



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 196 116**

⑤① Int. Cl.⁷: C12Q 1/34

G01N 33/53, C12Q 1/48

C12Q 1/66, G01N 33/58

C07H 15/14, C07D 307/32

⑫

TRADUCCION DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧⑥ Número de solicitud europea: **96200534.4**

⑧⑥ Fecha de presentación: **22.01.1993**

⑧⑦ Número de publicación de la solicitud: **0 726 322**

⑧⑦ Fecha de publicación de la solicitud: **14.08.1996**

⑤④ Título: **Dosificado de homocisteína.**

③⑩ Prioridad: **22.01.1992 NO 920282**
10.02.1992 US 833118
06.03.1992 GB 9204922

⑦③ Titular/es: **AXIS-SHIELD ASA**
Ulvenv 87
0581 Oslo 5, NO

④⑤ Fecha de la publicación de la mención BOPI:
16.12.2003

⑦② Inventor/es: **Sundrehagen, Erling**

④⑤ Fecha de la publicación del folleto de patente:
16.12.2003

⑦④ Agente: **Ungría López, Javier**

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

DESCRIPCION

Dosificado de homocisteína.

5 La presente invención se refiere a un ensayo para determinar homocisteína en muestras clínicas.

La homocisteína es un aminoácido intermedio producido cuando la metionina es metabolizada a cisteína. Generalmente, la homocisteína producida en el organismo es metabolizada rápidamente mediante una de dos rutas, (1) condensación con serina para formar cistation o (2) conversión a metionina, y su concentración (y la de su forma oxidada homocistina) en el organismo vivo bajo condiciones normales es virtualmente despreciable.

Los niveles de homocisteína en muestras biológicas pueden tener sin embargo un significado clínico en varias situaciones, ya que la homocisteína juega una parte importante en el conjunto complejo de rutas que constituyen el metabolismo de los sulfhidril aminoácidos y su acumulación puede ser indicativa de diferentes trastornos que tienen lugar en estas rutas, incluyendo en particular errores innatos del metabolismo. Así, por ejemplo, se sabe que la homocistinuria (un aumento anormal de homocisteína en la orina) es un trastorno del metabolismo de aminoácidos que resulta de deficiencias en los enzimas cistationina β -sintetasa o metiltransferasa del ácido metiltetrahidrofólico (que cataliza la metilación de homocisteína a metionina).

El metabolismo de los sulfhidril aminoácidos está estrechamente ligado al del ácido fólico y al de la vitamina B₁₂ (cobalamina), que actúan como sustratos o cofactores en las diferentes transformaciones implicadas. Por esta razón, se ha propuesto también la acumulación de homocisteína como un indicador del mal funcionamiento de los enzimas dependientes de cobalamina o folato, o de otros trastornos o enfermedades relacionados con el metabolismo de la cobalamina o del folato.

Además, como la conversión de homocisteína en metionina se basa en una reacción que requiere 5-metil tetrahidrofolato como donante de metilo, el metabolismo de la homocisteína puede ser afectado también por fármacos anti-folato, tales como metotrexato, administrados para combatir otros trastornos, principalmente cáncer. La monitorización de homocisteína ha sido también propuesta, por tanto, para dirigir el tratamiento de enfermedades malignas con fármacos anti-folato.

Más recientemente, niveles elevados de homocisteína en sangre han sido correlacionados con el desarrollo de aterosclerosis (ver Clarke y col., *New Eng. J. Med.* **324**:1149-1155 (1991)) e incluso una moderada homocisteinemia es considerada actualmente como un factor de riesgo para enfermedades cardíacas y vasculares. La medida de los niveles de homocisteína en plasma o en sangre tiene por tanto también importancia en el diagnóstico y tratamiento de las enfermedades vasculares.

Aunque no están disponibles métodos inmunológicos para determinar directamente homocisteína, ya que no hay ningún anticuerpo hacia homocisteína disponible, se han propuesto otros métodos diferentes para determinar homocisteína en muestras clínicas. Todos éstos implican separaciones cromatográficas y se han basado generalmente en uno de los tres principios siguientes:

- 45 (1) análisis cromatográfico clásico de aminoácidos,
- (2) reacción de la homocisteína de la muestra con el enzima S-adenosil-L-homocisteína hidrolasa en presencia del cosustrato S-adenosina marcado radioactivamente o de otro modo, seguido por separación y cuantificación del producto formado (S-adenosil-L-homocisteína, SAH). Generalmente se utiliza separación cromatográfica (HPLC o TLC) y medidas de radioactividad (ver Refsum y col., *Clin. Chem.* **31**:624-628 (1985); Kredich y col., *Anal. Biochem.* **116**:503-510 (1981); Chui, *Am. J. Clin. Path.* **90**(4):446-449 (1988); Totani y col., *Biochem. Soc.* **14**(6):1172-9 (1988) y Schimizu y col., *Biotechnol. Appl. Biochem.* **8**:153-159 (1986)),
- 50 55 (3) reacción de la homocisteína de la muestra con un fluoróforo, seguido por separación mediante HPLC y fluorimetría (ver Refsum y col., *Clin. Chem.* **35**(9):1921-1927 (1989)).

Estos métodos requieren mucho tiempo para ser realizados, son tediosos y se basan todos en la cuantificación directa. Más particularmente, la separación cromatográfica es una característica común de los métodos de la técnica anterior y requiere un equipamiento altamente especializado y sofisticado.

La utilización de tal equipamiento no es generalmente bien aceptada en la práctica rutinaria de los laboratorios clínicos y, por consiguiente, tales procesos no son generalmente susceptibles de ser automatizados en los procedimientos de los laboratorios clínicos típicos.

5 Existe por tanto la necesidad de un ensayo mejorado para determinar homocisteína que sea sencillo, específico, rápido de realizar, fácilmente adaptable para ser utilizado en laboratorios clínicos y, sobre todo, que evite la necesidad de la costosa y larga separación cromatográfica. La presente invención trata de proporcionar tal ensayo.

10 En un aspecto, por tanto, la presente invención proporciona un método para analizar homocisteína en una muestra, comprendiendo dicho método las etapas de poner en contacto la muestra con un enzima convertidor de homocisteína, distinto de la S-adenosil homocisteína (SAH) hidrolasa, y al menos un sustrato de dicho enzima distinto de homocisteína, y sin separación cromatográfica (esto es de reactivos o de los productos de reacción), determinando (preferiblemente fotométricamente) un analito no marcado se-
15 leccionado del cosustrato de homocisteína y de los productos de la conversión enzimática de homocisteína por dicho enzima, siendo dicho cosustrato un compuesto que reacciona con homocisteína en la reacción de conversión de homocisteína catalizada por dicho enzima convertidor de homocisteína.

20 Después de poner en contacto la muestra con el enzima convertidor de homocisteína y el sustrato, se incuba preferiblemente durante al menos 30 segundos, especialmente al menos 5 minutos antes de realizar las etapas posteriores del ensayo.

El enzima convertidor de homocisteína utilizado en el ensayo de la invención no es la SAH-hidrolasa, pero pueden utilizarse otros enzimas. Así, puede hacerse mención, por ejemplo, de la betaína-homocisteína
25 metil transferasa y de otros enzimas implicados en las conversiones de homocisteína (según está descrito, por ejemplo, por Graham en Trends Cardiovasc. Med. 1:244-249 (1991)).

