



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년09월30일

(11) 등록번호 10-1554457

(24) 등록일자 2015년09월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 9/96 (2006.01) C12N 9/02 (2006.01)

C12N 9/04 (2006.01) C12Q 1/26 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 9/96 (2013.01)

C12N 9/0004 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-7015319(분할)

(22) 출원일자(국제) 2010년08월18일

심사청구일자 2015년06월09일

(85) 번역문제출일자 2015년06월09일

(65) 공개번호 10-2015-0070443

(43) 공개일자 2015년06월24일

(62) 원출원 특허 10-2012-7007136

원출원일자(국제) 2010년08월18일

심사청구일자 2012년03월20일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2010/062045

(87) 국제공개번호 WO 2011/020856

국제공개일자 2011년02월24일

(30) 우선권주장

09168327.6 2009년08월20일

유럽특허청(EPO)(EP)

(56) 선행기술조사문헌

WO2007012494 A1

(73) 특허권자

에프. 호프만-라 로슈 아게

스위스 체하-4070 바젤 그랜짜체스트라쎄 124

(72) 발명자

뢰델 블프강

독일 69123 하이델베르크 요하니터슈트라쎄 9

호른 카리나

독일 68647 비블리스 프랑켄슈트라세 5

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인코리아나

전체 청구항 수 : 총 6 항

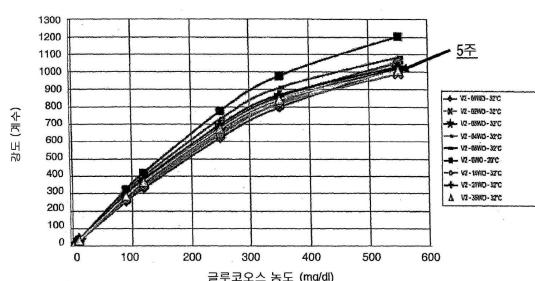
심사관 : 김남경

(54) 발명의 명칭 안정한 조효소를 사용하는 효소 안정화

(57) 요약

본 발명은 안정화된 조효소의 존재하에서 효소를 저장함에 의한 효소의 안정화 방법에 관한 것이다. 또한 본 발명은 안정화된 조효소를 사용하여 안정화된 효소 뿐 아니라, 분식물 검출을 위한 시험 요소에서의 이들의 용도에 관한 것이다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
C12N 9/0006 (2013.01)
C12Q 1/26 (2013.01)
C12Y 101/01002 (2013.01)
C12Y 101/01049 (2013.01)

(72) 발명자
슈타인케 렐리
독일 67071 루드비히샤펜 오랑케리슈트라쎄 6
부키 나디네
독일 69168 비슬로흐 춤 카이텔베르크 22
마이어 토마스
독일 81373 뮌헨 드라헨제슈트라쎄 12

쉬무크 라이너

독일 83671 베네딕트보이에른 암 클로슈터바이어 7
나겔 롤프
독일 68642 뷔르슈타트 폐수탈로치슈트라쎄 1
하인들 디터
독일 82396 폐흘 슈테른슈트라쎄 4

명세서

청구범위

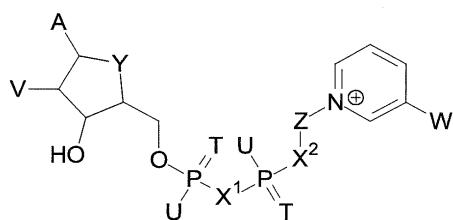
청구항 1

효소를 2 주 이상 동안 안정화하는 방법으로서,

효소를 안정화된 조효소의 존재하에서 저장하고, 상기 안정화된 조효소로 안정화된 효소는, 2 주 이상 동안 저장되는 경우, 효소 활성의 초기값에 대해 50 % 미만의 효소 활성의 감소를 나타내며,

명칭 EC 1.1.1.2 를 갖는 알코올 디히드로게나아제, 명칭 EC 1.1.1.49 를 갖는 글루코오스-6-포스페이트 디히드로게나아제 또는 명칭 EC 1.6.99.2 를 갖는 디아포라아제가 효소로서 사용되고,

하기 일반식 (II) 의 화합물, 또는 이의 염 또는 이의 환원된 형태가 안정화된 조효소로서 사용되는 것을 특징으로 하는 방법:



(II)

(식 중,

A = 아데닌이고,

T = 각 경우 독립적으로 O, 또는 S 이고,

U = 각 경우 독립적으로 OH, SH, BH3-, 또는 BCNH2- 이고,

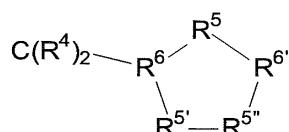
V = 각 경우 독립적으로 OH 또는 포스페이트 기이고,

W = COOR, CON(R)2, COR 또는 CSN(R)2 (식 중, R = 각 경우 독립적으로 H, 메틸 또는 에틸임) 이고,

X1, X2 = 각 경우 독립적으로 O, CH2, CHCH3, C(CH3)2, NH 또는 NCH3 이고,

Y = NH, S, O 또는 CH2 이고,

Z = 하기 일반식 (III) 의 포화 또는 불포화 카르보시클릭 또는 헤테로시클릭 5-원 고리 화합물임,



(III)

(식 중, 단일 또는 이중 결합이 R5' 와 R5'' 사이에 존재하고,

R4 = 각 경우 독립적으로 H, F, Cl 또는 CH3 이고,

$R^5 = CR_2^4$ 이고,

R^5' 와 R^5'' 사이에 단일 결합이 있는 경우, $R^5' = O, S, NH, NC_1-C_2-$ 알킬, CR_2^4, CHO 또는 $CHOCH_3$ 이고, $R^5'' = CR_2^4, CHO$, 또는 $CHOCH_3$ 이고,

R^5' 와 R^5'' 사이에 이중 결합이 있는 경우, $R^5' = R^5'' = CR^4$ 이고,

$R^6, R^6' = 각 경우 독립적으로 CH 또는 CCH_3$ 임)

단, Z 및 피리딘 잔기는 글리코시드 결합에 의해 연결되지 않음).

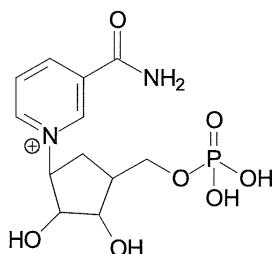
청구항 2

효소를 2 주 이상 동안 안정화하는 방법으로서,

효소를 안정화된 조효소의 존재하에서 저장하고, 상기 안정화된 조효소로 안정화된 효소는, 2 주 이상 동안 저장되는 경우, 효소 활성의 초기값에 대해 50 % 미만의 효소 활성의 감소를 나타내며,

명칭 EC 1.1.1.2 를 갖는 알코올 디히드로게나아제, 명칭 EC 1.1.1.49 를 갖는 글루코오스-6-포스페이트 디히드로게나아제 또는 명칭 EC 1.6.99.2 를 갖는 디아포라아제가 효소로서 사용되고,

안정화된 니코틴아미드 아데닌 디뉴클레오티드 (NAD/NADH) 화합물, 안정화된 니코틴아미드 아데닌 디뉴클레오티드 포스페이트 (NADP/NADPH) 화합물 또는 하기 화학식 (I) 의 화합물이 안정화된 조효소로서 사용되는 것을 특징으로 하는 방법:



(I)

청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

carbaNAD 가 안정화된 조효소로서 사용되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

효소가 20°C 내지 50°C 의 온도에서 저장되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

효소가 50 % 내지 85 %의 상대 공기 습도에서, 건조제의 부재 하에서, 또는 양쪽 모두의 조건에서 저장되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

효소가 견조 물질로서 또는 액상으로 저장되는 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 안정화된 조효소의 존재하에서 효소를 저장함에 의한 효소의 안정화 방법에 관한 것이다. 또한 본 발명은 안정화된 조효소를 사용하여 안정화된 효소 뿐 아니라, 분석물 검출을 위한 시험 요소에서의 이들의 용도에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 진단 시험 요소는 임상적으로 관련된 분석 방법의 중요한 성분이다. 이러한 이유로 분석물에 특이적인 효소의 도움으로 직접적으로 또는 간접적으로 측정될 수 있는 분석물, 예를 들어, 대사물 또는 기질의 측정에 초점을 둔다. 이 경우, 분석물은 효소-조효소 복합체의 도움으로 전환되고 이어서 정량화된다. 이것은 측정되게 되는 분석물이 적합한 효소, 조효소 및 임의로 매개체와 접촉되도록 하여, 조효소는 효소 반응에 의해 물리화학적으로 변화한다, 예를 들어 산화 또는 환원된다. 매개체가 부가적으로 사용되는 경우, 이것은 통상적으로, 전극의 전도성 성분 또는 광학 표시기 상의 분석물의 전환 동안 방출된 환원된 조효소로부터 전자를 이동시켜, 방법이 예를 들어 광도측정적으로 또는 전기화학적으로 검출될 수 있게 한다. 보정은 측정된 값과 측정되는 분석물의 농도 사이에 직접적인 관련성을 제공한다.

[0003] 진단 시험 요소가 제공되는 경우 중요한 기준은 이들의 장기간 안정성이다. 예를 들어 혈중 글루코오스의 측정에 사용되는 종래 기술로부터 공지된 시험 요소는 일반적으로, 특히 주로 조효소 및 매개체의 기능이 손상되는 습기 및 열에 매우 민감하다. 시판 시험 요소의 또 다른 문제는 효소 시스템에 의한 광 흡수가 효소, 조효소 또는/및 매개체에 손상을 야기할 수 있는, 주위 광에 대한 이들의 민감성이다. 특정 형태의 적용에 서, 예를 들어, 최종 사용자 스스로에 의해 실행되는 시험의 경우에서, 사용자에 의해 쉽게 검출될 수 있는 측정 시스템의 올바르지 않은, 간과된 결함 저장으로 인해 오류 결과가 발생할 수 있고 각각의 질환의 올바르지 않은 처리를 야기할 수 있다.

[0004] 진단 시험 요소의 안정성을 증가시키기 위해 사용될 수 있는 공지된 측정은 안정한 효소의 사용, 예를 들어, 호열성 유기체 유래의 효소의 사용이다. 게다가, 화학적 개질, 예를 들어 가교결합에 의해, 또는 돌연변이 생성에 의해 효소를 안정화시키는 것이 가능하다. 부가적으로 효소 안정화제, 예컨대 트레할로오스, 폴리비닐 피롤리돈 및 혈청 알부민이 또한 첨가될 수 있거나, 효소는 예를 들어, 광중합에 의해 중합체 네트워크 내에 포위될 수 있다.

[0005] 또한 적합한 매개체를 사용함으로써 진단 시험 요소의 안정성을 개선시키기 위한 시도가 이루어졌다. 그러므로, 시험의 특이성은 증가하고, 반응 동안의 간섭은 가능한 한 낮은 산화환원 전위를 갖는 매개체를 사용함으로써 제거된다. 그러나, 효소/조효소 복합체의 산화환원 전위는 매개체의 산화환원 전위에 대한 낮은 제한을 형성한다. 산화환원 전위가 상기 제한보다 낮은 경우, 매개체로의 반응은 느려지거나 심지어 중단된다.

[0006] 대안적으로는, 예를 들어 조효소, 예컨대 조효소 NADH 가 직접 검출되는, 매개체가 없는 진단 시험 요소를 사용하는 것이 또한 가능하다. 그러나 이러한 측정 시스템의 단점은, NAD 및 NADP 와 같은 고유의 조효소가 불안정하다는 것이다.

[0007] NAD 및 NADP 는 염기-불안정한 분자이고, 이의 분해 경로는 문헌에 기재되어 있다 (N.J. Oppenheimer, in "The Pyridine Nucleotide Coenzyme", Academic Press New York, London 1982, editor J. Everese, B. Anderson, K. You, chapter 3, pages 56-65). NAD 또는 NADP 가 리보오스 및 피리딘 단위 사이에 글리코실 연결의 절단에 의해 분해되는 경우 ADP-리보오스가 주로 형성된다. 환원된 형태와 반대로, NADH 및 NADPH 는 산-불안정하다: 예를 들어, 에피머화가 공지된 분해 경로이다. 두 경우에서 NAD/NADP 및 NADH/NADPH 의 불안정성은 리보오스 단위와 피리딘 단위 사이의 글리코실 연결의 유연성으로 인한 것이다. 그러나, 예를 들어 수용액과 같은 극단적이지 않은 조건 하에서, 조효소 NAD 및 NADP 는 이미 주위 습도로 인해 단독으로 가수분해된다. 상기 불안정성은 분석물의 측정의 부정확성을 야기할 수 있다.

[0008] 다수의 NAD/NADP 유도체가 예를 들어 문헌 [B.M. Anderson in "The Pyridine Nucleotide Coenzymes", Academic Press New York, London 1982, editor J. Everese, B. Anderson, K. You, chapter 4]에 기재되어 있다. 그러나, 대부분의 상기 유도체는 효소에 의해 잘 용인되지 않는다. 그러므로 지금까지 진단 시험에 대해 사

용되어왔던 유일한 유도체는 1965년에 최초로 기재되었던 3-아세틸피리딘 아데닌 디뉴클레오티드 (아세틸-NAD)이다 (N.O. Kaplan, J. Biol. Chem. (1956), 221, 823). 상기 조효소는 또한 효소에 의한 열악한 수용성 및 산화환원 전위의 변화를 나타낸다.

[0009] WO 01/94370에는 개질된 피리딘 그룹이 있는 추가의 NAD 유도체의 용도가 기재되어 있다. 그러나, 니코틴아미드 기의 개질은 일반적으로 촉매 반응에 직접 영향을 준다. 대부분의 경우, 본 영향은 부정적이다.

[0010] 또다른 안정화 개념에서, 리보오스 단위가 글리코실 연결의 안정성에 영향을 주기 위해 변경되었다. 상기 절차는 니코틴아미드 기의 촉매 반응을 직접 간섭하지 않는다. 그러나, 이것은 효소가 리보오스 단위에 대해 강하고 특이적인 결합을 나타내자마자 간접적 영향을 줄 것이다. Kaufmann 등은 이와 연관하여 WO 98/33936 및 US 5,801,006 및 WO 01/49247에서 다수의 티오리보스-NAD 유도체를 기재하였다. 그러나, 니코틴아미드 리보오스 단위의 개질과 효소 반응 중 유도체의 활성 사이의 관계는 지금까지 제시되지 않았다.

[0011] 글리코실 연결이 없는 유도체인 carbaNAD는 1988년에 최초로 기재되었다 (J.T. Slama, Biochemistry (1988), 27, 183, 및 Biochemistry (1989), 28, 7688). 그 안의 리보오스는 카르바시클릭 당 단위에 의해 치환된다. carbaNAD가 디히드로게나아제에 대한 기질로서 기재되었음에도 불구하고, 이의 활성은 이전에 생화학적 검출 방법에서 임상적으로 증명되지 않았다.

[0012] 이후에, 천연 파이로포스페이트 대신에 메틸렌 비스포스포네이트 화합물로 carbaNAD를 제조하기 위해, 문헌 G.M. Blackburn (Chem. Comm. (1996), 2765)에 유사한 접근법이 기재되었다. 메틸렌 비스포스포네이트는 포스파타아제에 대해 증가된 안정성을 보이며, ADP-리보실 시클라아제에 대한 저해제로서 사용되었다. 가수 분해 안정성의 증가는 목적이 아니었다 (J.T. Slama, G.M. Blackburn).

[0013] WO 2007/012494 및 US 11/460,366에는 최종적으로 안정화된 NAD/NADH 및 NADP/NADPH 유도체, 상기 유도체의 효소 복합체 및 생화학적 검출 방법 및 시약 키트에서의 이들의 용도가 기재되어 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0014] 본 발명의 근원적인 목적은 상기 언급된 단점을 적어도 부분적으로 제거하는 효소의 안정화, 특히 효소의 장기간 안정화를 위한 방법을 제공하는 것이었다.

과제의 해결 수단

[0015] 본 목적은 효소를 안정화된 조효소의 존재하에서 저장하는, 효소를 안정화시키는 방법에 의해 본 발명에 따라 달성된다. 높은 상대 습도에서 또는 심지어 액상으로, 승온에서 및 주위 광에서 수 주 또는 수 개월의 장기간 안정화가 안정화된 조효소의 도움으로 가능하다는 것이 놀랍게도 밝혀졌다. 이러한 이유로 "저장"이라는 용어는 효소를 안정화된 조효소의 존재하에서 임의의 시간 기간 동안, 바람직하게는 2주 이상의 시간 기간 동안, 더욱 바람직하게는 3개월 이상의 시간 기간 동안, 더욱 더 바람직하게는 6개월 이상의 시간 기간 동안, 가장 바람직하게는 12개월 이상의 시간 기간 동안 유지하는 것을 의미하고, 저장은 바람직하게는 대기압, 실온 (25°C) 및 50% 이상의 상대 공기 습도에서 일어난다.

