



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(11) PI 0710131-7 B1**



**(22) Data do Depósito: 11/04/2007**

**(45) Data de Concessão: 10/03/2020**

**(54) Título:** MUTANTES ISOLADOS DE GLICOSE DESIDROGENASE SOLÚVEL DEPENDENTE DE PIRROLQUINOLINA QUINONA E MÉTODO DE DETECÇÃO, DETERMINAÇÃO OU MEDIÇÃO DE GLICOSE USANDO OS MESMOS

**(51) Int.Cl.:** C12N 9/04.

**(30) Prioridade Unionista:** 13/04/2006 EP 06 007779.9.

**(73) Titular(es):** F. HOFFMANN-LA ROCHE AG.

**(72) Inventor(es):** MARA BOENITZ-DULAT; DANIELA BECK; PETER KRATZSCH; RAINER SCHMUCK; HERBERT VON DER ELTZ.

**(86) Pedido PCT:** PCT EP2007003207 de 11/04/2007

**(87) Publicação PCT:** WO 2007/118647 de 25/10/2007

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 13/10/2008

**(57) Resumo:** MUTANTES APERFEIÇOADOS DE GLICOSE DESIDROGENASE SOLÚVEL DEPENDENTE DE PIRROLQUINOLINA QUINONA A presente invenção descreve um mutante de glicose desidrogenase solúvel dependente de PQQ (s-GDH; EC 1.1.5.2) com especificidade aperfeiçoada a glicose em comparação com maltose, apresentando uma substituição de treonina na posição 348 por glicina, alanina ou serina, na qual esse mutante adicionalmente compreende pelo menos uma mutação para aperfeiçoar a estabilidade do mutante e uma ou mais mutações para aperfeiçoar a afinidade do mutante por glicose, e/ou uma ou mais mutações para aperfeiçoar adicionalmente a especificidade do mutante a glicose em comparação com maltose, e na qual a posição 348 corresponde às posições de aminoácidos conhecidas sequência do tipo selvagem de s-GDH de *A. calcoaceticus*. Também descritos são genes que codificam esse mutante de s-GDH e diferentes aplicações desses mutantes de s-GDH, particularmente para determinar a concentração de glicose em uma amostra.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**MUTANTES ISOLADOS DE GLICOSE DESIDROGENASE SOLÚVEL DEPENDENTE DE PIRROLQUINOLINA QUINONA E MÉTODO DE DETECÇÃO, DETERMINAÇÃO OU MEDIÇÃO DE GLICOSE USANDO OS MESMOS**".

5           A presente invenção refere-se a um mutante de glicose desidrogenase solúvel dependente de PQQ (s-GDH; EC 1.1.5.2) com especificidade aperfeiçoada em relação à glicose em comparação com maltose, apresentando uma substituição de treonina na posição 348 por glicina, alanina ou serina, e na qual esse mutante adicionalmente compreende pelo menos uma  
10       mutação para aperfeiçoar a estabilidade do mutante e uma ou mais mutações para aperfeiçoar a afinidade do mutante por hexoses, por exemplo, preferencialmente glicose, e/ou uma ou mais mutações para aperfeiçoar adicionalmente a especificidade do mutante à glicose em comparação com maltose, e em que essas posições correspondem às posições dos aminoácidos  
15       conhecidas da sequência do tipo selvagem s-GDH de *A. calcoaceticus*. Também descritos são genes que codificam essa s-GDH mutante e diferentes aplicações desses mutantes de s-GDH, particularmente para determinar a concentração de glicose em uma amostra.

Antecedentes da Invenção

20           A determinação de concentração de glicose no sangue é extremamente importante em diagnose clínica e no controle de diabetes. Aproximadamente 150 milhões de pessoas no mundo sofrem da doença crônica diabetes melito, um número que poderá dobrar por volta de 2025 de acordo com a OMS (WHO). Embora diabetes seja imediatamente diagnosticada e  
25       tratada, controle bem-sucedido a longo prazo exige ferramentas de diagnóstico de baixo custo que registrem rápida e precisamente concentrações de glicose no sangue. Glicose desidrogenases dependentes de PQQ (EC 1.1.5.2) catalisam uma reação em que glicose é oxidada à gliconolactona. Consequentemente, esse tipo de enzima é usado na medição de açúcar no  
30       sangue. Uma dessas ferramentas é uma fita de diagnóstico baseada na glicose desidrogenase solúvel (s-GlucDOR, EC 1.1.5.2), uma enzima que contém pirrolquinolina quinona originalmente derivada de *Acinetobacter calcoaceticus*.

- Quinoproteínas usam quinona como co-fator para oxidar álcoois, aminas e aldoses às suas lactonas, aldeídos e ácidos aldólicos correspondentes (Duine, J.A., *Energy generation and the glucose deshydrogenase pathway in Acinetobacter* (Geração de energia e o caminho da glicose desidrogenase em *Acinetobacter*), in "*The Biology of Acinetobacter*" ("A Biologia de *Acinetobacter*"), Nova Iorque, Plenum Press (1991), pp. 295-312; Duine, J.A., *Eur. J. Biochem.* 200 (1991) 271-284; Davidson, V.L., in "*Principles and applications of quinoproteins*" ("Princípios e aplicações de quinoproteínas"), todo o livro, Nova Iorque, Marcel Dekker (1993); Anthony, C., *Biochem. J.* 320 (1996) 697-711; Anthony, C. e Ghosh, M., *Current Science* 72 (1997) 716-727; Anthony, C., *Biochem. Soc. Trans.* 26 (1998) 413-417; Anthony, C. e Ghosh, M., *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 69 (1998) 1-22. Entre as quinoproteínas, aquelas que contêm o co-fator 2,7,9-tricarboxi-1H-pirrol[2,3-f]quinolino-4,5-diona (PQQ) não-covalentemente ligado constituem o maior sub-grupo (Duine 1991, *supra*). Todas as glicose desidrogenases de quinona bacteriana há muito conhecidas pertencem a esse subgrupo com PQQ como co-fator (Anthony e Ghosh 1997, *supra*; Goodwin, P.M. e Anthony, C., *Adv. Microbiol. Physiol.* 40 (1998) 1-80; Anthony, C., *Adv. in Phot. and Resp.* 15 (2004) 203-225).
- Dois tipos de glicose desidrogenase dependente de PQQ (EC 1.1.5.2) foram caracterizados em bactérias: uma é ligada a membrana (m-GDH); a outra é (s-GDH) solúvel. Ambos os tipos não compartilham qualquer homologia significativa de seqüências (Cleton-Jansen, A.M. e outros, *Mol. Gen. Genet.* 217 (1989) 430-436; Cleton-Jansen, A.M. e outros, *Antonie Van Leeuwenhoek* 56 (1989) 73-79; Oubrie, A. e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96 (1999) 11787-11791. Eles são também diferentes em relação tanto às suas propriedades cinéticas quanto às suas propriedades imunológicas (Matsushita, K. e outros, *Bioscience Biotechnol. & Biochem.* 59 (1995) 1548-1555). As m-GDHs são comuns em bactérias gram-negativas, s-GDHs, entretanto, têm sido encontradas apenas no espaço periplasmático de cepas de *Acinetobacter*, tal como *A. calcoaceticus* (Duine, J.A., 1991a; Cleton-Jansen, A.M. e outros, *J. Bacteriol.* 170 (1988) 2121-2125; Matsushita e A-

dachi, 1993) e *A. baumannii* (JP 11243949).

Por meio de busca em banco de dados de seqüências, duas seqüências homólogas à s-GDH de comprimento completo de *A. calcoaceticus* foram identificadas in *E.coli* K-12 e *Synechocystis* sp.. Adicionalmente, duas  
 5 seqüências incompletas homólogas à s-GDH de *A. calcoaceticus* foram também encontradas no genoma de *P. aeruginosa* e *Bordetella pertussis* (Oubrie e outros, 1999 a, b, c) e *Enterobacter intermedium* (Kim, C.H. e outros., *Current Microbiol.* 47 (2003) 457-461), respectivamente. As seqüências de aminoácidos deduzidas dessas quatro proteínas não-caracterizadas são estreitamente relacionadas com s-GDH de *A. calcoaceticus* com muitos resí-  
 10 duos no sítio ativo putativo absolutamente conservados. Essas proteínas homólogas provavelmente apresentam uma estrutura similar e catalisam reações dependentes de PQQ similares (Oubrie e outros, 1999 a, b, c; Oubrie A., *Biochim. Biophys. Acta* 1647 (2003) 143-151; Reddy, S., e Bruice, T.C., *J. Am. Chem. Soc.* 126 (2004) 2431-2438; Yamada, M. e outros, *Biochim. Biophys. Acta* 1647 (2003) 185-192).  
 15

Verificou-se que s-GDHs e m-GDHs bacterianas possuem seqüências bastante diferentes e diferente especificidade a substratos. Por exemplo, *A. calcoaceticus* contém duas glicose desidrogenases dependentes de PQQ diferentes, uma designada m-GDH, que é ativa in vivo, e outra  
 20 designada s-GDH, em relação à qual apenas atividade in vitro pode ser mostrada. Cleton-Jansen e outros, 1988; 1989 a, b, clonaram os genes que codificam as duas enzimas GDH e determinaram as seqüências de DNA desses ambos os genes para GDH. Não há homologia óbvia entre m-GDH e s-GDH, corroborando o fato de que m-GDH e s-GDH representam duas moléculas  
 25 completamente diferentes (Laurinavicius, V. e outros, *Biologija* (2003) 31-34).

O gene para s-GDH de *A. calcoaceticus* foi clonado em *E. coli*. Após ser produzida na célula, a s-GDH translocaliza-se através da membrana citoplasmática para o espaço periplasmático (Duine, J.A., *Energy generation and the glicose desidrogenase pathway in Acinetobacter* (Geração de energia e o caminho da glicose desidrogenase em *Acinetobacter*), in "The  
 30

- Biology of Acinetobacter*", Nova Iorque, Plenum Press (1991), pp. 295-312; Matsushita, K. e Adachi, O., *Bacterial quinoproteins glucose dehydrogenase and alcohol dehydrogenase* (Glicose desidrogenase de quinoproteínas bacterianas e desidrogenase alcoólica), in "*Principles and applications of quinoproteins*" ("Princípios e aplicações de quinoproteínas"), Nova Iorque, Marcel Dekker (1993) pp. 47-63). Como a s-GDH nativa de *A. calcoaceticus*, s-GDH recombinante expressa em *E.coli* é um homodímero, com uma molécula de PQQ e três íons cálcio por monômero (Dokter, P. e outros, *Biochem. J.* 239 (1986) 163-167; Dokter, P. e outros, *FEMS Microbiol. Lett.* 43 (1987) 195-200; Dokter, P. e outros, *Biochem. J.* 254 (1988) 131-138; Olsthoorn, A.J. e Duine, J.A., *Arch. Biochem. Biophys.* 336 (1996) 42-48; Oubrie, A. e outros, *J. Mol. Biol.* 289 (1999) 319-333; Oubrie, A. e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96 (1999) 11787-11791; Oubrie, A. e outros, *Embo J.* 18 (1999) 5187-5194). s-GDH oxida uma ampla faixa de mono e dissacarídeos às correspondentes cetonas que adicionalmente hidrolisam-se aos ácidos aldônicos, e é também capaz de doar elétrons a PMS (metossulfato de fenazina), DCPIP (2,6-diclorofenolino dofenol), WB (azul de Wurster) e ubiquinonas de cadeias curtas tais como ubiquinona Q1 e ubiquinona Q2 (Matsushita, K. e outros, *Biochem.* 28 (1989) 6276-6280; Matsushita, K. e outros, *Antonie Van Leeuwenhoek* 56 (1989) 63-72), diversos receptores artificiais de elétrons tal como metil sulfato de N-metilfenazônio (Olsthoorn, A.J. e Duine, J.A., *Arch. Biochem. Biophys.* 336 (1996) 42-48; Olsthoorn, A.J. e Duine, J.A., *Biochem.* 37 (1998) 13854-13861) e polímeros eletrocondutores (Ye, L. e outros, *Anal. Chem.* 65 (1993) 238-241). Em vista da alta atividade específica de s-GDH a glicose (Olsthoorn, A.J. e Duine, J.A., (1996), *supra*) e sua ampla especificidade a receptores artificiais de elétrons, a enzima é bem adequada a aplicações analíticas, particularmente para ser usada em (bio)sensores ou fitas de teste para determinação de glicose em aplicações diagnósticas (Kaufmann, N. e outros, *Development and evaluation of a new system for determining glucose from fresh capillary blood and heparinized blood in "Glucotrend"* (Desenvolvimento e avaliação de um novo sistema para determinação de glicose a partir de sangue capilar novo e sangue heparinizado em "Glicoten-

dência") (1997) 1-16, *Boehringer Mannheim GmbH*; Woosuck, S. e outros, *Sensors and Actuators B 100* (2004) 395-402).