El cosustrato de homocisteína determinado en el método de la invención es un compuesto que reacciona con la homocisteína en la reacción de conversión de homocisteína catalizada por el enzima.

30 Según se utiliza en la presente, el término "determinar" tiene la intención de incluir la determinación cuantitativa y cualitativa, en el sentido de obtener un valor absoluto de la cantidad o concentración del analito, por ejemplo el cosustrato de homocisteína, presente en la muestra, y de obtener también un índice, una proporción, un porcentaje, un valor visual u otro valor indicativo del nivel del analito en la
35 muestra. La determinación puede ser directa o indirecta y la especie química detectada realmente no necesita ser, por supuesto, el propio analito sino que puede ser, por ejemplo, un derivado del mismo o alguna sustancia adicional, según se discute más adelante.

40 El ensayo de la invención utiliza convenientemente técnicas enzimáticas o inmunológicas para la determinación del analito. En una técnica enzimática preferida, el analito es puesto en contacto con un enzima adicional para el que es un sustrato y se determina un cosustrato o un producto de reacción directo o indirecto de la conversión enzimática del analito por ese enzima adicional. En una técnica inmunológica preferida, el analito es determinado utilizando un procedimiento que implica la unión competitiva a un anticuerpo del analito y un hapteno adicional (por ejemplo un polihapteno o un análogo marcado del
45 analito) y la determinación del hapteno unido o no unido.

La cantidad de homocisteína en una muestra influye por tanto indirectamente sobre la formación o el consumo del cosustrato de homocisteína y, de este modo, sobre su concentración resultante en la mezcla de reacción. En esta invención, la concentración resultante o el cambio en la concentración del cosustrato
50 de homocisteína en la mezcla de reacción puede ser utilizada como un indicador de la concentración inicial de homocisteína en la muestra. De este modo, cuando el analito es el cosustrato, el ensayo de la invención difiere de los métodos de la técnica anterior en que, en lugar de ser determinada directamente, la homocisteína es determinada indirectamente evaluando la concentración de su cosustrato en su conversión catalizada por un enzima. Esto tiene la ventaja directa de que pueden utilizarse métodos de detección que
55 son adecuados para los procedimientos de los laboratorios clínicos típicos pero que no fueron utilizables en los ensayos para determinar homocisteína de la técnica anterior, por ejemplo métodos fotométricos, haciendo de este modo que el ensayo de acuerdo con la invención sea particularmente adecuado para uso clínico rutinario.

60 En otras realizaciones preferidas de la invención, puede utilizarse la dirección opuesta de la reacción.

Muchos enzimas están implicados en la compleja serie de rutas del metabolismo de los sulfhidril

aminoácidos y de las reacciones de transmetilación en el organismo. Estas rutas y reacciones han sido todas bien estudiadas y se han investigado los papeles reguladores de los enzimas implicados. El papel de uno de tales enzimas, la SAH-hidrolasa, se discute en una revisión de Ueland en *Pharmacological Reviews* 34:223-253 (1982). Trewyn y col., en *J. Biochem. Biophys. Met.* 4:299-307 (1981), describen una investigación sobre el papel regulador de la SAH-hidrolasa y proporcionan un ensayo para determinar la actividad enzimática de la SAH-hidrolasa. Garras y col. en *Analytical Biochem.* 199:112-118 (1991) describieron otras rutas de reacciones de la homocisteína y en particular proporcionan un ensayo para determinar la conversión de homocisteína mediada por la metionina sintasa. Según se mencionó anteriormente, Graham (*supra*) describe conversiones de homocisteína mediadas por enzimas adicionales. Los cosustratos y los productos de conversión de estas diferentes reacciones pueden ser utilizados como analitos en el ensayo de la invención, especialmente cuando se utiliza un medio de determinación inmunológico.

Las muestras clínicas a analizar de acuerdo con la invención pueden derivar de cualquier fluido biológico o de cualquier extracto de tejido y pueden ser pretratadas antes del ensayo. Sin embargo, se utilizarán generalmente muestras de plasma u orina.

En el plasma o en la orina, proporciones significativas de la homocisteína presente pueden estar unidas mediante un enlace disulfuro a proteínas circulantes, tales como la albúmina, y la homocisteína puede estar presente también en forma de otros derivados disulfuro (generalmente conjugados homocisteína-cisteína). Para obtener un estimación de la homocisteína total presente en la muestra puede ser deseable, por tanto, tratar la muestra con un agente reductor para cortar los enlaces disulfuro y liberar homocisteína libre.

Los disulfuros son fácilmente y específicamente reducidos por tioles (por ejemplo, ditioneitol (DTT), ditioeritritol (DTE), 2-mercaptoetanol, tioglicolato de cisteína, ácido tioglicólico, glutation y compuestos similares). La reducción química directa puede conseguirse utilizando borohidruros (por ejemplo borohidruro de sodio) o amalgamas (por ejemplo amalgama de sodio) o pueden utilizarse reactivos más especializados tales como fosfinas o fosfortioatos. La reducción de disulfuro está revisada por Jocelyn en *Methods of Enzymology* 143:243-256 (1987), donde se enumera un amplio rango de agentes reductores adecuados.

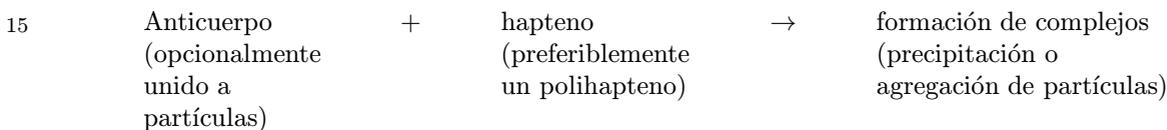
Los cosustratos de homocisteína pueden ser determinados por métodos conocidos. Generalmente, se prefieren los métodos que se basan en la detección fotométrica (por ejemplo colorimétrica, espectrofotométrica o fluorimétrica) y los métodos inmunológicos, ya que éstos particularmente pueden ser adaptados fácilmente para su utilización en laboratorios clínicos. Los métodos basados en una reacción enzimática o en una reacción con anticuerpos mono o policlonales son particularmente preferidos, ya que éstos son sencillos y rápidos de realizar y pueden ser relativamente baratos. Así, por ejemplo, el analito puede ser determinado monitorizando la reacción con enzimas que lo convierten directa o indirectamente en productos que pueden ser detectados fotométricamente, por ejemplo espectrofotométricamente. Los enzimas adecuados no deben ser por supuesto reactivos con los demás sustratos del enzima convertidor de homocisteína, particularmente con homocisteína. Tales enzimas pueden ser además combinados con otros enzimas que actúen convirtiendo los productos formados en productos adicionales detectables.

Los ejemplos de métodos inmunológicos incluirían métodos que implican la reacción del analito con anticuerpos específicos para el mismo, que sean ellos mismos determinables o bien que puedan hacerse reaccionar posteriormente para formar productos detectables, por ejemplo en un ensayo de sándwich. Un método inmunológico particularmente atractivo implica, sin embargo, la utilización de un análogo del analito marcado con un fluoróforo, preferiblemente un cosustrato, por ejemplo adenosina marcada con fluoresceína - éste y el analito no marcado pueden ser puestos en contacto con un anticuerpo para el analito. Si el producto resultante es sometido a un ensayo de polarización de fluorescencia utilizando una radiación excitante polarizada, una indicación de la concentración del analito no marcado puede derivarse entonces del grado de despolarización de la radiación de fluorescencia. Las técnicas de inmunoensayo de polarización de fluorescencia (FPIA) están bien establecidas (ver, por ejemplo, US-A-4420568 y US-A-4593089 y otras publicaciones de Abbott Laboratories referentes a su tecnología TDx).

