

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 369 979**

51 Int. Cl.:  
**C12Q 1/48** (2006.01)  
**C12Q 1/34** (2006.01)  
**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **00976976 .1**  
96 Fecha de presentación: **02.11.2000**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1230381**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.08.2002**

54 Título: **ENSAYOS DE CICLACIÓN ENZIMÁTICA PARA LA HOMOCISTEÍNA Y LA CISTATIONINA.**

30 Prioridad:  
**02.11.1999 US 163126 P**  
**10.05.2000 US 203349 P**  
**01.11.2000 US 704036**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**09.12.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**09.12.2011**

73 Titular/es:  
**Axis-Shield Diagnostics Ltd.**  
**Luna Place The Technology Park**  
**Dundee DD2 1XA, Scotland, GB**

72 Inventor/es:  
**KAWASAKI, Glenn;**  
**WEBB, Heather, Kay;**  
**OWENS, Jeffrey;**  
**LIEDTKE, Raymond;**  
**FOREST, Doreen;**  
**LEGAZ, Mark y**  
**LAWSON, Sobomabo**

74 Agente: **Curell Aguilá, Marcelino**

ES 2 369 979 T3

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).

## DESCRIPCIÓN

Ensayos de ciclación enzimática para la homocisteína y la cistationina.

5 **Antecedentes de la invención**

Las grandes concentraciones de homocisteína en el plasma humano se correlacionan con el aumento del riesgo de cardiopatía coronaria, ictus, arterioesclerosis y otras enfermedades. Como resultado, es deseable examinar en la población en general las cantidades elevadas de este aminoácido. Para la viabilidad de la prueba a gran escala de la homocisteína, deben desarrollarse nuevos ensayos y menos costosos.

La homocisteína en el plasma se mide de forma rutinaria por cromatografía líquida a alta presión (HPLC) y cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC/MS) a un coste superior a 100 \$ por ensayo, haciendo demasiado costosos estos métodos de separación física para un estudio en toda la población. Por ejemplo, pueden prepararse muestras de orina o de sangre para cromatografía de aminoácidos, y cuantificar la L-homocisteína por separación y detección por HPLC. Fiskerstrand *et al.*, (*Clin. Chem.*, 39:263-271 (1993)) describen un método de ensayo de L-homocisteína que utiliza el marcaje fluorescente de tioles del suero, seguido de separación y detección por HPLC del derivado de L-homocisteína procedente de varios otros compuestos que contienen azufre. Sin embargo dichos métodos son por lo general prolongados, costosos y no resultan fácilmente disponibles en muchos laboratorios.

Se ha desarrollado también un inmunoensayo indirecto para la homocisteína, sin embargo, estos métodos de anticuerpos son todavía relativamente costosos a razón de aproximadamente 24 \$ por prueba. Un inmunoensayo indirecto específico convierte mediante enzimas la homocisteína en adenosil-homocisteína y la cantidad de adenosil-homocisteína se determina por un ELISA competitivo (inmunoensayo con enzima ligada), utilizando un anticuerpo anti-adenosil-homocisteína (por ejemplo, véase la patente US nº 5.827.645).

Se han desarrollado ensayos enzimáticos indirectos para la cuantificación de L-homocisteína. Por ejemplo, la enzima S-adenosil-homocisteína hidrolasa y la adenosina se añaden a una muestra de prueba. La concentración resultante, o el cambio en la concentración, de adenosina en la mezcla de reacción se utiliza como indicador para la concentración inicial de homocisteína en la muestra.

Se han publicado también ensayos enzimáticos directos para cuantificar la homocisteína. Por lo general, estos protocolos convierten de manera irreversible la homocisteína en otros compuestos que son cuantificables. Por ejemplo, la enzima homocisteína deshidratasa se ha utilizado para eliminar el grupo sulfhidrilo de la homocisteína. La concentración del resto sulfhidrilo eliminado se mide a continuación. Un inconveniente principal en éste y otros ensayos enzimáticos para la homocisteína es que las enzimas utilizadas reaccionan con otros aminoácidos que contienen azufre y compuestos relacionados con la homocisteína, conduciendo a un fondo elevado e inconstante y a determinaciones de homocisteína en el plasma que son inexactas.

Se han publicado ensayos de ciclación enzimática para un número muy pequeño de analitos. En un ensayo de ciclación enzimático se utilizan dos o más actividades enzimáticas que reciclan el sustrato y no convierten de manera irreversible el compuesto cuantificado. En su lugar el "compuesto" se utiliza como catalizador para controlar la velocidad de conversión para el compuesto cuantificado en el ensayo. Como resultado, el analito de interés continúa en una concentración estacionaria que es lo suficiente baja como para crear una velocidad de reacción de pseudoprimer orden. La concentración estacionaria del analito de este modo está relacionada linealmente con la velocidad de todo el ensayo. Al medir las velocidades de reacción, la cantidad del analito se determina fácilmente. Los ensayos de ciclación enzimática se denominan a veces ensayos de "ampliación", porque los métodos por lo general aumentan la sensibilidad de la cuantificación de un analito de 100 a 1.000 veces. La ampliación de la cuantificación es un resultado directo de no reducir la concentración estacionaria del compuesto. Se ha publicado un ensayo de ciclación enzimática para la cuantificación de la homocisteína en el documento WO 00/28071.

La presente invención proporciona un ensayo de ciclación enzimática para la homocisteína y/o la cistationina que es menos costoso, y proporciona un resultado superior de la muestra que los ensayos de diagnóstico actualmente disponibles. Además, la invención proporciona métodos y vectores para la producción recombinante de enzimas que pueden utilizarse en la producción de reactivos de ensayo y kits de prueba para evaluar la cantidad de homocisteína y cistationina en una muestra.

60 **Sumario de la invención**

La presente invención proporciona un kit de prueba para su utilización en la evaluación de la cantidad de homocisteína en una solución de la muestra que contiene cistationina  $\beta$ -sintasa, o un derivado de la misma, L-serina, cistationina  $\beta$ -liasa, o un derivado de la misma, en el que los derivados conservan actividad enzimática de una enzima natural aislada.

La invención proporciona además una enzima aislada que presenta una secuencia seleccionada de entre el grupo

constituido por las SEC. ID. nº 19 y nº 20.

La invención proporciona además un procedimiento de utilización de la cistationina como calibrador del ensayo de homocisteína que comprende las etapas siguientes:

- 5 (a) tomar una concentración conocida de cistationina;
- (b) añadir dicha concentración conocida a una muestra biológica;
- 10 (c) utilizar dicha muestra que contiene cistationina en una reacción enzimática que convierte la homocisteína en cistationina y reconvertir la cistationina en homocisteína con la producción acompañante de piruvato y amoniaco;
- (d) medir las cantidades de piruvato o amoniaco producidas; y
- 15 (e) utilizar dichas cantidades medidas de piruvato o amoniaco como patrones de referencia para dicho ensayo de homocisteína.

Ésta aprovecha la reacción de homocisteína y L-serina para formar cistationina mediante la enzima cistationina  $\beta$ -sintasa (CBS), o un derivado de la misma que conserva actividad enzimática de una enzima natural aislada y la conversión enzimática por la cistationina  $\beta$ -liasa (CBL) de cistationina a homocisteína, piruvato y amoniaco. El kit puede utilizarse para un ensayo que proporciona una concentración estacionaria de la homocisteína y/o la cistationina que está linealmente relacionado con la velocidad de la reacción completa. La cantidad de homocisteína y/o cistationina determinada en una muestra se basa en la cantidad de piruvato y/o amoniaco que se forma o en la cantidad de serina eliminada de la mezcla de reacción. Las soluciones que pueden someterse a prueba utilizando el kit de la presente invención pueden incluir muestras de laboratorio de sangre, suero, plasma, orina y otras muestras biológicas. Además, puede someterse a prueba cualquier otra muestra líquida.

Se da a conocer un procedimiento para evaluar la cantidad de homocisteína y/o cistationina en una solución que comprende las etapas siguientes:

- 30 (a) poner en contacto la solución que contiene homocisteína y/o cistationina (bien antes y/o después de llevar a cabo una etapa de reducción de disulfuro) para formar una mezcla de reacción con CBS, o un derivado de la misma, L-serina y CBL, o un derivado de la misma, durante un periodo suficiente para catalizar la conversión cíclica de homocisteína en cistationina, y la reconversión de cistationina en homocisteína con producción de piruvato y amoniaco;
- 35 (b) determinar la cantidad de piruvato y/o amoniaco presente en la mezcla de reacción; y
- 40 (c) evaluar la cantidad de homocisteína y/o cistationina presente en la solución basándose en la cantidad de piruvato y/o amoniaco formada.

Más específicamente, el procedimiento proporciona la evaluación de la cantidad de homocisteína mediante la adición del aminoácido L-serina económico. La cantidad de piruvato presente en la mezcla de reacción puede medirse de numerosas maneras. En un kit específico de la presente invención lactato-deshidrogenasa (LDH) y NADH (cofactor de nicotinamida reducido), están presentes en la mezcla de reacción. LDH en presencia de NADH convierte piruvato en lactato con la oxidación de NADH a NAD<sup>+</sup> (cofactor de nicotinamida oxidado).

La oxidación de NADH a NAD<sup>+</sup> puede medirse por numerosos procedimientos conocidos en la técnica incluyendo el seguimiento de la mezcla de reacción a 340 nm. La producción de NAD<sup>+</sup> puede también seguirse por la oxidación de un colorante para producir un cambio de color observable. Los colorantes preferidos para su utilización en la presente invención comprenden de manera no limitativa 5,5'-ditiobis(ácido 2-nitrobenzoico), 2,6-diclorofenilindofenol, compuestos de tetrazolio, metosulfato de fenazina, metilo viológeno o derivados de cualquiera de estos colorantes. La cantidad de homocisteína y/o cistationina presente en la solución se basa en la intensidad del color observado en comparación con una curva patrón construida para muestras de analito de concentración conocida.

Se da a conocer que la piruvato oxidasa con peroxidasa de rábano picante, en presencia de peróxido de hidrógeno y un cromógeno puede utilizarse para detectar la cantidad de piruvato presente en la muestra. N-etil-N-2-hidroxi-3-sulfopropil) m-toluidina sódica (TOOS) y otros derivados de N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-anilina son cromógenos preferidos para esta reacción colorimétrica. Como anteriormente, la cantidad de homocisteína y/o cistationina presente en la muestra está basada en la intensidad del color observado comparada con una curva patrón construida para muestras de concentraciones conocidas del analito.

La cantidad de homocisteína y/o cistationina presente en una solución puede medirse también basándose en la cantidad de amoniaco presente en la mezcla de reacción. Los métodos para determinar la concentración de amoniaco en una solución son abundantes. La cantidad de amoniaco puede medirse utilizando un sensor de amoniaco patrón normalmente disponible.

Se da a conocer un procedimiento para evaluar la cantidad de homocisteína y/o cistationina en una muestra que comprende las etapas que consisten en poner en contacto la solución con un agente reductor durante un periodo suficiente para reducir sustancialmente toda la homocisteína y otros disulfuros que están presentes en la solución para homocisteína. El tratamiento con un agente reductor puede actuar también para liberar homocisteína que está unida a una proteína y/o a otras moléculas presentes en una solución mediante un enlace disulfuro. Tras la reducción la solución se pone en contacto a continuación con CBS, o un derivado de la misma, L-serina, y CBL, o un derivado de la misma, durante un periodo suficiente para catalizar la conversión cíclica de homocisteína en cistationina y la conversión de cistationina en homocisteína con producción de piruvato y amoniaco. Para evaluar la cantidad de homocisteína y/o cistationina presente en la solución, la cantidad de piruvato y/o amoniaco presente en la mezcla de reacción puede determinarse como se indicó anteriormente. Los agentes de reducción preferidos incluyen sales de borohidruro y agentes reductores de tiol. Los agentes reductores de tiol típicos apropiados para su utilización incluyen ditioeritrol (DTE), ditiotreitrol (DTT),  $\beta$ -mercaptoetanol ( $\beta$ ME), hidrocloreto de tris-(carboxietil) fosfina (TCEP) o ácido tioacético, o algunos derivados de los mismos, y similares.

En otro procedimiento todavía para evaluar la cantidad de homocisteína y/o cistationina presente en una solución, la solución puede pretratarse con cistationina  $\gamma$ -liasa (CGL), o un derivado de la misma, durante un periodo suficiente para eliminar cualquier cistationina de la mezcla de reacción por conversión de cistationina en  $\alpha$ -cetoglutarato. Después de la eliminación de cistationina la cistationina  $\gamma$ -liasa se elimina de la mezcla de reacción o se destruye. La cistationina  $\gamma$ -liasa puede destruirse calentando la solución durante un periodo suficiente para eliminar sustancialmente su actividad enzimática. La cistationina  $\gamma$ -liasa puede inmovilizarse también en un sustrato o superficie insoluble, tal como, por ejemplo, una micropartícula o bolita, que puede eliminarse fácilmente.

Se da a conocer un procedimiento para evaluar la cantidad de homocisteína y/o cistationina presente en una solución que comprende la reacción de la solución con L-serina y CBS, o un derivado de la misma, y CBL, o un derivado de la misma, que han sido inmovilizados en una superficie sólida. La superficie sólida puede ser, por ejemplo, papel, papel de filtro, nilón, vidrio, cerámica, sílice, alúmina, tierra de diatomeas, celulosa, polimetacrilato, polipropileno, poliestireno, polietileno, cloruro de polivinilo y derivados de los mismos. La superficie sólida puede ser los lados y el fondo del recipiente de prueba o puede ser un material añadido al recipiente de prueba. La superficie sólida puede comprender una bolita que se añade al recipiente de prueba.

La CBS, o el derivado de la misma, CBL, o el derivado de la misma, y cistationina  $\gamma$ -liasa, o un derivado de la misma, útil en la presente invención puede obtenerse en forma de extracto de una célula en bruto. En una forma de realización de la presente invención la cistationina  $\beta$ -sintasa (CBS), o el derivado de la misma, cistationina  $\beta$ -liasa (CBL), y/o cistationina  $\gamma$ -liasa (CGL) se purifican a partir de células humanas, de levadura o bacterianas. En una forma de realización particularmente preferida de la presente invención los genes que codifican las enzimas se aíslan o sintetizan y se expresan como una proteína recombinante en una célula hospedadora. Resulta específicamente preferido que una secuencia de ADN que codifica una etiqueta de afinidad se añada al montaje génico para ayudar en la purificación y/o detección de las enzimas producidas de manera recombinante. Los métodos recombinantes pueden utilizarse también para proporcionar proteínas de fusión que comprenden las actividades enzimáticas de CBS y CBL en una sola proteína. Se puede incluir también una etiqueta de afinidad como parte del montaje de la proteína de fusión para ayudar a la purificación de la proteína de fusión.

Una forma de realización de la presente invención proporciona un kit de prueba tal como se define en la reivindicación 1, que comprende un recipiente para mantener la solución en la que debe evaluarse la cantidad de homocisteína y/o cistationina, L-serina, CBS, o un derivado de la misma, CBL, o un derivado de la misma, y algunos tampones, sustancias auxiliares y disolventes necesarias para proporcionar condiciones conductoras para gran actividad enzimática. El kit de prueba puede comprender además lactato deshidrogenasa y NADH, NADH puede medirse directamente a 340 nm o, puede incluirse un colorante que puede proporcionar un cambio de color cuando se oxida. La cantidad de homocisteína y/o cistationina está correlacionada con el cambio en la medida de absorbancia a lo largo del tiempo.

En una forma de realización preferida se proporcionan las enzimas inmovilizadas en un soporte sólido. El soporte sólido puede comprender la superficie del recipiente provisto para mantener la muestra de prueba o puede ser una bolita u otro artículo añadido al recipiente. En una forma de realización adicional de la presente invención, puede proporcionarse cistationina  $\gamma$ -liasa como parte del kit de prueba para eliminar cualquier cistationina de la solución de prueba antes del ensayo de ciclación enzimática. Sustancialmente toda la actividad de la cistationina  $\gamma$ -liasa, o un derivado de la misma, debe eliminarse de la mezcla de reacción o destruirse en la misma antes de la adición de los componentes restantes para la ciclación enzimática de la homocisteína.

Se ha observado que el ensayo preferido puede realizarse en un periodo relativamente corto y con cantidades relativamente pequeñas de enzima, proporcionando un ensayo que presenta sustanciales ventajas comerciales. Por ejemplo, el ensayo preferido implica la creación de una mezcla de reacción que incluye una muestra que contiene homocisteína, serina, CBS, CBL, lactato deshidrogenasa, NADH y un reductor tal como DTE o DTT, siendo la relación CBS/CBL en la mezcla desde aproximadamente 1:1 a 25:1, más preferentemente desde aproximadamente 1:10, y aún más preferentemente desde aproximadamente 2:1 a 5:1. De manera ventajosa, se ha observado que el

reductor puede estar presente junto con el sistema de detección (es decir, la lactato deshidrogenasa y NADH) sin afectar perjudicialmente el ensayo. Por lo tanto, el ensayo se realiza sin una etapa de reducción independiente de modo que los tiempos de ensayo totales se reducen. Por lo tanto, cuando una variedad de muestras que deben ensayarse creando sucesivamente una mezcla de reacción en un recipiente (por ejemplo, una cubeta espectrofotométrica) constituida por una muestra, serina, CBS, CBL, lactato deshidrogenasa, NADH y el reductor, y evaluando la cantidad de piruvato presente en la mezcla de reacción controlando la producción de NAD<sup>+</sup> a lo largo del tiempo, el intervalo de tiempo entre las respectivas etapas de reacción-creación puede ser como mucho de 100 a 50 segundos siendo el tiempo de reacción total de hasta aproximadamente 20 minutos para una muestra dada. Más preferentemente, el tiempo de reacción total para una muestra dada es de hasta aproximadamente 15 minutos, y aún más preferentemente hasta de aproximadamente 13 minutos. El número total de muestras ensayadas por hora puede ser de aproximadamente de 15 a 30 para instrumentos más lentos, pero tan elevada como 200 a 400 para instrumentos más rápidos. En este ensayo preferido, se prepara una mezcla de reacción que comprende la muestra, serina, lactato deshidrogenasa, NADH y el reductor, con un periodo de incubación adecuado que permita la liberación de un predominio (y preferentemente esencialmente su totalidad) la homocisteína (homocisteína total) presente en los estados ligado, oxidado y/o libre en la muestra. Después, se añaden CBS y CBL para completar la mezcla de reacción e iniciar la ciclación enzimática de homocisteína y/o cistationina.

En otra forma de realización preferida, puede utilizarse cistationina para construir un o unos calibrador(es) para el ensayo enzimático (ya que el ensayo de ciclación enzimática interconvierte la homocisteína y la cistationina). En otras palabras, pueden utilizarse niveles variables conocidos de cistationina en el sistema de ensayo para "calibrar" o "normalizar" el ensayo y/o el instrumento lo que permite la cuantificación de los resultados de la muestra. En esta forma de realización, se añade una concentración conocida de cistationina a una muestra biológica y a continuación se somete al ensayo descrito en la presente memoria. Los resultados se utilizarán para crear una línea de calibración que a continuación se usará para ajustar la línea de homocisteína, debido al alto grado de correlación entre las dos líneas. Alternativamente, pueden utilizarse conocidas concentraciones de cistationina como medida de control de calidad, para asegurar que el ensayo está actuando de manera apropiada. En esta forma de realización de control de calidad, estas concentraciones "conocidas" de cistationina se ensayan como si fueran muestras desconocidas, y los resultados se comparan con sus valores conocidos (esperados), a fin de asegurar que el sistema de ensayo está funcionando apropiadamente.

