



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년03월28일

(11) 등록번호 10-1604624

(24) 등록일자 2016년03월14일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/32 (2006.01) *C12N 9/02* (2006.01)
G01N 33/52 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2011-7019082
- (22) 출원일자(국제) 2010년02월12일
 심사청구일자 2011년08월17일
- (85) 번역문제출일자 2011년08월17일
- (65) 공개번호 10-2011-0117166
- (43) 공개일자 2011년10월26일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2010/051801
- (87) 국제공개번호 WO 2010/094632
 국제공개일자 2010년08월26일
- (30) 우선권주장
 PCT/EP2009/001206 2009년02월19일 세계지적재산권기구(WIPO)(WO)
- (56) 선행기술조사문헌
 WO2007012494 A1
 Appl Environ Microbiol, Vol. 71, No. 6, pp. 3285-3293 (2005.06.)
- (73) 특허권자
 에프. 호프만-라 로슈 아게
 스위스 체하-4070 바젤 그린짜체스트라쎄 124
- (72) 발명자
 호른 카리나
 독일 68647 비블리스 프랑켄슈트라쎄 5
 개슬러-디트쎄 클라우디아
 독일 69198 슈리스하임 비스마르크슈트라쎄 81
 (뒷면에 계속)
- (74) 대리인
 특허법인코리아나

전체 청구항 수 : 총 10 항

심사관 : 김남경

(54) 발명의 명칭 **건식 화학 층에서 낮은 활성을 갖는 효소의 고속 반응 속도**

(57) 요약

본 발명은 분석물 측정 방법 및 이를 위한 적합한 진단 요소에 관한 것이다.

(72) 발명자

하인들 디터

독일 82396 펄 슈테른슈트라쎼 4

희네스 요하임

독일 64673 츠빙겐베르크 로다우어 슈트라쎼 50아

마이어 토마스

독일 81373 뮌헨 드라헨제슈트라쎼 12

쉬무크 라이너

독일 83671 베네딕트보이에른 암 클로슈터바이어 7

명세서

청구범위

청구항 1

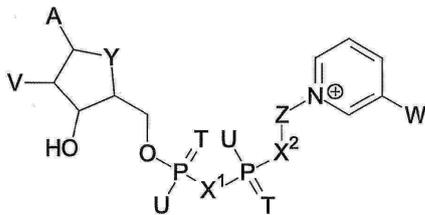
샘플에서의 분석물 측정 방법으로서,

상기 분석물이 글루코오스이고, 하기 단계를 포함하는 방법:

(a) 분석물을 함유하는 샘플을 하기를 함유하는 건식 시약층을 포함하는 진단 요소와 접촉시키는 단계:

(i) 분석물에 대해 특이적인 돌연변이화된 글루코오스 탈수소효소 (EC 1.1.1.47)로서, 바실러스 메가테리움 (*Bacillus megaterium*), 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*) 또는 바실러스 투린지엔시스 (*Bacillus thuringiensis*) 로부터의 야생형 글루코오스 탈수소효소의 돌연변이에 의해 수득되고, 상응하는 야생형 글루코오스 탈수소효소의 아미노산 서열의 위치 170, 위치 252, 또는 양쪽 모두에서의 돌연변이를 포함하며, 위치 170 에서의 돌연변이가 글루탐산의 아르기닌 또는 리신으로의 아미노산 치환을 포함하고, 위치 252 에서의 돌연변이가 리신의 류신으로의 아미노산 치환을 포함하는, 니코틴아미드 아데닌 디뉴클레오티드 (NAD/NADH)-의존적 또는 니코틴아미드 아데닌 디뉴클레오티드 포스페이트 (NADP/NADPH)-의존적 돌연변이화된 글루코오스 탈수소효소, 및

(ii) 하기 화학식 (II) 의 화합물 또는 이의 염 또는 이의 환원 형태인 인공 조효소:



(II)

[식 중,

A = 아데닌, 7-테아자아데닌, 8-아자아데닌 또는 7-테아자-8-아자아데닌이며, 상기 7-테아자아데닌과 상기 7-테아자-8-아자아데닌은 할로겐, C₁₋₆ 알킬닐, C₁₋₆ 알케닐 또는 C₁₋₆ 알킬에 의해 7 위치에서 치환될 수 있고,

T = 각각의 경우 독립적으로 O, 또는 S 를 나타내고,

U = 각각의 경우 독립적으로 OH, SH, BH₃⁻, 또는 BCNH₂⁻ 를 나타내고,

V = 각각의 경우 독립적으로 OH 또는 포스페이트기를 나타내고,

W = COOR, CON(R)₂, COR, 또는 CSN(R)₂ 이고, 상기 R 은 각각의 경우 독립적으로 H 또는 C₁₋₂ 알킬을 나타내고,

X¹, X² = 각각의 경우 독립적으로 O, CH₂, CHCH₃, C(CH₃)₂, NH, 또는 NCH₃ 을 나타내고,

Y = NH, S, O, 또는 CH₂ 이고,

Z = 선형 또는 시클릭 유기 잔기이며,

단, Z 및 피리딘 잔기는 글리코시드 결합에 의해 연결되지 않음], 및

(b) 분석물의 존재, 양 또는 양쪽 모두를 측정하는 단계.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 진단 요소에서의 분석물의 전향 속도가 인공 조효소 대신 상응하는 야생형 조효소를 포함하

는 상응하는 진단 요소에서의 분석물의 전향 속도와 동일하거나 더 높은 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상응하는 야생형 탈수소효소에 비해 감소된 특이적 효소 활성을 갖는 돌연변이화된 탈수소효소를 사용하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 돌연변이화된 글루코오스 탈수소효소가 SEQ ID NO:1 에서 나타난 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, carbaNAD 를 인공 조효소로서 사용하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 시험용 테이프, 시험용 디스크, 시험용 패드, 시험용 스트립 또는 시험용 스트립 드럼을 진단 요소로서 사용하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 분석물의 존재, 양 또는 양쪽 모두를 광도 측정법적 또는 형광 측정법적으로 측정하는 것을 특징으로 하는 방법.

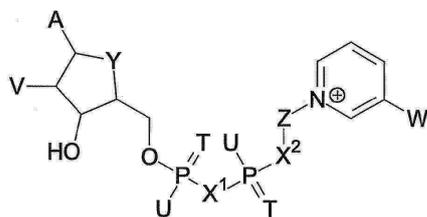
청구항 8

샘플에서의 분석물 측정용 진단 요소로서,

상기 분석물이 글루코오스이고, 하기를 함유하는 건식 시약층을 포함하는 분석물 측정용 진단 요소:

(a) 분석물에 대해 특이적인 돌연변이화된 글루코오스 탈수소효소 (EC 1.1.1.47)로서, 바실러스 메가테리움 (*Bacillus megaterium*), 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*) 또는 바실러스 투린지엔시스 (*Bacillus thuringiensis*) 로부터의 야생형 글루코오스 탈수소효소의 돌연변이에 의해 수득되고, 상응하는 야생형 글루코오스 탈수소효소의 아미노산 서열의 위치 170, 위치 252, 또는 양쪽 모두에서의 돌연변이를 포함하며, 위치 170 에서의 돌연변이가 글루탐산의 아르기닌 또는 리신으로의 아미노산 치환을 포함하고, 위치 252 에서의 돌연변이가 리신의 류신으로의 아미노산 치환을 포함하는, 니코틴아미드 아데닌 디뉴클레오티드 (NAD/NADH)-의존적 또는 니코틴아미드 아데닌 디뉴클레오티드 포스페이트 (NADP/NADPH)-의존적 돌연변이화된 글루코오스 탈수소효소, 및

(b) 하기 화학식 (II) 의 화합물 또는 이의 염 또는 이의 환원 형태인 인공 조효소:



(II)

[식 중,

A = 아데닌, 7-데아자아데닌, 8-아자아데닌 또는 7-데아자-8-아자아데닌이며, 상기 7-데아자아데닌과 상기 7-데아자-8-아자아데닌은 할로겐, C₁₋₆ 알킬닐, C₁₋₆ 알케닐 또는 C₁₋₆ 알킬에 의해 7 위치에서 치환될 수 있고,

T = 각각의 경우 독립적으로 O, 또는 S 를 나타내고,

U = 각각의 경우 독립적으로 OH, SH, BH₃⁻, 또는 BCNH₂⁻ 를 나타내고,
 V = 각각의 경우 독립적으로 OH 또는 포스페이트기를 나타내고,
 W = COOR, CON(R)₂, COR, 또는 CSN(R)₂ 이고, 상기 R 은 각각의 경우 독립적으로 H 또는 C₁-C₂ 알킬을 나타내고,
 X¹, X² = 각각의 경우 독립적으로 O, CH₂, CHCH₃, C(CH₃)₂, NH, 또는 NCH₃ 을 나타내고,
 Y = NH, S, O, 또는 CH₂ 이고,
 Z = 선형 또는 시클릭 유기 잔기이며,
 단, Z 및 피리딘 잔기는 글리코시드 결합에 의해 연결되지 않음].

청구항 9

제 8 항에 있어서, 돌연변이화된 글루코오스 탈수소효소가 SEQ ID NO:1 에서 나타낸 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 진단 요소.

