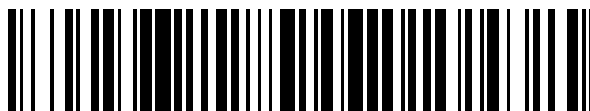


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 782 199**

51 Int. Cl.:

C12P 7/18 (2006.01)

C12N 9/04 (2006.01)

C12Q 1/32 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.02.2017 PCT/EP2017/052855**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.08.2017 WO17137491**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.02.2017 E 17704245 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.01.2020 EP 3414325**

54 Título: **3-Hidroxibutirato deshidrogenasa mutante de Rhodobacter sphaeroides, así como procedimientos y usos que implican la misma**

30 Prioridad:

09.02.2016 EP 16000321

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

11.09.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

BECK, DANIELA;
BOENITZ-DULAT, MARA;
KRATZSCH, PETER;
STREIDL, THOMAS y
HORN, CARINA

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 782 199 T3

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

DESCRIPCIÓN

3-Hidroxiacetil-CoA deshidrogenasa mutante de *Rhodobacter sphaeroides*, así como procedimientos y usos que implican la misma

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Los autores de la invención identificaron una cantidad considerable de aminoácidos en la 3-HADH natural, en la que las sustituciones incrementaron el rendimiento de las enzimas mutantes resultantes en relación con la HADH natural (véanse, por ejemplo, las tablas 1A y 1B de los ejemplos). En particular, los aminoácidos se pueden sustituir para incrementar la estabilidad térmica y opcionalmente la afinidad por el sustrato y/o cofactor (para 3-hidroxiacetil-CoA y/o NAD o derivados de NAD, por ejemplo, carba-NAD). Los ejemplos adecuados de esos sitios incluyen las posiciones 66, 109, 113, 125, 140, 144, 145, 195, 197, 217, 223, 232, 239, 250 y/o 257 de SEQ ID NO: 1. El rendimiento de la 3-HADH mutante se podría incrementar aún más combinando mutaciones en los sitios anteriores o en sitios adicionales (véanse las tablas 2A y 2B). Ejemplos en particular adecuados de esas enzimas mutantes incluyen aquellas con las mutaciones (para las definiciones de abreviaturas, véase a continuación)

– 125Phe;

– 144Arg;

- 232Cys;
- 250Met;
- 5 – 230Leu y 250Met;
- 37Tyr y 250Met;
- 37Tyr, 230Leu y 250Met;
- 10 – 202Gly, 230Leu y 250Met;
- 37Tyr, 145Gly, 230Leu y 250Met; o
- 15 – 37Tyr, 195Gln, 230Leu y 250Met

(véanse los ejemplos).

En consecuencia, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a una 3-hidroxi-butirato deshidrogenasa (3-HBDH) mutante de *Rhodobacter sphaeroides* con un rendimiento mejorado en relación con la 3-HBDH natural. Preferentemente, la 3-HBDH mutante de *Rhodobacter sphaeroides* con un rendimiento mejorado en relación con la 3-HBDH natural comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 (3-HBDH de *Rhodobacter sphaeroides*; 3-HBDH natural) y tiene al menos una sustitución aminoacídica en relación con la 3-HBDH natural en una posición correspondiente a la posición 250 de SEQ ID NO: 1. Más preferentemente, el aminoácido en la posición correspondiente a la posición 250 de SEQ ID NO: 1 se sustituye con Met (250Met) o Ile (250Ile), en particular con Met (250Met). Se ha demostrado que la posición y las sustituciones son ventajosas para mejorar el rendimiento de una 3-HBDH mutante (véanse las tablas 1A y 1B) y que se pueden combinar con mutaciones adicionales (véanse las tablas 2A y 2B). En consecuencia, enzimas mutantes en particular adecuadas incluyen aquellas con las mutaciones

- 250Met;
- 230Leu y 250Met;
- 35 – 37Tyr y 250Met;
- 37Tyr, 230Leu y 250Met;
- 202Gly, 230Leu y 250Met;
- 40 – 37Tyr, 145Gly, 230Leu y 250Met; o
- 37Tyr, 195Gln, 230Leu y 250Met

(véanse los ejemplos).

La 3-hidroxi-butirato deshidrogenasa (3-HBDH) (EC 1.1.1.30) pertenece a la familia de las oxidorreductasas, en concreto es una enzima que cataliza la oxidación estereoespecífica de 3-hidroxi-butanoato / 3-hidroxi-butirato / (R)-3-hidroxi-butirato / ácido 3-hidroxi-butírico (3-HB) a acetoacetato con NAD o derivados como cofactor:



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

La expresión "3-HBDH natural" se refiere a una 3-HBDH como se produce típicamente en la naturaleza. Una 3-HBDH natural de la bacteria fotosintética púrpura *Rhodobacter sphaeroides* se clonó en *E. coli* y se describió adicionalmente en 1999 (documento DE 19815685 A1). Sin embargo, la enzima se caracteriza por una estabilidad bastante baja (dando como resultado una corta duración en almacenamiento), que es desventajoso en aplicaciones biotécnicas, biomédicas y de diagnóstico. En particular, la corta duración en almacenamiento tiene un impacto negativo sobre la aplicabilidad de la enzima, si se pretende el uso de una enzima preparada previamente. En particular, esto incluye productos comerciales tales como preparaciones enzimáticas, kits, tiras reactivas, etc., que normalmente se preparan

a gran escala, se almacenan y a continuación se comercializan, por ejemplo, en lotes más pequeños. Adicionalmente, evidentemente es deseable incrementar la afinidad de la enzima por los sustratos y/o cofactores. El incremento de la afinidad y/o estabilidad incrementará el rendimiento de la enzima en aplicaciones y dispositivos biotécnicos. La secuencia de aminoácidos comúnmente aceptada de la 3-HBDH natural típica de *Rhodobacter sphaeroides* se proporciona a continuación como SEQ ID NO: 1.

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

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

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

SEQ ID NO: 1 (3-HBDH de *Rhodobacter sphaeroides*)

MDLNGKRAIV	TGSNSGIGLG	CAEELARAGA	EVVINSFTDR	DEDHALAEKI	GREHGVSCRY	60
IAADMSDGEA	CRALIETAGG	CDILVNNAGI	QHVSSIEEFP	VGKWNAILAI	NLSSAFHTTA	120
AALPGMRAGK	WGRIVNIASA	HGLTASPYKS	AYVAAKHGVV	GFTKVTALET	AGKGITCNAI	180
CPGYVLTPLV	EAQIPDQMK	HDMDRETIVR	EVMLDRQPSR	QFATTGQIGG	TVVFLCSGAA	240
DQITGTTISV	DGGWTAL					257

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

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

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

En un modo de realización de la presente invención, la 3-HBDH mutante de acuerdo con la presente invención puede comprender una o más sustituciones aminoacídicas, en particular un número limitado de sustituciones (por ejemplo, sustituciones de hasta 50, 40, 30, 20, especialmente 10 aminoácidos). Las sustituciones adecuadas se dan en los ejemplos, en particular en las tablas. Todas las sustituciones identificadas en los ejemplos como adecuadas para incrementar el rendimiento de la 3-HBDH se pueden usar en la invención, ya sea solas o en combinación entre sí y/o con sustituciones adicionales, por ejemplo, sustituciones conservadoras. "Sustitución aminoacídica conservadora" se refiere a una sustitución de un residuo con un residuo diferente que tiene una cadena lateral similar y, por tanto, típicamente implica la sustitución del aminoácido del polipéptido con aminoácidos dentro de la misma clase de aminoácidos definida o de una clase similar. A modo de ejemplo y sin limitación, un aminoácido con una cadena lateral alifática se puede sustituir con otro aminoácido alifático, por ejemplo, alanina, valina, leucina e isoleucina; un aminoácido con cadena lateral hidroxilo se sustituye con otro aminoácido con una cadena lateral hidroxílica, por ejemplo, serina y treonina; un aminoácido que tiene cadenas laterales aromáticas se sustituye con otro aminoácido que tiene una cadena lateral aromática, por ejemplo, fenilalanina, tirosina, triptófano e histidina; un aminoácido con una cadena lateral básica se sustituye con otro aminoácido con una cadena lateral básica, por ejemplo, lisina y arginina; un aminoácido con una cadena lateral ácida se sustituye con otro aminoácido con una cadena lateral ácida,

por ejemplo, ácido aspártico o ácido glutámico; y un aminoácido hidrófobo o hidrófilo se reemplaza con otro aminoácido hidrófobo o hidrófilo, respectivamente. Los ejemplos de sustituciones aminoacídicas conservadoras incluyen los que se enumeran a continuación:

<u>Residuo original</u>	<u>Sustituciones conservadoras</u>
Ala, Leu, Val, Ile	Otros alifáticos (Ala, Leu, Val, Ile) Otros apolares (Ala, Leu, Val, Ile, Gly, Met)
Gly, Met	Otros apolares (Ala, Leu, Val, Ile, Gly, Met)
Asp, Glu	Otros ácidos (Asp, Glu)
Lys, Arg	Otros básicos (Lys, Arg)
Asn, Gln, Ser, Thr	Otros polares (Asn, Gln, Ser, Thr)
His, Tyr, Trp, Phe Cys, Pro	Otros aromáticos (His, Tyr, Trp, Phe) Ninguno

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

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

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

En un modo de realización de la presente invención, la 3-HBDH mutante de acuerdo con la presente invención puede comprender una o más delecciones aminoacídicas, en particular delecciones N y/o C terminales. Las delecciones pueden ser pequeñas (por ejemplo, hasta 50, 40, 30, 20, especialmente 10 aminoácidos).