[0016] 본 발견은 비록 효소가 고유의 조효소의 존재하에서 수 시간의 증가된 단기간 안정성을 나타내지만 (Bertoldi et al., Biochem. J. (2005), 389, 885; van den Heuvel et al., J. Biol. Chem. (2005), 280, 32115; 및 Pan et al., J. Chin. Biochem. Soc. (1974), 3, 1), 이들이 장기간에 걸쳐 저하된 안정성을 갖는다 (Nutrition Reviews (1978), 36, 251)는 것이 알려져 있었기 때문에 놀랍다. 습기 또는/및 열에 대해 이제 관찰되었던 안정화된 조효소 및 효소를 포함하는 진단 시험 요소의 장기간 안정성이 모두 안정화된 조효소가 상응하는 고유의 조효소보다 효소와 적은 결합 상수를 가지기 때문에 더욱 놀랍다.

[0017] 본 발명에 따른 방법에 의해 안정화된 효소는 조효소-의존성 효소이다. 적합한 효소는 예를 들어 디히드로게나아제, 특히 알코올 디히드로게나아제 (EC 1.1.1.1; EC 1.1.1.2), L-아미노산 디히드로게나아제 (EC 1.4.1.5), 글루코오스 디히드로게나아제 (EC 1.1.1.47), 글루코오스-6-포스페이트 디히드로게나아제 (EC 1.1.1.49), 글리세롤 디히드로게나아제 (EC 1.1.1.6), 3-히드록시부티레이트 디히드로게나아제 (EC 1.1.1.30), 락테이트 디히드로게나아제 (EC 1.1.1.27; EC 1.1.1.28), 말레이트 디히드로게나아제 (EC 1.1.1.37) 및 소르비톨 디히드로게나아제로 이루어지는 군으로부터 선택되는 디히드로게나아제이다. 추가의 적합한 효소는 옥

시다아제, 예컨대 예를 들어, 글루코오스 옥시다아제 (EC 1.1.3.4) 또는 콜레스테롤 옥시다아제 (EC 1.1.3.6), 아미노트랜스페라아제, 예컨대 예를 들어, 아스파테이트 아미노트랜스페라아제 또는 알라닌 아미노트랜스페라아제, 5'-뉴클레오티다아제, 크레아틴 키나아제 및 디아포라아제 (EC 1.6.99.2) 이다. 효소는 바람직하게는 알코올 디히드로게나아제 (EC 1.1.1.1; EC 1.1.1.2), 글루코오스 디히드로게나아제 (EC 1.1.1.47), 글루코오스-6-포스페이트 디히드로게나아제 (EC 1.1.1.49) 또는 디아포라아제 (EC 1.6.99.2) 이다.

[0018] 글루코오스 디히드로게나아제 (EC 1.1.1.47) 가 효소로서 사용되는 경우, 돌연변이된 글루코오스 디히드로게나아제는 예를 들어 본 발명에 따른 방법의 범주 내에서 사용될 수 있다. 본 출원의 범주 내에서 사용되는 바와 같은 "돌연변이체" 라는 용어는 동일한 수의 아미노산을 가지면서, 야생형 효소와 비교하여 개질된 아미노산 서열을 갖는 즉, 야생형 효소와 하나 이상의 아미노산이 상이한 고유의 효소의 유전적으로 개질된 변이체를 말한다. 돌연변이(들)의 도입은, 각각의 요구사항 및 조건에 따라 고유의 효소의 아미노산 서열 내 하나 이상의 아미노산 치환을 산출하는 특정 분야에 알려진 바와 같은 재조합 방법을 사용하여 부위-특이적으로 또는 비-부위-특이적으로, 바람직하게는 부위-특이적으로 실행될 수 있다. 돌연변이체는 야생형 효소에 비해 특히 바람직하게는 증가된 열 또는 가수분해적 안정성을 갖는다. 이러한 돌연변이체의 예는 본원에 명백하게 참조된, Baik (Appl. Environ. Microbiol. (2005), 71, 3285), Vasquez-Figueroa (ChemBioChem. (2007), 8, 2295) 뿐 아니라 WO 2005/045016 A2 에 기재되어 있다.

[0019] 돌연변이된 글루코오스 디히드로게나아제는 원칙적으로 그의 아미노산 서열 중 임의의 위치에 상응하는 야생형 글루코오스 디히드로게나아제와 비교해 개질된 아미노산(들)을 함유할 수 있다. 돌연변이된 글루코오스 디히드로게나아제는 바람직하게는 야생형 글루코오스 디히드로게나아제의 아미노산 서열의 위치 96, 170 및 252 중 하나 이상에 돌연변이를 함유하고, 위치 96 및 위치 170에 돌연변이 또는 위치 170 및 위치 252에 돌연변이를 갖는 돌연변이체가 특히 바람직하다. 돌연변이된 글루코오스 디히드로게나아제가 상기 돌연변이 이외에 추가의 돌연변이를 함유하지 않는 경우 유리한 것으로 입증된다.

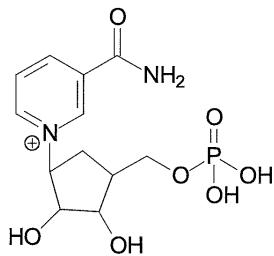
[0020] 위치 96, 170 및 252에서의 돌연변이는 원칙적으로 야생형 효소의 안정화, 예를 들어 열 또는 가수분해 안정성의 증가를 야기하는 임의의 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 위치 96에서의 돌연변이는 바람직하게는 글리신에 의한 글루탐산의 아미노산 치환을 포함하는 반면, 위치 170과 관련해서는 아르기닌 또는 리신에 의한 글루탐산의 아미노산 치환, 특히 리신에 의한 글루탐산의 아미노산 치환에 바람직하다. 위치 252에서의 돌연변이와 관련하여 이것은 바람직하게는 류신에 의한 리신의 아미노산 치환을 포함한다.

[0021] 돌연변이된 글루코오스 디히드로게나아제는 임의의 생물학적 기원으로부터 유래된 야생형 글루코오스 디히드로게나아제의 돌연변이 의해 수득될 수 있고, 본 발명의 문맥에서 상기 "생물학적 기원"은 원핵세포 예를 들어 박테리아, 및 진핵세포, 예를 들어 포유동물 및 기타 동물을 모두 포함한다. 야생형 글루코오스 디히드로게나아제는 바람직하게는 박테리아로부터 유래되고, 이것은 특히 바람직하게는 바실러스 메가테리움 (*Bacillus megaterium*), 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*) 또는 바실러스 투링겐시스 (*Bacillus thuringiensis*), 특히 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*)로부터의 글루코오스 디히드로게나아제이다.

[0022] 특히 바람직한 구현예에서, 돌연변이된 글루코오스 디히드로게나아제는 SEQ ID NO:1에 제시되는 아미노산 서열 (GlucDH_E96G_E170K) 또는 SEQ ID NO:2에 제시되는 아미노산 서열 (GlucDH_E170K_K252L)을 갖는, 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*)로부터의 야생형 글루코오스 디히드로게나아제의 돌연변이에 의해 수득된 글루코오스 디히드로게나아제이다.

[0023] 본 발명의 범주 내에서 안정화된 조효소는 고유의 조효소와 비교해 화학적으로 개질되고 대기압에서 습기, 특히 0°C 내지 50°C의 범위의 온도, 특히 pH 4 내지 pH 10의 범위의 산 및 염기, 또는/및 예를 들어 알코올 또는 아민과 같은 친핵체에 대해 고유의 조효소에 비해 높은 안정성을 갖고 이와 관련하여 고유의 조효소보다 긴 시간 기간에 걸쳐 동일한 환경 조건하에서 활성을 나타낼 수 있는 조효소이다. 안정화된 조효소는 바람직하게는 시험 조건 하에서 완전한 가수분해 안정성이 특히 바람직한 고유의 조효소에 비해 높은 가수분해 안정성을 갖는다. 고유의 조효소와 비교하여, 안정화된 조효소는 효소에 대해 감소된 결합 상수, 예를 들어 2 이상의 인자에 의해 감소된 결합 상수를 가질 수 있다.

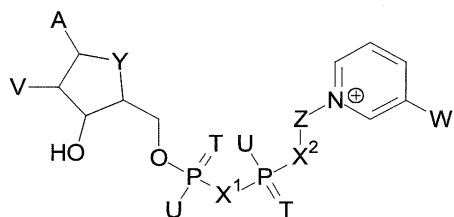
[0024] 안정화된 조효소의 바람직한 예는 니코틴아미드 아데닌 디뉴클레오티드 (NAD/NADH) 또는 니코틴아미드 아데닌 디뉴클레오티드 포스페이트 (NADP/NADPH) 또는 단축된 NAD 유도체 (예를 들어 AMP 부분이 없거나, 비-뉴클레오시드 잔기 예를 들어, 소수성 잔기가 있는)의 안정화된 유도체이다. 하기 화학식 (I)의 화합물이 마찬가지로, 본 발명의 의미로 안정화된 조효소로서 바람직하다:



(I)

[0025]

NAD/NADH 및 NADP/NADPH의 바람직한 안정화된 유도체는 본원에 명백하게 참조된 상기 언급된 참조에 기재되어 있다. 특히 바람직한 안정화된 조효소는 본원에 명백하게 참조된 WO 2007/012494 및 US 11/460,366에 기재되어 있다. 안정화된 조효소는 특히 바람직하게는 하기 일반식 (II)의 화합물, 또는 이의 염 또는 임의로 이의 환원된 형태로부터 선택된다:



(II)

[0027]

(식 중,

[0029]

A = 아데닌 또는 이의 유사체이고,

[0030]

T = 각 경우 독립적으로 O, S이고,

[0031]

U = 각 경우 독립적으로 OH, SH, BH3-, BCNH2-이고,

[0032]

V = 각 경우 독립적으로 OH 또는 포스페이트 기이고, 또는 이의 2개의 기가 시클릭 포스페이트 기를 형성하고,

[0033]

W = COOR, CON(R)2, COR, CSN(R)2 (식 중, R = 각 경우 독립적으로 H 또는 C1-C2 알킬임)이고,

[0034]

X1, X2 = 각 경우 독립적으로 O, CH2, CHCH3, C(CH3)2, NH, NCH3이고,

[0035]

Y = NH, S, O, CH2이고,

[0036]

Z = 선형 또는 시클릭 유기 잔기임,

[0037]

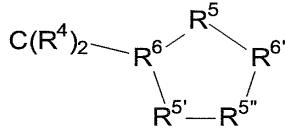
단, Z 및 페리딘 잔기는 글리코시드 결합에 의해 연결되지 않음).

[0038]

화학식 (II)의 화합물 중 Z는 바람직하게는, 4-6 C 원자, 바람직하게는 4 C 원자를 갖는 선형 잔기 (식 중, 1 또는 2 C 원자는 O, S 및 N으로부터 선택되는 1개 이상의 혼테로원자에 의해 임의로 대체됨), 또는 0, S 및 N으로부터 선택되는 혼테로원자 뿐 아니라 임의로 1개 이상의 치환기를 임의로 함유하는 5 또는 6 C 원자를 갖는 시클릭기를 포함하는 잔기, 및 잔기 CR42 (식 중, CR42는 시클릭기 및 X2에 결합되고, R4는 각 경우 독립적으로 H, F, Cl, CH3임)이다.

[0039]

Z는 특히 바람직하게는 포화 또는 불포화 카르보시클릭 또는 혼테로시클릭 5-원 고리, 특히 하기 일반식 (III)의 화합물이다:



(III)

[0041] (식 중, 단일 또는 이중 결합이 $R^{5'}$ 와 $R^{5''}$ 사이에 존재할 수 있고,[0042] R^4 = 각 경우 독립적으로 H, F, Cl, CH_3 이고,[0043] R^5 = CR_2^4 이고,[0044] $R^{5'}$ 와 $R^{5''}$ 사이에 단일 결합이 있는 경우, $R^{5'} = O, S, NH, NC_1-C_2-알킬, CR_2^4, CHO, CHOCH_3$ 이고, $R^{5''} = CR_2^4, CHO, CHOCH_3$ 이고,[0045] $R^{5'}$ 와 $R^{5''}$ 사이에 이중 결합이 있는 경우, $R^{5'} = R^{5''} = CR^4$ 이고,[0046] $R^6, R^{6'} = 각 경우 독립적으로 CH 또는 CCH_3 임).$ [0047] 바람직한 구현예에서 본 발명에 따른 화합물은 아데닌 또는 아데닌 유사체, 예컨대 C_8 -치환 및 N_6 -치환 아데닌, 테아자 변이체, 예컨대 7-테아자, 아자 변이체, 예컨대 8-아자 또는 조합, 예컨대 7-테아자 또는 8-아자 또는 카르보시클릭 유사체, 예컨대 포르마이신 (7-테아자 변이체는 할로겐, C_1-C_6 알카닐, C_1-C_6 알케닐 또는 C_1-C_6 알킬에 의해 7 위치에서 치환될 수 있음)을 함유한다.

[0048] 추가의 바람직한 구현예에서 화학식 (II)의 화합물은 예를 들어 2-메톡시데옥시리보오스, 2'-플루오로데옥시리보오스, 헥시톨, 알트리톨 또는 폴리시클릭 유사체, 예컨대 비시클로, LNA 및 트리시클로 당 (리보오스 대신)을 함유하는 아데노신 유사체를 함유한다.

[0049] 특히 (디)-포스페이트 산소는 또한 화학식 (II)의 화합물에서 아이소트론으로 대체될 수 있다 (예를 들어 O⁻ 가 S⁻ 또는 BH_3^- 에 의해, O 가 NH, NCH_3 또는 CH_2 에 의해 및 =O 가 =S에 의해). 본 발명에 따른 화학식 (II)의 화합물 중 W는 바람직하게는 $CONH_2$ 또는 $COCH_3$ 이다.[0050] 화학식 (III)의 그룹 중 R^5 는 바람직하게는 CH_2 이다. 게다가, $R^{5'}$ 가 CH_2 , $CHOH$ 및 NH로부터 선택되는 것이 바람직하다. 특히 바람직한 구현예에서 $R^{5'}$ 및 $R^{5''}$ 는 각각 $CHOH$ 이다. 또 다른 추가의 바람직한 구현예에서 $R^{5'}$ 는 NH이고, $R^{5''}$ 는 CH_2 이다. 화학식 (III)의 화합물 (식 중, $R^4 = H$ 이고, $R^5 = CH_2$ 이고, $R^{5'} = R^{5''} = CHO$ 이고, $R^6 = R^{6'} = CH$ 임)이 더욱 바람직하다. 바람직한 안정화된 조효소의 구체적인 예는 1A 및 1B에 제시된다. 가장 바람직한 구현예에서 안정화된 조효소는 화합물 carbaNAD이다.

[0051] 본 발명에 따른 방법은 효소의 장기간 안정화에 특히 적합하다. 이것은 안정화된 효소가 예를 들어 2 주 이상, 바람직하게는 4 주 이상, 가장 바람직하게는 8 주 이상의 기간에 걸쳐, 예를 들어, 건조 물질로서 또는 액상으로 저장되는 것을 의미하고, 이 동안 효소 활성은 효소 활성의 초기값에 대해 바람직하게는 50 % 미만, 더욱 바람직하게는 30 % 미만, 가장 바람직하게는 20 % 미만 까지 감소한다.

[0052] 본 발명에 따른 방법은 부가적으로는 승온에서, 예를 들어 20°C 이상, 바람직하게는 25°C 이상, 가장 바람직하게는 30°C 이상의 온도에서의 안정화된 효소의 저장을 포함하며, 이 동안 효소 활성은 효소 활성의 초기값에 대해 바람직하게는 50 % 미만, 더욱 바람직하게는 30 % 미만, 가장 바람직하게는 20 % 미만 까지 감소한다. 저장은 필요하다면, 상기 언급된 바와 같이 장기간 동안 수행될 수 있다.

[0053] 게다가, 본 발명에 따른 방법은 주위 광의 존재하에서, 즉, $\geq 300 \text{ nm}$ 의 파장의 광의 존재하에서의 안정화된 효소의 저장을 포함하며, 이 동안 효소 활성은 효소 활성의 초기값에 대해 바람직하게는 50 % 미만, 더욱 바람직하게는 30 % 미만, 가장 바람직하게는 20 % 미만 까지 감소한다. 이 경우 저장은 필요하다면, 상기 언급된 바와 같이 장기간 동안 또는/및 승온에서 수행될 수 있다. 주위 광에 대한 효소 시스템의 안정성으로 인해, 안정화된 효소는 부가적으로 또한 사용 전 또는/및 패키지 제거 후 잠시 직접 태양광에 노출될 수 있다.

[0054] 본 발명에 따른 안정화는 또한 안정화된 효소가 건조제 없이 또는/및 높은 상대 공기 습도에서, 예를 들어, 50 % 이상의 상대 공기 습도에서 저장될 수 있게 하고, 이 동안 효소 활성은 효소 활성의 초기값에 대해 50 % 미만, 더욱 바람직하게는 30 % 미만, 가장 바람직하게는 20 % 미만 까지 감소한다. 이 경우 저장은 필요하다면, 상기 언급된 바와 같이 장기간 동안, 승온에서 또는/및 주위 광의 존재하에 수행될 수 있다. 효소의 활성을 측정하기 위한 방법 또는 시험은 당업계에 널리 알려져 있고, 필요한 경우, 저장 전후 효소 활성을 비교하기 위해 각 경우에 동일한 시험 조건이 사용되는 곳의 각각의 필요성에 따라 당업자에 의해 채용될 수 있다.