청구항 10

제 2 항에 있어서, 진단 요소에서의 분석물의 전향 속도가 인공 조효소 대신 상응하는 야생형 조효소를 포함하는 상응하는 진단 요소에서의 분석물의 전향 속도보다 20% 이상 더 높은 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 분석물 측정 방법 및 이를 위한 적합한 진단 요소에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 진단 요소는 임상적으로 관련된 분석법의 중요한 성분이다. 이와 관련하여, 첫 번째 초점은 예를 들어 분석물에 대해 특이적인 효소의 도움으로 간접적으로 또는 직접적으로 측정하는, 분석물, 예를 들어 대사산물 또는

기질의 측정에 대한 것이다. 이러한 경우, 분석물은 효소-조효소 복합체의 도움으로 전환된 후 정량된다. 이러한 과정에서, 측정될 분석물은 적합한 효소, 조효소 및 임의로는 매개체와 접촉하며 상기 조효소는 효소적 반응에 의해 물리화학적으로 변화하여, 예를 들어 산화 또는 환원된다. 매개체가 추가적으로 사용되는 경우, 상기 매개체는 통상 분석물의 반응 동안 방출된 전자를 환원된 조효소로부터 광학 지시제 또는 전극의 전도성 성분에 전달시켜, 상기 반응은 예를 들어 광도 측정법적 또는 전기화학적으로 측정될 수 있다. 교정으로, 측정값과 측정될 분석물의 농도 사이의 직접적인 관계가 산출된다.

[0003] 선행 기술로부터 공지되어 있는 진단 요소는 제한된 보관 수명, 및 이러한 보관 수명이 성취되도록 하는 환경에 대한 특정 요구사항 (예를 들어 냉장 또는 건조 보관)에 의해 특징지어진다. 따라서, 특정 형태의 적용에서, 예를 들어 혈당 자가 모니터링과 같은 최종 사용자 스스로에 의해 실행되는 시험의 경우, 소비자에 의해 거의 인지될 수 없는 측정 시스템의 거짓된, 눈에 띄지 않는 부정확한 보관으로 인해 잘못된 결과가 발생할 수 있으며, 이는 각 질환의 잘못된 치료를 유발할 수 있다. 잘못된 결과는 일차적으로 이러한 진단 요소에서 사용된 효소, 조효소 및 매개체가 일반적으로 수분 및 열에 민감하게 반응하며 시간에 걸쳐 불활성화되기 때문이다.

[0004] 진단 요소의 안정성을 증가시키는데 사용되는 공지된 측정법은 안정한 효소, 예를 들어 호열성 미생물로부터의 효소를 사용하는 것이다. 또한, 효소는 화학적 개질, 특히 가교에 의해 안정화될 수 있다. 또한, 효소 안정화제 예를 들어 트레할로오스, 폴리비닐 피롤리돈 및 혈청 알부민이 또한 첨가될 수 있거나, 효소는 예를 들어 광중합에 의해 중합체 네트워크 내에서 봉쇄될 수 있다.

[0005] 효소를 안정화시키는 또다른 방법은 위치-특이적 또는 비 위치-특이적으로 도입되는 돌연변이에 의한 것이다. 이와 관련하여, 효소에 대한 DNA 코딩에서의 표적된 변화에 의해 상응하는 효소의 특성에 특이적으로 영향을 주는 재조합 기술의 사용이 특히 적합한 것으로 증명된 바 있다.

[0006] Baik 등 (Appl. Environ. Microbiol (2005), 71, 3285)은 아미노산 치환 E170K, Q252L 또는 E170K/Q252L을 포함하는 바실러스 메가테리움 (*Bacillus megaterium*)으로부터의 글루코오스 탈수소효소의 세 가지 돌연변이체의 단리 및 분석을 기재하고 있다. 돌연변이체 E170K 및 Q252L은 단지 낮은 염 농도 및 높은 pH 값에서만 낮은 안정성을 가지며, 이중 돌연변이체는 이량체-이량체 경계면에서의 증강된 상호작용으로 인해 시험 조건 하에 유의하게 증가된 안정성을 나타낸다.

[0007] Vazquez-Figueroa 등 (ChemBioChem (2007), 8, 2295)은 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*), 바실러스 투린지엔시스 (*Bacillus thuringiensis*) 및 바실러스 리체니포르미스 (*Bacillus licheniformis*)로부터의 글루코오스 탈수소효소의 위치 155, 170 및 252에서 아미노산 치환을 도입하는 것을 포함하는, 열안정성 글루코오스 탈수소효소의 개발을 개시하고 있다. 이와 관련하여, 돌연변이 E170K 및 Q252L이 개별적으로 뿐 아니라 조합으로, 바실러스 서브틸리스로부터의 글루코오스 탈수소효소의 안정화를 야기한다는 것이 언급된다.

[0008] 그러나, 야생형 변이체에 비해 유전적으로 변형된 안정화 효소가 사용되는 경우, 이들이 상응하는 야생형 효소보다 통상 꽤 낮은 활성을 가지므로 시간 단위 당 더 낮은 기질 전향 (turnover) 값을 갖는다는 문제점이 발생한다. 높은 특이적 활성을 갖는 효소가 임상 및 진단 화학 예컨대 혈당 측정에 바람직하게 사용된다는 사실을 고려한다면, 안정화 효소의 사용은 종종 자연적 효소의 사용에 대한 허용가능하지 않은 대체물이다.

[0009] 또다른 어려움은, 시간 단위 당 높은 기질 전향과 상호연관되는 높은 효소 활성이 통상, 각각의 경우에서 각 자연적 조효소로만 단지 달성된다는 것이다. 인공 조효소가 자연적 조효소 대신 사용되는 경우, 효소 활성은 통상 크게 감소하며 기질로의 전향 속도도 따라서 감소한다.

[0010] 따라서, 본 발명의 기반인 목적은 선행 기술의 불리한 점을 일부 이상 제거한, 특히 글루코오스를 측정하기 위한 안정한 진단 요소를 제공하는 것이다. 특히, 진단 요소는 기질의 높은 전향 속도를 확보하면서 동시에 효소 뿐 아니라 조효소의 높은 안정성을 확보해야 한다.

발명의 내용

[0011] 이러한 목적은, 하기 단계를 포함하는 분석물 측정 방법에 의해 본 발명에 따라 달성된다:

[0012] (a) 분석물을 함유하는 샘플을 하기를 함유하는 건식 시약층을 포함하는 진단 요소와 접촉시키는 단계:

[0013] (i) 분석물에 대해 특이적인 돌연변이화된 탈수소효소 및

[0014] (ii) 인공 조효소, 및

- [0015] (b) 분석물의 존재 및/또는 양을 측정하는 단계.
- [0016] 놀랍게도, 큐벳 시험에서 인공 조효소의 존재 하에 극도로 낮은 활성을 갖는 돌연변이화된 탈수소효소가 시험 스트립에서와 같은 건식 시약층을 갖는 진단 요소에서 보다 신속한 반응 속도를 나타내며, 적어도 자연적 조효소 (야생형 조효소) 의 존재 하에서만만큼 많은 전향을 산출한다는 것이 본 발명의 범주 내에서 발견되었다. 이의 이유는 추측컨대 성분의 높은 농도에서 효소 활성 외의 다른 요소가 전향 속도에 결정적으로 영향을 주기 때문이며, 이와 관련하여 효소, 조효소, 환원된 조효소, 분석물 및 산화된 분석물 사이의 복합체 형성 상태가 특히 결정적인 것으로 나타난다.
- [0017] 이 점에 있어서, 본 발명에 따른 방법은 바람직한 구현예에서, 본원에 기재된 진단 요소에서의 분석물의 전향 속도가 인공 조효소 대신 상응하는 야생형 조효소를 포함하는 상응하는 진단 요소에서의 분석물의 전향 속도와 동일하거나 더 크다는 것을 제공한다. 본 발명에 따라 사용된 진단 요소에서의 분석물의 전향 속도는 야생형 조효소를 포함하는 진단 요소에서의 분석물의 전향 속도에 비해 바람직하게는 20% 이상, 보다 바람직하게는 50% 이상, 가장 바람직하게는 100% 이상, 예를 들어 100% 내지 200% 증가한다.
- [0018] 본 출원에서 사용되는 바와 같은 용어 "돌연변이화된 탈수소효소" 또는 "탈수소효소 돌연변이체" 는 야생형 탈수소효소에 비해 변형된 아미노산 서열을 가지면서 동일한 수의 아미노산, 즉 야생형 탈수소효소로부터 하나 이상의 아미노산이 상이한 아미노산을 갖는 자연적 탈수소효소 (야생형 탈수소효소) 의 유전적으로 변형된 변이체를 의미한다.
- [0019] 돌연변이화된 탈수소효소는 임의의 생물학적 공급원에서 유래한 야생형 탈수소효소로부터의 돌연변이에 의해 수득될 수 있으며, 본 발명의 의미에 있어서 상기 용어 "생물학적 공급원" 은 원핵생물 예컨대 세균 뿐 아니라 진핵 생물 예컨대 포유류 및 기타 동물을 포함한다. 돌연변이(들) 의 도입은 당업계에 공지된 재조합 방법을 사용하여 위치-특이적 또는 비 위치-특이적으로, 바람직하게는 위치-특이적으로 발생할 수 있어, 각각의 필요사항 및 조건에 따라 자연적 탈수소효소의 아미노산 서열 내에 하나 이상의 아미노산 치환을 야기한다.
- [0020] 이러한 방식으로 수득되며 본 발명에 따른 방법에서 사용되는 탈수소효소 돌연변이체는 바람직하게는, 상응하는 야생형 탈수소효소에 비해 증가된 열 및/또는 가수분해 안정성을 갖는다. 이러한 돌연변이체의 예는 그 중에서도 Baik (Appl. Environ. Microbiol. (2005), 71, 3285), Vazquez-Figueroa (ChemBioChem (2007), 8, 2295) 뿐 아니라 WO 2005/045016 A2 에 기재되어 있으며, 이들 개시물은 본원에 명백하게 참고로 포함된다.
- [0021] 본 발명의 의미에 있어서의 돌연변이화된 탈수소효소는 특히 바람직하게는 상응하는 야생형 탈수소효소에 비해 감소된 특이적 효소 활성을 갖는다. 본 출원에서 사용된 바와 같은 용어 "특이적 효소 활성" (U/mg 효소로서 나타냄) 은 효소의 1 mg 당 및 1 분 당 사전한정된 조건 하에 전환되는 기질의 양을 의미한다. 한편, 용어 "동결건조물 활성" 은 보조 물질과 조합으로 효소를 포함하는 동결건조물의 1 mg 당 및 1 분 당 사전결정된 조건 하에 전환되는 기질의 양을 의미한다.
- [0022] 본 발명에 따른 방법에서 사용되는 돌연변이화된 탈수소효소는 바람직하게는 니코틴아미드 아데닌 디뉴클레오티드 (NAD/NADH)-의존적 또는 니코틴아미드 아데닌 디뉴클레오티드 포스페이트 (NADP/NADPH)-의존적 돌연변이화된 탈수소효소이며 이는 바람직하게는 돌연변이화된 알코올 탈수소효소 (EC 1.1.1.1; EC 1.1.1.2), 돌연변이화된 L-아미노산 탈수소효소 (1.4.1.5), 돌연변이화된 글루코오스 탈수소효소 (EC 1.1.1.47), 돌연변이화된 글루코오스-6-포스페이트 탈수소효소 (EC 1.1.1.49), 돌연변이화된 글리세롤 탈수소효소 (EC 1.1.1.6), 돌연변이화된 3-히드록시부티레이트 탈수소효소 (EC 1.1.1.30), 돌연변이화된 락테이트 탈수소효소 (EC 1.1.1.27; EC1.1.1.28), 돌연변이화된 말레이트 탈수소효소 (EC 1.1.1.37) 및 돌연변이화된 소르비톨 탈수소효소에서 선택된다. 돌연변이화된 탈수소효소는 특히 바람직하게는 돌연변이화된 글루코오스 탈수소효소 (EC 1.1.1.47) 이다.
- [0023] 돌연변이화된 글루코오스 탈수소효소가 본 발명의 범주 내에서 사용되는 경우, 이는 상응하는 야생형 글루코오스 탈수소효소에 비교하여, 기본적으로 이의 아미노산 서열에서의 임의의 위치에서 변형된 아미노산(들) 을 포함할 수 있다. 돌연변이화된 글루코오스 탈수소효소는 바람직하게는 야생형 글루코오스 탈수소효소의 아미노산 서열의 위치 170 및 252 중 하나 이상에서 돌연변이를 포함하는데, 위치 170 및 위치 252 에서 돌연변이를 갖는 돌연변이체가 특히 바람직하다. 돌연변이화된 글루코오스 탈수소효소가 이들 돌연변이에 더하여 추가적인 돌연변이를 포함하지 않는 경우가 유리하다는 것이 증명된 바 있다.
- [0024] 위치 170 및/또는 252 에서의 돌연변이는 안정화, 예를 들어 야생형 탈수소효소의 열 및/또는 가수분해 안정성에 있어서의 증가를 일으키는 임의의 아미노산 치환을 기본적으로 포함할 수 있다. 위치 170 에서의 돌연변이