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

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

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

La identidad de secuencia de acuerdo con la presente invención se puede determinar, por ejemplo, mediante procedimientos de alineación de secuencias en forma de comparación de secuencias. Los procedimientos de

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

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

En otro modo de realización preferente, la enzima mutante de la presente invención tiene al menos una sustitución aminoacídica en relación con la 3-HBDH natural, en el que la al menos una sustitución aminoacídica está en una o más de las posiciones correspondientes a las posiciones 66, 109, 113, 125, 140, 144, 145, 195, 197, 217, 223, 232, 239, 250 y/o 257 de SEQ ID NO: 1, en particular al menos las posiciones 125, 144, 232 y/o 250 de SEQ ID NO: 1, más en particular al menos las posiciones 125, 144 y/o 250 de SEQ ID NO: 1, especialmente al menos la posición 250 de SEQ ID NO: 1. Se ha demostrado en los ejemplos que la sustitución del aminoácido en la posición correspondiente a las posiciones anteriores de SEQ ID NO: 1 incrementa la estabilidad y/o afinidad por los sustratos y/o cofactores (véanse, por ejemplo, las tablas 1A y 1B). Las sustituciones en estas posiciones se pueden combinar entre sí (véanse también los ejemplos).

Preferentemente, la 3-HBDH mutante de *Rhodobacter sphaeroides* con un rendimiento mejorado en relación con la 3-HBDH natural comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 (3-HBDH de *Rhodobacter sphaeroides*; 3-HBDH natural), tiene al menos una sustitución aminoacídica en relación con la 3-HBDH natural en una posición correspondiente a la posición 250, preferentemente 250Met, de SEQ ID NO: 1 y tiene al menos una sustitución aminoacídica adicional en una o más de las posiciones correspondientes a las posiciones 66, 109, 113, 125, 140, 144, 145, 195, 197, 217, 223, 232, 239 y/o 257 de SEQ ID NO: 1, en particular al menos las posiciones 125, 144 y/o 232 de SEQ ID NO: 1, más en particular al menos las posiciones 125 y/o 144 de SEQ ID NO: 1.

Los ejemplos en particular adecuados de sustituciones para una 3-HBDH mutante de la presente invención se dan a continuación:

- la posición 66 de SEQ ID NO: 1 se sustituye con Tyr (66Tyr) o Asn (66Asn);
- la posición 109 de SEQ ID NO: 1 se sustituye con Glu (109Glu);
- la posición 113 de SEQ ID NO: 1 se sustituye con Thr (113Thr);
- la posición 125 de SEQ ID NO: 1 se sustituye con Phe (125Phe);
- la posición 140 de SEQ ID NO: 1 se sustituye con Val (140Val);
- la posición 144 de SEQ ID NO: 1 se sustituye con Arg (144Arg);
- la posición 145 de SEQ ID NO: 1 se sustituye con Gly (145Gly);
- la posición 195 de SEQ ID NO: 1 se sustituye con Gln (195Gln) o Leu (195Leu);
- la posición 197 de SEQ ID NO: 1 se sustituye con Ile (197Ile);
- la posición 217 de SEQ ID NO: 1 se sustituye con Val (217Val);
- la posición 223 de SEQ ID NO: 1 se sustituye con Val (223Val);
- la posición 232 de SEQ ID NO: 1 se sustituye con Cys (232Cys), Tyr (232Tyr) o Trp (232Trp), especialmente 232Cys;
- la posición 239 de SEQ ID NO: 1 se sustituye con Tyr (239Tyr) o Trp (239Trp);

- la posición 250 de SEQ ID NO: 1 se sustituye con Met (250Met); y/o
- la posición 257 de SEQ ID NO: 1 se sustituye con Met (257Met) o Gln (257Gln).

5

Además, las sustituciones anteriores se pueden combinar con una o más de las siguientes sustituciones:

- la posición 37 de SEQ ID NO: 1 se sustituye con Tyr (37Tyr);
- la posición 202 de SEQ ID NO: 1 se sustituye con Gly (202Gly), y/o
- la posición 230 de SEQ ID NO: 1 se sustituye con Leu (230Leu),

10

en la que estas se combinan preferentemente con 250Met.

15

En un modo de realización en particular preferente de la presente invención,

a) la 3-HBDH mutante tiene al menos las mutaciones 125Phe, 144Arg, 232Cys y/o 250Met, en particular 125Phe, 144Arg y/o 250Met, más en particular 250Met correspondientes a las posiciones de SEQ ID NO: 1; o

20

b) la 3-HBDH mutante tiene las mutaciones

- 125Phe;
- 144Arg;
- 232Cys;
- 250Met;
- 230Leu y 250Met;
- 37Tyr y 250Met;
- 37Tyr, 230Leu y 250Met;
- 202Gly, 230Leu y 250Met;
- 37Tyr, 145Gly, 230Leu y 250Met; y/o
- 37Tyr, 195Gln, 230Leu y 250Met

25

30

35

40

correspondientes a las posiciones de SEQ ID NO: 1; o

45

c) la 3-HBDH mutante tiene solo las mutaciones

- 125Phe;
- 144Arg;
- 232Cys;
- 250Met;
- 230Leu y 250Met;
- 37Tyr y 250Met;
- 37Tyr, 230Leu y 250Met;
- 202Gly, 230Leu y 250Met;
- 37Tyr, 145Gly, 230Leu y 250Met; o
- 37Tyr, 195Gln, 230Leu y 250Met

50

55

60

65

correspondientes a las posiciones de SEQ ID NO: 1.

En un modo de realización aún más en particular preferente de la presente invención, la enzima mutante comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 (3-HBDH de *Rhodobacter sphaeroides*; 3-HBDH natural), tiene al menos una sustitución aminoacídica en relación con la 3-HBDH natural en una posición correspondiente a la posición 250, preferentemente 250Met, de SEQ ID NO: 1 y

a) tiene al menos las mutaciones 125Phe, 144Arg y/o 232Cys, en particular 125Phe y/o 144Arg, correspondientes a las posiciones de SEQ ID NO: 1; o

b) la 3-HBDH mutante tiene las mutaciones

– 125Phe;

– 144Arg;

– 232Cys;

– 250Met;

– 230Leu y 250Met;

– 37Tyr y 250Met;

– 37Tyr, 230Leu y 250Met;

– 202Gly, 230Leu y 250Met;

– 37Tyr, 145Gly, 230Leu y 250Met; y/o

– 37Tyr, 195Gln, 230Leu y 250Met

correspondientes a las posiciones de SEQ ID NO: 1; o

c) la 3-HBDH mutante tiene solo las mutaciones

– 250Met;

– 230Leu y 250Met;

– 37Tyr y 250Met;

– 37Tyr, 230Leu y 250Met;

– 202Gly, 230Leu y 250Met;

– 37Tyr, 145Gly, 230Leu y 250Met; o

– 37Tyr, 195Gln, 230Leu y 250Met

correspondientes a las posiciones de SEQ ID NO: 1.

En un modo de realización preferente de la presente invención, la 3-HBDH mutante comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos un 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 1 a 11, en particular en el que la 3-HBDH mutante comprende o consiste en la secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2 a 11.

Como se detalla anteriormente, la secuencia de SEQ ID NO: 1 se refiere a la 3-HBDH natural. Las secuencias de SEQ ID NO: 2 a 11 son las secuencias de enzimas mutantes preferentes. Las secuencias de SEQ ID NO: 5 a 11 son las secuencias de enzimas mutantes altamente preferentes. Las secuencias de las enzimas mutantes y las sustituciones efectuadas se muestran en la sección "Secuencias". La identidad de secuencia se puede determinar como se describe anteriormente.

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

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

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

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

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

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

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

enzima mutante en relación con la enzima natural se incrementa si el valor resultante es $> 100\%$. Una prueba adecuada particular para determinar la estabilidad se describe en detalle en el ejemplo 2. De acuerdo con esto, la estabilidad se puede expresar como actividad restante y calcular como $[dE/min \text{ (muestra en cond. extremas)}] / [dE/min \text{ (muestra en cond. no extremas)}] * 100$. Otros detalles se dan en el ejemplo 2. Un valor obtenido con una enzima mutante que sea mayor que el valor obtenido con la enzima natural representa una estabilidad incrementada de la enzima mutante.

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

Además, existen ventajas comerciales en la realización de reacciones enzimáticas a mayores temperaturas. En consecuencia, la estabilidad térmica de la enzima mutante se incrementa preferentemente. Esto significa que la resistencia de la enzima mutante en relación con la enzima natural a temperaturas incrementadas es mayor. El incremento de la estabilidad térmica se puede determinar en particular como se muestra en los ejemplos, por ejemplo, en los ejemplos 2 y 3. En general, la enzima mutante y la enzima natural se pueden preincubar a una temperatura incrementada (por ejemplo, por encima de $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, tal como $54\text{ }^{\circ}\text{C}$ o $64\text{ }^{\circ}\text{C}$) durante un periodo de tiempo definido (tal como 10 min o 30 min), después de ello la actividad restante en la conversión de 3-HB en acetoacetato de la enzima mutante se compara con la actividad restante de la enzima natural. Si la actividad restante de la enzima mutante es mayor que la de la enzima natural, la enzima mutante tiene una estabilidad térmica incrementada.

En los ejemplos se detalla un procedimiento adecuado para la determinación de la estabilidad térmica incrementada. Condiciones ejemplares de condiciones extremas pueden ser preincubación a $50\text{--}90\text{ }^{\circ}\text{C}$, en particular a $50\text{--}64\text{ }^{\circ}\text{C}$ (por ejemplo, $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ o $54\text{ }^{\circ}\text{C}$ o $64\text{ }^{\circ}\text{C}$) durante 30 min y, a continuación, someter a prueba con 3-hidroxibutirato $62,22\text{ mM}$; cNAD $4,15\text{ mM}$; Triton X-100 al $0,1\%$; Hepes 200 mM a pH $9,0$ o 3-hidroxibutirato 150 mM ; cNAD 5 mM ; Triton X-100 al $0,1\%$; Mops 70 mM a pH $7,5$.