Los ensayos preferidos se realizan utilizando enzimas CBL y CBS aisladas (purificadas) que tienen por lo menos aproximadamente 80% (y preferentemente por lo menos aproximadamente 90%) de identidad de secuencia con las enzimas seleccionadas de entre el grupo constituido por SEC. ID. n° 19 y n° 20. Tal como se utiliza en la presente memoria, "identidad de secuencia" como se conoce en la técnica se refiere a una relación entre dos o más proteínas o secuencias de polipéptidos o dos o más secuencias de polinucleótidos, a saber una secuencia de referencia y una secuencia dada para ser comparada con la secuencia de referencia. La identidad de secuencia se determina comparando la secuencia dada con la secuencia de referencia una vez se han alineado las secuencias de manera óptima para producir el mayor grado de similitud de secuencia, determinado por el ajuste entre series de dichas secuencias. En dicha alineación, la identidad de secuencia se determina posición por posición, por ejemplo, las secuencias son "idénticas" en una posición específica si en esta posición, los nucleótidos o restos de aminoácidos son idénticos. El número total de dichas identidades de posición se divide a continuación por el número total de nucleótidos o restos en la secuencia de referencia para dar el % de identidad de secuencia. La identidad de secuencia puede calcularse fácilmente por procedimientos conocidos, incluyendo pero sin limitarse a, los descritos en Computational Molecular Biology, Lesk, A. N., ed., Oxford University Press, Nueva York (1998), Biocomputing: Informatics y Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, Nueva York (1993); Computer Analysis of Sequence Data, Parte I, Griffin, A.M., y Griffin, H.G., eds., Humana Press, Nueva Jersey (1994); Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinge, G., Academic Press (1987); Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M. Stockton Press, Nueva York (1991); y Carillo, H., y Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48:1073 (1998). Los métodos preferidos para determinar la identidad de secuencia se diseñan para proporcionar un mayor ajuste entre las secuencias probadas. Los métodos para determinar la identidad de secuencia están codificados en programas informáticos públicamente disponibles que determinan la identidad de secuencia entre secuencias dadas. Los ejemplos de dichos programas comprenden, de manera no limitativa el paquete del programa GCG (Devereux, J., *et al.*, *Nucleic Acids Research*, 12(1):387 (1984)), a BLASTP, BLASTN y FASTA (Altschul, S. F. *et al.*, *Molec. Biol.*, 215:403-410 (1990)). El programa BLASTX está públicamente disponible en NCBI y otros proveedores (BLAST Manual, Altschul, S. *et al.*, NCVI NLM NIH Bethesda, MD 20894, Altschul, S. F. *et al.*, *J. Molec. Biol.*, 215:403-410 (1990)). Estos programas alinean de manera óptima secuencias utilizando ponderaciones de hueco por defecto para producir el nivel mayor de identidad de secuencia entre las secuencias dada y la de referencia. Como ilustración, mediante un polinucleótido que tiene una secuencia nucleotídica que tiene por lo menos, por ejemplo, 95% de "identidad de secuencia" con una secuencia nucleotídica de referencia, se pretende que la secuencia nucleotídica del polinucleótido dado sea idéntica a la secuencia de referencia excepto que la secuencia polinucleotídica dada puede incluir hasta 5 mutaciones puntuales por cada 100 nucleótidos de la secuencia nucleotídica de referencia. En otras palabras, en un polinucleótido que tiene una secuencia nucleotídica que presenta por lo menos 95% de identidad en relación con la secuencia nucleotídica de referencia, hasta el 5% de los nucleótidos en la secuencia de referencia pueden eliminarse o sustituirse por otro nucleótido, o un número de nucleótidos de hasta el 5% de los nucleótidos totales en la secuencia de referencia pueden insertarse en la secuencia de referencia. Estas mutaciones de la secuencia de referencia pueden ocurrir en las posiciones terminales 5' o 3' de la secuencia del nucleótido de

referencia o en cualquier lugar entre estas posiciones terminales, intercaladas ya sea individualmente entre los nucleótidos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia. Asimismo, mediante un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos dada que tiene por los menos, por ejemplo, 95% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de referencia, se desea que la secuencia de aminoácidos dada del polipéptido sea idéntica a la secuencia de referencia excepto que la secuencia de polipéptidos dada pueda incluir hasta alteraciones de 5 aminoácidos por cada 100 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de referencia. En otras palabras, para obtener una secuencia de polipéptidos dada con por lo menos el 95% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos de referencia, hasta el 5% de los restos de aminoácidos en la secuencia de referencia puede eliminarse o sustituirse con otro aminoácido, o un número de aminoácidos hasta el 5% del número total de restos de aminoácidos en la secuencia de referencia puede insertarse en la secuencia de referencia. Estas alteraciones de la secuencia de referencia pueden ocurrir en las posiciones del terminal amino o del carboxi de la secuencia de aminoácidos de referencia o en cualquier lugar entre estas posiciones terminales, intercaladas individualmente ente los restos de la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia. Preferentemente, las posiciones del residuo que no son idénticas se diferencian por las sustituciones conservadoras de aminoácidos. Sin embargo, no se incluyen sustituciones conservadoras como ajuste al determinar la identidad de secuencia.

Los reactivos útiles en la presente invención incluyen CBS, CBL, L-serina, LDH, NADH, DTE,  $\beta$ ME, DTT, TCEP, ácido tioacético y CGL. Las concentraciones de la enzima CBS útiles en la presente invención oscilan entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 100 KU/l. Más preferentemente, la concentración de CBS oscila entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 75 KU/l, y aún más preferentemente entre aproximadamente 1 y aproximadamente 50 KU/l. Aún más preferentemente, la concentración de CBS oscila entre aproximadamente 1 y aproximadamente 30 KU/l. Las concentraciones de la enzima CBL útiles en la presente invención oscilan entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 100 KU/l. Más preferentemente, la concentración de CBS oscila entre aproximadamente 0,05 y aproximadamente 50 KU/l, y aún más preferentemente, entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 30 KU/l. Aún más preferentemente, la concentración de CBS oscila entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 15 KU/l. L-serina puede estar presente a una concentración final entre aproximadamente 1  $\mu$ M y aproximadamente 50 mM. Más preferentemente, la L-serina se añade a una concentración final entre aproximadamente 10  $\mu$ M y aproximadamente 40 mM y aún más preferentemente a una concentración final entre aproximadamente 100  $\mu$ M y aproximadamente 20 mM. Aún más preferentemente, la concentración final de L-serina añadida oscila entre aproximadamente 0,2 mM y aproximadamente 10 mM. Cuando se utiliza en cualquier forma de realización, LDH está presente en la mezcla de reacción a una concentración final entre aproximadamente 30 y aproximadamente 5000 U/l. Más preferentemente, la concentración final de la LDH presente en la mezcla de reacción está comprendida entre aproximadamente 30 y aproximadamente 3000 U/l, y aún más preferentemente entre aproximadamente 50 y aproximadamente 2500 U/l. Aún más preferentemente, LDH está presente en la mezcla de reacción a una concentración final entre aproximadamente 100 y aproximadamente 2000 U/l. Además, cuando se utiliza NADH en cualquier forma de realización, la cantidad de NADH presente en la mezcla de reacción puede oscilar entre aproximadamente 0,1 mM y aproximadamente 2 mM. Más preferentemente, NADH está presente en la mezcla de reacción a una concentración final entre aproximadamente 0,1 mM y aproximadamente 1,5 mM, y aún más preferentemente entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 1 mM. Aún más preferentemente, NADH está presente en la mezcla de reacción a una concentración final entre aproximadamente 0,2 y aproximadamente 0,8 mM. Cuando se utiliza DTE en la presente invención, puede oscilar en una concentración final entre aproximadamente 0,01 mM y aproximadamente 100 mM. Más preferentemente, las concentraciones de DTE oscilarán entre aproximadamente 0,01 mM y aproximadamente 50 mM, y aún más preferentemente entre aproximadamente 0,1 mM y aproximadamente 25 mM. Aún más preferentemente, las concentraciones de DTE oscilarán entre aproximadamente 0,1 mM y aproximadamente 10 mM. Asimismo, cuando se utiliza DTT en la presente invención, puede oscilar en una concentración final entre aproximadamente 0,01 mM y aproximadamente 100 mM. Más preferentemente, las concentraciones de DTT oscilarán entre aproximadamente 0,01 mM y aproximadamente 50 mM, y aún más preferentemente entre aproximadamente 0,1 mM y aproximadamente 25 mM. Aún más preferentemente, las concentraciones de DTT oscilarán entre aproximadamente 0,1 mM y aproximadamente 10 mM. Por último, cuando se utiliza CGL en la presente invención, puede oscilar en la concentración final entre aproximadamente 0,1 KU/l y aproximadamente 100 KU/l. Más preferentemente, CGL oscilará entre aproximadamente 0,5 KU/l y aproximadamente 75 KU/l, y aún más preferentemente entre aproximadamente 1 KU/l y aproximadamente 50 KU/l. Aún más preferentemente, las concentraciones finales de CGL oscilarán entre aproximadamente 1 KU/l y aproximadamente 30 KU/l.

### Breve descripción de los dibujos

La figura 1 representa la absorbancia frente a diagramas de tiempo obtenidos utilizando soluciones acuosas de piruvato (5-100  $\mu$ M) que demuestran la cuantificación de piruvato. Los componentes del reactivo fueron los descritos en la Tabla 1 y los ajustes del instrumento los descritos en la Tabla 2;

la figura 2 representa una curva patrón de valores de absorbancia representados frente a cantidades conocidas de piruvato (0-100  $\mu$ M). La duración del ensayo fue de 5 min.;

la figura 3 representa la absorbancia frente a gráficos de tiempo obtenidos utilizando soluciones acuosas de

cistationina (0-100  $\mu\text{M}$ ). La cistationina se cuantificó por conversión enzimática de cistationina a homocisteína, piruvato y amoníaco con CBL;

5 la figura 4 representa las curvas patrón del ensayo de cistationina obtenidas utilizando soluciones acuosas de cistationina (0 a 100  $\mu\text{M}$ ). La duración de la reacción fue 5 ó 20 min.;

10 la figura 5 representa la absorbancia frente a gráficos de tiempo que demuestran la ciclación de CBS/CBL/piruvato oxidasa/peroxidasa y el sistema de señalización. Se disolvió cistationina en agua para preparar patrones a concentraciones entre 1 y 100  $\mu\text{M}$ ;

10 la figura 6 representa la absorbancia frente a gráficos de tiempo que demuestran la ciclación de CBS/CBL/piruvato oxidasa/peroxidasa y el sistema de señalización. Se disolvió cistationina en agua para preparar patrones a concentraciones entre 0 y 100  $\mu\text{M}$ ;

15 la fig. 7 representa una curva de calibración típica obtenida utilizando soluciones acuosas de homocisteína (0-100  $\mu\text{M}$ ) utilizando el sistema de ciclación y detección CBS/CBL/PO/HRP;

20 la figura 8 representa gráficos típicos de absorción frente al tiempo obtenidos utilizando homocisteína (0-100  $\mu\text{M}$ ) en solución acuosa utilizando el sistema CBS/CBL/LDH sin ditioneitol;

20 la figura 9 representa gráficos típicos de absorción frente al tiempo obtenidos utilizando homocisteína (0-100  $\mu\text{M}$ ) en solución acuosa utilizando el sistema de ciclación CBS/CBL/LDH con ditioneitol;

25 la figura 10 representa un gráfico de calibración de la concentración de homocisteína (0 a 100  $\mu\text{M}$ ) frente a la absorbancia con y sin ditioneitol. La duración de la reacción fue de 5 minutos;

30 la figura 11 representa una correlación entre los resultados de cuantificación obtenidos utilizando el sistema de ciclación enzimática CBS/CBL/LDH para medir la homocisteína en muestras de plasma humano utilizando DTT como agente reductor en comparación de los resultados de la cuantificación obtenidos por el método IMx homocisteína de Abbott;

30 la figura 12 representa un gráfico de correlación que ilustra la correlación entre ensayo de la presente invención (y) frente al ensayo IMx (x) comercializado, como se describe en el ejemplo 7;

35 la figura 13 representa un gráfico de correlación que ilustra la correlación entre ensayo de la presente invención (y) frente a un ensayo de HPLC convencional (x), como se describe en el ejemplo 7;

40 la figura 14 representa un gráfico de correlación que ilustra la correlación entre ensayo IMx (x) y el ensayo HPLC (y), como se describe en el ejemplo 7;

40 la figura 15 representa un gráfico de absorbancia frente al tiempo para el ensayo de piruvato sin DTT descrito en el ejemplo 9; y

45 la figura 16 representa un gráfico de absorbancia frente al tiempo para el ensayo de piruvato que contiene DTT descrito en el ejemplo 9.

### Descripción de las formas de realización específicas

50 La presente invención proporciona un kit tal como se define en la reivindicación 1 para evaluar la cantidad de homocisteína en una muestra. La ciclación enzimática mantiene un nivel estacionario de homocisteína y proporciona además un aumento de la sensibilidad del ensayo de homocisteína. Además, la presente invención proporciona enzimas que son útiles en la presente invención tal como se define en la reivindicación 18.

55 La homocisteína está presente en células como aminoácido intermediario producido cuando la metionina se metaboliza a cisteína. Generalmente, la homocisteína producida en el cuerpo es metabolizada rápidamente por una de las dos vías: (1) condensación con serina para formar cistationina o (2) conversión a metionina, y su concentración (y la de su forma ionizada, homocistina) en el cuerpo es baja en condiciones normales. La concentración media de homocisteína en el plasma para un adulto sano es aproximadamente 12  $\mu\text{M}$  para varones que oscilan desde aproximadamente 8,6 a aproximadamente 17,1  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$  para hembras que oscilan desde aproximadamente 3,9 a 16,8  $\mu\text{M}$  (Vester *et al.*, *Eur. J. Clin. Chem. Biochem.*, 29:549-554 (1991); Jacobsen *et al.*, *Clin. Chem.*, 40:873-881 (1994)).

65 Recientemente se ha determinado que la cantidad de concentraciones de homocisteína en una muestra biológica es de significación clínica en numerosas enfermedades. Cantidades elevadas de homocisteína en la sangre se han correlacionado con el desarrollo de aterosclerosis (Clarke *et al.*, *New Eng. J. Med.*, 324:1149-1155 (1991)). Además, la homocisteinemia moderada se considera actualmente como un factor de riesgo para cardiopatías y vasculopatías.

La precisión en el intervalo normal de homocisteína observada en los adultos normales es muy importante ya que se ha determinado que el riesgo de cardiopatía aumenta notablemente como mínimo el 30% sobre la concentración normal aumentando el factor de riesgo asociado 3,4 veces (Stampfer *et al.*, JAMA 268:877-881 (1992)).

5 Tal como se utiliza en la presente memoria el término "evaluación" está destinado a incluir tanto la determinación cuantitativa como cualitativa de la cantidad de homocisteína y/o cistationina presente en una solución de prueba. Una "solución" o "solución de prueba" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una muestra de fluido clínico o biológico o un extracto tisular y puede incluir, por ejemplo, sangre, derivados de la sangre, tal como plasma, y orina, y similares.

10 Una muestra que contiene homocisteína reacciona con L-serina para formar cistationina en presencia de la enzima CDS; la cistationina puede convertirse a continuación en homocisteína, piruvato y amoniaco con una segunda enzima, CBL. El resultado de utilizar estas enzimas anabólicas y catabólicas que operan simultáneamente es un "ciclo sin sentido", mediante el cual (1) cistationina y homocisteína se interconvierten continuamente, (2) serina se degrada, y (3) se crean piruvato y amoniaco.

15 La utilización de concentraciones relativamente elevadas de serina con homocisteína proporciona condiciones conductoras a una velocidad de reacción global que sigue la cinética de pseudoprimer orden dependiente directamente de la cantidad de homocisteína y cistationina en la reacción. Si la concentración de cistationina es muy baja comparada con la concentración de homocisteína, la velocidad de la reacción global variará linealmente con la cantidad de homocisteína. Midiendo la reducción en serina o el aumento en piruvato o amoniaco, la cantidad de homocisteína en una solución o muestra desconocida puede determinarse por comparación con reacciones de referencia que comprenden concentraciones conocidas de homocisteína que experimentan las reacciones enzimáticas idénticas. El método de ciclación enzimática proporciona un procedimiento de ampliación que produce cantidades mucho mayores de productos finales que la cantidad de homocisteína probablemente que está en la solución de prueba, es decir, la sangre. Por lo tanto los ensayos para determinar la cantidad de piruvato o amoniaco producido por la reacción no tienen que ser sumamente sensibles y puede medirse por procedimientos existentes conocidos por los especialistas expertos.

20 El piruvato se mide típicamente por la conversión enzimática en lactato con lactato deshidrogenasa, o un derivado de la misma. Esta reacción de conversión enzimática requiere el cofactor NADH (cofactor nicotinamida reducido), o un derivado del mismo, que se convierte en NAD<sup>+</sup> (cofactor de nicotinamida oxidado). La reacción puede controlarse midiendo la absorbancia a 340 nm. Tal como se utiliza la presente memoria, el término "derivados", con respecto a los cofactores, se refiere a las sales, solvatos y otras formas químicamente modificadas que conservan la actividad del cofactor global, pero puede haber extendido la estabilidad en soluciones acuosas. Los derivados pueden incluir, pero no se limitan a derivados acetílicos de NADH, incluyendo 3-piridinaldehído-NADH, 3-acetilpiridina-NADH, 3-tioico-tinamida-NADH y similares (véase, por ejemplo, la patente US nº 5.801.006).

25 Otros ensayos convenientes para determinar la oxidación de NADH, o un derivado del mismo, incluyen por ejemplo, la medición de fluorescencia, tal como describen Passoneau *et al.*, en *Enzymatic Analysis, A Practical Guide*, páginas 219-222 (1993). En otra forma de realización, NADH, o un derivado de la misma, reacciona con piruvato en presencia de lactato deshidrogenasa para formar NAD<sup>+</sup>, que reacciona además con un colorante capaz de producir un cambio de color, preferentemente en el espectro visible, cuando se oxida. El cambio de color del colorante puede utilizarse para determinar la cantidad total de oxidación de NADH a NAD<sup>+</sup> que corresponde a la cantidad de piruvato formado en la reacción de ciclación enzimática. Ejemplos de colorantes que pueden utilizarse en la presente invención comprenden de manera no limitativa 5,5'-ditiobis(ácido 2-nitrobenzoico), 2,6 diclorofenolindofenol, compuestos de tetrazolio, metosulfato de fenacina, metilo viológeno y derivados de cada uno de ellos.

30 El piruvato puede medirse también en la reacción con piruvato oxidasa, o un derivado de la misma, en presencia de una peroxidasa, es decir peroxidasa de rábano picante y similares. La cantidad de piruvato convertido en peróxido de hidrógeno se determina por la condensación oxidativa, por ejemplo, de un donante de hidrógeno soluble en agua que proporciona un compuesto coloreado para determinación fotométrica de la concentración de peróxido. Los donantes de hidrógeno particularmente preferidos que proporcionan un producto de reacción de color estable incluyen derivados solubles en agua de derivados de N-alkil-N-sulfopropilamilina, es decir la sal sódica de N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-m-toluidina (TOOS) (Tamaoku *et al.*, *Chem. Pharm. Bull.* 30:2492-2497 (1982)). La cantidad de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> puede medirse también por electrometría. Esto incluye mediciones amperométricas y potenciométricas. La determinación de la cantidad de homocisteína y/o cistationina se realiza a partir de la correlación de la cantidad de peróxido producida a partir de la conversión de piruvato en piruvato oxidasa a lo largo de un periodo de tiempo definido.

