) 之溫度下顯現儲存較佳地達至少 2 週 (特佳地達至少 4 週且最佳地達至少 8 週)，其中適當地於高濕度且不存在乾燥劑下，與起初之酶催化活性相比較，酶催化活性之衰退係低於 50%，較佳地低於 30% 且最佳地低於 20%。

進一步，本發明亦關於一種用於測定被分析物之偵測試劑，其包含上述被安定之輔酶所安定之酶。另外，本發明關於一種測試元件，其包含分別依據本發明之被安定之酶和依據本發明之偵測試劑。該偵測試劑和測試元件可適於分別實施乾燥試驗或液態試驗。該測試元件較佳地係供被分析物之螢光測定偵測或光度測定偵測之測試條。該測試條包含被安定之輔酶所安定且被固定於吸收劑或/及可膨脹材料(諸如例如纖維素、塑料等)上之酶。

本發明將藉由下述之圖式和實施例加以更為詳細地說明。

【實施方式】

實施例 1

將 Carba-NAD(圖 1A)或 NAD 加入至對葡萄糖專一之 GlucDH 中。將此等調製物各別施加至 Pokalon 膜(Lonza)

上並經乾燥後儲存於溫熱且潮濕之條件(32℃, 85%相對濕度)下。隨後於定期之時間間隔下測定反應動力學和函數圖形。於每個測量時間點同時進行 cNAD/NAD 分析及測定酶之殘餘活性。

第 1 天所測定之 NAD 動力學圖(圖 2A)和 cNAD 動力學圖(圖 2B)係可相比較的且亦顯示對葡萄糖依賴性之類似上升。然而, 經 5 週後動力學圖上之清楚差異係明顯的。雖然 NAD 之動力學(圖 2C)於動態上大為降低, 但是被 cNAD 安定之酶的動力學實質上仍保持未變(圖 2D)。

由圖 3 明顯可知, 於空白值(於施加血液樣品前之乾燥空白值)上亦存有明顯差異。NAD 之乾燥空白值上升可歸因於螢光粒子之生成(Oppenheimer(1982), 如上述)。令人驚訝地, 此現象並未發生於 cNAD 上。

比較圖 4 和 5 亦明顯可知, 葡萄糖去氫酶分別於 NAD 和 cNAD 之存在下係呈不同之安定性。經 5 週後, 被 cNAD 安定之酶的函數圖仍呈一串先前之測量值(圖 5A), 然而經 NAD 處理之酶的圖(圖 4)呈現於較高濃度下掉落, 該掉落係酶/輔酶量太低之一種典型訊號。圖 5B 顯示被 cNAD 安定之葡萄糖去氫酶於 24 週期間之各種不同函數圖。對此, 清楚可知於整個期間該酶之功能僅於高葡萄糖濃度下呈現些微之變化且於 24 週後約略對應於經 5 週後所得到之值。

輔酶之結構與其經預定期間後之安定性間的關係係清楚地示於圖 6。依據圖 6, 經儲存(於 32℃ 和 85%相對濕度

下)24 週後，葡萄糖偵測試劑中 cNAD 之殘餘量仍達起初量之約 80%，然而僅經 5 週後，經 NAD 安定之葡萄糖偵測試劑中 NAD 之量衰減至起初量之約 35%且藉由外插法得知經約 17 週後將衰減至 0。

於 32℃ 和 85%相對濕度下，活性 GlucDH 經 5 週後之殘餘活性的測定結果(圖 7A)係十分令人驚訝的。被 NAD 安定之酶現今僅顯現極低之酶活性(0.5%)，然而被 cNAD 安定之酶仍顯現 70%之殘餘活性(每個情況係藉由與儲存於冰箱中且於乾燥劑下之樣品相比較)。於 32℃ 和 85%相對濕度下經 24 週後(圖 7B)，被 cNAD 安定之酶的殘餘活性仍呈約 25%。

若使用突變體以替代源自枯草芽胞桿菌之野生型酶，更進一步增加 GlucDH 之殘餘活性係可能的。於 32℃ 和 85%相對濕度下且於 cNAD 之存在下經儲存 24 週後，突變體 GlucDH_E96G_E170K(GlucDH-Mut1；野生型酶第 96 位置上之谷胺酸→甘胺酸的胺基酸替代及第 170 位置上之谷胺酸→離胺酸的胺基酸替代)之殘餘活性係約 70%，然而突變體 GlucDH_E170K_K252L(GlucDH-Mut2；野生型酶第 170 位置上之谷胺酸→離胺酸的胺基酸替代及第 252 位置上之離胺酸→亮胺酸的胺基酸替代)之殘餘活性係約 50%(圖 8)。

葡萄糖去氫酶於 SDS 凝膠上之凝膠電泳分析(圖 9 和 10)亦清楚顯示分別於 NAD 之存在下與於 cNAD 之存在下的儲存差異性。雖然於 32℃ 和 85%相對濕度下且於 cNAD

之存在下經儲存 5 週後，該酶~~仍~~然可被鑑別(呈現具有所預期之移動性的帶)，但是於 NAD 之存在下所儲存之酶完全消失(圖 9)。由圖 10，於相同時間下，清楚可知被 NAD 安定且儲存於 50℃ 下之酶的帶隨著儲存時間增加而變得較弱且於 476 小時後實質上消失，然而於 cNAD 之存在下經儲存之酶的對應帶與實驗開始時所偵測之帶相比較僅顯現些微之改變。

此結果亦可由液相儲存加以證實(圖 11A 和 11B)。於 50℃ 下經 95 小時後，葡萄糖去氫酶於天然之輔酶 NAD 的存在下之殘餘活性係 $\approx 5\%$ ，然而 GlucDH 於人造輔酶 cNAD 之存在下的殘餘活性係 75%(圖 11A)。於 50℃ 下經儲存 336 小時後，被 NAD 安定之酶的殘餘活性現今僅約 1%；於 cNAD 之存在下經儲存之酶的殘餘活性仍然係約 70%。對應之 SDS 凝膠同樣地顯示於天然之輔酶 NAD 的存在下 GlucDH 帶之改變：新帶出現於較大分子量區且 30 kDa 帶發生位移。

整體而言，輔因子之安定化作用同時致使酶之安定化且不僅是經由該酶之較佳黏合的協同功效係十分令人驚訝之結果。輔因子 NAD 之分解對酶 GlucDH 之安定性具有負面作用且事實上加速該酶失去活性。藉由人造類似物替代天然之 NAD 允許 GlucDH 儲存於應激條件(例如升高溫度)下且甚至於輔因子之存在下。

利用此系統可製造具有顯著改良之安定性的血糖測試條，且該血糖測試條可於不含有乾燥劑下存在。

實施例 2

將 cNAD 或 NAD 加入至醇偵測溶液中。令該等混合物儲存於 35℃ 下。於定期之時間間隔下檢驗酶之安定性並測定該酶之殘餘活性。

再次，於 SDS 凝膠上之凝膠電泳分析(圖 12 和 13)顯示分別於 NAD 和 cNAD 之存在下儲存之差異性。因此，分別於 6℃ 和 35℃ 下經儲存 65 小時後，被 cNAD 安定之(乙)醇去氫酶的帶僅些微不同，該結果說明該酶被人造輔酶安定化。相比較下，於 NAD 之存在下儲存於 35℃ 下之酶的帶已完全消失(圖 12)。

進一步由圖 13 清楚可知，被 NAD 安定且儲存於 35℃ 下之酶的帶係隨著儲存時間之增加而變得較弱且經 5 天後已幾乎完全消失。被 cNAD 安定之酶於 35℃ 下經儲存 6 天後所偵測之帶顯示明顯較少之酶分解及因此增加之安定性。

此結果亦可由液相儲存加以證實(圖 14)。於天然之輔酶 NAD 的存在下且於 35℃ 下經 65 小時後，(乙)醇去氫酶之殘餘活性係約 6%，然而於人造輔酶 cNAD 之存在下該酶之殘餘活性係仍然約 60%。

實施例 3

為測定葡萄糖，對各種不同之測試系統進行光度測定或電化學測定，該等測試系統各別包括葡萄糖去氫酶、

NAD、媒質及適當之光學指示劑。

為進行光度測定，起初於各種不同之葡萄糖濃度下測試 4 個測試元件，該等測試元件已各別於室溫下儲存達 11 週且包含 2,18-磷鉬酸、葡萄糖去氫酶、NAD 及媒質。

由圖 15 清楚可知，對所使用之所有 4 種媒質(即[(4-亞硝基苯基)亞胺基]二甲醇氫氯化物(媒質 A)、1-甲基-5,6-二側氧基-5,6-二氫-1,10-三氟甲磺酸菲繞啉鎘(媒質 B)、7-甲基-5,6-二側氧基-5,6-二氫-1,7-三氟甲磺酸菲繞啉鎘(媒質 F)及 1-(3-羧基丙氧基)-5-乙基三氟甲磺酸吩嗪鎘(媒質 G))，隨著葡萄糖濃度之增加，觀察到反射率降低，因此上述該等媒質原則上係適合光度測定葡萄糖。

於 800 mg/dl 區域之高葡萄糖濃度下，分別使用[(4-亞硝基苯基)亞胺基]二甲醇氫氯化物和 1-(3-羧基丙氧基)-5-乙基三氟甲磺酸吩嗪鎘之被測樣品之反射率仍然係約 20%，此結果建議該兩種媒質係特別適合於使用葡萄糖去氫酶/NAD 系統之光度測量且因此亦特別適合於使用葡萄糖去氫酶/cNAD 系統之光度測量。於範圍 0 至 800 mg/dl 之葡萄糖濃度下，使用葡萄糖去氫酶、NAD、1-(3-羧基丙氧基)-5-乙基三氟甲磺酸吩嗪鎘及 2,18-磷鉬酸系統所進行之葡萄糖轉化的動力學結果係示於圖 16。

由圖 17 之圖示說明清楚可知，(額外)使用心肌黃酶作為中間媒質亦可進行葡萄糖之光度測量。圖 18 顯示對葡萄糖去氫酶、NAD、心肌黃酶、[(4-亞硝基苯基)亞胺基]二甲醇氫氯化物及 2,18-磷鉬酸系統(系統 1)，反射率之濃

度依賴性降低。作為比較之系統係葡萄糖染料氧化還原酶、吡咯並喹啉醌、[(4-亞硝基苯基)亞胺基]二甲醇氫氯化物及 2,18-磷鉬酸(系統 2)，該系統 2 同樣地造成反射率之濃度依賴性降低，但是因為葡萄糖染料氧化還原酶之低專一性而有些缺點。於範圍 0 至 800 mg/dl 之葡萄糖濃度下，使用系統 1 所進行之葡萄糖轉化的動力學結果係示於圖 19。

為測定被分析物，亦可使用電化學測量以作為光度測量之替代方法。因此，利用包含葡萄糖去氫酶、作為輔酶之 NAD 及作為媒質之 1-(3-羧基丙氧基)-5-乙基三氟甲磺酸吩嗪鎘之測試元件及包括安定之輔酶 cNAD 以替代 NAD 之對應系統，發現使被還原之媒質再氧化所需之電流係線性取決於葡萄糖濃度(圖 20)。

因此，已顯示藉由電化學偵測及利用不受輔酶影響之其他波長進行評估，亦可利用去氫酶/安定之輔酶系統測定被分析物。經使用安定之酶/輔酶對，應亦使整體調製物更為安定。

【圖式簡單說明】

圖 1A：描繪安定之輔酶 carba-NAD(cNAD)。

圖 1B：描繪安定之輔酶吡咯啉基-NAD。

圖 2：說明於儲存前後，分別於 NAD 和 cNAD 之存在下葡萄糖去氫酶之酶動力學。

2A：於 NAD 之存在下經 1 天後 GlucDH 之酶動力學

2B：於 cNAD 之存在下經 1 天後 GlucDH 之酶動力學

2C：於 NAD 之存在下經於 32℃ 和 85%相對濕度下儲存達 5 週後 GlucDH 之酶動力學。

2D：於 cNAD 之存在下經於 32℃ 和 85%相對濕度下儲存達 5 週後 GlucDH 之酶動力學。

圖 3：於 32℃ 和 85%相對濕度下經達 5 週之期間，分別於 NAD 之存在下和 cNAD 之存在下比較葡萄糖去氫酶之空白值。

圖 4：描繪葡萄糖去氫酶於 NAD 之存在下經於 32℃ 和 85%相對濕度下儲存後之各種不同函數圖。儲存時間係介於 1 天至 5 週。

圖 5：描繪葡萄糖去氫酶於 cNAD 之存在下經於 32℃ 和 85%相對濕度下儲存後之各種不同函數圖。儲存時間係分別介於 1 天至 5 週(圖 5A)和介於 1 天至 24 週(圖 5B)。

圖 6：描繪葡萄糖去氫酶分別於 NAD 和 cNAD 之存在下經於 32℃ 和 85%相對濕度下儲存 24 週後，NAD 和 cNAD 之殘餘量。

圖 7：描繪葡萄糖去氫酶分別於 NAD 和 cNAD 之存在下經於 32℃ 和 85%相對濕度下儲存分別達 5 週(圖 7A)和 24 週(圖 7B)後，葡萄糖去氫酶之活性。

圖 8：描繪野生型葡萄糖去氫酶(GlucDH-wt)、葡萄糖去氫酶雙重突變體 GlucDH_E96G_E170K(GlucDH-Mut1)及

葡萄糖去氫酶雙重突變體 GlucDH_E170K_K252L(GlucDH-Mut2)分別於 NAD 和 cNAD 之存在下經於 32℃ 和 83%相對濕度下儲存 25 週後，葡萄糖去氫酶之活性。