[0055] 안정화된 효소는 한편으로는 건조 물질로서, 다른 한편으로는 액상으로 저장될 수 있다. 안정화된 효소는 바람직하게는, 분석물의 측정에 적합한 시험 요소 상에 또는 내에 저장된다. 이 경우 안정화된 효소는 바람직하게는, 다른 성분, 예컨대 매개체, 광학 표시기, 염, 완충액 등을 임의로 함유할 수 있는 검출 시약의 성분이다.

[0056] 안정화된 효소는 체액, 예컨대 혈액, 혈청, 혈장 또는 소변에서 또는 폐기물 샘플에서, 또는 식품에서 분석물, 예를 들어 파라미터를 검출하는데 사용될 수 있다. 산화환원 반응에 의해 검출될 수 있는 임의의 생물학적 또는 화학적 성분은 분석물로서, 예를 들어 조효소-의존적 효소의 기질 또는 조효소-의존적 효소 그 자체인 성분으로서 측정될 수 있다. 분석물의 바람직한 예는 글루코오스, 락트산, 말산, 글리세롤, 알코올, 콜레스테롤, 트리글리세라이드, 아스코르브산, 시스테인, 글루타티온, 웨티드, 우레아, 암모늄, 살리실레이트, 피루베이트, 5'-뉴클레오티다아제, 크레아틴 키나아제 (CK), 락테이트 디히드로게나아제 (LDH), 이산화탄소 등이다. 분석물은 바람직하게는 글루코오스이다.

[0057] 본 발명의 또다른 주제는 효소 반응에 의해 샘플 내 분석물을 검출하기 위한 본 발명에 따른 화합물 또는 본 발명에 따라 안정화된 효소의 용도이다. 이것은 특히 바람직하게는, 적합한 조효소를 사용하는 글루코오스 디히드로게나아제 (EC 1.1.1.47) 또는 글루코오스-6-포스페이트 디히드로게나아제 (EC 1.1.1.49)의 도움으로의 글루코오스의 검출이다.

[0058] 분석물과의 반응에 의해 야기되는 안정화된 조효소의 변화는 원칙적으로 임의의 방식으로 검출될 수 있다. 이 경우 원칙적으로 효소 반응 검출을 위한 종래 기술로부터 공지된 모든 방법을 이용하는 것이 가능하다. 그러나, 조효소 내 변화는 바람직하게는 광학적 방법에 의해 검출된다. 광학적 검출 방법은 예를 들어 흡수, 형광, 원편광 이색성 (CD), 선광 분산액 (ORD), 굴절률측정의 측정을 포함한다.

[0059] 바람직하게는 본 출원의 범주 내에서 사용되는 광학 검출 방법은 광도측정 및 형광측정이다. 분석물과의 반응으로 인한 조효소의 변화를 광도측정적으로 측정하기 위해서는, 그러나, 감소된 조효소의 반응성을 증가시키고 전자를 적합한 광학 표시기 또는 광학 표시기 시스템으로 이동시킬 수 있는 하나 이상의 매개체가 존재하도록 하는 것이 부가적으로 필수적이다.

[0060] 본 발명의 목적에 적합한 매개체에는 기타 니트로소아닐린 중에서, 예컨대 예를 들어 [(4-니트로소페닐)이미노]-디메탄을 히드로클로라이드, 퀴논, 예컨대 예를 들어 폐난트렌 퀴논, 폐난트롤린 퀴논 또는 벤조[h]-퀴놀린 퀴논, 폐나진, 예컨대 1-(3-카르복시프로포시)-5-에틸렌 폐나지늄 트리플루오로메탄 술포네이트 또는/및 디아포라아제 (EC 1.6.99.2) 가 포함된다.

[0061] 디아포라아제는 특히 폐나진과 비교하는 경우, 높은 안정성이라는 장점을 갖지만, 이들의 기능은 예를 들어 DE 2 061 984 A로부터 공지된 바와 같이 고유의 조효소의 분해 산물에 의해, 예를 들어 NAD 또는 NADP의 분해 산물에 의해 손상될 수 있다.

[0062] 본 발명의 범위 내의 폐난트롤린 퀴논의 바람직한 예는 1,10-폐난트롤린-5,6-퀴논, 1,7-폐난트롤린-5,6-퀴논, 4,7-폐난트롤린-5,6-퀴논 뿐 아니라 이의 N-알킬화 및 N,N'-디알킬화 염을 포함하며, N-알킬화 또는 N,N'-디알킬화 염의 경우, 가용성을 증가시키는 할로겐화물, 트리플루오로메탄 술포네이트 또는 기타 음이온이 반대이온으로서 바람직하다. 본 발명의 목적에 특히 적합한 디아포라아제는 예를 들어 폐지 심장, 클로스트리듐 류이베리 (Clostridium kluyverii) 및 바실러스 스테아로테루모필러스 (Bacillus stearothermophilus) 유래

의 디아포라아제 뿐 아니라, 고유의 디아포라아제와 비교하여 향상된 촉매 기능 및 열안정성을 갖는 US 2007/0196899A1에 기재된 디아포라아제 돌연변이체를 포함한다. 상기 US 출원의 기재를 본원에 명백하게 참조한다.

[0063] 환원가능하고 예를 들어 색상, 형광, 반사율, 투과율, 편광 또는/및 굴절률과 같은 광학 특성의 검출가능한 변화를 겪게 되는 임의의 성분이 광학 표시기로서 또는 광학 표시기 시스템으로서 사용될 수 있다. 샘플 내 분석물의 존재 또는/및 양의 측정은 맨눈으로 또는/및 당업자에게 적합한 것으로 보이는 광도측정 방법을 사용하는 검출 장치에 의해 수행될 수 있다. 헤테로폴리 산 및 특히 2,18-포스포몰리브덴산이 바람직하게는 상응하는 헤테로폴리 블루로 환원되는 광학 표시기로서 사용된다. 대안적으로는 광학 표시기로서 퀴논, 예를 들어 레사주린, 디클로로페놀 인도페놀 또는/및 테트라졸륨 염을 사용하는 것이 또한 가능하다. 본 발명의 목적에 특히 적합한 테트라졸륨 염은 예를 들어 시판 제품 WST-3, WST-4 및 WST-5 (모두 Dojindo Company 사제)를 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0064] 조효소 내 변화는 특히 바람직하게는 형광을 측정함으로써 검출된다. 형광 측정은 고도로 민감하고, 소형화된 시스템에서 심지어 저농도의 분석물이 검출되는 것을 가능하게 한다. 대안적으로는 조효소 내 변화는 또한 예를 들어 전기화학 시험 스트립과 같은 적합한 시험 요소를 사용하여 전기화학적으로 검출될 수 있다. 이를 위한 예비조건화는 다시 한번 전자의 이동에 의해 환원된 형태로 환원된 조효소에 의해 전환될 수 있는 적합한 매개체의 사용이다. 분석물은 샘플 내 분석물의 농도와 연관된 환원된 매개체를 재산화시키기 위해 필요한 전류를 측정함으로써 측정된다. 전기화학 측정에 사용될 수 있는 매개체의 예는 특히 광도측정 측정에 사용된 상기 언급된 매개체를 포함한다.

[0065] 시약이 예를 들어 수성 또는 비-수성 액체 중의 용액 또는 혼탁액의 형태로, 또는 분말 또는 동결건조물로서 존재하는 분석물을 검출하기 위해 액체 시험을 사용하는 것이 가능하다. 그러나, 또한 시약이 지지체에 적용된 건조 시험을 사용하는 것도 가능하다. 지지체는 예를 들어 조사되어 지는 샘플 액체에 의해 습윤되되되는 흡착제 또는/및 팽창성 물질을 포함하는 시험 스트립일 수 있다.

[0066] 특히 바람직한 시험 포맷은 환원된 조효소 NADH의 유도체가 형성되는 습윤 시험에서 특히 글루코오스의 검출을 위한 안정화된 NAD 유도체의 효소 글루코오스-6-포스페이트 디히드로게나아제의 사용을 포함한다. NADH는 광학적 방법에 의해 예를 들어, UV 여기 후 광도측정 또는 형광측정 측정에 의해 검출된다. 특히 바람직한 시험 시스템은 본원에 명백하게 참조된 US 2005/0214891에 기재된다.

[0067] 본 발명의 추가의 양상은 안정화된 조효소로 안정화된 효소에 관한 것이고, 상기 안정화된 효소는 적합하게는 높은 공기 습도에서 또는/및 건조제의 부재하에서, 20°C 이상, 바람직하게는 25°C 이상, 가장 바람직하게는 30°C 이상의 온도에서 또는/및 $\geq 300\text{ nm}$ 의 파장의 광의 존재하에서 2 주 이상, 바람직하게는 4 주 이상, 가장 바람직하게는 8 주 이상 동안 저장된 경우, 효소 활성의 초기값에 대해 50% 미만, 바람직하게는 30% 미만, 가장 바람직하게는 20% 미만의 효소 활성의 감소를 나타낸다. 이 경우 효소는 상기 언급된 바와 같이 사용된다.

[0068] 본 발명의 또 다른 추가의 양상은 상기 언급된 바와 같은 안정화된 효소를 함유하는 분석물을 측정하기 위한 검출 시약에 관한 것이다. 또한 본 발명은 본 발명에 따라 안정화된 효소 또는 본 발명에 따른 검출 시약을 함유하는 시험 요소에 관한 것이다. 검출 시약 및 시험 요소는 건조 시험 또는 액체 시험을 수행하는데 적합할 수 있다. 시험 요소는 바람직하게는, 분석물의 형광측정 또는 광도측정 검출을 위한 시험 스트립이다. 이러한 시험 스트립은 안정화된 효소를 흡착제 또는/및 팽창성 물질, 예컨대 셀룰루오스, 플라스틱 등 상에 부동화된 형태로 함유한다.

[0069] 본 발명의 또 다른 추가의 양상은 이전에 구체화된 바와 같은 효소가 고유의 조효소의 존재하에서 저장되는, 특히 주위 광에 대해 효소를 안정화하기 위한 방법에 관한 것이다. 바람직한 변형에서 알코올 디히드로게나아제 (EC 1.1.1.1; EC 1.1.1.2), 글루코오스 디히드로게나아제 (EC 1.1.1.47), 글루코오스-6-포스페이트 디히드로게나아제 (EC 1.1.1.49) 또는 디아포라아제 (EC 1.6.99.2)가 효소로서 사용되고, 고유의 및 돌연변이된 글루코오스 디히드로게나아제를 포함하는 글루코오스 디히드로게나아제 (EC 1.1.1.47), 및 글루코오스-6-포스페이트 디히드로게나아제 (EC 1.1.1.49)가 특히 바람직하다. 고유의 니코틴아미드 아데닌 디뉴클레오티드 (NAD/NADH) 또는 고유의 니코틴아미드 아데닌 디뉴클레오티드 포스페이트 (NADP/NADPH) 화합물, 및 특히 고유의 NAD 또는 NADP가 고유의 조효소로서 바람직하게는 사용된다.

[0070] 본 발명을 하기 도면 및 실시예를 근거로 하여 더욱 상세히 설명하는 것으로 의도된다.

발명의 효과

[0071]

본 발명의 추가의 양상은 안정화된 조효소로 안정화된 효소에 관한 것이고, 상기 안정화된 효소는 적합하게는 높은 공기 습도에서 또는/및 건조제의 부재하에서, 20°C 이상, 바람직하게는 25°C 이상, 가장 바람직하게는 30°C 이상의 온도에서 또는/및 $\geq 300\text{ nm}$ 의 파장의 광의 존재하에서 2 주 이상, 바람직하게는 4 주 이상, 가장 바람직하게는 8 주 이상 동안 저장된 경우, 효소 활성의 초기값에 대해 50 % 미만, 바람직하게는 30 % 미만, 가장 바람직하게는 20 % 미만의 효소 활성의 감소를 나타낸다.

도면의 간단한 설명

[0072]

도 1A: 안정화된 조효소 carbaNAD (cNAD) 의 다이아그램.

도 1B: 안정화된 조효소 피롤리디닐 NAD 의 다이아그램.

도 2: 저장 전후, NAD 의 존재하에서의 글루코오스 디히드로게나아제 및 cNAD 의 존재하에서의 글루코오스 디히드로게나아제의 효소 키네티ك의 결과의 다이아그램.

2A: 1 일 후 NAD 의 존재하에서의 GlucDH 의 키네티ك.

2B: 1 일 후 cNAD 의 존재하에서의 GlucDH 의 키네티ك.

2C: 32°C 및 85 % 상대 공기 습도에서 5 주 저장 후 NAD 의 존재하에서의 GlucDH 의 키네티ك.

2D: 32°C 및 85 % 상대 공기 습도에서 5 주 저장 후 cNAD 의 존재하에서의 GlucDH 의 키네티ك.

도 3: 32°C 및 85 % 공기 습도에서의 5 주 이하의 기간에 걸친 NAD 의 존재하에서의 글루코오스 디히드로게나아제 또는 cNAD 의 존재하에서의 GlucDH 의 블랭크 값의 비교.

도 4: 32°C 및 85 % 공기 습도에서 NAD 의 존재하에서의 글루코오스 디히드로게나아제의 저장 후 글루코오스 디히드로게나아제의 다양한 기능 곡선의 다이아그램. 저장 기간은 1 일에서 5 주로 다양하였다.

도 5: 32°C 및 85 % 공기 습도에서 cDNA 의 존재하에서의 글루코오스 디히드로게나아제의 저장 후 글루코오스 디히드로게나아제의 다양한 기능 곡선의 다이아그램. 저장 기간은 1 일에서 5 주 (도 5A), 1 일에서 24 주 (도 5B)로 다양하였다.

도 6: 32°C 및 85 % 공기 습도에서 24 주 동안 각각 NAD 또는 cNAD 의 존재하에서의 글루코오스 디히드로게나아제의 저장 후 NAD 또는 cNAD 의 잔류 함량의 다이아그램.

도 7: 32°C 및 85 % 공기 습도에서 5 주 (도 7A) 또는 24 주 (도 7B) 동안 NAD 또는 cNAD 의 존재하에서의 글루코오스 디히드로게나아제의 저장 후 GlucDH 활성의 다이아그램.

도 8: 32°C 및 83 % 상대 공기 습도에서 NAD 또는 cNAD 의 존재하에서 25 주의 기간 동안 글루코오스 디히드로게나아제 (GlucDH-wt), 이중 돌연변이체 GlucDH_E96G_E170K (GlucDH-Mut1) 및 이중 돌연변이체 GlucDH_E170K_K252L (GlucDH-Mut2) 의 저장 후 GlucDH 활성의 다이아그램.

도 9: 4 일 (도 9A) 또는 14 일 (도 9B)의 기간 동안 50°C에서 액상 내 NAD 또는 cNAD 의 존재하에서의 글루코오스 디히드로게나아제의 안정성의 다이아그램. 시험 조건: 10 mg/ml GlucDH; 12 mg/ml NAD 또는 cNAD; 완충액: 0.1 M Tris, 1.2 M NaCl, pH 8.5; 온도 50°C.

도 10: cNAD 의 존재하에서의 알코올 디히드로게나아제의 다양한 기능 곡선의 다이아그램. cNAD 의 농도는 액체 시험 중 NAD 의 초기 농도에 대해 25 % 내지 150 %로 다양하였다.

도 11: 다양한 에탄올 농도에서 cNAD 의 존재하에서의 알코올 디히드로게나아제의 효소 키네티ك의 결과의 다이아그램.

도 12: 65 시간의 기간 동안 35°C에서 액상 내 NAD 또는 cNAD 의 존재하에서의 효모 유래의 알코올 디히드로게나아제의 안정성의 다이아그램. 시험 조건: 5 mg/ml ADH; 50 mg/ml NAD 또는 cNAD; 완충액: 75 mM Na₄P₂O₇; 글리신, pH 9.0; 온도 35°C.

도 13: 실온에서 NAD 및 상이한 매개체의 존재하에서의 11 주 저장 후 글루코오스 디히드로게나아제의 다양한 기능 곡선의 다이아그램.

도 14: 다양한 글루코오스 농도에서 NAD 및 1-(3-카르복시프로포시)-5-에틸페나지늄-트리플루오로메탄 슬포네이트의 존재하에서의 글루코오스 디히드로게나아제의 효소 키네틱의 결과의 다이아그램.

도 15: 효소로서 GlucDH 및 매개체로서 디아포라아제를 사용하는 글루코오스 검출의 대표 도식.