35 El amoniaco puede medirse por diferentes métodos, incluyendo mediante la utilización de un sensor de amoniaco (Willems *et al.*, *Clin. Chem.* 34:2372 (1988)). El amoniaco puede detectarse también fácilmente utilizando técnicas colorimétricas conocidas. Por ejemplo, el amoniaco generado en la muestra puede hacerse reaccionar para formar un producto coloreado, cuya formación puede detectarse por espectrofotometría. Dicho procedimiento, descrito en *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer) 1:1049-1056 (1970), se basa en la reacción de amoniaco con fenol en presencia de hipoclorito en condiciones alcalinas para formar el colorante coloreado indofenol. Puede utilizarse

nitroprusida sódica como catalizador. Las modificaciones del procedimiento utilizando, por ejemplo, varios derivados pueden utilizarse también. El producto final coloreado se forma en cantidades directamente proporcionales a la concentración de amoníaco y por lo tanto de homocisteína. Otros procedimientos pueden incluir, por ejemplo, análisis por microdifusión (Seligson *et al.*, *J. Lab. Clin. Med.*, 49:962-974 (1957), una técnica de intercambio iónico (Forman, *Clin. Chem.*, 10:497-508 (1964), y varios métodos enzimáticos (véase, por ejemplo, Mondzac *et al.*, *J. Lab. Clin. Med.*, 66:526-531 (1979)).

El método de ciclación enzimática para evaluar la cantidad de homocisteína y/o cistationina reduce las dificultades observadas en otros ensayos anteriores en los que los compuestos de fondo y las reacciones de fondo produjeron "ruido". Grandes cantidades de un aminoácido económico, por ejemplo, L-serina pueden añadirse para proporcionar la conversión total de L-serina a piruvato y amoníaco. Una concentración en serina de 250  $\mu\text{M}$  o más puede utilizarse, y posteriormente convertirse en piruvato y amoníaco. El plasma contiene por lo general serina aproximadamente 100  $\mu\text{M}$ . Esta cantidad de serina endógena es inmaterial para el ensayo presente ya que el ensayo mide una velocidad de conversión que está limitada por la cantidad de homocisteína y no la cantidad de serina. Concentraciones de L-serina de aproximadamente 0,1 mM hasta 10 mM no serían de esperar que afecten a la sensibilidad o precisión del ensayo dado a conocer.

Además, la reacción de ciclación enzimática proporciona una velocidad de conversión de L-serina que depende de la concentración de homocisteína en una reacción de pseudoprimer orden. Las concentraciones de piruvato en la sangre normales están comprendidas por lo general entre aproximadamente 0,4 y 2,5 mg/100 ml (Lehninger, AL. Principles of Biochemistry. 1982. Worthington Publishers, Inc. Pág. 707), que corresponde a aproximadamente 45 a 284  $\mu\text{M}$ . Esta concentración de piruvato podría proporcionar una medición de fondo menor, pero el presente ensayo mide un cambio a lo largo del tiempo y puede ajustarse fácilmente para el nivel de partida de piruvato en una solución. Además, el piruvato puede eliminarse antes de la incubación con lactato deshidrogenasa u otras enzimas. De manera más importante, la cisteína y otros compuestos que llevan azufre, por ejemplo, en la sangre, no contribuyen de manera significativa a la reacción de ciclación enzimática y, por lo tanto, se consideran ruido insignificante en el sistema.

La muestra puede tratarse para eliminar cistationina con objeto de aumentar la precisión de la cuantificación de homocisteína. Como ejemplo específico, el tratamiento comprende poner en contacto cistationina  $\gamma$ -liasa con la solución para convertir cistationina en  $\alpha$ -cetoglutarato (compuesto que puede no participar en la ciclación enzimática descrita anteriormente). Antes de proceder con el ensayo de ciclación de la enzima para evaluar la cantidad de homocisteína, debe eliminarse de la muestra o destruirse la actividad de cistationina  $\gamma$ -liasa, por ejemplo, mediante calor o similar.

Esto puede utilizarse también para la evaluación de la cantidad de cistationina comparando las diferencias de la velocidad de producción de piruvato y/o amoníaco en una muestra tratada y sin tratar con cistationina  $\gamma$ -liasa antes de experimentar el ensayo de ciclación enzimática. Por lo tanto, el procedimiento y el kit pueden utilizarse para determinar la cantidad de cistationina en una muestra desconocida, incluso si la muestra contiene homocisteína.

En determinadas muestras biológicas, tal como sangre, la homocisteína está unida con frecuencia mediante un enlace disulfuro a las proteínas, tioles y otros componentes celulares. Por lo general, la muestra puede tratarse con un agente reductor, tal como borohidruro sódico o potásico; un tiol, tal como ditioeritrol,  $\beta$ -mercaptoetanol, ditiotreitól, ácido tioglicólico o glutatión; o una fosfina o una trialquilfosfina, tal como tributilfosfina y tris(2-carboxietil) fosfina (TCEP), y similares, para liberar el enlace y la homocisteína ligada al disulfuro. Los ensayos anteriores que requieren anticuerpos para la etapa de detección deben cambiar las condiciones redox de la mezcla de reacción (la mayoría de los anticuerpos se mantienen unidos con un enlace disulfuro). Sin embargo en el presente método no es necesario lavar o alterar las condiciones redox porque el CBS y CBL utilizados son activos en condiciones reductoras. Por lo tanto, se requieren menos etapas para los ensayos dados a conocer en la presente memoria que para muchos inmunoensayos de la técnica anterior.

Una muestra que contiene sangre, fracciones sanguíneas, suero, plasma u orina puede tratarse con un agente reductor y ensayar directamente la homocisteína. El calentamiento de la muestra antes del ensayo para acelerar la liberación de homocisteína y para inactivar enzimas degradadoras y otros factores que pueden interferir con el ensayo puede resultar asimismo preferido. La manipulación general de las muestras de sangre para ensayo de homocisteína es conocida por los expertos en la materia para otros métodos tales como las pruebas por HPLC.

Las CBS y CBL son enzimas encontradas normalmente en la naturaleza. La especie humana y la levadura utilizan CBS para la síntesis de metionina; y el ADNc humano para CBS puede sustituir el gen CBS en levadura de cerveza (Kruger *et al.*, *Hum. Molec. Genet.*, 4:1155-1161 (1995)). CBL se encuentra en muchas bacterias, incluyendo *E. coli* (Laber *et al.*, *FEBS Lett.*, 3 79:94-96 (1996). Las secuencias completas de ADN para los genes de CBS y CBL son conocidas en estos organismos y en otras especies, proporcionando a un biólogo molecular experto una fuente para clonar o sintetizar fácilmente estos genes o derivados de los mismos.

Tal como se utiliza en la presente memoria "derivados" con respecto a las enzimas se refiere a mutantes producidos por adición, eliminación, sustitución y/o modificación de aminoácidos; mutantes producidos por recombinación y/o

reordenación del ADN; y sales, solvatos y otras formas químicamente modificadas de la enzima que conservan actividad enzimática de la enzima natural aislada. Un procedimiento para crear una enzima derivada por reordenamiento del ADN útil en la presente invención se describe en la patente US nº 5.605.793. Incluso sin clonación, se han purificado las dos enzimas de numerosos organismos diferentes. Véase por ejemplo, Ono *et al.*, *Yeast* 10:333-339 (1994); Dwivedi *et al.*, *Biochemistry* 21:3064-3069 (1982). Se dan a conocer organismos genéticamente modificados para producir una CBS, o un derivado de la misma, y para producir una CBL, o un derivado de la misma, que puede utilizarse en el ensayo de ciclación enzimática para proporcionar reactivos a un coste reducido y para aumentar la facilidad de purificar las enzimas.

Se han secuenciado el gen de la CBS y el genoma completo de *Saccharomyces cerevisiae*. Asimismo el gen de la CBL y los genes restantes de *E. coli* son también conocidos. Por lo tanto, utilizando técnicas habituales en materia de biología molecular, los genes que codifican CBS y CBL pueden clonarse y expresarse en ambos organismos. Los procedimientos publicados para purificar las dos enzimas son conocidos los cuales utilizan métodos de purificación de proteínas habituales. Sin embargo cada una de las enzimas pueden construirse como proteínas de fusión incluyendo por ejemplo, una fracción de otra proteína que ayuda a la disolución y/o repliegamiento de las secuencias activas de la enzima o aminoácidos que pueden añadirse para ayudar a la purificación. Un ejemplo de secuencias de aminoácidos añadidas para la purificación incluyen, etiquetas para la afinidad, tales como poli-His, o glutation-S-transferasa (GST) pueden añadirse para permitir la purificación más rápida de las proteínas en una sola columna de afinidad. Aunque las enzimas no requieren purificación hasta homogeneidad para la presente invención, las proteasas y sus actividades que convierten serina en piruvato pueden reducirse a niveles insignificantes mediante purificación.

Además, la concentración de las enzimas generalmente conduce a mayor estabilidad de la actividad enzimática durante la reacción y en el almacenamiento de larga duración. Es de esperar que CBS y CBL de otros organismos a parte de *S. cerevisiae* y *E. coli*, especialmente termófilos, sean fuentes de enzimas incluso con mayor estabilidad. Las enzimas aisladas pueden seleccionarse también para una mayor afinidad a la homocisteína. Además, la ingeniería de proteínas de la CBS de levadura y de la CBL bacteriana pueden conducir a enzimas con mejores propiedades comerciales, incluyendo mayores afinidades, velocidades de reacción más rápidas, purificación más fácil y una vida media más larga durante el almacenamiento.

Asimismo, se ha descrito con detalle la cistationina  $\gamma$ -liasa (CGL) en muchas especies (véase, por ejemplo, Yamagata, *et al.*, *J. Bacteriol.*, 175:4800-4808 (1993)). La manipulación de los genes que codifican CGL puede modificarse más genéticamente por métodos de recombinación habituales e insertarse en una célula hospedadora para desarrollar mayores niveles de cepas de producción.

Las expresiones recombinantes de los genes de CBS, CBL y CGL son típicas. Estos métodos pueden proporcionar grandes cantidades de enzima purificada y los genes pueden modificarse, por ejemplo, para añadir una secuencia peptídica definida (una etiqueta de afinidad) a las enzimas expresadas que pueden utilizarse para purificación por afinidad. Mediante la utilización de etiquetas de afinidad en la expresión de las enzimas recombinantes, la purificación e inmovilización de éstas enzimas puede simplificarse en gran medida, conduciendo a costes menores. Las etiquetas de afinidad son conocidas en la técnica e incluyen por ejemplo, pero no se limitan a, poli-histidina, GST (glutation-S-transferasa), strep-tag, "flag", secuencias c-myc y similares. Las etiquetas se utilizan ampliamente para la purificación por afinidad de proteínas expresadas de manera recombinante, y muchas están disponibles en el mercado.

En una forma de realización preferida, CBS y CBL se inmovilizan en una superficie sólida de manera que mantienen las actividades de las enzimas y de manera que mantienen la homocisteína libre para interactuar directamente con las proteínas. Al inmovilizar las enzimas a altas densidades, las distancias de difusión entre las diferentes proteínas se reducen con relación a las enzimas en solución. Como resultado, la velocidad de reacción global del ensayo aumenta en gran medida, ya que el producto de una enzima puede hacerse reaccionar mediante la otra enzima y viceversa. La aceleración de las velocidades de reacción se debe a un aumento local en las concentraciones de los intermedios, que están en más íntima proximidad con la enzima siguiente como resultado de la inmovilización. Aumentar la velocidad del ensayo de homocisteína puede ser un factor importante para comercialización del producto para diagnóstico porque la  $K_m$  de CBS y de CBL están en un intervalo milimolar pero las concentraciones en la sangre de homocisteína son aproximadamente de 10  $\mu$ M. Las reacciones de difusión limitada son conocidas por requerir una gran concentración de enzimas para proporcionar una velocidad de reacción rápida. La inmovilización de las enzimas en el kit de ciclación supera las dificultades que pueden presentarse por las bajas afinidades de estas dos enzimas para sus sustratos respectivos.

Todavía en otra forma de realización preferida CBS y CBL se inmovilizan en forma de una proteína de fusión. La distancia y orientación de las dos proteínas diferentes con relación entre sí puede controlarse durante la construcción del vector de expresión del gen de fusión. Colocando apropiadamente las dos actividades en una proteína de fusión, la interconversión de homocisteína y cistationina puede ocurrir de forma sumamente rápida prácticamente dentro de la proteína, ya que las distancias de difusión pueden minimizarse entre los dos centros activos. La homocisteína, por lo tanto, se comporta como un cofactor en toda la reacción de ciclación enzimática, que construye piruvato y amoniaco a partir de L-serina.

El kit de ciclación enzimática de la presente invención puede proporcionarse en numerosos formatos. El formato más sencillo de kit proporciona una solución de reactivo que contiene L-serina, CBS o un derivado de la misma, CGL o un derivado de la misma tal como se define en la reivindicación 1, y varios tampones y sustancias auxiliares necesarios para la optimización de las reacciones enzimáticas. En una forma de realización particularmente preferida de la presente invención CBS, o el derivado de la misma, y CBL, y el derivado de la misma, se proporcionan inmovilizadas en una superficie sólida.

La inmovilización de las enzimas a una superficie sólida conservando sustancialmente a la vez toda la actividad de la enzima es bien conocida en la técnica. Se han utilizado varios métodos para la inmovilización incluyendo, enlace covalente, absorción física, oclusión y deposición electroquímica. Como ejemplo se ha utilizado glutaraldehído para inmovilizar creatinina desaminasa y glutamato oxidasa a bolitas de vidrio con poro controlado modificadas con propilamina (Rui *et al.*, *Ann. NY. Acad. Sci.*, 672:264-271 (1992)). Otros ejemplos comprenden de manera no limitativa la utilización de carbodiimidas para unir por enlace covalente enzimas a bolitas de vidrio modificadas con succinato (Rui *et al.*, anteriormente), y la utilización de reactivos reticulantes hetero- u homo-bifuncionales (por ejemplo, SPDP, 3-(2-pirilditio)-propionato de N-succinimidilo; SMPT, succinimidiloxicarbonil- $\alpha$ -metil- $\alpha$ -(2-piridil-ditio)-tolueno; DSP, ditiobis(succinimidil propionato); DTSSP, 3,3'-ditiobis(sulfa-succinimidilpropionato); DSS, suberato de disuccinimidilo y similares) para acoplar por enlace covalente una enzima mediante, por ejemplo una amina o grupo sulfhidrilo a una superficie sólida modificada (Wilson, *et al.*, *Biosens. Bioelectro.*, 11:805-810 (1996)).

La "superficie sólida" tal como se utiliza en la presente memoria puede incluir un material poroso o no poroso insoluble en agua que puede tener una cualquiera de numerosas formas, tales como de tira, varilla, partícula, incluyendo una bolita o similar. Los materiales adecuados son bien conocidos en la técnica y pueden incluir, por ejemplo, papel, papel de filtro, nilón, vidrio, cerámica, sílice, alúmina, tierra de diatomeas, celulosa, polimetacrilato, polipropileno, poliestireno, polietileno, cloruro de polivinilo y derivados de cada de éstos. La superficie sólida puede ser los lados y el fondo del recipiente de prueba o puede ser un material añadido al recipiente de prueba. En una forma de realización preferida la superficie sólida comprende una bolita que se añade al recipiente de prueba.

Tanto las levaduras como las bacterias tienen enzimas que convierten la L-serina en piruvato, actividades que algunas veces se refieren a serina desaminasa o serina deshidratasa. Pueden utilizarse procedimientos mutagénicos muy probados para reducir en gran medida o eliminar estas actividades, que pueden contribuir de manera significativa al fondo en el ensayo de ciclación de homocisteína. *Saccharomyces cerevisiae*, en particular, puede manipularse genéticamente para eliminar las actividades de serina desaminasa, que son necesarias para (1) la síntesis de isoleucina y (2) el crecimiento en serina como fuente de carbono o nitrógeno, utilizando un método sencillo conocido como "destrucción génica". Eliminando el gen *chal* de la levadura, se elimina una actividad principal de serina desaminasa, con lo que se elimina un problema de fondo potencial para el ensayo de ciclación. Además, la eliminación de *chal* puede ser útil para seleccionar proteínas de fusión CBS-CBL y para modificar genéticamente estas proteínas de fusión. La cepa para eliminación de *chal* no puede crecer en serina como única fuente de carbono o nitrógeno. El gen de fusión de la CBS-CBL puede complementar la eliminación, siempre que esté disponible la homocisteína como "cofactor", porque el sistema de ciclación produce el mismo resultado neto que la serina desaminasa. Por lo tanto, la eliminación de *chal* puede utilizarse para seleccionar y mantener las fusiones CBS-CBL mejoradas, especialmente si una población de los genes de fusión se muta y se coloca en vectores de una sola copia o en los cromosomas en levadura. Las células que crecen más rápido en el medio de serina o que tienen un requisito reducido para la homocisteína pueden contener mutaciones que codifican enzimas o proteínas más rápido con mayores afinidades para la homocisteína y la cistationina.

La cantidad de homocisteína en una muestra puede determinarse mediante la utilización enzimática de homocisteína en la muestra. La conversión de homocisteína en el metabolismo celular por lo general libera un protón del resto sulfhidrilo de homocisteína. La liberación de este protón se utilizó para medir la afinidad de unión de la homocisteína a la sintasa metionina dependiente de cobalamina de *E. coli* (Jerret *et al.*, *Biochemistry*, 36:15739-15748 (1997)). Las reacciones enzimáticas catalizadas por proteínas, tal como la metionina sintasa, requieren generalmente cofactores o sustratos adicionales para completar la reacción. Si estos cofactores y sustratos no están presentes, la homocisteína continua estando unida a la enzima. La medición de los protones liberados elimina los protones liberados por la reacción enzimática que conduce a la reacción hacia el consumo de homocisteína presente en la muestra. La medición del cambio en el pH asociado a los protones liberados proporciona una determinación de la cantidad de homocisteína en la muestra., En el ensayo puede utilizarse, por ejemplo, metionina sintasa independiente de cobalamina.

Por cuestión de conveniencia, los reactivos para su utilización en la presente invención pueden suministrarse en un kit de prueba para su utilización en el método de ensayo. Un kit típico como se define en la reivindicación 1 comprende una combinación envasada de un recipiente para contener la solución de ensayo, L-serina, CBS, o un derivado de la misma, y CBL, o un derivado de la misma, y tampones y sustancias auxiliares requeridas para las condiciones óptimas de reacción. Curiosamente, varios agentes conservantes y/o estabilizantes pueden incluirse además con algunos o todos los reactivos del kit y/o enzimas para prolongar el periodo de descomposición así como la vida "en línea" durante la prueba de la muestra. El kit puede comprender además agentes reductores o CGL para pretratar la muestra antes del ensayo de ciclación. Además, el kit puede incluir lactato deshidrogenasa, NADH y un

colorante capaz de un cambio de color observable durante la oxidación.