Oxidação de glicose pode ser catalisada por pelo menos três grupos de enzimas bastante distintos, isto é, por glicose desidrogenases dependentes de NAD/P, por flavoproteína glicose oxidases ou por quinoproteína GDHs (Duine, J.A., *Biosens. Bioelectronics* 10 (1995) 17-23). Uma auto-oxidação bastante lenta de s-GDH reduzida foi observada, demonstrando que oxigênio é um receptor de elétrons muito pobre para s-GDH (Olsthorn e Duine, 1996). s-GDH pode doar eficientemente elétrons da quinona reduzida a mediadores tais como PMS, DCPIP, WB e ubiquinonas de cadeias curtas tais como Q1 e Q2, mas não pode doar eficientemente elétrons diretamente a oxigênio.

Fitas de teste e sensores tradicionais para monitorar nível de glicose no sangue, soro e urina, por exemplo, de pacientes diabéticos, usam glicose oxidase. A eficácia da enzima é dependente da concentração de oxigênio. Medições de glicose a diferentes altitudes com diferentes concentrações de oxigênio no ar poderão levar a resultados falsos. A maior vantagem de glicose desidrogenases dependentes de PQQ é sua independência de oxigênio. Essa importante característica é, por exemplo, discutida *in US* 6.103.509, em que algumas características de GDH ligada a membrana foram investigadas.

Uma importante contribuição ao campo tem sido o uso de s-GDH juntamente com mediadores apropriados. Métodos de ensaio e dispositivos de fitas de teste baseados em s-GDH são descritos em detalhes *in US* 5.484.708. Essa patente também contém informação detalhada sobre a configuração de ensaios e a produção de fitas de teste baseadas em s-GDH para medição de glicose. Os métodos descritos na patente, bem como nos documentos citados nela, são incluídos aqui como referência.

Outras patentes ou pedidos relativos ao campo e que compreendem informação específica sobre várias modalidades de aplicação de enzimas com atividade de glicose desidrogenase são US 5.997.817, US 6.057.120, EP 0 620 283 e JP 11-243949-A.

Um sistema comercial que utiliza s-GDH e um indicador que produz uma mudança de cor quando a reação ocorre (Kaufmann e outros, 1997, *supra*) é o sistema *Glucotrend®* distribuído por *Roche Diagnostics GmbH*.

5                    Apesar das vantagens discutidas acima no uso de uma s-GDH dependente de PQQ, na determinação de glicose, também uma desvantagem tem de ser considerada. A enzima tem particularmente um amplo espectro de substratos em comparação com m-GDH. Isto é, s-GDH oxida não só glicose, mas também diversos outros açúcares, incluindo maltose, galactose, lactose, manose, xilose e ribose (Dokter e outros, 1986 a; Oubrie A., *Biochim. Biophys. Acta* 1647 (2003) 143-151). A reatividade a açúcares diferentes de glicose poderá em certos casos prejudicar a precisão de determinação de níveis de glicose no sangue. Em particular, pacientes sob diálise peritoneal, tratados com icodextrina (um polímero de glicose), poderão conter em seus fluidos sangüíneos, por exemplo, no sangue, altos níveis de outros açúcares, especialmente de maltose (Wens, R. e outros, *Perit. Dial. Int.* 18 (1998) 603-609).

Portanto, amostras clínicas como, por exemplo, aquelas obtidas de pacientes diabéticos, especialmente de pacientes com complicações re-  
20 nais e especialmente de pacientes sob diálise, poderão conter significativos níveis de outros açúcares, especialmente maltose. Determinações de glicose em amostras obtidas desses pacientes críticos poderão ser prejudicadas por maltose (Frampton, J.E. e Plosker, G.L., *Drugs* 63 (2003) 2079-2105).

Há poucos relatos na literatura sobre tentativas para produzir s-  
25 GDHs modificadas dependentes de PQQ com especificidade a substratos alterada. Igarashi, S. e outros, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 264 (1999) 820-824, relatam que introdução de uma mutação pontual na posição Glu277 conduz a mutantes com perfil de especificidade a substratos alterada.

30                    Sode, EP 1 176 202, relata que certas substituições de aminoácidos em s-GDH leva a s-GDH mutante com afinidade aperfeiçoada por glicose. In EP 1 167 519, o mesmo autor relata s-GDH mutante com estabili-

dade aperfeiçoada. Adicionalmente, o mesmo autor relata *in* JP2004173538 outros mutantes de s-GDH com afinidade aperfeiçoada por glicose.

Kratzsch, P. e outros, WO 02/34919, relatam que a especificidade de s-GDH a glicose em comparação com outros substratos de açúcar, especialmente em comparação com maltose, pode ser aperfeiçoada por substituições de aminoácidos em certas posições de s-GDH. Central e crucial é uma substituição na posição de aminoácidos 348. Uma s-GDH mutante compreendendo, por exemplo, uma glicina na posição 348 em vez de uma treonina como presente na s-GDH do tipo selvagem apresenta uma seletividade tremendamente aperfeiçoada pelo substrato glicose quando, por exemplo, em comparação com o substrato maltose. Eles também revelam que um mutante duplo que possui substituições nas posições 348 e 428 apresenta uma especificidade ainda mais aperfeiçoada a glicose.

*In* WO 2006/008132 mostra-se que uma inserção de aminoácido entre os aminoácidos 428 e 429 de s-GDH, especialmente em combinação com uma substituição apropriada de aminoácidos na posição 348, apresenta efeitos bastante favoráveis sobre a especificidade a substratos. Mutantes que compreendem essa inserção são, por exemplo, mais específicos ao substrato glicose em comparação com o substrato maltose.

Contudo, considerando que na verdade alguns aperfeiçoamentos na especificidade a glicose encontram-se relatados, parece que tais aperfeiçoamentos freqüente e infelizmente se fazem acompanhar de desvantagens tais como, por exemplo, uma reduzida estabilidade, uma reduzida atividade e/ou uma reduzida afinidade por glicose dessa s-GDH mutada, por exemplo, tornou-se evidente que a especificidade aperfeiçoada de um mutante de s-GDH que compreende uma substituição de aminoácido na posição 348 ocorre à custa de estabilidade, afinidade e atividade desse mutante em comparação com a enzima do tipo selvagem.

Uma grande demanda e necessidade clínica existem, portanto, por formas mutantes de s-GDH adicionalmente aperfeiçoadas que apresentem uma alta especificidade a glicose e que caracterizam ao mesmo uma razoável termoestabilidade, bem como aperfeiçoamentos em atividade es-



pecífica ou afinidade por glicose, ou que caracterizam aperfeiçoamentos tanto em atividade específica quanto em afinidade por glicose.

Tratou-se de tarefa da presente invenção proporcionar novos mutantes ou variantes de s-GDH com termoestabilidade significativamente  
5 aperfeiçoada, atividade específica e afinidade por glicose em comparação com um mutante com especificidade aperfeiçoada compreendendo uma substituição na posição 348.

Verificou-se que é possível aperfeiçoar significativamente a termoestabilidade, a atividade específica e a afinidade por glicose de um mutante de s-GDH que apresenta uma substituição na posição 348 mediante  
10 seleção de mutações das posições conforme dado nas reivindicações anexas.

Devido às propriedades aperfeiçoadas das novas formas de s-GDH, progresso técnico significativo para determinações de glicose em vários campos de aplicação é possível. Os mutantes de s-GDH aperfeiçoados de acordo com esta invenção podem, por exemplo, ser usados com grande  
15 vantagem para a detecção específica ou medição de glicose em amostras biológicas.

### **Sumário da Invenção**

20 A presente invenção refere-se a mutantes de s-GDH. Um mutante de glicose desidrogenase solúvel dependente de PQQ (s-GDH; EC 1.1.5.2) é descrito com especificidade aperfeiçoada a glicose em comparação com maltose, apresentando uma substituição de treonina na posição 348 por glicina, alanina ou serina, mutante este que compreende adicionalmente pelo menos uma mutação para aperfeiçoar a estabilidade do mutante,  
25 pelo menos uma mutação para aperfeiçoar a afinidade do mutante por glicose, e opcionalmente uma ou mais mutações para aperfeiçoar adicionalmente a especificidade do mutante a glicose em comparação com maltose, e em que as posições dadas correspondem às posições de aminoácidos conhecidas da seqüência do tipo selvagem (ID SEQ NO: 2) de s-GDH de *A. calco-*  
30 *ceticus*.

Também descritos são um polinucleotídeo isolado que codifica

uma proteína mutante de s-GDH, um vetor de expressão que compreende esse polinucleotídeo isolado operavelmente ligado a uma seqüência promotora capaz de promover a expressão desse polinucleotídeo em uma célula hospedeira e uma célula hospedeira que compreende esse vetor de expressão.

Adicionalmente, é descrito um processo para produzir mutantes de s-GDH, compreendendo esse processo cultivar a célula hospedeira transfectada com um vetor de expressão apropriado sob condições adequadas para produção de um mutante de s-GDH.

Adicionalmente, é descrito um método de detecção, determinação ou medição de glicose em uma amostra, usando um mutante de s-GDH aperfeiçoado de acordo com a presente invenção, compreendendo esse aperfeiçoamento contatar com esse mutante a amostra.

Também é descrito um dispositivo para a detecção ou medição de glicose em uma amostra que compreende um mutante de s-GDH aperfeiçoado de acordo com a presente invenção e outros reagentes exigidos para essa medição.

#### **Descrição Detalhada da Invenção**

Em uma primeira modalidade, a invenção refere-se a um mutante de glicose desidrogenase solúvel dependente de PQQ (s-GDH; EC 1.1.5.2) com especificidade aperfeiçoada a glicose em comparação com maltose, apresentando uma substituição de treonina na posição 348 por glicina, alanina ou serina e em que esse mutante compreende pelo menos uma mutação para aperfeiçoar a estabilidade do mutante e adicionalmente compreende pelo menos uma mutação para aperfeiçoar a afinidade do mutante a glicose, e opcionalmente uma ou mais mutações para aperfeiçoar adicionalmente a especificidade do mutante a glicose em comparação com maltose, e em que as posições dadas correspondem às posições de aminoácidos conhecidas da seqüência do tipo selvagem (ID SEQ NO: 2) de s-GDH de *A. calcoaceticus*.

Conforme descrito in WO 02/34919, uma substituição do aminoácido na posição 348 da seqüência de s-GDH que corresponde à seqüência

do tipo selvagem isolada de *A. calcoaceticus* pode ser usada para aperfeiçoar significativamente a especificidade de s-GDH a glicose. Isso se dá porque os aperfeiçoamentos descritos no contexto da presente invenção são todos descritos e baseados em um mutante de s-GDH que compreende uma substituição de aminoácido na posição 348. Preferencialmente, o resíduo de treonina na posição 348 é substituído por um resíduo de aminoácido selecionado do grupo que consiste de alanina, glicina e serina. Em uma modalidade adicionalmente preferida, glicina ou serina é usada para substituir treonina na posição 348. A terminologia T348G é conhecida daquele habilitado no estado da técnica e indica que treonina na posição 348 é substituída por glicina.

Como discutido neste relatório, acima, dois tipos de enzima de quinoproteína completamente diferentes com atividade de glicose desidrogenase (ligada a membrana e solúvel) são agrupadas sob EC 1.1.5.2. Esses dois tipos parecem não ser relacionados um com o outro.

Para o fim deste invenção, somente a forma solúvel de GDH (s-GDH) é relevante e mutantes aperfeiçoados da mesma são discutidos aqui, abaixo.

Sabe-se no estado da técnica que a seqüência de DNA do tipo selvagem de uma glicose desidrogenase solúvel dependente de PQQ pode ser isolada de cepas de *Acinetobacter*. Mais preferido é o isolamento de s-GDH da cepa LMD 79.41 do tipo *Acinetobacter calcoaceticus*. A seqüência polipeptídica dessa s-GDH do tipo selvagem (a proteína madura) é dada em ID SEQ NO: 2 e a seqüência de DNA é dada em ID SEQ NO: 1, respectivamente. Outras cepas LMD de *Acinetobacter* poderão também ser usadas como fonte de s-GDH do tipo selvagem. Essas seqüências podem ser alinhadas com a seqüência obtida de *A. calcoaceticus* e comparações de seqüências podem ser feitas. Parece também exeqüível classificar bibliotecas de DNA de outras cepas bacterianas, como, por exemplo, descrito para K-12 de *E.coli* (Oubrie, A. e outros, *J. Mol. Biol.* 289 (1999) 319-333) e para identificar seqüências relacionadas com s-GDH em tais genomas. Essas seqüências e seqüências homólogas ainda não-identificadas poderão ser usadas

para gerar s-GDH mutantes com termoestabilidade aperfeiçoada.