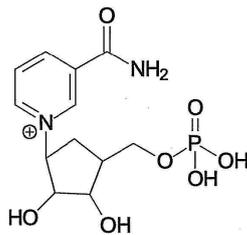
이는 바람직하게는 글루탐산의 아르기닌 또는 리신으로의 아미노산 치환, 특히 글루탐산의 리신으로의 아미노산 치환을 포함하는 한편, 위치 252 에 관해서는 리신의 류신으로의 아미노산 치환이 바람직하다.

[0025] 상술한 글루코오스 탈수소효소의 돌연변이체를 제조하는데 사용되는 야생형 글루코오스 탈수소효소는 바람직하게는 세균에서 유래하며, 바실러스 메가테리움, 바실러스 서브틸리스 또는 바실러스 투린지엔시스, 특히 바실러스 서브틸리스로부터의 글루코오스 탈수소효소가 특히 바람직하게 사용된다. 가장 바람직한 구현예에서, 바실러스 서브틸리스로부터의 야생형 글루코오스 탈수소효소의 돌연변이에 의해 취득된 SEQ ID NO:1 에서 나타내는 아미노산 서열을 갖는 돌연변이화된 글루코오스 탈수소효소 GlucDH_E170K_K252L 이 본 발명에 따른 방법의 범주 내에서 사용된다.

[0026] 본 발명에 따라서, 본원에 기재된 진단 요소는 분석물에 특이적인 돌연변이화된 탈수소효소에 추가로 인공 조효소를 또한 포함한다. 본 발명의 의미 내의 인공 조효소는 자연적 조효소에 비해 화학적으로 개질되며 자연적 조효소에 비해 대기압에서 수분, 특히 0°C 내지 50°C 범위의 온도, 특히 pH 4 내지 pH 10 범위의 산 및 염기 및/또는 친핵체 (nucleophile) 예컨대 알코올 또는 아민에 대한 높은 안정성을 가지므로, 동일한 환경 조건 하에 자연적 조효소보다 더 긴 기간에 걸쳐 이의 활성을 나타낼 수 있는 조효소이다.

[0027] 인공 조효소는 바람직하게는 자연적 조효소에 비해 높은 가수분해 안정성을 가지며, 시험 조건 하 가수분해에 대해 완전한 저항성을 갖는 것이 특히 바람직하다. 인공 조효소는 자연적 조효소에 비해 탈수소효소에 대한 감소된 결합 상수를 가질 수 있으며, 예를 들어 결합 상수는 2 배 이상으로 감소된다.

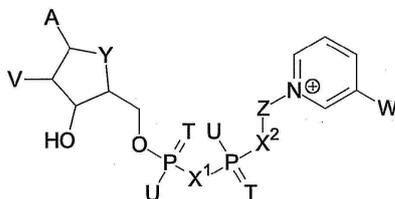
[0028] 본 발명에 따른 방법의 범주 내에서 사용될 수 있는 인공 조효소의 바람직한 예는 인공 NAD(P)/NAD(P)H 화합물, 즉 자연적 니코틴아미드 아데닌 디뉴클레오티드 (NAD/NADH) 또는 자연적 니코틴아미드 아데닌 디뉴클레오티드 포스페이트 (NADP/NADPH) 의 화학 유도체 또는 하기 화학식 (I) 의 화합물이다:



(I)

[0029] 인공 조효소가 인공 NAD(P)/NAD(P)H 화합물인 경우, 인공 NAD(P)/NAD(P)H 화합물은 바람직하게는, 선형 또는 시클릭 유기 잔기, 특히 시클릭 유기 잔기를 통해 인-함유 잔기 예를 들어 포스페이트 잔기에 글리코시드 결합 없이 연결되는 3-피리딘 카르보닐 또는 3-피리딘 티오카르보닐 잔기를 포함한다.

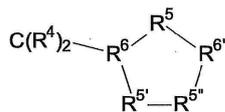
[0031] 인공 조효소는 특히 바람직하게는 하기 화학식 (II) 의 화합물 또는 이의 염 또는 임의로는 이의 환원 형태에서 선택된다:



(II)

[0032] [식 중,
 [0033] A = 아데닌 또는 이의 유사체이고,
 [0034] T = 각각의 경우 독립적으로 O, S 를 나타내고,
 [0035]

- [0036] U = 각각의 경우 독립적으로 OH, SH, BH_3^- , $BCNH_2^-$ 를 나타내고,
- [0037] V = 각각의 경우 독립적으로 OH 또는 포스페이트기, 또는 시클릭 포스페이트기를 형성하는 2 개의 기를 나타내고,
- [0038] W = COOR, $CON(R)_2$, COR, $CSN(R)_2$ 이고, 여기서 R 은 각각의 경우 독립적으로 H 또는 C_1-C_2 알킬을 나타내고,
- [0039] X^1, X^2 = 각각의 경우 독립적으로 O, CH_2 , $CHCH_3$, $C(CH_3)_2$, NH, NCH_3 을 나타내고,
- [0040] Y = NH, S, O, CH_2 이고,
- [0041] Z = 선형 또는 시클릭 유기 잔기이며,
- [0042] 단, Z 및 피리딘 잔기는 글리코시드 결합에 의해 연결되지 않음].
- [0043] 화학식 (II) 의 화합물에서, Z 는 바람직하게는, 1 또는 2 개의 탄소 원자가 임의로는 O, S 및 N 에서 선택되는 하나 이상의 헤테로원자로 대체된 탄소수 4-6, 바람직하게는 탄소수 4 의 선형 잔기이거나, O, S 및 N 에서 선택되는 헤테로원자, 및 임의로는 하나 이상의 치환기를 임의로 함유하는 탄소수 5 또는 6 의 시클릭기를 포함하는 잔기, 및 시클릭기 및 X^2 에 결합하는 잔기 CR^4_2 (식 중 R^4 는 각각의 경우 독립적으로 H, F, Cl, CH_3 임) 이다.
- [0044] Z 는 특히 바람직하게는 포화 또는 불포화 카르보시클릭 또는 헤테로시클릭 5-원 고리, 특히 하기 화학식 (III) 의 화합물이다:



(III)