En circunstancias apropiadas uno o más de los reactivos en el kit puede proporcionarse en solución (con o sin agentes conservantes y/o estabilizantes) o en forma de polvo seco, normalmente liofilizado, incluyendo excipientes, agentes conservantes y/o estabilizantes, que en disolución pueden proporcionar una solución de reactivo que tiene las concentraciones apropiadas para realizar el ensayo según la presente invención. Para mejorar la versatilidad de la presente invención, los reactivos pueden suministrarse en una combinación envasada, en el mismo recipiente o por separado, de modo que la relación de los reactivos proporciona sustancial optimización del procedimiento y del ensayo. Los reactivos cada uno puede estar en recipientes separados o varios recipientes pueden combinarse en uno o más recipientes dependiendo de la estabilidad de los reactivos. Por cuestión de conveniencia, los reactivos en el kit de la presente invención pueden suministrarse en cantidades predeterminadas. El kit de prueba puede contener además instrucciones escritas sobre cómo utilizar los reactivos y/o cómo llevar a cabo un ensayo específico, por ejemplo en forma de un prospecto del envase.

Los ejemplos siguientes son proporcionados a título ilustrativo y no limitativo.

### Ejemplo 1

#### Clonación y expresión del gen de la cistationina $\beta$ -liasa de *E. coli*

En este ejemplo se utilizaron procedimientos normalizados de RCP para clonar el gen de la CBL de *E. coli*. El gen aislado se insertó en un vector de expresión con una secuencia de etiqueta de afinidad (6HIS) y la proteína expresada se purificó en una columna de afinidad. Una cantidad sustancial de la actividad de la enzima CBL en las células hospedadoras se transformó con el vector de expresión, el montaje se purificó a partir de los lisados celulares.

#### *Clonación del gen de la cistationina $\beta$ -liasa (CBL, EC 4.4.1.8) de *E. coli**

Se utilizaron procedimientos normalizados de RCP que utilizan el sistema RCP EXPAND HIGH FIDELITY PCR (Roche Biochemicals) para ampliar el gen de la CBL de *E. coli* utilizando células competentes ONE SHOT TOP10 de *E. coli* (Invitrogen) como fuente de ADN genómico. Las secuencias de cebador de RCP para la clonación de CBL fueron las siguientes: (cebador con terminal N de CBL: 5'-CGACGGATCC GATGGCGGACAAAAGCTTG-3': SEC. ID. n° 1) y (el cebador con terminal C de CBL: 5'-CGCAGCAGCT GTTATACAATTCGCGCAA3'; SEC. ID. n° 2). El producto génico para CBL ampliado por RCP se purificó a continuación por electroforesis en gel de agarosa, se digirió con endonucleasas de restricción BamHI y PvuII, y se purificó otra vez por electroforesis en gel de agarosa. El gen de la CBL de *E. coli* purificado se ligó a continuación en el gel purificado, vector de expresión de la proteína pRSETB digerido con BamHI/PvuII (Invitrogen). El montaje resultante proporcionó el gen de la CBL bajo en control del activador de transcripción T7, se clonó en el marco con una secuencia principal con resto seis Histidina (6HIS) con terminal amino (denominada en lo sucesivo 6HISCBL) que permite la expresión conveniente, la purificación por afinidad y el análisis con inmunotinción de la proteína 6HISCBL recombinante procedente de las células de *E. coli*. La secuencia de ADN del gen de la cistationina  $\beta$ -liasa (CBL) de *E. coli* se presenta (SEC. ID. n° 21). La secuencia proteica de cistationina  $\beta$ -liasa (CBL) de *E. coli* clonada con una etiqueta de afinidad de 6 histidina (6 His) en el terminal amino-(NH<sub>3</sub>), procedente de la clonación del gen de la CBL en el plásmido de expresión bacteriana pRSETB se presenta también (SEC. ID. n° 19).

#### *Expresión y purificación de la proteína cistationina $\beta$ -liasa*

El montaje del plásmido pRSETB(6HISCBL) se transformó en la cepa BL21(DE3)pLysS de *E. coli* (Invitrogen), se extendió en placas LB/Agar-agar que contenían (100  $\mu$ g/ml de ampicilina, 35  $\mu$ g/ml de cloranfenicol) y a continuación se incubó durante la noche a 37°C. Las colonias bacterianas aisladas se transfirieron a continuación y se cultivaron durante la noche en matraces que contenían 100 ml de medio de cultivo LB que contenía ampicilina y cloranfenicol. Los 100 ml de cultivo de toda la noche se añadieron a continuación a múltiples matraces que contenían 1 l de medio de cultivo LB reciente que contenía ampicilina, y se dejó crecer hasta alcanzar una A<sub>600</sub> de 0,6 (aprox. 2,5 horas). A fin de provocar la expresión de la proteína CBL (dirigida por el activador T7), se añadió a continuación isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido (IPTG) al medio de cultivo hasta una concentración final de 0,1 a 1 mM. Se añadió además piridoxal 5'-fosfato (PLP) cofactor de la enzima CBL hasta una concentración final de 100  $\mu$ M en el medio de cultivo durante la inducción. Después de hacer el seguimiento del crecimiento celular y de la expresión de la proteína 6HISCBL durante un periodo de 5 horas, se recogieron por centrifugación las células de *E. coli*, se volvieron a poner en suspensión y se lisaron mediante la adición de reactivo de extracción de proteínas BUGBUSTER (Novagen Inc.) en presencia de inhibidor de proteasa completo exento de EDTA (Roche Biochemicals) tal como se describe en el protocolo del fabricante. El lisado celular se trató a continuación con ADNasa I, se purificó por centrifugación y se cargó en una columna de afinidad que contenía la resina de purificación de proteínas Poly-His (Roche Biochemicals). Se lavó a continuación la columna con 10 volúmenes de lecho de tampón equilibrador (KPi 50 mM, pH 7,8, NaCl 0,5 M) seguido de la elución con 5 volúmenes de lecho de tampón 1 de elución (KPi 50 mM, pH 7,8, NaCl 0,5 M, imidazol 10 mM; EB1), 5 volúmenes de lecho de tampón 2 de elución (KPi 50 mM, pH 7,8, NaCl 0,5 M, imidazol 50 mM, EB2) y 5 volúmenes de lecho de tampón 3 de elución (KPi 50 mM, pH 7,8, NaCl 0,5 M, imidazol

500 mM, EB3). Las muestras tomadas durante cada etapa del procedimiento de purificación se analizaron a continuación por electroforesis en gel de proteína desnaturizante (SDS-PAGE) y se tiñeron con Coomassie Brilliant Blue, o se sometieron a análisis de inmunotransferencia Western utilizando una inmunoglobulina de ratón conjugada con peroxidasa antipolihistidina monoclonal para la detección tal como describe el fabricante (Sigma).

Se observó que la proteína 6HISCBL purificada eluye principalmente en tampones 2 y 3 de elución (EB2 y EB3). El eluido que contiene la CBL se concentró a continuación utilizando cámaras de filtración centrífugas (Amicon) y se dializó durante la noche a 4°C frente a tampón de almacenamiento (TrisHCl 50 mM, pH 8, NaCl 100 mM, PLP 5 mM), se dividió en alícuotas y se almacenó congelado a -80°C. Se calculó a continuación la concentración de la enzima CBL homogénea purificada basándose en el coeficiente de extinción a 280 nm y un peso de la subunidad de 43.312 Da. (Clausen *et al.*, *Biochem.* 36:12633-42 (1997)). Un rendimiento típico de 6 HISCBL purificada estaba comprendido en el intervalo entre 20 y 30 mg de 6 HISCBL por gramo de pasta de células *E. coli*.

#### Ensayo de actividad de CBL

La actividad de CBL de la proteína 6HisCBL recombinante purificada por afinidad expresada en el montaje del plásmido pRSETB (6HisCBL) se llevó a cabo esencialmente como se describió anteriormente (Clausen *et al.*, *Biochem.* 36:12633-42 (1997) incorporada en la presente memoria por referencia). En resumen, las mezclas de ensayo contenían Tris/HCl 100 mM (pH 8,5), L-cistationina 5 mM, 5,5'-ditiobis(ácido 2-nitrobenzoico) 1 mM (DTNB; reactivo de Ellman) y enzima 6HisCBL en un volumen de reacción final de 1 ml. La reacción fue seguida registrando el aumento en absorbancia a 412 nm a lo largo del tiempo. La misma reacción enzimática se realizó también en muestras que tienen concentraciones conocidas de sustrato para producir una curva patrón. Sustancialmente se recuperó toda la actividad de CBL detectada en todo el lisado celular y se observó presente en las muestras purificadas experimentalmente de la enzima recombinante 6HisCBL producida a partir del montaje del plásmido pRSETB(6HisCBL).

#### Ejemplo 2

##### Clonación y expresión del gen de la cistationina B-sintasa (CBS) de levadura en levadura

En este ejemplo se utilizaron procedimientos de RCP para clonar el gen de la CBS en levadura. El fragmento de RCP que comprende el gen de la CBS se insertó en un vector de expresión tanto con como sin una etiqueta de afinidad que se añadió para ayudar a la purificación del producto génico expresado.

Una cepa de laboratorio de *Saccharomyces cerevisiae* (5153-11-1 (his3 met2)) se utilizó como fuente del gen de la CBS. Se cultivaron las células YEPD a 32°C, se centrifugaron, se lavaron con agua y se transfirieron en 200 µl de tampón plásmido de levadura (NaCl 100 mM, Tris 10 mM (pH 8), EDTA 1 mM, SDS al 0,2%). La suspensión celular se mezcló con un volumen igual de bolitas de vidrio de 0,45 mM y se agitó intensamente a alta velocidad durante 3 x 30 segundos. Se eliminó el líquido pipeteando y se centrifugó durante dos minutos en una microcentrifugadora para eliminar el residuo celular. Se extrajo el sobrenadante con PCI (fenol:cloroformo:alcoholes isoamílicos (25:24:1) y cloroformo. Se añadió cloruro sódico (5 M) (aproximadamente 20 µl) y se precipitó el ADN con un volumen igual de isopropanol.

Se amplió por RCP este ADN genómico de levadura con cebadores CI-001 (CGGGGATCCTGATGCATGCATGATAAGGA, SEC. ID. nº 3) y CI-012 (CGGCATTACCGTTT CACTAATTTATTG; SEC. ID. nº 4), que son secuencias nucleotídicas publicadas que flanquean el gen estructural para la CBS de levadura. El cebador CI-001 (SEC. ID. nº 3) contiene una secuencia BamHI encontrada en el lateral 3' no traducido del gen de la CBS. Para añadir una secuencia BamHI al lateral 5' del fragmento de RCP, el gen se amplió más por RCP con CI-001 (SEC. ID. nº 3) y CI-002 (GTTGGATCCGGCATTACCGTTTCAC; SEC. ID. nº 5). El producto de la RCP resultante era una secuencia de ADN de aproximadamente 1937 pares de bases, incluyendo 1521 pares de bases que codifican la proteína CBS. El ADN adicional que flanquea la secuencia de codificación comprende el activador natural y las secuencias de terminación de la transcripción del gen de la CBS de levadura.

Un activador más potente se insertó corriente arriba del gen de la CBS para favorecer unos niveles más elevados de expresión de la proteína. El activador 1 de TPI de levadura se clonó en el mismo ADN genómico de levadura utilizando los cebadores CI-009 (GGTGGATCCATCAATAGATACGTA CGTCCT; SEC. ID. nº 6) y CI-010 (TTTTAGTTTATGTATGTGTTTTTGTG; SEC. ID. nº 7) en una reacción de RCP convencional. Para acoplar la zona de codificación de CBS al activador de TPI 1, se utiliza un cebador adaptador: CI-011 (AACACATACATAAACTAAAAATGACT AAATCTGAGCAGCAA; SEC. ID. nº 8), que contiene 20 bases del activador TPI1 y las primeras 21 bases del gen de la CBS. La secuencia de CBS obtenida anteriormente se amplió por RCP con cebadores CI-001 (SEC. ID. nº 3) y CI-011 (SEC. ID. nº 8). El producto de la RCP resultante se mezcló con el producto activador de TPI1 del anterior, y la mezcla se amplió por PCR utilizando los cebadores CI-001 (SEC. ID. nº 3) y CI-009 (SEC. ID. nº 6) para producir un gen de fusión denominado "TPICBS", que comprende el activador de TPI1, la secuencia de codificación de CBS y el terminador de la transcripción de CBS.

Los productos CBS y TPICBS de RCP comprenden cada uno secuencias BamHI tanto en los laterales 5' y 3' de la

zona de codificación. Estos productos de RCP se purificaron con una PCR WIZARD PREP (Promega), según las recomendaciones del fabricante y se cortaron con BamHI. Los fragmentos nucleotídicos de BamHI resultantes se ejecutaron en un gel TBE de agarosa al 1% y se purificaron con papel NA45 (S&S). La levadura, el vector lanzadera CI-1 de *E. coli* tiene una única secuencia de BamHI en el gen de resistencia a la tetraciclina se utilizó para la expresión del gen de la CBS. El vector CI-1 se cortó con BamHI y se trató con fosfatasa alcalina de gamba, según las instrucciones del fabricante (Roche Biochemicals). Los fragmentos de BamHI CBS y TPICBS se ligaron en el vector CI-1 linealizado. La reacción de ligadura se transformó en las células TOP10 (Invitrogen), que se colocaron en placas LB con ampicilina. Transformantes resistentes a Amp se transfirieron a placas LB amp y LB tet para determinar los clones sensibles a tetraciclina. Se seleccionaron varias colonias sensibles a tet procedentes de placas LB amp, se cultivaron durante la noche en placas LB amp y se procesaron más por el procedimiento de lisis alcalina para el ADN plásmido. Se cortó el ADN con BamHI y se separó en gel de agarosa al 1% para determinar qué plásmidos contienen las inserciones de CBS o de TPICBS.

Los plásmidos CI-1 que llevan inserciones se transformaron en la cepa de levadura, INVSc-1, cepa diploide que está comercialmente disponible en Invitrogen. INVSc-1 tiene una mutación en ambas copias del gen de la LEU2 y requiere el gen de la LEU2 procedente del plásmido CI-1 para el crecimiento selectivo en medio sin leucina. INVSc-1 se transformó con los plásmidos relacionados con CI-1, utilizando el kit de transformación de levadura de Invitrogen, según las instrucciones del fabricante. Este kit implicaba la preparación de esferoplastos de las células con zimoliasa, seguido de un tratamiento con calcio para la transformación del ADN. Los transformantes se colocaron en placas en un medio sintético que contenía sorbitol 1 M, base nitrogenada de levadura y complementos de levadura, excluyendo leucina. Los transformantes eran visibles en el revestimiento de agar-agar después de tres días de incubación a 32°C.

#### *Acoplamiento de polihistidina a cistationina $\beta$ -sintasa para la expresión de la levadura*

Las secuencias de ADN que codifican seis histidinas se añadieron al extremo 3' de la zona de codificación de CBS, tanto en los montajes de CBS como del vector TPICBS. Las secuencias de codificación de polihistidina se añadieron al clon para CBS original por ampliación del fragmento de RCP de CBS desde el anterior con el cebador CI-017 (ATGATGATGATGATGATGACCTGCT AAGTAGCTCAGTAA; SEC. ID. nº 9) y el cebador CI-02 (SEC. ID. nº 5). El producto de RCP resultante comprende la zona del activador de CBS natural, la zona de codificación de CBS y una secuencia de codificación más para los restos de glicina y seis histidinas. El resto de glicina se añadió para aumentar la flexibilidad espacial del péptido poli-his tras la traducción. El producto poli-his CBS de RCP se purificó en gel aparte del ADN de CBS original y se amplió por RCP sucesivamente dos veces después con cebadores, CI-02 (SEC. ID. nº 5) y CI-017 (SEC. ID. nº 9) para eliminar prácticamente el ADN de CBS original.

Asimismo, el producto TPICBS de PCR anterior se amplió con cebadores, CI-009 (SEC. ID. nº 6) y CI-017 (SEC. ID. nº 9). El producto de RCP se purificó en gel y se volvió a ampliar dos veces con CI-009 (SEC. ID. nº 6) y CI-017 (SEC. ID. nº 9) para reducir en gran medida la secuencia de ADN TPICBS de entrada.

El gen de la CBS se clonó también para RCP con los cebadores CI-001 (SEC. ID. nº 3) y CI-018 (CATCATCATCATCATCATTAAATAAGAACCCACGCT; SEC. ID. nº 10) para producir una secuencia de polihistidina con un codón TAA de terminación, seguido de la secuencia terminadora de transcripción. Este producto de RCP corto ("terminador") de aproximadamente 190 pb se purificó también en gel y se clonó por PCR con los mismos cebadores. La poli-his CBS y los fragmentos del "terminador" se combinaron en una reacción RCP con los cebadores, CI-001 (SEC. ID. nº 3) y CI-002 (SEC. ID. nº 5). La ampliación resultante produjo una molécula de ácido nucleico denominada "CBSH", que comprende el activador CBS natural, la zona de codificación de CBS completa, un resto de glicilo adicional, seis restos de histadilo con un codón de terminación, y el terminador de transcripción de CBS.

Asimismo, la poli-his TPICBS y los fragmentos del terminador se combinaron en una reacción RCP con los cebadores, CI-001 (SEC. ID. nº 3) y CI-009 (SEC. ID. nº 6). El producto del ácido nucleico resultante, denominado "TPICBSH" fue el mismo que la secuencia CBSH, excepto que el activador TPI1 sustituyó el activador CBS natural. El CBSH y TPICBSH (que contiene cada uno una secuencia con etiqueta de afinidad de poli-histidina) se cortó con BamHI y se ligó en CI-1, como se hizo anteriormente para las secuencias de CBS y TPICBS. Las mezclas de ligadura se transformaron en INVSc-1. Se examinaron las colonias sensibles a tet para la inserción de los genes apropiados clonados en CI-1 por análisis con enzima de restricción.

### **Ejemplo 3**

#### Clonación, expresión y purificación del gen de la cistationina $\beta$ -sintasa (CBS) de levadura en *E. coli*

En este ejemplo se utilizan técnicas normalizadas de RCP y de biología molecular para clonar el gen de la cistationina  $\beta$ -sintasa (CBS) de *Saccharomyces cerevisiae* (INVSc1) como proteína de fusión con una glutatión S-transferasa (GST) con terminal amino. La adición de esta zona de glutatión S-transferasa permite la purificación por afinidad en una sola etapa de la proteína CBS procedente del medio de cultivo de *E. coli* y puede también ayudar a la disolución y/o favorecer el repliegamiento apropiado de la enzima en una forma activa.

*Clonación*

La cepa de laboratorio de *Saccharomyces cerevisiae* (INVSc1) (Invitrogen) se utilizó como fuente del gen de la CBS. Una sola colonia de levadura INVSc1 se hirvió en 100 µl de agua desionizada durante 5 min. y se agitó rápidamente en presencia de un volumen igual de bolitas de vidrio de 0,45 mM durante 2 min. Se utilizó a continuación un microlitro de este lisado celular como fuente de ADN para la ampliación por RCP del gen de la CBS de levadura utilizando los cebadores CI-024 (GCGGGTCGACTATGACTAAATCTGAGCAGCAAGCC; SEC. ID. nº 12) y CI-025 (GCGTGCGGCCGCGTTATGCTAAGTAGCTCAG; SEC. ID. nº 13) que contiene secuencias flanqueantes para el gen de la CBS de levadura publicado y enzimas de restricción para la clonación en el vector de expresión pGEX-6P-2 (Amersham Pharmacia). El producto de RCP resultante (aproximadamente 1548 pb) se aisló a continuación y se purificó por extracción de ADN en gel de agarosa utilizando un kit comercial (Roche). El producto de RCP purificado que contenía el gen CBS flanqueado por las secuencias de las enzimas de restricción Sall (extremo 5') y NotI (extremo 3') se digirió a continuación (por Sall y NotI), se purificó el gel y se ligó en el vector de expresión pGEX6P-2 (Amersham Pharmacia). Se utilizó cartografía de enzima de restricción para confirmar la identidad del ADN ampliado por RCP como gen de la CBS de levadura. Se representa la secuencia de ADN (SEC. ID. nº 14) para el gen clonado para cistationina β-sintasa (CBS) de *Saccharomyces cerevisiae*. La secuencia del CBS clonado de *Saccharomyces cerevisiae* que tiene una proteína de fusión GST con terminal amino-(NH<sub>3</sub>) unida como resultado de la clonación en el vector de expresión pGEX6P-2 bacteriano se presenta también (SEC. ID. nº 20).