As realizações da presente invenção são descritas em grandes detalhes fazendo referência a posições de aminoácidos conhecidas de ID SEQ NO: 2, a sequência do tipo selvagem de s-GDH como isolada da cepa  
5 LMD 79.41 do tipo *Acinetobacter calcoaceticus*. Posições de aminoácidos em diferentes isolados de s-GDH que correspondem a posições de ID SEQ NO: 2 são facilmente identificadas por meio de comparação apropriada de sequências.

O alinhamento múltiplo e comparação de uma sequência de s-GDH com a sequência do tipo selvagem de ID SEQ NO: 2 preferencialmente  
10 é realizada com o programa *PileUp* de *GCG Package Versão 10.2* (*Genetics Computer Group, Inc.*). *PileUp* cria um alinhamento múltiplo de sequências usando uma simplificação do método de alinhamento progressivo de Feng, D. F. e Doolittle, R. F., *J. Mol. Evol.* 25 (1987) 351-360, e as matrizes classi-  
15 ficadas em relação a resíduos de aminoácidos idênticos, similares ou diferentes são definidas conseqüentemente. Esse processo começa com o alinhamento aos pares das duas sequências mais similares, produzindo um agrupamento de duas sequências alinhadas. Esse agrupamento pode então ser alinhado com a próxima sequência mais relacionada ou agrupamento de  
20 sequências alinhadas. Dois agrupamentos de sequências podem ser alinhados por meio de uma extensão simples do alinhamento aos pares de duas sequências individuais. O alinhamento final é obtido por uma série de alinhamentos aos pares progressivos que incluem sequências e agrupamentos crescentemente dissimilares, até todas as sequências terem sido incluí-  
25 das no alinhamento aos pares final. Dessa maneira, posições de aminoácidos noutras moléculas homólogas de s-GDH podem ser facilmente identificadas como correspondendo às posições dadas para s-GDH de *A. calcoaceticus* em ID SEQ NO: 2. Isso se dá porque as posições de aminoácidos dadas aqui devem ser entendidas como posições de aminoácidos de ID SEQ  
30 NO: 2 ou como posições que correspondem a elas em outra molécula homóloga de s-GDH.

O termo "mutante" ou "variante" no sentido da presente inven-

ção refere-se a uma proteína s-GDH que comparada à sequência de aminoácidos do tipo selvagem em ID SEQ NO: 2 exibe pelo menos uma substituição, supressão ou inserção de aminoácidos.

5 O mutante de s-GDH poderá compreender outras substituições e/ou supressões e/ou inserções, contanto que um mutante s-GDH da invenção não difira em mais de 45 aminoácidos da s-GDH de ID SEQ NO: 2, por exemplo, que exibe no máximo 45 substituições, inserções ou supressões de aminoácidos no total.

10 O termo "uma mutação para aperfeiçoamento da estabilidade" refere-se a quaisquer substituições e/ou supressões e/ou inserções amino que aperfeiçoam a termoestabilidade de um mutante de s-GDH em um modelo de tensão por temperatura a curto prazo.

15 Como mencionado acima, aperfeiçoamentos na especificidade a glicose parecem ser possíveis apenas e grandemente à custa de uma estabilidade reduzida, uma afinidade reduzida a glicose ou uma atividade específica reduzida ou de quaisquer combinações dessas propriedades desvantajosas.

20 Estabilidade de acordo com a presente invenção é avaliada nesse modelo de tensão a curto prazo e a estabilidade de s-GDH como determinado nesse modelo é referida como termoestabilidade. Termoestabilidade é determinada medindo a atividade enzimática de s-GDH não-estressada e estressada de uma amostra. Ajustando a atividade não-estressada da amostra em 100%, a atividade restante após tratamento de tensão pode ser calculada em porcentagem. Para mutantes de s-GDH com  
25 especificidade aperfeiçoada a substrato, foram escolhidas condições de estressamento de 64°C por 30 minutos. Usando essas condições, a enzima do tipo selvagem apresenta cerca de 80% de sua atividade original, considerando que a maioria dos mutantes com especificidade aperfeiçoada a glicose apresenta somente 10% ou menos de sua atividade enzimática inicial após  
30 terem sido submetidos a esse modelo de tensão a curto prazo.

Preferencialmente, a mutação para aperfeiçoamento da estabilidade de uma variante de s-GDH que apresenta uma substituição de treonina

na posição 348 por glicina, alanina ou serina é uma substituição. Preferencialmente, essa substituição é selecionada do grupo que consiste de D87R; N122K; S124K; S146A ou G; L187F ou M; N267Y; V298L; T313D e L386F.

5 Também preferido, essa substituição para aperfeiçoamento da estabilidade de uma variante de s-GDH é selecionada do grupo que consiste de D87R; N122K; S124K; S146G; V298L e L386F. Em modalidades adicionalmente preferidas, combinações de duas, três ou quatro dessas substituições ou também preferencialmente de todas essas cinco substituições são usadas em uma s-GDH mutada para aperfeiçoar a estabilidade desse mu-  
10 tante.

Em uma modalidade preferida, o mutante de s-GDH de acordo com a presente invenção compreende uma arginina na posição 87 como se sabe de s-GDH do tipo selvagem (ID SEQ NO: 2) de *A. calcoaceticus*, ou em uma posição que corresponde a essa posição 87 em uma enzima homóloga.

15 Em uma modalidade adicionalmente preferida, o mutante de s-GDH de acordo com a presente invenção compreende uma lisina na posição 122 como se sabe de s-GDH do tipo selvagem (ID SEQ NO: 2) de *A. calcoaceticus*, ou em uma posição que corresponde a essa posição 122 em uma enzima homóloga.

20 Em uma modalidade adicionalmente preferida, o mutante de s-GDH de acordo com a presente invenção compreende uma lisina na posição 124 como se sabe de s-GDH do tipo selvagem (ID SEQ NO: 2) de *A. calcoaceticus*, ou em uma posição que corresponde a essa posição 124 em uma enzima homóloga.

25 Em uma modalidade adicionalmente preferida, o mutante de s-GDH de acordo com a presente invenção compreende glicina na posição 146 como se sabe de s-GDH do tipo selvagem (ID SEQ NO: 2) de *A. calcoaceticus*, ou em uma posição que corresponde a essa posição 146 em uma enzima homóloga.

30 Em uma modalidade adicionalmente preferida, o mutante de s-GDH de acordo com a presente invenção compreende leucina na posição 298 como se sabe de s-GDH do tipo selvagem (ID SEQ NO: 2) de *A. calcoa-*

*ceticus*, ou em uma posição que corresponde a essa posição 298 em uma enzima homóloga.

Em uma modalidade adicionalmente preferida, o mutante de s-GDH de acordo com a presente invenção compreende fenilalanina na posição 386 como se sabe de s-GDH do tipo selvagem (ID SEQ NO: 2) de *A. calcoaceticus*, ou em uma posição que corresponde a essa posição 386 em uma enzima homóloga.

Verifica-se que seis posições de s-GDH parecem ser particularmente importantes para obter aperfeiçoamentos significativos em termos de termoestabilidade, isto é, as posições 87, 122, 124, 146, 298 e 386. O que é de significativa relevância aqui é o fato de que se verifica que essas substituições apresentam um pronunciado efeito sobre a termoestabilidade de mutantes que anteriormente tinham sido gerados a fim de aperfeiçoar especificidade a glicose, mas à custa de uma termoestabilidade reduzida. Em uma modalidade preferida, o mutante de s-GDH de acordo com a presente invenção compreende uma arginina na posição 87, uma lisina na posição 122 e 124, uma glicina na posição 146, uma leucina na posição 298 e uma fenilalanina na posição 386 de ID SEQ NO:2, ou em uma posição que corresponde a essas posições se é usada uma s-GDH homóloga.

Em uma modalidade adicionalmente preferida, a presente invenção refere-se a um mutante de glicose desidrogenase solúvel dependente de PQQ (s-GDH; EC 1.1.5.2) com especificidade aperfeiçoada a glicose em comparação com maltose, apresentando uma substituição de treonina na posição 348 por glicina ou por alanina ou por serina, em que esse mutante adicionalmente compreende pelo menos uma mutação para aperfeiçoar a estabilidade do mutante e pelo menos uma mutação para aperfeiçoar a afinidade do mutante por glicose.

O termo "afinidade" por um substrato é bem conhecido no estado da técnica. Ele é dado em mM como chamado valor Km. Vários métodos são conhecidos no estado da técnica para determinar a afinidade de s-GDH, usando glicose ou outros açúcares como substratos, cf. Igarashi, S. e outros, *Biochem Biophys Res Commun* 264 (1999) 820.

Na classificação de novas variantes com extrato bruto de *E. coli*, um cálculo de porcentagem do valor Km foi realizado para avaliação mais rápida de clones gerados. A afinidade por glicose de mutantes de s-GDH candidatos foi calculada de acordo com a bem conhecida cinética de Michaelis-Menten.

O mutante de s-GDH de acordo com a presente invenção apresenta uma afinidade aperfeiçoada por glicose em comparação com um mutante que compreende uma substituição de treonina na posição 348 por glicina, alanina ou serina. Preferencialmente, a afinidade pelo substrato glicose é determinada conforme descrito em detalhes na seção de exemplos.

Preferencialmente, o que é referido como uma ou mais mutações para aperfeiçoamento da afinidade por glicose de um mutante de s-GDH que já compreende uma substituição de treonina na posição 348 por glicina, alanina ou serina é uma substituição de aminoácido selecionada do grupo que consiste de L110H ou Y; N229A, G ou S; Q246H, M ou N; Y333A; G339T; M341V; V349A ou G e V436P.

No caso de o aminoácido que corresponde à posição 110 da sequência do tipo selvagem (ID SEQ NO: 2) de s-GDH conhecida de *A. calcoaceticus* ser substituído em uma variante da presente invenção, prefere-se que o aminoácido leucina que ocorre naturalmente seja substituído por um aminoácido selecionado do grupo que consiste de histidina e tirosina. Mais preferencialmente, a substituição na posição 110 é por histidina.

No caso de o aminoácido que corresponde à posição 229 da sequência do tipo selvagem (ID SEQ NO: 2) de s-GDH conhecida de *A. calcoaceticus* ser substituído em uma variante da presente invenção, prefere-se que o aminoácido asparagina que ocorre naturalmente seja substituído por um aminoácido selecionado do grupo que consiste de alanina, glicina e serina. Mais preferencialmente, a substituição na posição 229 é por alanina.

No caso de o aminoácido que corresponde à posição 349 da sequência do tipo selvagem (ID SEQ NO: 2) de s-GDH conhecida de *A. calcoaceticus* ser substituído em uma variante da presente invenção, prefere-se que o aminoácido valina que ocorre naturalmente seja substituído por um



aminoácido selecionado do grupo que consiste de alanina e glicina. Mais preferencialmente, a substituição na posição 349 é por glicina.

Também preferencialmente, a mutação para aperfeiçoamento da afinidade por glicose é selecionada do grupo que consiste de L110H,  
5 Q246H; G339T; M341V, V349G e V436P.

Também preferencialmente essa substituição para aperfeiçoamento da afinidade por glicose é selecionada de Q246H; G339T; M341V e V349G. Uma s-GDH preferida de acordo com a presente invenção compreende duas ou três dessas substituições ou todas essas quatro substituições.

10 Em uma modalidade adicionalmente preferida, o mutante de s-GDH acima descrito com especificidade aperfeiçoada a glicose em comparação com maltose, apresentando uma substituição de treonina na posição 348 por glicina, alanina ou serina e compreendendo pelo menos uma mutação para aperfeiçoar a estabilidade, adicionalmente compreende uma ou  
15 mais mutações para aperfeiçoar a especificidade do substrato do mutante a glicose em comparação com maltose.

Para certas aplicações, a especificidade do substrato de um mutante de s-GDH com especificidade aperfeiçoada a glicose em comparação com maltose, apresentando uma substituição de treonina na posição 348 por  
20 glicina, alanina ou serina, poderá, todavia, não ser suficiente para certas aplicações de rotina.

Em certas modalidades, poderá ser exigido gerar um mutante de s-GDH que além da mutação na posição 348 discutida acima compreende uma ou mais mutações adicionais para aperfeiçoar adicionalmente  
25 a especificidade do mutante a glicose em comparação com maltose.

O termo "especificidade do substrato" ou "especificidade" é bem conhecido daquele habilitado no estado da técnica.

A fim de calcular a especificidade do substrato ou reatividade cruzada, uma maneira fácil é ajustar a atividade medida com glicose como  
30 substrato em 100 % e comparar com o valor da glicose a atividade medida com outro açúcar selecionado. Algumas vezes, a fim de não ser redundante, simplesmente o termo especificidade é usado sem fazer referência especial

a glicose, por um lado, e a outro substrato de açúcar selecionado, por outro.

O especialista no campo, entenderá que comparação de atividades enzimáticas é realizada melhor sob concentrações equimolares das moléculas do substrato investigadas usando condições de ensaio bem definidas. De outro modo, correções de diferenças nas concentrações têm de ser efetuadas.

