



(12)发明专利



(10)授权公告号 CN 102471767 B

(45)授权公告日 2018.02.16

(21)申请号 201080036800.9

(22)申请日 2010.08.18

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 102471767 A

(43)申请公布日 2012.05.23

(30)优先权数据

09168327.6 2009.08.20 EP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2012.02.20

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2010/062045 2010.08.18

(87)PCT国际申请的公布数据

W02011/020856 DE 2011.02.24

(73)专利权人 霍夫曼-拉罗奇有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72)发明人 W.勒德尔 C.霍恩 N.施泰因克

N.布西 T.迈尔 R.施姆克

R.纳格尔 D.海因德尔

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 柯珂 郭文洁

(51)Int.Cl.

C12N 9/96(2006.01)

C12N 9/06(2006.01)

(56)对比文件

EP 2093284 A1,2009.08.26,

CN 101945999 A,2011.01.12,

CN 101233144 A,2008.07.30,

Iqbal Munir et al.Separation and

Properties of Two Novel NADP+-dependent

Alcohol Dehydrogenases from Euglena

gracilis Z.《Pakistan Journal of

Biological Sciences》.2006,第9卷(第15期),
2743-2747.

Osborne H H et al.An investigation of
the nicotinamide-adenine dinucleotide-
induced tightening of the structure of
glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.
《Biochem .J.》.1976,第157卷(第1期),255-
259.

审查员 马俊凯

权利要求书1页 说明书17页

序列表3页 附图28页

(54)发明名称

利用稳定辅酶的酶的稳定化

(57)摘要

本发明涉及通过在存在稳定化的辅酶的情况下保存酶来使酶稳定的方法。此外,本发明涉及利用稳定化的辅酶来稳定化的酶,以及其在用于检测被分析物的测试元件中的用途。

1. 稳定酶的方法

其特征在于

所述酶在存在稳定化的辅酶的情况下保存,并且具有编号EC1.1.1.1的醇脱氢酶、具有编号EC1.1.1.49的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶或具有编号EC1.6.99.2的心肌黄酶被用作所述酶,其中carbaNAD被用作稳定化的辅酶。

2. 根据权利要求1的方法,

其特征在于

所述稳定化的酶是心肌黄酶并被保存至少2周的时间。

3. 根据权利要求1的方法,

其特征在于

所述稳定化的酶是心肌黄酶并被保存至少4周的时间。

4. 根据权利要求1的方法,

其特征在于

所述稳定化的酶是心肌黄酶并被保存至少8周的时间。

5. 根据权利要求1到4之一的方法,

其特征在于

所述稳定化的酶是心肌黄酶并被保存在至少20℃的温度下。

6. 根据权利要求1到4之一的方法,

其特征在于

所述稳定化的酶是心肌黄酶并被保存在至少25℃的温度下。

7. 根据权利要求1到4之一的方法,

其特征在于

所述稳定化的酶是心肌黄酶并被保存在至少30℃的温度下。

8. 根据权利要求1到4之一的方法,

其特征在于

所述稳定化的酶是心肌黄酶并在至少50%的相对空气湿度下,或/和在不存在干燥剂的情况下保存。

9. 根据权利要求1到8之一的方法,

其特征在于

所述稳定化的酶是心肌黄酶并作为干物质或在液相中保存。

10. 稳定酶的方法,

其特征在于

所述酶在存在天然辅酶的情况下保存,其中具有编号EC1.1.1.1的醇脱氢酶、具有编号EC1.1.1.47的葡糖脱氢酶、具有编号EC1.1.1.49的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶或具有编号EC1.6.99.2的心肌黄酶被用作所述酶,天然的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)化合物被用作天然辅酶,并且稳定化的酶在存在波长 $\geq 300\text{nm}$ 的光的情况下保存。

利用稳定辅酶的酶的稳定化

[0001] 本发明涉及通过在存在稳定化的辅酶的情况下保存酶来使酶稳定的方法。此外，本发明涉及利用稳定化的辅酶来稳定化的酶，以及其在用于检测被分析物的测试元件中的用途。

[0002] 诊断测试元件是临床上相关的分析方法的重要的成分。在这一点上，重点在于被分析物的测量，例如，代谢物或底物，例如，其可以借助特异于所述被分析物的酶直接或间接地测定。在这种情况下，被分析物借助于酶-辅酶复合物被转化，随后被定量。这要求被测定的被分析物与适合的酶、辅酶和任选的介体接触，在此辅酶被物理化学地改变，例如，通过酶反应被氧化或还原。如果另外使用介体，它通常将在被分析物的转化期间释放的电子从还原型辅酶转移到光学指示物或电极的导电部件上，从而该过程可以例如被光度地或电化学地检测。校准提供了测量的值与要测定的被分析物浓度之间的直接关系。

[0003] 当提供诊断测试元件时的重要的指标是它们的长期稳定性。现有技术已知的测试元件，例如在血糖的测定中使用的，一般对于水和热非常敏感，此时通常地，特别是辅酶和介体的功能受损。商业上可获得的试验元件的另一个问题是它们对环境光的敏感性，其中酶系统的光吸收可以引起对酶、辅酶和/或介体的损害。在某些形式的应用中，例如，由终端客户自己进行测试的情况下，由于测量系统的不正确的、被忽视的不完善保存，从而产生错误的结果，这是用户很难检测的，可能引起相应疾病的不正确的处置。

[0004] 可以用于提高诊断测试元件的稳定性的已知的手段是使用稳定的酶，例如，使用来自嗜热生物的酶。此外，有可能通过化学修饰，例如交联，或通过诱变来稳定酶。此外，也可以添加酶稳定剂，例如，海藻糖、聚乙烯吡咯烷酮和血清白蛋白，或者酶可以封装到聚合物网络中，例如，通过光聚合作用。

[0005] 还已经进行了尝试来通过使用稳定的介体来改善诊断测试元件的稳定性。因而，通过使用具有尽可能低的氧化还原电势的介体，测试的特异性被提高，反应期间的干扰被消除。然而，酶/辅酶复合物的氧化还原电势形成了介体的氧化还原电势的下限。如果氧化还原电势低于这个界限，与介体的反应被减速或甚至停止。

[0006] 做为选择，还可能使用不用介体的诊断测试元件，其中，直接地检测辅酶，例如，辅酶NADH。然而这种测量系统的缺点是，天然的辅酶例如NAD和NADP是不稳定的。

[0007] NAD和NADP是碱不稳定的分子，在文献中描述了它们的降解途径(N. J. Oppenheimer, "The Pyridine Nucleotide Coenzyme", Academic Press New York, London 1982, editor J. Everese, B. Anderson, K. You, chapter 3, pages 56-65)。当NAD或NADP通过核糖和吡啶单位之间的糖基连键的裂解而降解时，主要形成ADP-核糖。相比之下，还原型NADH和NADPH是酸不稳定的：例如，差向异构作用是已知的降解途径。在两种情况下，NAD/NADP和NADH/NADPH的不稳定性是由于核糖单位和吡啶单位之间的糖基连键的不稳定性。然而，在不剧烈的条件下，例如，水性溶液中，辅酶NAD和NADP是由于环境水分已经完全水解的。这种不稳定性可能引起被分析物测量中的不准确。

[0008] 例如，B.M. Anderson在"The Pyridine Nucleotide Coenzymes", Academic Press New York, London 1982, editor J. Everese, B. Anderson, K. You,第4章中描

述了多种NAD/NADP衍生物。然而,这些衍生物的大部分不被酶良好地接受。因而迄今为止用于诊断测试的仅有的衍生物是 3-乙酰吡啶腺嘌呤二核苷酸(乙酰基-NAD),其在1965年被首次描述(N.O. Kaplan, J. Biol. Chem.(1956), 221, 823)。这种辅酶也显示了酶的不良接受性,以及氧化还原电势中的改变。

[0009] W001/94370描述了具有修饰的吡啶基团的进一步NAD衍生物的用途。然而,烟酰胺基团的修饰一般对催化反应具有直接影响。大多数情况下这种影响是负面的。在另一种稳定化构想中,核糖单位被改变,以由此影响糖基连键的稳定性。这种过程不直接影响烟酰胺基团的催化反应。然而,一旦酶展现了对核糖单位的强的和特异性的结合,它可能具有间接影响。在这一点上,Kaufmann等人在W098/33936和US 5,801,006中以及在W001/49247中公开了许多硫代核糖-NAD衍生物。然而,迄今为止没有显示出烟酰胺核糖单位的修饰与酶反应中衍生物的活性之间的关系。

[0010] 一种没有糖基连键的衍生物carbaNAD在1988年首次被描述(J.T. Slama, Biochemistry(1988), 27, 183, and Biochemistry(1989), 28, 7688)。其中的核糖被carbacyclic糖单位替代。虽然carbaNAD被描述为脱氢酶的底物,它的活性早先未在生物化学检测方法中临床上展现。后来由G.M. Blackburn(Chem. Comm.(1996), 2765)描述了类似的方法,以用亚甲基二磷酸化合物代替天然焦磷酸来制备carbaNAD。亚甲基二磷酸显示了对磷酸酶的稳定的稳定性,被用作ADP-核糖基环化酶的抑制物。目的不是水解稳定性的提高(J.T. Slama, G.M. Blackburn)。

[0011] W02007/012494和US11/460,366最后公开了稳定化的NAD/NADH和NADP/NADPH衍生物,这些衍生物的酶复合物以及它们在生物化学检测方法中的用途和试剂盒。

[0012] 本发明的基本目的是提供用于稳定酶的方法,特别是用于酶的长期稳定化,其至少部分地消除了上述的缺点。根据本发明,这个目的通过一种稳定酶的方法来实现,其中酶在存在稳定化的辅酶的情况下保存。令人惊讶地发现的是,借助于稳定化的辅酶,在高相对湿度下或甚至在液相中,在提高的温度下以及在环境光中数周或数月的长期稳定化是可能的。在这一点上,术语“保存”是指,酶在存在稳定化的辅酶的情况下被保持任何时间,优选的至少2周的时间,更优选的至少3个月的时间,再更优选的至少6个月的时间,最优选的至少12个月的时间,其中保存优选地在大气压力、室温(25℃)和至少50%的相对空气湿度下进行。

[0013] 这个发现是令人惊讶的,因为已知的是虽然酶在存在天然辅酶的情况下展现了几个小时的提高的短期稳定性(Bertoldi et al., Biochem. J.(2005), 389, 885;van den Heuvel et al., J. Biol. Chem.(2005), 280, 32115;以及Pan et al., J. Chin. Biochem. Soc.(1974), 3, 1),它们在更长的时间中具有更低的稳定性(Nutrition Reviews(1978), 36, 251)。现在对于水和/或热所观察到的、包含酶和稳定化的辅酶的诊断测试元件的长期稳定性是完全更令人惊讶的,因为与相应的天然辅酶相比,稳定化的辅酶具有对酶的更低的结合常数。

[0014] 通过根据本发明的方法稳定化的酶是辅酶依赖性的酶。适合的酶是例如脱氢酶,特别是选自以下构成的组的脱氢酶:醇脱氢酶(EC 1.1.1.1.;EC 1.1.1.2)、L-氨基酸脱氢酶(EC 1.4.1.5)、葡糖脱氢酶(EC 1.1.1.47)、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(EC 1.1.1.49)、甘油脱氢酶(EC 1.1.1.6)、3-羟基丁酸脱氢酶(EC 1.1.1.30)、乳酸脱氢酶(EC 1.1.1.27;EC

1.1.1.28)、苹果酸脱氢酶 (EC 1.1.1.37) 和山梨醇脱氢酶。进一步适合的酶是氧化酶, 例如, 葡萄糖氧化酶 (EC 1.1.3.4) 或胆固醇氧化酶 (EC 1.1.3.6), 氨基转移酶, 例如, 天冬氨酸转氨酶或丙氨酸转氨酶、5'-核苷酸酶、肌酸激酶和心肌黄酶 (EC 1.6.99.2)。酶优选地是醇脱氢酶 (EC 1.1.1.1; EC 1.1.1.2)、葡糖脱氢酶 (EC 1.1.1.47)、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 (EC 1.1.1.49) 或心肌黄酶 (EC 1.6.99.2)。

[0015] 如果葡糖脱氢酶 (EC 1.1.1.47) 被用作酶, 则例如在根据本发明的方法的范围内可以使用突变的葡糖脱氢酶。在本申请的范围内使用的术语“突变体”是指天然酶的遗传修饰的变体, 其虽然具有相同的氨基酸数, 但具有与野生型酶相比被修饰的氨基酸序列, 即, 在至少一个氨基酸处与野生型是不同的。突变的引入可以位点特异性地或非位点特异性发生, 优选位点特异性地, 使用专门领域中已知的重组方法, 取决于相应的要求和条件, 引起天然酶的氨基酸序列内至少一个氨基酸取代。与野生型酶相比, 突变体特别优选地具有提高的热稳定性或水解稳定性。这样的突变体的实例由 Baik (Appl. Environ. Microbiol. (2005), 71, 3285)、Vásquez-Figueroa (ChemBioChem. (2007), 8, 2295) 以及在 W0 2005/045016 A2 中描述了, 在此明确地引用它们的公开内容。

[0016] 突变的葡糖脱氢酶原则上可以含有在其氨基酸序列的任何位置上与相应的野生型葡糖脱氢酶相比被修饰的氨基酸。突变的葡糖脱氢酶优选地含有在野生型葡糖脱氢酶的氨基酸序列的位置 96、170 和 252 的至少一个中的突变, 其中在位置 96 和位置 170 具有突变, 或在位置 170 和位置 252 具有突变的突变体是特别优选的。除这些突变之外突变的葡糖脱氢酶不含有进一步的突变时被证明是有益的。

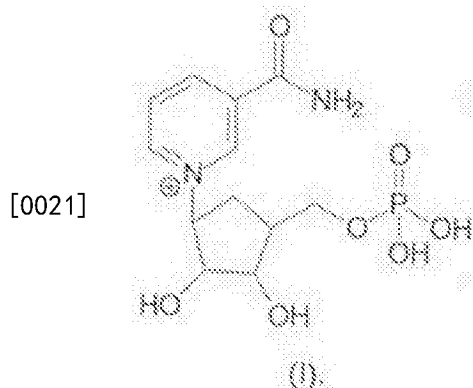
[0017] 在位置 96、170 和 252 的突变原则上可以包含任何氨基酸取代, 其引起野生型酶的稳定化, 例如热稳定性或水解稳定性的提高。在位置 96 处的突变优选地包含甘氨酸对谷氨酸的氨基酸取代, 而对于位置 170, 精氨酸或赖氨酸对谷氨酸的氨基酸取代, 特别是赖氨酸对谷氨酸的氨基酸取代是优选的。对于在位置 252 处的突变, 优选地包含亮氨酸对赖氨酸的取代。

[0018] 突变的葡糖脱氢酶可以通过来自任何生物学来源的野生型葡糖脱氢酶的突变来获得, 其中在本发明的上下文中术语“生物学来源”包括原核生物, 例如细菌, 以及真核生物, 例如, 哺乳动物和其他动物。野生型葡糖脱氢酶优选地来自细菌, 特别优选地它是来自巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 或苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 的葡糖脱氢酶, 特别是来自枯草芽孢杆菌的。

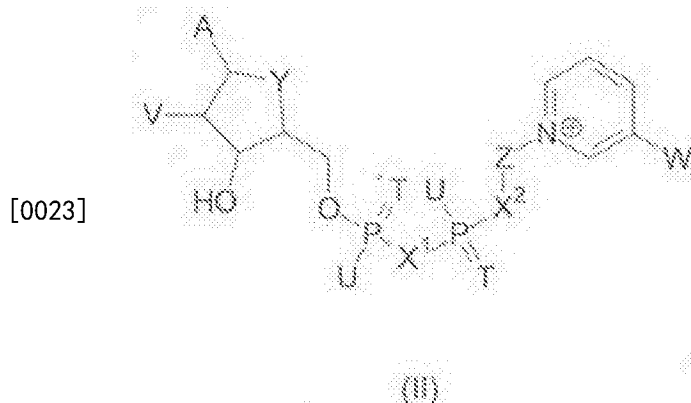
[0019] 在特别优选的实施方式中, 突变的葡糖脱氢酶是通过来自枯草芽孢杆菌的野生型葡糖脱氢酶的突变所获得的葡糖脱氢酶, 其具有 SEQ ID NO:1 (GlucDH_E96G_E170K) 中显示的, 或 SEQ ID NO:2 (GlucDH_E170K_K252L) 中显示的氨基酸序列。

[0020] 在本发明的范围内的稳定化的辅酶是与天然辅酶相比被化学地修饰的辅酶, 其与天然辅酶相比, 对于水分, 温度, 特别是 0°C 到 50°C, 酸和碱, 特别是在 pH 4 到 pH 10 的范围内, 和/或亲核体例如醇或胺具有更高的稳定性, 在这点上相比天然辅酶可以在相同环境条件下展现其活性更长的时间。稳定化的辅酶相比天然辅酶优选具有更高的水解稳定性, 其中在试验条件下的完全水解稳定性是特别优选的。与天然辅酶相比, 稳定化的辅酶可以具有对酶的降低的结合常数, 例如, 降低 2 或更多倍的结合常数。稳定化的辅酶的优选的实例是烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD/NADH) 或烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (NADP/NADPH) 的稳定

化的衍生物,或缩短的NAD衍生物,例如没有AMP部分,或具有非核苷残基,例如疏水性残基。在本发明的意义上,式(I)的化合物作为稳定化的辅酶是同样优选的。



[0022] NAD/NADH和NADP/NADPH的优选的稳定化衍生物在前述参考文献中描述了,在此明确地引用它们的公开内容。特别优选的稳定化的辅酶在W0 2007/012494和US11/460,366中描述了,在此明确地引用它们的公开内容。稳定化的辅酶特别优选地选自通式(II)的化合物:



[0024] 其中

[0025] A = 腺嘌呤或其类似物,

[0026] T = 在每种情况下独立的O、S,

[0027] U = 在每种情况下独立的OH、SH、BH₃⁻、BCNH₂⁻,

[0028] V = 在每种情况下独立的OH或磷酸基团,或形成环状磷酸基团的两个基团,

[0029] W = COOR、CON(R)₂、COR、CSN(R)₂其中R=在每种情况下独立的H或 C₁-C₂烷基,

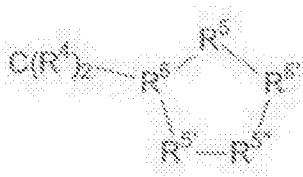
[0030] X¹, X² = 在每种情况下独立的O、CH₂、CHCH₃、C(CH₃)₂、NH、NCH₃