*Expresión y purificación*

El vector de expresión pGEX6P-2 que contenía el gen de la CBS de levadura clonado (descrito anteriormente) se transformó en las células TOP10 de *E. coli* (Invitrogen). Se seleccionaron colonias aisladas y se cultivaron cultivos celulares en medio LB que contenía 100 µg/ml de ampicilina en 30EC hasta alcanzar una absorbancia a 600 nm de aprox. 0,5 D.O. Para provocar la expresión de la proteína de fusión GST-CBS (dirigida por el activador tac), se añadió isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) al medio de crecimiento hasta una concentración final de 0,1 mM. El cofactor de CBS, piridoxal-5'-fosfato, se añadió también al medio de cultivo a una concentración final de 100 µM durante la inducción. Las células inducidas se dejaron crecer a continuación a 30°C durante 21 h más antes de recoger por centrifugación.

La purificación por afinidad de la proteína GST-CBS utilizando resina de afinidad Glutathione Sepharose 4B se llevó a cabo a continuación como se describe esencialmente en el protocolo del fabricante (Amersham Pharmacia). En resumen, se pusieron en suspensión las células en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se destruyeron por tratamiento con ultrasonidos en hielo. Se añadió a continuación Triton X-100 a una concentración final de 0,1% (v/v) y el tratado con ultrasonidos se agitó a temperatura ambiente de 30 a 45 min. El lisado celular se purificó a continuación del residuo insoluble por centrifugación, se trató con ADNasa I, y se cargó en una columna de resina por afinidad Glutathione Sepharose 4B. Las proteínas no unidas específicamente se lavaron con 10 volúmenes de columna de PBS, y la proteína GST-CBS deseada se eluyó a continuación de la resina de afinidad por adición de 5 volúmenes de columna de tampón de elución (Tris 50 mM, pH 8, fi-mercaptoetanol (BME) 1,4 mM, NaCl 100 mM, Triton X-100 al 0,1% (v/v), glutatión reducido 50 mM). La purificación de la proteína de fusión GST-CBS se confirmó a continuación por SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida, dodecilsulfato sódico) teñido con Coomassie Blue). La GST-CBS eluida se dializó a continuación en tampón para almacenamiento (TrisHCl 50 mM, pH 8, NaCl 100 mM, PLP 5 µM) se dividió en alícuotas y se almacenó a -80°C. La concentración de GST-CBS purificada se determinó a continuación utilizando el kit de ensayo de proteínas MICRO BCA (Pierce Chemical). Un rendimiento típico de GST-CBS purificada estaba comprendido en el intervalo de 5 a 10 mg de GST-CBS por gramo de pasta de *E. coli*.

*Ensayo de actividad para CBS*

La actividad de CBS de la proteína de fusión GST-CBS de levadura purificada se llevó a cabo tal como describe Kashiwamata y Greenberg (*Biochim. Biophys. Acta* 212:488-500 (1970)). Este ensayo se basa en la capacidad de CBS para sintetizar cistationina a partir de serina y homocisteína. La cantidad de cistationina formada por CBS se determinó a continuación por espectrofotometría detectando el cromógeno de la reacción con ninhidrina a 455 nm y se comparó con una curva patrón generada utilizando muestras de concentraciones conocidas de cistationina. La actividad de CBS se determinó también mediante los ensayos enzimáticos descritos anteriormente, o mediante otros ensayos bien conocidos por el experto en la materia.

**Ejemplo 4**Construcción del montaje de fusión ADH2CYS4*Expresión y purificación de cistationina β-sintasa de levadura en levadura*

En este ejemplo un activador potente, ADH2, se insertó corriente arriba del gen de CYS4 y se construyó como una fusión con el gen de la CBS de levadura para estimular la expresión mayor de la proteína. El activador ADH2 está

regulado por la Adr1P, y se reprime cuando las células de levadura se cultivan en medio que contiene glucosa y se desreprime cuando las células se cultivan en una fuente de carbono no fermentable. Esto permite la expresión regulada, si la sobreproducción de una proteína es letal para la célula.

#### 5 *Construcción del gen ADH2CYS4*

El ADN genómico de levadura se amplió con los cebadores CI-029 (CTATATCGTAATAATGACTAAATCTGAGCAGCAAGCCGATTCA; SEC. ID. nº 15) y CI-017 (ATGATGATGATGATGATGACCTCGTAAGTAGCTCAGTAA; SEC. ID. nº 9) para producir todo el gen de CYS4 sin el codón de terminación y el terminador de transcripción. El cebador CI-029 (SEC. ID. nº 15) contiene las 13 bases últimas de la zona del activador ADH2 clonadas además de los primeros diez codones del gen de CYS4. El cebador CI-017 (SEC. ID. nº 9) tiene la secuencia de los seis codones últimos del gen CYS4, excepto el codón de terminación más un resto glicilo y seis restos de histadilo. El producto resultante de la RCP comprende una zona de codificación CYS4, y una secuencia de codificación más para glicina y seis restos de histidina. Se añadió glicina para aumentar la flexibilidad espacial del péptido poli-his después de la traducción. El fragmento "terminador" se produjo ampliando el mismo ADN genómico con los cebadores CI-018 (CATCATCATCATCATCATTAAATAAG AACCCACGCT; SEC. ID. nº 10) y CI-040 (AGGGCTCGAGGATCCCGGGGGT GCTATTATGAATGCACGG; SEC. ID. nº 16) para producir una secuencia de polihistidina con un codón de terminación TAA, seguido del terminador de la transcripción. La reacción RCP de CI-029/CI-017 produjo un fragmento de aproximadamente 1530 pb mientras que la reacción de CI-018/CI-040 produjo un fragmento de aproximadamente 331 pb. Estos dos fragmentos se unieron mezclando sus productos de RCP y ampliando con cebadores CI-029/CI-040. El producto resultante se denominó CYS4H y tenía aproximadamente 1861 pb de longitud.

Para unir el activador ADH2 al fragmento génico CYS4H, se generó en primer lugar producto de RCP con el cebador CI-027 (CGGGGATCCGACGTTTTGCCCGCAGGCG GGAAACC; SEC. ID. nº 17) y el cebador CI-028 (AGATTTAGTCATTATTACGATAT AGTTAATAGTTGATAG; SEC. ID. nº 18) del mismo ADN genómico de levadura para producir la secuencia activadora ADH2. El cebador CI-028 (SEC. ID. nº 18) contiene los primeros 12 nucleótidos de la zona de codificación del gen de CYS4. Por lo tanto, entre los cebadores CI-028 (SEC. ID. nº 18) y CI-029 (SEC. ID. nº 15) existen 25 nucleótidos de ADN de complementariedad en sus productos respectivos. El producto ADH2 de la RCP se mezcló con el fragmento CYS4H y se amplió con los cebadores CI-027 (SEC. ID. nº 17) y CI-040 (SEC. ID. nº 16) para producir un fragmento de producto de aproximadamente 2201 pb denominado ADH2CYS4H. Cada uno de estos productos de RCP se confirmó por análisis con endonucleasa de restricción.

El producto ADH2CYS4H se clonó en YEp24 cortando ambos ADN con BamHI y ligándolos utilizando T4 ADN ligasa. Los productos ligados se transformaron dentro de células de *E. coli* (TOP10; Invitrogen) y se colocaron en placas en LB-agar-agar más placas de ampicilina. Los plásmidos, preparados utilizando el kit de preparación de plásmidos (Roche) según la recomendación del fabricante de supuestos recombinantes, fueron analizados mediante endonucleasa de restricción. Los plásmidos de los clones que se observó que tienen la inserción correcta se transformaron en *S. cerevisiae* (BJ5460) y se colocaron en medio completo sintético menos uracilo (SC-ura), enriquecido con glucosa al 2%. Después de dos días los supuestos recombinantes se volvieron a rayar en el mismo tipo de placas para aislar las colonias. Las células se provocan cultivando en SC-ura más 2% de etanol y 1% de peptona, enriquecido normalmente con 0,1% de glucosa para permitir que las células crezcan en 24 horas. Después de toda la noche las células de cultivo se recogen por centrifugación y el sedimento celular se guarda a -70°C hasta la lisis. Se lisan las células volviendo a poner en suspensión el sedimento celular en un volumen de 0,05 del volumen original el tampón de lisis. Las bolitas de vidrio se añaden a continuación al menisco del tampón.

Toda la suspensión se agitó intensamente durante 1 min. cada una durante cuatro veces. Se enfriaron las células en hielo durante 1 min. entre cada agitación. Se transfirió el lisado a un tubo reciente y se centrifugó durante 10 min. a 10.000x g. El lisado purificado se estratificó en una columna con resina de His (Roche) y la proteína se purificó se recuperó una proteína parcialmente purificada en la elución tres.

#### **Ejemplo 5**

##### Ejemplos de fragmento sin ciclación de formatos de ensayo para homocisteína

En este ejemplo se presenta la fracción sin ciclación del ensayo para piruvato y cistationina.

##### *Ensayo de piruvato*

Piruvato: La presente invención proporciona la medición de homocisteína basada en la utilización de las enzimas CBS y CBL para ciclar homocisteína con producción de piruvato y amoniaco. La velocidad de producción de piruvato y amoniaco se previó que era proporcional a la concentración original de homocisteína en la muestra. La medición de esta velocidad utilizando la(s) enzima(s) apropiada(s) presenta una oportunidad para un procedimiento homogéneo de homocisteína.

En un aspecto de la presente invención se ha desarrollado un procedimiento muy sensible para la cuantificación de

piruvato. En el procedimiento la piruvato oxidasa convierte piruvato en fosfato de acetilo, dióxido de carbono y peróxido. La peroxidasa posteriormente convierte el peróxido, TOOS, y 4-aminoantipirina en cromógeno, que presenta un máximo de absorción cerca de 550 nm. La absorbancia molar de este cromógeno es muy elevada, aproximadamente  $36 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

Utilizando los componentes del reactivo presentados en la Tabla 1 y los parámetros del instrumento Cobas FARA (Roche, Basilea, Suiza) presentados en la Tabla 2, se cuantificó fácilmente el piruvato en el intervalo de  $\mu\text{M}$  mediante un blanco de lectura anticipada y reacción de punto final en aproximadamente 5 a 10 minutos. En la figura 1 se muestran los gráficos de absorbancia frente al tiempo. En la figura 2 se muestra una curva de calibración real.

<b>Tabla 1. Método del piruvato: componentes del reactivo</b>	
Compuesto químico	Concentración
<b>Reactivo 1</b>	
HEPES, sal hemisódica	21,5 mM
HEPES, ácido	28,6 mM
EDTA (4 Na)	5,0 mM
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	49,8 mM
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , dibásico	7,5 mM
TOOS	1,4 mM
TTHA	0,8 mM
TPP	0,2 mM
4-aminoantipirina	1,0 mM
BSA	1,9 g/l
Ferrocianuro potásico	0,07 mM
Peroxidasa de rábano picante	3,0 KU/l
Piruvato oxidasa	3,0 KU/l
pH = 7,0	

<b>Tabla 2. Método del piruvato: parámetros de Cobas FARA</b>	
Parámetro	Ajuste
<b>GENERAL</b>	
Modo de medición	ABS
Modo de reacción	P-A
Modo de calibración	PROMEDIO DE LA AVG
Blanco reactivo	REAG/DIL
Longitud de onda	550 nm
Temperatura	37°C
<b>ANÁLISIS</b>	
volumen de muestra	40 $\mu\text{l}$
volumen de diluyente	10 $\mu\text{l}$
denominación del diluyente	H <sub>2</sub> O
volumen de reactivo	250 $\mu\text{l}$
tiempo de incubación	60 s
volumen de reactivo inicial	n.a.
denominación del diluyente	H <sub>2</sub> O
volumen del diluyente	n.a.
tiempo de incubación	n.a.
volumen inicial del reactivo 2	n.a.
denominación del diluyente	H <sub>2</sub> O
volumen de diluyente	n.a.
retardo de temperatura	n.a.
<b>LECTURAS DE ABSORBANCIA</b>	
Primera	0,5 s
Número	14
Intervalo	30 s
<b>CÁLCULO</b>	
Número de etapas	1
etapa A de cálculo	CINÉTICA
Primero	1
Último	14
<b>CALIBRACIÓN</b>	
Número de patrones	1
Patrón	50 $\mu\text{M}$
repetición	2

*Ensayo de cistationina*

- 5 Se analizó cuantitativamente la cistationina añadiendo CBL al reactivo de piruvato descrito anteriormente. CBL convierte la cistationina en homocisteína, piruvato y amoniaco. El piruvato se analizó cuantitativamente a continuación como se describió anteriormente. La composición del reactivo utilizado para cuantificar cistationina se muestra en la Tabla 3. La cuantificación puede hacerse utilizando cualquier instrumento adecuado. En el presente ejemplo, se utilizó un Cobas FARA (Roche, Basilea, Suiza). Los parámetros típicos de la reacción se presentan en la Tabla 4. La figura 3 representa gráficos de absorbancia frente al tiempo obtenidos utilizando soluciones acuosas de cistationina. La reacción alcanza el punto final en menos de diez minutos.
- 10

<b>Tabla 3. Método de la cistationina: componentes del reactivo</b>	
Compuesto químico	Concentración
<b>Reactivo 1</b>	
HEPES, sal hemisódica	20,3 mM
HEPES, ácido	27,0 mM
EDTA (4 Na)	4,7 mM
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	47,1 mM
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , dibásico	7,1 mM
TOOS	1,3 mM
TTHA	0,8 mM
TPP	0,2 mM
4-aminoantipirina	0,9 mM
BSA	1,8 g/l
Ferrocianuro potásico	0,07 mM
Peroxidasa de rábano picante	2,8 KU/l
Piruvato oxidasa	2,8 KU/l
CBL	1,9 g/l
pH = 7,0	

<b>Tabla 4. Método de la cistationina: parámetros de Cobas FARA</b>	
Parámetro	Ajuste
<b>GENERAL</b>	
Modo de medición	ABS
Modo de reacción	P-A
Modo de calibración	LIN INTER
Blanco reactivo	REAG/DIL
Longitud de onda	550 nm
Temperatura	37°C
<b>ANÁLISIS</b>	
volumen de muestra	30 µl
volumen de diluyente	10 µl
denominación del diluyente	H <sub>2</sub> O
volumen de reactivo	260 µl
tiempo de incubación	60 s
volumen de reactivo inicial	n.a.
denominación del diluyente	H <sub>2</sub> O
volumen del diluyente	n.a.
tiempo de incubación	n.a.
volumen inicial del reactivo 2	n.a.
denominación del diluyente	H <sub>2</sub> O
volumen de diluyente	n.a.
retardo de temperatura	n.a.
<b>LECTURAS DE ABSORBANCIA</b>	
primera	5 s
número	21
intervalo	60 s
<b>CÁLCULO</b>	
número de etapas	1
etapa A de cálculo	PUNTO FINAL
primera	1
última	10

Tabla 4 (continuación)	
Parámetro	Ajuste
<b>CALIBRACIÓN</b>	
Número de patrones	1
Patrón	50 $\mu$ M
repetición	2

La figura 4 representa curvas patrón obtenidas utilizando soluciones acuosas de cistationina. Estas curvas son lineales en todo el intervalo de 0 a 100  $\mu$ M de concentración de cistationina por lo menos. El cromóforo formado era estable en aproximadamente 15 a 20 minutos. Sin embargo, si las muestras que contenían 10 a 20 veces concentraciones más elevadas de cistationina se sometían a ensayo, resultaba evidente alguna inestabilidad del cromóforo.

En algunos experimentos se incluyó la serina en la mezcla de reacción. La serina a una concentración de 250  $\mu$ M no presentaba ningún efecto significativo. Las concentraciones mayores de serina se toleraban también en este ensayo. La falta de interferencia de serina es una observación importante debido a que la presencia de serina es necesaria para el ensayo de la homocisteína.

### Ejemplo 6

Ensayos de ciclación enzimática para homocisteína

En este ejemplo se proporcionan sistemas de ciclación enzimática para determinar la concentración de homocisteína utilizando el sistema de señalización piruvato oxidasa/peroxidasa o el sistema de señalización de la lactato deshidrogenasa.

*Demostración de la ciclación: Sistema de ciclación enzimática CBS/CBL/PO/HRP*

Se ha demostrado el sistema de ciclación en el que se inició la reacción utilizando homocisteína o cistationina. Los componentes del reactivo utilizados en estos experimentos se muestran en la Tabla 5. Se añadieron por separado CBS y serina después del mezclado de la muestra con reactivo 1 que contiene todos los demás componentes. Los parámetros pertinentes de Cobas FARA se muestran en la Tabla 6. Se disolvió cistationina u homocisteína en agua para preparar patrones a concentraciones apropiadas. En las figuras 5 y 6 se muestran el tiempo frente a la absorbancia. Después de un retraso de tiempo de tres a seis minutos los gráficos con lineales. Una curva de calibración típica de homocisteína (figura 7) que, aunque no es completamente lineal, puede utilizarse para cuantificar concentraciones de homocisteína en muestras adecuadas utilizando una técnica de ajuste de la curva apropiada.