圖 9：說明葡萄糖去氫酶分別於 NAD 和 cNAD 之存在下經儲存後，藉由凝膠電泳分析葡萄糖去氫酶。測試條件：MW, 10-220 kDa 標記物；1:GlucDH/NAD, 5 週於 6℃ 下；2:GlucDH/NAD, 5 週於 32℃ /85%相對濕度下；3:GlucDH/cNAD, 5 週於 6℃ 下；4:GlucDH/cNAD, 5 週於 32℃ /85%相對濕度下。

圖 10：說明葡萄糖去氫酶分別於 NAD 和 cNAD 之存在下經於 50℃ 下儲存後，藉由凝膠電泳分析葡萄糖去氫酶。測試條件：MW, 10-220 kDa 標記物；1: GlucDH 8.5mg/ml, NAD, 0 小時；2:GlucDH 8.5mg/ml, NAD, 22 小時；3:GlucDH 8.5 mg/ml, NAD, 96 小時；4: GlucDH 8.5mg/ml, NAD, 118 小時；5:GlucDH 8.5mg/ml, NAD, 140 小時；6:GlucDH 8.5mg/ml, NAD, 188 小時；7:GlucDH 8.5mg/ml, NAD, 476 小時；8: GlucDH 8.5mg/ml, cNAD, 0 小時；9:GlucDH 8.5 mg/ml, cNAD, 188 小時；10:GlucDH 8.5mg/ml, cNAD, 476 小時。

圖 11：說明於液相中、於 50℃ 下且分別於 NAD 和 cNAD 之存在下分別達 4 天(圖 11A)和 14 天(圖 11B)後，葡萄糖去氫酶之安定性。測試條件：GlucDH 10 mg/ml；NAD 和 cNAD 分別為 12 mg/ml；緩衝液：0.1M Tris, 1.2M NaCl, pH 8.5；溫度 50℃。

圖 12：說明分別於 NAD 和 cNAD 之存在下經儲存後，藉由凝膠電泳分析酵母菌之(乙)醇去氫酶。測試條件：MW, 10-220kDa 標記物；1:ADH, 65 小時於 6℃ 下；2:ADH/cNAD, 65 小時於 6℃ 下；3:ADH/NAD, 65 小時於 6℃ 下；4: ADH, 65 小時於 35℃ 下；5: ADH/cNAD, 65 小時於 35℃ 下；6:ADH/NAD, 65 小時於 35℃ 下。

圖 13：說明分別於 NAD 和 cNAD 之存在下經於 35℃ 下儲存後，藉由凝膠電泳分析酵母菌之(乙)醇去氫酶。測試條件：MW, 10-220 kDa 標記物；1:ADH/NAD, 0 天；2: ADH/NAD, 1 天；3: ADH/NAD, 2 天；4: ADH/NAD, 3 天；5: ADH/NAD, 5 天；6: ADH/cNAD, 0 天；7: ADH/cNAD, 1 天；8: ADH/cNAD, 2 天；9: ADH/cNAD, 3 天；10: ADH/cNAD, 6 天。

圖 14：說明於液相中、於 35℃ 下且分別於 NAD 和 cNAD 之存在下達 65 小時後，酵母菌之(乙)醇去氫酶之安定性。測試條件：ADH 5 mg/ml；NAD 和 cNAD 分別為 50 mg/ml；緩衝液：75 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ ，甘胺酸，pH 9.0；溫度 35℃。

圖 15：描繪於室溫下且於 NAD 和各種不同之媒質的存在下經儲存達 11 週後，葡萄糖去氫酶之各種不同函數圖。

圖 16：描繪於 NAD 和 1-(3-羧基丙氧基)-5-乙基三氟甲磺酸吩嗪鎘之存在下且在各種不同之葡萄糖濃度下，葡萄糖去氫酶之酶動力學。

圖 17：圖示說明利用 GlucDH 作為酶及心肌黃酶作為媒質進行葡萄糖偵測。

圖 18：分別描繪於吡咯並喹啉醌(PQQ)和[(4-亞硝基苯基)亞胺基]二甲醇氫氯化物作為媒質之存在下葡萄糖染料氧化還原酶(GlucDOR)之函數圖及於 NAD 和心肌黃酶/[(4-亞硝基苯基)亞胺基]二甲醇氫氯化物作為媒質之存在下葡萄糖去氫酶之函數圖。

圖 19：描繪於 NAD 和心肌黃酶之存在下且在各種不同之葡萄糖濃度下，葡萄糖去氫酶之酶動力學。

圖 20：描繪分別於 NAD 和 cNAD 之存在下，利用葡萄糖去氫酶進行葡萄糖之電化學測定，所測定之電流係葡萄糖濃度之函數。測試條件：分別為 25 mM NAD 和 cNAD；2.5 秒遲延；5 秒測量時間。

圖 21：說明葡萄糖去氫酶雙重突變體 GlucDH_E96G_E170K 和 GlucDH_E170K_K252L 之胺基酸序列。

序列表

<110> 福赫夫曼拉瑞奇股份有限公司
 <120> 利用安定之輔酶使去氫酶安定之方法
 <140> TW098105120
 <141> 2009-02-18
 <150> EP 08 003 054.7
 <151> 2008-02-19
 <160> 2
 <170> PatentIn 版本3.3
 <210> 1
 <211> 261
 <212> PRT
 <213> 人造
 <220>
 <223> 源自枯草芽胞桿菌之葡萄糖去氫酶突變體
 <220>
 <221> 誘變劑
 <222> (96)..(96)
 <220>
 <221> 誘變劑
 <222> (170)..(170)
 <400> 1
 Met Tyr Pro Asp Leu Lys Gly Lys Val Val Ala Ile Thr Gly Ala Ala
 1 5 10 15
 Ser Gly Leu Gly Lys Ala Met Ala Ile Arg Phe Gly Lys Glu Gln Ala
 20 25 30
 Lys Val Val Ile Asn Tyr Tyr Ser Asn Lys Gln Asp Pro Asn Glu Val
 35 40 45
 Lys Glu Glu Val Ile Lys Ala Gly Gly Glu Ala Val Val Val Gln Gly
 50 55 60
 Asp Val Thr Lys Glu Glu Asp Val Lys Asn Ile Val Gln Thr Ala Ile
 65 70 75 80
 Lys Glu Phe Gly Thr Leu Asp Ile Met Ile Asn Asn Ala Gly Leu Gly
 85 90 95
 Asn Pro Val Pro Ser His Glu Met Pro Leu Lys Asp Trp Asp Lys Val
 100 105 110
 Ile Gly Thr Asn Leu Thr Gly Ala Phe Leu Gly Ser Arg Glu Ala Ile
 115 120 125
 Lys Tyr Phe Val Glu Asn Asp Ile Lys Gly Asn Val Ile Asn Met Ser
 130 135 140

Ser Val His Glu Val Ile Pro Trp Pro Leu Phe Val His Tyr Ala Ala
145 150 155 160

Ser Lys Gly Gly Ile Lys Leu Met Thr Lys Thr Leu Ala Leu Glu Tyr
165 170 175

Ala Pro Lys Gly Ile Arg Val Asn Asn Ile Gly Pro Gly Ala Ile Asn
180 185 190

Thr Pro Ile Asn Ala Glu Lys Phe Ala Asp Pro Lys Gln Lys Ala Asp
195 200 205

Val Glu Ser Met Ile Pro Met Gly Tyr Ile Gly Glu Pro Glu Glu Ile
210 215 220

Ala Ala Val Ala Val Trp Leu Ala Ser Lys Glu Ser Ser Tyr Val Thr
225 230 235 240

Gly Ile Thr Leu Phe Ala Asp Gly Gly Met Thr Lys Tyr Pro Ser Phe
245 250 255

Gln Ala Gly Arg Gly
260

<210> 2
<211> 261
<212> PRT
<213> 人造

<220>
<223> 源自枯草芽胞桿菌之葡萄糖去氫酶突變體

<220>
<221> 誘變劑
<222> (170)..(170)

<220>
<221> 誘變劑
<222> (252)..(252)

<400> 2

Met Tyr Pro Asp Leu Lys Gly Lys Val Val Ala Ile Thr Gly Ala Ala
1 5 10 15

Ser Gly Leu Gly Lys Ala Met Ala Ile Arg Phe Gly Lys Glu Gln Ala
20 25 30

Lys Val Val Ile Asn Tyr Tyr Ser Asn Lys Gln Asp Pro Asn Glu Val
35 40 45

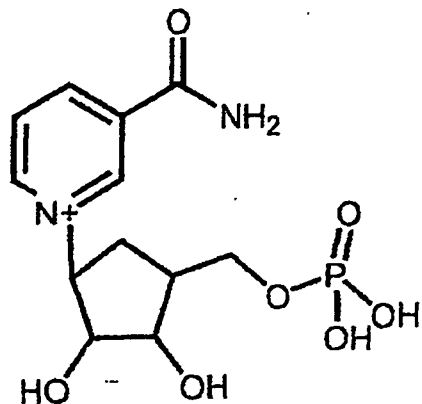
Lys Glu Glu Val Ile Lys Ala Gly Gly Glu Ala Val Val Val Gln Gly
50 55 60

Asp Val Thr Lys Glu Glu Asp Val Lys Asn Ile Val Gln Thr Ala Ile

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

七、申請專利範圍：

1. 一種安定酶之方法，其特徵在於該酶係於安定之輔酶的存在下儲存，其中該安定之輔酶係選自安定之菸醯胺腺嘌呤二核苷酸(NAD/NADH)化合物、菸醯胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADP/NADPH)化合物或式(I)化合物



(I)

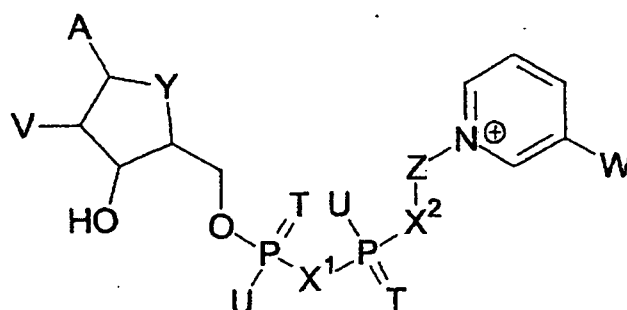
2. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該酶係選自去氫酶。

3. 如申請專利範圍第 2 項之方法，其中該酶係選自葡萄糖去氫酶(E.C.1.1.1.47)、乳酸去氫酶(E.C.1.1.1.27, 1.1.1.28)、蘋果酸去氫酶(E.C.1.1.1.37)、甘油去氫酶(E.C.1.1.1.6)、(乙)醇去氫酶(E.C.1.1.1.1)、 α -羥基丁酸去氫酶、山梨醇去氫酶或胺基酸去氫酶。

4. 如申請專利範圍第 3 項之方法，其中該胺基酸去氫酶為 L-胺基酸去氫酶(E.C.1.4.1.5)。

5. 如申請專利範圍第 3 項之方法，其中使用葡萄糖去氫酶作為酶。

6. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該安定之輔酶係選自通式 (II) 之化合物



(II)

其中

A = 腺嘌呤、7-去氮變異體、8-氮變異體或 7-去氮-8-氮變異體，其中該 7-去氮變異體於第 7 位置上可較佳經鹵素、 C_1 - C_6 -炔基、 C_1 - C_6 -烯基或 C_1 - C_6 -烷基取代，

T = 各別獨立地 O 或 S，

U = 各別獨立地 OH、SH、 BH_3^- 或 $BCNH_2^-$ ，

V = 各別獨立地 OH 或磷酸基，或兩個基所形成之環磷酸基，

W = COOR、 $CON(R)_2$ 、COR 或 $CSN(R)_2$ ，其中 R = 各別獨立地 H 或 C_1 - C_2 -烷基，

X^1 ， X^2 = 各別獨立地 O、 CH_2 、 $CHCH_3$ 、 $C(CH_3)_2$ 、NH 或 NCH_3 ，

Y = NH、S、O 或 CH_2 ，

Z = 具有 4 至 6 個碳原子之直鏈基 (其中 1 或 2 個碳原

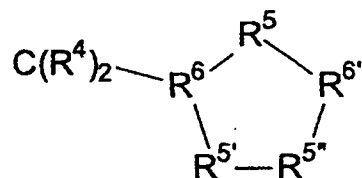
子可經一或多個選自 O、S 或 N 之雜原子替代)或包括環狀基和 CR^4_2 基之環狀有機基(其中該環狀基含有 5 或 6 個碳原子且可包含選自 O、S 或 N 之雜原子及可包含一或多個取代基，且其中 CR^4_2 係與該環狀基和 X^2 基鍵結，其中 R^4 =各別獨立地 H、F、Cl 或 CH_3)，唯其 Z 和該吡啶殘基並非藉由糖苷鍵聯連接，

或其鹽或還原型式。

7.如申請專利範圍第 6 項之方法，其中該直鏈基具有 4 個碳原子。

8.如申請專利範圍第 6 或 7 項之方法，其中 Z 係飽和或未飽和 5 員碳環或雜環。

9.如申請專利範圍第 8 項之方法，其中 Z 為通式(III)之化合物



(III)