La expresión "afinidad por sustrato incrementada, especialmente por 3-hidroxibutirato, en relación con la 3-HBDH natural" significa que la afinidad de la enzima mutante por el sustrato ácido 3-hidroxibutírico / 3-hidroxibutirato / 3-hidroxibutanoato (3-HB) que se convierte en acetoacetato se incrementa. Para la determinación, la reacción enzimática se puede monitorizar (por ejemplo, a temperatura ambiente a 340 nm durante 5 minutos) y se puede calcular el dE/min para cada muestra. La afinidad de la enzima mutante se incrementa en comparación con la enzima natural si la enzima mutante, por ejemplo, tiene una mayor afinidad absoluta o relativa por el sustrato, en particular, 3-HB. La afinidad de la enzima mutante en comparación con la enzima natural se puede determinar comparando las afinidades absolutas de ambas enzimas (natural y mutante) (comparación absoluta) y se puede calcular en porcentaje de actividad $((dE/min \text{ (mutante)} / dE \text{ (natural)}) * 100) (\%)$. De forma alternativa, la afinidad de la enzima mutante en comparación con la enzima natural se puede determinar comparando las afinidades relativas de ambas enzimas (natural y mutante) (comparación relativa). La afinidad relativa de la enzima natural o mutante se puede determinar ajustando la afinidad a la concentración de sustrato de subsaturación en relación con la afinidad a la concentración de sustrato de saturación. Como se detalla en los ejemplos 2 y 3, la afinidad por 3-hidroxibutirato se puede determinar en un ensayo de actividad con una cantidad reducida de sustrato (es decir, a una concentración de subsaturación), por ejemplo, con 3-hidroxibutirato $1,94\text{ mM}$ (otras condiciones ejemplares: cNAD $4,15\text{ mM}$; Triton X-100 al $0,1\%$; Hepes 200 mM a pH $9,0$). Una prueba adecuada particular para determinar la afinidad se describe en detalle en el ejemplo 2. De acuerdo con esto, la afinidad se puede expresar como actividad relativa y calcular como $[dE/min \text{ (concentración de sustrato de subsaturación)}] / [dE/min \text{ (concentración de sustrato de saturación)}] * 100$. Otros detalles se dan en el ejemplo 2. Un valor obtenido con una enzima mutante que sea mayor que el valor obtenido con la enzima natural representa un incremento de la afinidad para la enzima mutante.

Una afinidad incrementada se correlaciona con un valor de K_m menor. La constante de Michaelis K_m es la concentración del sustrato a la que la velocidad de reacción de la enzima es la mitad del máximo y es una medida inversa de la afinidad del sustrato por la enzima.

La expresión "afinidad por cofactor incrementada, especialmente por NAD o un derivado del mismo, en particular en el que el derivado es carba-NAD, en relación con la 3-HBDH natural" significa que la afinidad de la enzima mutante por el cofactor (NAD o un derivado del mismo, especialmente carba-NAD) necesaria para convertir 3-HB en acetoacetato se incrementa. Como se detalla en los ejemplos 2 y 3, la afinidad por el cofactor se puede determinar en un ensayo de actividad con una cantidad reducida de cofactor (es decir, por debajo del nivel de saturación), por ejemplo, con cNAD $0,032\text{ mM}$ (otras condiciones ejemplares: 3-hidroxibutirato $62,22\text{ mM}$; Triton X-100 al $0,1\%$; Hepes 200 mM , pH $9,0$) o cNAD $0,5\text{ mM}$. Los detalles anteriores dados con respecto a la afinidad por el sustrato son análogamente aplicables a la afinidad por el cofactor. Una prueba adecuada particular para determinar la afinidad se describe en detalle en el ejemplo 2.

En particular, la 3-HBDH mutante de la presente invención se caracteriza por que la 3-HBDH mutante tiene una estabilidad incrementada en al menos un factor 2 en relación con la 3-HBDH natural, preferentemente una estabilidad incrementada en al menos un factor 3, preferentemente una estabilidad incrementada en al menos un factor 4, más preferentemente una estabilidad incrementada en al menos un factor 5; y/o se caracteriza por que la 3-HBDH mutante

tiene una afinidad incrementada por el sustrato y/o cofactor en relación con la 3-HBDH natural, en particular una afinidad incrementada por (i) 3-hidroxibutirato y/o (ii) dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD) o un derivado funcionalmente activo del mismo y/o en particular en el que la afinidad por el sustrato y/o cofactor se incrementa en al menos un 5 %, más en particular en al menos un 10 %, todavía más en particular en al menos un 15 % o 20 %.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un ácido nucleico que codifica la 3-HBDH mutante de la presente invención como se describe anteriormente.

La expresión "ácido nucleico", como se usa en el presente documento, se refiere en general a cualquier molécula de nucleótidos que codifica la 3-HBDH mutante de la invención y que puede ser de longitud variable. Los ejemplos de un ácido nucleico de la invención incluyen, pero no se limitan a, plásmidos, vectores o cualquier tipo de fragmento(s) de ADN y/o ARN que se puedan aislar mediante procedimientos estándar de biología molecular, incluyendo, por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico. Un ácido nucleico de la invención se puede usar para la transfección o transducción de una célula u organismo particular.

La molécula de ácido nucleico de la presente invención puede estar en forma de ARN, tal como ARNm o ARNc, o en forma de ADN, incluyendo, por ejemplo, ADNc y ADN genómico, por ejemplo, obtenido por clonación o producido por técnicas químicas sintéticas o por una combinación de los mismos. El ADN puede ser tricatenario, bicatenario o monocatenario. El ADN monocatenario puede ser la hebra codificante, también conocida como la hebra de sentido, o puede ser la hebra no codificante, también conocida como la hebra de antisentido. Como se usa en el presente documento, molécula de ácido nucleico también se refiere, entre otros, a ADN monocatenario y bicatenario, ADN que es una mezcla de ARN monocatenario y bicatenario, y ARN que es una mezcla de regiones monocatenarias y bicatenarias, moléculas híbridas que comprenden ADN y ARN que pueden ser monocatenarios o, más típicamente, bicatenarios o tricatenarios, o una mezcla de regiones monocatenarias y bicatenarias. Además, como se usa en el presente documento, molécula de ácido nucleico se refiere a regiones tricatenarias que comprenden ARN o ADN o tanto ARN como ADN.

Adicionalmente, el ácido nucleico puede contener una o más bases modificadas. Dichos ácidos nucleicos también pueden contener modificaciones, por ejemplo, en la cadena principal de ribosa-fosfato para incrementar la estabilidad y la semivida de dichas moléculas en entornos fisiológicos. Por tanto, los ADN o ARN con cadenas principales modificadas para incrementar la estabilidad o por otros motivos son "moléculas de ácido nucleico" como un rasgo característico previsto en el presente documento. Además, los ADN o ARN que comprenden bases inusuales, tales como inosina, o bases modificadas, tales como bases tritiladas, por nombrar solo dos ejemplos, son moléculas de ácido nucleico dentro del contexto de la presente invención. Se apreciará que se ha realizado una gran variedad de modificaciones en el ADN y el ARN que cumplen muchos propósitos útiles conocidos por los expertos en la técnica. La expresión molécula de ácido nucleico como se emplea en el presente documento abarca dichas formas de molécula de ácido nucleico modificadas química, enzimática o metabólicamente, así como las formas químicas de ADN y ARN características de virus y células, incluyendo células simples y complejas, entre otras.

Además, la molécula de ácido nucleico que codifica la 3-HBDH mutante de la invención se puede enlazar de forma funcional, usando técnicas estándar tales como técnicas de clonación estándar, a cualquier secuencia deseada, tal como una secuencia reguladora, secuencia líder, secuencia marcadora heteróloga o una secuencia codificante heteróloga para crear una proteína de fusión.

El ácido nucleico de la invención se puede formar originalmente *in vitro* o en una célula en cultivo, en general, mediante la manipulación de ácidos nucleicos por endonucleasas y/o exonucleasas y/o polimerasas y/o ligasas y/o recombinasas u otros procedimientos conocidos por el experto para producir los ácidos nucleicos.

El ácido nucleico de la invención puede estar comprendido en un vector de expresión, en el que el ácido nucleico está enlazado de forma funcional a una secuencia promotora que puede promover la expresión del ácido nucleico en una célula huésped.

Como se usa en el presente documento, la expresión "vector de expresión" se refiere en general a cualquier tipo de molécula de ácido nucleico que se pueda usar para expresar una proteína de interés en una célula (véanse también los detalles anteriores sobre los ácidos nucleicos de la presente invención). En particular, el vector de expresión de la invención puede ser cualquier plásmido o vector conocido por el experto en la técnica que sea adecuado para expresar una proteína en una célula huésped particular que incluye, pero no se limita a, células de mamífero, célula bacteriana y células de levadura. Una construcción de expresión de la presente invención también puede ser un ácido nucleico que codifica una 3-HBDH de la invención, y que se usa para la clonación posterior en un vector respectivo para garantizar la expresión. Los plásmidos y vectores para la expresión de proteínas son bien conocidos en la técnica, y se pueden adquirir comercialmente de diversos proveedores, incluyendo, por ejemplo, Promega (Madison, WI, EE. UU.), Qiagen (Hilden, Alemania), Invitrogen (Carlsbad, CA, EE. UU.) o MoBiTec (Alemania). El experto en la técnica conoce bien los procedimientos de expresión de proteínas y se describen, por ejemplo, en Sambrook *et al.*, 2000 (Molecular Cloning: A laboratory manual, tercera edición).