- [0045]
- [0046] [식 중,
- [0047] 단일 또는 이중 결합이 $R^{5'}$ 와 $R^{5''}$ 사이에 존재할 수 있으며,
- [0048] R^4 = 각각의 경우 독립적으로 H, F, Cl, CH_3 을 나타내고,
- [0049] R^5 = CR^4_2 이고,
- [0050] 단일 결합이 $R^{5'}$ 와 $R^{5''}$ 사이에 존재하는 경우, $R^{5'}$ = O, S, NH, NC_1-C_2 알킬, CR^4_2 , CHOH, $CHOCH_3$ 이고, $R^{5''}$ = CR^4_2 , CHOH, $CHOCH_3$ 이고,
- [0051] 이중 결합이 $R^{5'}$ 와 $R^{5''}$ 사이에 존재하는 경우, $R^{5'} = R^{5''} = CR^4$ 이고,
- [0052] $R^6, R^{6'}$ = 각각의 경우 독립적으로 CH 또는 CCH_3 을 나타냄].
- [0053] 바람직한 구현예에서, 본 발명에 따른 화합물은 아데닌 또는 아데닌 유사체 예를 들어 C_8 -치환 및 N_6 -치환 아데닌, 데아자 변이체 예컨대 7-데아자, 아자 변이체 예컨대 8-아자 또는 조합물 예컨대 8-데아자 또는 7-아자 또는 카르보시클릭 유사체 예컨대 포르마이신을 포함하며, 상기 7-데아자 변이체는 할로젠, C_{1-6} 알킬닐, C_{1-6} 알케닐 또는 C_{1-6} 알킬에 의해 7 위치에서 치환될 수 있다.
- [0054] 추가적으로 바람직한 구현예에서, 화합물은 예를 들어 2-메톡시데옥시리보오스, 2'-플루오로데옥시리보오스, 핵시톨, 알트리톨 또는 폴리시클릭 유사체 예컨대 비시클릭 당, LNA 당 및 트리시클로 당을 리보오스 대신에 포함하는 아데노신 유사체를 포함한다.

- [0055] 특히, (이)-포스페이트 산소는 또한 화학식 (II) 의 화합물에서 아이소트론적으로 (isotronically), 예를 들어 S^- 또는 BH_3^- 에 의해 O^- 가, NH , NCH_3 또는 CH_2 에 의해 O 가, $=S$ 에 의해 $=O$ 가 대체될 수 있다. 본 발명에 따른 화학식 (II) 의 화합물에서, W 는 바람직하게는 $CONH_2$ 또는 $COCH_3$ 이다.
- [0056] R^5 는 바람직하게는 화학식 (III) 의 기에서 CH_2 이다. 또한, $R^{5'}$ 가 CH_2 , $CHOH$ 및 NH 에서 선택되는 것이 바람직하다. 특히 바람직한 구현예에서, $R^{5'}$ 및 $R^{5''}$ 는 각각의 경우 $CHOH$ 이다. 추가적으로 바람직한 구현예에서, $R^{5'}$ 는 NH 이고 $R^{5''}$ 는 CH_2 이다. $R^4 = H$, $R^5 = CH_2$, $R^{5'} = R^{5''} = CHOH$ 이고 $R^6 = R^{6'} = CH$ 인 화학식 (III) 의 화합물이 가장 강력하게 바람직하다.
- [0057] 가장 강력하게 바람직한 구현예에서, 인공 조효소는 문헌으로부터 공지되어 있는 화합물 carbaNAD 이다 (J.T. Slama, Biochemistry (1988), 27, 183 및 Biochemistry (1989), 28, 7688). 본 발명에 따라 사용될 수 있는 다른 안정한 조효소는 WO 98/33936, WO 01/49247, WO 2007/012494, US 5,801,006, US11/460,366 및 Blackburn 등 (Chem. Comm. (1996), 2765) 에 의한 발명물에서 기재되어 있으며, 이의 개시물은 본원에 명백히 참고로 포함된다.
- [0058] 본 발명에 따른 방법에 사용되는 진단 요소는 돌연변이화된 탈수소효소 및 인공 조효소를 함유하는 건식 시약층을 포함하며 분석물 함유 샘플에 의해 습윤될 수 있는 임의의 진단 요소일 수 있다. 돌연변이화된 탈수소효소 및 인공 조효소에 추가로, 시약층은 예를 들어 적합한 매개체 뿐 아니라 적합한 보조 물질 및/또는 첨가제와 같은, 분석물의 정성 검출 또는 정량 측정에 사용되는 추가적인 시약을 임의로 함유할 수 있다.
- [0059] 분석물을 수용액 또는 비-수용액의 형태로 적용할 수 있는 진단 요소는 바람직하게는 본 발명의 범주 내에서 사용된다. 본 발명의 특히 바람직한 구현예에서, 진단 요소는 시험용 테이프, 시험용 디스크, 시험용 패드, 시험용 스트립, 시험용 스트립 드럼, 또는 본원에서 명백히 참고되는 WO 2005/084530 A2 에서 언급된 진단 요소이다. 본 출원에서 기재되는 진단 요소는 각각의 경우, 분석물 함유 샘플과 접촉될 수 있으며 적합한 수단을 사용하여 분석물의 정성 및/또는 정량 측정이 가능한 하나 이상의 시험 부위를 포함한다.
- [0060] 본원에서 사용되는 바와 같은 용어 "시험용 테이프" 는 하나 초과의 개별적인 시험 부위, 바람직하게는 10 개 이상의 개별적인 시험 부위, 보다 바람직하게는 25 개 이상의 개별적인 시험 부위, 가장 바람직하게는 50 개 이상의 개별적인 시험 부위를 통상 포함하는 테이프형 진단 요소를 의미한다. 개별적인 시험 부위는 바람직하게는 각각 수 mm 내지 수 cm 의 거리에서, 예를 들어 서로 2.5 cm 미만의 거리에서 배열되며, 시험용 테이프는 테이프 이동 동안 이동한 거리를 기록하고/하거나 교정을 위해 연속 시험 부위 사이에 마커 부위를 임의로 포함할 수 있다. 이러한 시험용 테이프는 예를 들어 EP 1739 432 A1 에 기재되며, 이의 개시물은 명백히 참고로 포함된다.
- [0061] 본원에서 사용되는 바와 같은 용어 "시험용 디스크" 는 하나 이상의 개별적인 시험 부위, 예를 들어 10 개 이상의 개별적인 시험 부위를 포함할 수 있는 디스크형 진단 요소를 의미한다. 한 구현예에서, 시험용 디스크는 그 위에 분석물 샘플을 적용함으로써 샘플의 부피에 따라 더 크거나 더 작은 크기의 시험용 디스크 부위가 샘플에 의해 습윤될 수 있으며 분석물 측정에 사용될 수 있는 시험 화학의 박층, 예를 들어 약 20 μm 의 두께를 갖는 층으로 코팅된다. 시험 화학층을 통한 수분의 통과로 인해 부분적으로 또는 완전히 습윤될 수 있는 시험용 디스크의 비-습윤 부위는 이후 분석물의 추가적 측정에 이용가능하다.
- [0062] 본 발명에 따른 방법은 광화학적 또는 전기화학적으로 검출될 수 있는 임의의 생물학적 또는 화학적 물질을 측정하는데 사용될 수 있다. 분석물은 바람직하게는 말산, 알코올, 암모늄, 아스코르브산, 콜레스테롤, 시스테인, 글루코오스, 글루코오스-6-포스페이트, 글루타티온, 글리세롤, 우레아, 3-히드록시부티레이트, 락트산, 5'-뉴클레오타이드아제, 펩티드, 피루베이트, 살리실레이트 및 트리글리세라이드로 이루어지는 군에서 선택되며, 글루코오스가 특히 바람직하다. 이와 관련하여, 분석물은 임의의 공급원에서 기원할 수 있으나 바람직하게는 진혈, 혈장, 혈청, 림프액, 담즙, 뇌척수액, 세포외 조직액, 소변 뿐 아니라 선 분비물 예컨대 침 또는 땀을 비제한적으로 포함하는 체액에 포함된다. 진혈, 혈장, 혈청 또는 세포외 조직액으로부터의 샘플 내 분석물의 존재 및/또는 양은 바람직하게는 본원에 기재되는 진단 요소에 의해 측정된다.
- [0063] 분석물의 정성 및/또는 정량 측정은 임의의 방식으로 발생할 수 있다. 이러한 목적을 위해, 선행 기술에 공지되어 있으며 분석할 수 있거나 수동적으로 또는 적합한 수단을 사용하여 판독할 수 있는 측정가능한 신호를 생성해내는 효소적 반응을 검출하기 위한 모든 방법이 기본적으로 사용될 수 있다. 본 발명의 범주 내에서,

예를 들어 흡광, 형광, 원편광 이색 (CD), 광학 회전 분산 (ORD), 굴절률 등의 측정을 포함하는 광학 측정법 뿐 아니라 전기화학적 기술이 바람직하게 사용된다. 분석물의 존재 및/또는 양은 특히 바람직하게는 광도 측정법적 또는 형광 측정법적으로 측정되며, 예를 들어 인공 조효소의 형광 측정법적으로 측정가능한 변화에 의해 간접적으로 측정된다.

[0064] 추가적인 양상에서, 본 발명은 하기를 함유하는 건식 시약층을 포함하는 분석물 측정용 진단 요소에 관한 것이다:

[0065] (a) 분석물에 특이적인 돌연변이화된 탈수소효소, 및

[0066] (b) 인공 조효소.

[0067] 진단 요소 뿐 아니라 이에 포함되는 돌연변이화된 탈수소효소 또는 이에 포함되는 인공 조효소의 바람직한 구현예에 관해서, 본 발명의 방법의 상세한 설명에 관련된 구현예가 참고된다.