其中 $\text{R}^{5'}$ 與 $\text{R}^{5''}$ 之間可存有單鍵或雙鍵，

R^4 =各別獨立地 H、F、Cl 或 CH_3 ，

$\text{R}^5=\text{CR}^4_2$ ，

其中若 $\text{R}^{5'}$ 與 $\text{R}^{5''}$ 之間存在單鍵，則 $\text{R}^{5'}=\text{O}$ 、S、NH、 $\text{NC}_1\text{-C}_2$ -烷基、 CR^4_2 、CHOH 或 CHOCH_3 ，且 $\text{R}^{5''}=\text{CR}^4_2$ 、

CHOH 或 CHOCH_3 ，且

其中若 $\text{R}^{5'}$ 與 $\text{R}^{5''}$ 之間存在雙鍵，則 $\text{R}^{5'}=\text{R}^{5''}=\text{CR}^4$ ，且 $\text{R}^6, \text{R}^{6'}$ 各別獨立地 CH 或 CCH_3 。

10. 如申請專利範圍第 6 項之方法，其中 $\text{W}=\text{CONH}_2$ 或 COCH_3 。

11. 如申請專利範圍第 9 項之方法，其中 R^5 係 CH_2 。

12. 如申請專利範圍第 9 項之方法，其中 $\text{R}^{5'}$ 係選自 CH_2 、CHOH 或 NH。

13. 如申請專利範圍第 9 項之方法，其中 $\text{R}^{5'}$ 和 $\text{R}^{5''}$ 皆為 CHOH。

14. 如申請專利範圍第 9 項之方法，其中 $\text{R}^{5'}$ 係 NH 且 $\text{R}^{5''}$ 係 CH_2 。

15. 如申請專利範圍第 1 至 5 項中任一項之方法，其中該安定之輔酶係 carbaNAD。

16. 如申請專利範圍第 1 至 5 項中任一項之方法，其中被安定之輔酶所安定之酶係儲存達至少 2 週之期間。

17. 如申請專利範圍第 16 項之方法，其中被安定之輔酶所安定之酶係儲存達至少 4 週之期間。

18. 如申請專利範圍第 17 項之方法，其中被安定之輔酶所安定之酶係儲存達至少 8 週之期間。

19. 如申請專利範圍第 1 至 5 項中任一項之方法，其中係於至少 20°C 之溫度下儲存被安定之輔酶所安定之酶。

20. 如申請專利範圍第 19 項之方法，其中係於至少 25°C 之溫度下儲存被安定之輔酶所安定之酶。

21.如申請專利範圍第 20 項之方法，其中係於至少 30℃ 之溫度下儲存被安定之輔酶所安定之酶。

22.如申請專利範圍第 1 至 5 項中任一項之方法，其中係於不存在乾燥劑下儲存被安定之輔酶所安定之酶。

23.如申請專利範圍第 1 至 5 項中任一項之方法，其中係於至少 50%相對濕度下儲存被安定之輔酶所安定之酶。

24.如申請專利範圍第 1 至 5 項中任一項之方法，其中係以乾燥物之方式儲存被安定之輔酶所安定之酶。

25.如申請專利範圍第 1 至 5 項中任一項之方法，其中係於液相儲存被安定之輔酶所安定之酶。

26.如申請專利範圍第 1 至 5 項中任一項之方法，其中係於測試元件上儲存被安定之輔酶所安定之酶。

27.一種被安定之輔酶所安定之酶，其特徵在於該酶於至少 25℃ 之溫度下儲存達至少 4 週，其中該酶儲存於高濕度且不存在乾燥劑下，其中與起初之酶催化活性相比較，顯出酶催化活性之衰退係低於 20%，其中該酶為經突變之葡萄糖去氫酶，以及與野生型葡萄糖去氫酶相比較，該經突變之葡萄糖去氫酶具有增加之熱安定性或水解安定性。