El pretratamiento enzimático de la muestra es deseable ya que, en muchas de las realizaciones de la invención, el analito está ya presente en la muestra en cantidades variables, proporcionando así una fuente de error potencial en el ensayo. El contenido de analito de fondo puede ser compensado realizando el ensayo en una porción de la muestra sin utilizar el enzima convertidor de homocisteína; sin embargo tal procedimiento es muy largo y hace que el ensayo sea más tedioso. Una alternativa es el pretratamiento de la muestra con un agente que sirva para convertir o eliminar el analito endógeno. Según se mencionó anteriormente, con el fin de evitar el aumento innecesario del tiempo requerido para la realización del

ensayo, tal tratamiento de la muestra puede ser efectuado convenientemente en el momento en el que es pretratada con el agente reductor para liberar la homocisteína.

Además de la utilización de técnicas espectrométricas o colorimétricas para la determinación del analito, pueden utilizarse otras técnicas fotométricas. Entre las técnicas más útiles que pueden ser utilizadas están las técnicas de aglutinación de partículas y de inmunoprecipitación. Si se utilizan anticuerpos policlonales, puede utilizarse la aglutinación de partículas directa o la inmunoprecipitación directa. Sin embargo, pueden utilizarse técnicas de inhibición de la precipitación o de inhibición de la aglutinación de partículas. Éstas se basan en la utilización de combinaciones anticuerpo/hapteno, las cuales después de la conjugación conducen a la precipitación o a la agregación de partículas que pueden ser detectadas mediante una medida turbidimétrica o nefelométrica. Cuando la formación del complejo anticuerpo/hapteno es inhibida por el analito, el contenido de analito puede ser determinado a partir de la reducción de la precipitación/agregación. La reacción puede ser expresada según sigue:



Cuando el ensayo de la invención utiliza anticuerpos, éstos pueden ser policlonales pero son preferiblemente monoclonales. Cuando los anticuerpos deseados no estén todavía disponibles comercialmente, pueden ser producidos mediante técnicas estándar. Los anticuerpos pueden ser por tanto producidos en animales o hibridomas, monoclonales o policlonales, por ejemplo según está descrito por James Gooding en "Monoclonal Antibodies: Principle and Practice", Academic Press, London, 1983, Capítulo 3. Los monoclonos deben ser clasificados para seleccionar los clones que discriminen entre el hapteno deseado y otros sustratos del(los) enzima(s). Los anticuerpo policlonales reactivos solamente con el analito deben ser purificados para eliminar los anticuerpos que reaccionan de manera cruzada, esto es aquéllos que son reactivos con otros sustratos además del analito. Esto puede ser realizado mediante cromatografía de afinidad.

En la producción del anticuerpo se utiliza como hapteno el propio analito u otra molécula que incluya la porción del analito que se considere que es la región de unión más apropiada, por ejemplo una región muy distante de las regiones que participan en la reacción enzimática. El hapteno es conjugado convenientemente a una macromolécula tal como BSA o hemocianina.

Para realizar el ensayo de la invención, los reactivos necesarios pueden ser añadidos a la mezcla de reacción de manera secuencial o simultáneamente. Sin embargo, en muchas realizaciones preferidas, una o más de las reacciones pueden ser realizadas de manera ventajosa durante algún tiempo antes de la adición de los reactivos para la(s) reacción(es) posterior(es).

En los análisis de química clínica, es una práctica habitual la utilización de curvas estándar para fines de calibración. Así, en la realización del método de esta invención, pueden utilizarse muestras con un contenido conocido de homocisteína en lugar de las muestras clínicas con el fin de construir una curva estándar para la respuesta/señal a medir, y el contenido de homocisteína de las muestras desconocidas puede ser calculado posteriormente por interpolación en la curva estándar. Por tanto, no es necesaria una cuantificación exacta de las moléculas que producen la señal o de los potenciales redox.

El método de ensayo de la presente invención puede ser utilizado para el diagnóstico y monitorización de condiciones patológicas o potencialmente patológicas que estén relacionadas con, o que se manifiesten en, el contenido de homocisteína de fluidos o tejidos corporales. Éstas incluyen aterosclerosis, enfermedades de la sangre, deficiencias vitamínicas y/o errores innatos de metabolismo. Puede ser utilizado también para evaluar los efectos de productos farmacéuticos, tales como fármacos anti-folato.

En otro aspecto, la invención proporciona un producto analítico, opcionalmente en formato de kit, para ser utilizado en el ensayo de la cantidad o concentración de homocisteína en una muestra ya sea directamente o indirectamente, comprendiendo dicho producto: un enzima convertidor de homocisteína seleccionado del grupo que consta de cistationina- β -sintetasa, metiltransferasa del ácido metiltetrahidrofólico, metionina sintasa o betaína-homocisteína-metiltransferasa; un sustrato de dicho enzima distinto de homocisteína, siendo dicho cosustrato un compuesto que reacciona con homocisteína en la reacción de conversión de homocisteína catalizada por dicho enzima convertidor de homocisteína; un agente productor de una señal y, opcionalmente, un medio para la determinación de la señal.

ES 2 196 116 T3

En una realización preferida, el producto analítico comprende: un enzima convertidor de homocisteína seleccionado del grupo que consta de cistationina β -sintetasa, metiltransferasa del ácido metiltetrahidrofólico, metionina sintasa o betaína-homocisteína-metiltransferasa;

5 uno o más sustratos de dicho enzima distintos de homocisteína, siendo dicho cosustrato un compuesto que reacciona con homocisteína en la reacción de conversión de homocisteína catalizada por dicho enzima convertidor de homocisteína;

10 un medio para generar un derivado detectable de un analito seleccionado del cosustrato de homocisteína y los productos de la conversión enzimática de homocisteína; y, opcionalmente, un medio para determinar espectrométricamente o colorimétricamente dicho derivado detectable con el fin de proporcionar una indicación del contenido de homocisteína de la muestra.

15 En los kits, todos o algunos de los reactivos pueden estar presentes en forma seca, igual que puede estarlo el formato/matriz para procesar las reacciones de la mezcla de reacción. De manera similar, el kit puede incluir, según se ha indicado, como medio para determinar un analito o derivado detectable, un aparato espectrométrico o colorimétrico relativamente barato, por ejemplo una fuente de luz y un dispositivo detector preajustado para detectar intensidad lumínica a una longitud de onda característica del analito detectable, etc., o incluso una simple gráfica de calibración colorimétrica.

20 La invención será ahora descrita por medio de los Ejemplos no limitantes siguientes. El ensayo del Ejemplo 19 es especialmente preferido. Aunque se describe la utilización de la SAH-hidrolasa, se comprenderá que los ejemplos no se limitan a la misma, y que puede utilizarse cualquier enzima convertidor de homocisteína.