El vector puede incluir adicionalmente secuencias de ácido nucleico que le permitan replicarse en la célula huésped,

tales como un origen de replicación, uno o más genes terapéuticos y/o genes marcadores seleccionables y otros elementos genéticos conocidos en la técnica, tales como elementos reguladores que dirigen la transcripción, traducción y/o secreción de la proteína codificada. El vector se puede usar para transducir, transformar o infectar una célula, provocando de este modo que la célula exprese ácidos nucleicos y/o proteínas distintas de las naturales de la célula. El vector incluye opcionalmente materiales para ayudar a lograr la entrada del ácido nucleico en la célula, tales como una partícula vírica, liposoma, recubrimiento proteico o similares. Se conocen en la técnica numerosos tipos de vectores de expresión apropiados para la expresión de proteínas, mediante técnicas estándar de biología molecular. Dichos vectores se seleccionan de entre tipos de vectores convencionales que incluyen insectos, por ejemplo, expresión en baculovirus, o sistemas de expresión de levadura, fúngicos, bacterianos o víricos. Para este propósito también se pueden usar otros vectores de expresión apropiados, de los que numerosos tipos son conocidos en la técnica. Los procedimientos para obtener dichos vectores de expresión son bien conocidos (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, *supra*).

Como se detalla anteriormente, el ácido nucleico que codifica una 3-HBDH mutante de la invención se enlaza de forma funcional a una secuencia que es adecuada para dirigir la expresión de una proteína en una célula huésped, para garantizar la expresión de la proteína. Sin embargo, se incluye dentro de la presente invención que la construcción de expresión reivindicada puede representar un producto intermedio, que posteriormente se clona en un vector de expresión adecuado para garantizar la expresión de la proteína. El vector de expresión de la presente invención puede comprender además todo tipo de secuencias de ácido nucleico, que incluyen, pero no se limitan a, señales de poliadenilación, señales de donante de ajuste y aceptor de ajuste, intrones, secuencias potenciadoras de la transcripción, secuencias potenciadoras de la traducción, uno o más genes de resistencia a fármacos o similares. Opcionalmente, el gen de resistencia a fármacos se puede enlazar de forma funcional a un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES), que podría ser específico del ciclo celular o independiente del ciclo celular.

La expresión "enlazado de forma funcional", como se usa en el presente documento, significa en general que los elementos génicos están dispuestos de modo que funcionan en concierto para los propósitos previstos, por ejemplo, en que la transcripción se inicia por el promotor y continúa a través de la secuencia de ADN que codifica la proteína de la presente invención. Es decir, la ARN-polimerasa transcribe la secuencia que codifica la proteína de fusión en ARNm, que a continuación se empalma y se traduce en una proteína.

La expresión "secuencia promotora", como se usa en el contexto de la presente invención, se refiere en general a cualquier tipo de secuencia reguladora de ADN enlazada de forma funcional a una secuencia codificante en dirección 3', en el que dicho promotor se puede unir a la ARN-polimerasa e iniciar la transcripción del marco abierto de lectura codificado en una célula, dirigiendo de este modo la expresión de dicha secuencia codificante en dirección 3'. La secuencia promotora de la presente invención puede ser cualquier tipo de secuencia promotora conocida por el experto en la técnica, que incluye, pero no se limita a, promotores constitutivos, promotores inducibles, promotores específicos del ciclo celular y promotores específicos del tipo celular.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una célula que comprende la 3-HBDH mutante de la presente invención o el ácido nucleico de la presente invención. En un modo de realización de la presente invención, una célula que comprende la enzima mutante se usa en el contexto de la presente invención. La célula es preferentemente una célula huésped. Una "célula huésped" de la presente invención puede ser cualquier tipo de organismo adecuado para su aplicación en tecnología de ADN recombinante, e incluye, pero no se limita a, toda clase de cepas bacterianas y de levadura que sean adecuadas para expresar una o más proteínas recombinantes. Los ejemplos de células huésped incluyen, por ejemplo, diversas cepas de *Bacillus subtilis* o *E. coli*. Un experto en la técnica conoce una variedad de células huésped bacterianas de *E. coli* e incluye, pero no se limita a, cepas tales como DH5-alfa, HB101, MV1190, JM109, JM101 o XL1-Blue que se pueden adquirir comercialmente de diversos proveedores, incluyendo, por ejemplo, Stratagene (CA, EE. UU.), Promega (WI, EE. UU.) o Qiagen (Hilden, Alemania). Una célula huésped en particular adecuada también se describe en los ejemplos, a saber, células XL1-Blue de *E. coli*. Las cepas de *Bacillus subtilis* que se pueden usar como célula huésped incluyen, por ejemplo, 1012 natural: leuA8 metB5 trpC2 hsdRM1 y 168 Marburg: trpC2 (Trp-), que están disponibles comercialmente en MoBiTec (Alemania).

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

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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

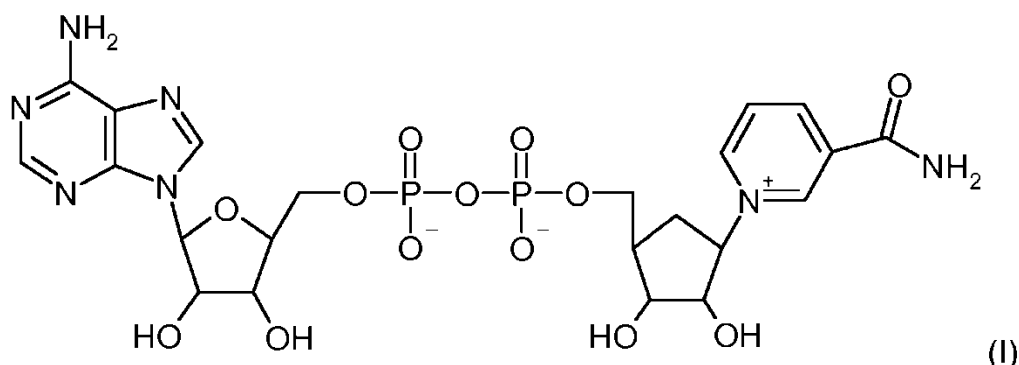
Se conoce en la técnica una variedad de procedimientos para determinar NADH/NAD o derivado del mismo y se puede usar cualquiera de ellos.

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

mediadora oxidorreductora adicional que cambia su estado de oxidorreducción en una relación definida con el estado de oxidorreducción del NADH/NAD o derivado del mismo y este mediador oxidorreductor reacciona en una etapa posterior en el electrodo de medición.

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

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



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

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

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

Un sensor es una entidad que mide una cantidad física/química y la convierte en una señal que puede leer un observador o un instrumento. En la presente invención, la 3-HBDH puede formar parte de un sensor. El sensor convierte 3-HB y NAD o un derivado del mismo en acetoacetato y NADH o un derivado del mismo, que luego se convierte en una señal tal como un cambio de color o un valor mostrado, por ejemplo, en una pantalla o monitor.

En un modo de realización, el sensor puede comprender 3-HBDH y un dispositivo amperométrico para determinar 3-HB de una muestra. Además, se podría usar un sistema de microdiálisis acoplado a una cubeta de lectura electroquímica para la monitorización continua de 3-HB en una muestra o sujeto. El electrodo de trabajo de la cubeta de lectura se podría preparar con la 3-HBDH inmovilizada en una película de polímero oxidorreductor sobre la superficie del electrodo. El acoplamiento de un sensor electroquímico con 3-HB directamente con microdiálisis elimina la necesidad de transferir partes alícuotas de muestra a un sistema de cromatografía de líquidos con un reactor de enzima oxidasa poscolumna. El 3-HB en el dializado de la sonda de microdiálisis se puede detectar selectivamente en el electrodo enzimático sin ninguna interferencia significativa de otras especies oxidables. Además, los biosensores acoplados a enzimas se han descrito en la técnica. De acuerdo con esto, la 3-HBDH se puede acoplar a una superficie (por ejemplo, imprimiendo una mezcla de 3-HBDH y grafito en almohadillas de grafito electrodepositado o mediante adsorción o inmovilización de la 3-HBDH mutante en partículas de carbono, partículas de carbono platinado, partículas de carbono/dióxido de manganeso, carbono vítreo o mezclándolo con electrodos de pasta de carbono, etc.)

Una tira reactiva o un elemento de prueba es un dispositivo analítico o de diagnóstico usado para determinar la presencia y/o cantidad de una sustancia objetivo dentro de una muestra. Una tira reactiva estándar puede comprender una o más zonas de reacción o almohadillas diferentes que comprenden reactivos que reaccionan (por ejemplo, cambian de color) cuando se ponen en contacto con una muestra. Las tiras reactivas son conocidas en muchos modos de realización, por ejemplo, de los documentos US 6.541.216, EP 262445 y US 4816224. Se sabe comúnmente que uno o más reactivos (por ejemplo, enzimas) necesarios para llevar a cabo los procedimientos de determinación están

presentes sobre o en capas de soporte sólido. Como capas de soporte, existen materiales absorbentes y/o hinchables especialmente preferentes que se humedecen con el líquido de muestra que se va a analizar. Los ejemplos incluyen capas de gelatina, celulosa y lana sintética (forro polar).

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

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

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

En consecuencia y preferentemente, el procedimiento de la presente invención se caracteriza además por que

- 30 a) en el que la determinación del cambio de estado de oxidorreducción de NAD o el derivado del mismo incluye la determinación de la concentración de (i) NAD o el derivado del mismo y/o (ii) NADH o el derivado del mismo; y/o
- b) en el que la determinación del cambio de estado de oxidorreducción de NAD o el derivado del mismo es electroquímica u óptica; y/o
- 35 c) en el que el procedimiento comprende además determinar la cantidad o concentración de acetoacetato y/o acetona; y/o
- d) en el que el procedimiento comprende además determinar la cantidad o concentración de glucosa; y/o
- 40 e) en el que el derivado de NAD es carba-NAD; y/o
- f) en el que la 3-HBDH mutante forma parte de un sensor, una tira reactiva, un elemento de prueba, un dispositivo de tiras reactivas o una prueba líquida; y/o
- 45 g) en el que la muestra es un líquido corporal, en particular una muestra de sangre o una muestra de orina.