[0031] Y = NH、S、O、CH₂,

[0032] Z = 直链或环状的有机残基,条件是Z和吡啶残基不通过糖苷键连接,或其盐或任选的还原形式。

[0033] 式(II)的化合物中Z优选地是具有4-6个C原子的直链残基,优选的具有4个C原子,其中1个或2个C原子任选地被选自O、S和N的一个或更多个杂原子替代,或是包含具有5或6个C原子的环基团的残基,其任选地含有选自O、S和N的杂原子,以及任选地一个或更多个取代基,和残基CR⁴₂,其中CR⁴₂结合到环基团并结合到X²,其中R⁴在每种情况下独立地是H、F、Cl、CH₃。

[0034] Z特别优选地是饱和的或不饱和碳环的或杂环的 5-元环,特别是通式(III)的化合物



[0035]

(III)

[0036] 其中单键或双键可以存在于R^{5'}和R^{5''}之间,其中

[0037] R⁴ = 在每种情况下独立的H、F、Cl、CH₃,

[0038] R⁵ = CR⁴₂,

[0039] R^{5'} = O、S、NH、NC₁-C₂-烷基、CR⁴₂、CHOH、CHOCH₃,以及如果R^{5'}和R^{5''}之间是单键,R^{5''} = CR⁴₂、CHOH、CHOCH₃,

[0040] 如果R^{5'}和R^{5''}之间是双键,R^{5'} = R^{5''} = CR⁴,

[0041] 和

[0042] R⁶、R^{6'} =在每种情况下独立的CH或CCH₃。

[0043] 在优选的实施方式中,根据本发明的化合物含有腺嘌呤或腺嘌呤类似物,例如,C₈取代的和N₆取代的腺嘌呤、脱氮杂变体,例如 7-脱氮杂,氮杂变体,例如,8-氮杂或组合,例如7-脱氮杂或8-氮杂或碳环的类似物,例如间型霉素,其中7-脱氮杂变体可以在7位置由卤素、C₁-C₆炔基、C₁-C₆烯基或C₁-C₆烷基取代。

[0044] 在进一步的优选的实施方式中,式(II)的化合物含有腺苷酸类似物,其含有,例如,2-甲氧基脱氧核糖、2'-氟脱氧核糖、己糖醇、阿卓糖醇或多环的类似物,例如二环、LNA和三环糖代替核糖。

[0045] 特别地,(二)-磷酸氧也可以在式(II)的化合物中被各向同性地替换,例如,O⁻被S⁻或BH₃⁻替换,O被NH、NCH₃或CH₂替换,以及=O被=S替换。根据本发明的式(II)的化合物中W优选地是CONH₂或COCH₃。

[0046] 式(III)的基团中R⁵优选地是CH₂。此外,优选的是R^{5'}选自CH₂、CHOH和NH。在特别优选的实施方式中,R^{5'}和R^{5''}各自是CHOH。在又进一步的优选的实施方式中,R^{5'}是NH和R^{5''}是CH₂。其中R⁴ = H、R⁵ = CH₂、R^{5'} = R^{5''} = CHOH和R⁶ = R^{6'} = CH的式(III)的化合物是更优选的。优选的稳定化的辅酶的特定实例在附图1A和1B中显示。在最优选的实施方式中,稳定化的辅酶是化合物carbaNAD。

[0047] 根据本发明的方法特别适合于酶的长时间稳定化。这意味着,稳定化的酶例如作为干物质或在液相中保存,例如,至少2周的时间,优选的至少4周,最优选的至少8周,在这期间,根据酶活性的初始值,酶活性优选地降低小于50%、更优选的小于30%、最优选的小于20%。

[0048] 根据本发明的方法另外包括在提高的温度下稳定化的酶的保存,例如,在至少20℃的温度下,优选地至少25℃以及最优选的至少30℃,在这期间,根据酶活性的初始值,酶活性优选地降低小于50%、更优选的小于30%以及最优选的小于20%。如有必要,保存可以进行如上所述的更长的时间。

[0049] 此外,根据本发明的方法设想了在存在环境光的情况下,例如,在存在波长 ≥ 300 nm的光的情况下稳定化的酶的保存,在这期间,根据酶活性的初始值,酶活性优选地降低小于50%、更优选的小于30%以及最优选的小于20%。在这种情况下,如有必要,保存可以如上所述进行更长的时间和/或在提高的温度下进行。由于酶系统对环境光的稳定性,稳定化的酶此外还可以在使用之前和/或从包装取出之后短期暴露于直接阳光。

[0050] 根据本发明的稳定化还允许稳定化的酶不用干燥剂地、和/或在高相对空气湿度下,例如,在至少50%的相对空气湿度下保存,在这期间,根据酶活性的初始值,酶活性降低小于50%、更优选的小于30%以及最优选的小于20%。在这种情况下,如有必要,保存可以如上所述进行更长的时间、在提高的温度下进行、或/和在存在环境光的情况下进行。测定酶活性的方法或测试是现有技术中公知的,如果需要,可以由本领域的技术人员根据相应的要求来调整,其中在每种情况中使用相同的测试条件来比较保存之前和之后的酶活性。

[0051] 稳定化的酶可以一方面作为干物质保存,另一方面,保存在液相中。稳定化的酶优选地被保存在适合于测定被分析物的测试元件之上或之中。在这种情况下,稳定化的酶优选地是检测试剂的成分,所述检测试剂任选地含有其他成分,例如,介体、光学指示物、盐、缓冲液,等等。

[0052] 稳定化的酶可以用于检测被分析物,例如,体液如血液、血清、血浆或尿液中,或污水的样品中、或食品中的参量。可以通过氧化还原反应来检测的任何生物或化学物质可以作为被分析物来测定,例如,作为辅酶依赖性酶的底物、或辅酶依赖性酶本身的物质。被分析物的优选的实例是葡萄糖、乳酸、苹果酸、甘油、醇、胆固醇、甘油三酯、抗坏血酸、半胱氨酸、谷胱甘肽、肽、脲、铵、水杨酸、丙酮酸、5'-核苷酸酶、肌酸激酶(CK)、乳酸脱氢酶(LDH)、二氧化碳等等。被分析物优选地是葡萄糖。

[0053] 本发明的另一个主题是根据本发明的化合物或根据本发明稳定化的酶用于通过酶反应方式检测样品中被分析物的用途。这特别优选地是利用适合的辅酶借助于葡糖脱氢酶(EC 1.1.1.47)或葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(EC 1.1.1.49)来检测葡萄糖。

[0054] 由与被分析物的反应引起的稳定化的辅酶的改变原则上可以以任何方式来检测。在这种情况下,原则上可能的是利用现有技术已知的所有方法用于检测酶反应。然热,辅酶中的改变优选地通过光学方法检测。光学检测方法包括,例如,光吸收、荧光、圆二色性(CD)、旋光色散(ORD)、折射的测量。

[0055] 在本申请的范围内优选地使用的光学检测方法是光度法和荧光法。然而,为了光度地测量由于与被分析物反应的辅酶改变,另外必需存在至少一种介体,其提高还原性辅酶的反应性并允许电子转移到适合的光学指示物或光学指示物系统。

[0056] 适合于本发明的目的的介体包括,尤其是,亚硝基苯胺类,例如,[(4-亚硝基苯基)亚氨基]-二甲醇盐酸盐,醌类,例如,菲醌、菲咯啉醌或苯并[h]-喹啉醌,吩嗪类,例如,1-(3-羧基丙氧基)-5-乙烯吩嗪、三氟甲烷磺酸盐或/和心肌黄酶(EC 1.6.99.2)。

[0057] 心肌黄酶,特别是在与吩嗪相比时,具有更高稳定性的优点,但是它们的功能可能被天然辅酶的降解产物,例如,NAD或NADP的降解产物损害,这是例如从DE 2 061 984 A知道的。

[0058] 在本发明的意义内菲咯啉醌的优选的实施例包括 1,10-菲咯啉-5,6-醌、1,7-菲咯啉-5,6-醌、4,7-菲咯啉-5,6-醌以及其N-烷基化的和 N,N'-二烷基化的盐,其中对于N-

烷基化的或 N,N'-二烷基化的盐,提高溶解度的卤化物、三氟甲烷磺酸盐或其他阴离子优选地作为平衡离子。特别适合于本发明的目的的心肌黄酶包括,例如,来自猪心脏、克鲁氏梭状芽孢杆菌(*Clostridium kluyverii*)和嗜热脂肪芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilus*)的心肌黄酶,以及在US 2007/0196899A1中描述的心肌黄酶突变体,相比天然的心肌黄酶它们具有改善的催化功能和热稳定性。在此明确地引用上述US申请的公开内容。

[0059] 可还原的并经历其光学性质如颜色、荧光、反射、透射、偏振或/和折射率方面可检测改变的任何物质可以被用作光学指示物或光学指示物系统。样品中被分析物的存在和/或量的测定可以用肉眼进行,和/或通过检测设备使用本领域的技术人员看来适合的光度测定法来进行。杂多酸以及特别地 2,18-磷钼酸优选地被用作光学指示物,其被还原成相应的杂多蓝。做为选择,还可能的是使用醌,例如, resazurine、二氯苯酚吲哚酚或/和四唑盐作为光学指示物。特别适合于本发明的目的的四唑盐包括,例如,商业上可获得的产品WST-3、WST-4和WST-5(全部来自Dojindo公司),然而不限于这些。

[0060] 辅酶中的改变特别优选地通过测量荧光来检测。荧光测量是高度敏感的,允许在小型化系统中检测非常低浓度的被分析物。做为选择,辅酶中的改变还可以使用适合的测试元件,例如,电化学试验条来电化学地检测。这个的前提还是利用适合的介质,其可以通过电子的转移被还原型辅酶转化成还原形式。通过测量将还原的介质再氧化所需的电流来测定被分析物,所述电流与样品中被分析物的浓度相关。可以用于电化学测量的介质的实例包括,特别是前述用于光度测量的介质。

[0061] 可能的是使用液体测试来检测被分析物,其中试剂以例如溶液或悬浮液的形式存在于水性或非水性液体中,或作为粉剂或冻干物存在。然而,还可能的是使用干测试,其中试剂被施加到支持物上。支持物可以是例如测试条,其包含吸附剂或/和可膨胀的材料,其被要研究的样品液体所湿润。

[0062] 特别优选的测试形式包括使用酶葡萄糖-6-磷酸脱氢酶和稳定化的NAD衍生物用于检测葡萄糖,特别是在湿测试中,在这样的情况下,形成还原型辅酶NADH的衍生物。NADH通过光学方法,例如,在UV激发之后通过光度的或荧光的测定来检测。特别优选的测试系统是在US 2005/0214891中描述的,在此明确地进行引用。

[0063] 本发明的进一步的方面涉及用稳定化的辅酶来稳定化的酶,其中当在至少20℃、优选的至少25℃以及最优选的至少30℃的温度下,或/和在存在波长 ≥ 300 nm的光的情况下,其中合适的在高空气湿度或/和在没有干燥剂的情况下保存至少2周、优选的至少4周以及最优选的至少8周,所述稳定化的酶展现了根据酶活性的初始值小于50%、优选的小于30%以及最优选的小于20%的酶活性降低。在这种情况下,酶如上所述地使用。

[0064] 本发明的再进一步的方面涉及用于测定被分析物、含有如上所述稳定化的酶的检测试剂。此外,本发明涉及测试元件,其含有根据本发明稳定化的酶或根据本发明的检测试剂。所述检测试剂和测试元件可以适合于进行干测试或液体测试。测试元件优选地是用于被分析物的荧光或光度的检测的测试条。这样的测试条含有处在吸附性或/和可膨胀的材料如纤维素、塑料等之上处于固定化形式的稳定化的酶。

[0065] 本发明的再进一步的方面涉及特别是针对环境光来稳定酶的方法,其中如早先详细说明所述酶在存在天然辅酶的情况下保存。优选的变体醇脱氢酶(EC 1.1.1.1; EC

1.1.1.2)、葡糖脱氢酶(EC 1.1.1.47)、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(EC 1.1.1.49)或心肌黄酶(EC 1.6.99.2)被用作酶,其中葡萄糖脱氢酶(EC 1.1.1.47),包括天然的和突变的葡萄糖脱氢酶,和葡糖-6-磷酸脱氢酶(EC 1.1.1.49)是特别优选的。天然的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD/NADH)或天然的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADP/NADPH)化合物,特别是天然NAD或NADP优选地被用作天然辅酶。

[0066] 在以下附图和实施例的基础上更详细地阐明本发明。

附图说明

[0067] 附图1A:稳定化的辅酶carbaNAD(cNAD)的图。

[0068] 附图1B:稳定化的辅酶吡咯烷基NAD的图。

[0069] 附图2:在保存之前和之后,在存在NAD的情况下葡糖脱氢酶,和在存在cNAD的情况下葡糖脱氢酶的酶动力学结果的图。

[0070] 2A: 在存在NAD的情况下在1天后GlucDH的动力学。

[0071] 2B: 在存在cNAD的情况下在1天后GlucDH的动力学。

[0072] 2C:在存在NAD的情况下在32℃和85%相对空气湿度下5周保存之后GlucDH的动力学。

[0073] 2D: 在存在cNAD的情况下在32℃和85%相对空气湿度下5周保存之后GlucDH的动力学。

[0074] 附图3:在32℃和85%空气湿度下达5周的时间,在存在NAD的情况下的葡糖脱氢酶,或在存在cNAD的情况下的GlucDH的空白值的比较。

[0075] 附图4:在32℃和85%空气湿度下在存在NAD的情况下,葡糖脱氢酶的保存之后葡糖脱氢酶的各种功能曲线的图。保存时间在1天和5周之间变化。

[0076] 附图5:在32℃和85%空气湿度下在存在cDNA的情况下葡糖脱氢酶的保存之后葡糖脱氢酶的各种功能曲线的图。保存时间在1天和5周(附图5A)之间,以及在1天和24周(附图5B)之间变化。

[0077] 附图6:在32℃和85%空气湿度下24周,分别在存在NAD或cNAD的情况下,葡糖脱氢酶的保存之后NAD或cNAD的剩余含量的图。

[0078] 附图7:在32℃和85%空气湿度下5周(附图7A)或24周(附图7B)在存在NAD或cNAD的情况下,葡糖脱氢酶的保存之后GlucDH活性的图。

[0079] 附图8:在32℃和83%空气湿度下在存在NAD或cNAD的情况下25周时间,葡糖脱氢酶(GlucDH-wt)、双突变体GlucDH_E96G_E170K(GlucDH-Mut1)和双突变体GlucDH_E170K_K252L(GlucDH-Mut2)的保存之后GlucDH活性的图。

[0080] 附图9:在50℃4天(附图9A)或14天(附图9B)的时间在液相中在存在NAD或cNAD的情况下葡糖脱氢酶的稳定性的图。试验条件:10 mg/ml GlucDH;12 mg/ml NAD或cNAD;缓冲液:0.1 M Tris,1.2 M NaCl,pH 8.5;温度50℃。

[0081] 附图10:在存在cNAD的情况下醇脱氢酶的各种功能曲线的图。根据液体测试中NAD的初始浓度,cNAD的浓度在25%和150%之间变化。

[0082] 附图11:在各种乙醇浓度下在存在cNAD的情况下醇脱氢酶的酶动力学的结果的图。

[0083] 附图12:在液相中在35℃下65小时的时间,在存在NAD或cNAD的情况下来自酵母的醇脱氢酶的稳定性的图。试验条件:5 mg/ml ADH;50 mg/ml NAD或cNAD;缓冲液:75 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$;甘氨酸,pH 9.0;温度35℃。

[0084] 附图13:在室温下存在NAD和不同介体的情况下11周保存之后,葡糖脱氢酶的各种功能曲线的图。

[0085] 附图14:在各种葡萄糖浓度下,在存在NAD和 1-(3-羧基丙氧基)5-乙基吩噻嗪-三氟甲烷磺酸盐的情况下,葡糖脱氢酶的酶动力学的结果的图。

[0086] 附图15:利用GlucDH作为酶、心肌黄酶作为介体的葡萄糖检测的示意图。

[0087] 附图16:在存在吡咯并喹啉醌(PQQ)和[(4-亚硝基苯基)亚氨基]-二甲醇]盐酸盐作为介体的情况下葡萄糖-染料-氧化还原酶(GlucDOR)、以及在存在NAD和心肌黄酶/[(4-亚硝基苯基)亚氨基]-二甲醇]盐酸盐作为介体的情况下的葡糖脱氢酶的功能曲线的图。

[0088] 附图17:在各种葡萄糖浓度下在存在NAD和心肌黄酶的情况下葡糖脱氢酶的酶动力学的结果的图。

[0089] 附图18:在存在NAD或cNAD的情况下,在利用葡糖脱氢酶的葡萄糖电化学测定中,作为葡萄糖浓度的函数测量的电流的图。测试条件:25 mM NAD或cNAD;2.5秒延迟;5秒测量时间。

[0090] 附图19:在波长360 nm的UV光照射之后在存在NAD的情况下葡糖脱氢酶的各种功能曲线的图。

[0091] 附图20:在250-450 nm的波长范围内cNAD和cNADH的吸收光谱的图。

[0092] 附图21:葡糖脱氢酶双突变体GlucDH_E96G_E170K和GlucDH_E170K_K252L的氨基酸序列的图。

[0093] 实施例1

[0094] carbaNAD(附图1A)或NAD添加到葡萄糖特异性GlucDH中。这些制剂各自施加到Pokalon箔(Lonza)上,在干燥之后,保存在温暖和湿润的条件下(32℃,85%相对空气湿度)。随后,以规定间隔时间测定反应动力学和功能曲线。在每次测量时间平行地进行cNAD/NAD分析和酶残余活性的测定。在第一天测定的NAD(附图2A)和cNAD(附图2B)的动力学曲线是可比较的,还显示了葡萄糖依赖性的相似的提高。然而,动力学曲线中的显著差异可以在5周后见到。虽然在NAD的动力学的动态范围中存在较大的降低(附图2C),用cNAD稳定的酶的动力学实际上保持不变(附图2D)。

[0095] 如附图3显示的,在空白值(在血液样品的施加之前的干空白值)上也存在相当大的差异。NAD的干空白值的提高是由于荧光颗粒的形成(Oppenheimer(1982),上文)。令人惊讶地,使用cNAD不会发生。