25 Ejemplo 1

30 La muestra (una solución acuosa de homocisteína para calibración o plasma u orina para el ensayo clínico) fue pretratada con un agente reductor (por ejemplo, ditiotreitól 10 mM). Esta muestra fue añadida, preferiblemente con una concentración final de homocisteína en el rango de 10^{-6} — 10^{-5} moles/l, a una solución a 37°C que contenía 5 mg/ml de IgG de conejo, 20 mU/ml de adenosina desaminasa, 20 mU/ml de nucleósido fosforilasa, 20 mU/ml de xantina oxidasa, 500 mU/ml de peroxidasa de rábano picante, 10 mmoles/l de ditiotreitól, 100 mmoles/l de fosfato de sodio, pH ajustado a 7,40, y 100 mU de S-adenosil-L-homocisteína hidrolasa. Simultáneamente o posteriormente, pero preferiblemente 35 después de 10 minutos de incubación para permitir la conversión de la adenosina de la muestra, se añadió adenosina a una concentración final de 5×10^{-6} moles/l. La absorción UV fue medida durante un periodo de 10 minutos y la respuesta fue medida a 292 nm en modo cinético, y se calculó la $\Delta A/\Delta t$.

40 Para los ensayos clínicos, la concentración de homocisteína puede ser calculada mediante interpolación en una curva estándar producida utilizando los estándares conocidos.

Ejemplo 2

45 La muestra (igual que para el Ejemplo 1) fue pretratada con un agente reductor (por ejemplo ditiotreitól 10 mM). Esta muestra fue añadida, preferiblemente a una concentración final de homocisteína en el rango de 10^{-6} - 10^{-5} moles/l, a una solución a 37°C que contenía 5 mg/ml de IgG de conejo, 20 mU/ml de adenosina desaminasa, 20 mU/ml de xantina oxidasa, 20 mU/ml de nucleósido fosforilasa, 500 mU/ml de peroxidasa de rábano picante, 10 mmoles/l de ditiotreitól, 100 mmoles/l de fosfato de sodio, pH ajustado a 7,40, y 20 mU de S-adenosil-L-homocisteína hidrolasa. Posteriormente, preferiblemente 50 después de 10 minutos de incubación para permitir que tenga lugar la conversión de la adenosina de la muestra, se añadió S-adenosil-L-homocisteína a una concentración final de 5×10^{-5} moles/l y se midió la absorción UV durante un periodo de 10 minutos a 292 nm en modo cinético, y se calculó la $\Delta A/\Delta t$.

55 Para los ensayos clínicos, la concentración de homocisteína puede ser calculada mediante interpolación en una curva estándar producida utilizando los estándares conocidos.

Ejemplo 3

Tampón de ensayo:

60 Tampón fosfato 0,1 M pH 7,4, conteniendo 1 mg/ml de IgG de conejo y 10 mmoles/l de ditiotreitól.

ES 2 196 116 T3

Procedimiento de ensayo:

A 150 μl de tampón de ensayo se añadieron 3 mU de S-adenosil-L-homocisteína hidrolasa y la muestra (preferiblemente pretratada según se describió en los Ejemplos 1 y 2). La reacción enzimática fue iniciada por la adición de adenosina disuelta en tampón de ensayo a una concentración final de $2,5 \times 10^{-5}$ moles/l. Después de 10 minutos de incubación, se añadieron 750 μl de una solución de tampón de ensayo que contenía 20 mU de adenosina desaminasa, 20 mU de nucleósido fosforilasa, 20 mU de xantina oxidasa y 375 mU de peroxidasa de rábano picante. La absorción UV a 292 nm fue medida durante 5 minutos en modo cinético. Se calcula la $\Delta A/\Delta t$. En paralelo, el ensayo es repetido pero sin la adición de S-adenosil-L-homocisteína hidrolasa. Se determina la diferencia entre los dos valores de $\Delta A/\Delta t$ y se calcula la concentración de homocisteína por interpolación en una curva estándar.

Ejemplo 4

El procedimiento de ensayo se realiza según se describió en el Ejemplo 3 hasta la primera incubación. Posteriormente, después de 10 minutos de incubación, se añade una solución de ensayo que contiene adenosina marcada con fluoresceína y anticuerpos monoclonales anti-adenosina. La adenosina restante y la adenosina marcada con fluoresceína compiten por unirse al anticuerpo. Se determina la cantidad de adenosina marcada unida a los anticuerpos mediante la técnica de polarización de fluorescencia convencional, y se calcula la concentración de homocisteína por interpolación en una curva estándar.

Ejemplo 5

Tampón de ensayo:

Tampón fosfato 0,1 M pH 7,4, conteniendo 1 mg/ml de IgG de conejo y 10 mmoles/l de ditioneol.

Solución de SAH-hidrolasa:

40 mU/ml de S-adenosil-L-homocisteína hidrolasa son disueltas en el tampón de ensayo.

Solución de adenosina:

5×10^{-8} moles/ml de adenosina son disueltos en el tampón de ensayo.

Solución de adenosina desaminasa:

200 mU/ml de adenosina desaminasa disueltas en el tampón de ensayo.

Solución de fenol/nitroprusida:

10 mg/ml de fenol y 50 μg /ml de nitroprusida de sodio en agua.

Solución de hipoclorito:

11 mmoles/l de NaOCl son disueltos en NaOH 125 mM.

Procedimiento de ensayo:

1. Se mezclan 75 μl de la solución de adenosina y 75 μl de la solución de SAH-hidrolasa con la muestra (preferiblemente pretratada según se describió en los Ejemplos 1 a 4), y se mantienen a 37°C durante 10 minutos.
2. Se añaden 100 μl de la solución de adenosina desaminasa y la mezcla se mantiene a 37°C durante 5 minutos.
3. Se añaden 750 μl de la solución de fenol/nitroprusida y 750 μl de la solución de hipoclorito. Después de 30 minutos a 37°C, se mide la extinción a 628 nm. En paralelo se repite el ensayo pero sin la adición de SAH-hidrolasa. Se determina la diferencia entre los dos valores de extinción a 628 nm y se calcula la concentración de homocisteína mediante la interpolación de esta diferencia en una curva estándar generada utilizando estándares conocidos.

Ejemplo 6

Formación de sah marcada con un fluoróforo

5 Se prepara una solución de 10 mmoles/l de SAH en dimetilformamida y se diluye posteriormente 1:10 en un tampón fosfato 100 mmoles/l, pH = 7,5. A esta solución se añade isotiocianato de fluoresceína a una concentración final de 1 mmol/l. Después de una incubación de 60 minutos a temperatura ambiente, el conjugado SAH-fluoresceína es purificado por HPLC utilizando una columna Kromasil C-18 a 260 nm utilizando una mezcla gradiente de acetato de amonio 25 mM (pH 7,0) y metanol.

10 Ejemplo 7

Formación de anticuerpos anti-sah

15 a) *Formación del antígeno:* A una solución de 1 mmol/l de SAH en tampón fosfato 25 mmoles/l pH = 7,4, con 125 mmoles/l de NaCl, se añade seroalbúmina bovina a una concentración final de 5 mg/ml. A esta mezcla, se añade bis(sulfosuccinimidil)suberato a una concentración final de 1 mmol/l, y la mezcla se deja reaccionar durante 60 minutos. (El pH es mantenido bajo en esta reacción de conjugación con el fin de estimular la conjugación a la función adenosil amina en lugar de a la función homocisteína amina). La fracción proteinácea de la solución - que contiene también los conjugados entre BSA y SAH es aislada por cromatografía de exclusión de tamaños utilizando una columna Superose 12 de Pharmacia con solución salina tamponada con fosfato como eluyente.