도 16: 매개체로서 피롤로퀴놀린 퀴논 (PQQ) 및 [(4-니트로소페닐)이미노]디메탄을 히드로클로라이드의 존재하에서의 글루코오스-염료-옥시도리덕타아제 (GlucDOR) 의 및 매개체로서 NAD 및 디아포라아제 / [(4-니트로소페닐)이미노]-디메탄을 히드로클로라이드의 존재하에서의 글루코오스 디히드로게나아제의 기능 곡선의 다이아그램.

도 17: 다양한 글루코오스 농도에서 NAD 및 디아포라아제의 존재하에서의 글루코오스 디히드로게나아제의 효소 키네틱의 결과의 다이아그램.

도 18: NAD 또는 cNAD 의 존재하에서 글루코오스 디히드로게나아제를 사용하는 글루코오스의 전기화학 측정에서 글루코오스 농도의 함수로서 측정된 전류의 다이아그램. 시험 조건: 25 mM NAD 또는 cNAD; 2.5 초 지연; 5 초 측정 시간.

도 19: 360 nm 의 파장의 UV 광의 조사 후 NAD 의 존재하에서의 글루코오스 디히드로게나아제의 다양한 기능 곡선의 다이아그램.

도 20: 250-450 nm 의 파장 범위 내 cNAD 및 cNADH 의 흡수 스펙트럼의 다이아그램.

도 21: 글루코오스 디히드로게나아제 이중 돌연변이체 GlucDH_E96G_E170K 및 GlucDH_E170K_K252L 의 아미노산 서열의 다이아그램.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0073]

실시예 1

carbaNAD (도 1A) 또는 NAD 를 글루코오스-특이적 GlucDH 에 첨가하였다. 상기 제형을 각각 Pokalon foils (Lonza) 에 적용하고, 건조 후, 따뜻하고 습한 조건 하에서 저장하였다 (32°C, 85 % 상대 공기 습도). 이어서, 반응 키네틱 및 기능 곡선을 규칙적인 간격으로 측정하였다. 동시에 각각의 측정 시간에 cNAD/NAD 분석 및 효소의 잔류 활성의 측정을 수행하였다.

[0075] 제 1 일에 측정된 NAD (도 2A) 및 cNAD (도 2B) 에 대한 키네틱 곡선을 비교하고, 또한 글루코오스 의존성에서 유사한 증가를 보였다. 그러나, 5 주 후에 키네틱 곡선 내 유의한 차이를 볼 수 있었다. NAD 에 대한 키네틱의 동적 범위 내 주요 감소가 있는 반면 (도 2C), cNAD 로 안정화된 효소의 키네틱은 사실상 불변으로 남아있다 (도 2D).

[0076] 또한 도 3 에 제시된 바와 같이 블랭크 값 (혈액 샘플 적용 전 건조 블랭크 값) 에 상당한 차이가 있다. NAD 에 대한 건조 블랭크 값의 증가는 형광 입자의 형성으로 인한 것이다 (Oppenheimer (1982), Supra). 놀랍게도, 이것은 cNAD 로는 발생하지 않는다.

[0077] NAD 또는 cNAD 의 존재하에서의 글루코오스 디히드로게나아제의 상이한 안정성은 또한 도 4 및 5 의 비교로부터 명백하다. 5 주 후, cNAD 로 안정화된 효소에 대한 기능 곡선은 여전히 이전 측정의 곡선의 설정 내에 있는 반면 (도 5A), NAD 로 처리된 효소에 대한 곡선 (도 4) 이 불충분한 양의 효소/조효소에 대한 전형적인 징표인 고농도에서의 하락을 나타낸다. 도 5B 는 24 주의 기간에 걸쳐 cNAD 로 안정화된 글루코오스 디히드로게나아제의 다양한 기능 곡선을 보여준다. 이와 관련하여 효소의 기능이 전체 기간에 걸쳐 고 글루코오스 농도에서 오직 약간 변하며, 24 주 후에 5 주 후 수득된 값에 대략 해당하는 것이 명백하다.

[0078] 미리 결정된 기간에 걸친 조효소의 구조와 이의 안정성 사이의 관계는 도 6 에 제시된다. 이에 따르면, 글루코오스 검출 시약 내 cNAD 의 잔류 함량은 24 주 저장 (32°C 및 85 % 상대 공기 습도에서) 후 여전히 초기값의 약 80 % 인 반면, NAD 로 안정화된 글루코오스 검출 시약 내 NAD 의 함량은 이미 5 주 후 초기값의 약 35 % 로 감소되었고, 추정에 의해 약 17 주 후 0 으로 감소된다.

[0079] 32°C 및 85 % 상대 공기 습도에서 5 주 후 활성 효소 GlucDH 의 잔류 활성의 측정 결과 (도 7A) 는 완전히 놀라웠다. NAD 로 안정화된 효소는 이제 매우 낮은 효소 활성 (0.5 %) 만을 가지는 반면, cNAD 로 안정화된 효소는 여전히 70 % 의 잔류 활성을 갖는다 (각 경우 건조제 (TM) 와 함께 냉장고 (KS) 에서 저장된 샘플과 비교하여). 32°C 및 85 % 상대 공기 습도에서 24 주 후 (도 7B) cNAD 로 안정화된 효소의 잔류 활성은 여전히

약 25 % 이다.

[0080] 돌연변이체가 야생형 효소 (바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*) 유래의) 대신 사용되는 경우, GlucDH 의 잔류 활성을 추가로 증가시키는 것이 가능하다. cNAD 의 존재하에서의 32°C 및 85 % 상대 공기 습도에서 24 주 저장 후 야생형 효소의 위치 96에서 글루탐산 → 글리신 및 위치 170에서 글루탐산 → 리신 아미노산 치환을 갖는 돌연변이체 GlucDH_E96G_E170K (GlucDH-mut1) 의 잔류 활성은 약 70 % 인 반면, 위치 170에서 글루탐산 → 리신 및 위치 252에서 리신 → 류신 아미노산 치환을 갖는 돌연변이체 GlucDH_E170K_K252L (GlucDH-mut2) 의 잔류 활성은 약 50 % 이다 (도 8).

[0081] 액상 내 글루코오스 디히드로게나아제의 저장은 또한 NAD 및 cNAD 사이의 차이를 명백하게 보여준다 (도 9A 및 9B). 50°C에서 95시간 후, 고유의 조효소 NAD의 존재하에서의 글루코오스 디히드로게나아제의 잔류 활성은 ≈ 5 % 인 반면, 인공 조효소 cNAD의 존재하에서의 GlucDH의 잔류 활성은 75 % 이다 (도 9A). 50°C에서 336시간 저장 후, NAD로 안정화된 효소의 잔류 활성은 이제 오직 약 1 % 이고; 여전히 약 70 % 의 잔류 활성이 cNAD의 존재하에서 저장된 효소에 대해 관찰된다. 상응하는 SDS 젤 또한 고유의 조효소 NAD의 존재하에서의 GlucDH 밴드에서의 변화를 보여준다: 새로운 밴드는 높은 물 질량에서 관찰되고, 30 kDa 밴드의 이동이 있다.

[0082] 전반적으로 조인자의 안정화가 동시에 효소의 안정화를 야기한다는 것은 매우 놀라운 결과이다 (효소의 더욱 양호한 응집의 협력 효과를 통해서 뿐 아니라). 조인자 NAD의 분해는 효소 GlucDH의 안정성에 역효과를 갖고 심지어 이의 불활성화를 가속화한다. 인공 유사체에 의한 고유의 NAD의 대체는 GlucDH가 심지어 조인자의 존재 하 스트레스 조건 하에서 (예를 들어, 승온) 저장될 수 있게 한다.

[0083] 이러한 시스템으로 상당히 개선된 안정성 특성을 갖는 혈중 글루코오스 시험 스트립을 제조하는 것이 가능하고, 이를 위해 건조제가 없는 제시물이 가능하다.

실시예 2

[0085] cNAD 또는 NAD를 알코올 디히드로게나아제를 함유하는 검출 용액에 첨가하였다. 상기 혼합물을 2 - 8°C 및 35°C에서 저장하였다. 이어서, 알코올 디히드로게나아제 (ADH)의 안정성을 규칙적인 간격으로 체크하고, 효소의 잔류 활성을 측정하였다.

[0086] 도 10은 에탄올을 측정하기 위한 효소 시스템 ADH/cNAD의 실시 유용성을 증명하는 다양한 농도의 cNAD의 존재하에서 알코올 디히드로게나아제 (ADH)에 의한 에탄올의 전환의 선형성을 나타낸다. 게다가, 알코올 디히드로게나아제 및 cNAD의 조합에 의한 에탄올의 전환의 키네티ック 곡선은, 에탄올 농도가 증가하면 전환 속도가 증가하여 기질의 농도에 대해 상당한 의존성이 있음을 보여준다 (도 11).

[0087] 또다시 액상 내 저장은 NAD 또는 cNAD의 존재하에서의 저장 사이의 차이를 보여준다 (도 12). 고유의 조효소 NAD의 존재하에서 알코올 디히드로게나아제의 잔류 활성은 35°C에서 65시간 후 약 6 % 인 반면, 인공 조효소 cNAD의 존재하에서의 효소의 잔류 활성은 여전히 약 60 % 이다.

[0088] 알코올 디히드로게나아제가 고유의 NAD 또는 cNAD와 함께 냉장고 2 - 8°C에서 수 개월 동안 저장되는 경우, 전체 저장 기간에 걸쳐 cNAD의 경우 효소 활성의 상당한 감소가 관찰된다. 2주 저장 후 차이는 여전히 약한 반면, 조효소로서 16 mM NAD를 함유하는 상응하는 용액과 비교하여 16 mM cNAD의 존재하에서 12개월 저장 후 알코올 디히드로게나아제의 대략 20 % 높은 잔류 활성이 있다. 결과를 표 1에 제시한다.

표 1

성분	농도 (mmol/l)	U/ml (초기 값)	척량된 양의 % (초기 값)	2-8°C에서 2주 (초기 값의 %)	2-8°C에서 3개월 (초기 값의 %)	2-8°C에서 7.5개월 (초기 값의 %)	2-8°C에서 10개월 (초기 값의 %)	2-8°C에서 12개월 (초기 값의 %)
펼쳐하는 혼합물 (NAD)	16	142.2	85.2	96.9	92.1	80.2	70.3	60.5
교환 NAD/cNAD	16	120.2	71.9	100.7	91.3	95.6	88.2	83.8

[0091] 사용된 cNAD의 양과 관련된 안정화의 범위를 표 2에 제시한다. 따라서, 알코올 디히드로게나아제의 잔류 활성은 cNAD의 농도를 증가시켜, 2 - 8°C에서 2주 동안 보관되었던 샘플에서 다소 증가할 수 있다. 35

℃에서 2 주 동안 효소의 저장을 고려하는 스트레스 모델에서, 알코올 디히드로게나아제의 효소 활성의 감소는 그러나 cNAD 의 농도가 증가하면 약간 증가될 수 있고, cNAD 에 대한 15 mM 의 농도의 경우 0.5 mM cNAD 의 존재하에서 효소의 용액과 비교해 대략 45 % 높은 잔류 활성이 관찰된다.

표 2

샘플	pH/첨가제	U/ml (초기 값)	처량된 양의 % (초기 값)	2-8°C에서 2 주 (초기 값의 %)	35°C에서 2 주 (초기 값의 %)
1	pH 7.85 0.5 mM cNAD	123.1	73.7	93.8	31.1
2	pH 7.85 1 mM cNAD	125.8	75.3	97.7	45.5
3	pH 7.85 5 mM cNAD	125.1	74.9	101.1	74.1
4	pH 7.85 15 mM cNAD	123.7	74.1	104.0	77.6

[0093]

실시예 3

글루코오스를 측정하기 위해, 글루코오스 디히드로게나아제, NAD, 매개체 및 적합하게는 광학 표시기를 각각 함유하고 있는 다양한 시험 시스템을 광도측정적으로 그리고 전기화학적으로 측정하였다.

광도측정 측정을 위해, 실온에서 11 주 동안 각각 저장하였고 글루코오스 디히드로게나아제, NAD 및 매개체 외에 2,18-포스포몰리브덴산을 함유하는 4 개의 시험 요소를 다양한 글루코오스 농도에서 처음으로 조사하였다.

도 13에 제시된 바와 같이, 사용되었던 모든 4 개의 매개체, 즉, [(4-니트로소-페닐)이미노]디메탄을 히드로로라이드 (med A), 1-메틸-5,6-디옥소-5,6-디히드로-1,10-페난트롤리늄-트리플루오로메탄 술포네이트 (med B), 7-메틸-5,6-디옥소-5,6-디히드로-1,7-페난트롤리늄-트리플루오로메탄 술포네이트 (med F) 및 1-(3-카르복시-프로포시)-5-에틸페나지늄-트리플루오로메탄 술포네이트 (med G)에 대해, 글루코오스 농도가 증가하면 반사율의 감소가 관찰되었고, 그러므로 상기 언급된 매개체는 광도측정에 의한 글루코오스의 측정에 원칙적으로 적합하다.

800 mg/dl 의 영역 내 높은 글루코오스 농도에서 [(4-니트로소페닐)이미노]디-메탄을 히드로클로라이드 또는 1-(3-카르복시프로포시)-5-에틸페나지늄-트리플루오로메탄 술포네이트를 사용하는 경우 측정된 샘플의 반사율은 여전히 약 20 %이며, 이는 상기 2 개의 매개체가 글루코오스 디히드로게나아제 / NAD 시스템을 사용하는, 및 그러므로 또한 글루코오스 디히드로게나아제 / cNAD 시스템을 사용하는 광도측정 측정에 대해 특히 적합하다는 것을 암시한다. 0 내지 800 mg/dl 범위의 글루코오스 농도에서 시스템 글루코오스 디히드로게나아제, NAD, 1-(3-카르복시프로포시)-5-에틸페나지늄-트리플루오로메탄 술포네이트 및 2,18-포스포몰리브덴산을 사용하는 글루코오스의 전환 키네тика 도 14에 제시된다.

도 15의 대표 도식은 글루코오스의 광도측정 측정이 또한 중간 매개체로서 디아포라아제의 (부가적인) 사용과 함께 일어날 수 있다는 것을 보여준다. 도 16은 글루코오스 디히드로게나아제, NAD, 디아포라아제, [(4-니트로소페닐)-이미노]디메탄을 히드로클로라이드 및 2,18-포스포몰리브덴산 시스템 (시스템 1)의 경우 반사율에서의 농도-의존성 감소를 나타낸다. 글루코오스-염료-옥시도리덕타아제, 피롤로퀴놀린 퀴논, [(4-니트로소페닐)이미노]디메탄을 히드로클로라이드 및 2,18-포스포몰리브덴산 시스템 (시스템 2)은 마찬가지로 반사율의 농도-의존성 감소를 야기하나 글루코오스-염료-옥시도리덕타아제의 낮은 특이성 때문에 단점을 갖는 비교로서 담당하였다. 시스템 1을 사용하는 글루코오스의 전환 키네тика는 0 내지 800 mg/dl 범위의 글루코오스 농도에 대해 도 17에 제시된다.

광도측정의 대안으로서, 전기화학 측정이 또한 분석물의 측정 목적을 위해 사용될 수 있다. 그러므로, 환원된 매개체를 재산화시키는데 필요한 전류는 글루코오스 디히드로게나아제 외에, 조효소로서 NAD 및 매개체로서 1-(3-카르복시프로포시)-5-에틸페나지늄-트리플루오로메탄 술포네이트를 함유한 시험 요소에 대해, 그리고 NAD 대신 안정화된 조효소 cNAD 를 함유한 상응하는 시스템에 대해 모두 글루코오스 농도에 선형으로 의존적이라는 것이 발견되었다 (도 18).

분석물 측정이 디히드로게나아제 / 안정화된 조효소 시스템을 사용할 뿐 아니라 조효소에 독립적인 또 다른 광장에서 전기화학 검출 및 평가에 의해 수행될 수 있다는 것을 보여주었다. 전반적인 제형은 또한 안정화된 효소 / 조효소 쌍의 사용에 의해 추가로 안정화되어야만 한다.

[0102] **실시예 4**

주위 광에 대한 안정성을 측정하기 위해, NAD 또는 carbaNAD 와 조합으로 글루코오스 디히드로게나아제 (GlucDH), 글루코오스-6-포스페이트 디히드로게나아제 (G6PDH) 및 글루코오스 디히드로게나아제 돌연변이체 2 (GlucDH-mut2)로부터 선택된 효소를 각각 함유하는 다양한 시험 시스템을 WO 03/097859 A2 에 기재된 방법에 따라 제조하였고, 이어서 혈액 샘플을 첨가했다. 특히 시험 시스템은 지지체에 효소 및 조효소를 포함하는 광중합가능 액체 조성물을 적용하고 이어서 360 nm 및 400 W 의 파장의 광으로 10 초 동안 조성물을 조사하여 12 - 15 μ m 의 두께를 갖는 시약 층을 수득함으로써 제조하였다. 검출을 수 분의 기간 동안 형광 방식으로 수행하였다.