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

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

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

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

65 La 3-HBDH de la presente invención puede formar parte de un dispositivo para determinar el 3-HB en una muestra. El dispositivo puede ser cualquier dispositivo adecuado para este propósito. El dispositivo puede ser una máquina o herramienta que se puede usar para determinar el 3-HB. Preferentemente, el dispositivo es un sensor,

preferentemente un sensor electroquímico o una tira reactiva. Los dispositivos ejemplares se describen anteriormente y a continuación:

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

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

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

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

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

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

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

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

A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos y cualquier acrónimo usado en el presente documento tienen los mismos significados que comúnmente entiende un experto en la técnica en el campo de la invención. Las definiciones de los términos comunes en biología molecular se pueden encontrar en Benjamin Lewin, Genes V, publicado por Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew *et al.*, (autores de la edición), The Encyclopedia of Molecular Biology, publicado por Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); y Robert A. Meyers (autor de la edición), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, publicado por VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8).

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

Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar diversos modos de realización de la invención. Como tales, las modificaciones específicas analizadas no se deben interpretar como limitaciones del alcance de la invención.

EJEMPLOS

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

El gen para la 3-hidroxi-butarato deshidrogenasa (3-HBDH) de *Rhodobacter sphaeroides* (base de datos UniProtKB - D0VWQ0) se sintetizó, se clonó en el vector pKkt5 y se transformó en la cepa XL1-Blue de *E. coli* mediante procedimientos conocidos de biología molecular.

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

(Agilent Technologies Cat. 200518).

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

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

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

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

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

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

De la placa de trabajo se transfirieron 4 x 20 µl de muestra/cavidad a cuatro pmv vacías. Una de estas se sometió a prueba con 3-hidroxibutirato 62,22 mM; cNAD 4,15 mM; Triton X-100 al 0,1 %; Hepes 200 mM, pH 9,0 a temperatura ambiente y se denomina medición de referencia. Las otras pmv se sometieron a prueba en diferentes condiciones y los valores obtenidos se compararon con la placa de referencia en porcentaje.

Se midieron los siguientes parámetros:

– Estabilidad térmica: La pmv se incubó durante 30 min a 50 °C (a menos que se indique de otro modo) y se sometió a prueba posteriormente con 3-hidroxibutirato 62,22 mM; cNAD 4,15 mM; Triton X-100 al 0,1 %; Hepes 200 mM a pH 9,0

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

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

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

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

$$\left(\frac{\text{dE/min muestra en cond. extremas (es decir, en el ejemplo 2: 30 min. a 50 °C)}}{\text{dE/min muestra en cond. no extremas}} \right) * 100$$

= actividad restante en porcentaje

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

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

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

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

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

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

Los datos por debajo de 0,001 dE/min se establecieron como cero, dando como resultado valores "cero".

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

En una primera ronda de mutagénesis de saturación se encontraron las siguientes enzimas mutantes:

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

Clon	Afinidad por		Estabilidad térmica
	3-HB	cNAD	
WT + D2G	+	o	o
WT + D2S	+	o	+
WT + N4T	+	nt	o
WT + N4C	+	nt	o
WT + T11P	+	+	+
WT + N14T	+	nt	o
WT + E23N	+	o	-
WT + F37Y	+	nt	+
WT + E42C	o	o	+
WT + S57N	+	nt	o
WT + S57C	+	nt	+
WT + S57Y	+	nt	o
WT + S57P	+	nt	+
WT + A62P	+	o	o
WT + A62R	++	o	+
WT + S66N	o	o	++
WT + S66Y	o	o	++
WT + D67C	o	o	+
WT + E69M	+	o	+
WT + E76D	o	o	+
WT + D87A	-	nt	+
WT + Q90T	-	nt	+
WT + H92Q	++	0	--
WT + S94A	+	nt	+
WT + S95R	++	++	+
WT + E97I	+	+	-
WT + E98T	o	o	+
WT + A106E	o	o	+

ES 2 782 199 T3

WT + A109E	o	o	++
WT + A109T	o	o	++
WT + N111I	-	nt	+
WT + S113T	o	o	++
WT + A115Y	-	-	+
WT + G125F	+	o	++
WT + A128K	o	o	+
WT + A140V	-	-	++
WT + T144R	+	o	+
WT + T144V	-	o	+
WT + A145G	o	o	+
WT + P147R	+	+	-
WT + P147Q	+	+	-
WT + V165T	-	-	+
WT + V185I	+	+	-
WT + L186K	+	o	-
WT + P188E	-	-	+
WT + P195Q	-	-	++
WT + P195 L	-	-	++
WT + D196L	-	-	+
WT + Q197I	-	-	++
WT + A200K	-	nt	+
WT + A200L	+	nt	o
WT + D202G	+	+	+
WT + D202N	+	+	+
WT + M203V	+	+	-
WT + T207R	+	+	-
WT + V208Y	-	nt	++
WT + V212I	++	o	-
WT + Q217V	-	-	++
WT + A223V	-	-	++
WT + T225P	o	o	+
WT + G226K	o	o	+
WT + G230C	++	nt	-
WT + G230L	++	nt	o
WT + V232C	+	o	++
WT + V232Y	o	o	++
WT + V232W	o	o	++
WT + V232P	+	+	-
WT + A239V	+	o	-
WT + A239Y	o	o	++
WT + A239W	o	o	++
WT + A239P	+	o	-
WT + V250I	++	nt	+
WT + V250M	+	o	++
WT + L257M	o	o	++
WT + L257Q	-	-	++
WT + L257M	o	o	++

(+ = mejorado; o = similar; - = disminuido; nt = no sometido a prueba)

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

Clon	Afinidad por*		Estabilidad térmica**
	3-HB	cNAD	
WT	33	9	16
WT + S66Y	34	10	100
WT + S66N	35	8	95
WT + A109E	26	5	99
WT + S113T	34	11	100
WT + G125F	39	8	92
WT + A140V	13	4	100
WT + T144R	40	13	100
WT + A145G	30	7	100
WT + P195Q	11	4	100
WT + P195L	10	5	96
WT + Q197I	21	5	100
WT + Q217V	22	3	100
WT + A223V	18	6	100
WT + V232C	41	11	100
WT + V232Y	31	4	100
WT + V232W	30	4	100
WT + A239Y	31	4	100
WT + A239W	30	4	100
WT + V250M	40	10	100
WT + L257M	34	10	100
WT + L257Q	22	7	100

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

** dado como actividad restante (%) después de una incubación de 30 minutos a 50 °C

10 La tabla muestra que, a menudo, la mejora de la estabilidad térmica tiene un efecto sobre la afinidad por el sustrato y/o cofactor. Se encontraron cuatro posiciones para mejorar los parámetros tanto de estabilidad como de afinidad: Posiciones 125, 144, 232 y 250 de SEQ ID NO: 1.

15 Se eligió un mutante ejemplar con intercambio V250M para una optimización adicional mediante la combinación de posiciones encontradas adicionales.

Ejemplo 3 Cribado de mutantes de 3-HBDH de la segunda ronda de mutagénesis (enzimas mutantes con sustitución aminoacídica V250M/I y opcionalmente una o más sustituciones aminoacídicas adicionales)

20 A menos que se indique de otro modo, los experimentos se han llevado a cabo como se detalla en el ejemplo 2. En una segunda ronda de mutagénesis, las sustituciones seleccionadas se combinaron en la variante WT + V250M. Los resultados se resumen en las tablas 2A y 2B:

Tabla 2A: Estabilidad térmica (54 °C, 30 min) y afinidad de diversas enzimas mutantes con sustitución aminoacídica V250M o V250I

Clon	Afinidad por*		Estabilidad térmica**
	3-HB	cNAD	
WT	33	9	0 (5 50 °C)
WT + V250I	41	nt	0 (27 50 °C)
WT + V250M	41	16	31 (83 50 °C)
WT + G230L + V250M	37	8	75

WT + F37Y + V250M	40	17	33
WT + A140V + V250M	9	5	44
WT + F37Y + G230L + V250M	37	10	89
WT + F37Y + A140V + V250M	13	4	75
WT + A140V + G230L + V250M	13	5	80
WT + D202G + G230L + V250M	41	9	74

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

** dado como actividad restante (%) después de una incubación de 30 minutos a 54 °C (a menos que se indique de otro modo)

nt no sometido a prueba

La tabla 2A muestra que múltiples sustituciones (además de V250M) muestran una estabilidad aún más incrementada. Las enzimas mutantes WT + G230L + V250M, WT + F37Y + V250M, WT + F37Y + G230L + V250M y WT + D202G + G230L + V250M son de particular interés, ya que también muestran buena afinidad por 3-HB.

La variante ejemplar WT + F37Y + G230L + V250M se combinó además con otras posiciones encontradas. Los resultados se resumen en la tabla 2B:

Tabla 2B: Estabilidad térmica (64 °C, 30 min) y afinidad de diversas enzimas mutantes con sustituciones aminoacídicas F37Y, G230L y V250M

Clon	Afinidad por*		Estabilidad térmica**
	3-HB	cNAD	
WT + F37Y + G230L + V250M	36	4	7
WT + F37Y + P195Q + G230L + V250M	13	4	51
WT + F37Y + A145G + G230L + V250M	34	11	29

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

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

La tabla 2B muestra que la estabilidad de la enzima mutante WT + F37Y + G230L + V250M se puede incrementar aún más mediante la adición de la sustitución P195Q o A145G, que también muestran una afinidad aceptable por 3-HB y cNAD.