20 b) *Formación de hibridomas:* Con el antígeno descrito se producen hibridomas de acuerdo con el procedimiento descrito por James W. Gooding en "Monoclonal Antibodies: Principle and Practice", Academic Press, London, 1983, Capítulo 3.

25 c) *Selección de hibridomas:*

30 (i) Los hibridomas que producen anticuerpos anti-SAH son identificados según sigue: El contenido de IgG de los sobrenadantes de los hibridomas es medido mediante la técnica ELISA convencional. Posteriormente, el sobrenadante es mezclado en una cubeta con un tampón que contiene 50 mmoles/l de fosfato, 120 mmoles/l de NaCl, pH = 7,4, y 0,1 mg de IgG de conejo por ml, a una concentración final de 0,1 μ moles/l de IgG de ratón. Se añade SAH marcada con fluoresceína, producida según el Ejemplo 6 anterior, a una concentración final de 0,02 μ moles/l. Después de una incubación de 10 minutos, se determina el grado de polarización con un espectrofluorímetro equipado con una unidad de polarización de fluorescencia, midiendo

35 A = la intensidad de fluorescencia cuando el plano de polarización de la luz incidente es paralelo al plano de polarización del filtro utilizado para filtrar la luz emitida,
B = la intensidad de fluorescencia cuando el plano de polarización de la luz incidente es perpendicular al plano de polarización del filtro utilizado para filtrar la luz emitida,
y utilizando una longitud de onda de excitación de 494 nm y detectando la luz emitida a 517 nm.

40 El grado de polarización es calculado como

$$45 \quad (A-B) / (A+B)$$

Un grado bajo de polarización indica que los anticuerpos monoclonales de ratón no se unen a SAH.

50 (ii) De los hibridomas seleccionados de acuerdo con (i), los hibridomas que producen anticuerpos reactivos con adenosina y/o homocisteína son identificados según sigue: Anticuerpos monoclonales anti-SAH del sobrenadante de los hibridomas son revestidos sobre la superficie de pocillos de microvaloración según se describe en el Ejemplo 9 posterior. Se añade a los pocillos de microvaloración adenosina marcada con carbono-14 (u homocisteína marcada con carbono-14), disponibles en Amersham Ltd., R.U., en un tampón que contiene 25 mmoles/l de fosfato, 120 mmoles/l de NaCl y 1 mg/ml de IgG de conejo y que tiene un pH = 7,4. Después de una incubación de 60 minutos, los pocillos son lavados 3 veces con el mismo tampón (sin contener por supuesto adenosina u homocisteína). Valores elevados de radioactividad retenida en los pocillos indican que los hibridomas producen anticuerpos que se unen a adenosina (o a homocisteína) por sí mismos. Estos anticuerpos no son utilizados en el ensayo.

60 (iii) *Producción de IgG monoclonal:* Los hibridomas que producen anticuerpos que se unen a SAH de acuerdo con el punto (i) anterior, pero que no se unen a adenosina o a homocisteína de

ES 2 196 116 T3

acuerdo con el punto (ii) anterior, son seleccionados para la producción de IgG monoclonal. Los hibridomas seleccionados son utilizados para la producción de líquido ascítico en ratón o para la producción de cultivos celulares *in vitro*, de acuerdo con técnicas convencionales. Los anticuerpos monoclonales son posteriormente aislados del líquido ascítico o del medio del cultivo celular de acuerdo con técnicas convencionales. Ver James W. Gooding "Monoclonal Antibodies: Principle and Practice", Academic Press, London, 1983.

Ejemplo 8

10 *Inmunoensayo de polarización de fluorescencia de l-homocisteína*

Solución enzimática:

15 50 mmoles/l de tampón fosfato pH = 7,4 que contiene 0,2 mg/ml de IgG de conejo, 120 mmoles/l de NaCl, 10 mmoles/l de ditiotreitól, 10 U/l de S-adenosil-L-homocisteína hidrolasa y 0,1 mmoles/l de adenosina.

Solución de SAH marcada con fluoresceína:

20 Se disuelve SAH conjugada a fluoresceína, producida de acuerdo con el Ejemplo 6, a una concentración final de 1 $\mu\text{mol/l}$ en tampón fosfato 50 mmoles/l pH = 7,4 con 125 mmoles/l de NaCl y 0,2 mg/ml de IgG de conejo.

Solución de anticuerpos:

25 Anticuerpos monoclonales anti-SAH (no reactivos con adenosina y preferiblemente tampoco reactivos con homocisteína), producidos por ejemplo de acuerdo con el Ejemplo 7, se disuelven a una concentración final de 0,1 $\mu\text{moles/l}$ en 50 mmoles/l de tampón fosfato pH = 7,4 con 125 mmoles/l de NaCl y 0,2 mg/ml de IgG de conejo.

30 *Realización del ensayo:*

35 En una cubeta, se mezclan 15 μl de plasma (inicialmente una serie de muestras con contenido de homocisteína conocido) con 100 μl de solución enzimática y se mantienen a 37 grados Celsius durante 15 minutos. Se añaden 100 μl de la solución de SAH marcada con fluoresceína, seguido por la adición de 1,0 ml de la solución de anticuerpos. Con un espectrofluorímetro equipado con una unidad de polarización de fluorescencia, se mide el grado de polarización según se describió en el Ejemplo 7(c)(i) anterior y se representa gráficamente frente a la concentración de homocisteína.

40 El ensayo puede ser realizado también utilizando los haptenos marcados y los anticuerpos de los Ejemplos 11 y 13 ó 15 y 17 en lugar de los de los Ejemplos 6 y 7.

Ejemplo 9

45 *Inmunoensayo de microvaloración con enzima unido*

(a) Se utiliza la solución enzimática del Ejemplo 8.

50 (b) *Solución de SAH marcada con peroxidasa:* Se disuelven 0,5 mg de peroxidasa de rábano picante en 1 ml de agua purificada. Se añaden 200 μl de una solución de 0,02 moles/l de peryodato de sodio, se agita la mezcla durante 20 minutos a temperatura ambiente y se dializa durante una noche frente a tampón acetato de sodio 10 mM pH = 4,4. Se añade SAH a una concentración final de 0,1 mmoles/l y se ajusta el pH a 6,0. La solución es agitada durante 4 horas a temperatura ambiente. Se añaden 100 μl de una solución acuosa de 4 mg/ml de borohidruro de sodio recién preparada, y la solución se incuba a 4 grados Celsius durante 2 horas. La peroxidasa y sus conjugados con SAH se aíslan mediante cromatografía de exclusión de tamaños en una columna de Superose 6 (Pharmacia, Suecia).

60 (c) *Anticuerpos anti-SAH revestidos sobre pocillos de microvaloración:* Se disuelve IgG policlonal de carnero, procedente de carneros inmunizados hacia IgG de ratón, a una concentración final de 1 mg/ml en 100 mmoles/l de tampón borato pH = 9,0. Se añaden a cada uno de los pocillos de placas de microvaloración de poliestireno 300 μl de esta solución. Después de 120 minutos de incubación a 37 grados Celsius, los pocillos son lavados 5 veces con solución salina tamponada con fosfato.