[0096] 在存在NAD或cNAD的情况下葡糖脱氢酶的不同稳定性根据附图4和5的比较也是明显的。在5周后,用cNAD稳定的酶的功能曲线仍然保持在早先测量的曲线组之内(附图5A),而用NAD处理的酶的曲线(附图4)显示了在更高浓度下的低落,这是酶/辅酶量不足的典型表现。附图5B显示了在24周时间内用cNAD稳定化的葡糖脱氢酶的各种功能曲线。在这一点上,明显的是,在整个时间内,酶的功能仅在高葡萄糖浓度下稍微改变,在24周后大约相应于5周后获得的值。

[0097] 在预定的时间内辅酶结构和它的稳定性之间的关系在附图6中显示。根据这个,葡

葡萄糖检测试剂中cNAD的剩余含量在24周保存(32℃和85%相对空气湿度)之后仍然是初始值的约80%,而在用NAD稳定的葡萄糖检测试剂中NAD的含量在5周后已经降低到初始值的约35%,通过外推法,在约17周后降至零。

[0098] 在32℃和85%相对空气湿度下5周后活性酶GlucDH的残余活性的测定结果(附图7A)是完全令人惊讶的。用NAD稳定的酶现在仅具有极其低的酶活性(0.5%),而用cNAD稳定的酶仍具有70%的残余活性(在每种情况下与在冷柜(KS)中与干燥剂(TM)保存的样品相比较)。在32℃和85%相对空气湿度下24周后(附图7B),当用cNAD稳定时酶的残余活性仍然有约25%。

[0099] 如果使用突变体代替野生型酶(来自枯草芽孢杆菌),有可能进一步提高GlucDH的残余活性。在32℃和85%相对空气湿度下在存在cNAD的情况下24周保存之后,野生型酶的具有位置96处谷氨酸→甘氨酸和位置170处谷氨酸→赖氨酸的氨基酸取代的突变体GlucDH_E96G_E170K(GlucDH-mut1)的残余活性是约70%,而具有位置170处谷氨酸→赖氨酸和位置252处赖氨酸→亮氨酸的氨基酸取代的突变体GlucDH_E170K_K252L(GlucDH-mut2)的残余活性是约50%(附图8)。

[0100] 葡萄糖脱氢酶在液相中的保存也清楚地显示了NAD和cNAD之间的差异(附图9A和9B)。在50℃下95小时之后,在存在天然辅酶NAD的情况下葡萄糖脱氢酶的残余活性是>5%,而在存在人工辅酶cNAD的情况下GlucDH的残余活性是75%(附图9A)。在50℃下336小时保存之后,使用NAD稳定的酶的残余活性现在仅仅约1%;在存在cNAD的情况下保存的酶观察到仍然约70%的残余活性。相应的SDS凝胶也显示了在存在天然辅酶NAD的情况下GlucDH条带的改变:在更高的摩尔质量下见到新的条带,在30 kDa条带中存在移位。

[0101] 总体上,极其令人惊讶的结果是,辅助因子的稳定化同时地带来了酶的稳定化,并且不仅仅是通过酶的更佳内聚(cohesion)的协同作用。辅助因子NAD的分解对酶GlucDH的稳定性具有副作用,甚至加速了它的灭活。人工类似物对天然NAD的替换容许GlucDH在压力条件(例如高温)下甚至在存在辅助因子的情况下保存。

[0102] 使用这样的系统有可能生产具有显著改善的稳定性质的血糖测试条,所述测试条没有干燥剂地呈现是可能的。

[0103] 实施例2

[0104] cNAD或NAD添加到含有醇脱氢酶的检测溶液中。这些混合物保存在2-8℃和保存在35℃。随后,以规定的时间间隔检查醇脱氢酶(ADH)的稳定性,测定酶的残余活性。

[0105] 附图10显示了在存在各种浓度的cNAD的情况下,通过醇脱氢酶(ADH)的乙醇的转化的线性,这展现了酶系统ADH/cNAD来测定乙醇的实际可用性。此外,通过醇脱氢酶和cNAD的组合的方式,乙醇的转化的动力学曲线显示了存在着对底物浓度的相当大的依赖性,其中转化速率随着乙醇浓度提高而提高(附图11)。

[0106] 再一次地,液相中的保存显示了在存在NAD或cNAD的情况下保存之间的差异(附图12)。在存在天然辅酶NAD的情况下醇脱氢酶的残余活性在35℃下65小时之后是约6%,而在存在人工辅酶cNAD的情况下酶的残余活性仍有约60%。

[0107] 如果醇脱氢酶在冷柜中在2-8℃下与天然NAD或与cNAD一起保存数月,则人们观察到,在cNAD的情况下,在整个保存期中酶活性的相当大的降低。虽然在2周保存之后的差异仍然是轻微的,在存在16 mM cNAD的情况下,与含有16 mM NAD作为辅酶的相应溶液相比,

在12个月的保存之后具有大约更高20%的醇脱氢酶残余活性。结果在表1中显示。

[0108] 表1

[0109]

成分	浓度 (mmol/l)	U/ml (初始值)	(初始值) 重量的%	在2-8℃ 下2周 (初始值 的%)	在2-8℃ 下3个月 (初始值 的%)	在2-8℃ 下7.5个 月(初始 值的%)	在2-8℃ 下10个月 (初始值 的%)	在2-8℃ 下12个月 (初始值 的%)
可比较的 混合物	16 (NAD)	142.2	85.2	96.9	92.1	80.2	70.3	60.5
交换 NAD/cNAD	16	120.2	71.9	100.7	91.3	95.6	88.2	83.8

[0110] 相对于使用的cNAD的量,稳定化的程度在表2中显示。因而,通过提高cNAD的浓度,在2-8℃下保存2周的样品中,醇脱氢酶的残余活性可以被稍微提高。在压力模型中,设想了在35℃下保存酶2周,然而,提高cNAD的浓度显著地提高了醇脱氢酶酶活性的降低,并且在15 mM cNAD的浓度的情况下,与存在0.5 mM cNAD的酶的溶液相比观察到更高约45%的残余活性。

[0111] 表2

[0112]

样品	pH值/添加物	U/ml (初始值)	(初始值) 重量的%	在2-8℃2周 (初始值的%)	在35℃下2周 (初始值的%)
1	pH 7.85 0.5 mM cNAD	123.1	73.7	93.8	31.1
2	pH 7.85 1 mM cNAD	125.8	75.3	97.7	45.5
3	pH 7.85 5 mM cNAD	125.1	74.9	101.1	74.1
4	pH 7.85 15 mM cNAD	123.7	74.1	104.0	77.6

[0113] 实施例3

[0114] 各含有葡糖脱氢酶、NAD、介体,以及在合适时含有光学指示物的各种测试系统,光度地和电化学地进行测量以测定葡萄糖。

[0115] 对于光度测量,在各种葡萄糖浓度下,初步研究了各自在室温下保存11周并且除葡糖脱氢酶、NAD和介体之外含有 2,18-磷钼酸的四个测试元件。

[0116] 如附图13中所示的,对使用的所有四种介体观察到随着提高葡萄糖浓度的反射率的降低,四种介体即[(4-亚硝基-苯基)亚氨基]二甲醇盐酸盐(med A)、1-甲基-5,6-二氧代-5,6-二氢-1,10-菲咯啉-3-三氟甲烷磺酸盐(med B)、7-甲基-5,6-二氧代-5,6-二氢-1,7-菲咯啉-3-三氟甲烷磺酸盐(med F)和1-(3-羧基-丙氧基)-5-乙基吩嗪-3-三氟甲烷磺

酸盐 (med G), 因而上述介体原则上适合于通过光度法测定葡萄糖。

[0117] 在高葡萄糖浓度下, 在约800 mg/dl的范围内, 当使用[(4-亚硝基苯基)亚氨基]二-甲醇盐酸盐或1-(3-羧基丙氧基)-5-乙基吩嗪-三氟甲烷磺酸盐时, 测量的样品的反射率仍然有约20%, 表明这两种介体特别适合于利用葡糖脱氢酶/NAD系统的光度测量, 因而也适合于葡糖脱氢酶/cNAD系统。利用系统葡糖脱氢酶、NAD、1-(3-羧基丙氧基)-5-乙基吩嗪-三氟甲烷磺酸盐和2,18-磷钼酸, 在0到800 mg/dl范围的葡萄糖浓度下, 葡萄糖的转化的动力学在附图14中示出。

[0118] 附图15中的示意图显示了葡萄糖的光度测定也可以用心肌黄酶作为中间的介体的(额外)使用来进行。附图16显示了对于葡糖脱氢酶、NAD、心肌黄酶、[(4-亚硝基苯基)-亚氨基]二-甲醇盐酸盐和2,18-磷钼酸系统(系统1), 反射率的浓度依赖性降低。葡萄糖-染料-氧化还原酶、吡咯并喹啉醌、[(4-亚硝基苯基)亚氨基]二-甲醇盐酸盐和2,18-磷钼酸系统(系统2)用作比较, 其同样地产生反射率方面的浓度依赖性降低, 但是具有由于葡萄糖-染料-氧化还原酶的低特异性的缺点。对于0到800 mg/dl范围内的葡萄糖浓度, 使用系统1的葡萄糖的转化的动力学在附图17中示出。

[0119] 作为对光度法的替代, 电化学测量也可以用于测定被分析物的目的。因而, 对于测试元件, 其除了葡糖脱氢酶之外含有NAD作为辅酶以及1-(3-羧基丙氧基)-5-乙基吩嗪-三氟甲烷磺酸盐作为介体, 以及对于含有稳定化的辅酶cNAD代替NAD的相应的系统, 发现了再氧化还原的介体所需的电流线性地依赖于葡萄糖浓度(附图18)。

[0120] 因而显示的是, 被分析物测定可以使用脱氢酶/稳定化的辅酶系统, 以及通过电化学检测并在与辅酶无关的另一个波长下评估来进行。通过使用稳定化的酶/辅酶对, 总体制剂应当也被进一步稳定化。

[0121] 实施例4

[0122] 为了测定它们对环境光的稳定性, 各自含有选自葡糖脱氢酶(GlucDH)、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PDH)和葡糖脱氢酶突变体2(GlucDH-mut2)的酶, 与NAD或carbaNAD组合的各种测试系统根据W003/097859A2中描述的方法来制备, 随后添加血液样品。特别地, 通过将包含酶和辅酶的可光聚合的液体组合物涂敷到支持物上, 随后用波长360 nm和400 W的光照射组合物10秒, 来获得具有12-15 μm 厚度的试剂层。以荧光方式进行检测持续几分钟时间。

[0123] 附图19显示了GlucDH/NAD系统的测量的结果。如图形所显示的, 在整个测量时间中无论如何没有观察到荧光的降低, 这得到的结论是, 即使用富含能量的辐射照射试剂层持续几分钟也不损害试剂层, 由于在区域 ≥ 300 nm中缺乏GlucDH/NAD系统的光吸收。考虑到G6PDH/NAD系统和含有carbaNAD的系统GlucDH/carbaNAD、G6PDH/carbaNAD和GlucDH-mut2/carbaNAD不吸收波长范围 ≥ 300 nm的事实(附图20), 所有这些系统也对环境光具有高稳定性(结果未显示)。

[0124] 实施例5

[0125] 可以用于生产在此描述的诊断测试元件的组合物体的具体实例在下文中详细说明。

[0126] a) 用于测定乳酸脱氢酶活性的液体试剂

[0127] 液体试剂被用于测定乳酸脱氢酶的活性, 其含有心肌黄酶、carbaNAD、四唑盐和乳酸盐等。在25°C下保存在溶液中的检测试剂含有以下成分:

[0128] 3 U/ml心肌黄酶(来自猪心脏)

[0129] 2 mM carbaNAD或0.2 mM NAD

[0130] 2 mM四唑~~盐~~ WST-3

[0131] 50 mM乳酸钠

[0132] 0.1 M tricine/HCl, pH 8.8

[0133] 处于各种保存时间的心肌黄酶的活性的测量显示了,与含有NAD作为辅酶的相应的制剂相比,含有carbaNAD的制剂的显著提高的残余活性。

[0134] b) 用于血糖测定的测试条

[0135] 组合物被用于测定血糖,其含有葡糖脱氢酶(GlucDH)、carbaNAD、心肌黄酶、亚硝基苯胺和磷钼酸等。通过使用刮片(层厚度100 μm)将第一制剂施加到聚碳酸酯箔上、干燥第一层、将第二层制剂施加到第一层上(刮片间隙30 μm)并干燥第二层来获得测试条,它们保存在32℃和30-70%相对空气湿度下。用于第一和第二层的制剂在表3中显示:

[0136] 表3

[0137]

成分	第一层	第二层
黄原胶	0.09 g	---
硅酸铝钠	5.00 g	---
聚乙烯内酯分散体(在水中按重量计算50%)	4.80 g	5.80 g
乙烯甲醚-马来酸共聚物	---	1.40 g
二氧化钛	---	14.00 g
NaOH 16 %	---	2.80 g
硅酸	---	2.50 g
磷酸盐缓冲液 0.1 M	13.80 g	4.40 g
N-乙酰基-N-甲基-葡萄糖胺	0.17 g	0.34 g
甲基油烯基牛磺酸钠	0.03 g	0.03 g
聚乙炔基吡咯烷酮(MW 25000)	0.85 g	1.80 g
氯化四乙胺	0.12 g	---
二-(2-羟基乙基)-(4-羟基亚氨基环己-2,5-次二烯)-氯化铵	0.10 g	---
2,18-磷钼酸六钠盐	0.50 g	---
NaCl	1.00 g	---
carbaNAD (or NAD)	1.00 g (0.10 g)	---
心肌黄酶	1.94 g (203 KU)	---
葡萄糖脱氢酶	0.97 g (207 KU)	---
己醇	0.17 g	0.16 g
2-甲氧基-丙醇	4.30 g	4.30 g

[0138] 通过从测试条提取酶,在各种保存时间测量心肌黄酶的活性,在含有carbaNAD的制剂的情况下,与含有NAD的制剂相比,观察到显著提高的残余活性。

[0139] c) 用于甘油三酯的测定的测试条

[0140] 组合物被用于测定甘油三酯,所述组合物含有甘油脱氢酶、carbaNAD、心肌黄酶和四唑~~盐~~等。通过将表4中提及的制剂通过刮片(层厚度80 μm)施加到聚碳酸酯箔上并随后干燥来获得测试条,将它们保存在32℃和30-70%相对空气湿度下。

[0141] 表4

成分	量
黄原胶	0.30 g
硅酸 (Aerosil)	5.00 g
聚丙烯酸酯分散体 (在水中按重量 计算50%)	6.00 g
二氧化钛	18.00 g
N-辛酰基-N-甲基-葡萄糖胺	0.20 g
聚乙烯基吡咯烷酮 (MW 25000)	0.40 g
Tricine	0.30 g
HCl	ad pH 8.5
脂肪酶 (猪的胰腺), 12 KU/g	5.00 g
甘油脱氢酶, 100 U/mg	1.00 g
carbaNAD (或NAD)	1.60 g (0.20 g)
心肌黄酶, 20 U/mg	2.00 g
WST-5	2.00 g
水	82.00 g

[0143] 通过从测试条提取酶,在各种保存时间测量心肌黄酶的活性,在含有carbaNAD的制剂的情况下,与含有NAD的制剂相比,观察到显著提高的残余活性。

[0144] 实施例6

[0145] 为了评估葡萄糖脱氢酶和心肌黄酶通过carbaNAD的稳定化,类似于实施例5制备了许多测试条。用于测试条的第一层和第二层的制剂在表5中示出。

[0146] 表5

[0147]

成分	第一层	第一层	第二层
黄原胶	0.29 g	0.29 g	---
Gantrez S97	---	---	1.44 g
氯化四乙铵	0.07 g	0.07 g	0.43 g
Mega 8	0.17 g	0.17 g	0.36 g
Gerepon T77	0.03 g	0.03 g	0.03 g
聚乙烯基吡咯烷酮 (MW 25000)	0.87 g	0.87 g	1.99 g
Transpall (或硅酸)	4.82 g (4.79 g)	4.82 g (4.79 g)	---
硅酸	---	---	16.02 g
二氧化钛	---	---	2.18 g
Propiofan	5.04 g	5.02 g	6.14 g
N,N'-二-(2-羟基乙基)-4- 亚硝基苯胺	0.10 g	0.10 g	0.16 g
2,18-磷酸六钠盐	0.33 g	0.33 g	1.98 g
K/Na缓冲液0.1 M	10.00 g	9.96 g	---
NAD	0.58 g	---	---
carbaNAD	---	4.00 g	---
葡萄糖脱氢酶, 突变体2	1.06 g (324 KU)	1.06 g (324 KU)	---
心肌黄酶	0.78 g (80 KU)	1.26 g (130 KU)	---
K ₃ [Fe(CN) ₆]	0.01 g	0.01 g	0.01 g
NaOH 16 %	0.25 g	0.28 g	2.69 g
叔戊醇	1.00 g	1.00 g	1.07 g

[0148] 测试条在5℃ (KS, 冷柜)、25℃ (RT)、30℃ (GT)、35℃ (DT) 和45℃ (HT) 的温度下保存18周的时间, 在保存开始时 (0周)、6周后、9周后、12周后和18周后测定测试条中的酶活性。结果在表6 (葡萄糖脱氢酶) 和表7 (心肌黄酶) 中显示。

[0149] 表6

[0150]

保存温度	辅酶	酶活性 (U/cm ²)					目标
		0周	6周	9周	12周	18周	
KS	NAD	14.6	16.5	16.6	14.4	13.8	25.4
RT			15.8	14.4	12.9	12.2	
GT			n.d.	n.d.	9.7	9.1	
DT			12.9	10.9	9.4	8.5	
HT			7.8	6.2	n.d.	n.d.	
KS	carbaNAD	19.8	20.4	21.2	18.5	18.8	25.8
RT			20.7	21.5	18.0	17.7	
GT			n.d.	n.d.	17.6	16.8	
DT			19.8	20.2	17.2	16.9	
HT			19.0	18.8	n.d.	n.d.	

[0151] 表7

[0152]

保存温度	辅酶	酶活性 (U/cm ²)					目标
		0周	6周	9周	12周	18周	
KS	NAD	2.7	2.2	2.4	3.3	3.7	6.3
RT			2.3	2.2	2.8	3.4	
GT			n.d.	n.d.	2.4	2.8	
DT			1.5	1.8	2.4	2.8	
HT			1.5	1.1	n.d.	n.d.	
KS	carbaNAD	4.6	4.4	5.2	4.8	7.0	10.4
RT			4.5	5.1	4.6	6.7	
GT			n.d.	n.d.	4.3	6.2	
DT			3.4	4.4	4.0	5.3	
HT			3.9	3.8	n.d.	n.d.	