Tabla 5. Ciclación de CBS/CBL, método PO/HRP	
Componentes del reactivo	
Compuesto químico	Concentración
<b>Reactivo 1</b>	
HEPES, sal hemisódica	20,3 mM
HEPES, ácido	27,0 mM
EDTA (4 Na)	4,7 mM
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	47,1 mM
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , dibásico	7,1 mM
TOOS	1,3 mM
TTHA	0,8 mM
TPP	0,2 mM
4-aminoantipirina	0,9 mM
BSA	1,8 g/l
Ferrocianuro potásico	0,07 mM
Peroxidasa de rábano picante	3,0 KU/l
Piruvato oxidasa	3,0 KU/l
CBL	
pH = 7,0	
<b>Reactivo SR1</b>	
Serina	3,1 mM
<b>Reactivo SR2</b>	
CBS	1,23 g/l

<b>Tabla 6. Sistema de ciclación CBS/CBL/PO/HPR: parámetros de Cobas FARA</b>	
Parámetro	Ajuste
<b>GENERAL</b>	
Modo de medición	ABS
Modo de reacción	P-I-SR1-I-SR2-A
Modo de calibración	LIN INTER
Blanco reactivo	REAG/DIL
Longitud de onda	550 nm
Temperatura	37°C
<b>ANÁLISIS</b>	
volumen de muestra	30 µl
volumen de diluyente	10 µl
denominación del diluyente	H <sub>2</sub> O
volumen de reactivo	260 µl
tiempo de incubación	60 s
volumen de reactivo inicial	30 µl (serina)
denominación del diluyente	H <sub>2</sub> O
volumen del diluyente	5 µl
tiempo de incubación	10 s
volumen inicial del reactivo 2	30 µl (CBS)
denominación del diluyente	H <sub>2</sub> O
volumen de diluyente	5 µl
retardo de temperatura	n.a.
<b>LECTURAS DE ABSORBANCIA</b>	
primera	0,5 s
número	14
intervalo	30 s
<b>CÁLCULO</b>	
número de etapas	1
etapa A de cálculo	PUNTO FINAL o CINÉTICA
primera	1
última	14
<b>CALIBRACIÓN</b>	
Número de patrones	1
Patrón	50 µM
repetición	2

#### *Reducción de enlaces disulfuro*

Muy poca homocisteína está presente en estado reducido, enlazado sin disulfuro en el plasma humano. La mayor parte de la homocisteína está acoplada a las proteínas o a pequeñas moléculas mediante enlaces disulfuro. La reducción con disulfuro de estos compuestos es necesaria para liberar homocisteína para la cuantificación por cualquier método de determinación de homocisteína total. Este ejemplo demuestra esta utilización de agentes reductores compatibles con un sistema que utiliza lactato deshidrogenasa y NADH. Los agentes reductores del candidato potencial incluyen DTE, DTT, n-acetilcisteína, ácido tioglicólico, TCEP y similares. Para la utilización de estos compuestos en el procedimiento de la presente invención, son necesarios el ajuste preciso de la concentración del agente reductor y los parámetros del instrumento. Las indicaciones iniciales de que determinados agentes reductores podrían impedir la acción de piruvato oxidasa y/o la peroxidasa de rábano picante condujeron a la investigación del sistema de detección de piruvato alternativo descrito a continuación.

#### *15 Demostración de la ciclación: Sistema CBS/CBL/LDH*

El piruvato reacciona con NADH en presencia de la enzima lactato deshidrogenasa para producir ácido láctico y NAD. El piruvato puede cuantificarse midiendo la disminución de absorbancia a 340 nm. La absorbancia molar de NADH es aproximadamente seis veces menor de la peroxidasa generada de cromógeno. Sin embargo, esto no afecta al sistema de la presente invención porque la ciclación de la homocisteína de CBL/CBS puede generar cantidades relativamente grandes de piruvato.

El sistema de reacción utilizado para generar los datos presentados en las figuras 8, 9, 10 y 11 comprende serina, CBL y lactato deshidrogenasa en tampón HEPES (pH 7,2) como primer reactivo. NADH en tampón TRIS (pH 8,5) y CBS se añaden a continuación sucesivamente. Todos los componentes pueden combinarse, sin embargo, de manera diferente para formar un sistema de cuantificación de homocisteína con dos o tres reactivos. Las concentraciones del reactivo se muestran en la Tabla 7, y los parámetros Cobas FARA se muestran en la Tabla 8. Se ajustó la concentración de NADH para proporcionar suficiente linealidad mientras que se permite la absorción de

la muestra de plasma a 340 nm.

<b>Tabla 7. Sistema de ciclación CBS/CBL/LDH: Componentes del reactivo</b>	
Compuesto químico	Concentración
<b>Reactivo 1</b>	
HEPES, sal hemisódica	39,4 mM
HEPES, ácido	12,6 mM
Serina	0,72 mM
Lactato deshidrogenasa	33.000 U/l
CBL	6,05 µg/l
pH = 7,2	
<b>Reactivo SR1</b>	
NADH	4,16 mM
TRIS	50 mM
pH = 8,5	
<b>Reactivo SR2</b>	
CBS	996 mg/l
TRIS	50 mM
Cloruro sódico	100 mM
Piridoxal fosfato	5 µM
<b>Diluyente de la muestra</b>	
DTT	13 mM
HEPES, sal hemisódica	56,7 mM
HEPES, ácido	18,1 mM
pH = 7,2	

<b>Tabla 8. Sistema de ciclación CBS/CBL/LDH: parámetros de Cobas FARA</b>	
Parámetro	Ajuste
<b>GENERAL</b>	
Modo de medición	ABS
Modo de reacción	P-I-SR1-I-SR2-A
Modo de calibración	LIN INTER
Blanco reactivo	REAG/DIL
Longitud de onda	340 nm
Temperatura	37°C
<b>ANÁLISIS</b>	
volumen de muestra	30 µl
volumen de diluyente	10 µl
denominación del diluyente	H <sub>2</sub> O (o agente reductor)
volumen de reactivo	250 µl
tiempo de incubación	60 s
volumen de reactivo inicial	15 µl (NADH)
denominación del diluyente	H <sub>2</sub> O
volumen del diluyente	5 µl
tiempo de incubación	10 s
volumen inicial del reactivo 2	30 µl (CBS)
denominación del diluyente	H <sub>2</sub> O
volumen de diluyente	10 µl
retardo de temperatura	n.a.
<b>LECTURAS DE ABSORBANCIA</b>	
primera	5 s
número	16
intervalo	30 s
<b>CÁLCULO</b>	
número de etapas	1
etapa A de cálculo	PUNTO FINAL o CINÉTICA
primera	6
última	20
<b>CALIBRACIÓN</b>	
Número de patrones	1
Patrón	25 ó 50 µM
repetición	2

*Análisis de soluciones acuosas*

El sistema funcionó bien para la detección de homocisteína en solución acuosa. En las figuras 8 y 9 se muestran gráficos típicos de absorción frente al tiempo. Estos gráficos eran lineales con poco o ningún retraso aparente de fase. Las velocidades de desaparición de NADH eran relativamente altas. Además, el gráfico de calibración de la concentración de homocisteína frente a la absorbancia era lineal en todo el intervalo de 0 a 100 µM en la muestra (figura 10). Por lo tanto, solamente un calibrador, por ejemplo 25 µM, junto con un blanco de reactivo fue necesario para la calibración.

Se prepararon soluciones de homocisteína a varias concentraciones para demostrar el funcionamiento del método en todo el intervalo de concentración de homocisteína de 2 a 20 µM. Los resultados se muestran en la Tabla 9 tanto en presencia como en ausencia de DTT. Como se mencionó anteriormente, El DTT sirve para reducir los enlaces disulfuro en las muestras (por ejemplo suero, plasma, etc.). El DTT no interfiere de manera significativa con la reacción catalizada por lactato deshidrogenasa.

**Tabla 9. Demostración de linealidad: sistema de ciclación CBS/CBL/LDH**  
Tiempo de reacción = 3 min.

Conc. de homocisteína (µM)	Valor observado (µM)	
	(-) DTT	(+) DTT
2	2	1,2
5	5,2	4,3
8	8,2	7,4
10	10,4	9,9
12,5	12,7	12,5
16,7	16,8	16,3
20	20,5	20

*Análisis de plasma humano basado en productos de referencia*

Se ha demostrado en la presente memoria el funcionamiento exacto del sistema de ciclación CBS/CBL/LDH utilizando plasma humano basado en productos de referencia con homocisteína fabricados por Bio-Rad Co. Se han utilizado varias concentraciones de DTT, y los tiempos de incubación se han variado para conseguir la recuperación óptima de homocisteína. Los tiempos de incubación de 5-1 min con concentraciones de DTT de 1,6-3,2 mM dieron determinaciones de homocisteína comprendidas en los intervalos especificados para varios otros métodos.

*Muestras de plasma humano*

El ensayo de ciclación de homocisteína ha demostrado buen funcionamiento utilizando muestras de plasma humano con DTT como agente reductor. Los resultados concuerdan bien con los obtenidos por un laboratorio independiente utilizando el método IMx para homocisteína de Abbott (figura 11). Los parámetros FARA de Cobas utilizados en este experimento se muestran en la Tabla 10 y los componentes del reactivo se muestran en la Tabla 7. En este ensayo se utilizó un calibrador de homocisteína acuosa (25 µM). Los gráficos de absorbancia frente al tiempo para muestras acuosas fueron lineales en ausencia de DTT y casi lineales en presencia de DTT. Sin embargo, los gráficos obtenidos utilizando muestras de plasma eran diferentes, es decir, no lineales después de los primeros tres minutos. En las condiciones esbozadas en la Tabla 7 y en la Tabla 10, la ciclación aparece disminuyendo poco a poco lentamente a lo largo del tiempo. No obstante, el estudio de correlación presentado en la figura 11 demuestra una coincidencia relativamente próxima entre el presente método (esbozado en la Tabla 7 y Tabla 10) con los obtenidos por IMx cuando se prueban las muestras de suero humano.

**Tabla 10. Sistema de ciclación CBS/CBL/LDH: parámetros de Cobas FARA para estudio de correlación en plasma humano**

Parámetro	Ajuste
<b>GENERAL</b>	
Modo de medición	ABS
Modo de reacción	P-I-SR1-I-SR2-A
Modo de calibración	LIN INTER
Blanco reactivo	REAG/DIL
Longitud de onda	340 nm
Temperatura	37°C
<b>ANÁLISIS</b>	
volumen de muestra	30 µl
volumen de diluyente	µl
denominación del diluyente	H <sub>2</sub> O (o agente reductor)

<b>Tabla 10. (continuación)</b>	
Parámetro	Ajuste
retardo de temperatura	900 s
volumen de reactivo	250 µl
tiempo de incubación	60 s
volumen de reactivo inicial	15 µl (NADH)
denominación del diluyente	H <sub>2</sub> O
volumen del diluyente	5 µl
tiempo de incubación	10 s
volumen inicial del reactivo 2	30 µl (CBS)
denominación del diluyente	H <sub>2</sub> O
volumen de diluyente	10 µl
retardo de temperatura	n.a.
<b>LECTURAS DE ABSORBANCIA</b>	
primera	5 s
número	24
intervalo	30 s
<b>CÁLCULO</b>	
número de etapas	1
etapa A de cálculo	PUNTO FINAL o CINÉTICA
primera	1
última	6
<b>CALIBRACIÓN</b>	
número de patrones	1
Patrón	25 ó 50 µM
repetición	2

5 En una forma de realización preferida, las velocidades se miden en los primeros tres minutos después del comienzo de la reacción. La optimización adicional del sistema, incluyendo la variación en las concentraciones de sal y detergente, producirán probablemente un funcionamiento más constante con muestras acuosas y de plasma. El ensayo ha sido igualmente preciso cuando los componentes se combinaron en dos o tres mezclas de reactivos.

### Ejemplo 7

10 Comparación de ensayos de homocisteína

En este ejemplo, un ensayo de homocisteína preferido según la invención se probó y comparó con dos ensayos existentes, a saber una técnica de HPLC convencional y el ensayo de IMx disponible en el mercado.

15 El ensayo de la invención se realizó utilizando tres reactivos como se muestra en la Tabla 11. El primer reactivo R1 estaba inicialmente en forma de polvo y se redisolvió hasta una concentración de 1,5 g de polvo por 100 ml de agua. El kit de ensayo global incluía además calibradores que contienen L-cistationina enriquecida a varias concentraciones en una matriz de plasma humano, así como dos muestras de referencia preparadas en una matriz de plasma humano procesada.

<b>Tabla 11. Sistema de ciclación CBS/CBL/LDH: Componentes del reactivo</b>	
Compuesto químico	Concentración
<b>Reactivo 1</b>	
HEPES, sal hemisódica	43,3 mM
HEPES, ácido	12,7 mM
Serina	1,295 mM
Lactato deshidrogenasa	>800 U/l
NADH	1,06 mM
Triton X-100	0,05% v/v
Azida sódica	7,7 mM
pH = 8,0	
<b>Reactivo SR1</b>	
DTE	6,75 mM
Ácido cítrico	50 mM
pH = 2,0	

20

Tabla 11 (continuación)	
Compuesto químico	Concentración
<b>Reactivo SR2</b>	
CBS	18,7 KU/l
CBL	8,9 KU/l
Sorbitol	1,65 M
Cloruro sódico	100 mM
Piridoxal fosfato	5 µM
Azida sódica	7,7 mM
Tris/HCl	50 mM
pH = 8,0	

Tabla 12. Sistema de ciclación de CBS/CBL/LDH: parámetros de Cobas MIRA				
Parámetro	Ajuste		Parámetro	Ajuste
<b>GENERAL</b>				
Modo de medición	Absorb.		Factor de conversión	1,00
Modo de reacción	R-S-SR1-SR2		Anulado	0,00
Modo de calibración	Regresión lineal			
Blanco reactivo	React./dil.		Intervalo de prueba	Bajo On Alto On
Limpiador	Ninguno		Intervalo Bajo	Ninguno
Longitud de onda	340 nm		Intervalo Alto	Ninguno
Posición de decimal	2		Número de etapas	1
Unidad	µmol/l			
<b>ANÁLISIS</b>				
Factor de posdil.	Ninguno		Etapa de cálculo A	Cinética
Factor de conc.	Ninguno		Lecturas Primera	18
Ciclo de muestra	1		Última	32
Volumen	30,0 µl		Reacción Límite	Ninguno
Denominación del diluyente	H <sub>2</sub> O		<b>CALIBRACIÓN</b>	
Volumen	25,0 µl		Intervalo de calibración	Cada serie
Ciclo de reactivo	1		Blanco	
Volumen	90 µl		Intervalo de reacción	Bajo Ninguno Alto Ninguno
Ciclo de R1 de partida	2		Intervalo del blanco	Bajo Ninguno Alto Ninguno
Volumen	25 µl		Patrón Posición	1 2 3 4 5 6
Denominación del diluyente	H <sub>2</sub> O			3,5 µmoles/l 7,0 µmoles/l 17 µmoles/l 27 µmoles/l 47 µmoles/l Ninguno
Volumen	25 µl			
Ciclo R2 de partida	17			
Volumen	35 µl			
Denominación del diluyente	H <sub>2</sub> O			
Volumen	15 µl			
<b>CÁLCULO</b>				
Límite de la muestra	Ninguno		7	Ninguno
Dirección de la reacción	Disminución		Replicado	Individual
Comprobación	Off		Desviación	
Exceso de antígeno	Ninguno		Patrón	Ninguno
			Corrección	
			Referencia	
			Posición de CS1	Ninguno
			Posición de CS2	Ninguno
			Posición de CS3	Ninguno

En la realización de este ensayo, se utilizó el instrumento Cobas MIRA disponible en el mercado. El programa informático Cobas MIRA permite 50 ciclos programables de 25 segundos. En particular, el instrumento se programó según los parámetros en la Tabla 12. En el ciclo se añadieron 1,30 µl de la muestra a una cubeta, seguido de 25 µl de agua de enjuague y 90 µl de reactivo líquido R1. Al comienzo del ciclo 2 se añadieron 25 µl de reactivo SR1 con unos 25 µl adicionales de agua de enjuague. Acto seguido, se dejó la mezcla incubar durante 15 ciclos (6,25 min.) para dejar liberar el reductor cualquier homocisteína ligada y para destruir cualquier piruvato endógeno presente. En este momento, se añadieron 35 µl del reactivo enzimático CBS/CBL con 15 µl más de agua de enjuague. La disminución de la absorbancia a 340 nm se midió a lo largo del tiempo entre los ciclos 18 y 32 como una cuantificación de la homocisteína en la muestra. El tiempo de ensayo total entre la adición de la muestra y la lectura de absorbancia final fue de 32 ciclos, o 13 min. y 20 s. Dado que múltiples muestras se desarrollan en paralelo, se producen resultados adicionales de la muestra por el MIRA a un ritmo de aproximadamente uno cada 30 a 90 segundos dependiendo de la longitud de la serie y del número de calibraciones del instrumento utilizadas. Utilizando

parámetros de programación similares este ensayo puede adaptarse a instrumentos aún más rápidos (por ejemplo INTEGRA de Roche, Hitachi, ACE, etc.) que podrían dar aún mayores velocidades de transferencia.

5 Se probaron un total de 24 muestras utilizando el ensayo de la invención y los ensayos comparativos conocidos. La Tabla 13 a continuación indica las concentraciones de homocisteína obtenidas utilizando estos tres métodos. Las figuras 12 a 14 son gráficos de correlación respectivos que representan gráficamente los resultados de la Tabla 13. Como puede observarse, el procedimiento de la invención se correlaciona estrechamente tanto con IMx como con HPLC; con la coincidencia más estrecha observada por lo general con IMx. Sin embargo, el presente procedimiento es sustancialmente menos costoso, puede desarrollarse más rápido y puede realizarse utilizando analizadores  
10 químicos generalmente disponibles.

La invención presenta muy buena precisión entre series como se muestra en la Tabla 14. Se observó que los CV típicos dentro de la serie eran menos del 4% sobre las concentraciones de homocisteína de aproximadamente 7 a 20  $\mu\text{moles/l}$ .  
15

Muestra nº	Concentración de homocisteína [ $\mu\text{M}$ ]		
	HPLC	Invención	IMx
1	9,5	11,5	11,7
2	14,3	13,1	12,1
3	8,8	7,8	7,5
4	10,6	10,1	9,4
5	10,5	10,1	9,9
6	8,6	9,2	7,2
7	7,6	5,8	6,2
8	5,2	3,5	3,1
9	9,6	9,3	9,7
10	7,7	8,7	7,5
11	11,2	11,1	9,4
12	10,5	8,3	8,1
13	11,9	8,4	8,3
14	10,8	9,2	8,9
15	14,1	12,3	12,5
16	24,3	16,3	17,9
17	20,9	17,7	17,8
18	24,2	22,7	22,1
19	33,6	26,4	26,4
20	21,0	20,7	18,9
21	22,7	19,6	18,1
22	20,5	17,3	16,6
23	25,6	23,3	22,0
24	20,5	17,0	15,8
Promedio	15,2	13,3	12,8
Intersección [HPLC]		1,4	0,9
Pendiente [HPLC]		1,2	1,2
R [HPLC]		0,957	0,974
Intersección [IMx]	-0,3	0,5	
Pendiente [IMx]	0,8	1,0	
r [IMx]	0,976	0,990	

Muestra	Homocisteína ( $\mu\text{moles/l}$ )			% CV
	Serie 1	Serie 2	Promedio	
1	16,35	16,46	16,41	0,47
2	12,13	12,58	12,36	2,58
3	19,45	21,6	20,53	7,41
4	16,29	16,79	16,54	2,14
5	11,13	10,01	10,57	7,49
6	7,33	7,56	7,45	2,18
7	6,31	7,24	6,78	9,71
8	7,13	5,54	6,34	17,75
9	14,87	14,5	14,69	1,78
10	13,81	13,41	13,61	2,08

Tabla 14 (continuación)				
Homocisteína (µmoles/l)				
Muestra	Serie 1	Serie 2	Promedio	% CV
11	26,86	28,66	27,76	4,58
12	12,45	13,05	12,75	3,33
13	10,15	10,74	10,45	3,99
14	9,6	10,39	10,00	5,59
15	12,53	13,67	13,10	6,15
16	14,60	15,20	14,90	2,85
17	25,03	25,65	25,34	1,73
18	20,77	20,03	20,40	2,56
19	31,83	32,10	31,97	0,60
20	36,86	36,43	36,65	0,83
21	11,65	11,48	11,57	1,04
22	40,22	38,25	39,24	3,55
23	31,68	32,62	32,15	2,07
24	7,68	6,38	7,03	13,08
CV media (%) = 4,22				

**Ejemplo 8**5 Efecto de las variaciones de concentración de reactivo

En este ejemplo, el ensayo preferido de la invención descrito en el ejemplo 7 se realizó con variaciones en algunos de los componentes del reactivo, a saber LDH, NADH y serina. Esto se realizó a fin de determinar las cantidades óptimas de estos componentes de reactivo. Los ensayos se realizaron como se describió anteriormente, con los componentes respectivos variados en concentración. La Tabla 15 expone los resultados de estas pruebas.