28.如申請專利範圍第 27 項之被安定之輔酶所安定之酶，其中該酶儲存達至少 8 週。

29.如申請專利範圍第 27 項之被安定之輔酶所安定之酶，其中該酶於至少 30℃ 之溫度下儲存。

30.如申請專利範圍第 27 項之被安定之輔酶所安定之酶，其中與起初之酶催化活性相比較，顯出酶催化活性之衰退係低於 30%。

31.一種用於測定被分析物之偵測試劑，其包含如申請專利範圍第 27 項之被安定之酶。

32.一種測試元件，其特徵在於包含如申請專利範圍第 27 項之被安定之酶或如申請專利範圍第 31 項之偵測試劑。

圖1A

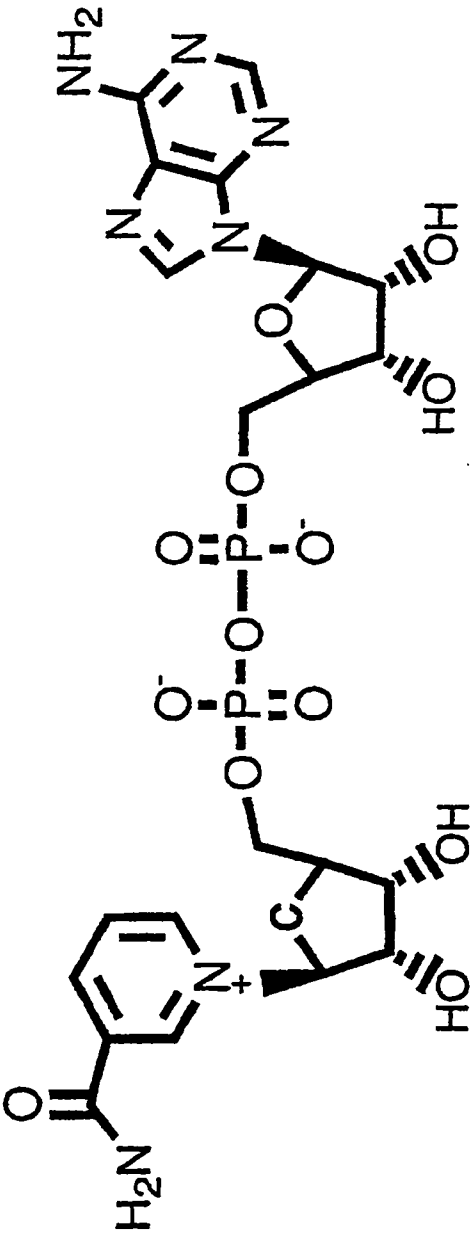


圖1B

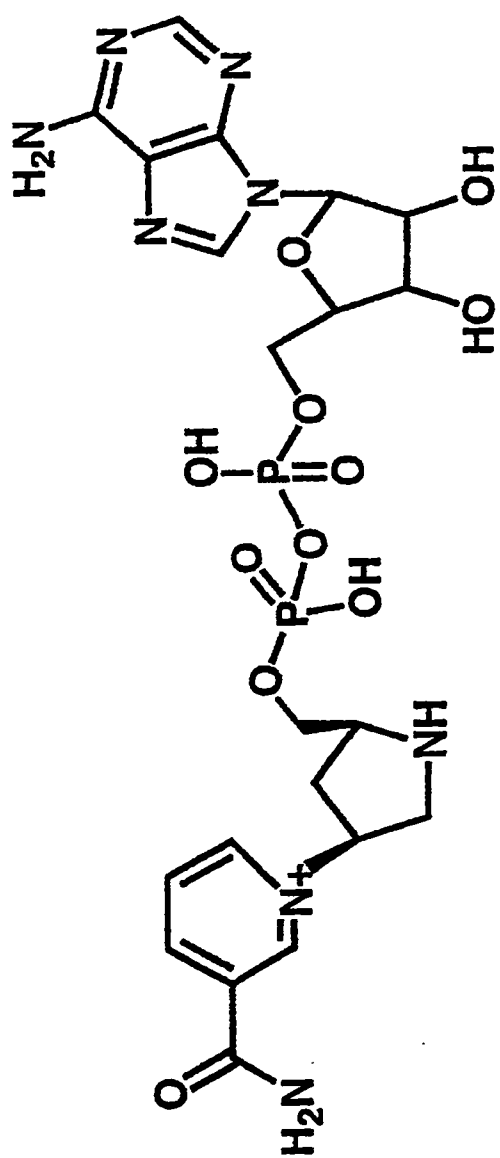


圖 2A

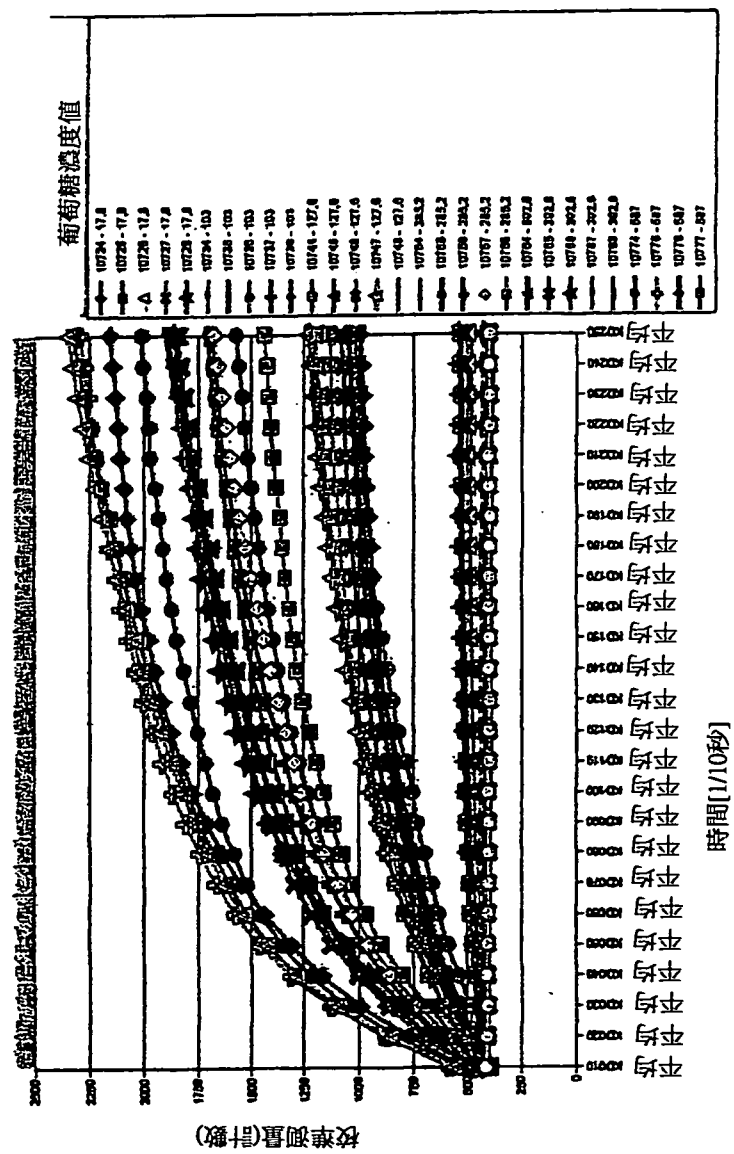


圖 2B

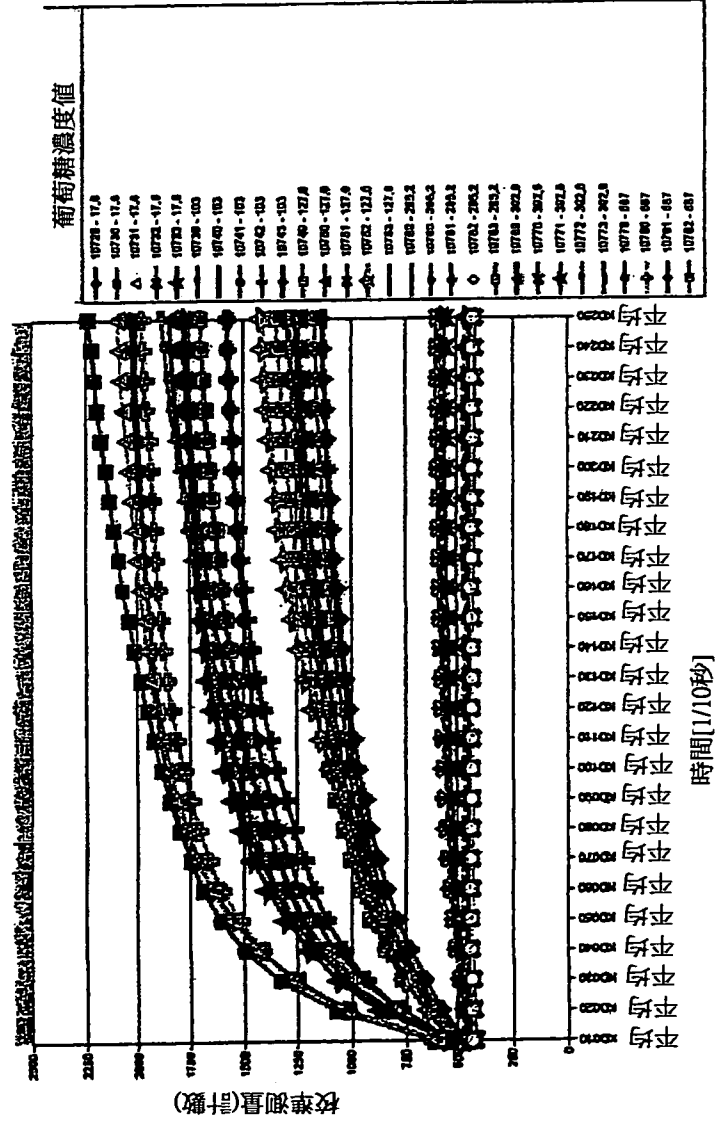


圖 2C

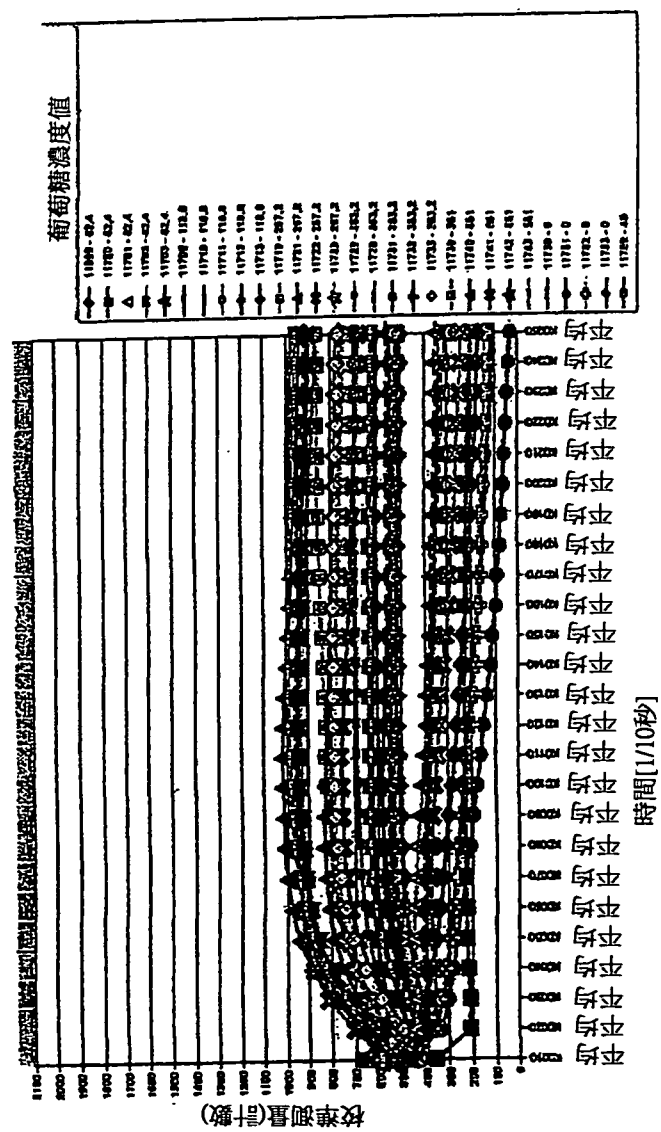


圖2D

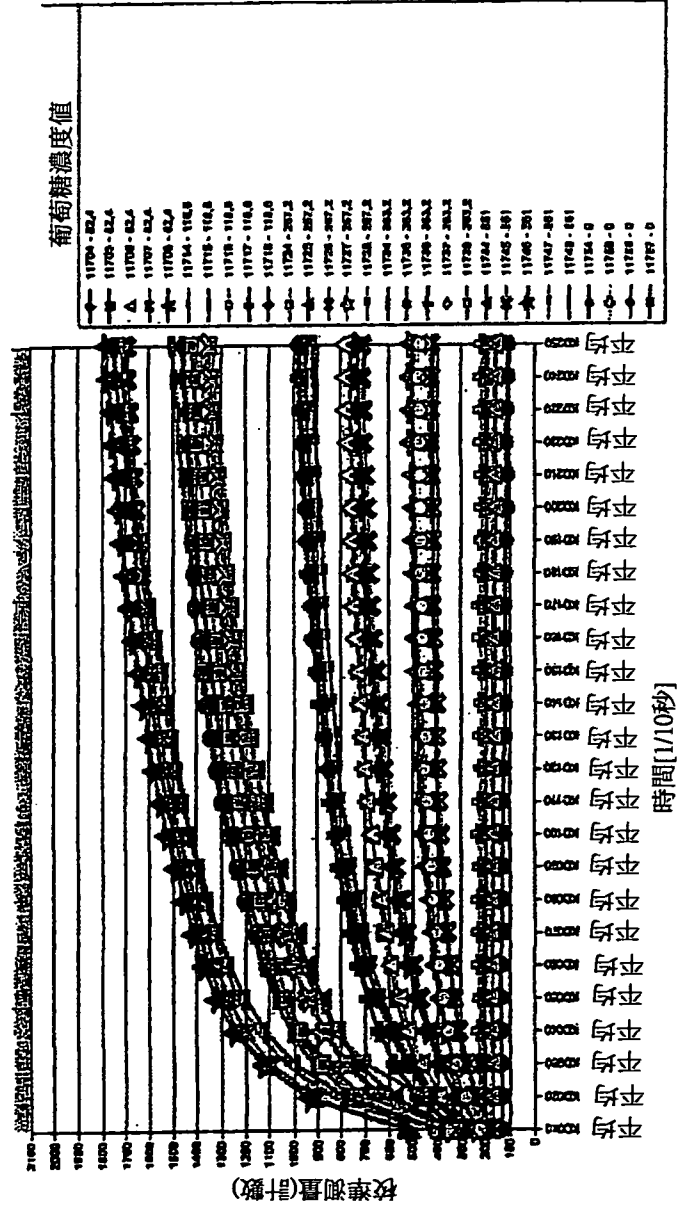