[0153] 如表7和8所示,在存在carbaNAD的情况下葡萄糖脱氢酶和心肌黄酶在18周时间的保存容许维持高酶活性,而在存在NAD的情况下酶的降解速率明显更为显著。

[0154] 实施例7

[0155] 为了确定NAD和carbaNAD 对各种脱氢酶的热稳定性的影响,酶(1 mg/ml)在第一个步骤中相对于相应的测量缓冲液在4℃透析20小时。随后将3.8 mM NAD或carbaNAD添加到样品中,样品保持在4℃。

[0156] 为了测定NAD或carbaNAD与各种脱氢酶的结合,进行了动力学的差示扫描量热法(DSC),其中量热扫描在20℃和100℃之间、以120℃/h的扫描率进行,每个样品测量三份。

[0157] 在进行测量之前根据MicroCal手册清洁和校准DSC设备以确保正确操作。在每个扫描过程之前和之后,在0.1 M甘氨酸-HCl pH 2.4中的溶菌酶(1 mg/ml)测量双份作为对照。测量池、阀门和注射器在每六次注射之后用水洗涤三次。使用MicroCal Origin软件分析数据。

[0158] Tris缓冲液pH 8.0中的葡萄糖脱氢酶突变体2在没有以及存在NAD的情况下产生明确界限的峰,没有NAD时熔点(T_m)是79.1℃,存在NAD时80.8℃。因而,葡萄糖脱氢酶突变2与NAD的结合引起超过1.5℃的 T_m 移位。除了醇脱氢酶之外,在其他脱氢酶的情况下例如对于野生型葡萄糖脱氢酶来说,当酶与NAD或carbaNAD接触时 T_m 也提高。

[0159] 表8显示了通过DSC分析对各种脱氢酶获得的数据,其中在每种情况下选择实验条件,所述条件产生在DSC谱中的单个峰。NAD或carbaNAD与脱氢酶结合的效果在每种情况下与不存在辅酶(配体)的扫描相比较。如果没有另外说明,在每种情况下0.1 M Tris缓冲液pH 8.5用作测量缓冲液。

[0160] 表8

[0161]

脱氢酶	配体	ΔH_{cat} (kcal/mol)	T_M (°C)
醇脱氢酶 *	---	260	55.5
	NAD	300	55.5
	carbaNAD	310	55.4
葡萄糖脱氢酶(野生型)	---	64	52.8
	NAD	110	63.5
	carbaNAD	84	58.5
D-乳酸脱氢酶 ≠	---	18	58.4
	NAD	19	60.4
	carbaNAD	19	59.1
L-乳酸脱氢酶(猪的)	---	80	59.8
	NAD	85	61.8
	carbaNAD	82	61.5
L-乳酸脱氢酶 (来自兔)	---	64	58.2
	NAD	72	60.1
	carbaNAD	66	60.2
苹果酸脱氢酶 ‡	---	310	42.4
	NAD	380	45.1
	carbaNAD	340	43.2

[0162] * 0.75 M 甘氨酸焦磷酸钠, pH 9.0

[0163] ≠ 0.1 M Tris缓冲液, pH 7.5

[0164] ‡ 0.5 M 碳酸盐缓冲液, pH值10.0。

[0001]	序列表			
[0002]	<110>	F. Hoffmann - La Roche AG		
[0003]		Roche Diagnostics GmbH		
[0004]	<120>	利用稳定辅酶的酶的稳定化		
[0005]	<130>	46200P WO		
[0006]	<150>	EP 09 168 327.6		
[0007]	<151>	2009-08-20		
[0008]	<160>	2		
[0009]	<170>	PatentIn version 3.3		
[0010]	<210>	1		
[0011]	<211>	261		
[0012]	<212>	PRT		
[0013]	<213>	人工的		
[0014]	<220>			
[0015]	<223>	来自枯草芽孢杆菌的葡糖脱氢酶的突变体		
[0016]	<220>			
[0017]	<221>	诱变原		
[0018]	<222>	(96) .. (96)		
[0019]	<220>			
[0020]	<221>	诱变原		
[0021]	<222>	(170) .. (170)		
[0022]	<400>	1		
[0023]	Met Tyr Pro Asp Leu Lys Gly Lys Val Val Ala Ile Thr Gly Ala Ala			
[0024]	1	5	10	15
[0025]	Ser Gly Leu Gly Lys Ala Met Ala Ile Arg Phe Gly Lys Glu Gln Ala			
[0026]		20	25	30
[0027]	Lys Val Val Ile Asn Tyr Tyr Ser Asn Lys Gln Asp Pro Asn Glu Val			
[0028]		35	40	45
[0029]	Lys Glu Glu Val Ile Lys Ala Gly Gly Glu Ala Val Val Val Gln Gly			
[0030]		50	55	60
[0031]	Asp Val Thr Lys Glu Glu Asp Val Lys Asn Ile Val Gln Thr Ala Ile			
[0032]		65	70	75
[0033]	Lys Glu Phe Gly Thr Leu Asp Ile Met Ile Asn Asn Ala Gly Leu Gly			
[0034]		85	90	95
[0035]	Asn Pro Val Pro Ser His Glu Met Pro Leu Lys Asp Trp Asp Lys Val			
[0036]		100	105	110
[0037]	Ile Gly Thr Asn Leu Thr Gly Ala Phe Leu Gly Ser Arg Glu Ala Ile			
[0038]		115	120	125

[0039]	Lys Tyr Phe Val Glu Asn Asp Ile Lys Gly Asn Val Ile Asn Met Ser
[0040]	130 135 140
[0041]	Ser Val His Glu Val Ile Pro Trp Pro Leu Phe Val His Tyr Ala Ala
[0042]	145 150 155 160
[0043]	Ser Lys Gly Gly Ile Lys Leu Met Thr Lys Thr Leu Ala Leu Glu Tyr
[0044]	165 170 175
[0045]	Ala Pro Lys Gly Ile Arg Val Asn Asn Ile Gly Pro Gly Ala Ile Asn
[0046]	180 185 190
[0047]	Thr Pro Ile Asn Ala Glu Lys Phe Ala Asp Pro Lys Gln Lys Ala Asp
[0048]	195 200 205
[0049]	Val Glu Ser Met Ile Pro Met Gly Tyr Ile Gly Glu Pro Glu Glu Ile
[0050]	210 215 220
[0051]	Ala Ala Val Ala Val Trp Leu Ala Ser Lys Glu Ser Ser Tyr Val Thr
[0052]	225 230 235 240
[0053]	Gly Ile Thr Leu Phe Ala Asp Gly Gly Met Thr Lys Tyr Pro Ser Phe
[0054]	245 250 255
[0055]	Gln Ala Gly Arg Gly
[0056]	260
[0057]	<210> 2
[0058]	<211> 261
[0059]	<212> PRT
[0060]	<213> 人工的
[0061]	<220>
[0062]	<223> 来自枯草芽孢杆菌的葡萄糖脱氢酶的突变体
[0063]	<220>
[0064]	<221> 诱变原
[0065]	<222> (170) .. (170)
[0066]	<220>
[0067]	<221> 诱变原
[0068]	<222> (252) .. (252)
[0069]	<400> 2
[0070]	Met Tyr Pro Asp Leu Lys Gly Lys Val Val Ala Ile Thr Gly Ala Ala
[0071]	1 5 10 15
[0072]	Ser Gly Leu Gly Lys Ala Met Ala Ile Arg Phe Gly Lys Glu Gln Ala
[0073]	20 25 30
[0074]	Lys Val Val Ile Asn Tyr Tyr Ser Asn Lys Gln Asp Pro Asn Glu Val
[0075]	35 40 45
[0076]	Lys Glu Glu Val Ile Lys Ala Gly Gly Glu Ala Val Val Val Gln Gly
[0077]	50 55 60

[0078]	Asp Val Thr Lys Glu Glu Asp Val Lys Asn Ile Val Gln Thr Ala Ile
[0079]	65 70 75 80
[0080]	Lys Glu Phe Gly Thr Leu Asp Ile Met Ile Asn Asn Ala Gly Leu Glu
[0081]	85 90 95
[0082]	Asn Pro Val Pro Ser His Glu Met Pro Leu Lys Asp Trp Asp Lys Val
[0083]	100 105 110
[0084]	Ile Gly Thr Asn Leu Thr Gly Ala Phe Leu Gly Ser Arg Glu Ala Ile
[0085]	115 120 125
[0086]	Lys Tyr Phe Val Glu Asn Asp Ile Lys Gly Asn Val Ile Asn Met Ser
[0087]	130 135 140
[0088]	Ser Val His Glu Val Ile Pro Trp Pro Leu Phe Val His Tyr Ala Ala
[0089]	145 150 155 160
[0090]	Ser Lys Gly Gly Ile Lys Leu Met Thr Lys Thr Leu Ala Leu Glu Tyr
[0091]	165 170 175
[0092]	Ala Pro Lys Gly Ile Arg Val Asn Asn Ile Gly Pro Gly Ala Ile Asn
[0093]	180 185 190
[0094]	Thr Pro Ile Asn Ala Glu Lys Phe Ala Asp Pro Lys Gln Lys Ala Asp
[0095]	195 200 205
[0096]	Val Glu Ser Met Ile Pro Met Gly Tyr Ile Gly Glu Pro Glu Glu Ile
[0097]	210 215 220
[0098]	Ala Ala Val Ala Val Trp Leu Ala Ser Lys Glu Ser Ser Tyr Val Thr
[0099]	225 230 235 240
[0100]	Gly Ile Thr Leu Phe Ala Asp Gly Gly Met Thr Leu Tyr Pro Ser Phe
[0101]	245 250 255
[0102]	Gln Ala Gly Arg Gly
[0103]	260