Tabla 15. Efecto de las variaciones en la concentración de componentes del reactivo				
Mezcla de reacción final [LDH] (U/l)	PENDIENTE (mA/min/µM)	INTERSECCIÓN mA/min	BLANCO mA/min	Intervalo de homocisteína diana de la muestra de referencia: 25-35 µM
114,5	1,21	-0,14	-10,2	25,8
229,3	1,14	0,12	-11,2	28,1
458,7	1,17	0,14	-11,3	26,6
917,5	0,88	1,89	-11,3	27,2
[NADH] (mM)				
0,130	0,77	4,23	-10,7	32,9
0,259	1,12	0,05	-11	25,2
[NADH] (mM)				
0,389	1,09	0,45	-10,7	26,8
0,519	1,13	0,49	-11,1	26,0
[SERINA] (mM)				
0,125	0,64	2,23	-6,7	30,9
0,25	0,92	1,26	-9,0	28,1
0,5	1,13	0,63	-10,8	27,1
1	1,16	0,15	-13,6	28,3
2	1,23	0,33	-15,4	28,2

Los resultados mostrados en la Tabla 15 permitieron la selección de concentraciones del componente reactivo final que proporcionaba sensibilidad adecuada con una cantidad de blanco mínima a la vez que también tratando de minimizar los costes de reactivo.

**Ejemplo 9**

*Estudio de los ensayos con homocisteína descritos en el documento WO 00/28071*

La publicación PCT WO 00/28071 describe con detalle dos ensayos con homocisteína. En la "primera forma de realización", el ensayo se realiza sin una etapa de reducción. Para convertir este procedimiento en uno útil para las determinaciones de homocisteína en el plasma humano, debe incorporarse una etapa de reducción ya sea independiente autónoma o una homóloga. La publicación WO 00/28071 describe una etapa de reducción autónoma y independiente quizás debido a que se utiliza un sistema de ciclación con piruvato oxidasa. Esta etapa implica una incubación de 20 min. antes que la muestra reducida pueda analizarse, lo que aumenta en gran medida la duración total del ensayo y el coste de operación. Por otra parte, si la muestra debe ensayarse para más de un

analito en el laboratorio clínico, la muestra primaria de suero o plasma debe dividirse en dos alícuotas, una para la prueba de homocisteína y la otra para algunas otras de la prueba de laboratorio ordenadas. En cambio, la presente invención permite la reducción homogénea ya que se utiliza un sistema de ciclación de LDH (Ejemplo 7).

- 5 En el ejemplo 9 (Tabla 16), se demuestra que DTT de hecho no interfiere con el sistema de detección de piruvato oxidasa descrito en la "segunda forma de realización" del documento WO 00/28071. En particular, se utilizaron el reactivo y las composiciones de DTT descritas en la "segunda forma de realización", y se realizaron ensayos con y sin DTT frente a conocidos patrones de piruvato (12,5, 25 y 50  $\mu$ moles/l) utilizando un instrumento Cobas FARA. En el caso de la prueba DTT, se mezclaron 40  $\mu$ l de cada patrón con 30  $\mu$ l de la solución de DTT, seguido de  
10 incubación durante 100 s. Después, se añadieron 90  $\mu$ l de reactivo piruvato oxidasa y se incubaron durante 30 s. Se tomaron a continuación lecturas de absorbancia a los 30, 60, 90, 120, 150, 180 y 210 s. En la prueba "sin DTT", se siguió el mismo procedimiento excepto que no se añadió DTT. La Tabla 16 expone los resultados de este experimento utilizando las lecturas a 210 s. Las Figuras 15 y 16 ilustran más los resultados de esta prueba.

	SIN DTT	CON DTT
Blanco	0,0021	-0,0021 1
Factor	2212 2	-11765
Patrón 50 f.1 mol/l	51,5	35,3
Patrón 25 f.1 mol/l	24,1 1	0,0
Patrón 12,5 f.1 mol/l	9,7	-21,2
Cambio de delta a los 30 s. (patrón 50 pmoles)	0,0643	-0,0062
Cambio de delta a los 90 s. (patrón 50 f.1 mol)	0,0890	-0,0103
Cambio de delta a los 120 s. (patrón 50 $\mu$ moles)	0,0903	-0,0113
Cambio de delta a los 210 s. (patrón 50 $\mu$ moles)	0,0906	-0,0113

- 15 Estos datos demuestran claramente la necesidad de la etapa de reducción independiente descrita en la "segunda forma de realización" de la publicación WO 00/28071. La presencia del reductor interfiere con el sistema de detección de piruvato oxidasa utilizado para someter a ensayo el piruvato. Por lo tanto, los datos presentados aquí confirman que la etapa de reducción autónoma independiente que utiliza mucho tiempo es esencial en la "segunda  
20 forma de realización". Además, la etapa de reducción autónoma descrita en el documento WO 00/28071 elevará probablemente de manera significativa la complejidad del ensayo y el coste relativo a la presente invención.

#### Listado de secuencias

- 25 <110> KAWASAKI, GLENN  
WEBB, HEATHER  
OWENS, JEFFREY  
LIEDTKE, RAYMOND  
30 FOREST, DOREEN  
LEGAZ, MARK  
LAWSON, SOBOMABO

<120> ENSAYOS DE CICLACIÓN ENZIMÁTICA PARA LA HOMOCISTEÍNA Y LA CISTATIONINA

35 <130> 30865

<150> 60/163.126 <151> 1999-11-02

<150> 60/203.349 <151> 2000-05-10

40

<160> 21

<170> PatentIn versión 3.0

45 <210> 1

<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

50 <220>

<221> misc feature

<222> () .. ()

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador PCR

# ES 2 369 979 T3

<400> 1 -  
cgacggatcc gatggcggac aaaaagcttg  
30

5 <210> 2  
<211> 29  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10 <400> 2  
cgcagcagct gttatacaat tcgcgcaaa  
29

15 <210> 3  
<211> 29  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<221> misc feature  
<222> () .. ()  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador PCR

25 <400> 3  
cggggatcct gatgcatgca tgataagga  
29

30 <210> 4  
<211> 27  
<212> ADN .  
<213> Secuencia artificial

35 <220>  
<221> misc feature  
<222> () .. ()  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador PCR

<400> 4

40 cggcattacc gtttcactaa tttattg  
27

45 <210> 5  
<211> 25  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

50 <220>  
<221> misc feature  
<222> () .. ()  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador PCR

<400> 5

55 gttggatccg gcattaccgt ttcac  
25

60 <210> 6  
<211> 30 .  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<221> misc feature  
<222> () .. ()

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador PCR  
 <400> 6  
 5 ggtggatcca tcaatagata cgtacgtcct  
     30  
 <210> 7  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 10 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <221> misc feature  
 <222> () .. ()  
 15 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador PCR  
 <400> 7  
 20 ttttagttta tgtatgtggt ttttg  
     25  
 <210> 8  
 <211> 41  
 <212> ADN  
 25 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <221> misc feature  
 <222> () .. ()  
 30 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador PCR  
 <400> 8  
 aacacataca taaactaaaa atgactaaat ctgagcagca a  
     41  
 35 <210> 9  
 <211> 39  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 40 <220>  
 <221> misc feature  
 <222> () .. ()  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador PCR  
 45 <400> 9  
 atgatgatga tgatgatgac ctgctaagta gctcagtaa  
     39  
 <210> 10  
 50 <211> 36  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 55 <221> misc feature  
 <222> () .. ()  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador PCR  
 <400> 10  
 60 catcatcatc atcatcatta aataagaacc cacgct  
     36

<210> 11  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <221> misc feature  
 <222> () .. ()  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia de receptor MetR consenso  
 10  
 <400> 11  
 gttaatggtg aacaaatctc atgttgcgtg  
 30  
 15 <210> 12  
 <211> 35  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 20 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> () .. ()  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador PCR  
 25 <400> 12  
 gcgggtcgac tatgactaaa tctgagcagc aagcc  
 35  
 30 <210> 13  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 35 <221> misc\_feature  
 <222> () .. ()  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador PCR  
 <400> 13  
 40 gcgtgcggcc gcgttatgct aagtagctca g  
 31  
 <210> 14  
 <211> 1524  
 45 <212> ADN  
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*  
 <400> 14  
 atgactaaat ctgagcagca agccgattca agacataacg ttatcgactt agttgtaac  
 60  
 accccattga tcgcactgaa aaaattgcct aaggctttgg gtatcaaacc acaaatttat  
 120  
 gctaagctgg aactatacaa tccaggtggt tccatcaaag acagaattgc caagtctatg  
 180  
 gtggaagaag ctgaagcttc cggtagaatt catccttcca gatctactct gatcgaacct  
 240  
 acttctggta acaccggtat cggctagct ttaatcggcg ccatcaaagg ttacagaact  
 300  
 50

ES 2 369 979 T3

atcatcacct tgccgaaaa aatgtctaac gagaaagttt ctgtcctaaa ggctctgggt  
360

gctgaaatca tcagaactcc aactgctgct gcctgggatt ctccagaatc acatattggt  
420

gttgctaaga agttgaaaa agagattcct ggtgctgta tacttgacca atataacaat  
480

atgatgaacc cagaagctca ttactttggt actggtcgcg aaatccaaag acagctagaa  
540  
gacttgaatt tatttgataa tctacgcgct gttggtgctg gtgctggtac tgggtgggact  
600

attagcggta tttccaagta cttgaaagaa cagaatgata agatccaaat cgttggtgct  
660

gagggattcg gttcaatfff agcccaacct gaaaacttga ataagactga tatcactgac  
720

tacaaagttg agggatttgg ttatgatttt gttcctcagg ttttgacag aaaattaatt  
780

gatgtttggt ataagacaga cgacaagcct tctttcaaat acgccagaca attgatttct  
840

aacgaaggtg tcttggtggg tggttcttcc gtttctacct tcaactgcggt tgtgaaatac  
900

tgtgaagacc accctgaact gactgaagat gatgtcattg ttgccatatt ccagattcc  
960

atcaggtcgt acctaaccaa attcgtcgat gacgaatggt tgaaaaagaa caatttggg  
1020

gatgatgacg tgttggcccg ttttgactct tcaaagctgg aggcttcgac gacaaaatac  
1080

gctgatgtgt ttggtaacgc tactgtaaag gatcttcact tgaaaccggt tgtttccggt  
1140

aaggaaaccg ctaaggtcac tgatgttatc aagatattaa aagacaatgg ctttgaccaa  
1200

ttgcctgtgt tgactgaaga cggcaagttg tctggtttag ttactctctc tgagcttcta  
1260

agaaaactat caatcaataa ttcaacaac gacaacacta taaagggtaa atacttggac  
1320

ttcaagaaat taacaatfff caatgatggt tcctcttaca acgaaaataa atccggtgaa  
1380

aagaagtta ttaaattcga tgaaaactca aagctatctg acttgaatcg tttctttgaa  
1440

aaaaactcat ctgccgttat cactgatggc ttgaaaccaa tccatattcg tactaagatg  
1500

gatttactga gctacttagc ataa  
1524

5

<210> 15

<211> 43

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> misc\_feature

<222> () .. ()

15 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador PCR

<400> 15  
ctatatcgta ataatgacta aatctgagca gcaagccgat tca  
43

5 <210> 16  
<211> 40  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> () .. ()  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador PCR

15 <400> 16  
agggctcgag gatcccgggg gtgctattat gaatgcacgg  
40

20 <210> 17  
<211> 35  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

25 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> () .. ()  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador PCR

30 <400> 17  
cggggatccg acgttttgcc cgcagggcggg aaacc  
35

35 <210> 18  
<211> 39  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

40 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> ()..()  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador PCR

45 <400> 18  
agatttagtc attattacga tatagttaat agttgatag  
39

50 <210> 19  
<211> 428  
<212> PRT  
<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 19

ES 2 369 979 T3

Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly Met Ala Ser Met Thr  
1 5 10 15  
Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Asp Leu Tyr Asp Asp Asp Asp Lys Asp  
20 25 30  
Pro Met Ala Asp Lys Lys Leu Asp Thr Gln Leu Val Asn Ala Gly Arg  
35 40 45  
Ser Lys Lys Tyr Thr Leu Gly Ala Val Asn Ser Val Ile Gln Arg Ala  
50 55 60  
Ser Ser Leu Val Phe Asp Ser Val Glu Ala Lys Lys His Ala Thr Arg  
65 70 75 80  
Asn Arg Ala Asn Gly Glu Leu Phe Tyr Gly Arg Arg Gly Thr Leu Thr  
85 90 95  
His Phe Ser Leu Gln Gln Ala Met Cys Glu Leu Glu Gly Gly Ala Gly  
100 105 110  
Cys Val Leu Phe Pro Cys Gly Ala Ala Val Ala Asn Ser Ile Leu  
115 120 125  
Ala Phe Ile Glu Gln Gly Asp His Val Leu Met Thr Asn Thr Ala Tyr  
130 135 140  
Glu Pro Ser Gln Asp Phe Cys Ser Lys Ile Leu Ser Lys Leu Gly Val  
145 150 155 160  
Thr Thr Ser Trp Phe Asp Pro Leu Ile Gly Ala Asp Ile Val Lys His  
165 170 175  
Leu Gln Pro Asn Thr Lys Ile Val Phe Leu Glu Ser Pro Gly Ser Ile  
180 185 190  
Thr Met Glu Val His Asp Val Pro Ala Ile Val Ala Ala Val Arg Ser  
195 200 205  
Val Val Pro Asp Ala Ile Ile Met Ile Asp Asn Thr Trp Ala Ala Gly  
210 215 220  
Val Leu Phe Lys Ala Leu Asp Phe Gly Ile Asp Val Ser Ile Gln Ala  
225 230 235 240  
Ala Thr Lys Tyr Leu Val Gly His Ser Asp Ala Met Ile Gly Thr Ala  
245 250 255  
Val Cys Asn Ala Arg Cys Trp Glu Gln Leu Arg Glu Asn Ala Tyr Leu  
260 265 270  
Met Gly Gln Met Val Asp Ala Asp Thr Ala Tyr Ile Thr Ser Arg Gly  
275 280 285  
Leu Arg Thr Leu Gly Val Arg Leu Arg Gln His His Glu Ser Ser Leu  
290 295 300  
Lys Val Ala Glu Trp Leu Ala Glu His Pro Gln Val Ala Arg Val Asn  
305 310 315 320  
His Pro Ala Leu Pro Gly Ser Lys Gly His Glu Phe Trp Lys Arg Asp  
325 330 335  
Phe Thr Gly Ser Ser Gly Leu Phe Ser Phe Val Leu Lys Lys Lys Leu  
340 345 350

ES 2 369 979 T3

Asn Asn Glu Glu Leu Ala Asn Tyr Leu Asp Asn Phe Ser Leu Phe Ser  
 355 360 365  
 Met Ala Tyr Ser Trp Gly Gly Tyr Glu Ser Leu Ile Leu Ala Asn Gln  
 370 375 380  
 Pro Glu His Ile Ala Ala Ile Arg Pro Gln Gly Glu Ile Asp Phe Ser  
 385 390 395 400  
 Gly Thr Leu Ile Arg Leu His Ile Gly Leu Glu Asp Val Asp Asp Leu  
 405 410 415  
 Ile Ala Asp Leu Asp Ala Gly Phe Ala Arg Ile Val  
 420 425

<210> 20  
 <211> 1252  
 <212> PRT  
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

5

<400> 20  
 Met Ser Pro Ile Leu Gly Tyr Trp Lys Ile Lys Gly Leu Val Gln Pro  
 1 5 10 15  
 Thr Arg Leu Leu Leu Glu Tyr Leu Glu Glu Lys Tyr Glu Glu His Leu  
 20 25 30  
 Tyr Glu Arg Asp Glu Gly Asp Lys Trp Arg Asn Lys Lys Phe Glu Leu  
 35 40 45  
 Gly Leu Glu Phe Pro Asn Leu Pro Tyr Tyr Ile Asp Gly Asp Val Lys  
 50 55 60  
 Leu Thr Gln Ser Met Ala Ile Ile Arg Tyr Ile Ala Asp Lys His Asn  
 65 70 75 80  
 Met Leu Gly Gly Cys Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ile Ser Met Leu Glu  
 85 90 95  
 Gly Ala Val Leu Asp Ile Arg Tyr Gly Val Ser Arg Ile Ala Tyr Ser  
 100 105 110  
 Lys Asp Phe Glu Thr Leu Lys Val Asp Phe Leu Ser Lys Leu Pro Glu  
 115 120 125  
 Met Leu Lys Met Phe Glu Asp Arg Leu Cys His Lys Thr Tyr Leu Asn  
 130 135 140  
 Gly Asp His Val Thr His Pro Asp Phe Met Leu Tyr Asp Ala Leu Asp  
 145 150 155 160  
 Val Val Leu Tyr Met Asp Pro Met Cys Leu Asp Ala Phe Pro Lys Leu  
 165 170 175  
 Val Cys Phe Lys Lys Arg Ile Glu Ala Ile Pro Gln Ile Asp Lys Tyr  
 180 185 190  
 Leu Lys Ser Ser Lys Tyr Ile Ala Trp Pro Leu Gln Gly Trp Gln Ala  
 195 200 205  
 Thr Phe Gly Gly Gly Asp His Pro Pro Lys Ser Asp Leu Glu Val Leu  
 210 215 220  
 Phe Gln Gly Pro Leu Gly Ser Pro Gly Ile Pro Gly Ser Thr Met Thr  
 225 230 235 240  
 Lys Ser Glu Gln Gln Ala Asp Ser Arg His Asn Val Ile Asp Leu Val  
 245 250 255

10

ES 2 369 979 T3

Gly Asn Thr Pro Leu Ile Ala Leu Lys Lys Leu Pro Lys Ala Leu Gly  
 260 265 270

Ile Lys Pro Gln Ile Tyr Ala Lys Leu Glu Leu Tyr Asn Pro Gly Gly  
 275 280 285

Ser Ile Lys Asp Arg Ile Ala Lys Ser Met Val Glu Glu Ala Glu Ala  
 290 295 300

Ser Gly Arg Ile His Pro Ser Arg Ser Thr Leu Ile Glu Pro Thr Ser  
 305 310 315 320

Gly Asn Thr Gly Ile Gly Leu Ala Leu Ile Gly Ala Ile Lys Gly Tyr  
 325 330 335

Arg Thr Ile Ile Thr Leu Pro Glu Lys Met Ser Asn Glu Lys Val Ser  
 340 345 350

Val Leu Lys Ala Leu Gly Ala Glu Ile Ile Arg Thr Pro Thr Ala Ala  
 355 360 365

Ala Trp Asp Ser Pro Glu Ser His Ile Gly Val Ala Lys Lys Leu Glu  
 370 375 380

Lys Glu Ile Pro Gly Ala Val Ile Leu Asp Gln Tyr Asn Asn Met Met  
 385 390 395 400