圖3

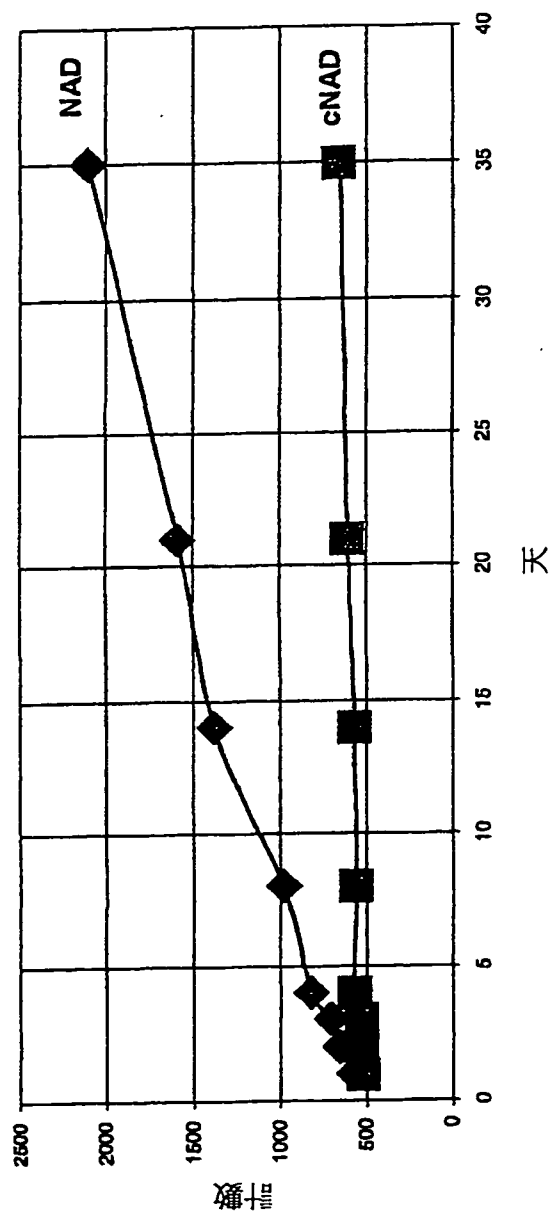


圖4

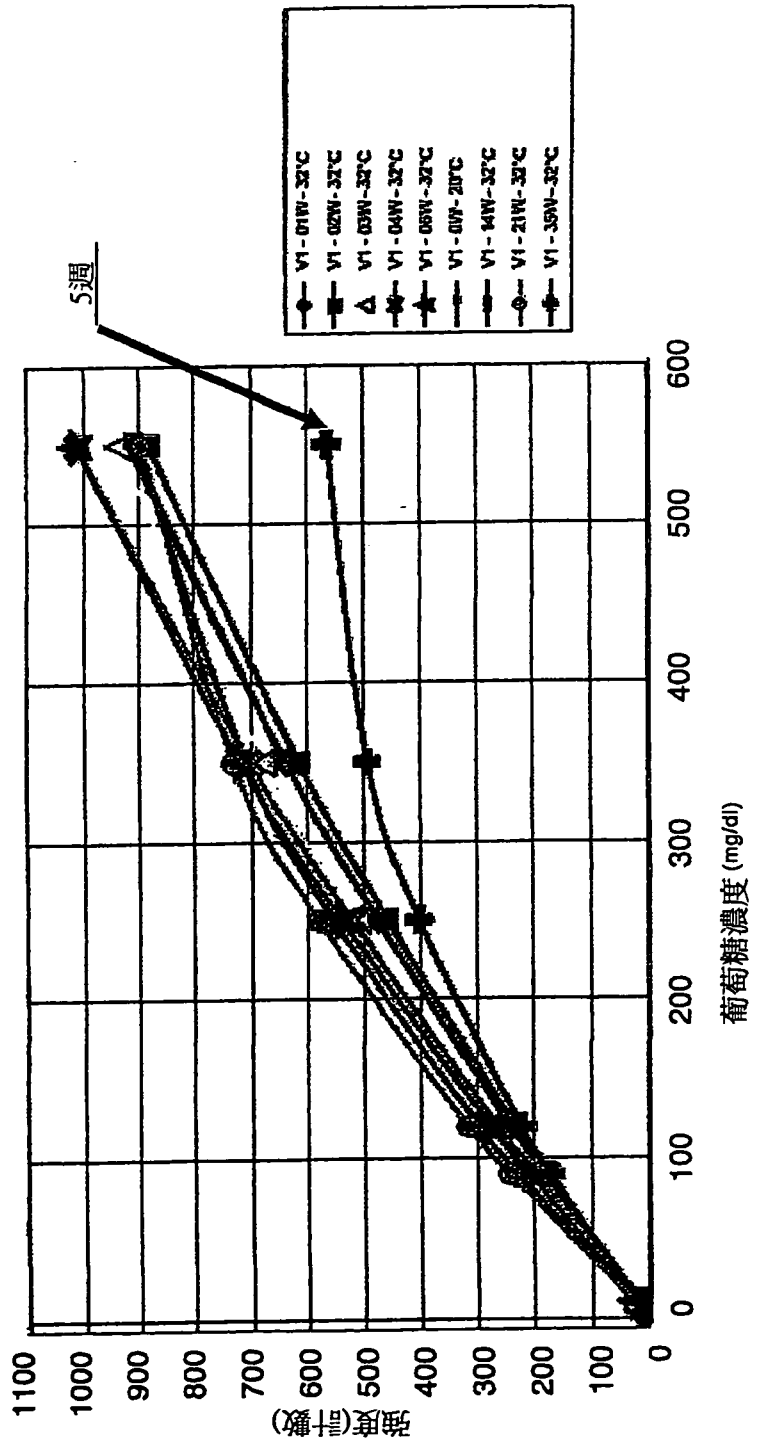


圖5A

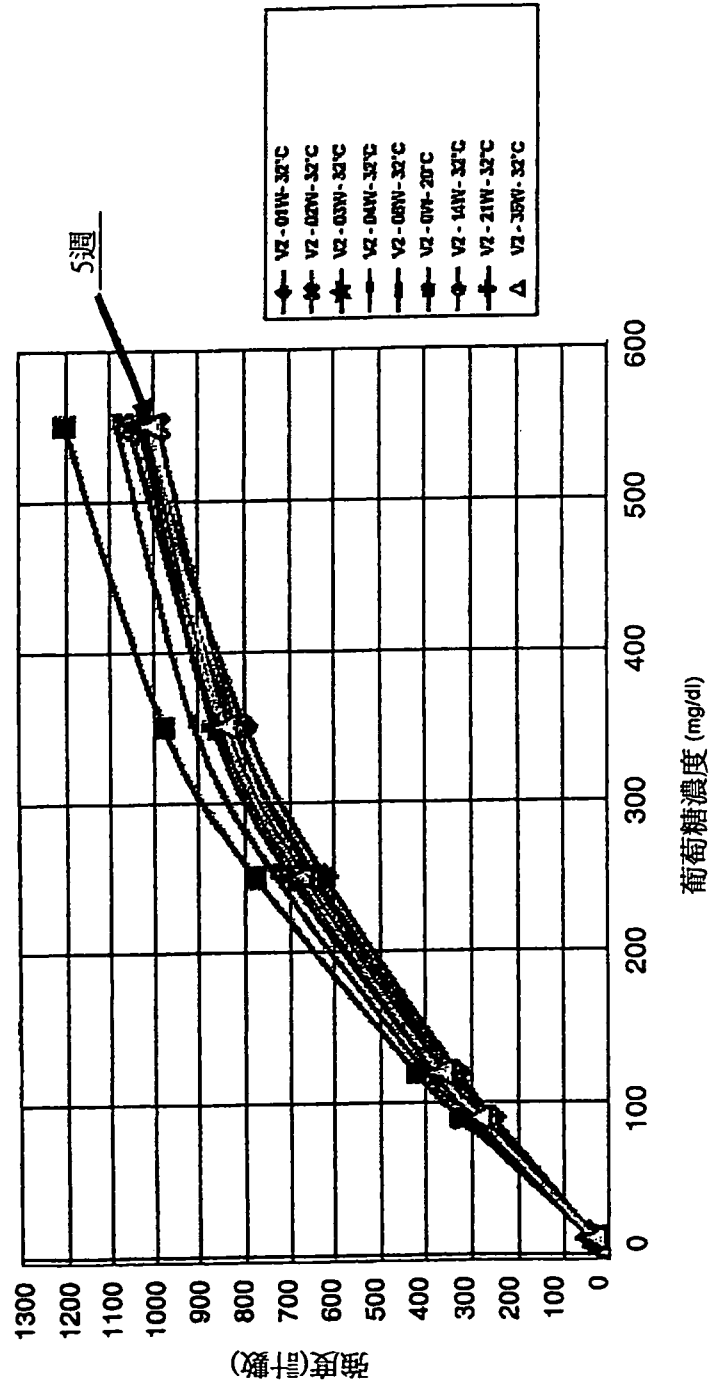


圖5B

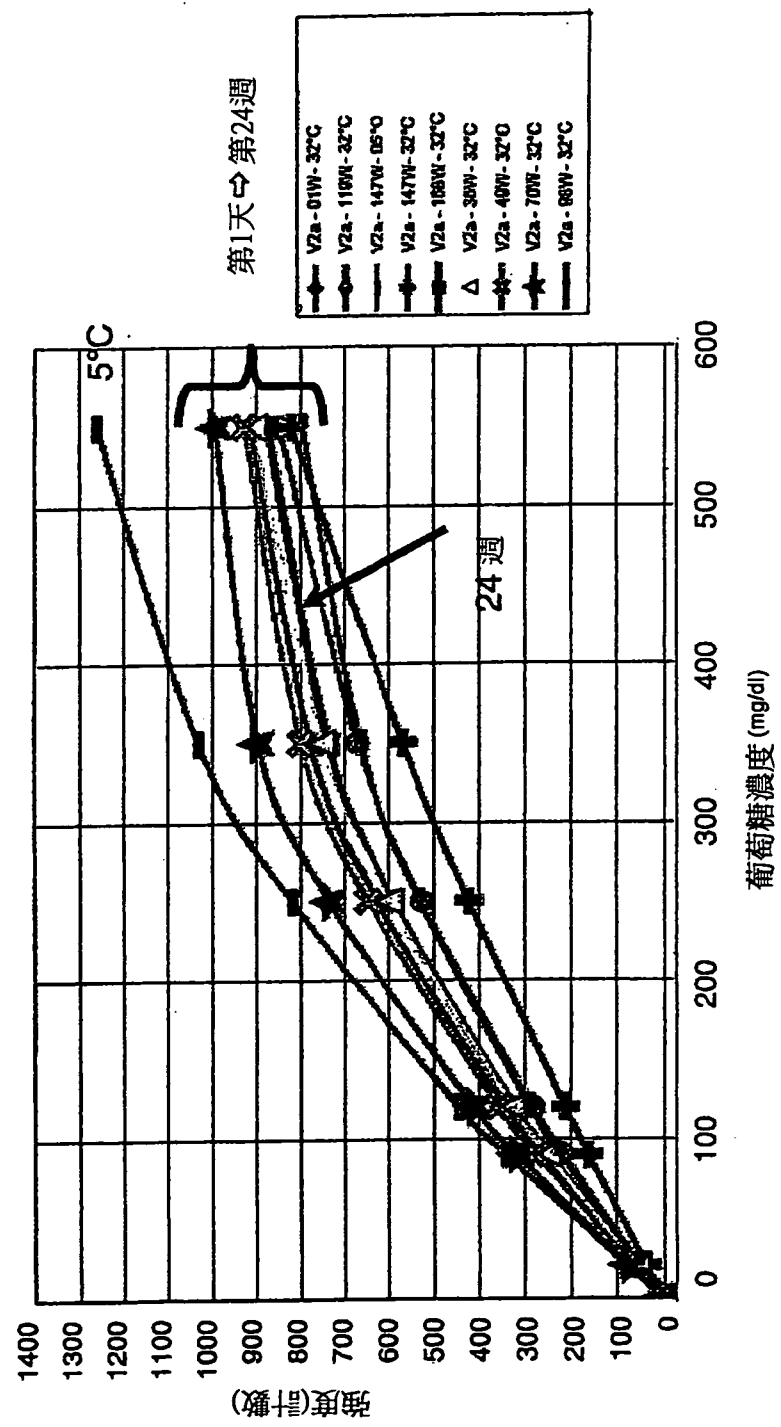


圖6

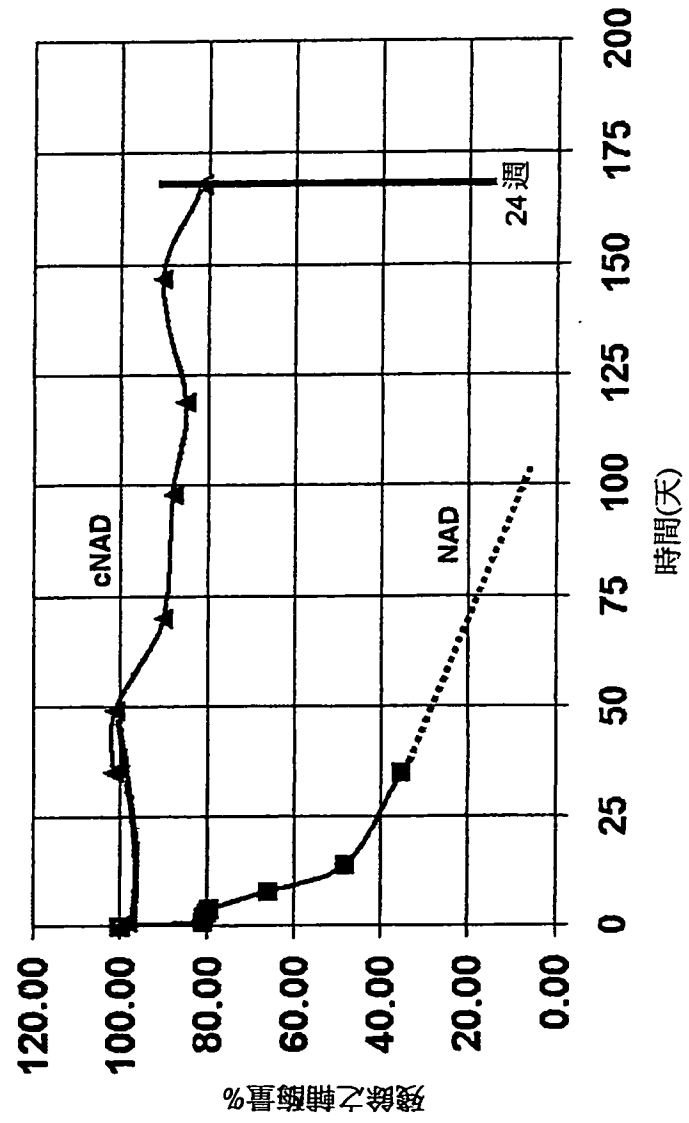


圖7A

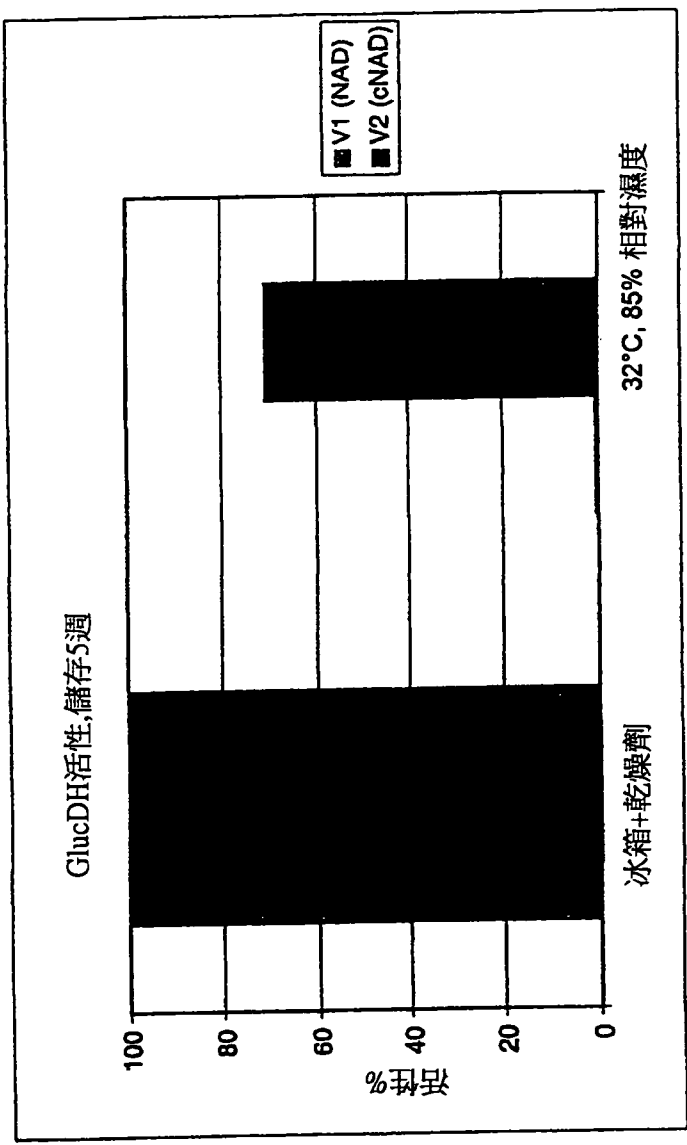


圖7B

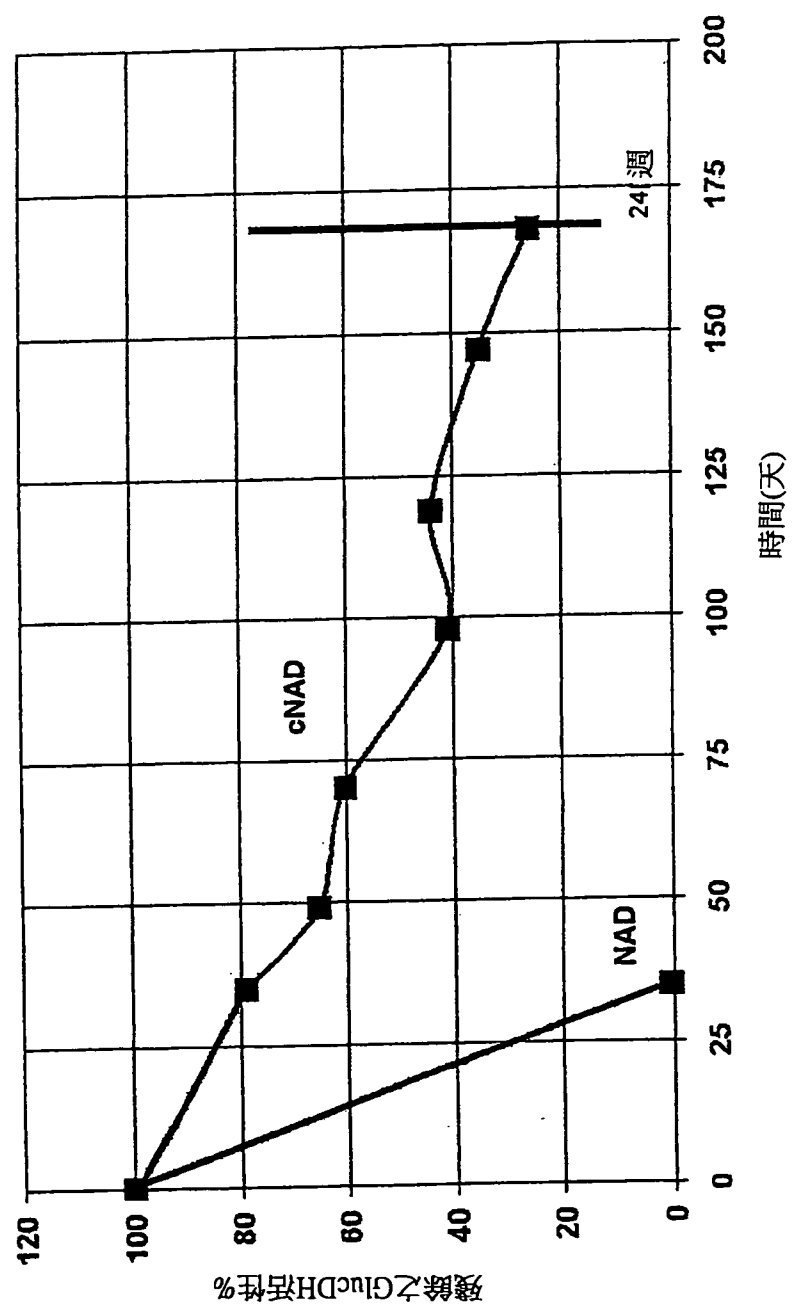


圖8

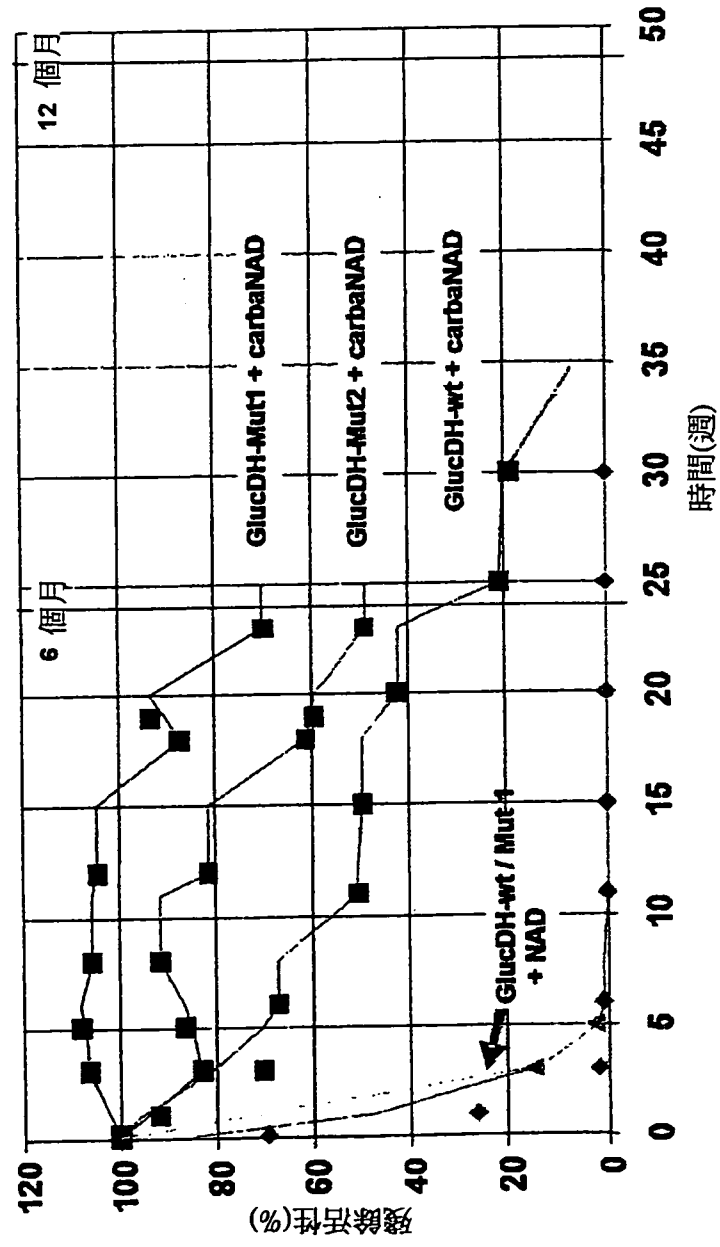


圖 9

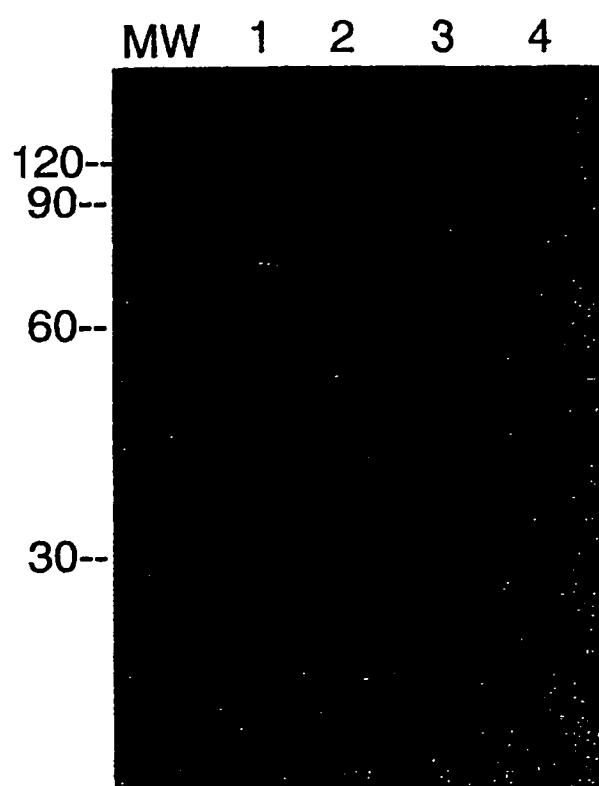


圖 10

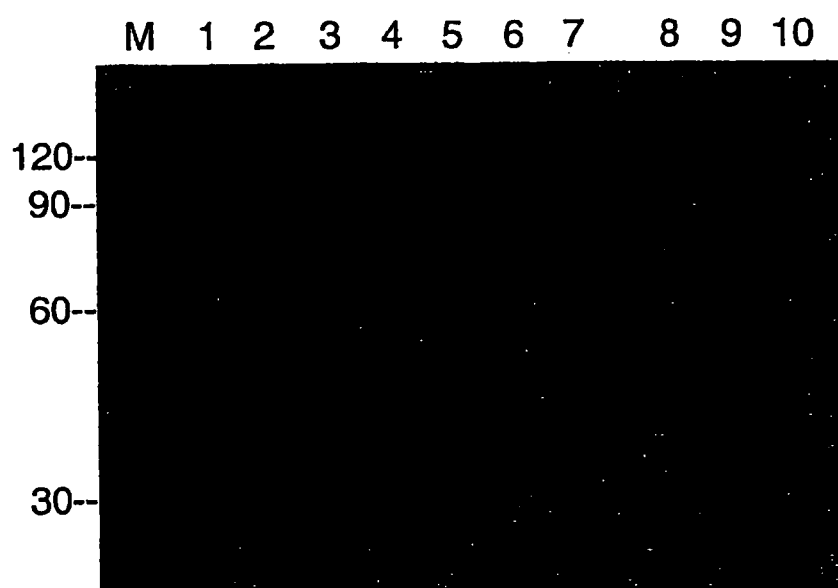


圖11A

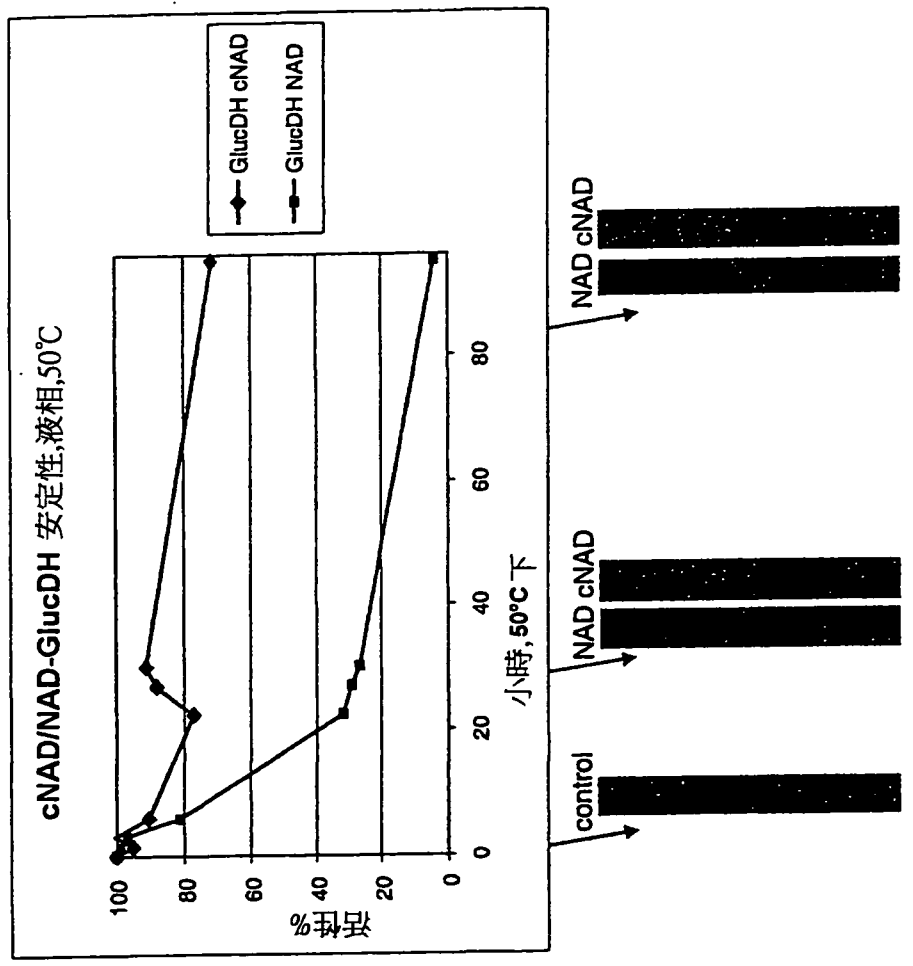