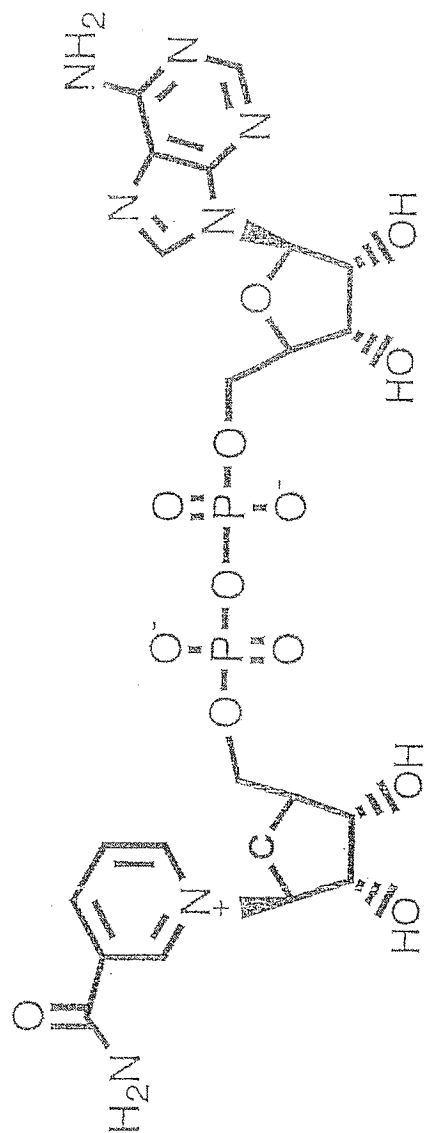


图 1A

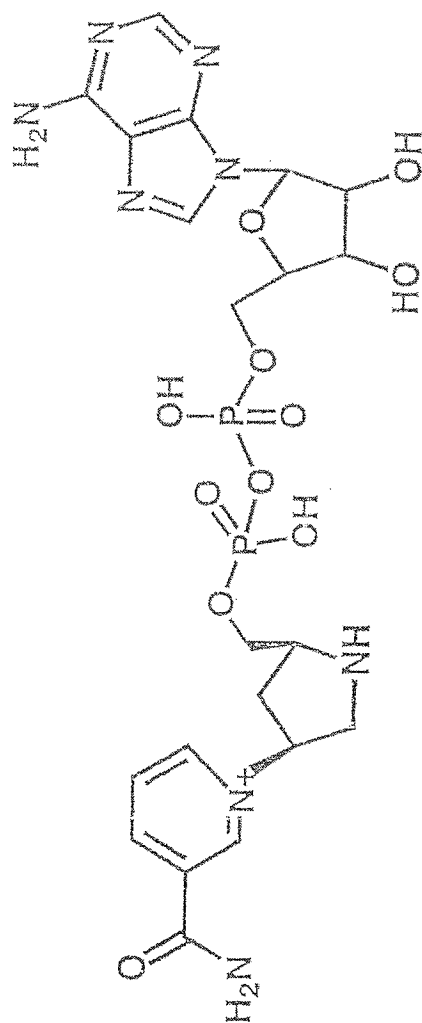


图 1B

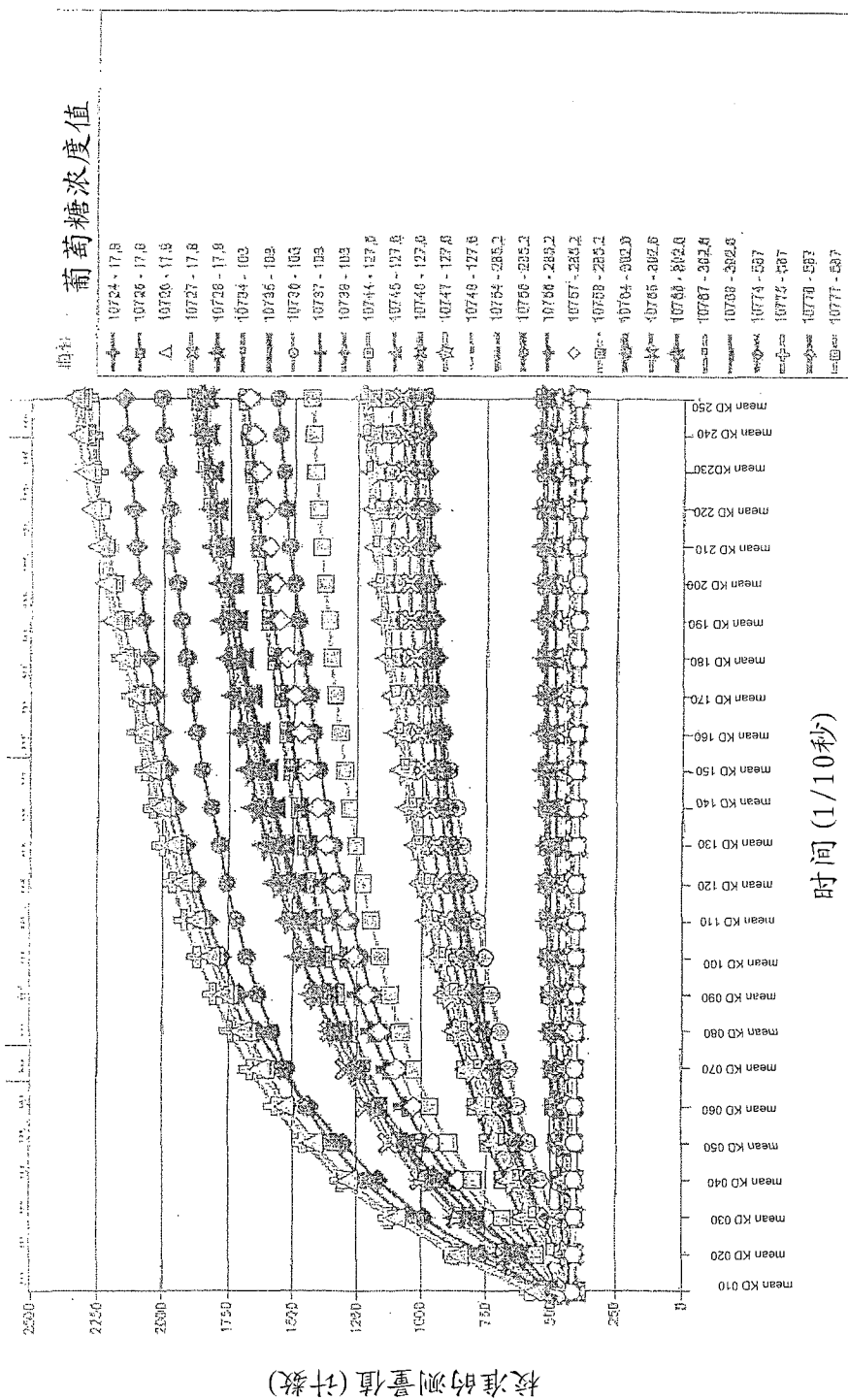


图 2A

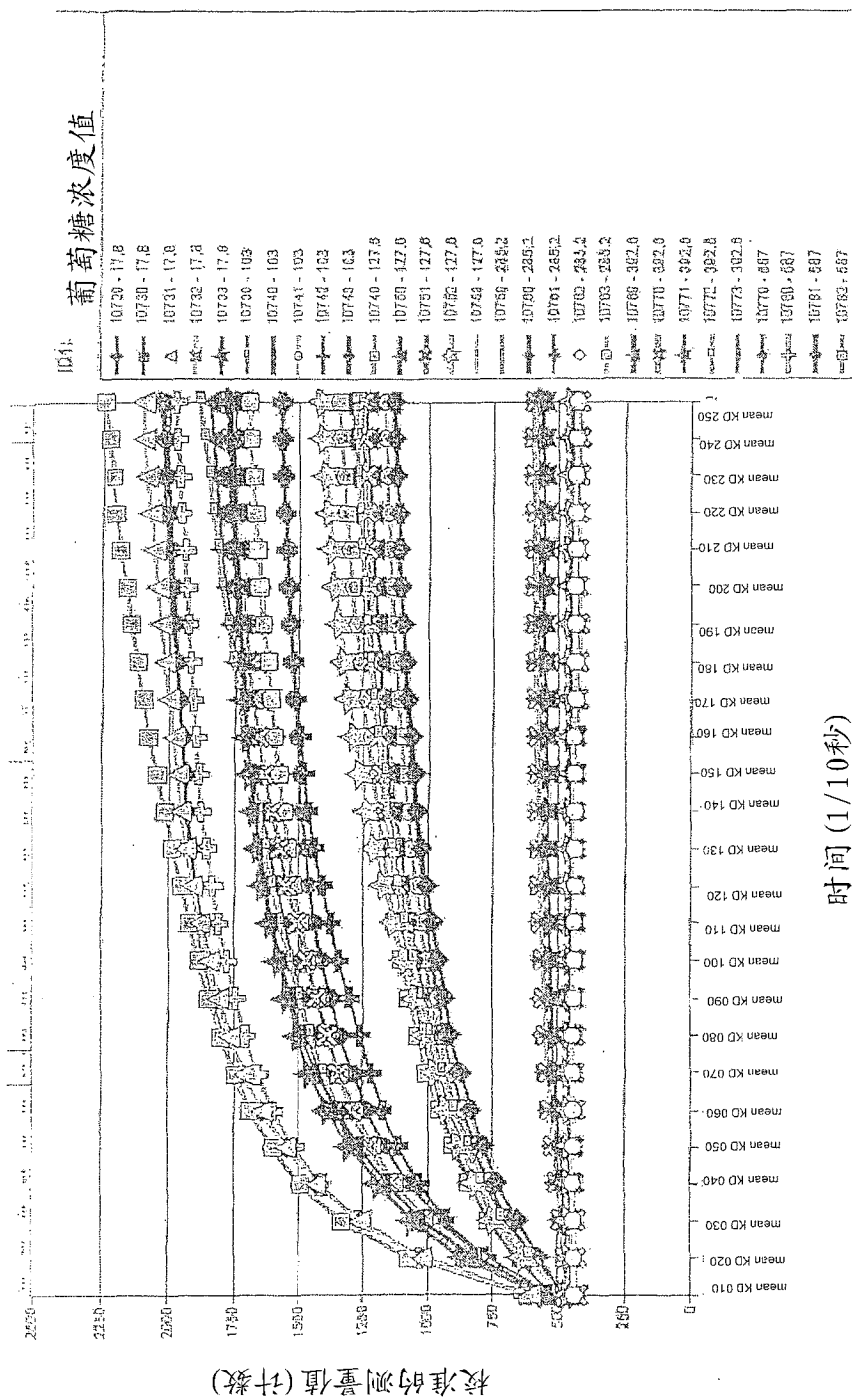


图 2B

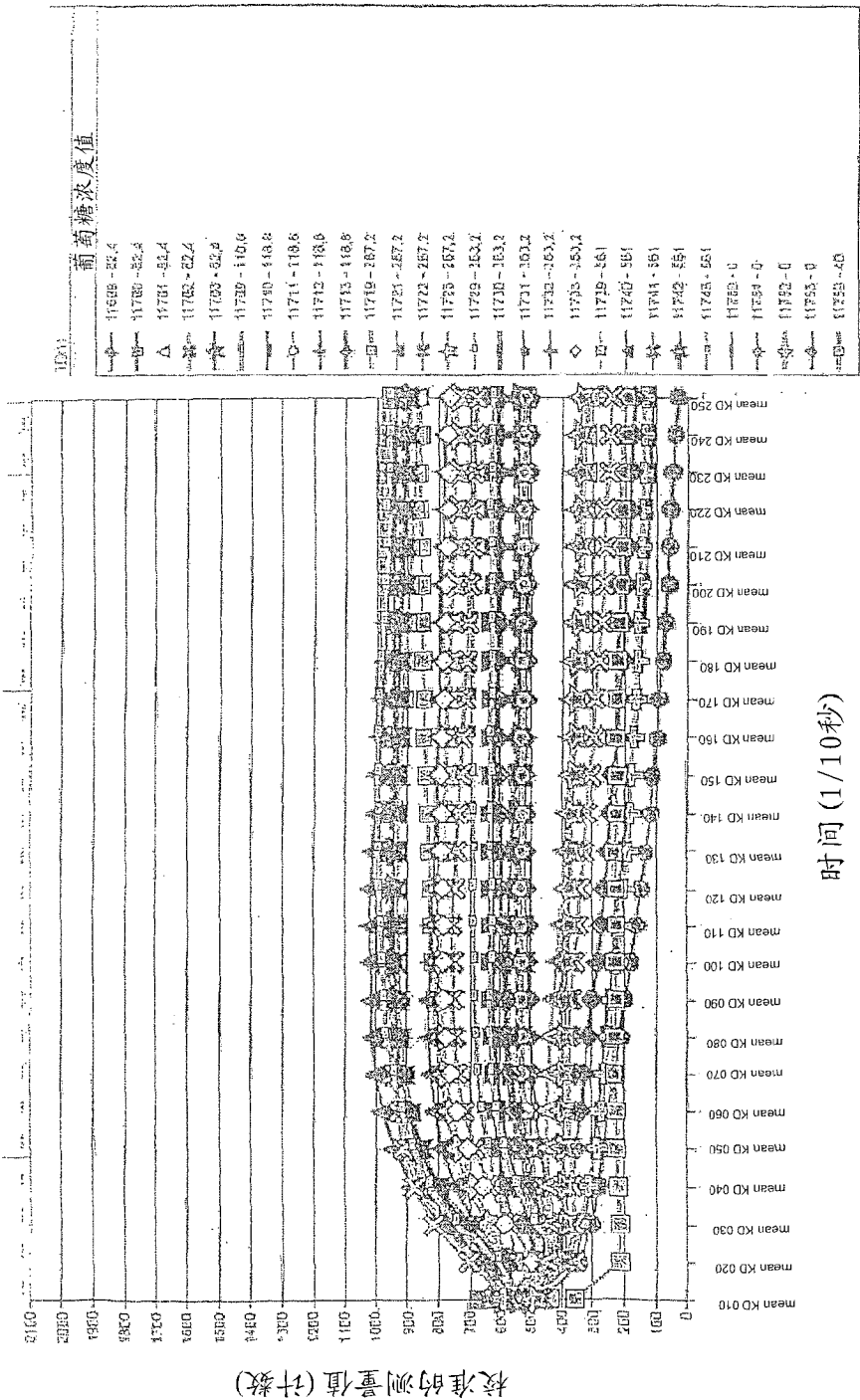


图 2C

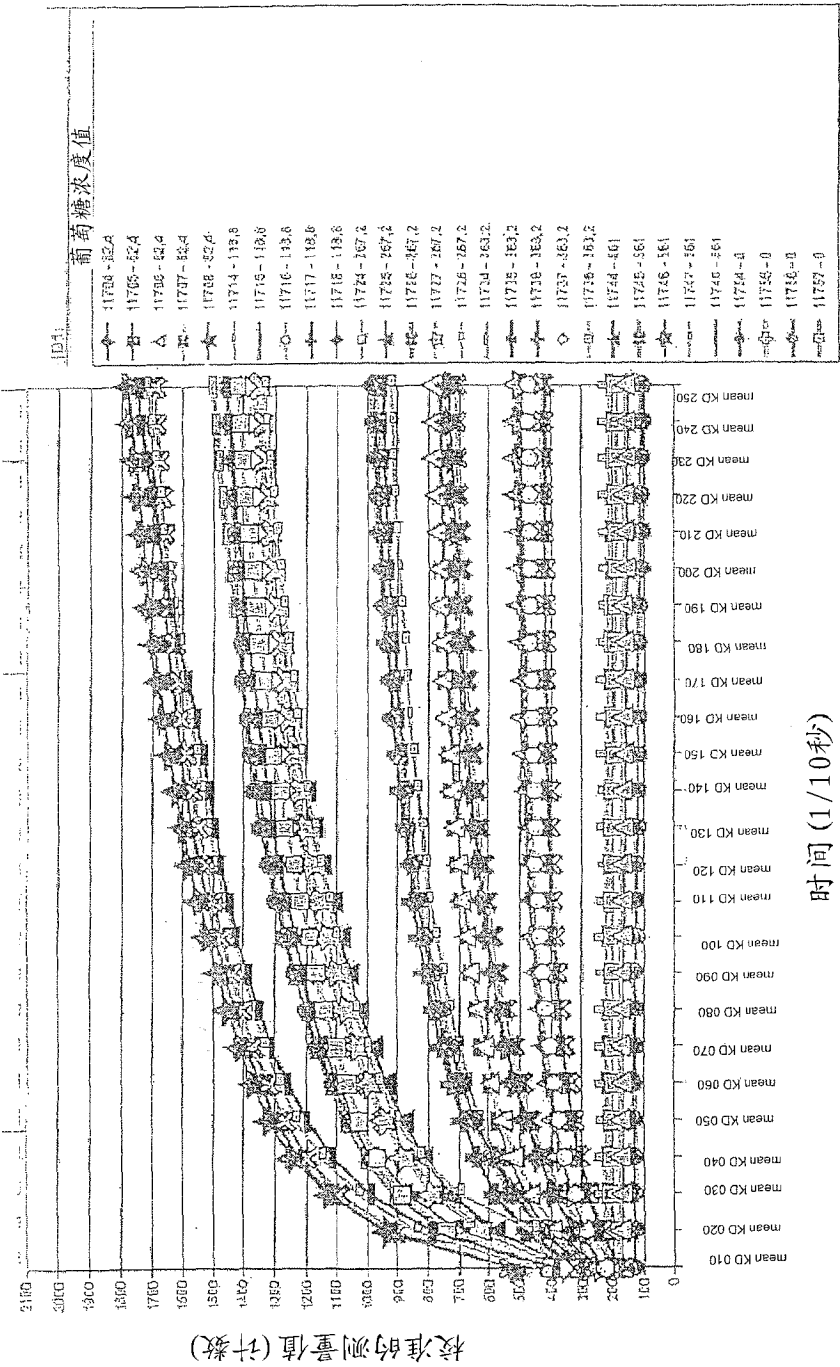


图 2D

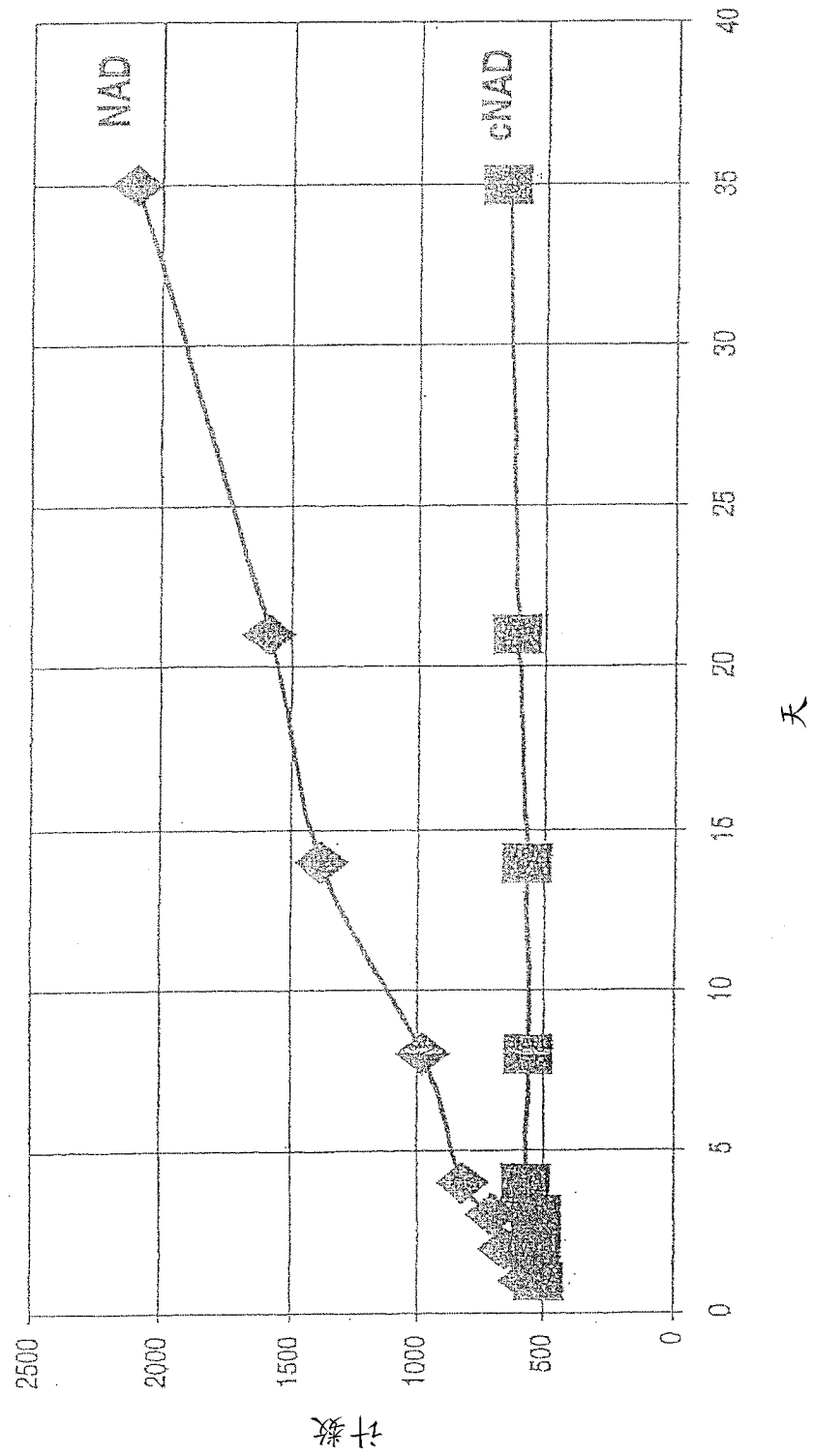