[0104] 도 19 는 GlucDH/NAD 시스템에 대한 측정 결과를 보여준다. 그라프에 의해 제시되는 바와 같이 전체 측정 기간에 걸쳐 어떤 식으로도 형광의 감소가 관찰되지 않고 이것으로 심지어 에너지-풍부 방사로 수 분 지속되는 시약 층의 조사가 영역 \geq 300 nm 에서 GlucDH/NAD 시스템의 흡수의 결핍으로 인해 시약 층을 순상시키지 않는다는 결론을 얻었다. G6PDH/NAD 시스템 및 carbaNAD-함유 시스템 GlucDH/carbaNAD, G6PDH/carbaNAD 및 GlucDH-mut2/carbaNAD 가 파장 영역 \geq 300 nm 에서 흡수하지 않는다는 사실을 고려하면 (도 20), 모든 상기 시스템은 또한 주위 광에 대한 높은 안정성을 갖는다 (결과는 제시되지 않음).

[0105] **실시예 5**

[0106] 본원에 기재된 진단 시험 요소를 제조하는데 사용될 수 있는 조성물의 구체적 예가 하기에 열거된다.

[0107] a) **락테이트 디히드로게나아제의 활성을 측정하기 위한 액체 시약**

[0108] 다른 것 중에서, 디아포라아제, carbaNAD, 테트라졸륨 염 및 락테이트를 함유한 액체 시약을 락테이트 디히드로게나아제의 활성을 측정하기 위해 사용하였다. 25°C 에서 용액으로 저장되었던 검출 시약은 하기 성분을 함유하였다:

[0109] 3 U/ml 디아포라아제 (돼지 심장 유래)

[0110] 2 mM carbaNAD 또는 0.2 mM NAD

[0111] 2 mM 테트라졸륨 염 WST-3

[0112] 50 mM Na 락테이트

[0113] 0.1 M 트리신/HCl, pH 8.8

[0114] 다양한 저장 시간에서 디아포라아제의 활성의 측정은, 조효소로서 NAD 를 함유하는 상응하는 제형에 비해 carbaNAD 를 함유하는 제형의 상당히 증가된 진류 활성을 보였다.

[0115] b) **혈중 글루코오스의 측정을 위한 시험 스트립**

[0116] 다른 것 중에서, 글루코오스 디히드로게나아제 (GlucDH), carbaNAD, 디아포라아제, 니트로소아닐린 및 포스포몰리브덴산을 함유한 조성물을 혈중 글루코오스를 측정하기 위해 사용하였다. 시험 스트립은 닥터 블레이드 (층 높이 100 μ m) 를 사용하여 폴리카보네이트 호일에 첫번째 제형을 적용하고, 첫번째 층을 건조시키고, 첫번째 층에 두번째 제형을 적용하고 (닥터 블레이드 캡 30 μ m), 두번째 층을 건조시키고, 이들을 32°C 및 30 - 70 % 상대 공기 습도에서 저장하여 수득했다. 제 1 층 및 제 2 층에 사용되는 제형은 표 3 에 제시된다:

표 3

성분	제 1 층	제 2 층
잔탄검	0.09 g	---
나트륨 알루미늄 실리케이트	5.00 g	---
폴리비닐 프로파이드 분산액 (수중 50 중량%)	4.80 g	5.80 g
메틸 비닐 에테르-말레산 공중합체	---	1.40 g
이산화티탄	---	14.00 g
NaOH 16 %	---	2.80 g
규산	---	2.50 g
포스페이트 완충액 0.1 M	13.80 g	4.40 g
N-옥타노일-N-메틸-글루카미드	0.17 g	0.34 g
Na-메틸 올레일 타우레이트	0.03 g	0.03 g
폴리비닐 피롤리돈 (MW 25000)	0.85 g	1.80 g
테트라에틸암모늄 클로라이드	0.12 g	---
비스-(2-히드록시에틸)-(4-히드록시아미노시 클로헥사-2,5-디에닐리텐)-암모늄 클로라이 드	0.10 g	---
2,18-포스포몰리브덴산, 헥사나트륨 염	0.50 g	---
NaCl	1.00 g	---
carbaNAD (또는 NAD)	1.00 g (0.10 g)	---
디아포라아제	1.94 g (203 KU)	---
글루코오스 디히드로게나아제	0.97 g (207 KU)	---
헥산올	0.17 g	0.16 g
2-메톡시-프로판올	4.30 g	4.30 g

[0118]

디아포라아제의 활성을 다양한 저장 시간에 시험 스트립으로부터 효소를 추출함으로써 측정하였고, carbaNAD 를 함유하는 제형의 경우 NAD 를 함유하는 제형과 비교하여 상당히 증가된 잔류 활성이 관찰되었다.

c) 트리글리세라이드의 측정을 위한 시험 스트립

다른 것 중에서, 글리세롤 디히드로게나아제, carbaNAD, 디아포라아제 및 테트라졸륨 염을 함유한 조성물을 트리글리세라이드를 측정하기 위해 사용하였다. 시험 스트립을 닥터 블레이트 (층 높이 80 μm) 에 의해 폴리카보네이트 호일에 표 4 에 언급된 제형을 적용하고, 후속 건조에 의해 수득하고, 이것을 32°C 및 30 ~ 70% 상대 공기 습도에서 저장하였다.

표 4

성분	양
잔탄검	0.30 g
규산 (Aerosil)	5.00 g
폴리비닐 프로파이드 분산액 (수중 50 중량%)	6.00 g
이산화티탄	18.00 g
N-옥타노일-N-메틸-글루카미드	0.20 g
폴리비닐 피롤리돈 (MW 25000)	0.40 g
트리신	0.30 g
HCl	ad pH 8.5
리파아제 (돼지 췌장), 12 KU/g	5.00 g
글리세롤 디히드로게나아제, 100 U/mg	1.00 g
carbaNAD (또는 NAD)	1.60 g (0.20 g)
디아포라아제, 20 U/mg	2.00 g
WST-5	2.00 g
물	82.00 g

[0123]

디아포라아제의 활성을 시험 스트립으로부터 효소를 추출함으로써 다양한 저장 시간에 측정하였고, carbaNAD 를 함유하는 제형의 경우 NAD 를 함유하는 제형에 비해 상당히 증가된 잔류 활성이 관찰되었다.

[0125] 실시예 6

[0126] carbaNAD 에 의한 글루코오스 디히드로게나아제 및 디아포라아제의 안정화를 평가하기 위해, 다수의 시험 스트립을 실시예 5 와 유사하게 제조하였다. 시험 스트립의 제 1 층 및 제 2 층에 사용된 제형은 표 5 에 제시된다.

[0127] 표 5

성분	제 1 층	제 1 층	제 2 층
잔탄검	0.29 g	0.29 g	---
Gantrez S97	---	---	1.44 g
데트라에틸암모늄 클로라이드	0.07 g	0.07 g	0.45 g
Mega 8	0.17 g	0.17 g	0.36 g
Geropon T77	0.03 g	0.03 g	0.03 g
폴리비닐 피롤리돈 (MW 25000)	0.87 g	0.87 g	1.99 g
Transpafill (또는 규산)	4.82 g (4.79 g)	4.82 g (4.79 g)	---
규산	---	---	16.02 g
이산화티탄	---	---	2.18 g
프로피오판	5.04 g	5.02 g	6.14 g
N,N-비스-(2-히드록시에틸)-4-나트로소아닐린	0.10 g	0.10 g	0.16 g
2,18-포스포몰리브덴산, 헥사나트륨 염	0.33 g	0.33 g	1.98 g
K/Na 원총 액 0.1 M	10.00 g	9.96 g	---
NAD	0.58 g	---	---
carbaNAD	---	4.00 g	---
글루코오스 디히드로게나아제, 풀연변이체 2	1.06 g (324 KU)	1.06 g (324 KU)	---
디아포라아제	0.78 g (80 KU)	1.26 g (130 KU)	---
K ₃ [Fe(CN) ₆]	0.01 g	0.01 g	0.01 g
NaOH 16 %	0.25 g	0.28 g	2.69 g
tert. 아밀 알코올	1.00 g	1.00 g	1.07 g

[0128]

[0129] 시험 스트립을 18 주의 기간에 걸쳐 5°C (KS, 냉장고), 25°C (RT), 30°C (GT), 35°C (DT) 및 45°C (HT) 의 온도에서 저장하였고, 시험 스트립 내 효소 활성을 저장 시작 (0 주), 6 주 후, 9 주 후, 12 주 후 및 18 주 후에 측정하였다. 결과를 표 6 (글루코오스 디히드로게나아제) 및 표 7 (디아포라아제) 에 제시한다.

[0130] 표 6

저장 온도	조효소	효소 활성 (U/cm ²)					
		0 주	6 주	9 주	12 주	18 주	표적
KS	NAD	14.6	16.5	16.6	14.4	13.8	25.4
RT			15.8	14.4	12.9	12.2	
GT			n.d.	n.d.	9.7	9.1	
DT			12.9	10.9	9.4	8.5	
HT			7.8	6.2	n.d.	n.d.	
KS	carbaNAD	19.8	20.4	21.2	18.5	18.8	25.8
RT			20.7	21.5	18.0	17.7	
GT			n.d.	n.d.	17.6	16.8	
DT			19.8	20.2	17.2	16.9	
HT			19.0	18.8	n.d.	n.d.	

[0131]

표 7

저장 온도	조효소	효소 활성 (U/cm^2)				
		0 주	6 주	9 주	12 주	표적
KS	NAD	2.7	2.2	2.4	3.3	3.7
RT			2.3	2.2	2.8	3.4
GT			n.d.	n.d.	2.4	2.8
DT			1.5	1.8	2.4	2.8
HT			1.5	1.1	n.d.	n.d.
KS	carbaNAD	4.6	4.4	5.2	4.8	7.0
RT			4.5	5.1	4.6	6.7
GT			n.d.	n.d.	4.3	6.2
DT			3.4	4.4	4.0	5.3
HT			3.9	3.8	n.d.	n.d.

[0133]

표 7 및 8에 제시된 바와 같이, 18 주 기간에 걸친 carbaNAD의 존재하에서의 글루코오스 디히드로게나아제 및 디아포라아제의 저장은 높은 효소 활성이 유지되도록 하는 반면, NAD의 존재하에서의 효소의 분해 속도는 상당히 더욱 두드러진다.

[0135]

실시예 7

다양한 디히드로게나아제의 열안정성에 대한 NAD 및 carbaNAD의 영향을 측정하기 위해, 효소 ($1 \text{ mg}/\text{ml}$)를 각각의 측정 완충액에 대하여 제 1 단계에서 20 시간 동안 4°C 에서 투석하였다. 이어서 3.8 mM NAD 또는 carbaNAD를 샘플에 첨가하고, 샘플을 4°C 에서 유지하였다.

[0137]

NAD 또는 carbaNAD의 다양한 디히드로게나아제에 대한 결합을 측정하기 위해, 20°C 내지 100°C 의 온도에서 $120^\circ\text{C}/\text{h}$ 의 스캔 속도로 열량 스캔을 실행하는 동적 시차 주사 열량계 (DSC)를 실행하고 각각의 샘플을 삼중으로 측정하였다.

[0138]

올바른 작업을 확보하기 위해 측정을 실행하기 전에 DSC 장치를 MicroCal 핸드북에 따라 세정 및 보정하였다. 0.1 M 글리신-HCl pH 2.4 내 라이소자임 ($1 \text{ mg}/\text{ml}$)을 각각의 스캔 공정 전 후에 대조군으로서 이중으로 측정하였다. 측정 세포, 벨브 및 주사기를 매 6 회 주입 후 물로 3 회 세정하였다. 데이터를 MicroCal Origin 소프트웨어를 사용하여 분석하였다.

[0139]

Tris 완충액, pH 8.0 중의 글루코오스 디히드로게나아제 돌연변이체2는 NAD의 존재하 뿐 아니라 부재하에서도 잘 정의된 피크를 야기하였고, 융점 (T_m)은 NAD의 부재 하에서 79.1°C 이고, NAD의 존재하에서 80.8°C 이다.

그러므로, 글루코오스 디히드로게나아제 돌연변이체2의 NAD에 대한 결합은 1.5°C 초과의 T_m 이동을 야기했다. 알코올 디히드로게나아제를 제외하고, T_m 은 또한 효소가 NAD 또는 carbaNAD와 접촉하는 경우 기타 디히드로게나아제의 경우, 예를 들어 야생형 글루코오스 디히드로게나아제의 경우 증가하였다.

[0140]

표 8은 실험 조건이 선택된 각 경우 다양한 디히드로게나아제에 대한 DSC 분석에 의해 수득된 데이터를 보여주고, 이것은 DSC 스펙트럼 중 단일 피크를 야기한다. NAD 또는 carbaNAD의 디히드로게나아제에 대한 결합의 영향을 조효소 (리간드)가 존재하지 않는 스캔으로의 각 경우와 비교하였다. 다르게 언급되지 않는다면 각 경우 0.1 M Tris 완충액, pH 8.5을 측정 완충액으로서 사용하였다.

[0141]

표 8

디히드로개나아제	리간드	ΔH_{cal} (kcal/mol)	T_M (°C)
암코올 디히드로개나아제 *	---	260	55.5
	NAD	300	55.5
	carbaNAD	310	55.4
글루코오스 디히드로개나아제 (야생형)	---	64	52.8
	NAD	110	63.5
	carbaNAD	84	58.5
D-락테이트 디히드로개나아제 ≠	---	18	58.4
	NAD	19	60.4
	carbaNAD	19	59.1
L-락테이트 디히드로개나아제 (데지)	---	80	59.8
	NAD	85	61.8
	carbaNAD	82	61.5
L-락테이트 디히드로개나아제 (토끼 유래)	---	64	58.2
	NAD	72	60.1
	carbaNAD	66	60.2
말레이트 디히드로개나아제 ‡	---	310	42.4
	NAD	380	45.1
	carbaNAD	340	43.2

* 0.75 M 글리신 나트륨 피로포스페이트, pH 9.0

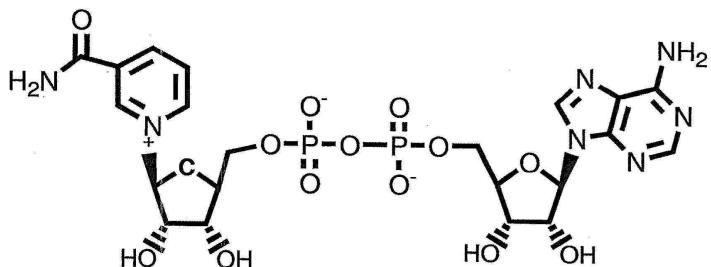
≠ 0.1 M Tris 완충액, pH 7.5

‡ 0.5 M 카보네이트 완충액, pH 10.0

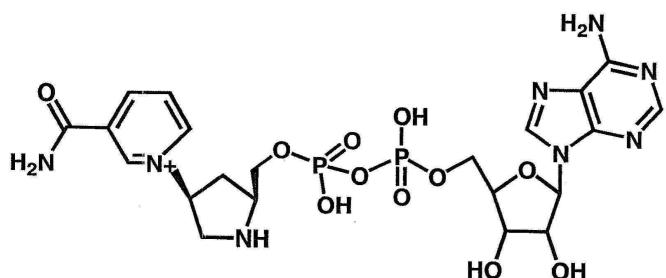
[0142]