Condições de ensaio padronizadas e bem definidas têm de ser escolhidas a fim de avaliar (aperfeiçoamentos na) especificidade do substrato. A atividade enzimática de s-GDH a glicose como substrato, bem como a outros substratos de açúcar selecionados, é medida como descrito na seção Exemplos.

Com base nas medições de atividade enzimática a glicose ou a maltose, respectivamente, reatividade cruzada (e seu aperfeiçoamento) é avaliada.

A reatividade (cruzada) de s-GDH a maltose em porcentagem é calculada como

Reatividade cruzada [%] = (atividade de maltose/atividade de glicose) x 100%.

Reatividade (cruzada) a maltose de s-GDH do tipo selvagem de acordo com a fórmula acima foi determinada como cerca de 105% (ver WO 02/34919).

Especificidade é calculada de acordo a seguinte fórmula:

$$\text{especificidade} = \frac{\text{atividade de mutante a glicose}}{\text{atividade de mutante a maltose}} \times \frac{\text{atividade do tipo selvagem a maltose}}{\text{atividade do tipo selvagem a glicose}}$$

Aperfeiçoamentos na especificidade de um novo mutante de s-GDH são reconhecidos como valores menores no cálculo acima, em comparação com um mutante de s-GDH com especificidade aperfeiçoada para glicose em comparação com maltose, apresentando uma substituição de treonina na posição 348 por glicina, alanina ou serina.

Como entenderá aquele habilitado no estado da técnica, os números absolutos dependerão do número e espécie de mutações já presentes em um mutante. O número e espécie de mutações já presentes em um

mutante poderá ser denominado base do mutante. Qualquer nova mutação é melhor comparada diretamente com a base do mutante.

Preferencialmente, a mutação para aperfeiçoar adicionalmente a especificidade do substrato a glicose em comparação com maltose é uma substituição de aminoácido selecionada do grupo que consiste de Q145P; D163G ou N; Q164F; L169F; Y171G; I208L ou V; T224I; E245D; G276S; A294D ou E; V300A, S, N, Y ou I; T307G; T323V; A354Y, E ou L; R378I, M, A ou D; N428P e inserção 429 P. O termo "inserção 429" é usado para indicar que entre a posição 428 e a posição 429 de ID SEQ NO:2 é introduzida uma prolina.

No caso de o aminoácido que corresponde à posição 169 da sequência do tipo selvagem de s-GDH conhecida de *A. calcoaceticus* (ID SEQ NO: 2) ser substituído em uma variante da presente invenção, prefere-se que o aminoácido leucina que ocorre naturalmente seja substituído por fenilalanina, tirosina ou triptofano. Mais preferencialmente, a substituição na posição 169 é por fenilalanina.

No caso de o aminoácido que corresponde à posição 171 da sequência do tipo selvagem de s-GDH conhecida de *A. calcoaceticus* (ID SEQ NO: 2) ser substituído em uma variante da presente invenção, prefere-se que o aminoácido tirosina que ocorre naturalmente seja substituído por um aminoácido selecionado do grupo que consiste de alanina, metionina, glicina. Mais preferencialmente, a substituição na posição 171 é por glicina.

No caso de o aminoácido que corresponde à posição 245 da sequência do tipo selvagem de s-GDH conhecida de *A. calcoaceticus* (ID SEQ NO: 2) ser substituído em uma variante da presente invenção, prefere-se que o aminoácido ácido glutâmico que ocorre naturalmente seja substituído por ácido aspártico, asparagina ou glutamina. Mais preferencialmente, a substituição na posição 245 é por ácido aspártico.

No caso de o aminoácido que corresponde à posição 341 da sequência do tipo selvagem de s-GDH conhecida de *A. calcoaceticus* (ID SEQ NO: 2) ser substituído em uma variante da presente invenção, prefere-se que o aminoácido metionina que ocorre naturalmente seja substituído por

valina, alanina, leucina ou isoleucina. Mais preferencialmente, a substituição na posição 341 é por valina.

Verifica-se também que é possível aperfeiçoar adicionalmente especificidade do substrato de uma variante de s-GDH que já compreende uma substituição na posição 348 por meio de inserção de um aminoácido, preferencialmente uma prolina, entre as posições 428 e 429.

Também preferida, a mutação adicional para aperfeiçoar a especificidade do substrato a glicose em comparação com maltose é selecionada do grupo que consiste de L169F; Y171G; E245D; N428P e inserção 429P.

Preferencialmente, a mutação adicional para aperfeiçoar a especificidade do substrato a glicose em comparação com maltose é selecionada do grupo que consiste de L169F; Y171G; E245D; e N428P. Em modalidades adicionalmente preferidas, combinações de duas, três ou todas essas quatro substituições são usadas para aperfeiçoar a especificidade do substrato desse mutante a glicose em comparação com maltose. Também preferida, a mutação adicional para aperfeiçoar a especificidade do substrato a glicose em comparação com maltose é selecionada do grupo que consiste de L169F; Y171G; E245D; e inserção 429P. Em modalidades adicionalmente preferidas, combinações de duas ou todas essas três substituições são usadas juntamente com a inserção 429 P em uma s-GDH mutada para aperfeiçoar a especificidade do substrato desse mutante a glicose em comparação com maltose.

Como descrito *in* WO 02/34919 e WO 2006/008132, respectivamente, uma substituição na posição 428, por meio da qual asparagina é substituída por prolina ou uma inserção do aminoácido prolina entre as posições 428 e 429, respectivamente, aperfeiçoa adicionalmente a especificidade de um mutante de s-GDH que já compreende uma substituição na posição 348. Em uma modalidade adicionalmente preferida, a presente invenção, portanto, refere-se a um mutante de glicose desidrogenase solúvel dependente de PQQ (s-GDH; EC 1.1.5.2) com especificidade aperfeiçoada a glicose em comparação com maltose, apresentando uma substituição de

treonina na posição 348 por glicina, por alanina ou por serina, e uma substituição na posição 428, por meio da qual asparagina é substituída por prolina ou uma inserção do aminoácido prolina entre as posições 428 e 429, em que esse mutante adicionalmente compreende pelo menos uma mutação para  
5 aperfeiçoar a estabilidade do mutante, pelo menos uma mutação para aperfeiçoar a atividade específica do mutante e opcionalmente uma ou mais mutações para aperfeiçoar a afinidade do mutante por glicose, e/ou uma ou mais mutações para aperfeiçoar adicionalmente a especificidade do mutante a glicose em comparação com maltose, e em que as posições dadas corres-  
10 pondem às posições de aminoácidos conhecidas da seqüência do tipo selvagem (ID SEQ NO: 2) de s-GDH de *A. calcoaceticus*.

Em outra modalidade, a presente invenção refere-se a um mutante de glicose desidrogenase solúvel dependente de PQQ (s-GDH; EC 1.1.5.2) com especificidade aperfeiçoada a glicose em comparação com  
15 maltose, apresentando uma substituição de treonina na posição 348 por glicina, alanina ou serina, em que esse mutante adicionalmente compreende pelo menos uma mutação para aperfeiçoar a estabilidade do mutante e pelo menos uma mutação para aperfeiçoar a atividade específica do mutante.

O termo "atividade específica" é bem conhecido do estado da técnica. É usado para descrever a atividade enzimática por quantidade de  
20 proteína. Vários métodos são conhecidos no estado da técnica para determinar atividade específica de uma s-GDH, usando glicose ou outros açúcares como substratos; ver, por exemplo, Igarashi, S. e outros, *Biochem Biophys Res Commun* 264 (1999) 820. O mutante de s-GDH de acordo com a  
25 presente invenção apresenta uma atividade específica aperfeiçoada em relação ao substrato glicose em comparação com um mutante que compreende uma substituição de treonina na posição 348 por glicina, alanina ou serina.

Preferencialmente, a mutação para aperfeiçoar a atividade específica a glicose é uma substituição de aminoácido selecionada do grupo  
30 que consiste de H30F ou R; A301G ou S e A302S ou T.

Como aquele habilitado no estado da técnica entenderá, é pos-

- sível realizar substituições de aminoácidos, por exemplo, mutações silenciosas, que não influenciam as propriedades de s-GDH em um grau significativo. A variante de acordo com a presente invenção não terá, no entanto, mais de 45 trocas de aminoácidos em comparação com ID SEQ NO:2. Preferencialmente, a variante compreenderá 20 ou menos substituições de aminoácidos, mais preferencialmente, apenas 15 substituições de aminoácidos, ou substituições menores estarão presentes.

- Algumas variantes específicas de s-GDH de acordo com a presente invenção são dadas na seção Exemplos. Variantes preferidas de s-GDH com baixa interferência em glicose e características aperfeiçoadas em relação a termoestabilidade e afinidade de substrato por glicose compreendem os mutantes com as seguintes substituições:

N122K+L169F+Y171G+E245D+M341V+T348G+ins429P;  
 N122K+S124K+L169F+Y171G+E245D+M341V+T348G+ins429P;  
 N122K+S124K+L169F+Y171G+E245D+M341V+T348G+L386F+ins429P;  
 N122K+S124K+L169F+Y171G+E245D+Q246H+M341V+T348G+L386F +ins429P;  
 D87R+N122K+S124K+S146G+L169F+Y171G+E245D+Q246H+V298L+  
 M341V+T348S+L386F+ins429P;  
 D87R+N122K+S124K+S146G+L169F+Y171G+E245D+Q246H+V298L+  
 +G339T+M341V+T348G+L386F+ins429P;  
 D87R+N122K+S124K+S146G+L169F+Y171G+E245D+Q246H+V298L+  
 M341V+T348S+L386F+ins429P+V436P;  
 D87R+N122K+S124K+S146G+L169F+Y171G+E245D+Q246H+V298L+  
 M341V+T348S+V349G+A354T+L386F+ins429P;  
 D87R+L110H+N122K+S124K+S146G+L169F+Y171G+E245D+Q246H+V298L+  
 M341V+T348S+L386F+ins429P.

- Numerosas possibilidades são conhecidas no estado da técnica para produzir proteínas mutantes. Com base nas importantes verificações da presente invenção que descrevem a importância crítica de certos resíduos para aperfeiçoar a termoestabilidade, a afinidade por glicose e a especificidade do substrato de um mutante s-GDH, aquele habilitado no estado da técnica pode agora facilmente produzir adicionalmente variantes apropriadas

de s-GDH que abrigam essas e outras modificações favoráveis. Essas variantes, por exemplo, podem ser obtidas pelos métodos conhecidos como mutagenese aleatória (Leung, D. W. e outros, *Technique 1* (1989) 11-15) e/ou mutagenese orientada a sítios (Hill, D. E. e outros, *Methods Enzymol.* 155 (1987) 558-568). Um método alternativo para produzir uma proteína com as propriedades desejada é proporcionar constructos quiméricos, que contêm elementos de seqüências de pelo menos duas diferentes fontes, ou sintetizar completamente um gene apropriado para s-GDH. Esses procedimentos conhecidos no estado da técnica poderão ser usados em combinação com a informação descrita na presente invenção para proporcionar mutantes ou variantes de s-GDH que compreendem, por exemplo, substituições adicionais de aminoácidos em combinação com com importância crítica conhecida de uma substituição na posição 348 de ID SEQ NO: 2.

Uma variante de s-GDH de acordo com a presente invenção pode, por exemplo, ser produzida iniciando de um gene para s-GDH conforme isolado de cepa LMD 79.41 do tipo *Acinetobacter calcoaceticus*, bem como começando de uma seqüência homóloga. No contexto deste pedido, o termo "homólogo" significa compreender uma seqüência de aminoácidos de s-GDH com pelo menos 90% de identidade em comparação com ID SEQ NO: 2. Em outras palavras, após alinhamento apropriado usando o programa *PileUp*, pelo menos 90% dos aminoácidos dessa s-GDH homóloga são idênticos aos aminoácidos descritos em ID SEQ NO: 2.

Entender-se-á que variações de DNA e de seqüências de aminoácidos existem naturalmente, ou poderão ser intencionalmente introduzidas usando métodos conhecidos no estado da técnica. Essas variações poderão resultar em até 10% de diferenças em aminoácidos na seqüência geral, devido a supressões, substituições, inserções, inversões ou adições de um ou mais resíduos de aminoácidos nessa seqüência em comparação com ID SEQ NO: 2. Essas substituições de aminoácidos poderão ser realizadas, por exemplo, com base em similaridade em polaridade, carga, solubilidade, hidrofobicidade, hidrofiliçidade e/ou a natureza anfipática dos resíduos envolvidos., por exemplo, aminoácidos negativamente carregados incluem áci-

do aspártico e ácido glutâmico; aminoácidos carregados positivamente incluem lisina e arginina; aminoácidos com grupos cabeça polares não-carregados ou grupos cabeça não-polares não-carregados que apresentam valores de hidrofiliicidade similares incluem o seguinte: leucina, isoleucina, valina, glicina, alanina, asparagina, glutamina, serina, treonina, fenilalanina e tirosina. Outras variações contempladas incluem sais e ésteres dos polipeptídeos acima mencionados, bem como precursores dos polipeptídeos acima mencionados, por exemplo, precursores que apresentam uma substituição no término N tais como metionina, N-formilmetionina, usadas como seqüências condutoras. Essas variações poderão ser efetuadas sem necessariamente se afastar do escopo e do espírito da presente invenção.