图 3

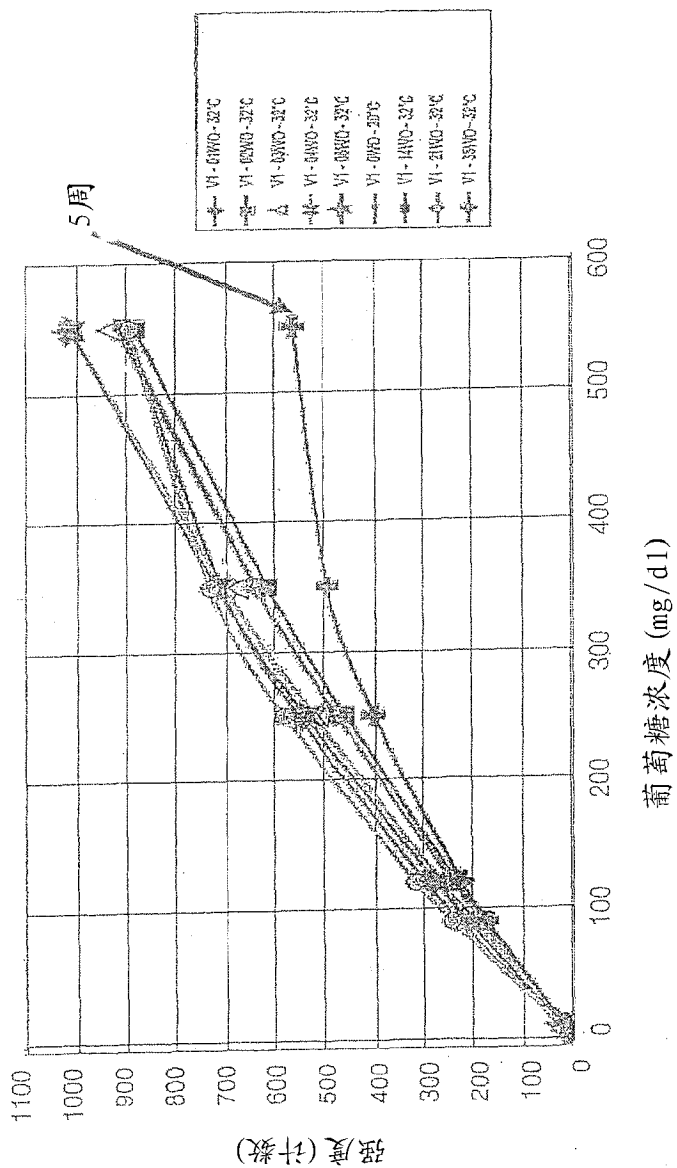


图 4

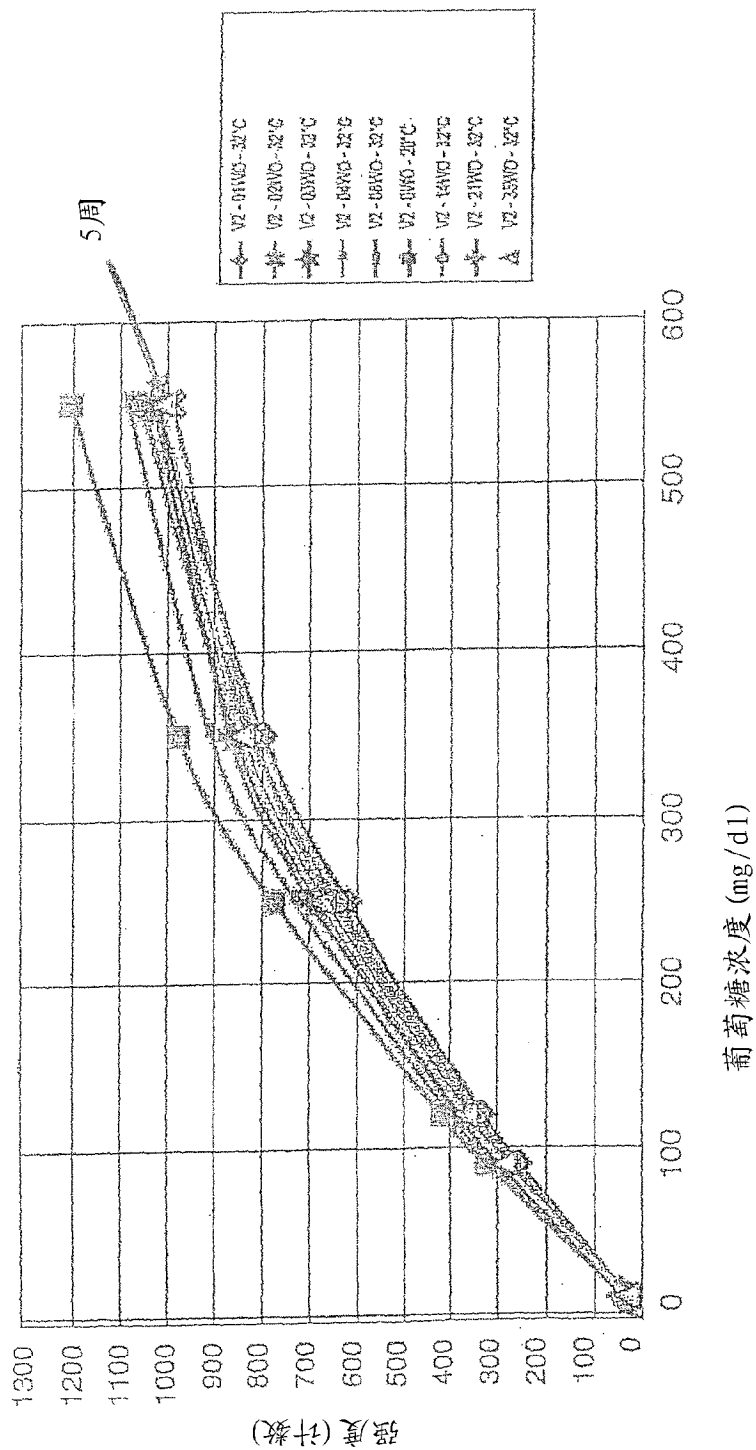


图 5A

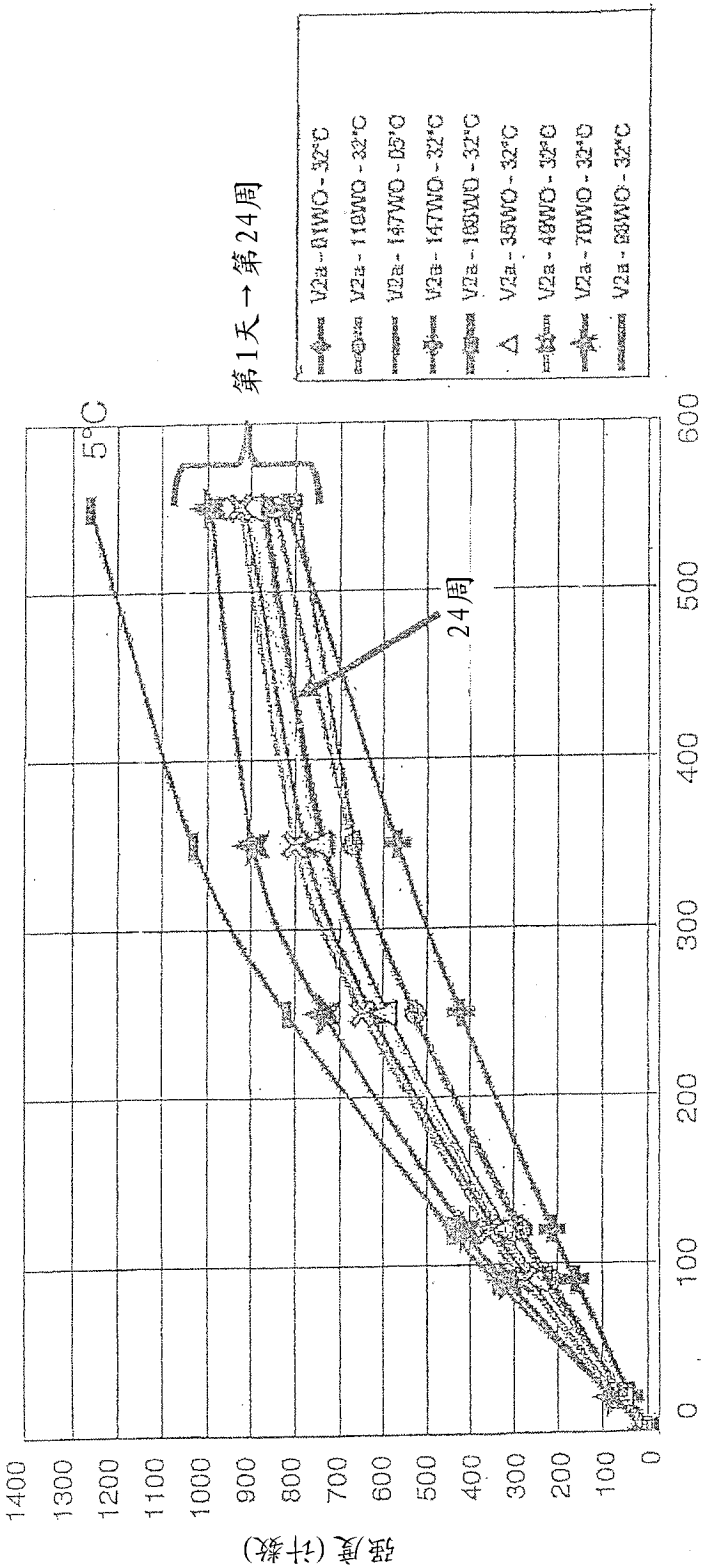


图 5B

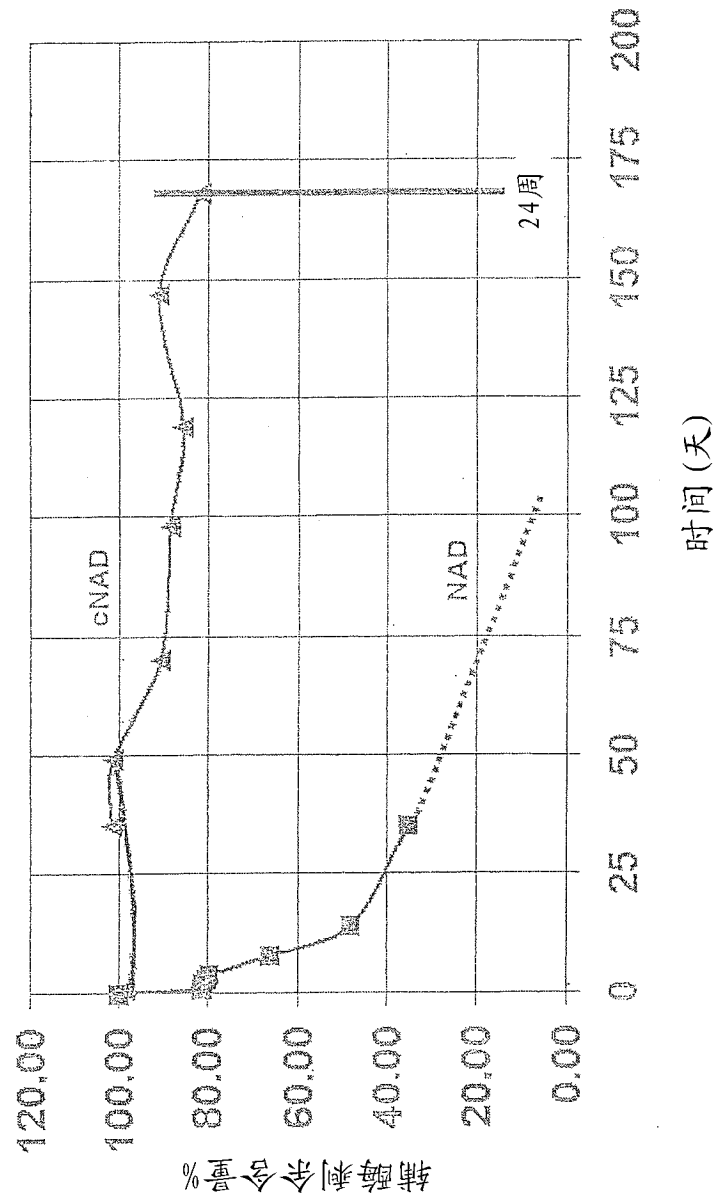


图 6

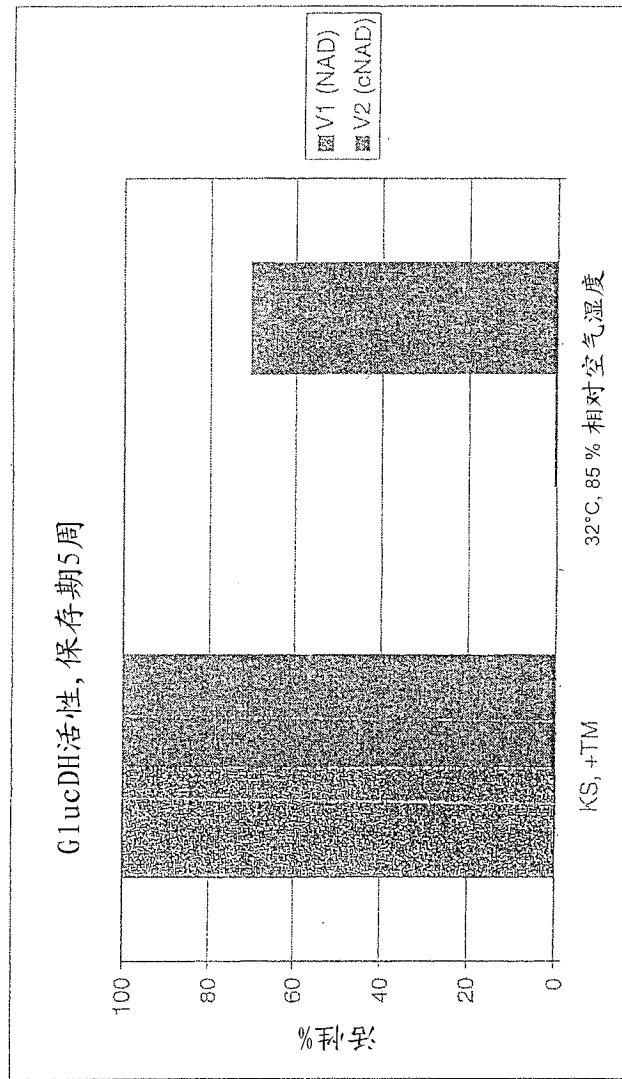


图 7A

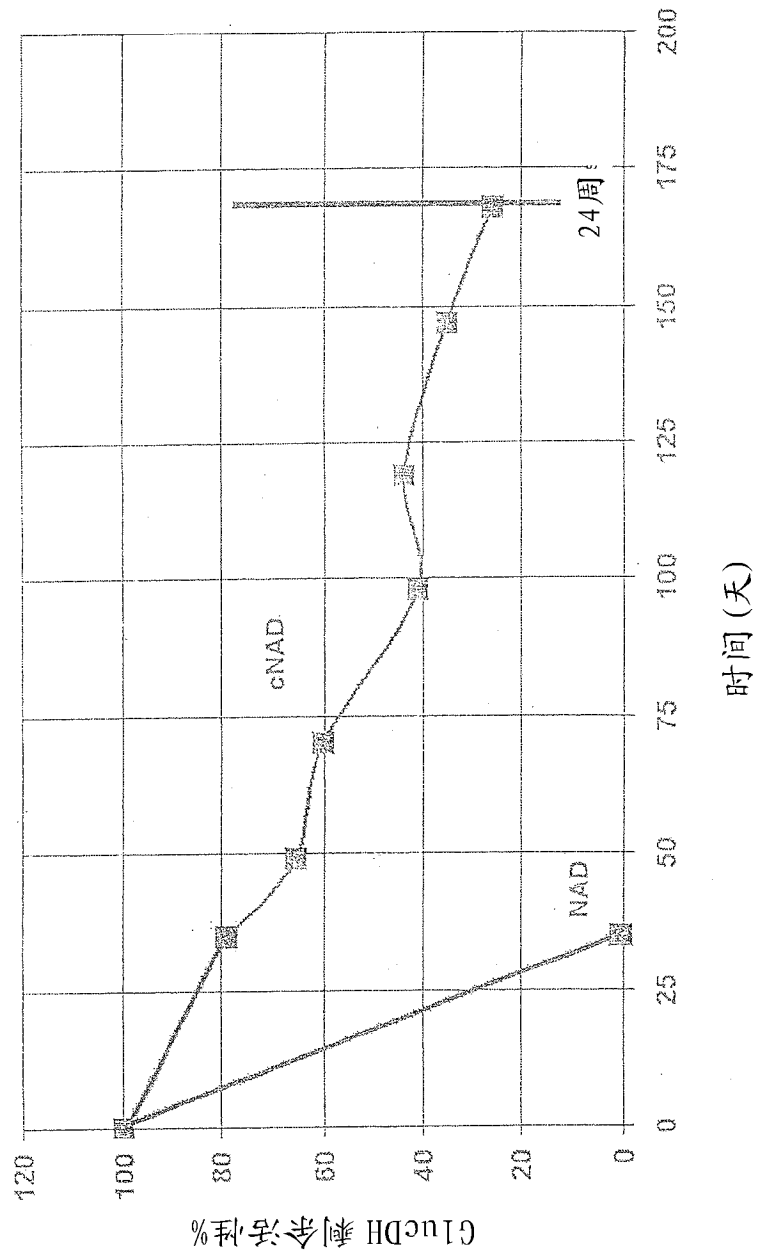


图 7B

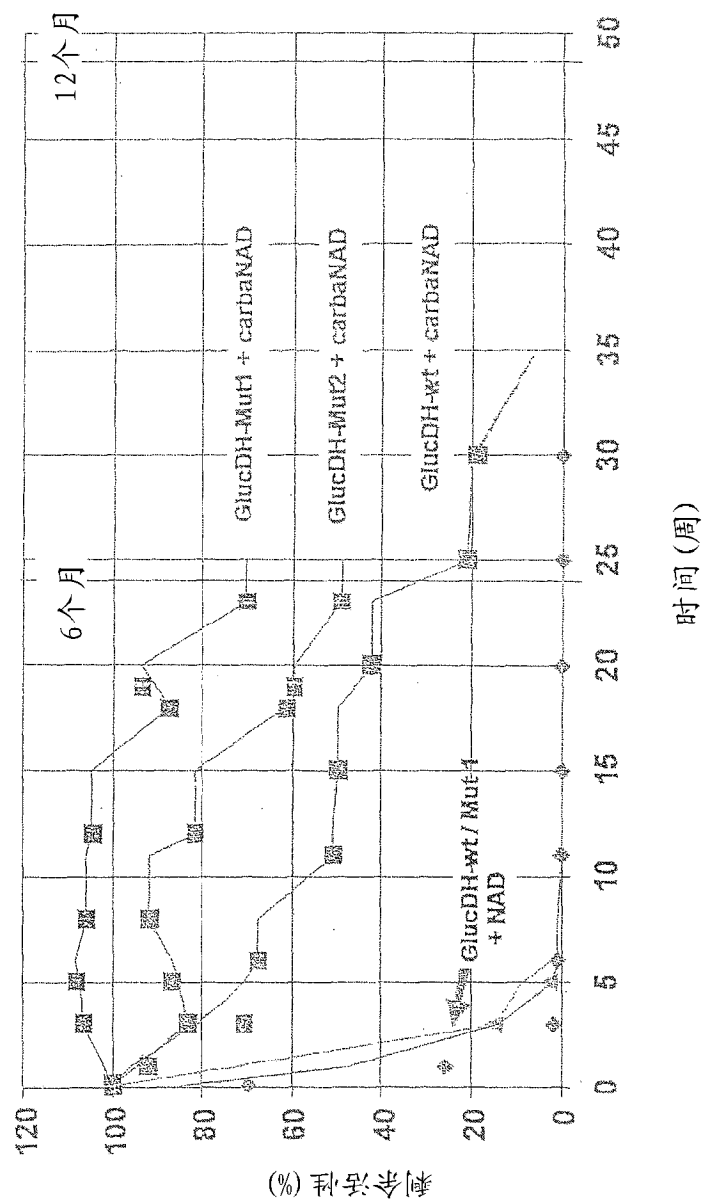