도면

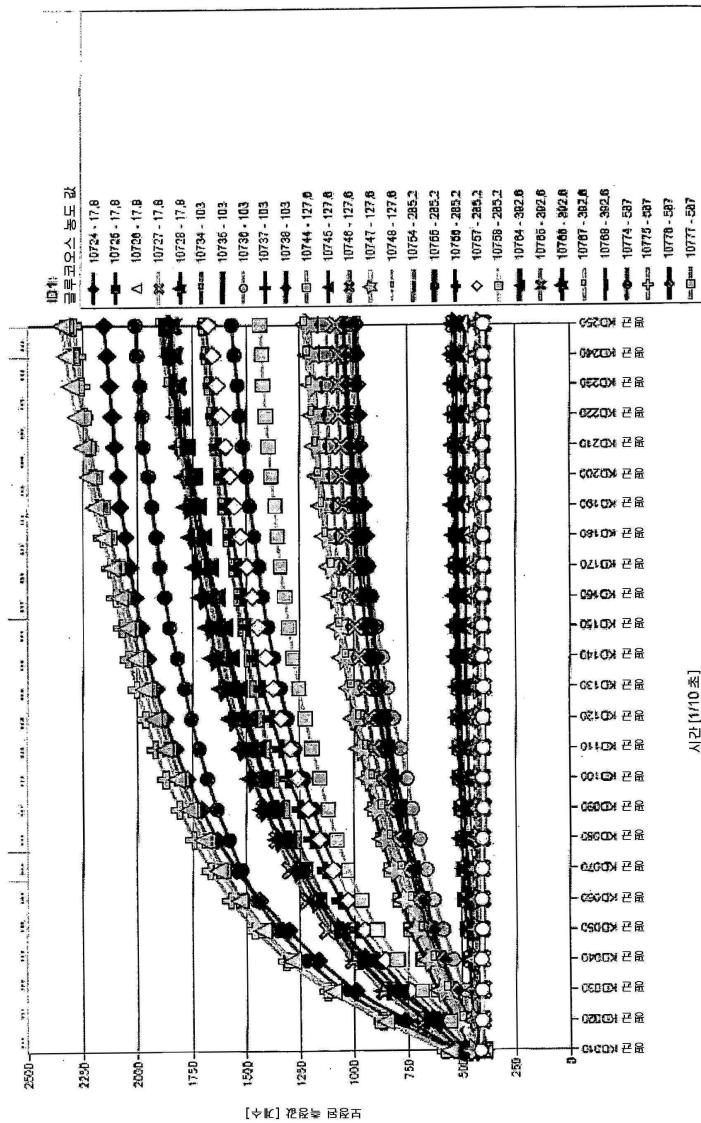
도면 1a



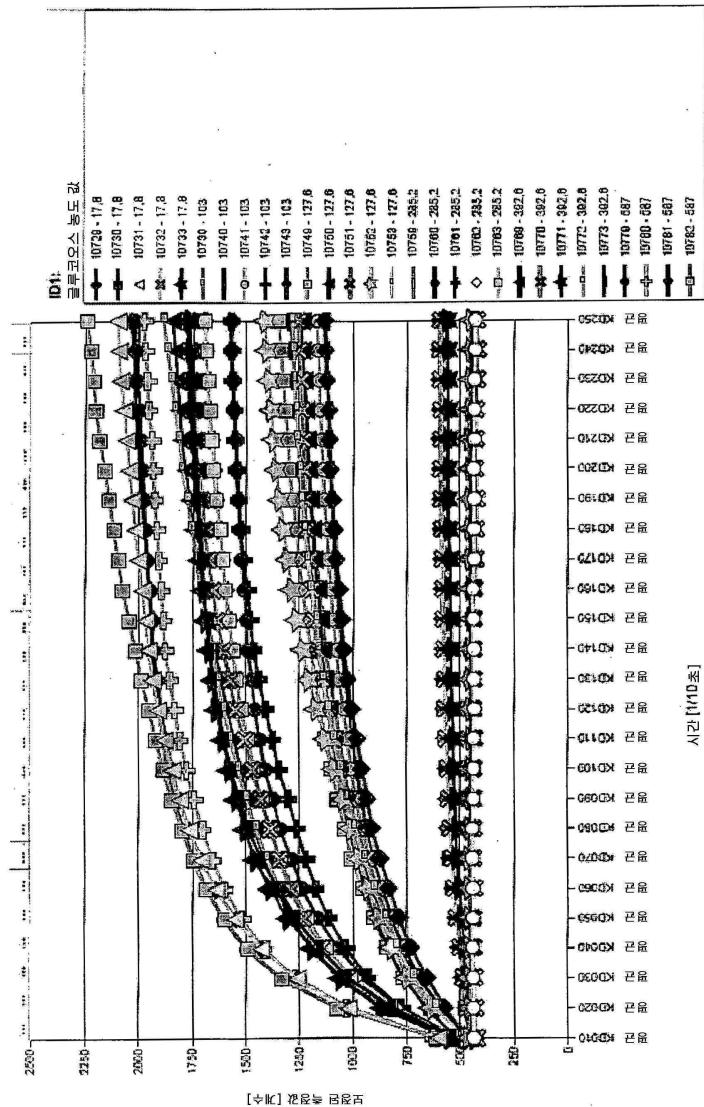
도면 1b



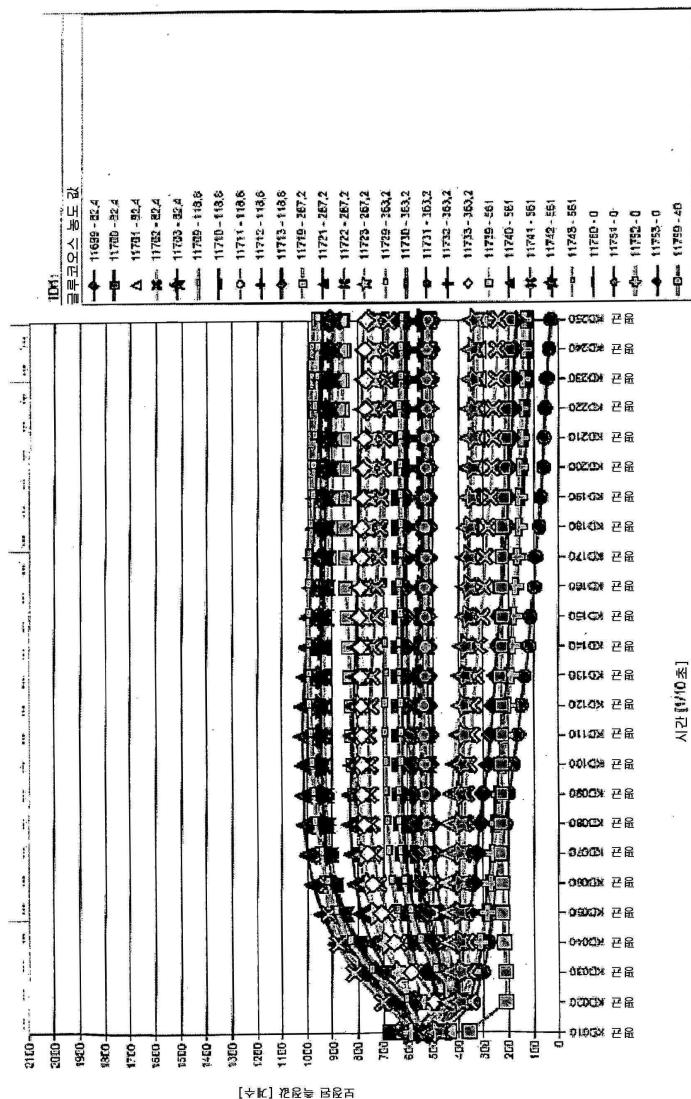
도면2a



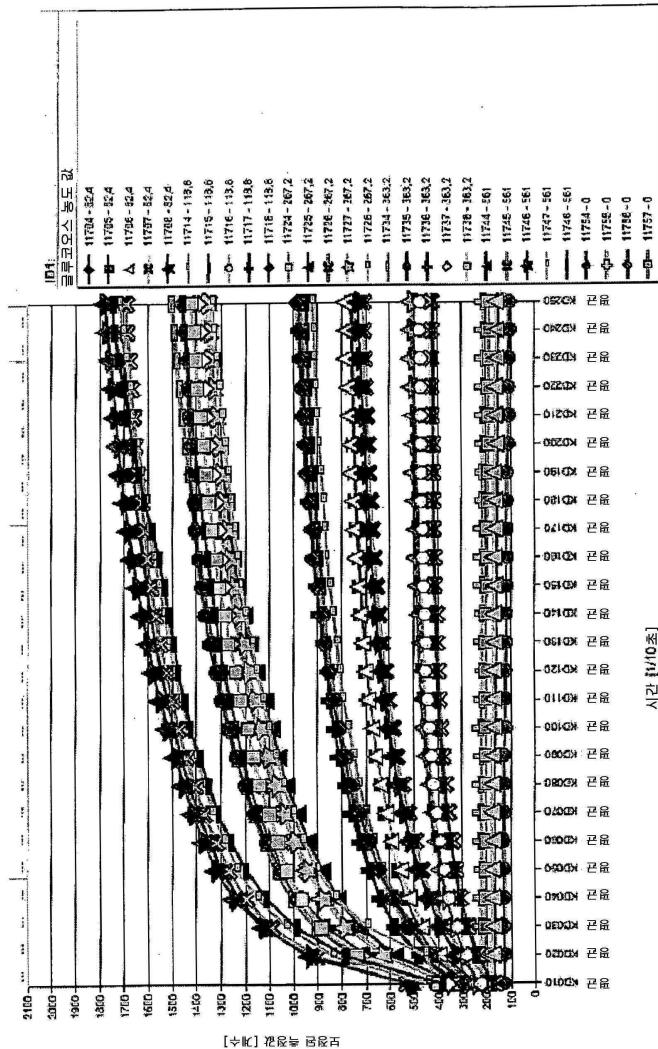
도면2b



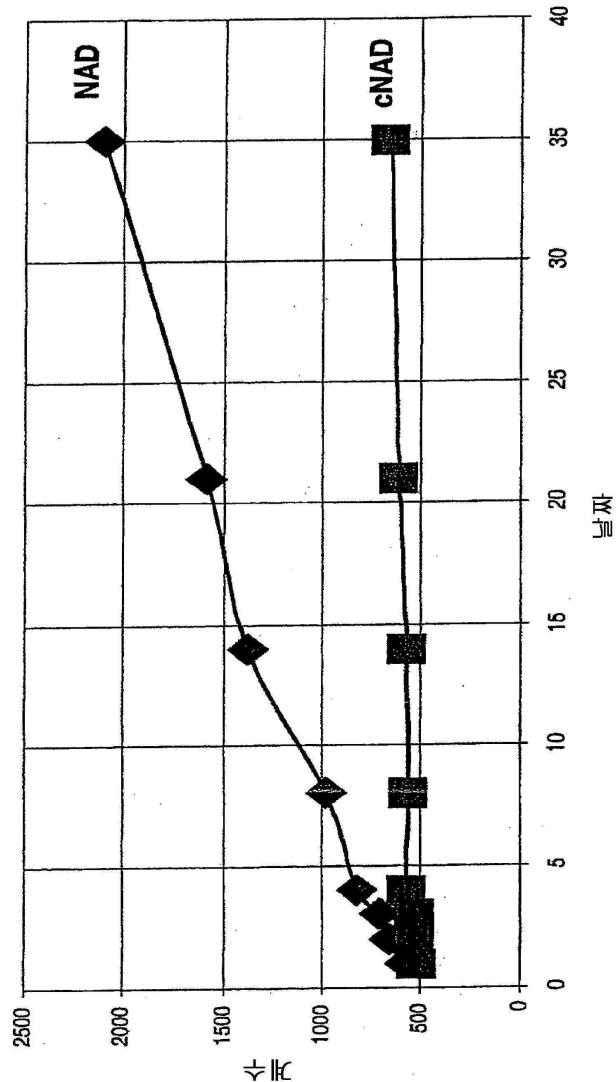
도면2c



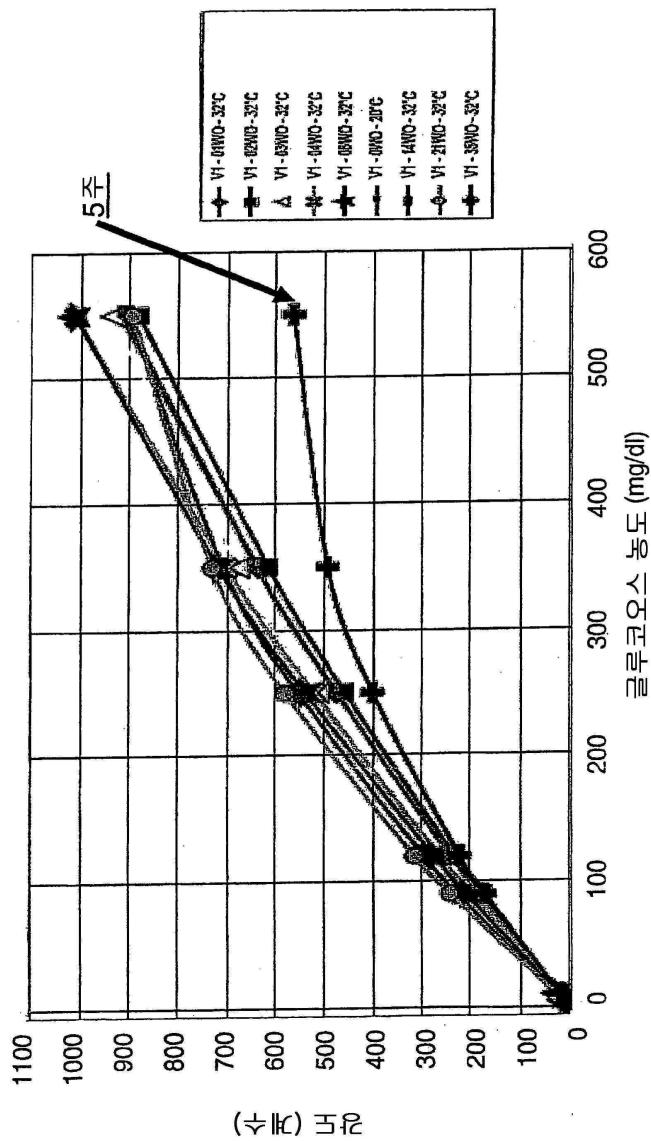
도면2d



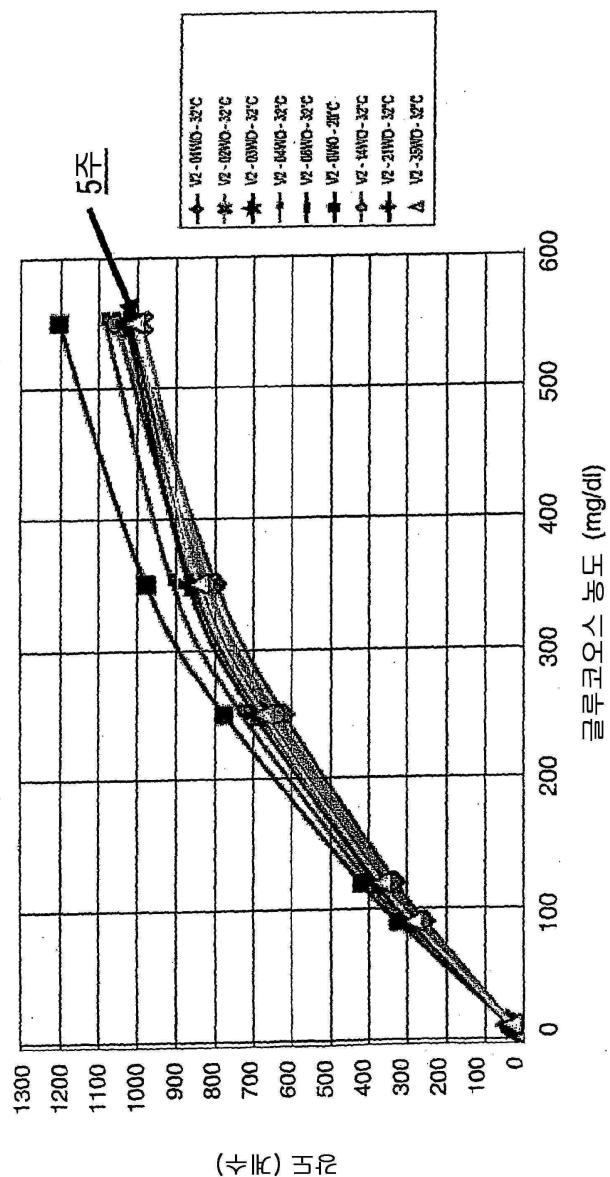
도면3



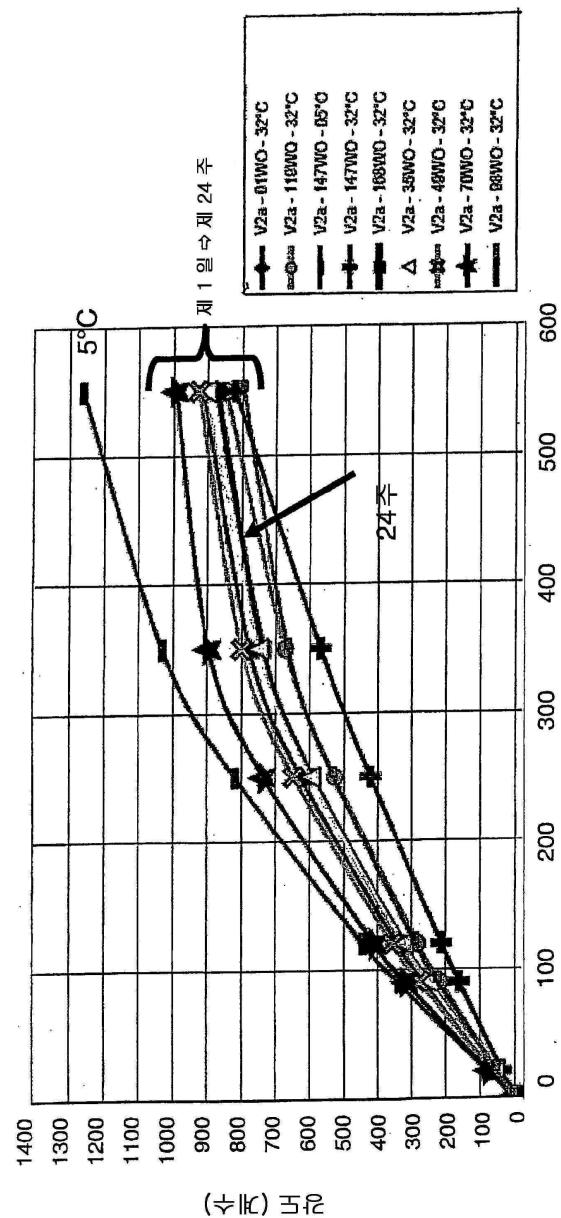
도면4



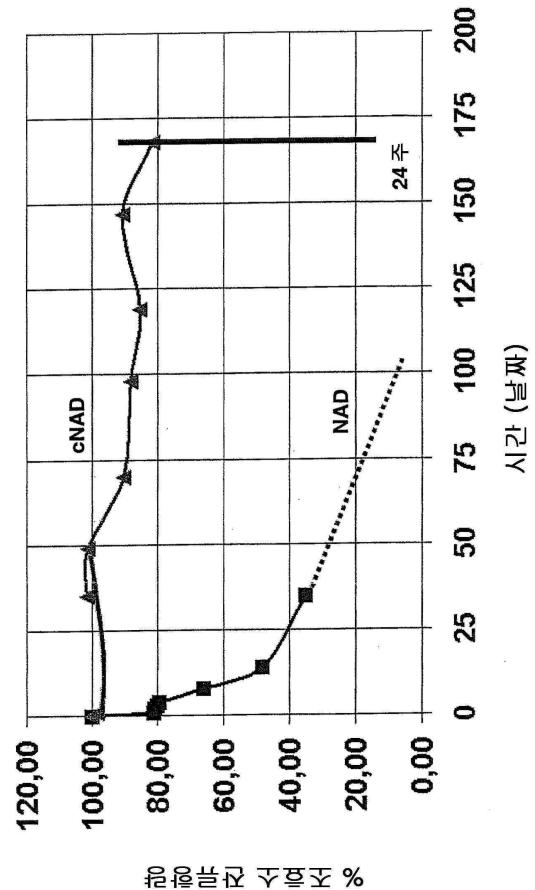
도면5a



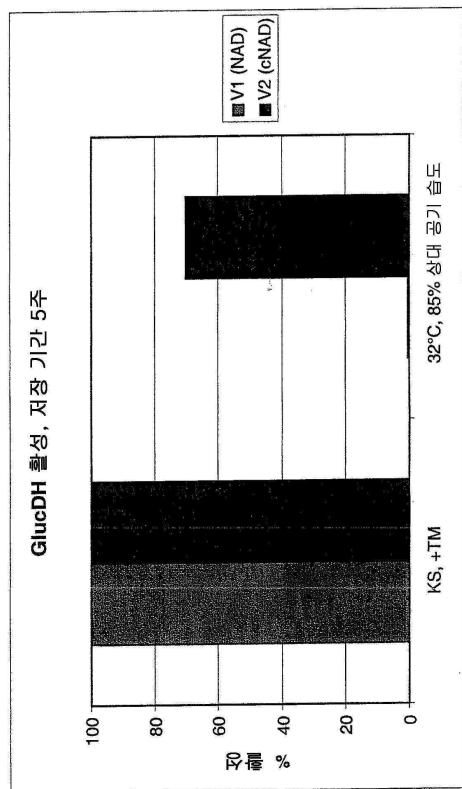
도면5b



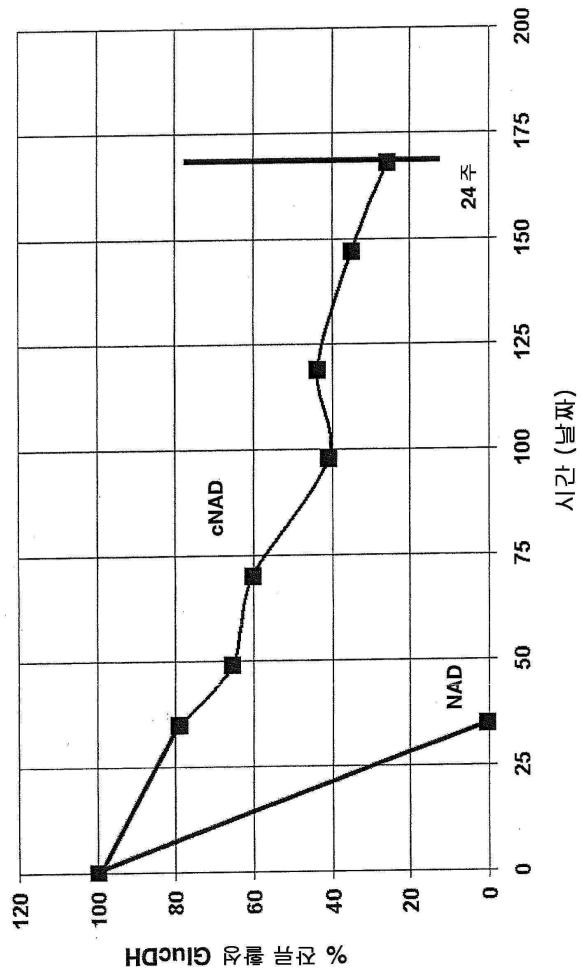
도면6



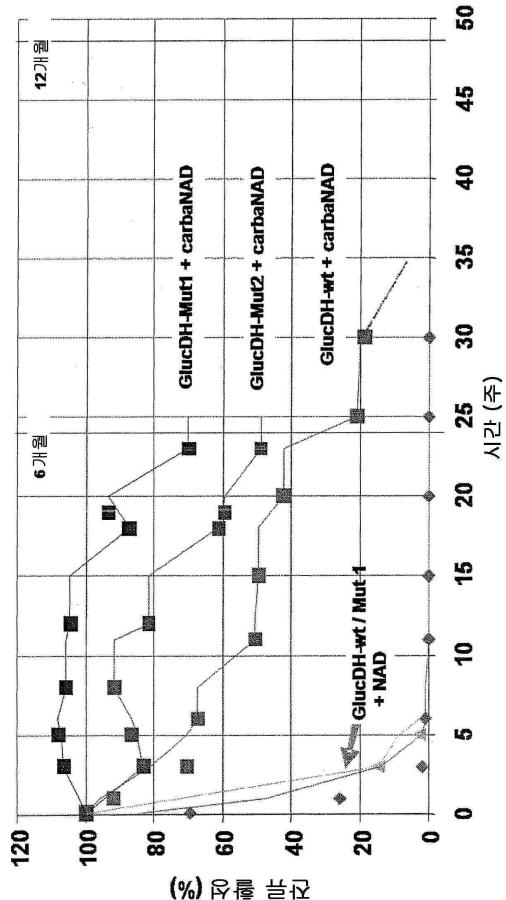
도면7a



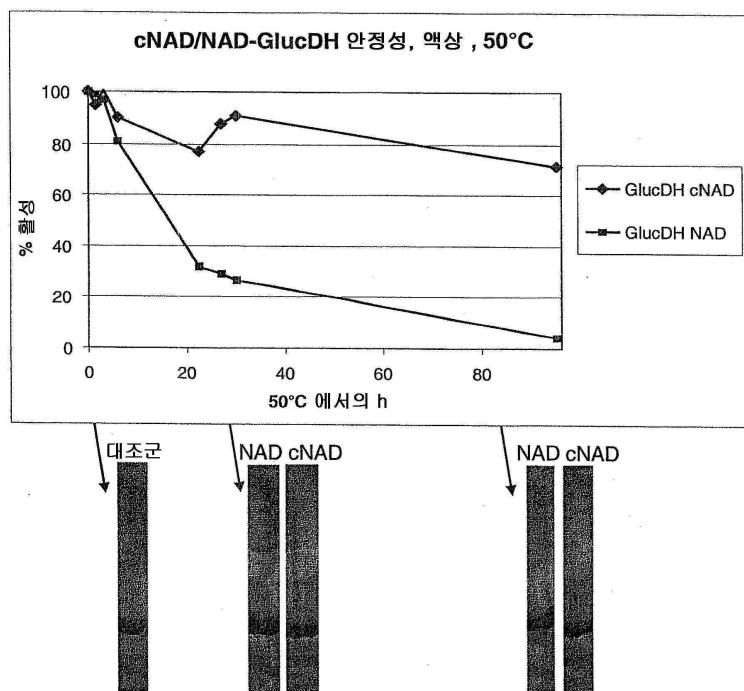
도면7b



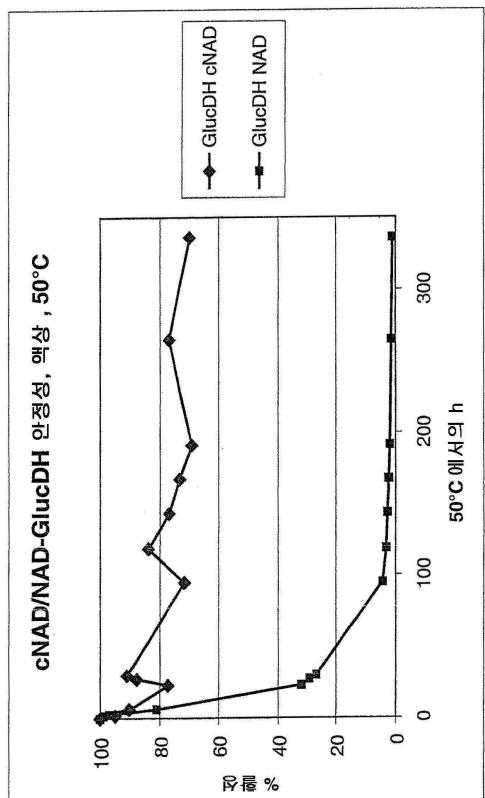
도면8



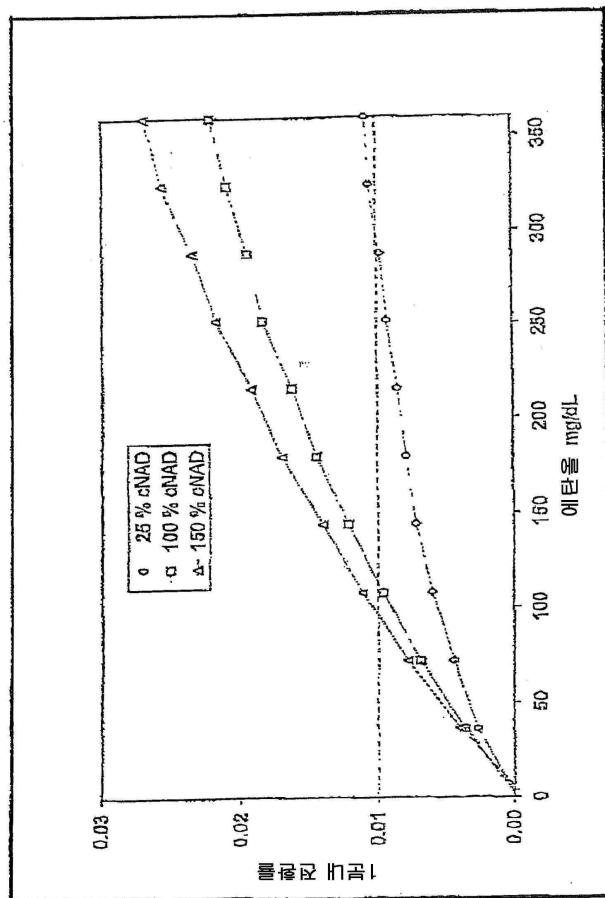
도면9a



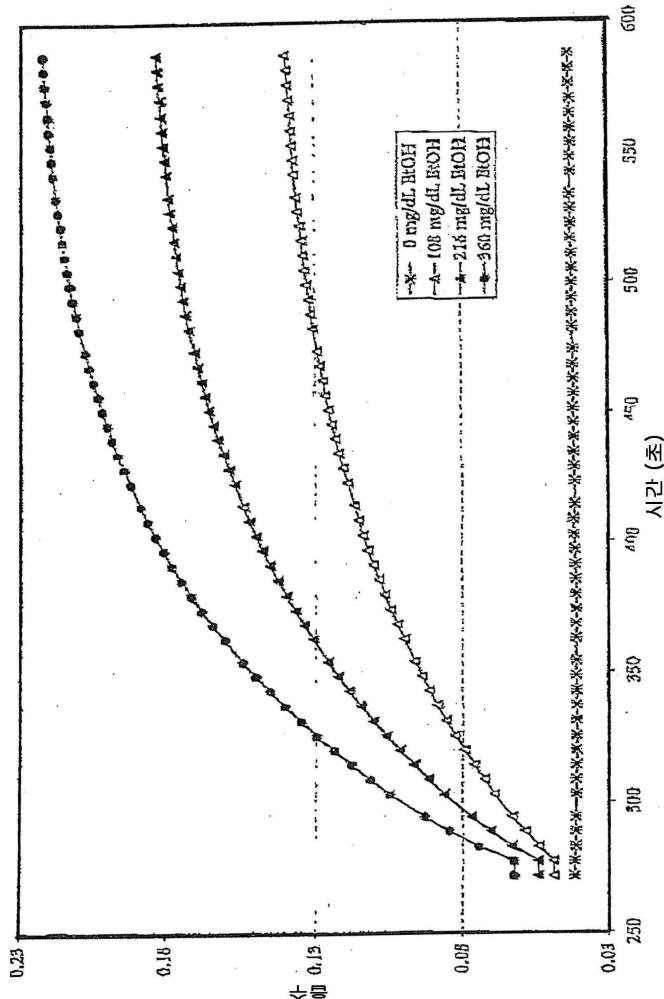
도면9b



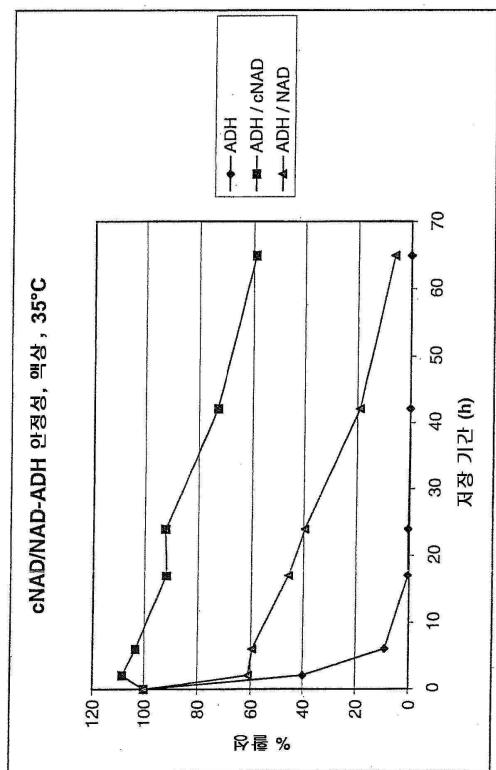
도면10



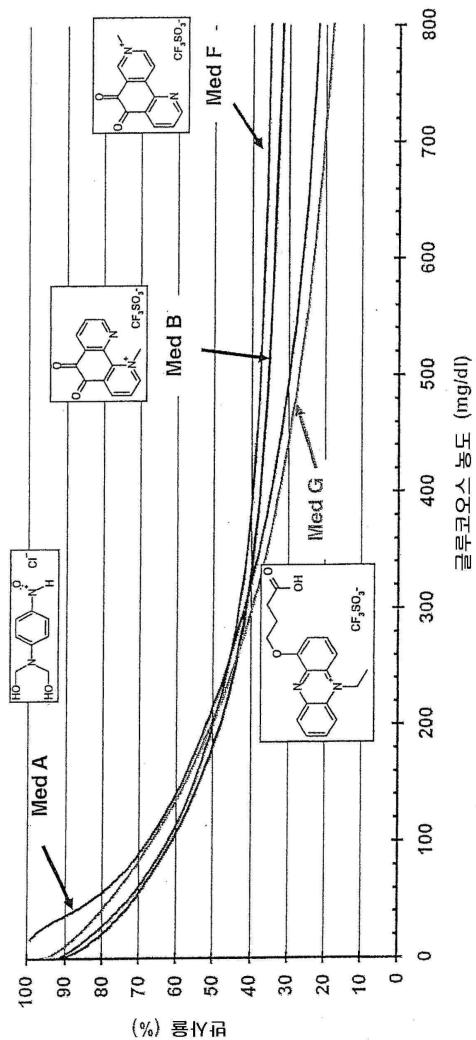
도면11



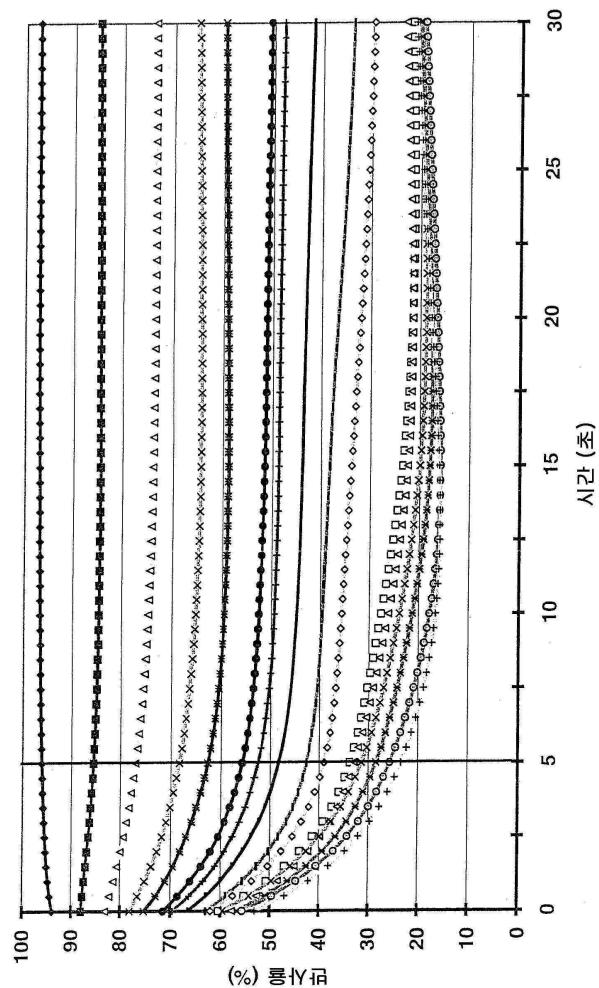
도면12



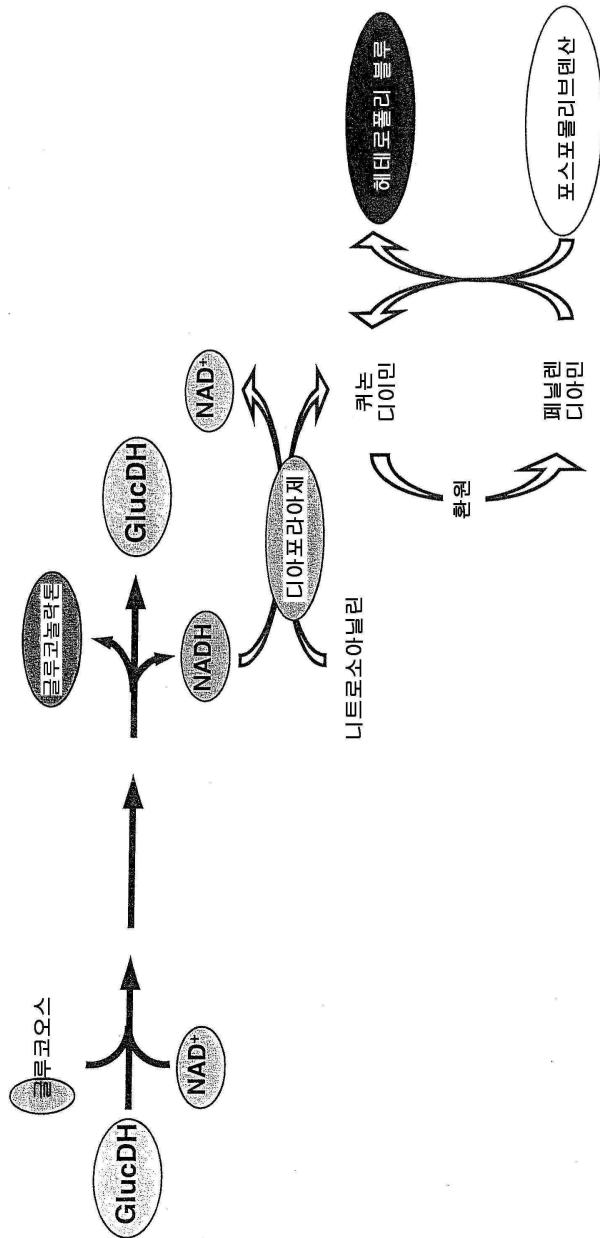
도면13



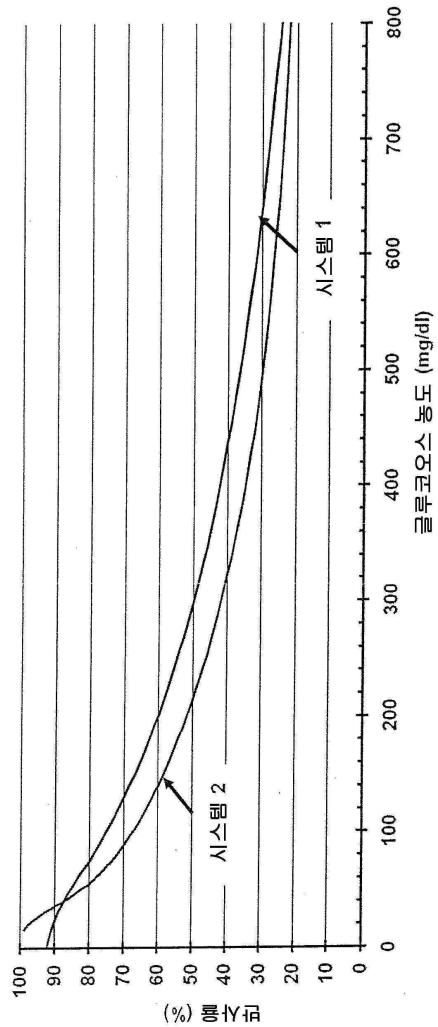
도면14



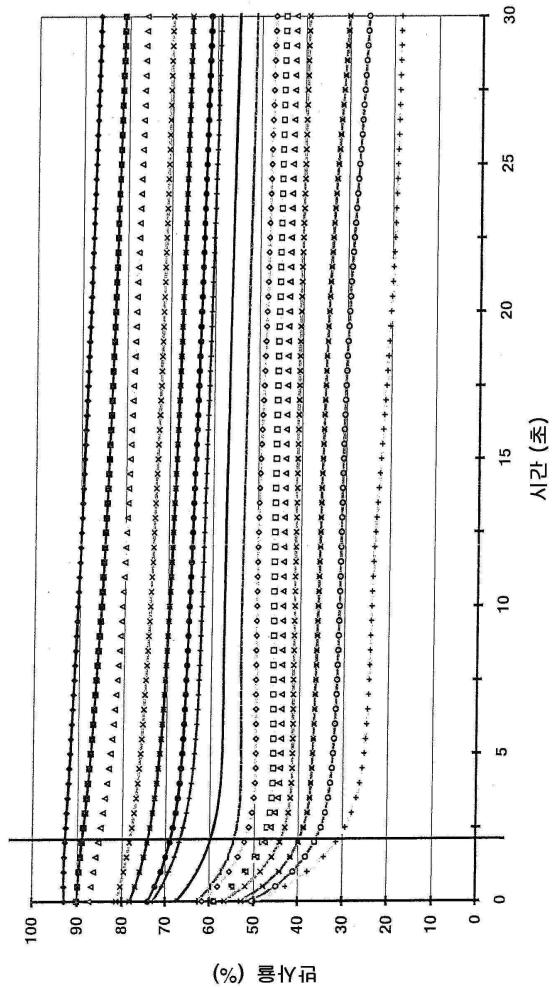
도면15



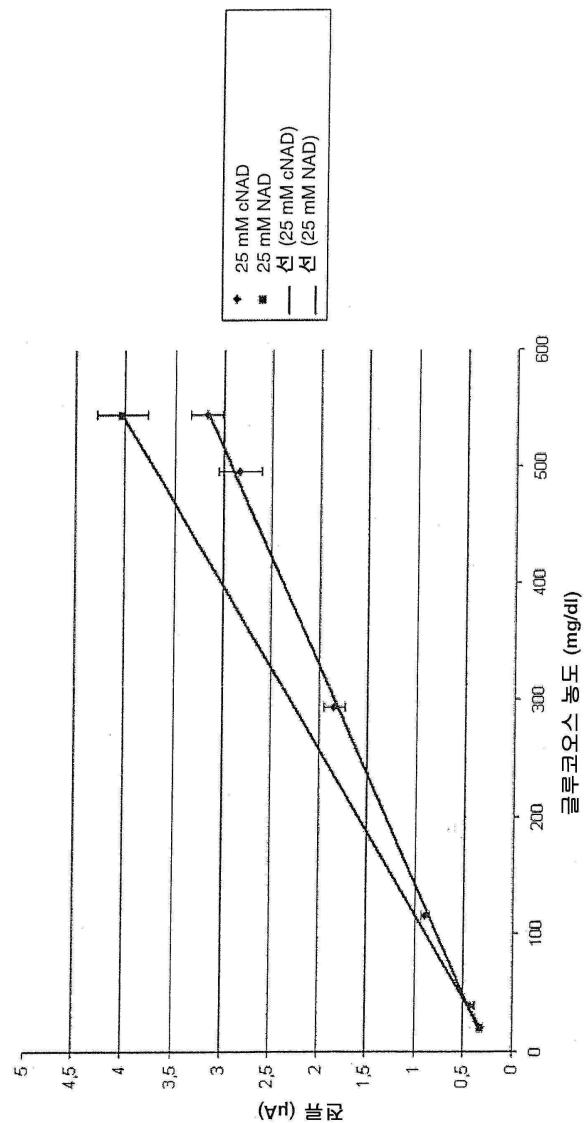
도면16



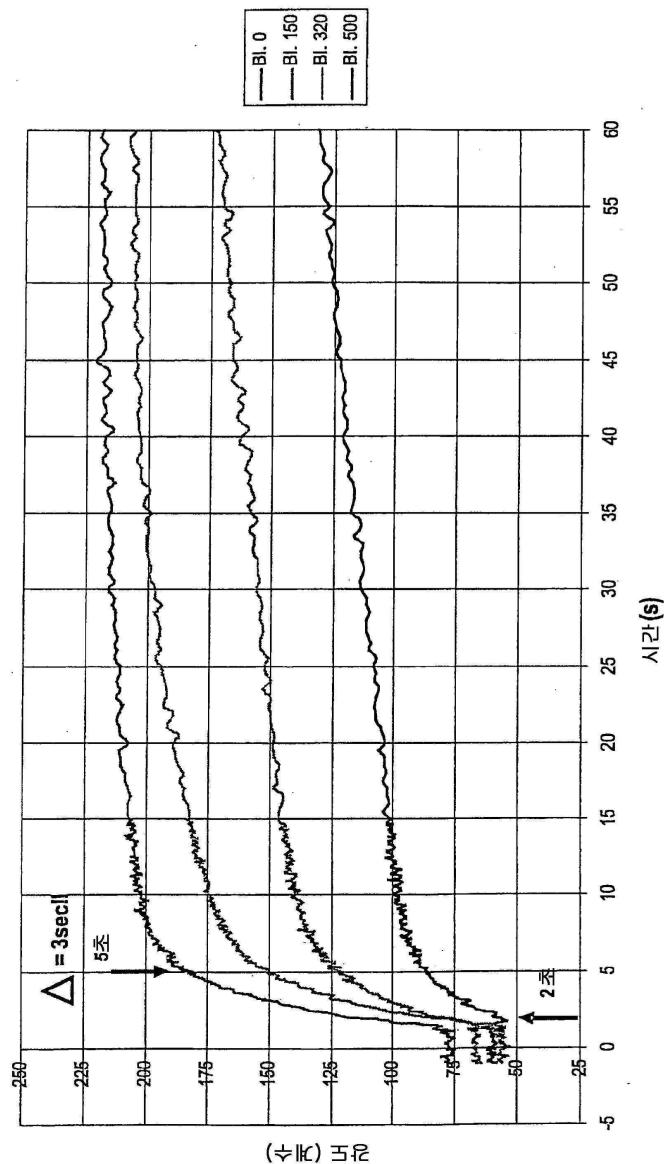
도면17