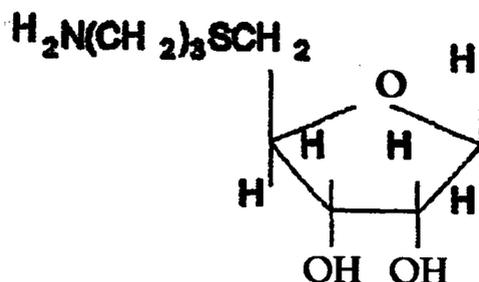
Posteriormente, los anticuerpos monoclonales IgG de ratón anti-SAH producidos de acuerdo con el Ejemplo 7 anterior, son disueltos en solución salina tamponada con fosfato a una concentración final de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Se añaden a cada pocillo 200 μl de esta solución de IgG monoclonales y se incuban durante 120 minutos a 37 grados Celsius. Los pocillos son luego lavados 5 veces con solución salina tamponada con fosfato conteniendo 0,1 mg/ml de IgG de conejo.

(d) *Realización del ensayo:* Una muestra de 25 μl de plasma (inicialmente una serie de muestras con concentración de homocisteína conocida) es mezclada con 500 μl de la solución enzimática y mantenida a 37 grados Celsius durante 15 minutos. Se añaden 50 μl de la solución de SAH marcada con peroxidasa y, después de mezclar, se añaden 250 μl de esta mezcla a un pocillo de los pocillos de microvaloración revestidos con anticuerpos anti-SAH producidos de acuerdo con (c) anterior, todos tamponados a pH 7,4. Después de 60 minutos de incubación a 37 grados Celsius, los pocillos son lavados tres veces con solución salina tamponada con fosfato conteniendo 0,1 mg/ml de IgG de conejo. Se añaden a cada pocillo 100 μl de una solución de 1 mg/ml de orto-feniléndiamina en tampón citrato 0,1 moles/l pH = 6,0 conteniendo un 0,015 % de peróxido de hidrógeno. Después de 10-30 minutos se lee la absorbancia de luz de cada pocillo a 450 nm. La absorbancia es representada gráficamente frente a la concentración de homocisteína.

Ejemplo 10

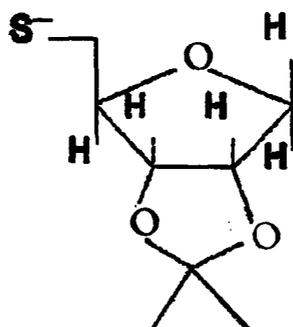
Producción de haptenos

3-S-(1-Anhidro-D-ribofuranosil)tiopropilamina



(a) *Mercaptano con los grupos hidroxilo protegidos activado*

(Compuesto (8) en el Esquema (E) anterior)



Un equivalente de metil β -D-ribofuranósido (Compuesto (1) anterior que está disponible comercialmente) se hace reaccionar con una mezcla de 5 equivalentes de sulfonato de trimetilsililmetano y un equivalente de trifluoruro de boro eterato utilizando el procedimiento de Jun y col. (Carb. Res. 163:247-261 (1987)). Se añaden 0,5 equivalentes del producto 1-anhidro-D-ribose (Compuesto (2)) en forma de polvo fino, en pequeñas porciones, bajo agitación continua, a una mezcla de acetona/ácido sulfúrico producida añadiendo 6,3 ml de ácido sulfúrico concentrado lentamente a 100 ml de acetona recién destilada en un baño de hielo. Se retira el baño de hielo y se deja que continúe la reacción a temperatura ambiente durante 8 horas. La masa cristalina blanca sólida obtenida es disuelta en cloroformo, lavada con

hidróxido de sodio acuoso, ácido clorhídrico diluido y finalmente agua, secada y evaporada para dar el derivado 2,3-isopropilidén-D-ribónico de la 1-anhidro-D-ribosa (Compuesto (2)). Un equivalente de éste y dos equivalentes de tetrabromuro de carbono son disueltos en éter seco y enfriados sobre hielo. Se añaden lentamente dos equivalentes de trifenilfosfina con agitación constante y refrigeración sobre hielo.
5 Se retira el baño de hielo y se deja que la mezcla se temple hasta temperatura ambiente, dejando que tenga lugar la reacción y haciendo que se desprenda bromuro de hidrógeno suavemente. Una vez que la reacción se ha completado, el exceso de reactivo se amortigua con la adición de metanol. El derivado bromuro (Compuesto (6)) es aislado por filtración y evaporación del filtrado. Al derivado bromuro se añade tiourea (un equivalente) disuelta en agua templada y diluida con alcohol rectificado. La mezcla
10 es sometida a reflujo y agitada bien periódicamente, continuando esto hasta alrededor de 30 minutos después de que se disuelva el derivado bromuro. La mezcla de reacción es enfriada sobre hielo y filtrada para dar un sólido que es tratado con agua alcalina, produciendo el mercaptano con los grupos hidroxil protegidos (Compuesto (7)) en la fase orgánica. Éste es convertido en la forma activada (Compuesto (8)) mediante tratamiento con metóxido en metanol. Éste se hace reaccionar luego adicionalmente según se describe a continuación.
15

(b) *3-S-(1-Anhidro-D-ribofuranosil)tiopropilamina*

Un equivalente del compuesto del Ejemplo 10(a) (Compuesto (8)) recién preparado se hace reaccionar
20 con un equivalente de acrilonitrilo para producir un tioéter (Compuesto (9)). Éste es reducido posteriormente mediante tratamiento con LiAlH_4 en éter seco y la amina desprotegida libre (Compuesto (10)) es aislada por tratamiento con ácido clorhídrico acuoso.

Los aminopropiltioéteres correspondientes, en los que R_1 y R_2 son distintos de hidrógeno, son producidos de forma análoga, por ejemplo utilizando como materiales de partida los Compuestos (1) y (3) disponibles comercialmente.
25

Ejemplo 11

30 *Marcaje del hapteno*

Una solución de 50 mmoles/l del compuesto del Ejemplo 10 en dimetilformamida (DMF) es diluida 1:5 (en volumen) en una solución de bicarbonato 0,1 M (pH 9,2). A esta solución se añade isotiocianato de fluoresceína a una concentración final de 12 mmoles/l. Después de 60 minutos de incubación a temperatura ambiente, el conjugado del compuesto del Ejemplo 10 con fluoresceína es purificado por RPC
35 utilizando una columna Kromasil 100 Å C-18 y una mezcla gradiente de acetato de amonio 20 mM (pH 7,0) y metanol.

40 Ejemplo 12

Preparación del antígeno

A una solución de 1 mmol/l del compuesto del Ejemplo 10 en tampón fosfato 50 mmoles/l, NaCl 125 mmoles/l (pH 7,4), se añade seroalbúmina bovina (BSA) a una concentración final de 5 mg/ml. A esta
45 mezcla, se añade bis(sulfosuccinimidil)suberato a una concentración final de 1,2 mmoles/l y la mezcla se deja reaccionar durante 60 minutos. La fracción proteínica, que incluye el conjugado hapteno-BSA, es aislada mediante cromatografía de exclusión de tamaños utilizando una columna Superose 12 de Pharmacia con solución salina tamponada con fosfato como eluyente.