图 8

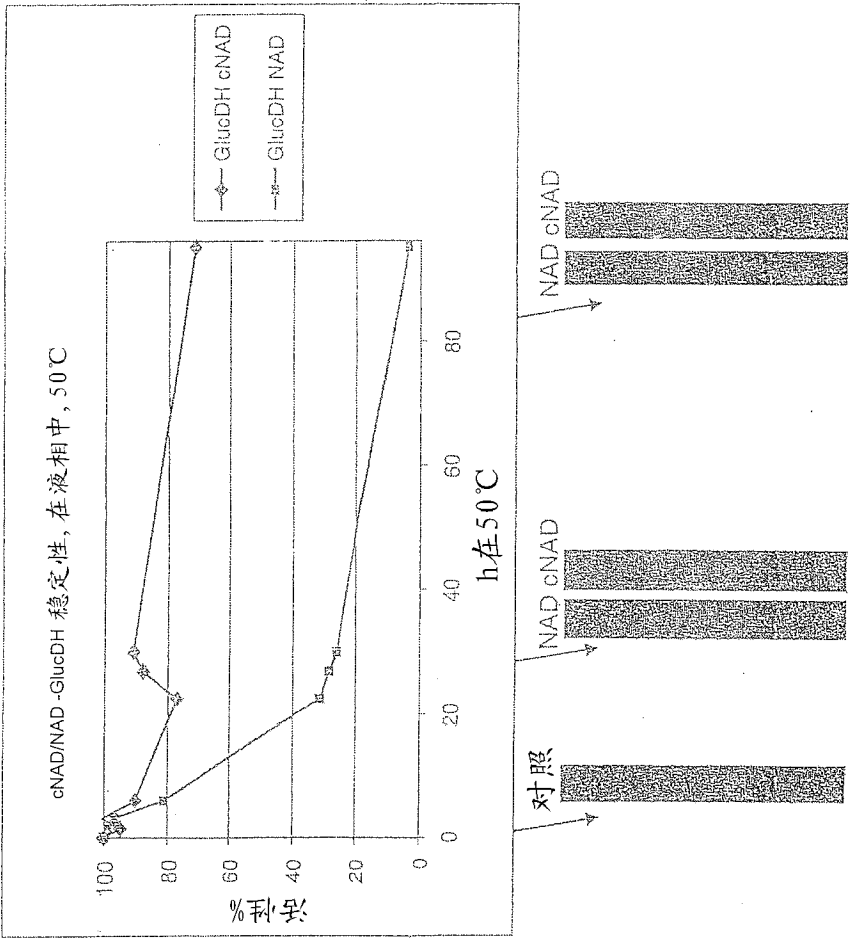


图 9A

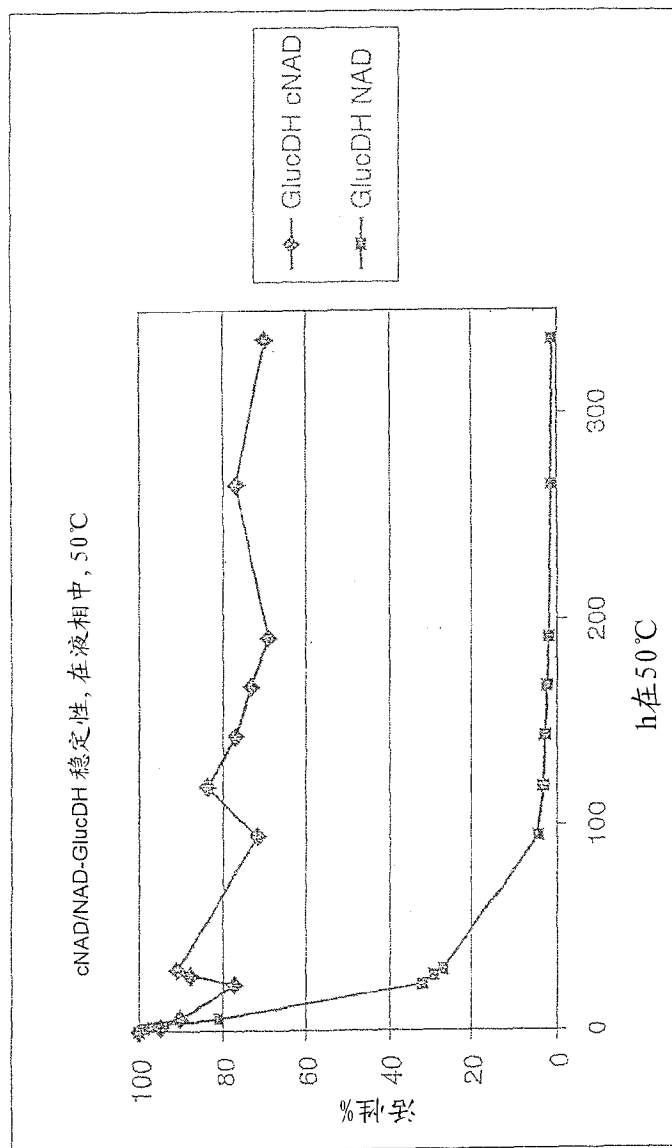


图 9B

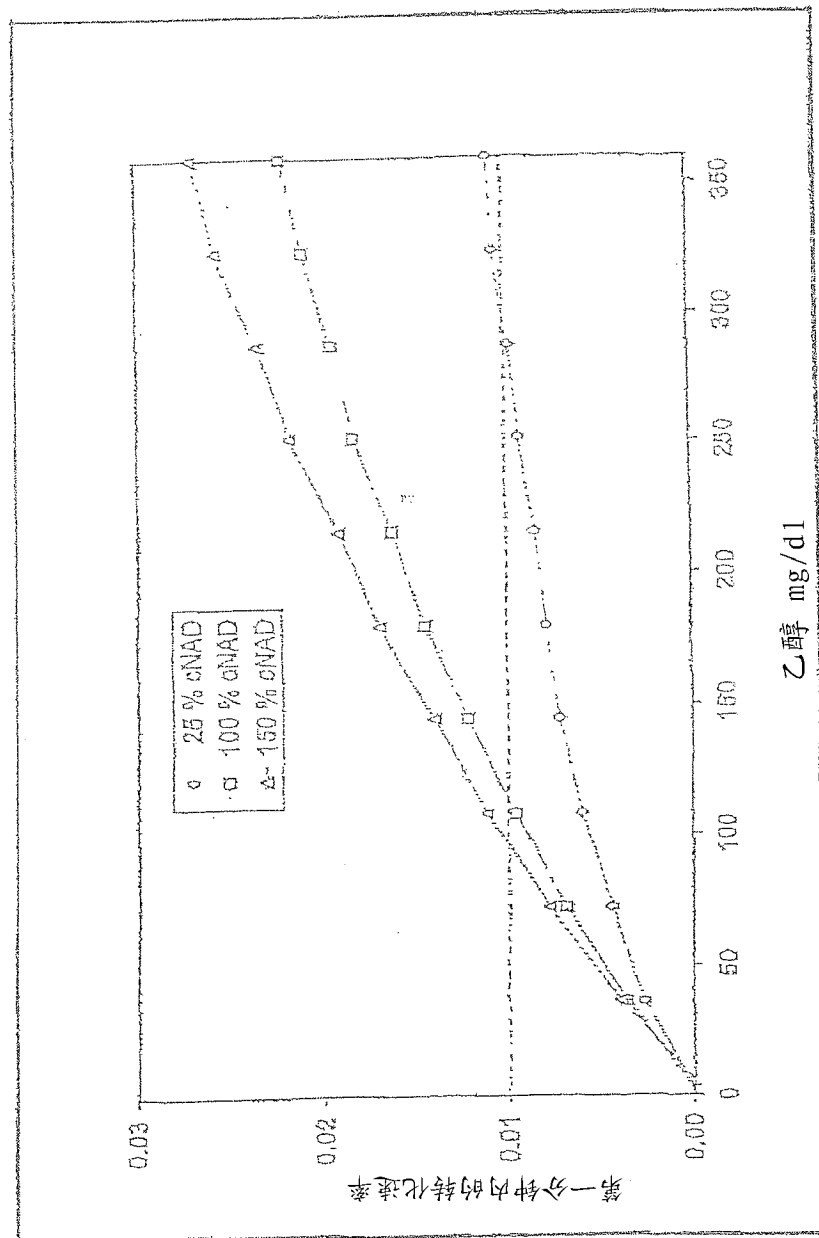


图 10

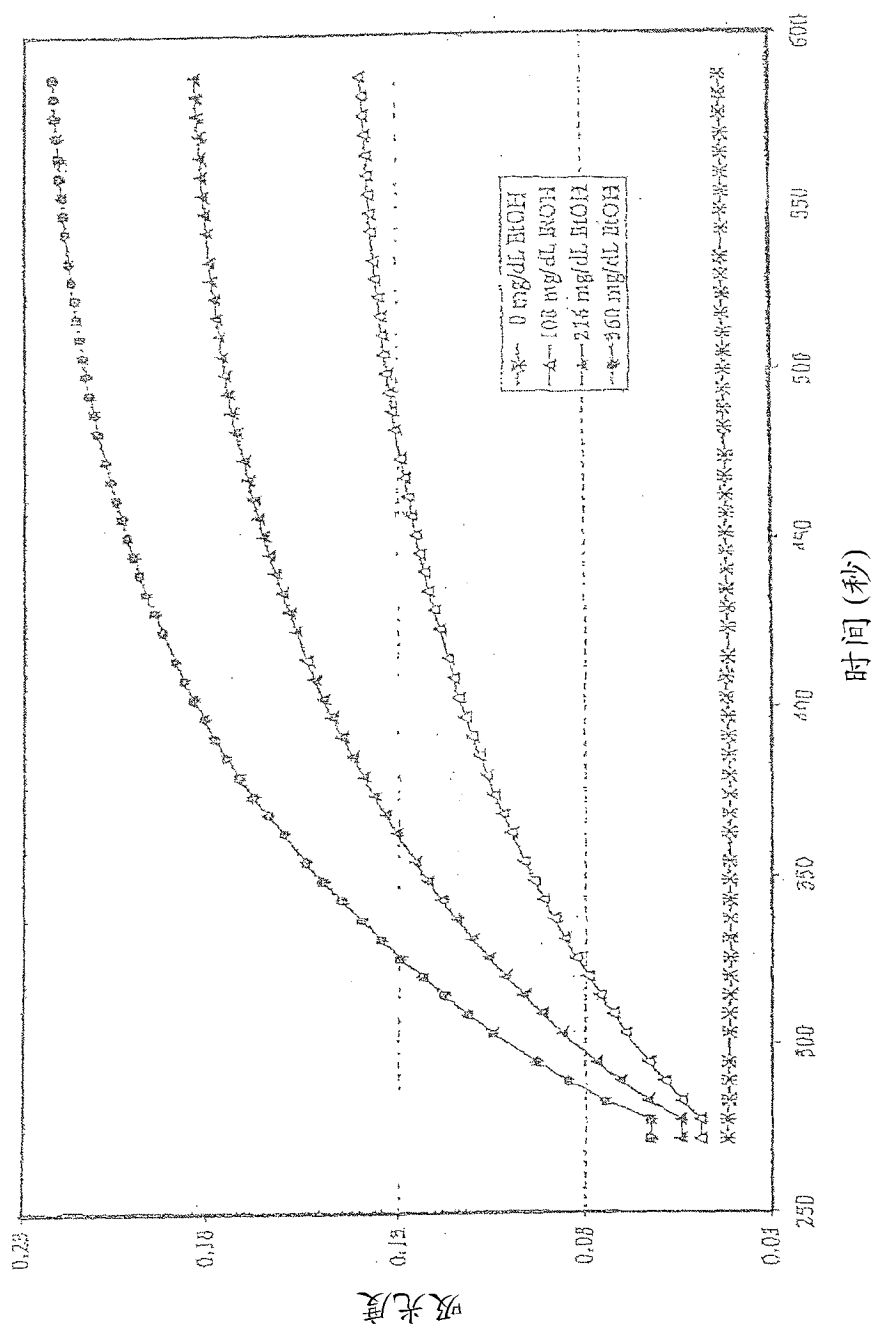


图 11

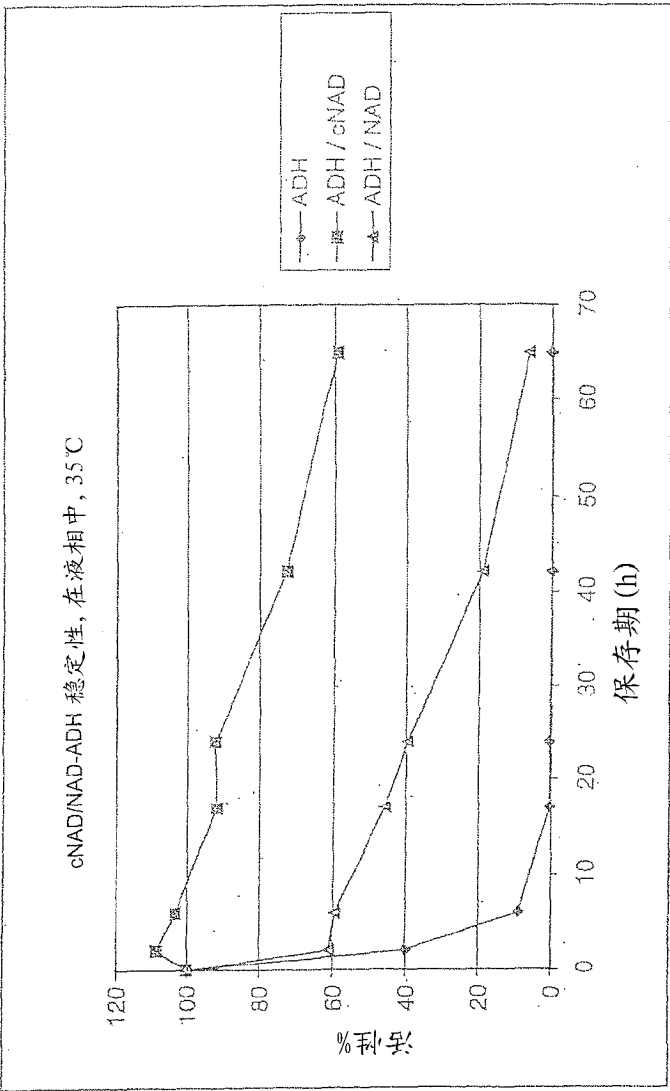


图 12

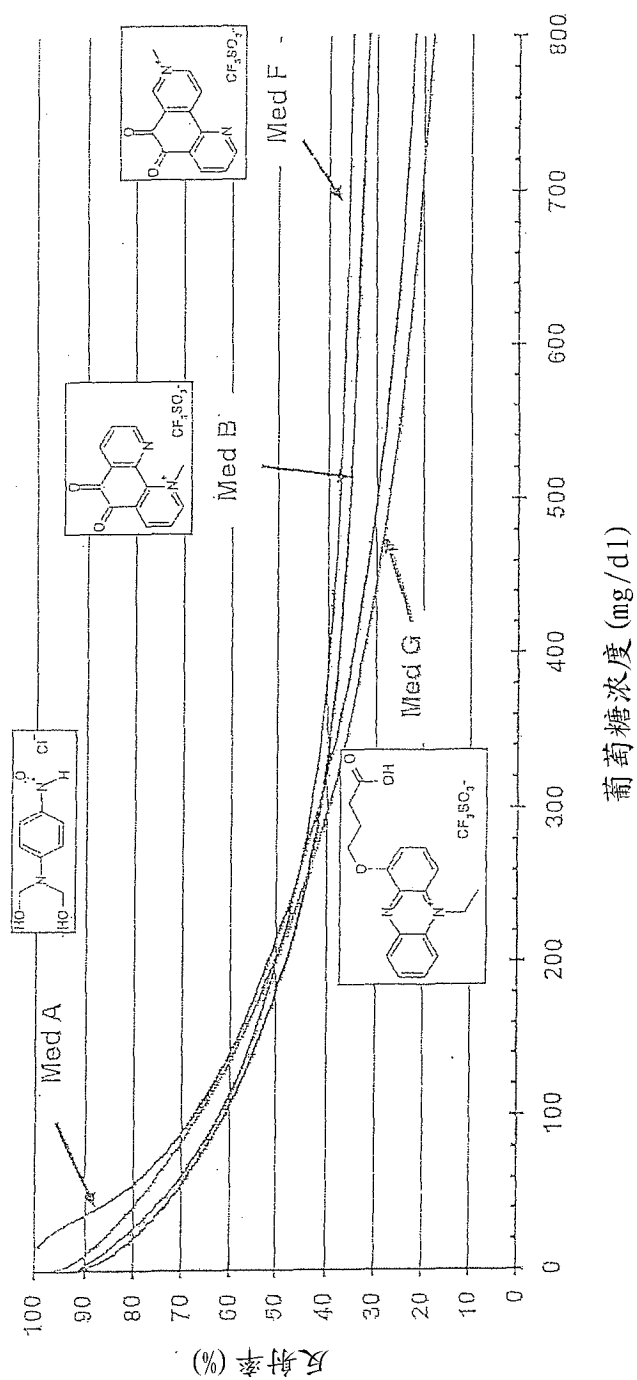


图 13