De acordo com procedimentos conhecidos no estado da técnica ou de acordo com os procedimentos fornecidos na seção de exemplos, é possível obter seqüências de polinucleotídeos que codificam qualquer dos mutantes de s-GDH como discutido acima. A invenção, portanto, compreende também seqüências isoladas de polinucleotídeos que codificam proteínas mutantes de s-GDH de acordo com a presente invenção como descrito acima.

A presente invenção adicionalmente inclui um vetor de expressão que compreende uma seqüência de ácidos nucleicos de acordo com a presente invenção ligada operavelmente a uma seqüência promotora capaz de dirigir sua expressão em uma célula hospedeira.

A presente invenção adicionalmente inclui um vetor de expressão que compreende uma seqüência de ácidos nucleicos de acordo com a presente invenção ligada operavelmente a uma seqüência promotora capaz de dirigir sua expressão em uma célula hospedeira. Vetores preferidos são plasmídeos tal como pACSGDH mostrado nas Figuras 2 e 3.

Vetores de expressão úteis na presente invenção tipicamente contêm uma origem de replicação, uma resistência a antibióticos para seleção, um promotor para expressão e toda ou parte da variante genética de s-GDH. Os vetores de expressão poderão também incluir outras seqüências de DNA conhecidas no estado da técnica, tais como seqüências sinalizado-



ras (para melhor enovelamento, transporte para o periplasma ou secreção), indutores para melhor modulação da expressão ou sítios de clivagem para clonagem.

As características do vetor de expressão selecionado têm de ser  
5 compatíveis com a célula hospedeira, que será empregada, por exemplo, quando se realiza clonagem em um sistema de células de *E. coli*, o vetor de expressão deve conter promotores isolados do genoma de células de *E. coli* (por exemplo, *lac* ou *trp*). Origens de replicação adequadas tal como a origem de replicação plasmídeo ColE1 podem ser usadas. Promotores adequados incluem, por exemplo, *lac* e *trp*. Prefere-se também que o vetor de  
10 expressão inclua a sequência que codifica um marcador de seleção tal como um gene de resistência a antibióticos. Como marcadores selecionáveis, resistência a ampicilina ou resistência a canamicina poderão ser convenientemente empregadas. Todos esses materiais são conhecidos no estado da  
15 técnica e são comercialmente disponíveis.

Vetores de expressão adequados que contêm as seqüências desejadas de codificação e controle poderão ser construídos utilizando técnicas padrões de DNA recombinante conhecidas no estado da técnica, muitas das quais são descritas *in* Sambrook e outros, *in* "Molecular Cloning: A  
20 Laboratory Manual" ("Clonagem Molecular: Manual de Laboratório") (1989) Cold Spring Harbor, Nova Iorque, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

A presente invenção adicionalmente refere-se a células hospedeiras que contêm um vetor de expressão que compreende uma seqüência de DNA que codifica todo ou parte da s-GDH mutante. As células hospedeiras preferencialmente contêm um vetor de expressão que compreende toda  
25 ou parte de uma das seqüências de DNA que codificam uma s-GDH mutante que apresenta uma ou mais mutações mostradas nos Exemplos 2-8. Células hospedeiras adequadas incluem, por exemplo, HB101 de *E. coli* (ATCC 33694) disponível pela Promega (2800 Woods Hollow Road, Madison, WI, EUA), XL1-Blue MRF<sup>+</sup> disponível pela Stratagene (11011 North Torrey Pine  
30 Road, La Jolla, CA, EUA) e similares.

Vetores de expressão poderão ser introduzidos em células hos-

pedeiras por meio de vários métodos conhecidos no estado da técnica. Por exemplo, transformação de células hospedeiras com vetores de expressão pode ser realizada por meio de método de transformação com protoplastos mediada por polietilenoglicol (Sambrook e outros, 1989, *supra*). Entretanto, outros métodos para introduzir vetores de expressão em células hospedeiras, por exemplo, eletroporação, injeção bolística ou fusão de protoplastos, podem também ser empregados.

Uma vez que um vetor de expressão contendo uma variante de s-GDH tenha sido introduzido em uma célula hospedeira apropriada, a célula hospedeira poderá ser cultivada sob condições que permitem expressão das variantes desejadas de s-GDH. Células hospedeiras que contêm o vetor de expressão desejado com a sequência de DNA que codifica toda ou parte da s-GDH mutante podem ser facilmente identificadas por, isto é, seleção anti-biótica. A expressão das variantes de s-GDH pode ser identificada por diferentes métodos tais como medição de produção de transcriptos de mRNA de s-GDH, detecção do produto genético imunologicamente ou detecção da atividade enzimática do produto genético. Preferencialmente, é aplicado um ensaio enzimático.

A presente invenção também ensina a geração e classificação de mutantes de s-GDH. Mutagênese aleatória e mutagênese por saturação são realizadas como se sabe no estado da técnica. Variantes são classificadas em relação a termoestabilidade (atividade sem tratamento de tensão térmica comparada com atividade remanescente após tratamento de tensão térmica). As condições de ensaio escolhidas são adaptadas de modo a assegurar que as esperadas pequenas acentuações realizadas, por exemplo, por uma única substituição de aminoácido, possam ser medidas. Uma modalidade preferida de seleção ou classificação de mutantes apropriados é dada no Exemplo 3. Qualquer mudança ou aperfeiçoamento em comparação com a enzima de partida (mutante ou do tipo selvagem) pode ser claramente detectada.

Deve-se, naturalmente, entender que nem todos os vetores de expressão e sequências reguladoras de DNA funcionariam igualmente bem

para expressar as seqüências de DNA da presente invenção. Nem todas as células hospedeiras funcionariam igualmente bem com o mesmo sistema de expressão. No entanto, aquele habilitado no estado da técnica faria uma seleção apropriada entre os vetores de expressão, seqüências reguladoras de DNA e células hospedeiras usando a orientação proporcionada aqui sem experimentação indevida.

A invenção também se refere a um processo para produzir variantes de s-GDH da presente invenção, o qual compreende cultivar uma célula hospedeira da invenção sob condições adequadas para produção da s-GDH mutante da invenção. Para células hospedeiras bacterianas, condições de cultura típicas são meio líquido contendo fontes de carbono e de nitrogênio, o agente antibiótico e o agente de indução apropriados (dependendo do vetor de expressão usado). Antibióticos apropriados típicos incluem ampicilina, canamicina, cloranfenicol, tetraciclina e similares. Agentes de indução típicos incluem IPTG, glicose, lactose e similares.

Prefere-se que os polipeptídeos da presente invenção sejam obtidos por produção em células hospedeiras que expressam uma seqüência de DNA que codifica a s-GDH mutante. Os polipeptídeos da presente invenção poderão também ser obtidos por tradução *in vitro* do mRNA codificado por uma seqüência de DNA que codifica a s-GDH mutante. Por exemplo, as seqüências de DNA poderão ser sintetizadas conforme descrito acima e introduzidas em um vetor de expressão adequado, que, por sua vez, poderá ser usado em um sistema transcrição/tradução *in vitro*.

Um vetor de expressão que compreende um polinucleotídeo isolado como definido e descrito acima operavelmente ligado a uma seqüência promotora capaz de promover sua expressão em um sistema de síntese de peptídeos sem células representa outra modalidade preferida da presente invenção.

Os polipeptídeos produzidos, por exemplo, por procedimentos como descrito acima poderão então ser isolados e purificados usando várias técnicas de purificação de proteína de rotina. Por exemplo, procedimentos cromatográficos tais como cromatografia de troca iônica, cromatografia de

filtração em gel e cromatografia de afinidade poderão ser empregados.

Uma vez que as maiores aplicações das variantes aperfeiçoadas de s-GDH desta invenção é para uso em fitas de teste para monitorar o nível de glicose no sangue em pacientes diabéticos. A insensibilidade de glicose desidrogenase dependente de PQQ a oxigênio é, como discutido acima, uma grande vantagem sobre glicose oxidase. A interferência devido a, por exemplo, maltose, galactose e/ou outros açúcares relacionados que poderão estar presentes em uma amostra a ser analisada pode agora ser significativamente reduzida usando as novas variantes de s-GDH que apresentam tanto termoestabilidade aperfeiçoada quanto especificidade aperfeiçoada a glicose. Naturalmente, muitas espécies de amostras poderão ser investigadas. Fluidos corporais tais como soro, plasma, fluido intestinal ou urina são fontes preferidas para tais amostras.

A invenção também compreende um método de detecção, determinação ou medição de glicose em uma amostra usando um mutante de s-GDH de acordo com a presente invenção. É especialmente preferido que o método aperfeiçoado para detecção de glicose em uma amostra seja caracterizado pelo fato de que essa detecção, determinação ou medição de glicose seja realizada utilizando um sensor ou dispositivo de fita de teste.

Também dentro do escopo da presente invenção está um dispositivo para a detecção ou medição de glicose em uma amostra que compreende um mutante de s-GDH de acordo com esta invenção, bem como outros reagentes exigidos para essa medição.

As variantes de s-GDH com termoestabilidade aperfeiçoada desta invenção podem também ser usadas com grande vantagem em biossensores (D'Costa, E.J. e outros, *Biosensors* 2 (1986) 71-87; Laurinavicius, V. e outros, *Analytical Letters* 32 (1999) 299-316; Laurinavicius, V. e outros, *Monatshefte fuer Chemie* 130 (1999) 1269-1281; Woosuck, S. e outros, *Sensors e Actuators B* 100 (2004) 395-402) para monitoramento *online* de glicose em uma amostra ou um reator. Com essa finalidade, as variantes de s-GDH podem, por exemplo, ser usadas para revestir um eletrodo de vidro insensível a oxigênio com um complexo de ósmio contendo uma rede de

epóxi condutora redox (Ye e outros, 1993, *supra*) para determinação mais precisa da concentração de glicose.

Nos exemplos seguintes, todos os reagentes, enzimas de restrição e outros materiais foram obtidos de *Roche Diagnostics Germany*, a menos que outras fontes comerciais sejam especificadas, e usados de acordo com as instruções dadas pelos fornecedores. Operações e métodos empregados para a purificação, caracterização e clonagem de DNA são bem conhecidos no estado da técnica (Ausubel, F. e outros, in "*Current protocols in molecular biology*" ("Protocolos correntes em biologia molecular") (1994) *Wiley Verlag*) e podem ser adaptados, conforme exigido, por aquele habilitado no estado da técnica.

Os exemplos seguintes ilustram adicionalmente a presente invenção. Esses exemplos não pretendem limitar o escopo da presente invenção, mas proporcionam adicionalmente compreensão da invenção.

Os exemplos seguintes, listagem de seqüências e figuras são proporcionados para ajudar na compreensão da presente invenção, cujo verdadeiro escopo é apresentado nas reivindicações anexas. Entende-se que modificações podem ser efetuadas nos procedimentos apresentados sem se afastar do espírito da invenção.

## 20 **Descrição das Figuras**

**Figura 1:** Seqüências protéicas de S-GDH de *A. calcoaceticus* dependente de PQQ (alto) e s-GDH de *A. baumannii* (fundo) alinhadas de acordo com homologia de seqüências.

**Figura 2:** Ilustração de vetor pACSGDH referido no Exemplo 1 contendo as seqüências do tipo selvagem ou mutadas de DNA, respectivamente, de glicose desidrogenase solúvel dependente de PQQ.

**Figura 3:** Seqüências de nucleotídeos (DNA) do vetor pACSGDH referido no Exemplo 1 contendo a seqüência do tipo selvagem de DNA de glicose desidrogenase solúvel dependente de PQQ.

## 30 **Exemplo 1**

**Clonagem e expressão da glicose desidrogenase solúvel do tipo selva-**

### gem dependente de PQQ de *A. calcoaceticus* em *E. coli*

O gene para s-GDH foi isolado de cepa LMD 79.41 de *Acinetobacter calcoaceticus* de acordo com procedimentos padrões. O gene do tipo selvagem para s-GDH foi subclonado em um plasmídeo contendo o promotor *mgI* para expressão ajustável (cf. Pedido de Patent WO 88/09373). O novo constructo foi chamado pACSGDH (ver Figuras 2 e 3, bem como ID SEQ NO: 3). Os plasmídeos recombinantes foram introduzidos em um organismo hospedeiro selecionado do grupo de *E.coli*. Esses organismos foram então cultivados sob condições apropriadas e colônias mostrando atividade selecionada a s-GDH.