[0068] 본 발명을 하기의 도면 및 실시예에 의해 추가로 설명한다:

도면의 간단한 설명

[0069] **도 1:** 0.0 mg/dl, 35.2 mg/dl, 54.2 mg/dl, 146.6 mg/dl, 249.0 mg/dl, 338.6 mg/dl 및 553.6 mg/dl (위에서 아래로 표시)의 글루코오스 농도에서 조효소로서 NAD/NADH의 존재 하에 바실러스 서브틸리스로부터의 야생형 글루코오스 탈수소효소의 반응 속도.

도 1A: 효소 활성 1556.2 kU/100 g 질량.

도 1B: 효소 활성 1004.0 kU/100 g 질량.

도 1C: 효소 활성 502.0 kU/100 g 질량.

도 1D: 효소 활성 251.0 kU/100 g 질량.

도 1E: 효소 활성 25.10 kU/100 g 질량.

도 2: 0.0 mg/dl, 34.4 mg/dl, 141.2 mg/dl, 236.6 mg/dl, 333.8 mg/dl 및 525.8 mg/dl (위에서 아래로 표시)의 글루코오스 농도에서 조효소로서 carbaNAD/carbaNADH의 존재 하에 바실러스 서브틸리스로부터의 야생형 글루코오스 탈수소효소의 돌연변이화에 의해 취득된 글루코오스 탈수소효소 이중 돌연변이체 GlucDH_E170K_K252L의 반응 속도. 효소 활성: 4.60 kU/100 g 질량.

도 3: 글루코노락톤으로의 적정 전 및 후 복합체 글루코오스 탈수소효소 (GlucDH)/NADH의 형광 스펙트럼.

도 4: 글루코오스로의 적정 전 및 후의 복합체 글루코오스 탈수소효소 (GlucDH)/NADH의 형광 스펙트럼.

도 5: 다양한 글루코오스 농도에서의 야생형 글루코오스 탈수소효소 및 NADH의 존재 하 글루코오스 전환의 반응 속도.

도 5A: 77.0 mg/dl, 207.0 mg/dl, 300.0 mg/dl 및 505.0 mg/dl (위에서 아래로 표시)의 글루코오스 농도에서의 추가적으로 첨가된 글루코노락톤의 부재 하 반응 속도.

도 5B: 96.2 mg/dl, 274.0 mg/dl, 399.0 mg/dl 및 600.0 mg/dl (위에서 아래로 표시)의 글루코오스 농도에서의 추가적으로 첨가된 글루코노락톤의 존재 하 반응 속도.

도 6: 글루코오스 탈수소효소 이중 돌연변이체 GlucDH_E170K_K252L의 아미노산 서열의 표시.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0070] 실시예

[0071] **실시예 1:** 아미노산 치환 E170K 및 K252L을 갖는 바실러스 서브틸리스로부터의 글루코오스 탈수소효소의 이중 돌연변이체 (GlucDH_E170K_K252L)의 제조

[0072] 자연적 탈수소효소에 비해 안정화된 효소를 생성시키기 위해서, 바실러스 서브틸리스로부터의 글루코오스 탈수소효소의 핵산 서열을 플라스미드 pKK177에서 도입하였다 (EcoRI 및 HindIII를 통해 클로닝됨). 돌연변이 E170K 및 K252L을 야생형 글루코오스 탈수소효소의 아미노산 서열의 위치 170에서 첫 번째로 위치-특이적 돌

연변이유발, 이후 상기 서열의 위치 252 에서 위치-특이적 돌연변이유발에 의해 도입하였다. 각각의 돌연변이유발 단계를 PCR 반응의 일부로서 특이적으로 설계된 프라이머를 사용하여 실행하였다.

[0073] 수득한 PCR 생성물을 에스케리키아 콜리 (Escherichia coli) XL1blue MRF' 내에 형질전환하였다. 세포를 플레이팅하고, 플라스미드 함유 클론을 밤새 배양하고, 효소 활성을 온도 스트레스 (스트레스 시험: 50°C 에서 30 분) 전 및 후에 측정하였다. 결과를 표 1 에 나타내었다.

표 1

스트레스 후 바실러스 서브틸리스로부터의 야생형 글루코오스 탈수소효소 및 돌연변이체 GlucDH_E170K 및 GlucDH_E170K_K252L 의 잔류 활성 (에스케리키아 콜리 XL1blue MRF' 에서 시험)	
	스트레스 후 잔류 활성 (%)
야생형 글루코오스 탈수소효소	23
돌연변이체 GlucDH_E170K	80
돌연변이체 GlucDH_E170K_K252L	130

[0075] 서열분석 전에 양성 클론을 추가 2 회 시험하였다. 이러한 방식으로 수득한 이중 돌연변이체 GlucDH_E170K_K252L 을 제조 균주 에스케리키아 콜리 NM522 내에 헬퍼 플라스미드로서 pUBS-520 을 사용하여 형질전환하였다.

[0076] 실시예 2: 이중 돌연변이체 GlucDH_E170K_K252L 의 정제

[0077] 10 g 바이오매스 각각을 30 mM 인산칼륨 완충액 pH 6.5 50 ml 중에서 취하고 약 800 bar 에서 분쇄하였다. 세포 잔해물의 분리 후, 컬럼 부피 1 ml 당 < 40 mg 단백질의 적재에서, 완충액 A (30 mM 인산칼륨 완충액 pH 6.5) 에서 완충액 B (완충액 A + 500 mM NaCl) 의 선형 구배를 사용하여 DEAE 세파로오스 (GE Healthcare Company) 상에서 크로마토그래피를 실행하였다. 글루코오스 탈수소효소 활성을 나타낸 분획물을 조합하고 황화암모늄 (Aldrich Company) 으로 전도도 230 mS/cm 로 조정하였다.

[0078] 원심분리 후, 맑은 상청액을 컬럼 부피 1 ml 당 10 mg 단백질의 최대 적재에서 페닐 세파로오스 FF (GE Healthcare Company) 상에서 크로마토그래피적으로 분리하였다. 황화암모늄으로 전도도 230 mS/cm 로 조정 한 완충액 A 에서 순수 완충액 A 의 선형 구배를 사용하여 용리를 실행하였다. 분획물을 이의 효소 활성에 대해 시험하고, 조합하고, 60 mM 인산칼륨 완충액 pH 6.5 중 약 50 mg/ml 의 농도로 재완충하고, 농축하고 동결 건조하였다.

[0079] 실시예 3: 바실러스 서브틸리스로부터의 야생형 글루코오스 탈수소효소 및 이중 돌연변이체 GlucDH_E170K_K252L 의 큐벳 시험에서의 활성 측정

[0080] 바실러스 서브틸리스로부터의 야생형 글루코오스 탈수소효소 뿐 아니라 실시예 1 에서 생성된 이중 돌연변이체 GlucDH_E170K_K252L 의 NAD/NADH 또는 carbaNAD/carbaNADH 의 존재 하 특이적 활성 또는 동결건조물 활성을 검사하기 위해서, 두 효소 모두에 대해 글루코오스 탈수소효소 활성 시험을 실행하였다.

[0081] **시약 용액의 제조**

[0082] Tris 완충액 (0.1 M, pH 8.5; 0.2 M NaCl)

[0083] 11.68 g NaCl (Sigma-Aldrich Company) 및 12.11 g Tris (Sigma-Aldrich Company) 를 약 900 ml 이차 증류수에 용해하고, 1 N HCl 로 pH 8.5 로 조정하고 이차 증류수로 1000 ml 까지 채웠다.

[0084] 희석 완충액 (3.8 mM NAD; 0.1 M Tris, pH 8.5; 0.2 M NaCl)

[0085] 250 mg NAD (Roche Company) 를 100 ml Tris 완충액 (0.1 M, pH 8.5; 0.2 M NaCl) 에 용해하였다.

[0086] 글루코오스 용액

[0087] 2 g D(+) 글루코오스 모노히드레이트 (Sigma-Aldrich Company) 를 10 ml 이차 증류수에 용해하였다. 실온에서 2 시간의 정지 시간 및 변성광 (mutarotation) 평형의 조정 후, 용액은 사용 준비되었다.

[0088] NAD 용액 (15 mM)

[0089] 10 mg NAD (Roche Company) 를 1 ml 이차 증류수에 용해하였다.

- [0090] carbaNAD 용액 (15 mM)
- [0091] 10 mg carbaNAD (Roche Company) 를 1 ml 이차 증류수에 용해하였다.
- [0092] **샘플 제조**
- [0093] 측정용으로 제조하기 위해서, 검사할 10 mg 의 효소를 1 ml 희석 완충액에 용해하고 실온에서 60 분 동안 유지시켜 재구성이 가능하게 하였다. 이후, 이를 희석 완충액으로 0.12 내지 0.23 U/ml 로 희석하였다.
- [0094] **측정 절차**
- [0095] 측정을 실행하기 위해 1.35 ml Tris 완충액, 0.1 ml 글루코오스 용액 및 0.05 ml NAD 용액 또는 0.05 ml carbaNAD 용액 (각각 25°C 로 인큐베이션함) 을 플라스틱 큐벳에 피펫팅하고, 함께 혼합하고 큐벳 캐리지에서 25°C 로 인큐베이션하였다.
- [0096] 용액의 흡광도가 더 이상 변화하지 않은 후 (블랭크 값), 0.025 ml 샘플을 큐벳에 도입하여 반응을 시작시키고, 샘플의 흡광도를 5 분의 기간 동안 모니터링하였다.
- [0097] 측정 파장: 340 nm
- [0098] 시험 부피: 1.525 ml
- [0099] 진로 (path) 길이: 1 cm
- [0100] 온도: 25°C
- [0101] 평가 범위: 1 - 5 분
- [0102] **평가**
- [0103] 하기 식을 사용하여, 각각의 효소의 수용액에서의 활성을 평가하였다:
- [0104]
$$\text{활성} = (1.525 \times \Delta A / \text{분} \times \text{희석 인자}) / (\epsilon_{340} \times 0.025 \times 1) \text{ U/ml}$$
- [0105] [식 중,
- [0106] $\Delta A = A_t - A_0 = \text{시간에 걸친 흡광도에서의 변화 기울기}$
- [0107] $\epsilon_{340} = 6.3 [1 \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}]$.
- [0108] 측정 결과를 표 2 에 나타내었다.