SECUENCIAS

WT: 3-HBDH natural de *Rhodobacter sphaeroides*

(SEQ ID NO: 1)

```
MDLNGKRAIV TGSNSGIGLG CAELARAGA EVVINSFTDR DEDHALAEKI GREHGVSCRY 60
IAADMSDGEA CRALIETAGG CDILVNNAGI QHVSSIEEFP VGKWNAILAI NLSSAFHTTA 120
AALPGMRAKG WGRIVNIA SA HGLTASPYKS AYVAAKHGVV GFTKVTAL ET AGKGITCNAI 180
CPGYVLTPLV EAQIPDQ MKA HDMDRETVIR EVMLDRQPSR QFATTGQIGG TVVFLCSGAA 240
DQITGTTISV DGGWTAL 257
```

WT + G125F

(SEQ ID NO: 2)

```
MDLNGKRAIV TGSNSGIGLG CAELARAGA EVVINSFTDR DEDHALAEKI GREHGVSCRY 60
IAADMSDGEA CRALIETAGG CDILVNNAGI QHVSSIEEFP VGKWNAILAI NLSSAFHTTA 120
AALPFMRAKG WGRIVNIA SA HGLTASPYKS AYVAAKHGVV GFTKVTAL ET AGKGITCNAI 180
CPGYVLTPLV EAQIPDQ MKA HDMDRETVIR EVMLDRQPSR QFATTGQIGG TVVFLCSGAA 240
DQITGTTISV DGGWTAL 257
```

WT + T144R

(SEQ ID NO: 3)

ES 2 782 199 T3

MDLNGKRAIV	TGSNSGIGLG	CAEELARAGA	EVVINSFTDR	DEDHALAEKI	GREHGVSCRY	60
IAADMSDGEA	CRALIETAGG	CDILVNNAGI	QHVSSIEEFP	VGKWNAILAI	NLSSAFHTTA	120
AALPGMRAKG	WGRIVNIAA	HGL <u>R</u> ASPYKS	AYVAAKHG	VV	GFTKVTALET	180
CPGYVLTPLV	EAQIPDQMK	A	HDMDRETVIR	EVMLDRQPSR	QFATTGQIGG	240
DQITGTTISV	DGGWTAL					257

WT + V232C

(SEQ ID NO: 4)

MDLNGKRAIV	TGSNSGIGLG	CAEELARAGA	EVVINSFTDR	DEDHALAEKI	GREHGVSCRY	60
IAADMSDGEA	CRALIETAGG	CDILVNNAGI	QHVSSIEEFP	VGKWNAILAI	NLSSAFHTTA	120
AALPGMRAKG	WGRIVNIAA	HGLTASPYKS	AYVAAKHG	VV	GFTKVTALET	180
CPGYVLTPLV	EAQIPDQMK	A	HDMDRETVIR	EVMLDRQPSR	QFATTGQIGG	240
DQITGTTISV	DGGWTAL				<u>T</u> CVFLCSGAA	257

5

WT + V250M

(SEQ ID NO: 5)

MDLNGKRAIV	TGSNSGIGLG	CAEELARAGA	EVVINSFTDR	DEDHALAEKI	GREHGVSCRY	60
IAADMSDGEA	CRALIETAGG	CDILVNNAGI	QHVSSIEEFP	VGKWNAILAI	NLSSAFHTTA	120
AALPGMRAKG	WGRIVNIAA	HGLTASPYKS	AYVAAKHG	VV	GFTKVTALET	180
CPGYVLTPLV	EAQIPDQMK	A	HDMDRETVIR	EVMLDRQPSR	QFATTGQIGG	240
DQITGTTIS <u>M</u>	DGGWTAL					257

10

WT + G230L + V250M

(SEQ ID NO: 6)

MDLNGKRAIV	TGSNSGIGLG	CAEELARAGA	EVVINSFTDR	DEDHALAEKI	GREHGVSCRY	60
IAADMSDGEA	CRALIETAGG	CDILVNNAGI	QHVSSIEEFP	VGKWNAILAI	NLSSAFHTTA	120
AALPGMRAKG	WGRIVNIAA	HGLTASPYKS	AYVAAKHG	VV	GFTKVTALET	180
CPGYVLTPLV	EAQIPDQMK	A	HDMDRETVIR	EVMLDRQPSR	QFATTGQIGG	240
DQITGTTISV	DGGWTAL					257

15

WT + F37Y + V250M

(SEQ ID NO: 7)

MDLNGKRAIV	TGSNSGIGLG	CAEELARAGA	EVVINS <u>Y</u> TDR	DEDHALAEKI	GREHGVSCRY	60
IAADMSDGEA	CRALIETAGG	CDILVNNAGI	QHVSSIEEFP	VGKWNAILAI	NLSSAFHTTA	120
AALPGMRAKG	WGRIVNIAA	HGLTASPYKS	AYVAAKHG	VV	GFTKVTALET	180
CPGYVLTPLV	EAQIPDQMK	A	HDMDRETVIR	EVMLDRQPSR	QFATTGQIGG	240
DQITGTTIS <u>M</u>	DGGWTAL					257

20

WT + F37Y + G230L + V250M

(SEQ ID NO: 8)

MDLNGKRAIV	TGSNSGIGLG	CAEELARAGA	EVVINS <u>Y</u> TDR	DEDHALAEKI	GREHGVSCRY	60
IAADMSDGEA	CRALIETAGG	CDILVNNAGI	QHVSSIEEFP	VGKWNAILAI	NLSSAFHTTA	120
AALPGMRAKG	WGRIVNIAA	HGLTASPYKS	AYVAAKHG	VV	GFTKVTALET	180
CPGYVLTPLV	EAQIPDQMK	A	HDMDRETVIR	EVMLDRQPSR	QFATTGQIG <u>L</u>	240
DQITGTTIS <u>M</u>	DGGWTAL					257

WT + D202G + G230L + V250M

(SEQ ID NO: 9)

MDLNGKRAIV	TGSNSGIGLG	CAEELARAGA	EVVINSFTDR	DEDHALAEKI	GREHGVSCRY	60
IAADMSDGEA	CRALIETAGG	CDILVNNAGI	QHVSSIEEFP	VGKWNAILAI	NLSSAFHTTA	120
AALPGMRAKG	WGRIVNIAA	HGLTASPYKS	AYVAAKHG	VV	GFTKVTALET	180
CPGYVLTPLV	EAQIPDQMK	<u>H</u> GMDRETVIR	EVMLDRQPSR	QFATTGQIG <u>L</u>	TVVFLCSGAA	240
DQITGTTIS <u>M</u>	DGGWTAL					257

25

WT + F37Y + A145G + G230L + V250M

(SEQ ID NO: 10)

ES 2 782 199 T3

MDLNGKRAIV	TGSNSGIGLG	CAEELARAGA	EVVINS <u>Y</u> TDR	DEDHALAEKI	GREHGVSCRY	60
IAADMSDGEA	CRALIETAGG	CDILVNNAGI	QHVSSIIEFP	VGKWNAILAI	NLSSAFHTTA	120
AALPGMRAKG	WGRIVNIASA	HGLT <u>G</u> SPYKS	AYVAAKHGVV	GFTKVTALET	AGKGITCNAI	180
CPGYVLTPLV	EAQIPDQMK	HDMDRETIVR	EVMLDRQPSR	QFATTGQIG <u>L</u>	TVVFLCSGAA	240
DQITGTTIS <u>M</u>	DGGWTAL					257

WT + F37Y + P195Q + G230L + V250M

(SEQ ID NO: 11)

MDLNGKRAIV	TGSNSGIGLG	CAEELARAGA	EVVINS <u>Y</u> TDR	DEDHALAEKI	GREHGVSCRY	60
IAADMSDGEA	CRALIETAGG	CDILVNNAGI	QHVSSIIEFP	VGKWNAILAI	NLSSAFHTTA	120
AALPGMRAKG	WGRIVNIASA	HGLTASPYKS	AYVAAKHGVV	GFTKVTALET	AGKGITCNAI	180
CPGYVLTPLV	EAQI <u>Q</u> DQMK	HDMDRETIVR	EVMLDRQPSR	QFATTGQIG <u>L</u>	TVVFLCSGAA	240
DQITGTTIS <u>M</u>	DGGWTAL					257

5

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> Roche Diagnostics GmbH
 Roche Diabetes Care, Inc.
 Roche Diabetes Care GmbH
 Roche Diagnostics Operations, Inc.
 F. Hoffmann-La Roche AG

10 <120> 3-Hidroxibutirato deshidrogenasa mutante de *Rhodobacter sphaeroides*, así como procedimientos y usos que implican la misma