圖11B

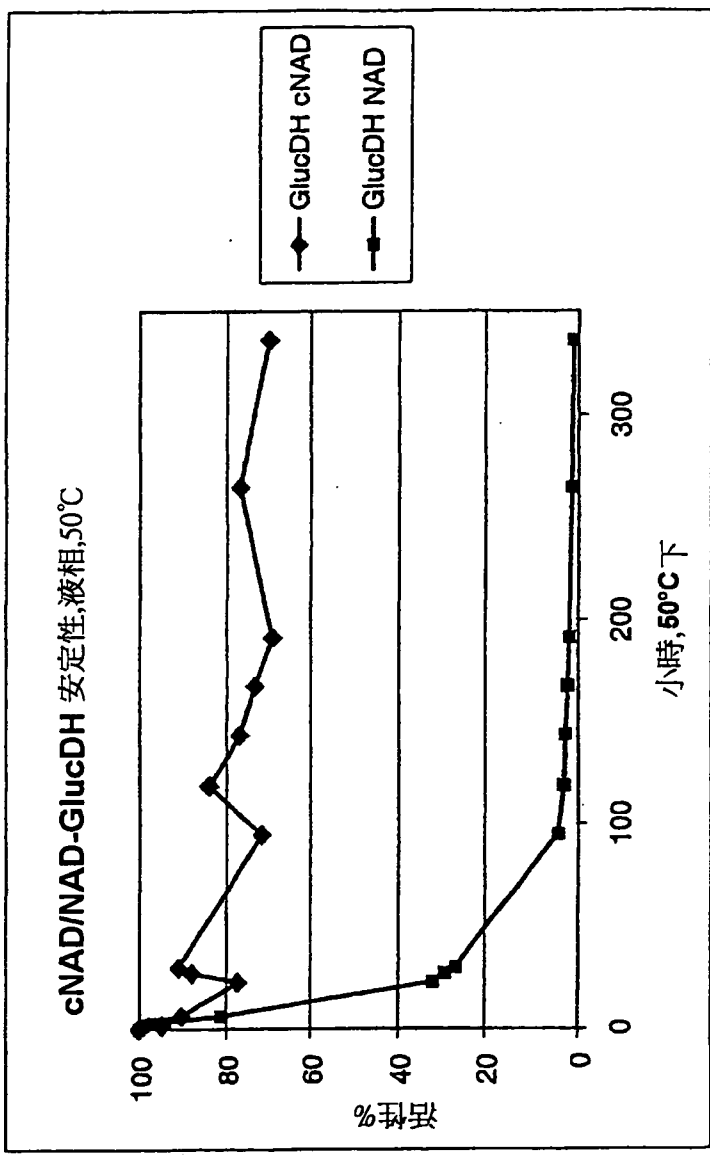


圖12

MW 1 2 3 4 5 6

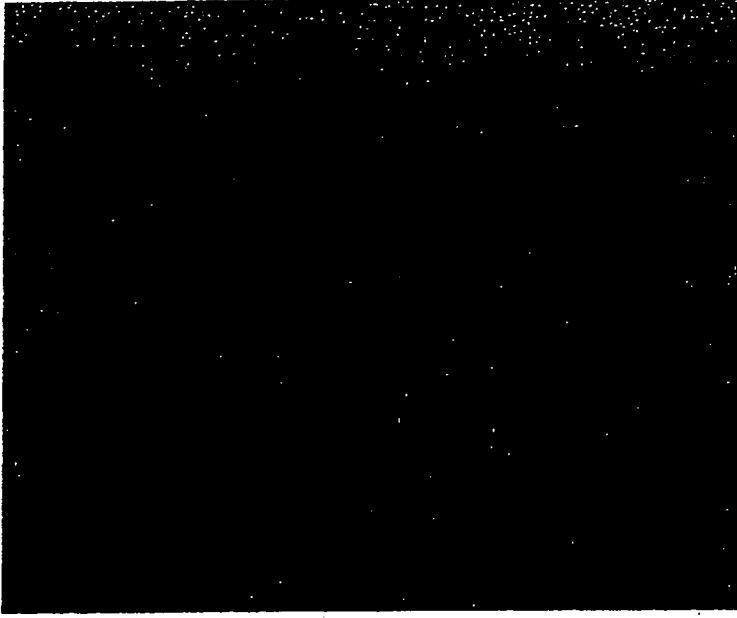


圖13

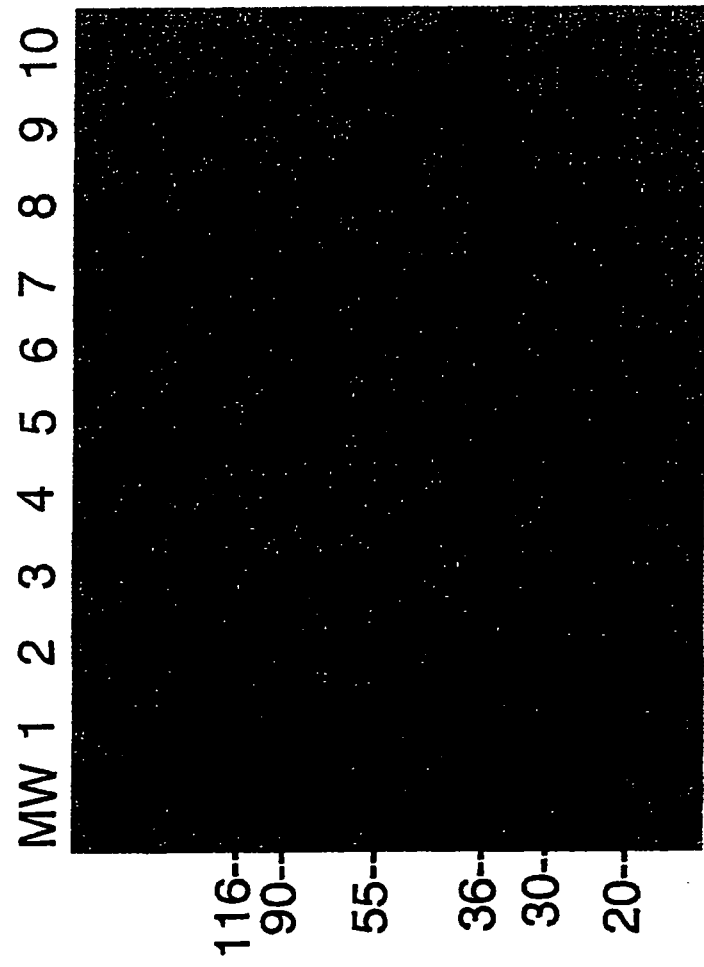


圖14

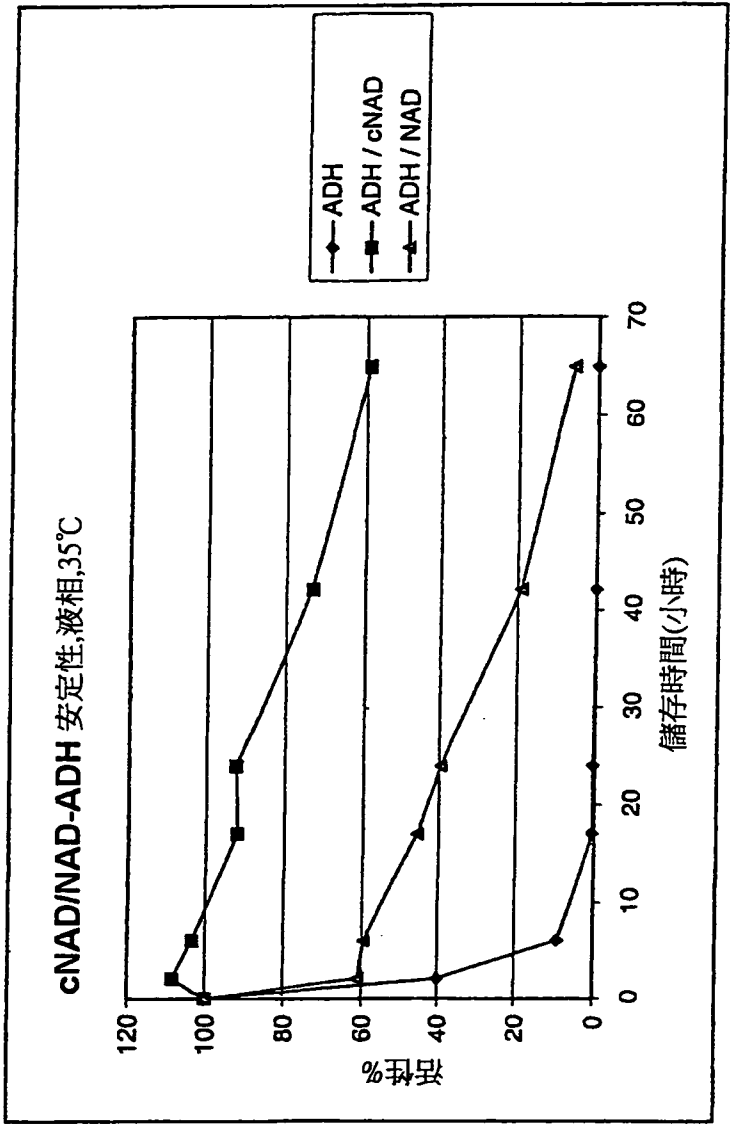


圖15

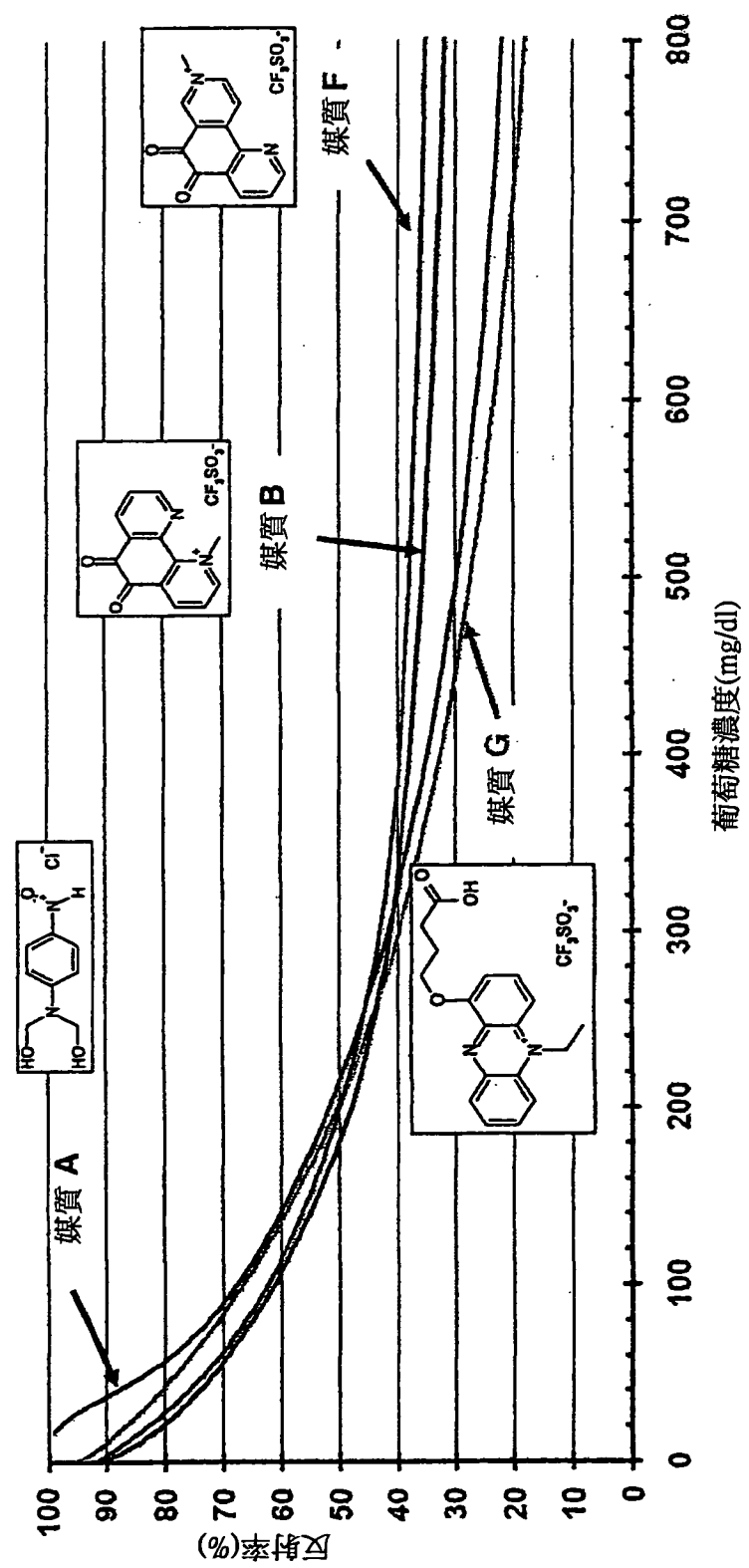


圖16

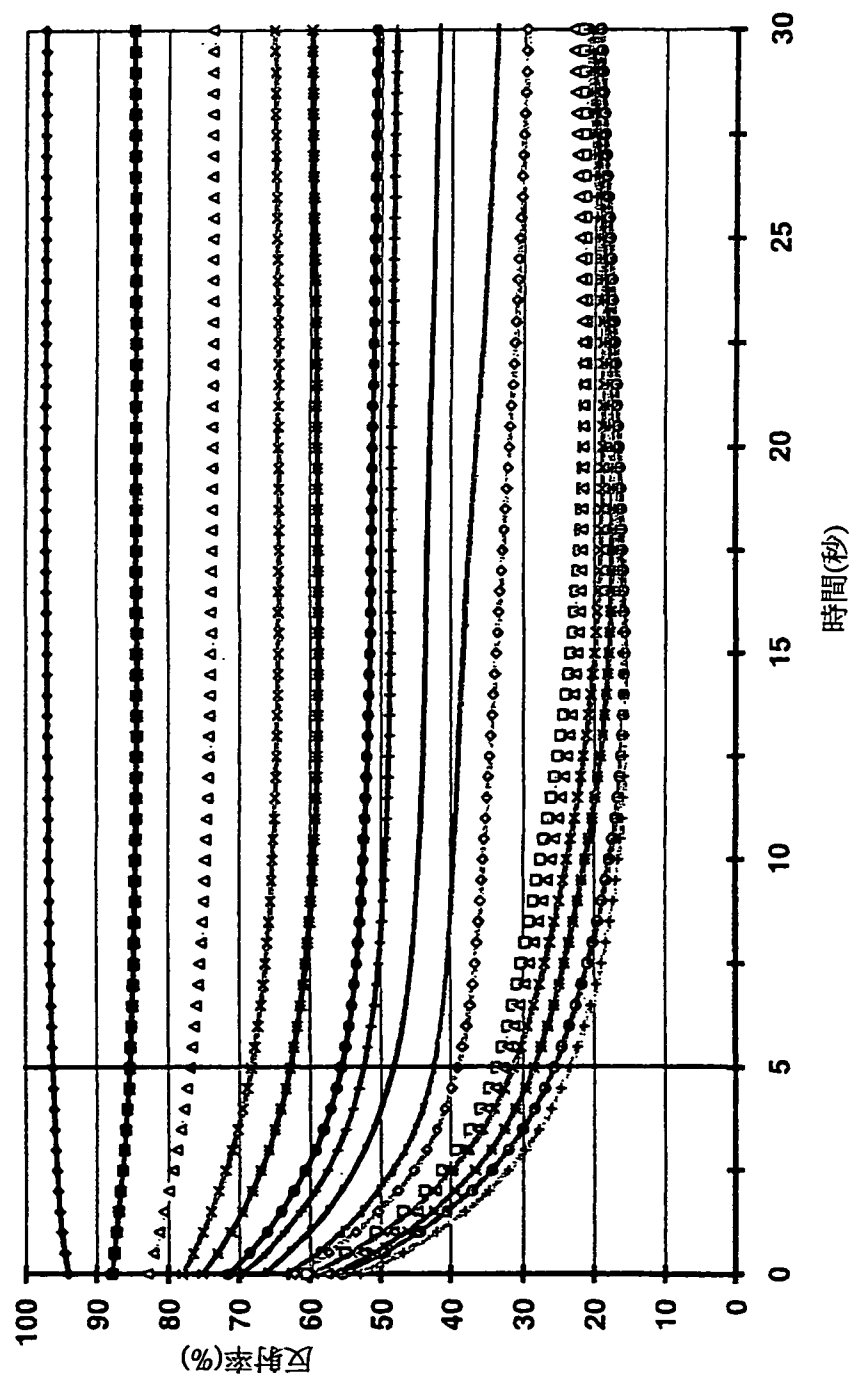


圖17

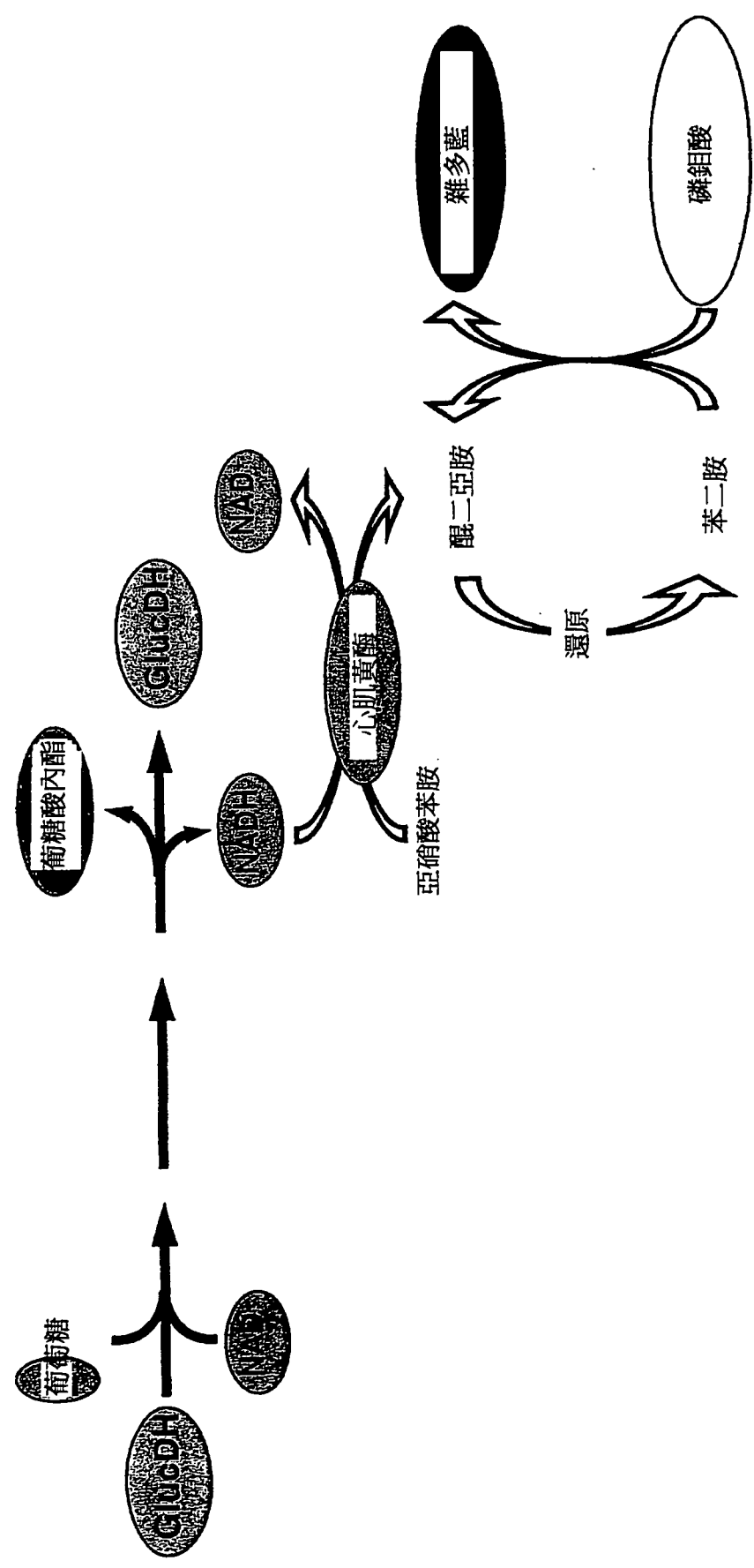


圖18

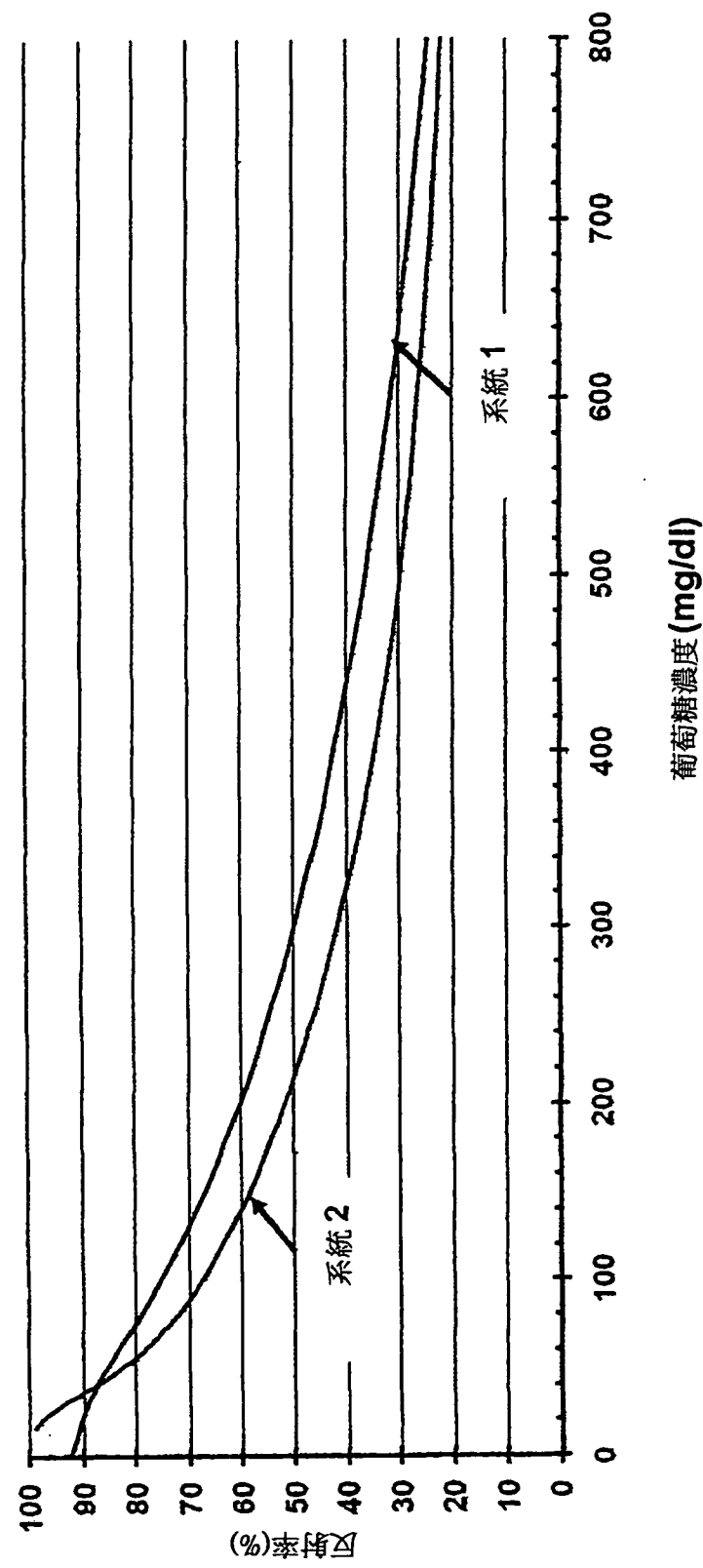


圖19

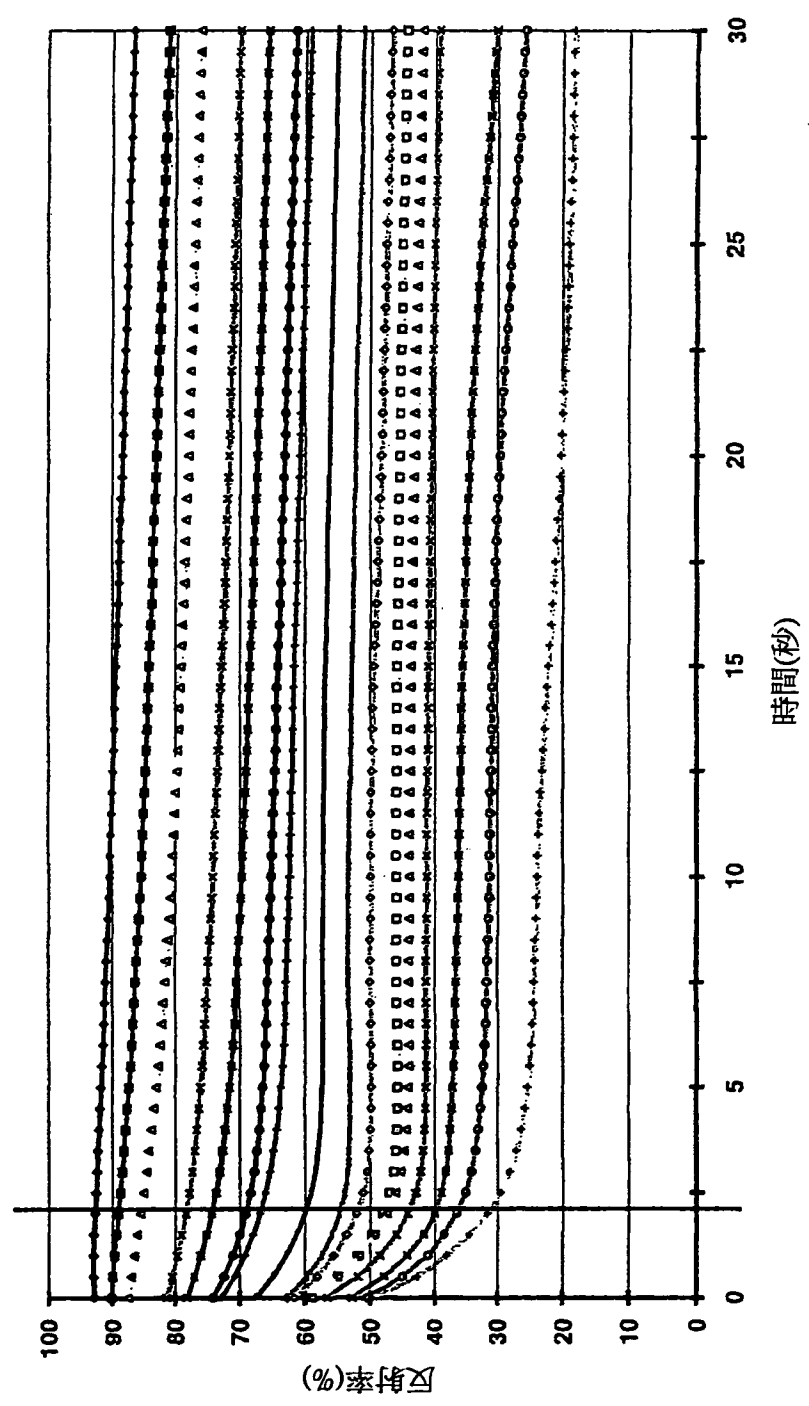


圖20

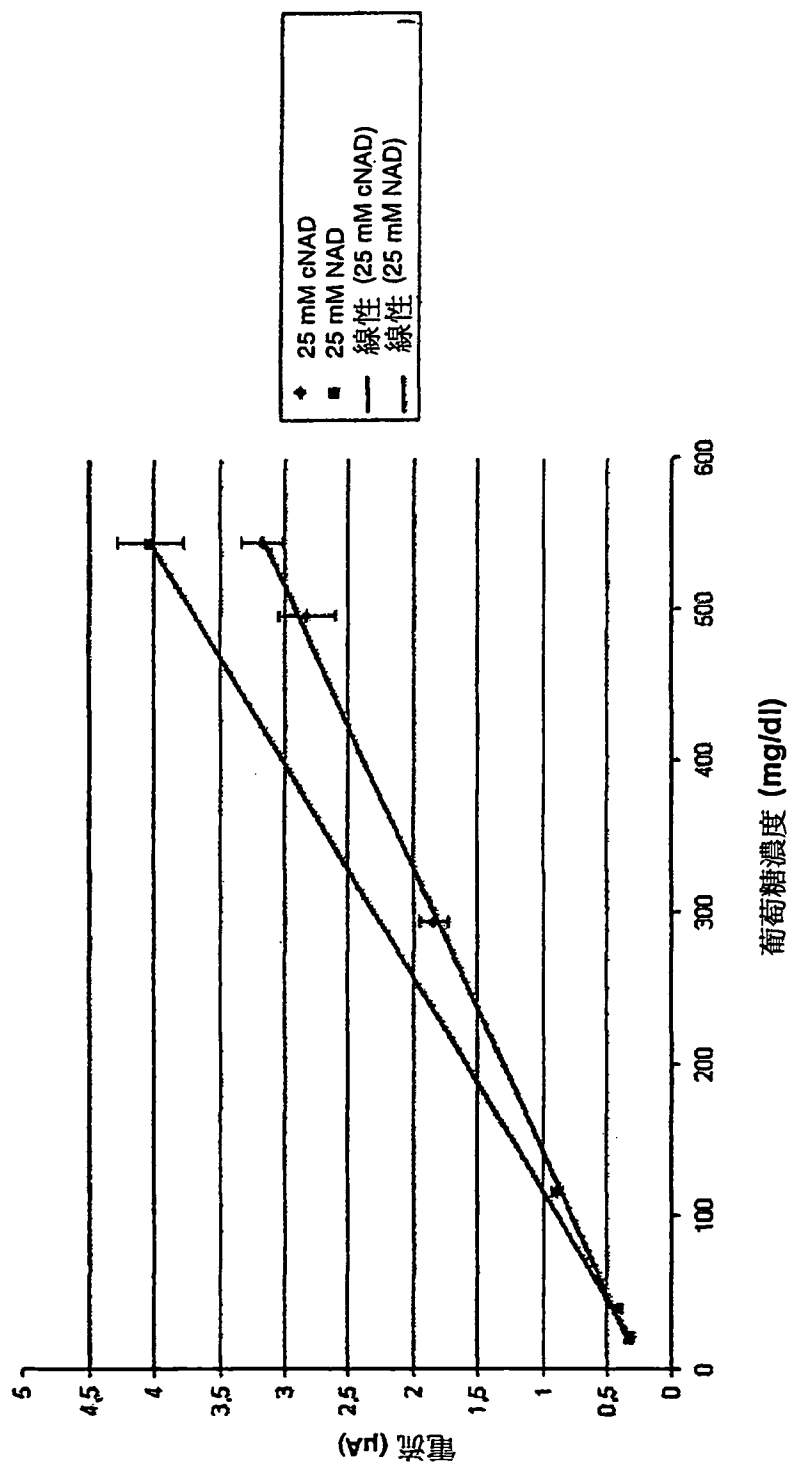


圖21

GlucDH_E96G_E170K