표 2

[0109]

바실러스 서브틸리스로부터의 야생형 글루코오스 탈수소효소 (WT-GlucDH) 및 이중 돌연변이체 GlucDH_E170K_K252L 의 활성			
		WT-GlucDH	GlucDH_E170K_K252L
NAD	U/mg 동결건조물	203	167
	U/mg 효소	484	270
	Km mM	0.08	0.07
	V _{최대} (U/mg 동결건조물)	122	144
carbaNAD	U/mg 동결건조물	3.4	2.3
	U/mg 효소	8.2	3.7
	NAD 에 대한 % U/mg 동결건조물	1.7 %	1.4 %
	Km mM	0.3	1.4
	V _{최대} (U/mg 동결건조물)	3	13

- [0110] 표 2 에서 나타낸 바와 같이, 큐벳에서의 표준화 조건 하의 시스템 WT-glucDH/carbaNAD 의 활성 (8.2 U/mg 효소) 은 시스템 WT-GlucDH/NAD 의 활성 (484 U/mg 효소) 보다 두 자릿수 더 낮았다. 마찬가지로, 인공 조효소 carbaNAD 의 존재 하 이중 돌연변이체 GlucDH_E170K_K252L 의 활성이 자연적 조효소 NAD 의 존재 하 (270 U/mg 효소) 에서보다 약 두 자릿수 더 낮다 (3.7 U/mg 효소) 는 것이 발견되었다.

[0111] 실시예 4: 바실러스 서브틸리스 (WT-GlucDH) 로부터의 야생형 글루코오스 탈수소효소 및 이중 돌연변이체 GlucDH_E170K_K252L 의 건식 시약층에서의 반응 속도 측정

[0112] 바실러스 서브틸리스 (WT-GlucDH) 로부터의 자연적 글루코오스 탈수소효소 또는 실시예 1 에서 제조된 이중 돌연변이체 GlucDH_E170K_K252L 과 조효소로서 NAD/NADH 또는 carbaNAD/carbaNADH 를 함께 포함하는 다양한 시험용 스트립을 제조하여 효소의 반응 속도를 측정하였다.

[0113] 구체적으로, 18.4 g 1 M 포스페이트 완충액 pH 7.0, 1.4 g Gantrez S97 (International Specialty Products Company), 2.94 g 16% NaOH 용액, 0.34 g Mega 8 (Sigma-Aldrich Company), 0.039 g Geroxon T77 (Rhone-Poulenc Company) 및 1.90 g 폴리비닐 피롤리돈 25000 (Fluka Company) 으로 이루어지는 부분 용액 1 을 상기 목적을 위해 먼저 제조하였다.

[0114] 상기 부분 용액을 이후 0.50 g 염화나트륨, 21.3 g 이차 증류수, 4.43 g Transpafill (Evonik Company) 및 2.95 g Propiofan (BASF Company) 으로 이루어지는 부분 용액 2 뿐 아니라 냉장고에서 밤새 보관한 부분 용액 3 (17.4 g 1 M 포스페이트 완충액 pH 7.0, 0.5 g 염화나트륨, 14.35 g 2 M 인산수소이칼륨으로 이루어짐) 과 혼합하였으며, 탈수소효소, 조효소 및 임의로는 소 혈청 알부민 (BSA; Roche Company) 의 각 량은 각각의 경우 하기 표 3 에 표시하였다. 시험용 스트립의 매트릭스 특성을 가능한 한 일정하게 유지시키기 위해 감소량의 자연적 탈수소효소를 사용하는 경우, 효소적으로 불활성인 소 혈청 알부민을 제형에 첨가하였다.

표 3

[0115]

사용된 시험용 스트립에서의 탈수소효소 및 조효소의 함량						
효소	효소 질량 (g)	동결건조물 활성 (U/mg)	조효소	조효소 질량 (g)	BSA 질량 (g)	kU/100 g 질량
WT-GlucDH	6.2	251	NAD	7.36	0	1556.2
WT-GlucDH	4.0	251	NAD	7.36	2.2	1004.0
WT-GlucDH	2.0	251	NAD	7.36	4.2	502.0
WT-GlucDH	1.0	251	NAD	7.36	5.2	251.0
WT-GlucDH	0.1	251	NAD	7.36	6.1	25.10
GlucDH 이중 돌연변이체	2.0	2.3	carbaNAD	2.1	0	4.60

[0116] 이러한 방식으로 수득한 시험용 스트립을, 여기 LED (375 nm) 및 통상적 검출기 (BPW34 blue-enhanced) 를 포함하는 실험실 측정 기구 (자체 제작, Roche Company) 에서 측정하였다. 적용한 샘플 물질은 조정된 글루코오스 값을 포함하는 혈액이었다. 측정 결과를 도 1 및 2 에 나타내었다.

[0117] 도 1A-1E 에서 나타낸 바와 같이, NAD 의 존재 하 야생형 글루코오스 탈수소효소에 의한 글루코오스 전환의 반응 속도는 시험용 스트립에서의 효소 함량 감소 및 이에 따른 효소 활성 감소와 함께 약화되었다. 따라서, carbaNAD 의 존재 하 이중 돌연변이체 GlucDH_E170K_K252L 에 의한 글루코오스 전환의 반응 속도가, 단지 4.60 kU/100 g 질량의 상당히 낮은 효소 활성으로 인해 심지어 더 불량한 결과를 산출하였다는 것이 예측되었다 (표 3 참조).

[0118] 도 2 는 조효소로서 carbaNAD 의 존재 하에 실시예 1 에 따라 수득한 돌연변이화된 글루코오스 탈수소효소의 반응 속도를 나타낸다. 도 2 에서 나타낸 바와 같이, 감소된 효소 활성으로 예측된 반응 속도의 감소는 발생하지 않았다. 오히려, 이중 돌연변이체는 상응하는 야생형 글루코오스 탈수소효소 및 자연적 조효소 NAD 를 포함하는 표 3 에 열거한 모든 제형보다, carbaNAD 의 존재 하에 더 양호한 반응 속도를 나타내었다.

[0119] 실시예 3 및 4 에 기재된 결과를 고려하는 경우, 이는 효소의 활성이 아니라, 건식 시약층에서의 글루코오스의 전환 속도에 대해 결정적인 효소, 조효소, 환원 조효소, 글루코오스 및 글루코노락톤 사이의 복합체 형성의 상태인 것으로 나타나며, 복합체 형성의 상태는 자연적 NAD/NADH 를 갖는 야생형 효소의 경우보다 carbaNAD/carbaNADH 를 갖는 실시예 1 에서 제조된 돌연변이체의 경우에서 명백히 더 양호하다.

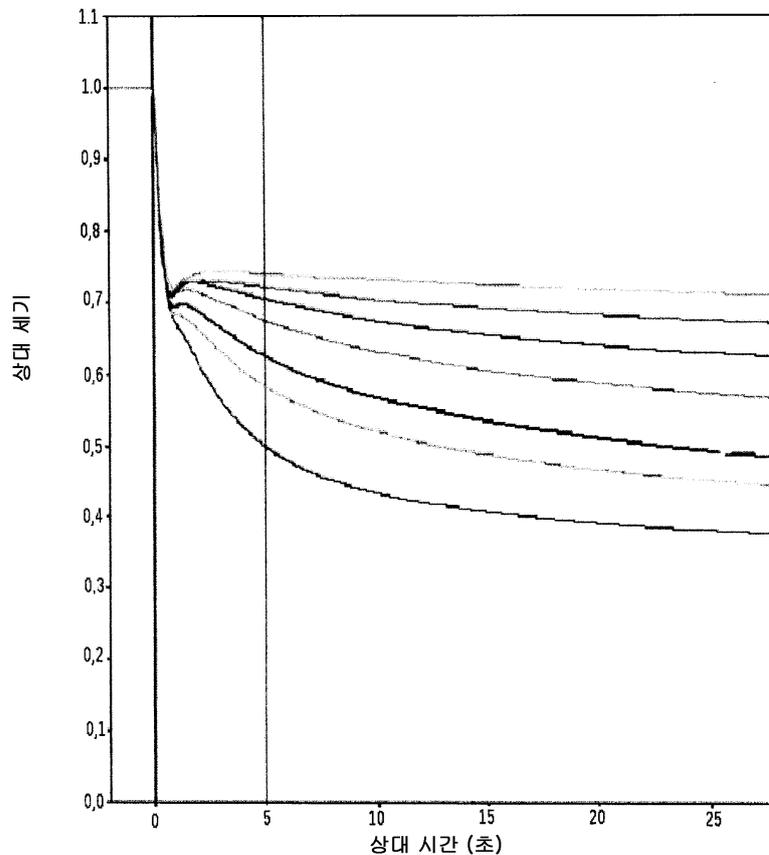
[0120] 실시예 5: 글루코오스 탈수소효소, NADH 및 글루코오스 또는 글루코노락톤으로 이루어지는 3 중 복합체의 검출

[0121] 효소, 환원 조효소 및 글루코오스 또는 글루코노락톤으로 이루어지는 3 중 복합체의 존재를 확인하기 위해서, NADH 의 형광 특성을 기준으로 하는 분석물의 결합에 대한 실험을 큐벳 시험에서 실행하였다.