O plasmídeo pACSGDH foi isolado de uma cultura de 200 ml da noite para o dia do clone mencionado acima usando *QIAGEN Plasmid Maxi Kit* (Qiagen) de acordo com o protocolo do fabricante. O plasmídeo foi ressuspenso em 1 ml de água bidestilada. A concentração do plasmídeo foi determinada usando um fotômetro *Beckman DU 7400*.

O rendimento foi de 600 µg. Em seguida, a qualidade do plasmídeo foi determinada por eletroforese em gel de agarose.

### Exemplo 2

#### Generação de T348G mutante e T348S mutante

Como padrões de partida para a geração de variantes adicionalmente aperfeiçoadas, foi produzida s-GDH mutada com as mutações T348G ou T348S, respectivamente. Esses mutantes de s-GDH foram escolhidos porque se sabe que eles apresentam especificidade aperfeiçoada do substrato a glicose em comparação com o substrato maltose (ver WO 02/34919).

O *Kit* de Mutagênese Orientada a Sítios *QuickChange* (*Stratagene*, Cat. 200518) foi usado para substituir a treonina na posição 348 por uma glicina ou uma serina. Os *primers* apropriados foram projetados.

O *primer* 5'- e o *primer* 3' usados para mutagenêse eram complementares um ao outro e continham o códon modificado pela troca de treonina por glicina (ACA por GGG) ou de treonina por serina (ACA to TCA) em uma posição central. Esses nucleotídeos foram flanqueados por 12 a 16 nu-

cleotídeos em cada extremidade. As seqüências dos nucleotídeos eram idênticas à fita de DNA sentido e anti-sentido que flanqueiam o códon pela troca de aminoácidos. Em vez dos códons ACA = treonina pela fita sentido e TGT pela fita anti-sentido, respectivamente, os *primers* continham GGG = glicina ou TCA = serina, respectivamente, pela fita sentido, e CCC = glicina ou AGT = serina, respectivamente, pela fita anti-sentido. A fita sentido e a fita anti-sentido pela troca T348G são dadas como IDs SEQs NOs: 3 e 4, respectivamente.

CATTTGCTGG CCAGGGGTTG CACCGTCAT (=ID SEQ NO: 4)

10 ATGACGGTGC AACCCCTGGC CAGCAAATG (=ID SEQ NO: 5)

A reação RCP e a digestão de *DpnI* foram realizadas de acordo com o manual. Após isso, 1 µl de amostra foi usado para a eletroporação de células XL-MRF'. Eletroporação foi obtida com 2,5 KV em *cuvettes* de 0,2 cm utilizando um pulsador de *E. coli BioRad (BioRad)*. Após crescimento em 15 1 ml de LB a 37°C por uma hora, bactérias foram plaqueadas sobre meio "4 x lêvedo" (20 g de extrato de lêvedo + 5 g de NaCl, pH 7,0 a 1 l, água dest.)-placas de ampicilina ágar (100 µg / ml ampicilina) e crescidas da noite para o dia a 37°C. Os clones de s-GDH mutada foram examinados usando o método de classificação seguinte.

### 20 **Exemplo 3**

#### **Classificação**

As colônias mutantes na placa de ágar descrita acima foram recolhidas em placas de microtitulação (MTPs) contendo 200 µl de meio "4 x lêvedo"-ampicilina por poço e incubadas da noite para o dia a 37°C. Essas 25 placas são chamadas placas-mestras.

De cada placa-mestra, 5 µl de amostra/poço foram transferidos para uma MTP contendo 5 µl por poço de B (B = Reagente de Extração de Proteína Bacteriana; Pierce No. 78248), para ruptura celular, e 240 µl de 0,0556 mM de pirrolquinolina quinona (PQQ); 50 mM de Hepes; 15 mM de 30 CaCl<sub>2</sub> pH 7,0/poço para ativação de s-GDH, foram adicionados. Para completar a formação da holoenzima, a MTP foi incubada a 25°C por 2 horas e a 10°C da noite para o dia. Essa placa é chamada placa de trabalho.

Da placa de trabalho, 4 x 10 µl de amostra por poço foram transferidos para quatro MTPs vazias. Em seguida, a primeira alíquota foi testada com glicose sob concentração padrão (isto é, 30 mM), a segunda, com uma concentração reduzida de glicose (1,9 mM em vez de 30 mM), a terceira, com maltose como substrato, e a quarta, submetida a tensão por 30 min a 64°C antes de testar essa alíquota similarmente à primeira alíquota. Tudo selecionado, outras moléculas de açúcar foram usadas em concentração padrão equimolar, isto é, a 30 mM. Em todos os ensaios, foram aplicados 90 µl de solução mediadora (ver Exemplo 8) já contendo o açúcar a ser analisado.

O dE/min foi calculado e o valor usando 30 mM de glicose como substrato foi ajustado em 100% de atividade. O valor obtido com o outro açúcar foi comparado com o valor da glicose e calculado em porcentagem de atividade (por exemplo, para maltose como:  $(\text{dE/min de maltose} / \text{dE de glicose}) * 100$ ). Essa atividade é equivalente à reatividade cruzada da enzima (variante). Nas Tabelas "M/G" seguintes, é dada a reatividade cruzada de s-GDH com maltose (M) como substrato em comparação com glicose (G) como substrato.

O valor obtido com 1,9 mM de glicose foi comparado com o valor de 30 mM de glicose e calculado em porcentagem relativa de atividade  $((\text{dE/min de 1,9 mM de glicose} / 30 \text{ mM de glicose}) * 100)$ . Isso fornece um valor em % que é um indicador indireto do valor de  $K_m$  para a variante analisada. De acordo com esse cálculo, um valor percentual maior indica um valor de  $K_m$  menor (= melhor).



**Tabela 1: Características básicas dos mutantes T348G e T348S em comparação com s-GDH do tipo selvagem (WT)**

Enzima	M/G sob 30 mM de açúcar em %	% de atividade relativa de 1,9 mM / 30 mM de glicose	Estabilidade, 30 min, 64°C	Troca de Aminoácido (AA)
WT	105 %	70%	80 %	-
Mutante A	22 %	25 %	40 %	T348G
Mutante A'	50 %	35 %	50 %	T348S

#### **Exemplo 4**

##### **Seqüenciamento de uma s-GDH mutante**

- 5 O método é exemplificado por T348G de s-GDH. O seqüenciamento detalhado abaixo pode também ser usado para seqüenciamento de outros mutantes de s-GDH.

Os seguintes *primers* foram usados para seqüenciamento de um mutante de s-GDH:

- 10 Fita sentido: 5'-TTA ACG TGC TGA ACA GCC GG-3' (= ID SEQ NO:6)  
Fita anti-sentido: 5'-ATA TGG GTA AAG TAC TAC GC -3' (= ID SEQ NO: 7)

- Os plasmídeos contendo o gene para s-GDH mutante T348G, mutante este que apresenta cerca de 22% de reatividade cruzada maltose/glicose, e T348S de s-GDH, mutante este que apresenta 50% de reatividade cruzada maltose/glicose, respectivamente, foram isolados (*Kit de Isolamento de Plasmídeos Altamente Puros, Roche Diagnostics GmbH, No.1754785*) e seqüenciados usando um *Kit de Seqüenciamento Terminador com Corante ABI Prism* e os seqüenciadores ABI 3/73 e 3/77 (*Amer-sham Pharmacia Biotech*).

- 20 O seqüenciamento confirmou que as mutações desejadas em DNA e no nível de aminoácidos foram obtidas em ambos os mutantes. Isso resultou em uma troca de T por G ou por S, respectivamente, na posição 348. Nenhuma mutação adicional nos dois genes foi verificada.

#### **Exemplo 5**

- 25 **Mutantes adicionais de s-GDH obtidos por mutagênese por saturação com base em T348G (mutante A) e T348S (mutante A')**

Posições de aminoácidos candidatos eram conhecidos dos inventores a partir de estudos anteriores conduzidos por eles. Aquelas posi-

ções de aminoácidos candidatos suspeitas ou sabidas influenciar características relevantes de s-GDH tais como termoestabilidade, especificidade a substrato ou afinidade por glicose foram analisadas individualmente com base em T348G (mutante A) ou com base em T348S (mutante A').

5 Mutagênese por saturação foi realizada em relação a posições únicas de aminoácidos a fim de avaliar que efeito essa única substituição de aminoácidos poderia apresentar sobre o mutante T348G ou T348S, respectivamente.

O *Kit* de Mutagênese Orientada a Sítios *QuickChange* (*Stratagene*, Cat. 200518) foi usado para substituir sucessivamente aminoácidos do tipo selvagem nas posições 87, 110, 122, 124, 145, 146, 169, 171, 187, 246, 294, 298, 300, 313, 323, 333, 339, 341, 349, 378, 428 e 436 da proteína s-GDH do tipo selvagem, respectivamente.

O *primer* 5' e o *primer* 3' usados para mutagênese foram escolhidos para serem complementares um ao outro e continham NNN (N = A, C, G ou T) em uma posição central. Os três nucleotídeos N aleatoriamente incorporados, que estão na posição desejada e codificam a posição dos aminoácidos sob investigação foram flanqueados por 12 a 16 nucleotídeos em cada extremidade que eram idênticos à fita de DNA sentido e anti-sentido do padrão. Em lugar do códon do tipo selvagem, os *primers* continham NNN, portanto os oligonucleotídeos codificados para cada códon possível.

Para cada uma das posições sob investigação, foi realizada uma reação RCP.

As reações de RCP e as digestões de endonuclease de restrição por DpnI foram realizadas de acordo com o manual fornecido com o *Kit* de Mutagênese Orientada a Sítios *QuickChange* (*Stratagene*, Cat. 200518).

De cada reação RCP, 1 µl foi usado para a eletroporação de células XL1F. As células foram crescidas e as atividades de s-GDH dos clones foram determinadas como descrito acima.

30 Para aumentar a probabilidade estatística de que todas as 20 substituições possíveis de aminoácidos são cobertas nessa avaliação, 200 clones de cada posição foram classificadas como descrito no **Exemplo 3**.

Clones de interesse foram seqüenciados de acordo com o método dado no Exemplo 4.

**Tabela 2: Efeito de substituições adicionais de aminoácidos sobre características básicas de mutante A (=T348G)**

Enzima	M/G sob 30 mM de açúcar em %	% de atividade relativa, 1,9 mM / 30 mM de glicose	Estabilidade, 30 min, 64°C	Troca de amino-ácidos (AA)
Wt-GlucDOR	105%	70%	80%	-
Mutante A	22%	25%	40%	T348G
Mutante A/1	-	30%	-	+ L 110 H
Mutante A/2	-	28%	-	+ L110 Y
Mutante A/3	40%	50%	-	+ Q 246 H
Mutante A/4	33%	30%	-	+ Q 246 M
Mutante A/5	35%	33%	-	+ Q 246 N
Mutante A/6	-	30%	-	+ Y 333 A
Mutante A/7	55%	40%	-	+ G 339 T
Mutante A/8	30%	45%	-	+ V 436 P
Mutante A/9	28%	30%	-	+ M 341 V
Mutante A/10	25%	28%	40%	+ V 349 A
Mutante A/11	26%	28%	40%	+ V 349 G
Mutante A/12	20%	27%	-	+ Q 145 P
Mutante A/13	17%	30%	-	+ A 294 D
Mutante A/14	15%	30%	-	+ A 294 E
Mutante A/15	20%	28%	-	+ V 300 A
Mutante A/16	20%	28%	-	+ V 300 S
Mutante A/17	20%	28%	-	+ V 300 N
Mutante A/18	20%	28%	-	+ V 300 Y
Mutante A/19	20%	28%	-	+ V 300 I
Mutante A/20	17%	25%	-	+ T 323 V
Mutante A/21	18%	26%	-	+ R 378 I
Mutante A/22	19%	26%	-	+ R 378 M
Mutante A/23	17%	26%	-	+ R 378 A
Mutante A/24	17%	28%	-	+ R 378 D
Mutante A/25	15%	22%	-	+ E 245 D
Mutante A/26	18%	32%	30%	+ L 169 F
Mutante A/27	18%	31%	28%	+ Y 171 G
Mutante A/28	12%	20%	20%	+ Ins 429 P
Mutante A/29	-	-	50%	+ D 87 R
Mutante A/30	-	-	70%	+ S 146 A
Mutante A/31	-	-	75%	+ S 146 G
Mutante A/32	-	-	45%	+ L 187 F
Mutante A/33	-	-	50%	+ N 122 K
Mutante A/34	-	-	45%	+ S 124 K
Mutante B	10%	35%	50%	T 348 G + N 428 P

**Tabela 3: Efeito de substituições adicionais de aminoácidos sobre características básicas de mutante A' (=T348S)**

Enzima	M/G sob 30 mM de açúcar em %	% de atividade relativa, 1,9 mM / 30 mM de glicose	Estabilidade, 30 min, 64°C	Troca de aminoácidos (AA)
Wt-GlucDOR	105%	70%	80%	-
Mutante A'	50%	35%	50%	T348S
Mutante A'/1	55%	47%	-	+ L 110 H
Mutante A'/2	65%	70%	-	+ Q 246 H
Mutante A'/3	58%	50%	-	+ Q 246 M
Mutante A'/4	60%	55%	-	+ Q246 N
Mutante A'/5	59%	50%	-	+ G 339 T
Mutante A'/6	60%	60%	-	+ V 436 P
Mutante A'/7	40%	35%	-	+ A 294 D
Mutante A'/8	38%	32%	-	+ A 294 E
Mutante A'/9	41%	45%	-	+ T 323 V
Mutante A'/10	43%	47%	-	+ R 378 I
Mutante A'/11	44%	47%	-	+ R 378 M
Mutante A'/12	40%	50%	-	+ R 378 A
Mutante A'/13	40%	50%	-	+ R 378 D
Mutante A'/14	-	-	60%	+ D 87 R
Mutante A'/15	-	-	80%	+ S 146 A
Mutante A'/16	-	-	85%	+ S 146 G
Mutante A'/17	-	-	65%	+ V 298 L
Mutante A'/18	-	-	60%	+ T 313 D
Mutante A'/19	-	-	75%	+L 386 F

- Trocas de aminoácidos com um efeito positivo sobre especificidade a substrato, afinidade por glicose e/ou termoestabilidade de mutante A ou mutante A', respectivamente, podem ser derivadas das Tabelas 2 e 3.