50 Ejemplo 13

Preparación de anticuerpos

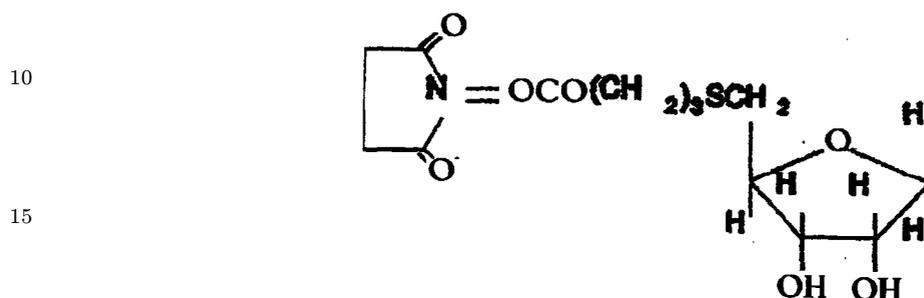
Los anticuerpos hacia el compuesto del Ejemplo 10 son preparados de manera análoga a la del Ejemplo
55 7 anterior utilizando el antígeno del Ejemplo 12. Los anticuerpos no reactivos con SAH y los anticuerpos reactivos con adenosina son rechazados ya que son preferiblemente anticuerpos reactivos con homocisteína.

60

Ejemplo 14

Producción del hapteno

5 *N*-Hidroxi succinimidil 3-*S*-(1-anhidro-*D*-ribofuranosil) tiobutanoato



20

Un equivalente del compuesto del Ejemplo 10(a), recién preparado, se hace reaccionar con un equivalente de 4-bromo-butirato de etilo para dar el compuesto éster (11). Éste es hidrolizado para dar el ácido libre mediante hidrólisis básica con hidróxido de sodio acuoso en dioxano y desprotegido por tratamiento con ácido clorhídrico acuoso para dar el ácido libre no protegido (Compuesto (12)). Un equivalente de éste es mezclado con dos equivalentes de *N*-hidroxisuccinimida en dimetilformamida enfriada en hielo y a esto se añaden 1,2 equivalentes de dicitohexilcarbodiimida bajo agitación constante. Se deja que tenga lugar la reacción a temperatura ambiente durante 18 horas, después de lo cual se enfría la mezcla y se añade éter enfriado en hielo. El NHS-éster precipitado (Compuesto (13)) es recristalizado a partir de DMF/éter, secado y almacenado posteriormente a 4°C sobre un desecante.

25

30

Los NHS-ésteres correspondientes en los que R₁ y R₂ son distintos de hidrógeno son producidos de manera análoga, por ejemplo utilizando como materiales de partida los Compuestos (1) y (3) disponibles comercialmente.

35 Ejemplo 15

Marcaje del hapteno

Una solución de 50 mmoles/l del compuesto del Ejemplo 14 en DMF es diluida 1:5 (en volumen) en tampón bicarbonato 0,1 M (pH 9,2). A esta solución se añade 5-aminoacetamido-fluoresceína (amida de fluoresceinil glicina) a una concentración final de 12 mmoles/l. Después de 60 minutos de incubación a temperatura ambiente, el conjugado del ácido 3-*S*-(1-anhidro-*D*-ribofuranosil)tiobutanoico con fluoresceína es purificado por RPC utilizando una columna Kromasil 100 Å C-18 y una mezcla gradiente de acetato de amonio 20 mM (pH 7,0) y metanol.

40

45

Ejemplo 16

Preparación del antígeno

50 A una solución de BSA (5 mg/l en tampón fosfato 50 mmoles/l, NaCl 125 mmoles/l (pH 7,4)), se añade el compuesto del Ejemplo 14 a una concentración final de 1 mmol/l. La mezcla se deja reaccionar durante 60 minutos y la fracción proteinácea, que contiene el conjugado BSA-hapteno, es aislada mediante cromatografía de exclusión de tamaños utilizando una columna Superose 12 de Pharmacia con solución salina tamponada con fosfato como eluyente.

55

Ejemplo 17

Preparación de anticuerpos

60 Los anticuerpos hacia el compuesto del Ejemplo 14 son preparados de manera análoga a la del Ejemplo 7 anterior utilizando el antígeno del Ejemplo 12. Los anticuerpos no reactivos con SAH y los anticuerpos reactivos con adenosina son rechazados, ya que son preferiblemente anticuerpos reactivos con homo-

ES 2 196 116 T3

cisteína.

Ejemplo 18

5 *Inmunoensayo de polarización de fluorescencia*

Solución enzimática:

10 Tampón fosfato 50 mmoles/l (pH 7,4) conteniendo 4 mg/ml de caseína, 120 mmoles/l de NaCl y 10 U/l de S-adenosil-L-homocisteína hidrolasa.

Solución de ditioneitol (DTT):

15 El ditioneitol es disuelto en agua a una concentración de 50 mmoles/l y ajustado a pH 3,0 con HCl.

Solución de adenosina:

1,8 mmoles/l de adenosina en tampón fosfato 50 mmoles/l (pH 7,4).

20 *Solución de SAH marcada con fluoresceína:*

Tampón fosfato 50 mmoles/l (pH 7,4) conteniendo SAH conjugada a fluoresceína, producida de acuerdo con el Ejemplo 6.

25 *Solución de anticuerpos:*

Anticuerpos monoclonales anti-SAH (por ejemplo de acuerdo con el Ejemplo 7) disueltos a una concentración final de 0,1 μ moles/l en tampón fosfato 50 mmoles/l (pH 7,4) conteniendo 120 mmoles/l de NaCl y 1 mg/ml de caseína.

30 *Realización del ensayo*

Etapa 1

35 En una cubeta se mezclan 15 μ l de muestra, 10 μ l de solución enzimática y 10 μ l de solución de adenosina con 10 μ l de la solución ácida de DTT y se mantienen a 37°C durante 15 minutos.

Etapa 2

40 A la cubeta se añaden 100 μ l de la solución de SAH marcada con fluoresceína y 1,0 ml de la solución de anticuerpos. Con un espectrofluorímetro equipado con una unidad de polarización de fluorescencia, se mide el grado de polarización según se describió en el Ejemplo 7(c)(i) anterior y se representa gráficamente frente a la concentración de homocisteína.

45 Ejemplo 19

Inmunoensayo de polarización de fluorescencia

Solución enzimática:

50 Tampón fosfato 50 mmoles/l (pH 7,4) conteniendo 1 mg/ml de caseína, 120 mmoles/l de NaCl y 10 U/l de S-adenosil-L-homocisteína hidrolasa.

Solución de ditioneitol (DTT):

55 El ditioneitol es disuelto en agua a una concentración de 50 mmoles/l y ajustado a pH 3,0 con HCl.

Solución de SAH marcada con fluoresceína/solución de adenosina:

60 Tampón fosfato 50 mmoles/l (pH 7,4) conteniendo 10 μ moles/l de SAH conjugada a fluoresceína, producida de acuerdo con el Ejemplo 6, y 1,8 mmoles/l de adenosina.

ES 2 196 116 T3

Solución de anticuerpos:

Anticuerpos monoclonales anti-SAH (por ejemplo de acuerdo con el Ejemplo 7) disueltos a una concentración final de 0,1 μ moles/l en tampón fosfato 50 mmoles/l (pH 7,4) conteniendo 120 mmoles/l de NaCl y 1 mg/ml de caseína.

Realización del ensayo

En una cubeta se mezclan 10 μ l de plasma, 100 μ l de solución enzimática y 10 μ l de la solución de SAH marcada/adenosina con 30 μ l de la solución ácida de DTT y se mantienen a 37°C durante 15 minutos.