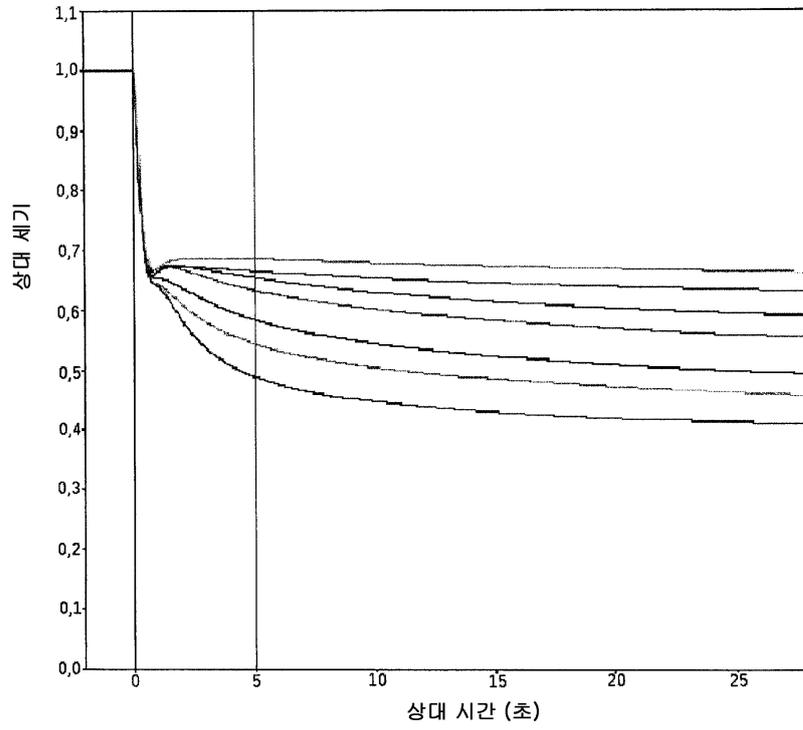
- [0122] 이러한 목적을 위해서, 1 mg NADH (Roche Company) 를 1 ml 포스페이트 완충액에 용해하고 관련 형광 스펙트럼을 기록하였다. 이후, 바실러스 서브틸리스로부터의 야생형 글루코오스 탈수소효소 (GlucDH) 10 mg 을 첨가하여, 문헌에서 공지되어 있는 복합체 GlucDH-NADH 를 형성시켰으며, 상기 복합체는, NADH 의 상당히 긴 수명 (자유 상태에서의 0.4 ns 에 비해 3 ns 임) 으로 인해 450 nm 에서 이동 발광 최대값을 산출하였다 (도 3 참조). 글루코노락톤으로의 상기 복합체의 직정은 형광을 감소시키면서, 동시에 427 nm 로 발광 최대값을 이동시키며, 이는 3 중 복합체 GlucDH-NADH-글루코노락톤인 신규한 복합체의 존재를 나타낸다 (도 3 참조).
- [0123] 수명 단축에 또한 상응하는 형광 감소는 추측컨대 산화환원 쌍 NADH-글루코노락톤에 의한 신속한 에너지 고갈로 인한 것이다. 2 중 복합체 GlucDH-NADH 를 글루코오스로 적정하는 경우, 비효과적인 3 중 GlucDH-NADH-글루코오스 복합체가 형성되어, 환원가능 종류의 결핍으로 인해 이는 특정 방식으로 에너지를 저하시킬 수 없으므로, 동일한 발광 최대값에서 더 긴 수명 및 더 높은 세기를 나타내는 경향이 있다 (도 4 참조).
- [0124] 3 중 복합체 GlucDH-NADH-글루코노락톤의 절단 및 이에 따른 효소의 재-이용성이 건식 시약층에서의 글루코오스의 글루코노락톤으로의 전환 속도에 결정적이라면, 추가적인 글루코노락톤 (반응에서 형성된 글루코노락톤에 추가로) 이 추가적인 효소 복합체를 저해할 것이기 때문에, 글루코노락톤의 첨가는 글루코오스의 전환을 감속시킬 것이다.
- [0125] 이러한 가정은, 혈액을 글루코노락톤의 부재 (도 5A 참조) 또는 존재 (도 5B 참조) 하에 본 출원의 실시예 4 에 따라 건식 시약층에 적용한 반응 속도 측정에서 확증되었다. 도 5B 는 도 5A 에서 측정한 샘플에 비해 전환의 상당한 감속을 나타내었다.