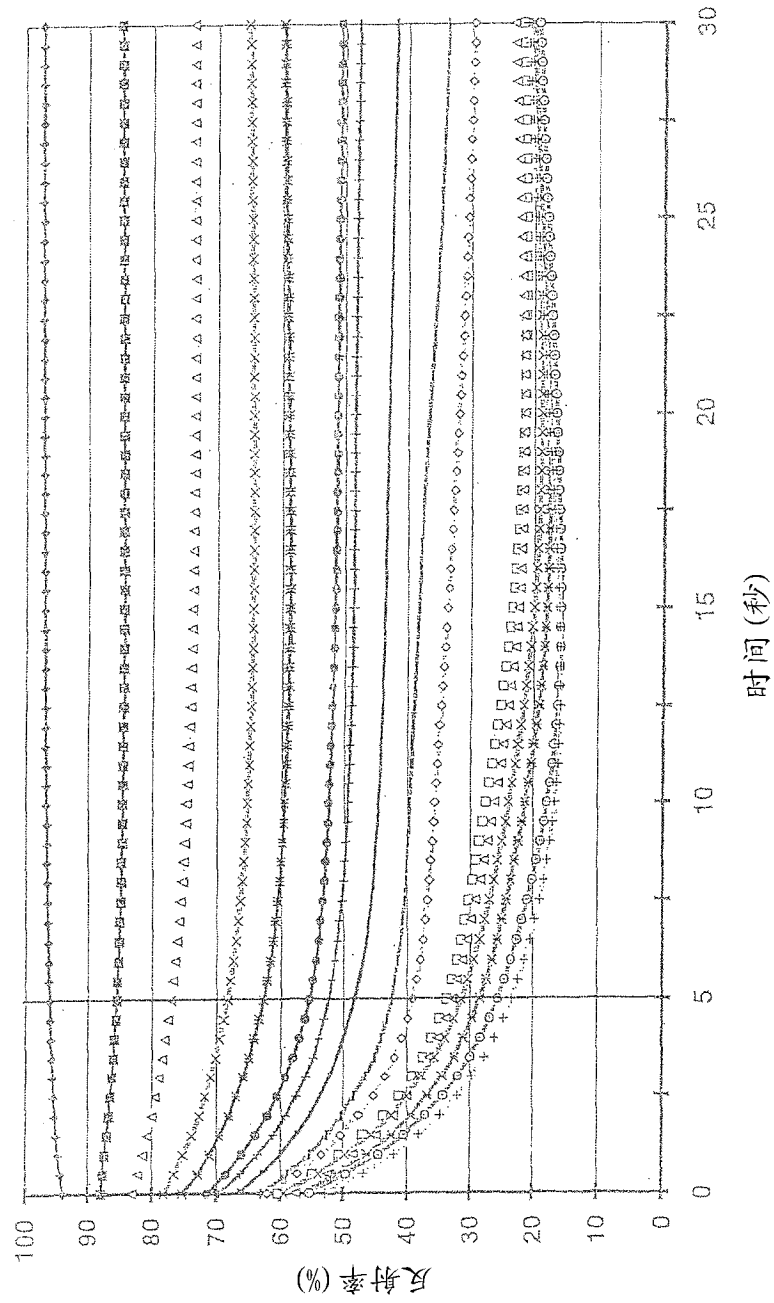


图 14

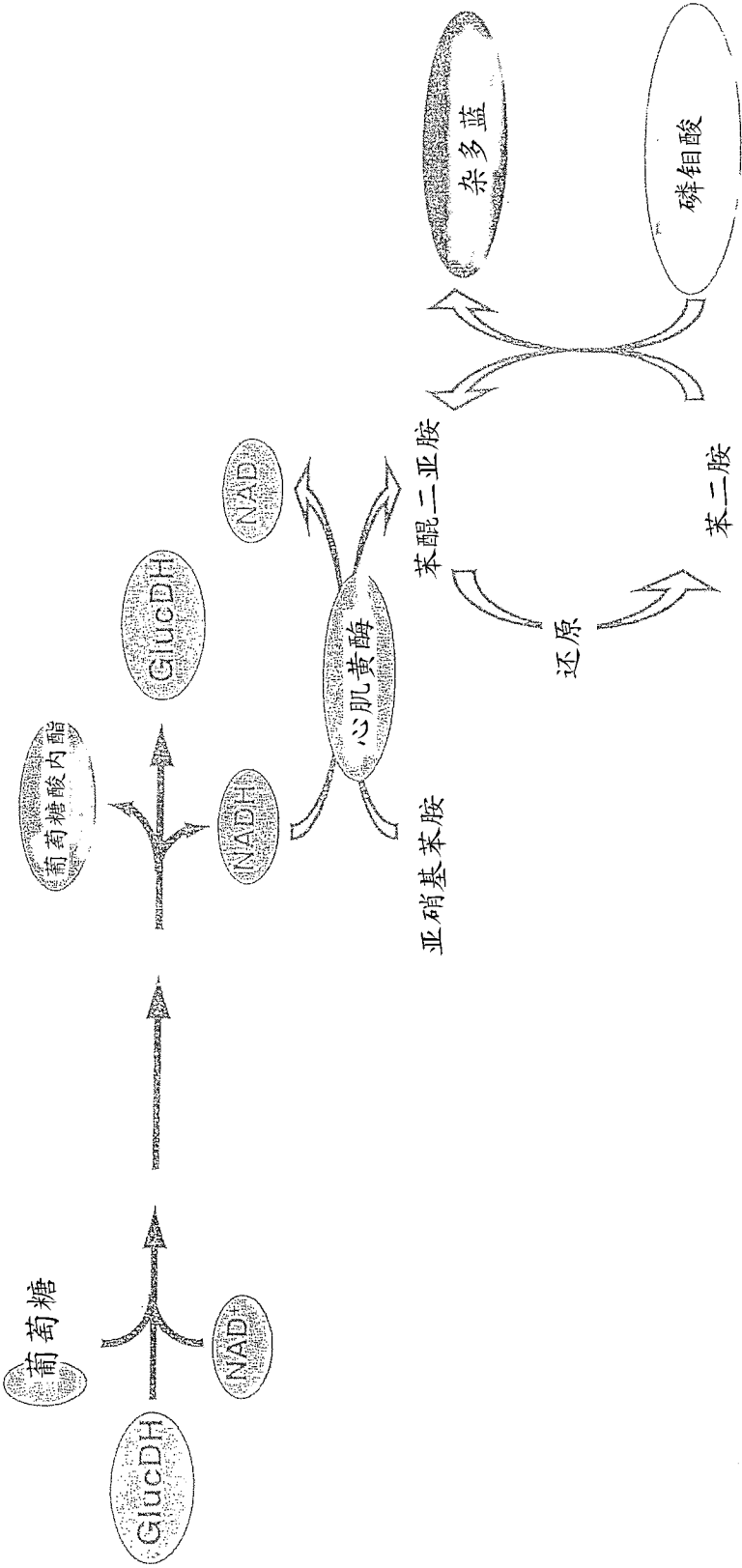


图 15

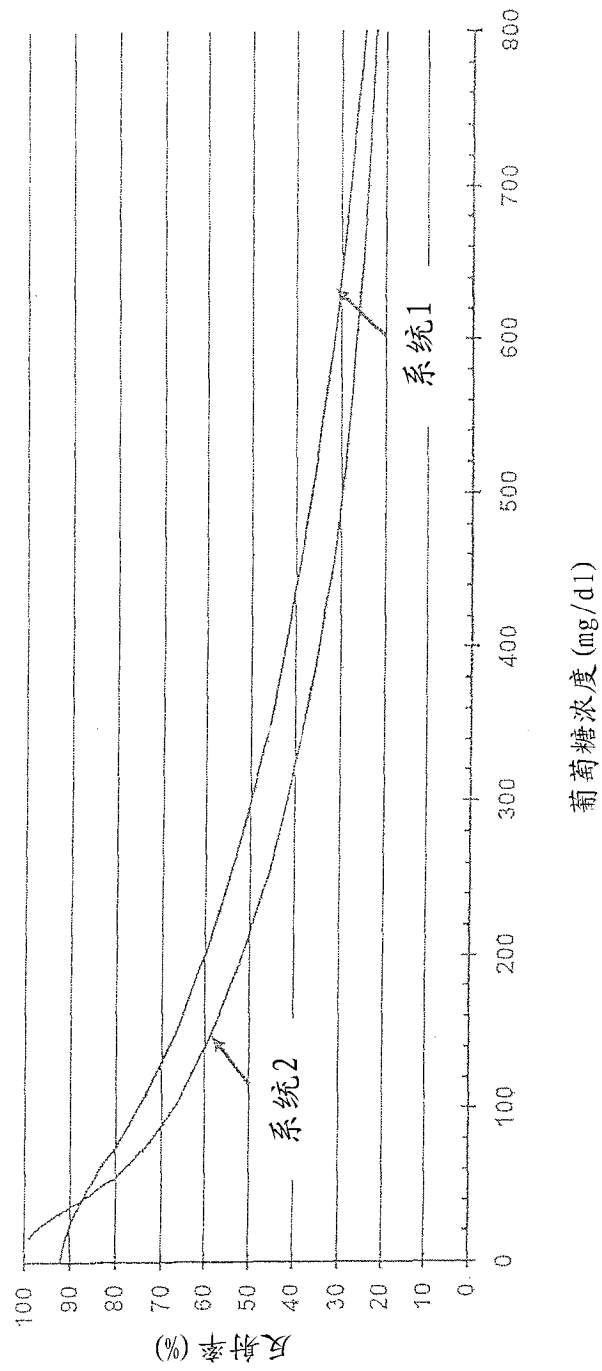


图 16

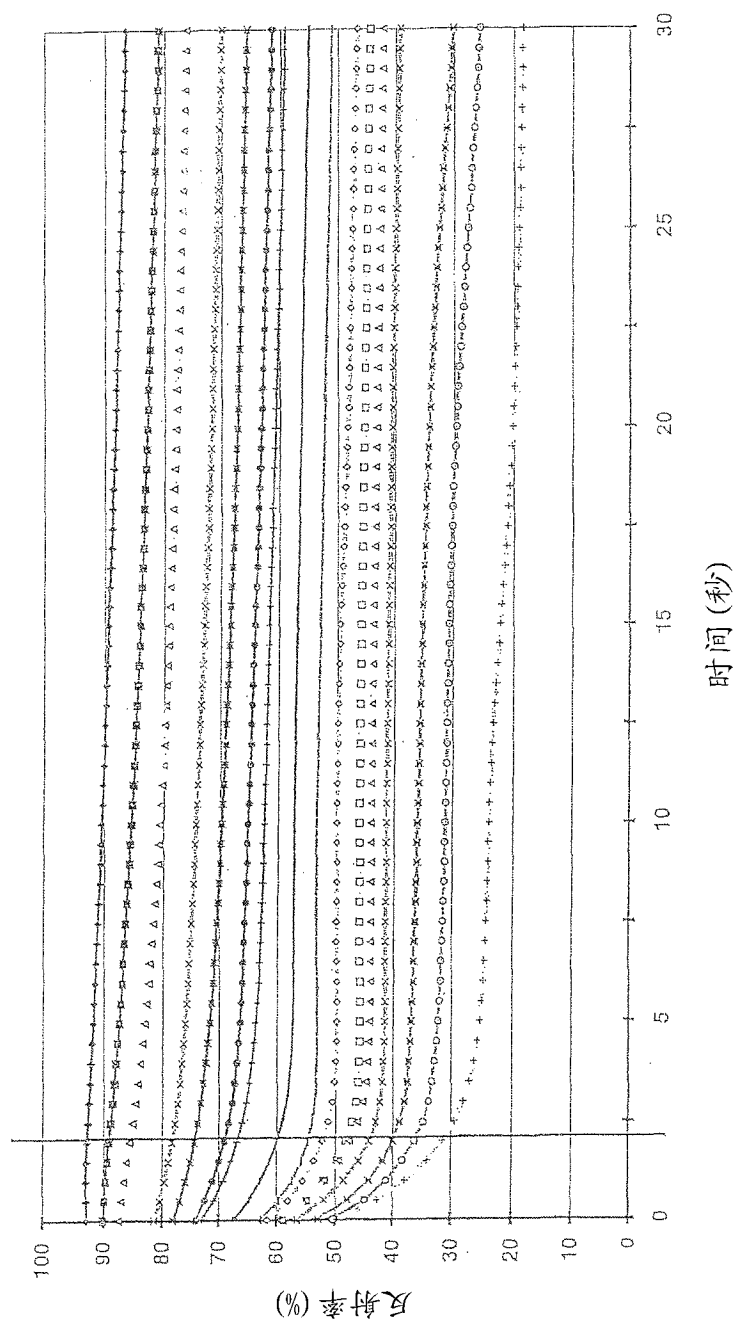


图 17

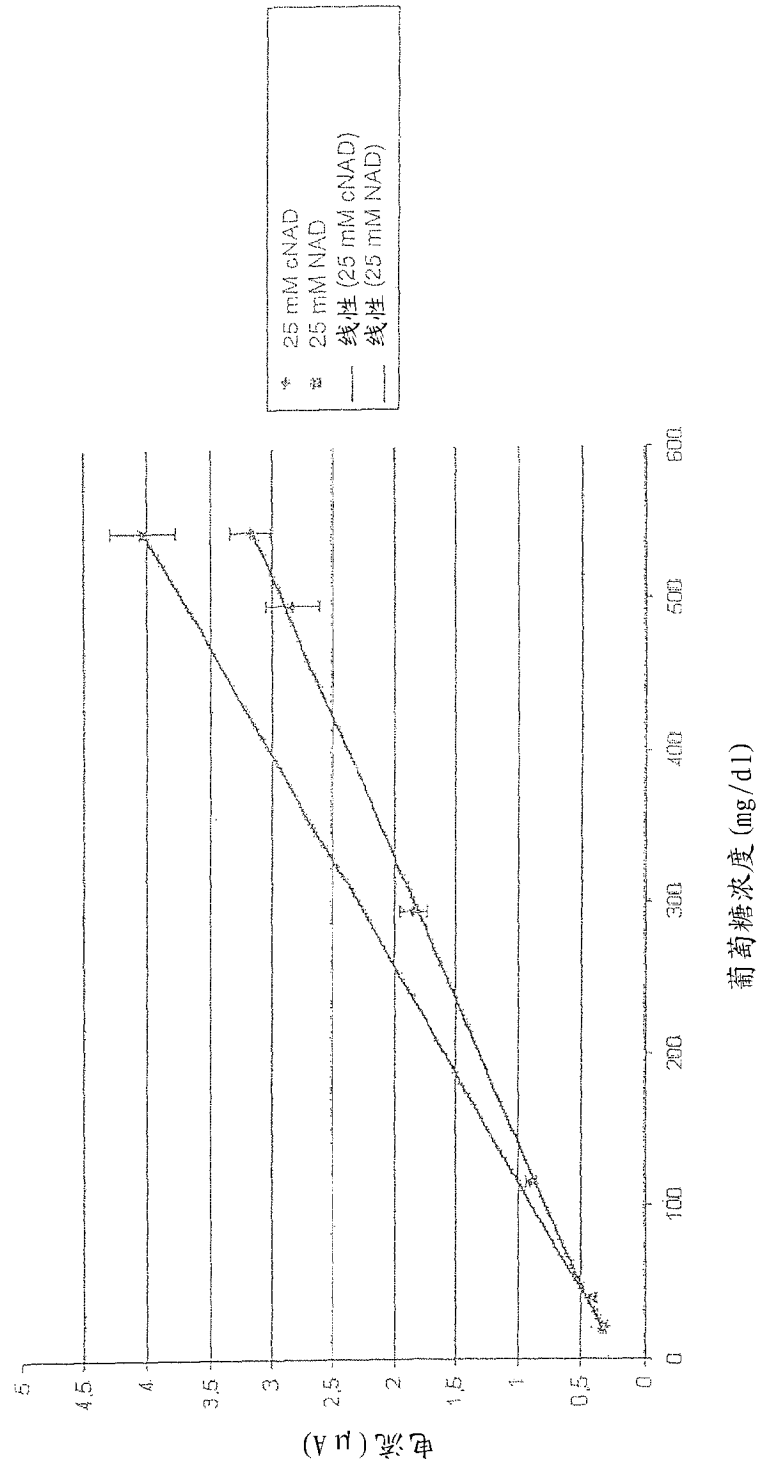


图 18

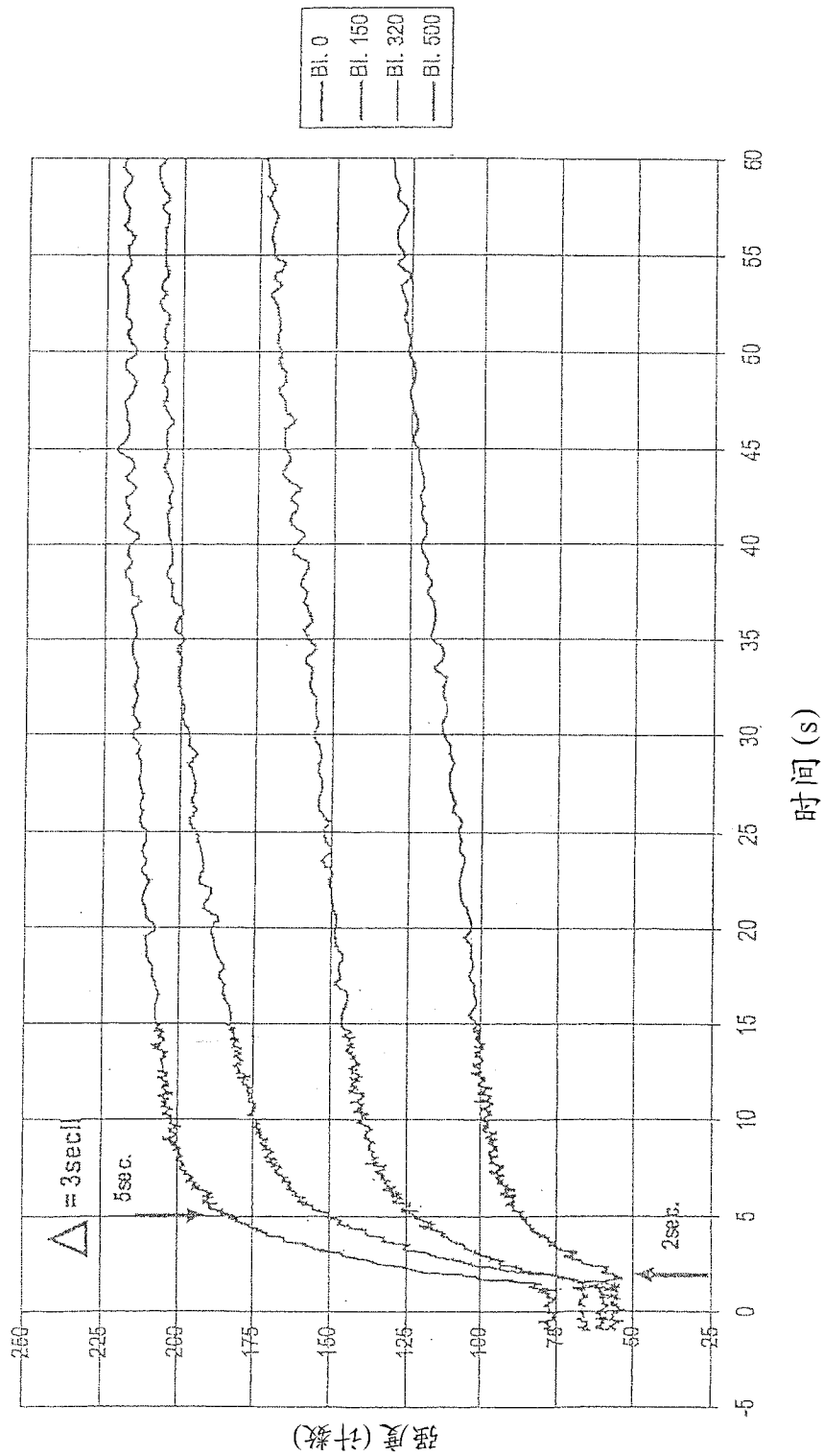


图 19

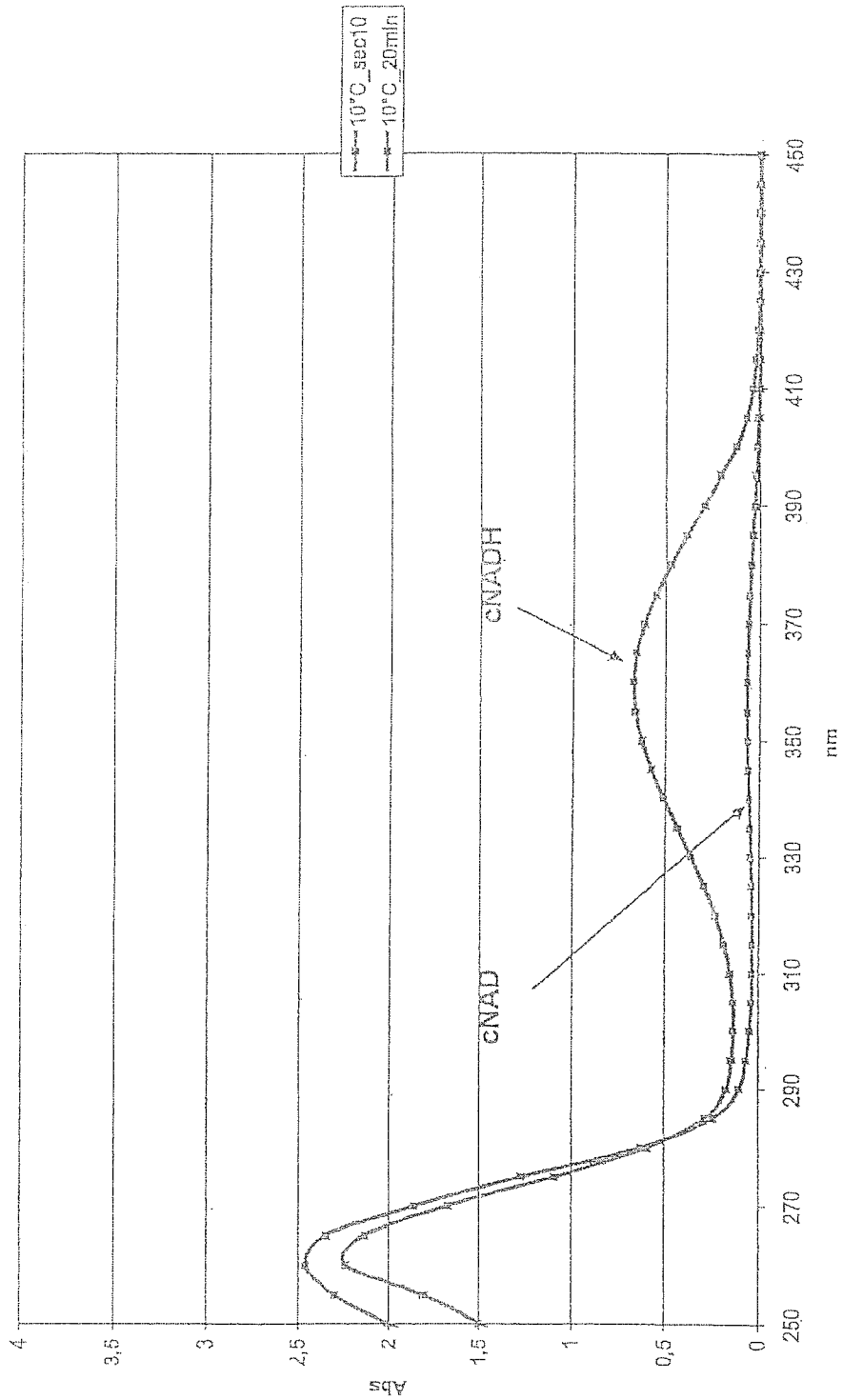


图 20