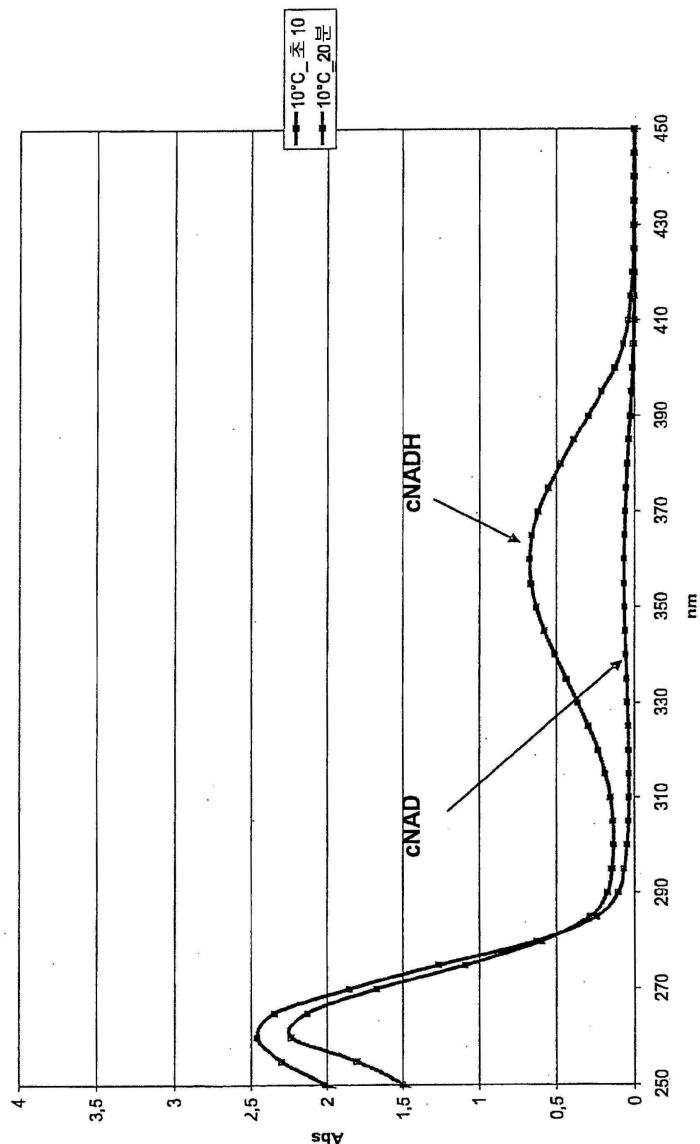
도면18



도면19



도면20



도면21

GlucDH_E96G_E170K

```

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

```

GlucDH_E170K_K252L

```

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

```

서 열 목 록

- <110> F. Hoffmann - La Roche AG
Roche Diagnostics GmbH
- <120> Stabilisierung von Enzymen mit stabilen Coenzymen
- <130> 46200P WO
- <150> EP 09 168 327.6
- <151> 2009-08-20
- <160> 2
- <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1
- <211> 261
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Mutant of glucose dehydrogenase from *Bacillus subtilis*
- <220><221> MUTAGEN
- <222> (96)
- <220><221> MUTAGEN
- <222> (170)
- <400> 1
- Met Tyr Pro Asp Leu Lys Gly Lys Val Val Ala Ile Thr Gly Ala Ala

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

260

<210> 2
 <211> 261
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Mutant of glucose dehydrogenase from *Bacillus subtilis*
 <220><221> MUTAGEN
 <222> (170)
 <220><221> MUTAGEN

<222> (252)

<400> 2

Met Tyr Pro Asp Leu Lys Gly Lys Val Val Ala Ile Thr Gly Ala Ala

1 5 10 15

Ser Gly Leu Gly Lys Ala Met Ala Ile Arg Phe Gly Lys Glu Gln Ala

20 25 30