### **Exemplo 6**

#### **Identificação de mutantes com termoestabilidade aperfeiçoada**

- Os experimentos foram estendidos a mutantes apresentando especificidade muito boa de substrato a glicose em comparação com maltose, mas à custa de desvantagens tal como termoestabilidade baixa demais ou afinidade por glicose baixa demais.

- O chamado mutante 6 apresenta uma baixa reatividade cruzada a maltose bastante favorável que é somente cerca de 1,5% da reatividade conforme medido para glicose. O mutante 6 caracteriza-se pelas substituições de aminoácidos Y171G, E245D, M341V e T348G e apresenta uma inserção de uma prolina (ins429P) entre as posições 428 e 429.

Os seguintes *primers* foram usados para introduzir essas substi-

tuições desejadas de aminoácidos:

Fita sentido 5'-CCTATAAGAAAAAGACAGATACGCTCG -3' (ID SEQ NO: 8)

Fita anti-sentido 5'-CGAGCGTATCTGTCTTTTTCTTATAGG-3' (ID SEQ: NO: 9)

D87R:

5 Fita sentido 5'-TTCCATCCTCGAGAGATTGTCAAT-3' ( ID SEQ NO: 10)

Fita anti-sentido 5'-ATTGACAATCTCTCTGAGGATGGAA-3' (ID SEQ: NO: 11)

N122K e S124K:

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

10 Fita anti-sentido 5'- CGAGCGTATCTGTCTTTTTCTTATAGGTATAACG-3' (ID SEQ NO: 13 )

S146G:

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

Fita anti-sentido 5'-CTTCTCGAGACCACCCTGATGGTCTTTT -3' (ID SEQ: NO:

15 15)

V298L:

Fita sentido 5'-GCTCAAATGGATTAAAAGTAGCCGCA -3' ( ID SEQ NO: 16)

Fita anti-sentido 5'-TGCGGCTACTTTATTTCCATTTTGAGC -3' (ID SEQ: NO: 17)

20 L386F:

Fita sentido 5'- CCGTATTAAGTTCGATCCAACCTTATAGC -3' ( ID SEQ NO: 18)

Fita anti-sentido 5'- GCTATAAGTTGGATCGAACTTAATACGG -3' (ID SEQ: NO: 19)

**Tabela 4:** Mutações com impacto positivo sobre a termoestabilidade de mutantes de s-GDH que já compreendem outros mutantes para, por exemplo, aperfeiçoar especificidade a glicose

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

Os resultados acima mostram que as trocas de aminoácidos

5 D87R, N122K, S124K, S146A ou G, preferencialmente G, S146G, L187F ou M; N267Y, V298L, T313D e L386F aperfeiçoam a termoestabilidade do mutante básico 6.

As substituições D87R; N122K; S124K; S146G; V298L e L386F

10 apresentam efeitos bastante fortes sobre aperfeiçoamentos na termoestabilidade.

### Exemplo 7

### **Geração de mutantes com alta especificidade de substratos a glicose em comparação com maltose e aperfeiçoamento de afinidade por glicose**

In WO 02/34919 diversas trocas de aminoácidos em diferentes posições de s-GDH foram identificadas e mostradas acentuar a especificidade de substratos a glicose em comparação com, por exemplo, maltose. Combinações da troca de aminoácido T348G com substituições de aminoácidos em outras posições, por exemplo, nas posições 169, 171, 245, 341 e/ou 349, aumentou a especificidade de substratos adicionalmente. Diversos mutantes de s-GDH diferentes com especificidade aperfeiçoada a glicose, mas em comparação com maltose, porém com particularmente uma baixa afinidade pelo substrato glicose, foram selecionados e tentativas foram feitas para aperfeiçoar sua afinidade por glicose.

Como se sabe dos experimentos resumidos nas Tabelas 2 e 3, as substituições de aminoácidos L110H ou Y; N229A, G ou S; Q246H, M ou N; Y333A; G339T; M341V; V349A ou G e V436P parecem apropriadas para aumentar a afinidade de um mutante de s-GDH por glicose. Efeitos mais intensos sobre afinidade são observados com os mutantes L110H, Q246H; G339T; M341V; V349G e V436P. Aperfeiçoamentos de afinidade adicionalmente fortes foram verificados com as trocas de aminoácidos Q246H, M341V; V349G e V436P. Mutações pontuais são introduzidas em mutantes já existentes pela mesma estratégia como já exemplificado no Example 6, portanto, aqui apenas os *primers* específicos às substituições Q246H são dados.

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

Fita anti-sentido 5'- GGGCCATGATCAGACTGCAATAATTACC -3' (ID SEQ NO: 21)

A determinação de afinidade por glicose via classificação da medição dos valores de Km como descrito no Exemplo foi realizada. O valor de Km aparente foi calculado dos gráficos de diferentes concentrações de substrato *versus* atividade da enzima.

A atividade específica foi aprimorada como descrito no Exemple

8.

Combinações de trocas identificadas como apropriadas para aperfeiçoar especificidade, afinidade e/ou estabilidade de substratos foram introduzidas em s-GDH mutada com especificidade totalmente aperfeiçoada a glicose em comparação a maltose.

5

**Tabela 5: Combinação de várias substituições de aminoácidos em mutantes de s-GDH com especificidade de substratos aperfeiçoada a glicose em comparação com maltose**

Enzimas	Classificação de valor de Km-em %	Valor ap. de Km em mM de Glicose	Valor ap. de Km em mM de Maltose	M/G em %	Atividade Específica U/mg
WT	70	0,7	1,4	105	800
Mutante 6	8	64,7	714	1,5	268
Mut.13 (=Mutante 6 +Q246H)	20	17,1	208	3	430
Mutante G	12	11	110	2	351
Mut.J (=Mutante G + Q246H)	18	8	143	3	489
Mutante 22	18	11	n.d.	2,5	400
Mutante 23 (=mutante 22, + Q246N)	15	13	n.d.	2	350
Mutante 29 (como o mutante 22, mas T348S)	21	11	n.d.	2,5	400
Mutante 30 (= mutante 22 + G339T)	26	9	n.d.	2,5	350
Mutante 31 (= mutante 29 + V436P)	33	6	n.d.	3	380
Mutante 32 (= mutante 29 + V349G + A354T)	32	n.d.	n.d.	3,3	220.
Mutante 33 (= mutante 29 + L110H)	28	n.d.	n.d.	4,3	350

Pode-se ver claramente que em todos os tipos de mutantes a troca de aminoácido adicional Q246H produziu um aumento de afinidade por glicose e um aperfeiçoamento em relação a atividade específica. O mutante 6 apresenta as trocas de aminoácidos nas posições T348G, N122K, L169F, Y171G, E245D, M341V e uma inserção de prolina na posição 429 como o mutante 13 e Q246H adicional. O mutante J apresenta as trocas de aminoácidos nas posições T348G, Y171G, E245D, M341V, N428P como o mutante G e Q246H adicional.

10

15



O mutante 22 apresenta as trocas de aminoácidos nas posições T348G, N122K, S124K, L169F, Y171G, E245D, Q246H, M341V, L386F e uma inserção de prolina na posição 429. O mutante 29 apresenta todas as trocas do mutante 22, exceto T348G, que é trocado por T348S, e resultou em um aperfeiçoamento de velocidade. Os mutantes 30 e 31 atingiram valores de Km ainda maiores para glicose trocando adicionalmente G339T e V436P.

### **Exemplo 8**

#### **Purificação de s-GDH do tipo selvagem ou variante e análise de atividade enzimática e atividade específica, respectivamente**

Células de *E. coli* compreendendo um vetor de expressão de s-GDH apropriado são crescidos (4 x lêvedo-amp., 37°C), colhidos e ressuspensos em tampão de fosfato de potássio, pH 7,0. Ruptura de células foi realizada por passagem em Prensa Francesa 70-90 MPa (700-900 bars). Após centrifugação, o sobrenadante foi aplicado em uma coluna de *S-Sepharose* (Amersham Pharmacia Biotech) equilibrada com 10 mM de tampão de fosfato de potássio, pH 7,0. Após lavagem, a s-GDH foi eluída usando um gradient salino de NaCl 0-1 M. As frações mostrando atividade de s-GDH foram reunidas, dialisadas contra tampão de fosfato de potássio, pH 7,0, e re-cromatografadas em coluna de *S-sepharose* reequilibrada. As frações ativas foram reunidas e submetidas a filtração em gel usando uma coluna *Superdex® 200* (Amersham). As frações ativas foram reunidas e após, adição de CaCl<sub>2</sub> (concentração final de 3 mM), armazenadas a -20°C.

Determinação de proteína foi realizada usando o Reagente de Ensaio Protéico No. 23225 da *Pierce* (curva de calibração com BSA, 30 min, 37°C).

Para medição da atividade enzimática, as amostras de s-GDH foram diluídas em 1 mg de proteína/ml com pirrolquinolina quinona (PQQ) 0,0556 mM; Hepes 50 mM; CaCl<sub>2</sub> 15 mM, pH 7,0, e incubadas a 25°C por 30 minutos para reconstituição ou ativação.

Após ativação, amostras foram diluídas com Hepes 50 mM; CaCl<sub>2</sub> 15 mM, pH 7,0, até aproximadamente 0,02 U/ml, e 50 µl de cada amostra

diluída foram adicionados a 1.000 µl de uma solução tampão de citrato 0,2 M (pH 5,8; a 25°C) contendo 0,315 mg de (4-(dimetilfosfinilmetil)-2-metilpirazol-[1.5a]-imidazol-3-il)-(4-nitrosofenil)-amina (ver patente norte-americana US 5.484.708)/ml como mediador e 30 mM de açúcar.

- 5 Extinção a 620 nm é monitorada durante os primeiros 5 minutos a 25°C.

Uma unidade de atividade enzimática corresponde à conversão de 1 mMol de mediador/min sob as condições de ensaio acima.

Cálculo:

- 10 Atividade volumétrica (U/ml) = (volume total \* dE/min [U/ml]) : (ε \* amostra volume \* 1)

(ε = coeficiente de extinção;  $\epsilon_{620\text{ nm}} = 30[1 * \text{mmol}^{-1} * \text{cm}^{-1}]$ ).

Atividade específica (U/mg) = Atividade volumétrica, U/ml, dividida por concentração de proteína, mg/ml, resulta em U/mg.

- 15 Os ensaios foram realizados com glicose e maltose (Merck, Alemanha), respectivamente.

Resultados referentes a atividade enzimática, bem como a atividade específica, foram incluídos nas Tabelas dadas nos Exemplos anteriores.

## REIVINDICAÇÕES

1. Mutante isolado de glicose desidrogenase solúvel dependente de PQQ (s-GDH), caracterizado pelo fato de que, em relação ao polipeptídeo do tipo selvagem s-GDH de *A. calcoaceticus* da SEQ ID NO:2, possui especificidade aperfeiçoada à glicose em comparação com maltose, em que o referido mutante se diferencia da SEQ ID NO:2 pelas seguintes modificações:

(a)

N122K+L169F+Y171G+E245D+M341V+T348G+ins429P;

(b)

N122K+S124K+L169F+Y171G+E245D+M341V+T348G+ ins429P;

(c)

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

(d)

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

(e) D87R+N122K+S124K+S146G+L169F+Y171G+E245D+  
Q246H+V298L+M341V+T348S+L386F+ins429P;

(f) D87R+N122K+S124K+S146G+L169F+Y171G+E245D+  
Q246H+V298L+G339T+M341V+T348G+L386F+ins429P;

(g) D87R+N122K+S124K+S146G+L169F+Y171G+E245D+  
Q246H+V298L+M341V+T348S+L386F+ins429P+V436P;

(h) D87R+N122K+S124K+S146G+L169F+Y171G+E245D+  
Q246H+V298L+M341V+T348S+V349G+A354T+L386F+ins429P; ou

(i) D87R+L110H+N122K+S124K+S146G+L169F+Y171G+  
E245D+Q246H+V298L+M341V+T348S+L386F+ins429P;

em que o mutante possui atividade s-GDH e as posições designadas correspondem as posições do amino ácido conhecidas pela sequência do tipo selvagem s-GDH de *A. calcoaceticus* da SEQ

ID NO:2.