<130> R69993PC

15 <160> 11
 <170> PatentIn versión 3.5

20 <210> 1
 <211> 257
 <212> PRT
 <213> Rhodobacter sphaeroides

<400> 1

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

Ile Gly Leu Gly Cys Ala Glu Glu Leu Ala Arg Ala Gly Ala Glu Val
 20 25 30

Val Ile Asn Ser Phe Thr Asp Arg Asp Glu Asp His Ala Leu Ala Glu
 35 40 45

Lys Ile Gly Arg Glu His Gly Val Ser Cys Arg Tyr Ile Ala Ala Asp
 50 55 60

Met Ser Asp Gly Glu Ala Cys Arg Ala Leu Ile Glu Thr Ala Gly Gly
 65 70 75 80

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

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

Ser Ser Ala Phe His Thr Thr Ala Ala Ala Leu Pro Gly Met Arg Ala
 115 120 125

Lys Gly Trp Gly Arg Ile Val Asn Ile Ala Ser Ala His Gly Leu Thr
 130 135 140

25 Ala Ser Pro Tyr Lys Ser Ala Tyr Val Ala Ala Lys His Gly Val Val
 145 150 155 160

Gly Phe Thr Lys Val Thr Ala Leu Glu Thr Ala Gly Lys Gly Ile Thr
165 170 175

Cys Asn Ala Ile Cys Pro Gly Tyr Val Leu Thr Pro Leu Val Glu Ala
180 185 190

Gln Ile Pro Asp Gln Met Lys Ala His Asp Met Asp Arg Glu Thr Val
195 200 205

Ile Arg Glu Val Met Leu Asp Arg Gln Pro Ser Arg Gln Phe Ala Thr
210 215 220

Thr Gly Gln Ile Gly Gly Thr Val Val Phe Leu Cys Ser Gly Ala Ala
225 230 235 240

Asp Gln Ile Thr Gly Thr Thr Ile Ser Val Asp Gly Gly Trp Thr Ala
245 250 255

Leu

<210> 2

<211> 257

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 3-HBDH mutante

<400> 2

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

Ile Gly Leu Gly Cys Ala Glu Glu Leu Ala Arg Ala Gly Ala Glu Val
20 25 30

Val Ile Asn Ser Phe Thr Asp Arg Asp Glu Asp His Ala Leu Ala Glu
35 40 45

Lys Ile Gly Arg Glu His Gly Val Ser Cys Arg Tyr Ile Ala Ala Asp
50 55 60

Met Ser Asp Gly Glu Ala Cys Arg Ala Leu Ile Glu Thr Ala Gly Gly
65 70 75 80

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

ES 2 782 199 T3

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

Ser Ser Ala Phe His Thr Thr Ala Ala Ala Leu Pro Phe Met Arg Ala
115 120 125

Lys Gly Trp Gly Arg Ile Val Asn Ile Ala Ser Ala His Gly Leu Thr
130 135 140

Ala Ser Pro Tyr Lys Ser Ala Tyr Val Ala Ala Lys His Gly Val Val
145 150 155 160

Gly Phe Thr Lys Val Thr Ala Leu Glu Thr Ala Gly Lys Gly Ile Thr
165 170 175

Cys Asn Ala Ile Cys Pro Gly Tyr Val Leu Thr Pro Leu Val Glu Ala
180 185 190

Gln Ile Pro Asp Gln Met Lys Ala His Asp Met Asp Arg Glu Thr Val
195 200 205

Ile Arg Glu Val Met Leu Asp Arg Gln Pro Ser Arg Gln Phe Ala Thr
210 215 220

Thr Gly Gln Ile Gly Gly Thr Val Val Phe Leu Cys Ser Gly Ala Ala
225 230 235 240

Asp Gln Ile Thr Gly Thr Thr Ile Ser Val Asp Gly Gly Trp Thr Ala
245 250 255

Leu

<210> 3

<211> 257

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 3-HBDH mutante

10

<400> 3

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

Ile Gly Leu Gly Cys Ala Glu Glu Leu Ala Arg Ala Gly Ala Glu Val
20 25 30

Val Ile Asn Ser Phe Thr Asp Arg Asp Glu Asp His Ala Leu Ala Glu

ES 2 782 199 T3

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

Leu

<210> 4

<211> 257

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 3-HBDH mutante

10

<400> 4

ES 2 782 199 T3

```

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

Ile Gly Leu Gly Cys Ala Glu Glu Leu Ala Arg Ala Gly Ala Glu Val
20      25      30

Val Ile Asn Ser Phe Thr Asp Arg Asp Glu Asp His Ala Leu Ala Glu
35      40      45

Lys Ile Gly Arg Glu His Gly Val Ser Cys Arg Tyr Ile Ala Ala Asp
50      55      60

Met Ser Asp Gly Glu Ala Cys Arg Ala Leu Ile Glu Thr Ala Gly Gly
65      70      75      80

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

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

Ser Ser Ala Phe His Thr Thr Ala Ala Ala Leu Pro Gly Met Arg Ala
115     120     125

Lys Gly Trp Gly Arg Ile Val Asn Ile Ala Ser Ala His Gly Leu Thr
130     135     140

Ala Ser Pro Tyr Lys Ser Ala Tyr Val Ala Ala Lys His Gly Val Val
145     150     155     160

Gly Phe Thr Lys Val Thr Ala Leu Glu Thr Ala Gly Lys Gly Ile Thr
165     170     175

Cys Asn Ala Ile Cys Pro Gly Tyr Val Leu Thr Pro Leu Val Glu Ala
180     185     190

Gln Ile Pro Asp Gln Met Lys Ala His Asp Met Asp Arg Glu Thr Val
195     200     205

Ile Arg Glu Val Met Leu Asp Arg Gln Pro Ser Arg Gln Phe Ala Thr
210     215     220

Thr Gly Gln Ile Gly Gly Thr Cys Val Phe Leu Cys Ser Gly Ala Ala
225     230     235     240

Asp Gln Ile Thr Gly Thr Thr Ile Ser Val Asp Gly Gly Trp Thr Ala
245     250     255

```

Leu

<210> 5

5 <211> 257

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> 3-HBDH mutante

<400> 5

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

ES 2 782 199 T3

<210> 6
 <211> 257
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> 3-HBDH mutante

<400> 6

10

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

Ile Gly Leu Gly Cys Ala Glu Glu Leu Ala Arg Ala Gly Ala Glu Val
 20 25 30

Val Ile Asn Ser Phe Thr Asp Arg Asp Glu Asp His Ala Leu Ala Glu
 35 40 45

Lys Ile Gly Arg Glu His Gly Val Ser Cys Arg Tyr Ile Ala Ala Asp
 50 55 60

Met Ser Asp Gly Glu Ala Cys Arg Ala Leu Ile Glu Thr Ala Gly Gly
 65 70 75 80

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

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

Ser Ser Ala Phe His Thr Thr Ala Ala Ala Leu Pro Gly Met Arg Ala
115 120 125

Lys Gly Trp Gly Arg Ile Val Asn Ile Ala Ser Ala His Gly Leu Thr
130 135 140

Ala Ser Pro Tyr Lys Ser Ala Tyr Val Ala Ala Lys His Gly Val Val
145 150 155 160

Gly Phe Thr Lys Val Thr Ala Leu Glu Thr Ala Gly Lys Gly Ile Thr
165 170 175

Cys Asn Ala Ile Cys Pro Gly Tyr Val Leu Thr Pro Leu Val Glu Ala
180 185 190

Gln Ile Pro Asp Gln Met Lys Ala His Asp Met Asp Arg Glu Thr Val
195 200 205

Ile Arg Glu Val Met Leu Asp Arg Gln Pro Ser Arg Gln Phe Ala Thr
210 215 220

Thr Gly Gln Ile Gly Leu Thr Val Val Phe Leu Cys Ser Gly Ala Ala
225 230 235 240

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

Leu

<210> 7

<211> 257

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 3-HBDH mutante

10

<400> 7

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

Ile Gly Leu Gly Cys Ala Glu Glu Leu Ala Arg Ala Gly Ala Glu Val
20 25 30

Val Ile Asn Ser Tyr Thr Asp Arg Asp Glu Asp His Ala Leu Ala Glu
35 40 45

ES 2 782 199 T3

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

Leu

<210> 8

<211> 257

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 3-HBDH mutante

10

<400> 8

ES 2 782 199 T3

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

Ile Gly Leu Gly Cys Ala Glu Glu Leu Ala Arg Ala Gly Ala Glu Val
20 25 30

Val Ile Asn Ser Tyr Thr Asp Arg Asp Glu Asp His Ala Leu Ala Glu
35 40 45

Lys Ile Gly Arg Glu His Gly Val Ser Cys Arg Tyr Ile Ala Ala Asp
50 55 60

Met Ser Asp Gly Glu Ala Cys Arg Ala Leu Ile Glu Thr Ala Gly Gly
65 70 75 80

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

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

Ser Ser Ala Phe His Thr Thr Ala Ala Ala Leu Pro Gly Met Arg Ala
115 120 125

Lys Gly Trp Gly Arg Ile Val Asn Ile Ala Ser Ala His Gly Leu Thr
130 135 140

Ala Ser Pro Tyr Lys Ser Ala Tyr Val Ala Ala Lys His Gly Val Val
145 150 155 160

Gly Phe Thr Lys Val Thr Ala Leu Glu Thr Ala Gly Lys Gly Ile Thr
165 170 175

Cys Asn Ala Ile Cys Pro Gly Tyr Val Leu Thr Pro Leu Val Glu Ala
180 185 190

Gln Ile Pro Asp Gln Met Lys Ala His Asp Met Asp Arg Glu Thr Val
195 200 205

Ile Arg Glu Val Met Leu Asp Arg Gln Pro Ser Arg Gln Phe Ala Thr
210 215 220

Thr Gly Gln Ile Gly Leu Thr Val Val Phe Leu Cys Ser Gly Ala Ala
225 230 235 240

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

Leu

<210> 9

5 <211> 257

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> 3-HBDH mutante

<400> 9

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

Ile Gly Leu Gly Cys Ala Glu Glu Leu Ala Arg Ala Gly Ala Glu Val
 20 25 30

Val Ile Asn Ser Phe Thr Asp Arg Asp Glu Asp His Ala Leu Ala Glu
 35 40 45

Lys Ile Gly Arg Glu His Gly Val Ser Cys Arg Tyr Ile Ala Ala Asp
 50 55 60

Met Ser Asp Gly Glu Ala Cys Arg Ala Leu Ile Glu Thr Ala Gly Gly
 65 70 75 80

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

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

Ser Ser Ala Phe His Thr Thr Ala Ala Ala Leu Pro Gly Met Arg Ala
 115 120 125

Lys Gly Trp Gly Arg Ile Val Asn Ile Ala Ser Ala His Gly Leu Thr
 130 135 140

Ala Ser Pro Tyr Lys Ser Ala Tyr Val Ala Ala Lys His Gly Val Val
 145 150 155 160

Gly Phe Thr Lys Val Thr Ala Leu Glu Thr Ala Gly Lys Gly Ile Thr
 165 170 175

Cys Asn Ala Ile Cys Pro Gly Tyr Val Leu Thr Pro Leu Val Glu Ala

	180		185		190
	Gln Ile Pro Asp Gln Met Lys Ala His Gly Met Asp Arg Glu Thr Val				
	195		200		205
	Ile Arg Glu Val Met Leu Asp Arg Gln Pro Ser Arg Gln Phe Ala Thr				
	210		215		220
	Thr Gly Gln Ile Gly Leu Thr Val Val Phe Leu Cys Ser Gly Ala Ala				
	225		230		235
	Asp Gln Ile Thr Gly Thr Thr Ile Ser Met Asp Gly Gly Trp Thr Ala				
		245		250	255
	Leu				
	<210> 10				
	<211> 257				
5	<212> PRT				
	<213> Secuencia artificial				
	<220>				
	<223> 3-HBDH mutante				
10	<400> 10				
	Met Asp Leu Asn Gly Lys Arg Ala Ile Val Thr Gly Ser Asn Ser Gly				
	1		5		10
	Ile Gly Leu Gly Cys Ala Glu Glu Leu Ala Arg Ala Gly Ala Glu Val				
		20		25	30
	Val Ile Asn Ser Tyr Thr Asp Arg Asp Glu Asp His Ala Leu Ala Glu				
		35		40	45
	Lys Ile Gly Arg Glu His Gly Val Ser Cys Arg Tyr Ile Ala Ala Asp				
		50		55	60
	Met Ser Asp Gly Glu Ala Cys Arg Ala Leu Ile Glu Thr Ala Gly Gly				
	65		70		75
	Cys Asp Ile Leu Val Asn Asn Ala Gly Ile Gln His Val Ser Ser Ile				
		85		90	95
	Glu Glu Phe Pro Val Gly Lys Trp Asn Ala Ile Leu Ala Ile Asn Leu				
		100		105	110
	Ser Ser Ala Phe His Thr Thr Ala Ala Ala Leu Pro Gly Met Arg Ala				
		115		120	125