Después de la incubación, se añade 1,0 ml de la solución de anticuerpos. Con un espectrofluorímetro equipado con una unidad de polarización de fluorescencia, se mide el grado de polarización según se describió en el Ejemplo 7(c)(i) anterior y se representa gráficamente frente a la concentración de homocisteína.

Los ensayos de los Ejemplos 18 y 19 pueden ser realizados también utilizando los haptenos marcados y los anticuerpos de los Ejemplos 11 y 13 ó 15 y 17 en lugar de los de los Ejemplos 6 y 7.

Ejemplo 20

Ensayo de luminiscencia

Tampón de Ensayo I:

Tampón Pipes 50 mM (pH 6,6) conteniendo 1 mg/ml de caseína, DTT 10 mM, $MgCl_2$ 0,5 mM y KCl 30 mM.

Tampón de Ensayo II:

Tampón Hepes 40 mM (pH 7,75), EDTA 4 mmoles/l, cloruro de magnesio 20 mM y 0,36 mmoles/l de DTT.

Tampón de Ensayo III:

Tampón Hepes 40 mM (pH 7,75) conteniendo 1,6 μ g/ml de luciferasa (de *Photinus pyralis*), 700 μ moles/l de D-luciferina, 20 mmoles/l de cloruro de magnesio, 4 mmoles/l de EDTA, 0,36 mmoles/l de DTT y 0,3 mmoles/l de AMP.

Procedimiento del ensayo:

A 130 μ l de Tampón de Ensayo I se añaden 3 U de S-adenosil-L-homocisteína hidrolasa; a esta mezcla se añaden 20 μ l de muestra y se incuba durante 15 minutos a 37 grados Celsius. Posteriormente, se añade adenosina disuelta en Tampón de Ensayo I a una concentración final de 5×10^{-6} moles/l. Después de 5 minutos de incubación a 37°C, se añaden 750 μ l de Tampón de Ensayo I conteniendo $0,7 \times 10^{-5}$ moles/l de ATP y 1 mU de adenosina quinasa, y la solución resultante se incuba adicionalmente a 37°C durante 5 minutos. Esta solución es diluida 1:100 (en volumen) con Tampón de Ensayo II y 500 μ l de esta solución diluida son añadidos inmediatamente a 500 μ l de Tampón de Ensayo III. Ambos Tampones de Ensayo II y III estaban equilibrados a temperatura ambiente (21°C). La luminiscencia producida es leída en un fotómetro a 550 nm.

En paralelo, se realiza un ensayo sin que esté presente S-adenosil-L-homocisteína hidrolasa. Para ensayos clínicos las concentraciones de homocisteína pueden ser calculadas mediante la interpolación en una curva estándar de la diferencia de la luminiscencia producida con y sin S-adenosil-L-homocisteína hidrolasa presente.

Ejemplo 21

Preparación de anticuerpos policlonales

Anticuerpos policlonales de conejo hacia los antígenos de los Ejemplos 12 y 16 son producidos de

ES 2 196 116 T3

acuerdo con el protocolo publicado por la Dako Corporation, Copenhagen, Dinamarca. La IgG policlonal es purificada del antisuero recogido de acuerdo con el mismo protocolo. Los anticuerpos policlonales son purificados de los anticuerpos reactivos con residuos de adenosina y homocisteína *per se* mediante el pase de los anticuerpos a través de columnas Racti-Gel con residuos inmovilizados de adenosina y homocisteína (gel y protocolo proporcionados por Pierce Chemical Company, Bélgica). Los anticuerpos no reactivos con SAH son también rechazados. Los anticuerpos seleccionados pueden ser utilizados en los ensayos de los Ejemplos anteriores.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

REIVINDICACIONES

1. Un método para analizar homocisteína en una muestra, comprendiendo dicho método las etapas de puesta en contacto de dicha muestra con un enzima convertidor de homocisteína, distinto de S-adenosilhomocisteína hidrolasa, y al menos un cosustrato para dicho enzima distinto de homocisteína y, sin separación cromatográfica, la determinación de un analito no marcado seleccionado de dicho cosustrato y los productos de conversión de la homocisteína procedentes de la conversión enzimática de homocisteína por dicho enzima, siendo dicho cosustrato un compuesto que reacciona con homocisteína en la reacción de conversión de homocisteína catalizada por dicho enzima convertidor de homocisteína.
2. Un método como el reivindicado en la reivindicación 1, en el que dicha muestra es puesta en contacto con un anticuerpo hacia dicho analito y con un hapteno para dicho anticuerpo distinto de dicho analito no marcado, y en el que la determinación de dicho analito se efectúa indirectamente determinando dicho hapteno unido o no unido a dicho anticuerpo.
3. Un método como el reivindicado en la reivindicación 2, en el que dicho hapteno es un polihapteno.
4. Un método como el reivindicado en la reivindicación 2, en el que dicho hapteno es una molécula marcada que tiene una unidad estructural epitópica que está presente también en dicho analito no marcado.
5. Un método como el reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
6. Un método como el reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo unido a una matriz portadora.
7. Un método como el reivindicado en la reivindicación 1, en el que dicha muestra es puesta en contacto con un segundo enzima que sirve para convertir dicho analito y la determinación de dicho analito es efectuada indirectamente mediante la determinación de un sustrato de dicho segundo enzima distinto de dicho analito o mediante la determinación de un producto de la conversión enzimática de dicho analito por dicho segundo enzima.
8. Un método como el reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho analito es dicho cosustrato.
9. Un método como el reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho analito es dicho producto de conversión.
10. Un método como el reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicha muestra es una muestra de sangre, plasma u orina pretratada con un agente reductor.
11. Un método como el reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la determinación de dicho analito es efectuada fotométricamente.
12. Un método como el reivindicado en la reivindicación 11, en el que dicha determinación es efectuada espectrométricamente o colorimétricamente.
13. Un método como el reivindicado en la reivindicación 11, en el que dicha determinación es efectuada turbidimétricamente o nefelométricamente.
14. Un método como el reivindicado en la reivindicación 11, en el que dicha determinación es efectuada utilizando detección de polarización de fluorescencia.
15. Un método como el reivindicado en la reivindicación 3, en el que la determinación es efectuada determinando la precipitación o la aglutinación de conjugados anticuerpo:polihapteno.
16. Un kit analítico para ser utilizado en el ensayo para determinar la cantidad o concentración de homocisteína en una muestra, directamente o indirectamente, conteniendo dicho kit: un enzima convertidor de homocisteína seleccionado del grupo que consta de cistationina β -sintetasa, metiltransferasa del ácido metil-tetrahidrofólico, metionina sintasa o betaína-homocisteína-metiltransferasa; un cosustrato para dicho enzima distinto de homocisteína, siendo dicho cosustrato un compuesto que reacciona con

homocisteína en la reacción de conversión de homocisteína catalizada por dicho enzima convertidor de homocisteína; un agente productor de una señal y, opcionalmente, un medio para determinar la señal.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

NOTA INFORMATIVA: Conforme a la reserva del art. 167.2 del Convenio de Patentes Europeas (CPE) y a la Disposición Transitoria del RD 2424/1986, de 10 de octubre, relativo a la aplicación del Convenio de Patente Europea, las patentes europeas que designen a España y solicitadas antes del 7-10-1992, no producirán ningún efecto en España en la medida en que confieran protección a productos químicos y farmacéuticos como tales.

55

60

Esta información no prejuzga que la patente esté o no incluida en la mencionada reserva.