2. Método de detecção, determinação ou medição de glicose em uma amostra usando um mutante de s-GDH como definido na reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o referido aperfeiçoamento compreende contatar a amostra com o referido mutante.

3. Método de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que a referida detecção, determinação ou medição de glicose é realizada usando um sensor ou dispositivo de fita de teste.

## FIG. 1

Seqüência de aminoácidos de *A. calcoaceticus* (parte superior) e  
*A. baumannii* (parte inferior)

```

1 DVPLTPSQFAKAKSENFDDKKVILSNLNKPHALLWGPDNQIWLTERATGKI 50
|:|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.
1 DIPLTPAQFAKAKTENFDDKKVILSNLNKPHALLWGPDNQIWLTERATGKI 50

51 LRVNPESGSVKTVFQVPEIVNDADGQNGLLGFAFHPDFKNNPYIYISGTF 100
||||| ||| |||||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.
51 LRVNPSGSAAKTVFQVPEIVSDADGQNGLLGFAFHPDFKHNPYIYISGTF 100

101 KNPKSTDKELPNQTIIRRYTYNKSTDITLEKPVDLLAGLPSSKDHQSGRLV 150
|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.
101 KNPKSTDKELPNQTIIRRYTYNKTTDTFEKPIDLIAGLPSSKDHQSGRLV 150

151 IGPDKIYYTIGDQGRNQLAYLFLPNQAQHTPTQQELNGKDYHTYMGKVL 200
|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.
151 IGPDKIYYTIGDQGRNQLAYLFLSNQAQHTPTQQELNSKDYHTYMGKVL 200

201 RLNLDSIPKDNPSFNGVVSIIYTLGHRNPQGLAFTPNGKLLQSEQGPNS 250
|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.
201 RLNLDSIPKDNPSFNGVVSIIYTLGHRNPQGLAFAPNGKLLQSEQGPNS 250

251 DDEINLIVKGGNYGWPNAVAGYKDDSGYAYANYSAANKS.IKDLAQNGVK 299
|||||:|.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.
251 DDEINLVKGGNYGWPNAVAGYKDDSGYAYANYSAATNKSQIKDLAQNGIK 300

300 VAAGVPVTKESEWTGKNFVPPLKTLTYTVQDTYNYNDPTCGEMTYICWPTV 349
|| |||||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.
301 VATGVPVTKESEWTGKNFVPPLKTLTYTVQDTYNYNDPTCGEMAYICWPTV 350

350 APSSAYVYKGGKKAITGWENTLLVPSLKRGVIFRIKLDPTYSTTYDDAVP 399
|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.|||||.
351 APSSAYVYTGGKKAIPGWENTLLVPSLKRGVIFRIKLDPTYSTTLDDAIP 400

400 MFKSNNRYRDVIASPDGNVLYVLTDTAGNVQKDDGSVTNTLENPGSLIKF 449
|||||.|||||.|||||:|| |||||||.|||||.|||||.|||||.|||||.
401 MFKSNNRYRDVIASPEGNTLYVLTDTAGNVQKDDGSVTHTLENPGSLIKF 450

450 TYKAK 454
|| |
451 TYNGK 455

```

FIG. 2

Diagrama esquemático do plasmídeo com gene para s-GDH(pACSGDH)

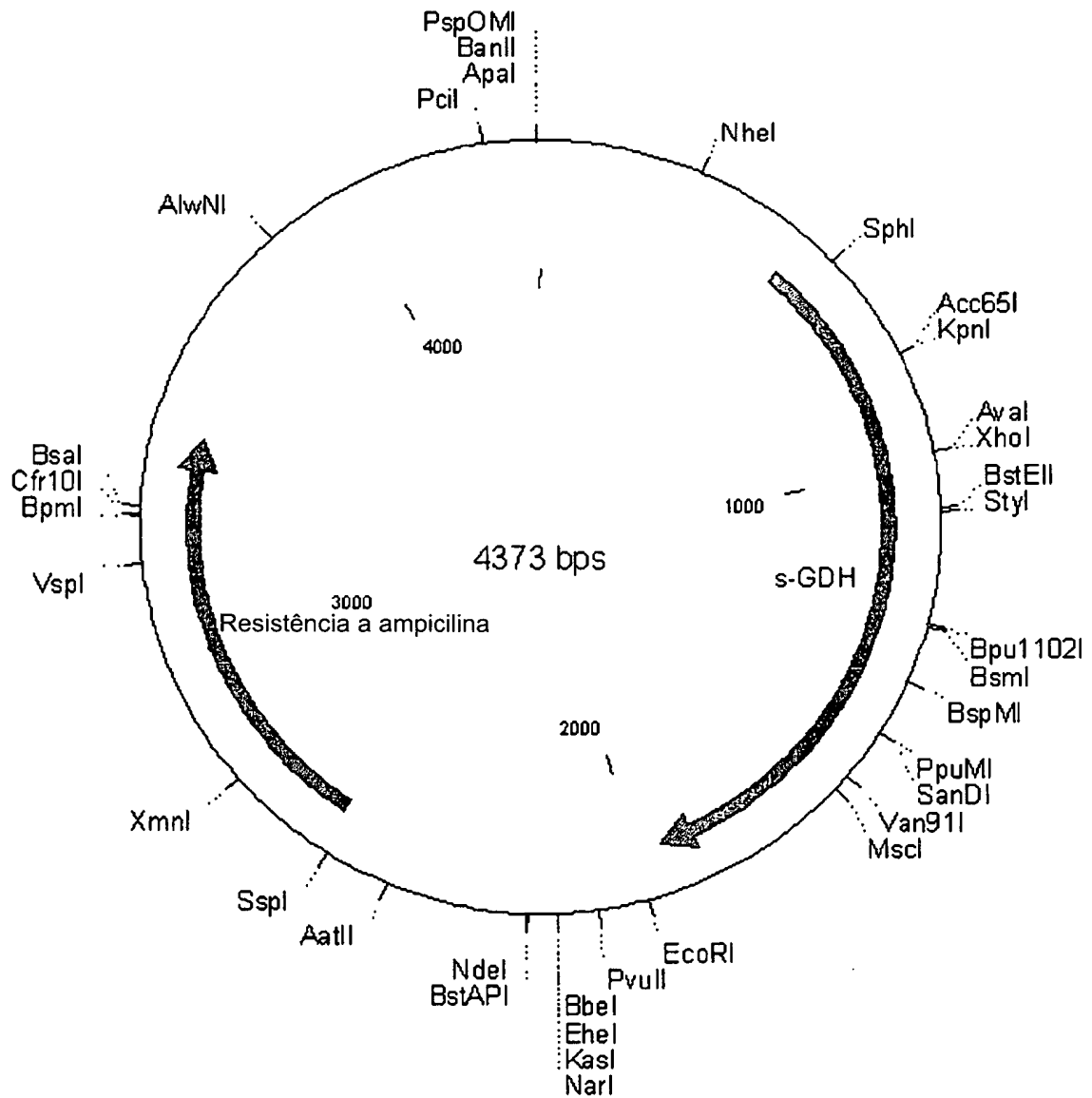


FIG. 3

## Seqüência vetor pACSGDH

```

cactaactga ttacgcaccg catgtaaccg ttttcaatct gtgagtaaatt tcacagttta 60
ttaacattgt gatagctatg atgacaacgt ttgtcgcaact gtaactaacg tgtaacagtt 120
agttgtcagt tttgctgggg tatttgcgtt ataaaaaccg ttatcacaat atcccgcgac 180
taccggacaa aaataaagag ttgaataaga gcttatccca ttagggctat tttacttgcc 240
atthttggacc tgggcagtg cgcgcaaaac gcgttagcgt tttgaacgcg ctacgcccgg 300
cccgaagggc gagcgtagcg agtcaaacct cacgtactac gtgtacgctc cggtttttgc 360
gcgctgtccg tgtccaaact gctgcgcca taacgcctgg tgggataggc tctaaatacg 420
cttcggcggt cagtaacacg cgttaacgtg ctgaacagcc gggcattttt ttacgctata 480
ccctacataa taaaaccgga gctaccatga ataagaaggt actgaccctt tctgccgtga 540
tggcaagtct gttattcggc gcgcacgcgc atgccgccga tgttcctcta actccatctc 600
aatttgctaa agcgaaatca gagaactttg acaagaaagt tattctatct aatctaaata 660
agccgcacgc gttgttatgg ggaccagata atcaaatttg gttactgag cgagcaacag 720
gtaagattct aagagttaat ccagagtcgg gtagtgtaaa aacagttttt caggtaccag 780
agattgtcaa tgatgctgat gggcagaatg gtttattagg ttttgccctc catcctgatt 840
ttaaaaataa tccttatatc tatatttcag gtacatttaa aaatccgaaa tctacagata 900
aagaattacc gaaccaaacg attattcgtc gttataccta taataaatca acagatacgc 960
tcgagaagcc agtcgattta ttagcaggat taccttcac aaagaccat cagtcaggtc 1020
gtcttgtcat tgggcccagat caaaagattt attatacgat tgggtgacca gggcgtaacc 1080
agcttgctta tttgttcttg ccaaatcaag cacaacatac gccaaactca caagaactga 1140
atggtaaaaga ctatcacacc tatatgggta aagtactacg cttaaactct gatggaagta 1200
ttccaaagga taatccaagt tttaacgggg tgggttagcca tatttataca cttggacatc 1260
gtaatccgca gggcttagca ttactccaa atggtaaat attgcagtc gaacaaggcc 1320
caaactctga cgatgaaatt aacctcattg tcaaagggtg caattatgg tggccgaatg 1380
tagcagggtta taaagatgat agtggctatg cttatgcaaa ttattcagca gcagccaata 1440
agtcaattaa ggatttagct caaaatggag taaaagtagc cgcaggggtc cctgtgacga 1500
aagaatctga atggactggg aaaaactttg tcccaccatt aaaaacttta tataccgttc 1560
aagataccta caactataac gatccaactt gtggagagat gacctacatt tgcgtggcaa 1620
cagttgcacc gtcactctgc tatgtctata agggcggtaa aaaagcaatt actggttggg 1680
aaaatacatt attggttcca tctttaaaac gtggtgtcat tttccgtatt aagttagatc 1740
caacttatag cactacttat gatgacgctg taccgatgtt taagagcaac aaccgttatc 1800
gtgatgtgat tgcaagtcca gatgggaatg tcttatatgt attaaactgat actgccggaa 1860
atgtccaaaa agatgatggc tcagtaacaa atacattaga aaaccagga tctctcatta 1920
agttcaccta taaggctaag taatacagtc gcattaaaaa accgatctat aaagatcggg 1980
ttttttagtt ttagaaaaga attcactggc cgtcgtttta caacgtcgtg actgggaaaa 2040
ccctggcggt acccaactta atcgccctgc agcacatccc ctttcgcca gctggcgtaa 2100
tagcgaagag gcccgcaccg atcgcccttc ccaacagttg cgcagcctga atggcgaatg 2160
gcgcctgatg cggatatttc tccttacgca tctgtgcggt atttcacacc gcatatgggtg 2220
cactctcagt acaatctgct ctgatgccgc atagttaagc cagccccgac accgcgcaac 2280
accgcctgac gcgccttgac gggcttgtct gctcccggca tccgcttaca gacaagctgt 2340
gaccgtctcc gggagctgca tgtgtcagag gttttcaccg tcatcacoga aacgcgcgag 2400
acgaaaggcg ctcgtgatac gcctattttt ataggttaat gtcatgataa taatgggttc 2460
ttagacgtca ggtggcactt ttcggggaaa tgtgcgcgga acccctattt gtttattttt 2520
ctaaatacat tcaaatatgt atccgctcat gagacaataa ccctgataaa tgcctcaata 2580
atattgaaaa aggaagagta tgagtattca acatttccgt gtcgccctta ttcccttttt 2640
tgccgcattt tgcccttctg tttttgctca ccagaaaacg ctgggtgaaag taaaagatgc 2700
tgaagatcag ttgggtgcac gagtgggtta catcgaactg gatctcaaca gcggtaagat 2760
ccttgagagt tttcgccccg aagaacgttt tccaatgatg agcactttta aagttctgct 2820
atgtggcgcg gtattatccc gtattgacgc cgggcaagag caactcggtc gccgcataca 2880

```

## FIG. 4

```

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

```