도면

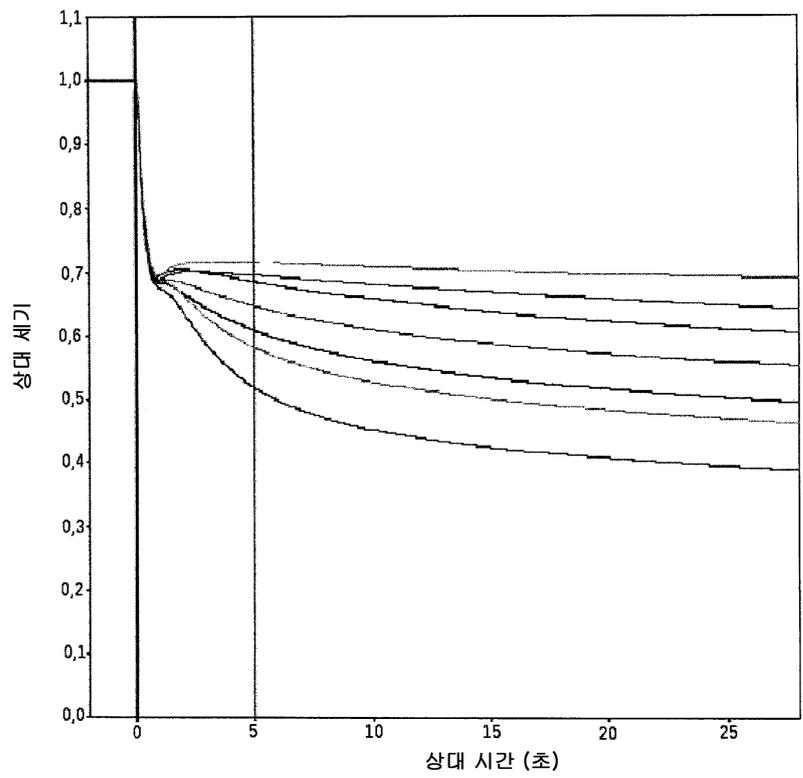
도면1a



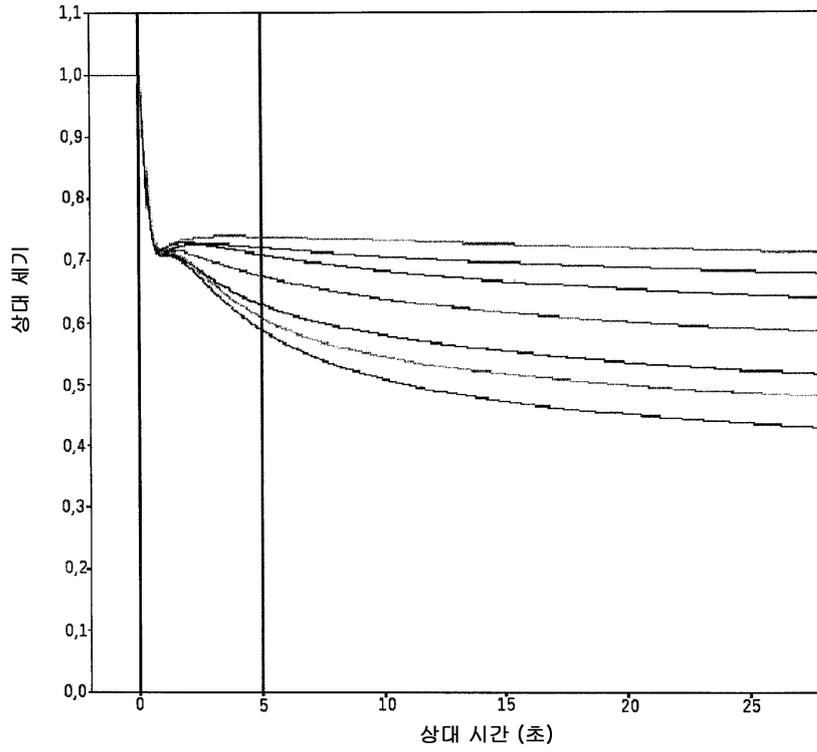
도면1b



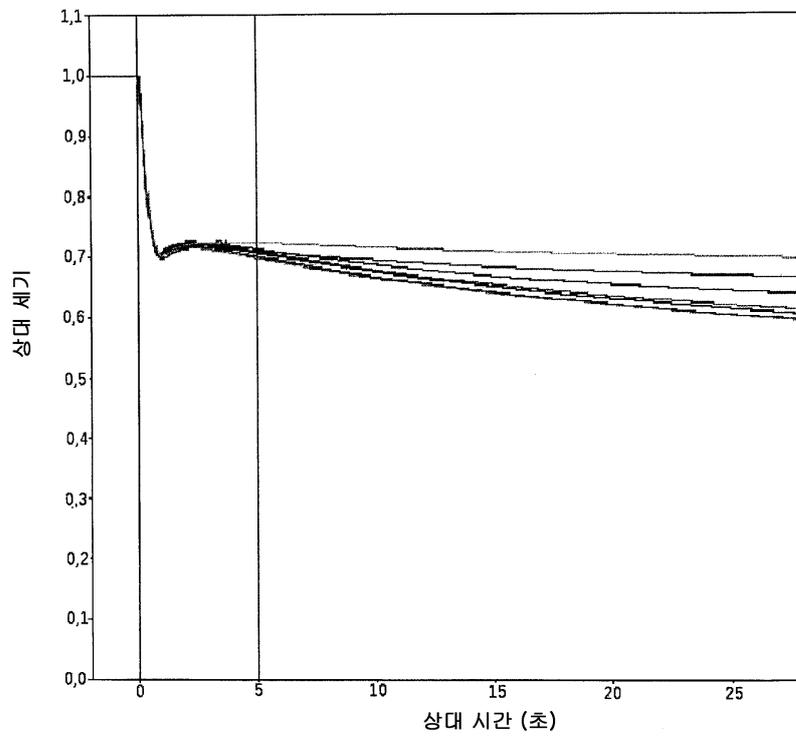
도면1c



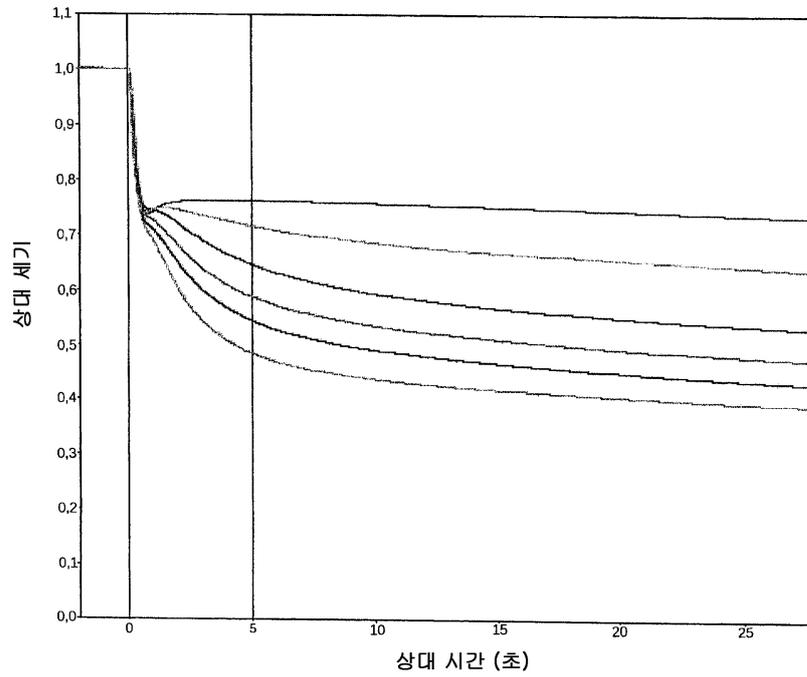
도면1d



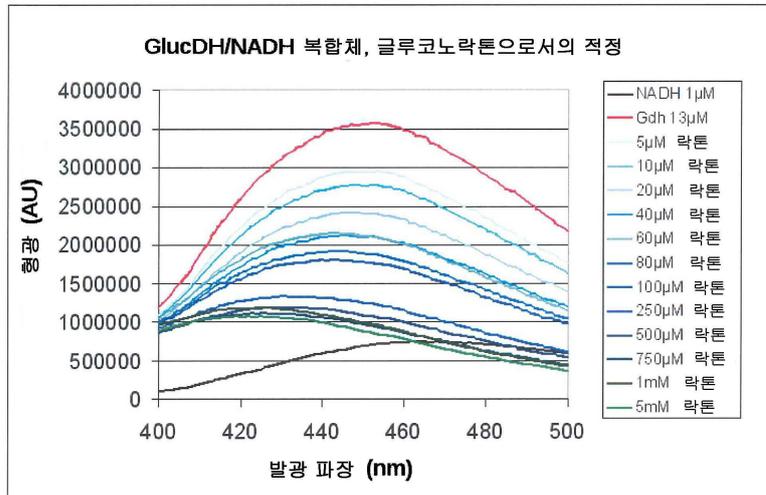
도면1e



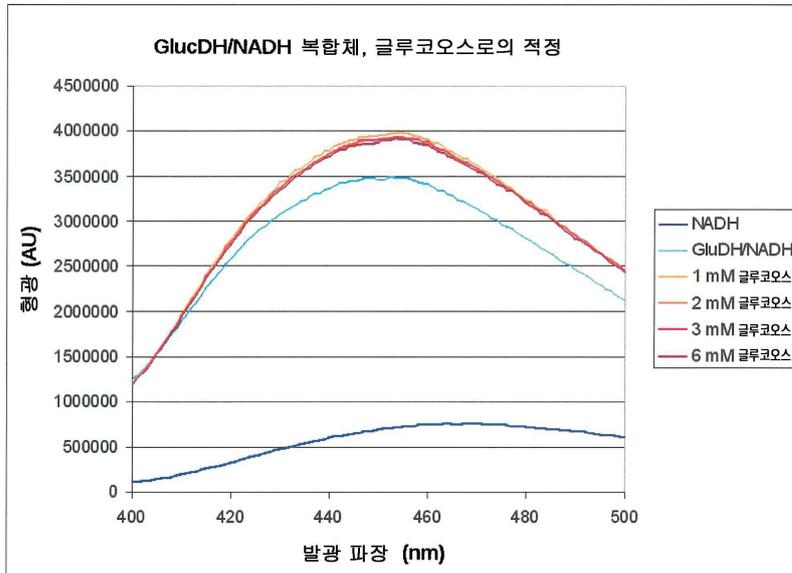
도면2



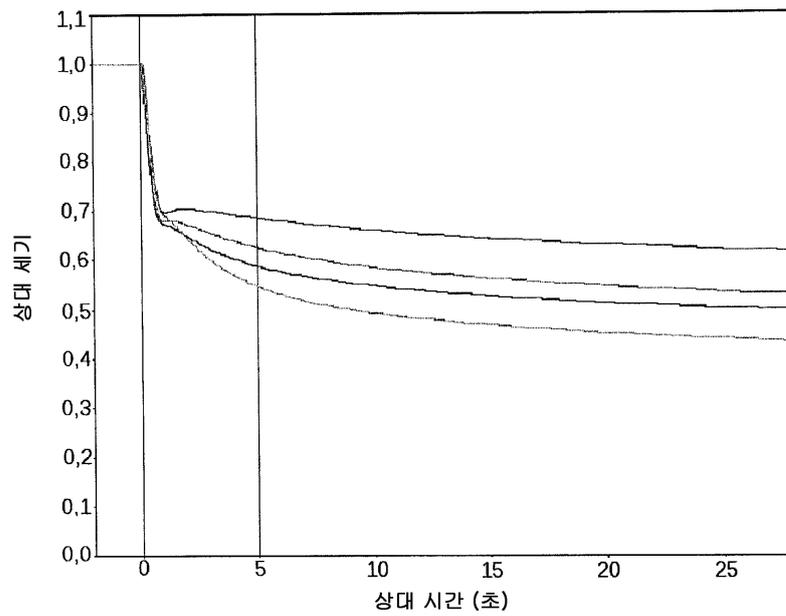
도면3



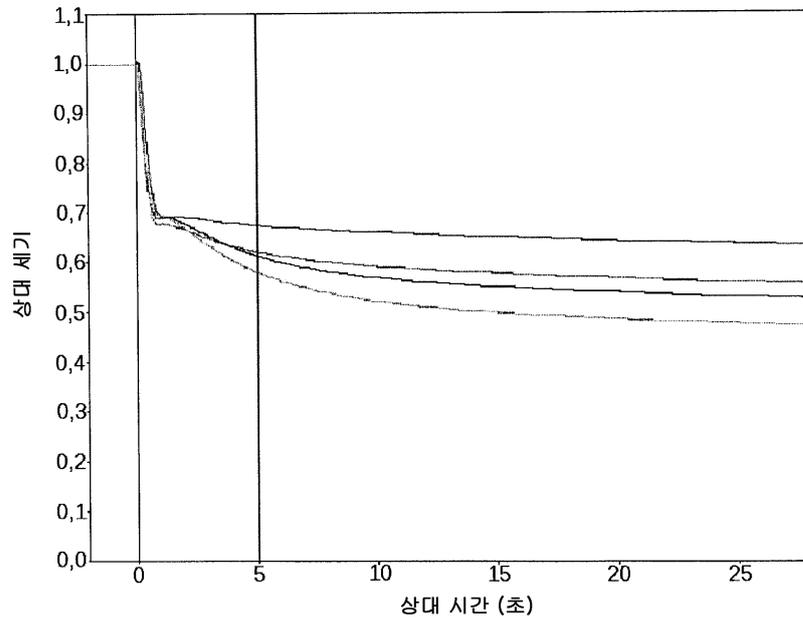
도면4



도면5a



도면5b



도면6

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
    
```

서열목록

- <110> F. Hoffmann - La Roche AG
Roche Diagnostics GmbH
- <120> Schnelle Reaktionskinetik von Enzymen mit niedriger Aktivit? in
Trockenschichten
- <130> 44103P WO
- <150> PCT/EP2009/001206
- <151> 2009-02-19
- <160> 1
- <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> (170)
 <220><221> MUTAGEN
 <222> (252)

<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 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, 8

【변경전】

상기 7-테아자 변이체

【변경후】

상기 7-테아자아데닌과 상기 7-테아자-8-아자아데닌