M Y P D L K G K V V A I T G A A S G L G K A M A I R F G K E
Q A K V V I N Y Y S N K Q D P N E V K E E V I K A G G E A V
V V Q G D V T K E E D V K N I V Q T A I K E F G T L D I M I
N N A G L G N P V P S H E M P L K D W D K V I G T N L T G A
F L G S R E A I K Y F V E N D I K G N V I N M S S V H E V I
P W P L F V H Y A A S K G G I K L M T K T L A L E Y A P K G
I R V N N I G P G A I N T P I N A E K F A D P K Q K A D V E
S M I P M G Y I G E P E E I A A V A V W L A S K E S S Y V T
G I T L F A D G G M T K Y P S F Q A G R G

GlucDH_E170K_K252L

M Y P D L K G K V V A I T G A A S G L G K A M A I R F G K E
Q A K V V I N Y Y S N K Q D P N E V K E E V I K A G G E A V
V V Q G D V T K E E D V K N I V Q T A I K E F G T L D I M I
N N A G L G N P V P S H E M P L K D W D K V I G T N L T G A
F L G S R E A I K Y F V E N D I K G N V I N M S S V H E V I
P W P L F V H Y A A S K G G I K L M T K T L A L E Y A P K G
I R V N N I G P G A I N T P I N A E K F A D P K Q K A D V E
S M I P M G Y I G E P E E I A A V A V W L A S K E S S Y V T
G I T L F A D G G M T L Y P S F Q A G R G