Lys Gly Trp Gly Arg Ile Val Asn Ile Ala Ser Ala His Gly Leu Thr
130 135 140

Gly Ser Pro Tyr Lys Ser Ala Tyr Val Ala Ala Lys His Gly Val Val
145 150 155 160

Gly Phe Thr Lys Val Thr Ala Leu Glu Thr Ala Gly Lys Gly Ile Thr
165 170 175

Cys Asn Ala Ile Cys Pro Gly Tyr Val Leu Thr Pro Leu Val Glu Ala
180 185 190

Gln Ile Pro Asp Gln Met Lys Ala His Asp Met Asp Arg Glu Thr Val
195 200 205

Ile Arg Glu Val Met Leu Asp Arg Gln Pro Ser Arg Gln Phe Ala Thr
210 215 220

Thr Gly Gln Ile Gly Leu Thr Val Val Phe Leu Cys Ser Gly Ala Ala
225 230 235 240

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

Leu

<210> 11
<211> 257
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> 3-HBDH mutante

<400> 11

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

Ile Gly Leu Gly Cys Ala Glu Glu Leu Ala Arg Ala Gly Ala Glu Val
20 25 30

Val Ile Asn Ser Tyr Thr Asp Arg Asp Glu Asp His Ala Leu Ala Glu
35 40 45

Lys Ile Gly Arg Glu His Gly Val Ser Cys Arg Tyr Ile Ala Ala Asp
50 55 60

Met Ser Asp Gly Glu Ala Cys Arg Ala Leu Ile Glu Thr Ala Gly Gly
 65 70 75 80

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

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

Ser Ser Ala Phe His Thr Thr Ala Ala Ala Leu Pro Gly Met Arg Ala
 115 120 125

Lys Gly Trp Gly Arg Ile Val Asn Ile Ala Ser Ala His Gly Leu Thr
 130 135 140

Ala Ser Pro Tyr Lys Ser Ala Tyr Val Ala Ala Lys His Gly Val Val
 145 150 155 160

Gly Phe Thr Lys Val Thr Ala Leu Glu Thr Ala Gly Lys Gly Ile Thr
 165 170 175

Cys Asn Ala Ile Cys Pro Gly Tyr Val Leu Thr Pro Leu Val Glu Ala
 180 185 190

Gln Ile Gln Asp Gln Met Lys Ala His Asp Met Asp Arg Glu Thr Val
 195 200 205

Ile Arg Glu Val Met Leu Asp Arg Gln Pro Ser Arg Gln Phe Ala Thr
 210 215 220

Thr Gly Gln Ile Gly Leu Thr Val Val Phe Leu Cys Ser Gly Ala Ala
 225 230 235 240

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

Leu

REIVINDICACIONES

1. Una 3-hidroxi-butarato deshidrogenasa (3-HBDH) mutante de *Rhodobacter sphaeroides* con un rendimiento mejorado en relación con la 3-HBDH natural en la que la enzima mutante comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 (3-HBDH de *Rhodobacter sphaeroides*; 3-HBDH natural) y en la que la enzima mutante tiene al menos una sustitución aminoacídica en relación con la 3-HBDH natural en una posición correspondiente a la posición 250 de SEQ ID NO: 1.
2. La 3-HBDH mutante de la reivindicación 1, en la que el aminoácido en la posición correspondiente a la posición 250 de SEQ ID NO: 1 se sustituye con Met (250Met) o Ile (250Ile), en particular con Met (250Met).
3. La 3-HBDH mutante de la reivindicación 1 o 2, en la que la enzima mutante tiene al menos una sustitución aminoacídica adicional en una o más de las posiciones correspondientes a las posiciones 66, 109 113, 125, 140, 144, 145, 195, 197, 217, 223, 232, 239 y/o 257 de SEQ ID NO: 1, en particular al menos las posiciones 125, 144 y/o 232 de SEQ ID NO: 1, más en particular al menos las posiciones 125 y/o 144 de SEQ ID NO: 1.
4. La 3-HBDH mutante de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el aminoácido en la posición correspondiente a
 - la posición 66 de SEQ ID NO: 1 se sustituye con Tyr (66Tyr) o Asn (66Asn);
 - la posición 109 de SEQ ID NO: 1 se sustituye con Glu (109Glu);
 - la posición 113 de SEQ ID NO: 1 se sustituye con Thr (113Thr);
 - la posición 125 de SEQ ID NO: 1 se sustituye con Phe (125Phe);
 - la posición 140 de SEQ ID NO: 1 se sustituye con Val (140Val);
 - la posición 144 de SEQ ID NO: 1 se sustituye con Arg (144Arg);
 - la posición 145 de SEQ ID NO: 1 se sustituye con Gly (145Gly);
 - la posición 195 de SEQ ID NO: 1 se sustituye con Gln (195Gln) o Leu (195Leu);
 - la posición 197 de SEQ ID NO: 1 se sustituye con Ile (197Ile);
 - la posición 217 de SEQ ID NO: 1 se sustituye con Val (217Val);
 - la posición 223 de SEQ ID NO: 1 se sustituye con Val (223Val);
 - la posición 232 de SEQ ID NO: 1 se sustituye con Cys (232Cys), Tyr (232Tyr) o Trp (232Trp), especialmente 232Cys;
 - la posición 239 de SEQ ID NO: 1 se sustituye con Tyr (239Tyr) o Trp (239Trp);
 - la posición 250 de SEQ ID NO: 1 se sustituye con Met (250Met); y/o
 - la posición 257 de SEQ ID NO: 1 se sustituye con Met (257Met) o Gln (257Gln).
5. La enzima mutante de la reivindicación 4, en la que el aminoácido en la posición correspondiente a
 - la posición 37 de SEQ ID NO: 1 se sustituye con Tyr (37Tyr);
 - la posición 202 de SEQ ID NO: 1 se sustituye con Gly (202Gly), y/o
 - la posición 230 de SEQ ID NO: 1 se sustituye con Leu (230Leu);
 en particular en combinación con 250Met.
6. La 3-HBDH mutante de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5,
 - a) en la que la 3-HBDH mutante tiene las mutaciones
 - 125Phe;

- 144Arg;
 - 232Cys;
 - 5 – 250Met;
 - 230Leu y 250Met;
 - 37Tyr y 250Met;
 - 10 – 37Tyr, 230Leu y 250Met;
 - 202Gly, 230Leu y 250Met;
 - 15 – 37Tyr, 145Gly, 230Leu y 250Met; y/o
 - 37Tyr, 195Gln, 230Leu y 250Met
- correspondientes a las posiciones de SEQ ID NO: 1; o
- 20 b) en la que la 3-HBDH mutante tiene solo las mutaciones
 - 250Met;
 - 25 – 230Leu y 250Met;
 - 37Tyr y 250Met;
 - 37Tyr, 230Leu y 250Met;
 - 30 – 202Gly, 230Leu y 250Met;
 - 37Tyr, 145Gly, 230Leu y 250Met; o
 - 35 – 37Tyr, 195Gln, 230Leu y 250Met
- correspondientes a las posiciones de SEQ ID NO: 1.
7. La 3-HBDH mutante de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la 3-HBDH mutante comprende o
- 40 consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos un 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 1 a 11,
- en particular en la que la 3-HBDH mutante comprende o consiste en la secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 5 a 11.
- 45 8. La 3-HBDH mutante de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en las que el rendimiento mejorado en relación con la 3-HBDH natural es
- una estabilidad incrementada, especialmente estabilidad térmica, en relación con la 3-HBDH natural; y/o
 - 50 – una afinidad por sustrato incrementada, especialmente por 3-hidroxibutirato, en relación con la 3-HBDH natural; y/o
 - una afinidad por cofactor incrementada, especialmente por NAD o un derivado del mismo, en particular en el que
 - 55 el derivado es carba-NAD, en relación con la 3-HBDH natural.
9. La 3-HBDH mutante de la reivindicación 8,
- 60 caracterizada por que la 3-HBDH mutante tiene una estabilidad incrementada en al menos un factor 2 en relación con la 3-HBDH natural, preferentemente una estabilidad incrementada en al menos un factor 3, preferentemente una estabilidad incrementada en al menos un factor 4, más preferentemente una estabilidad incrementada en al menos un factor 5; y/o
- 65 caracterizada por que la 3-HBDH mutante tiene una afinidad incrementada por el sustrato y/o cofactor en relación con la 3-HBDH natural, en particular una afinidad incrementada por (i) 3-hidroxibutirato y/o (ii) dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD) o un derivado funcionalmente activo del mismo y/o en particular en la que la afinidad por el sustrato

y/o cofactor se incrementa en al menos un 5 %, más en particular en al menos un 10 %, todavía más en particular en al menos un 15 % o 20 %.

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