Lys Val Val Ile Asn Tyr Tyr Ser Asn Lys Gln Asp Pro Asn Glu Val

35 40 45

Lys Glu Glu Val Ile Lys Ala Gly Gly Glu Ala Val Val Val Gln Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Lys Glu Phe Gly Thr Leu Asp Ile Met Ile Asn Asn Ala Gly Leu Glu

85 90 95

Asn Pro Val Pro Ser His Glu Met Pro Leu Lys Asp Trp Asp Lys Val

100 105 110

Ile Gly Thr Asn Leu Thr Gly Ala Phe Leu Gly Ser Arg Glu Ala Ile

115 120 125

Lys Tyr Phe Val Glu Asn Asp Ile Lys Gly Asn Val Ile Asn Met Ser

130 135 140

Ser Val His Glu Val Ile Pro Trp Pro Leu Phe Val His Tyr Ala Ala

145 150 155 160

Ser Lys Gly Gly Ile Lys Leu Met Thr Lys Thr Leu Ala Leu Glu Tyr

165 170 175
Ala Pro Lys Gly Ile Arg Val Asn Asn Ile Gly Pro Gly Ala Ile Asn
180 185 190
Thr Pro Ile Asn Ala Glu Lys Phe Ala Asp Pro Lys Gln Lys Ala Asp
195 200 205

Val Glu Ser Met Ile Pro Met Gly Tyr Ile Gly Glu Pro Glu Glu Ile
210 215 220
Ala Ala Val Ala Val Trp Leu Ala Ser Lys Glu Ser Ser Tyr Val Thr
225 230 235 240
Gly Ile Thr Leu Phe Ala Asp Gly Gly Met Thr Leu Tyr Pro Ser Phe
245 250 255
Gln Ala Gly Arg Gly
260

【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 1

【변경전】

T = 각 경우 독립적으로 0-, 또는 S

【변경후】

T = 각 경우 독립적으로 0, 또는 S