Asn Pro Glu Ala His Tyr Phe Gly Thr Gly Arg Glu Ile Gln Arg Gln  
 405 410 415

Leu Glu Asp Leu Asn Leu Phe Asp Asn Leu Arg Ala Val Val Ala Gly  
 420 425 430

Ala Gly Thr Gly Gly Thr Ile Ser Gly Ile Ser Lys Tyr Leu Lys Glu  
 435 440 445

Gln Asn Asp Lys Ile Gln Ile Val Gly Ala Asp Pro Phe Gly Ser Ile  
 450 455 460

Leu Ala Gln Pro Glu Asn Leu Asn Lys Thr Asp Ile Thr Asp Tyr Lys  
 465 470 475 480

Val Glu Gly Ile Gly Tyr Asp Phe Val Pro Gln Val Leu Asp Arg Lys  
 485 490 495

Leu Ile Asp Val Trp Tyr Lys Thr Asp Asp Lys Pro Ser Phe Lys Tyr  
 500 505 510

Ala Arg Gln Leu Ile Ser Asn Glu Gly Val Leu Val Gly Gly Ser Ser  
 515 520 525

Gly Ser Ala Phe Thr Ala Val Val Lys Tyr Cys Glu Asp His Pro Glu  
 530 535 540

Leu Thr Glu Asp Asp Val Ile Val Ala Ile Phe Pro Asp Ser Ile Arg  
 545 550 555 560

Ser Tyr Leu Thr Lys Phe Val Asp Asp Glu Trp Leu Lys Lys Asn Asn  
 565 570 575

Leu Trp Asp Asp Asp Val Leu Ala Arg Phe Asp Ser Ser Lys Leu Glu  
 580 585 590

Ala Ser Thr Thr Lys Tyr Ala Asp Val Phe Gly Asn Ala Thr Val Lys  
 595 600 605

ES 2 369 979 T3

Asp Leu His Leu Lys Pro Val Val Ser Val Lys Glu Thr Ala Lys Val  
 610 615 620  
 Thr Asp Val Ile Lys Ile Leu Lys Asp Asn Gly Phe Asp Gln Leu Pro  
 625 630 635 640  
 Val Leu Thr Glu Asp Gly Lys Leu Ser Gly Leu Val Thr Leu Ser Glu  
 645 650 655  
 Leu Leu Arg Lys Leu Ser Ile Asn Asn Ser Asn Asn Asp Asn Thr Ile  
 660 665 670  
 Lys Gly Lys Tyr Leu Asp Phe Lys Lys Leu Asn Asn Phe Asn Asp Val  
 675 680 685  
 Ser Ser Tyr Asn Glu Asn Lys Ser Gly Lys Lys Lys Phe Ile Lys Phe  
 690 695 700  
 Asp Glu Asn Ser Lys Leu Ser Asp Leu Asn Arg Phe Phe Glu Lys Asn  
 705 710 715 720  
 Ser Ser Ala Val Ile Thr Asp Gly Leu Lys Pro Ile His Ile Val Thr  
 725 730 735  
 Lys Met Asp Leu Leu Ser Tyr Leu Ala Met Thr Lys Ser Glu Gln Gln  
 740 745 750  
 Ala Asp Ser Arg His Asn Val Ile Asp Leu Val Gly Asn Thr Pro Leu  
 755 760 765  
 Ile Ala Leu Lys Lys Leu Pro Lys Ala Leu Gly Ile Lys Pro Gln Ile  
 770 775 780  
 Tyr Ala Lys Leu Glu Leu Tyr Asn Pro Gly Gly Ser Ile Lys Asp Arg  
 785 790 795 800  
 Ile Ala Lys Ser Met Val Glu Glu Ala Glu Ala Ser Gly Arg Ile His  
 805 810 815  
 Pro Ser Arg Ser Thr Leu Ile Glu Pro Thr Ser Gly Asn Thr Gly Ile  
 820 825 830  
 Gly Leu Ala Leu Ile Gly Ala Ile Lys Gly Tyr Arg Thr Ile Ile Thr  
 835 840 845  
 Leu Pro Glu Lys Met Ser Asn Glu Lys Val Ser Val Leu Lys Ala Leu  
 850 855 860  
 Gly Ala Glu Ile Ile Arg Thr Pro Thr Ala Ala Ala Trp Asp Ser Pro  
 865 870 875 880  
 Glu Ser His Ile Gly Val Ala Lys Lys Leu Glu Lys Glu Ile Pro Gly  
 885 890 895  
 Ala Val Ile Leu Asp Gln Tyr Asn Asn Met Met Asn Pro Glu Ala His  
 900 905 910  
 Tyr Phe Gly Thr Gly Arg Glu Ile Gln Arg Gln Leu Glu Asp Leu Asn  
 915 920 925  
 Leu Phe Asp Asn Leu Arg Ala Val Val Ala Gly Ala Gly Thr Gly Gly  
 930 935 940  
 Thr Ile Ser Gly Ile Ser Lys Tyr Leu Lys Glu Gln Asn Asp Lys Ile  
 945 950 955 960  
 Gln Ile Val Gly Ala Asp Pro Phe Gly Ser Ile Leu Ala Gln Pro Glu  
 965 970 975  
 Asn Leu Asn Lys Thr Asp Ile Thr Asp Tyr Lys Val Glu Gly Ile Gly  
 980 985 990

ES 2 369 979 T3

Tyr Asp Phe Val Pro Gln Val Leu Asp Arg Lys Leu Ile Asp Val Trp  
 995 1000 1005

Tyr Lys Thr Asp Asp Lys Pro Ser Phe Lys Tyr Ala Arg Gln Leu  
 1010 1015 1020

Ile Ser Asn Glu Gly Val Leu Val Gly Gly Ser Ser Gly Ser Ala  
 1025 1030 1035

Phe Thr Ala Val Val Lys Tyr Cys Glu Asp His Pro Glu Leu Thr  
 1040 1045 1050

Glu Asp Asp Val Ile Val Ala Ile Phe Pro Asp Ser Ile Arg Ser  
 1055 1060 1065

Tyr Leu Thr Lys Phe Val Asp Asp Glu Trp Leu Lys Lys Asn Asn  
 1070 1075 1080

Leu Trp Asp Asp Asp Val Leu Ala Arg Phe Asp Ser Ser Lys Leu  
 1085 1090 1095

Glu Ala Ser Thr Thr Lys Tyr Ala Asp Val Phe Gly Asn Ala Thr  
 1100 1105 1110

Val Lys Asp Leu His Leu Lys Pro Val Val Ser Val Lys Glu Thr  
 1115 1120 1125

Ala Lys Val Thr Asp Val Ile Lys Ile Leu Lys Asp Asn Gly Phe  
 1130 1135 1140

Asp Gln Leu Pro Val Leu Thr Glu Asp Gly Lys Leu Ser Gly Leu  
 1145 1150 1155

Val Thr Leu Ser Glu Leu Leu Arg Lys Leu Ser Ile Asn Asn Ser  
 1160 1165 1170

Asn Asn Asp Asn Thr Ile Lys Gly Lys Tyr Leu Asp Phe Lys Lys  
 1175 1180 1185

Leu Asn Asn Phe Asn Asp Val Ser Ser Tyr Asn Glu Asn Lys Ser  
 1190 1195 1200

Gly Lys Lys Lys Phe Ile Lys Phe Asp Glu Asn Ser Lys Leu Ser  
 1205 1210 1215

Asp Leu Asn Arg Phe Phe Glu Lys Asn Ser Ser Ala Val Ile Thr  
 1220 1225 1230

Asp Gly Leu Lys Pro Ile His Ile Val Thr Lys Met Asp Leu Leu  
 1235 1240 1245

Ser Tyr Leu Ala  
 1250

<210> 21

5 <211> 1188

<212> ADN

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 21

10 atggcggaca aaaagcttga tactcaactg gtgaatgcag gacgcagcaa aaaatacact  
 60

ctcggcgcgg taaatagcgt gattcagcgc gcttcttcgc tggcttttga cagtgtagaa  
 120

# ES 2 369 979 T3

gccaaaaaac acgcgacacg taatcgcgcc aatggagagt tgttctatgg acggcgcgga  
180

acgttaaacc atttctcctt acaacaagcg atgtgtgaac tggaaggtgg cgcaggctgc  
240

gtgctatttc cctgcggggc ggcagcggtt gctaattcca ttcttgcttt tatcgaacag  
300

ggcgatcatg tgttgatgac caacaccgcc tatgaaccga gtcaggattt ctgtagcaaa  
360

atcctcagca aactgggcgt aacgacatca tggtttgatc cgctgattgg tgccgatatc  
420

gttaagcatc tgcagccaaa cactaaaatc gtgtttctgg aatcgccagg ctccatcacc  
480

atggaagtcc acgacgttcc ggcgattggt gccgcctac gcagtgtggt gccggatgcc  
540

atcattatga tcgacaacac ctgggcagcc ggtgtgctgt ttaaggcgct ggattttggc  
600

atcgatgttt ctattcaagc cgccacccaaa tatctgggtg ggcattcaga tgcgatgatt  
660

ggcactgccg tgtgcaatgc ccgttgctgg gagcagctac gggaaaatgc ctatctgatg  
720

ggccagatgg tcgatgccga taccgcctat ataaccagcc gtggcctgcg cacattaggt  
780

gtgcgtttgc gtcaacatca tgaaagcagt ctgaaagtgg ctgaatggct ggcagaacat  
840

ccgcaagttg cgcgagttaa ccaccctgct ctgcctggca gtaaaggcca cgaattctgg  
900

aaacgagact ttacaggcag cagcgggcta ttttcctttg tgcttaagaa aaaactcaat  
960

aatgaagagc tggcgaacta tctggataac ttcagtttat tcagcatggc ctactcgtgg  
1020

ggcgggtatg aatcgttgat cctggcaaat caaccagaac atatcgccgc cattcgccca  
1080

caaggcgaga tcgattttag cgggacctg attcgcctgc atattggtct ggaagatgct  
1140

gacgatctga ttgccgatct ggacgccggt tttgcgcgaa ttgtataa  
1188

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Kit de prueba adecuado para su utilización en la evaluación de la cantidad de homocisteína en una solución de muestra que comprende cistationina  $\beta$ -sintasa, o un derivado de la misma, L-serina, cistationina  $\beta$ -liasa, o un derivado de la misma, en el que los derivados conservan la actividad enzimática de una enzima natural aislada.
2. Kit de prueba según la reivindicación 1, que comprende además un recipiente para contener dicha muestra.
- 10 3. Kit de prueba según la reivindicación 1, estando presente dicha cistationina  $\beta$ -sintasa en una concentración final de 0,1 a 100 KU/l.
4. Kit de prueba según la reivindicación 1, estando presente dicha L-serina en una concentración final de 1  $\mu$ M a 50  $\mu$ M.
- 15 5. Kit de prueba según la reivindicación 1, estando presente dicha cistationina  $\beta$ -liasa en una concentración final de 0,01 a 100 KU/l.
6. Kit de prueba según la reivindicación 1, que comprende lactato deshidrogenasa y NADH.
- 20 7. Kit de prueba según la reivindicación 6, estando presente dicha lactato deshidrogenasa en una concentración final de 30 a 5.000 U/l.
8. Kit de prueba según la reivindicación 6, estando presente dicha NADH en una concentración final de 0,1 mM a 2 mM.
- 25 9. Kit de prueba según la reivindicación 1, que comprende además un colorante que puede experimentar un cambio de color cuando se oxida.
- 30 10. Kit de prueba según la reivindicación 9, en el que dicho colorante es seleccionado de entre el grupo constituido por 5,5'-ditiobis(ácido 2-nitrobenzoico), 2,6-diclorofenolindofenol, compuesto de tetrazolio, metosulfato de fenazina o metilo viológeno.
11. Kit de prueba según la reivindicación 1, que comprende además un recipiente separado, conteniendo dicho recipiente separado un agente reductor.
- 35 12. Kit de prueba según la reivindicación 11, en el que dicho agente reductor comprende una sal de borohidruro o un agente reductor de tiol.
- 40 13. Kit de prueba según la reivindicación 12, en el que dicho agente reductor de tiol es seleccionado de entre el grupo constituido por  $\beta$ -mercaptoetanol, ditiotretol, ditioeritrol, TCEP o ácido tioacético, o cualquier sal de cada uno de los mismos.
- 45 14. Kit de prueba según la reivindicación 13, estando presente dichos ditiotretol,  $\beta$ -mercaptoetanol, ditioeritrol o ácido tioacético en una cantidad de 0,2 mM a 3 mM.
15. Kit de prueba según la reivindicación 1, que comprende además cistationina  $\gamma$ -liasa, o un derivado de la misma, en el que el derivado conserva la actividad enzimática de una enzima natural aislada.
- 50 16. Kit de prueba según la reivindicación 2, 16 ó 15, en el que dicha cistationina  $\beta$ -sintasa, o un derivado de la misma, cistationina  $\beta$ -liasa, o un derivado de la misma, cistationina  $\gamma$ -liasa, o un derivado de la misma, lactato deshidrogenasa, o un derivado de la misma, están inmovilizadas dentro de dicho recipiente, en el que los derivados conservan la actividad enzimática de una enzima natural aislada.
- 55 17. Kit de prueba según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que cada una de las enzimas se construye como proteínas de fusión.
18. Enzima aislada que presenta una secuencia seleccionada de entre el grupo constituido por las SEC. ID. nº 19 y nº 20.
- 60 19. Procedimiento de utilización de cistationina como calibrador del ensayo de homocisteína que comprende las etapas siguientes:
- 65 (a) tomar una concentración conocida de cistationina;
- (b) añadir dicha concentración conocida a una muestra biológica;

- (c) utilizar dicha muestra que contiene cistationina en una reacción enzimática que convierte la homocisteína en cistationina y reconvierte la cistationina en homocisteína con la producción acompañante de piruvato y amoníaco;
  - (d) medir las cantidades de piruvato o amoníaco producidas; y
  - (e) utilizar dichas cantidades medidas de piruvato o amoníaco como patrones de referencia para dicho ensayo de homocisteína.
- 5

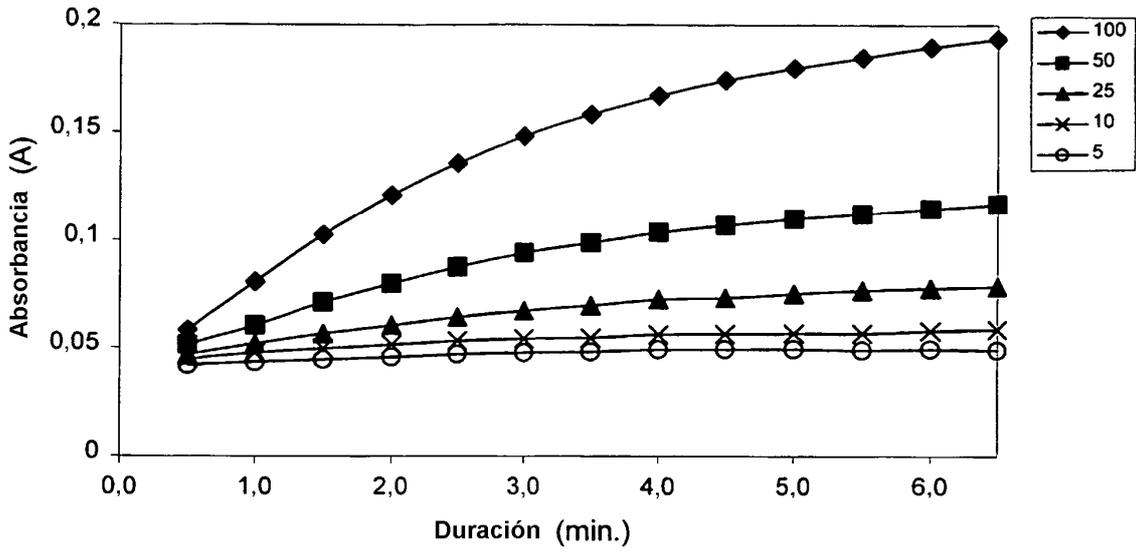


Figura 1

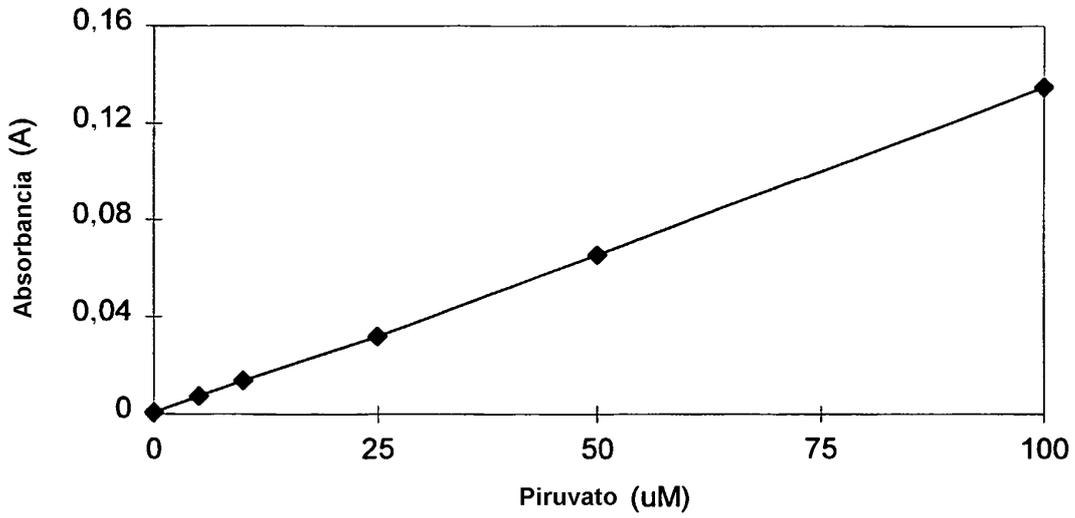


Figura 2

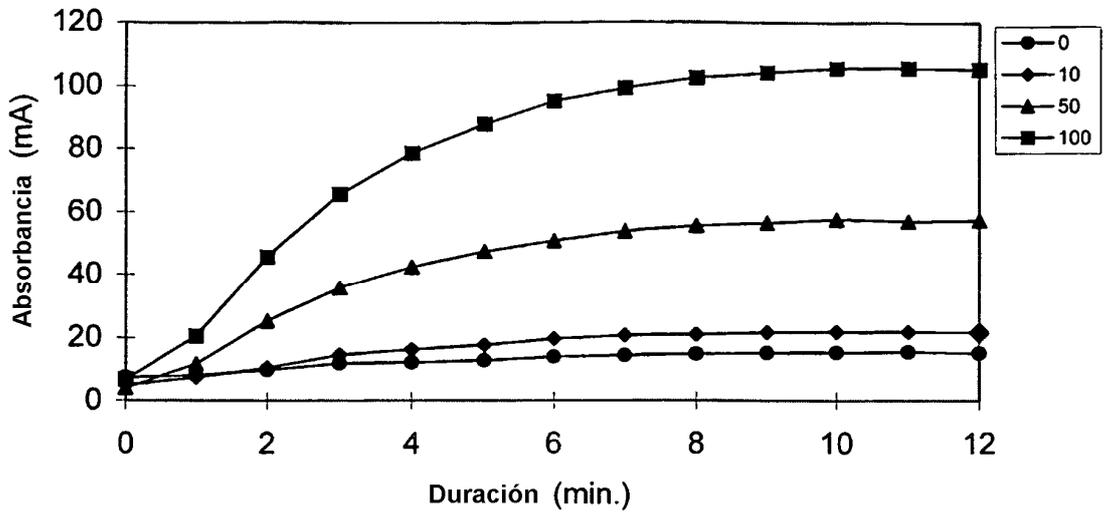


Figura 3

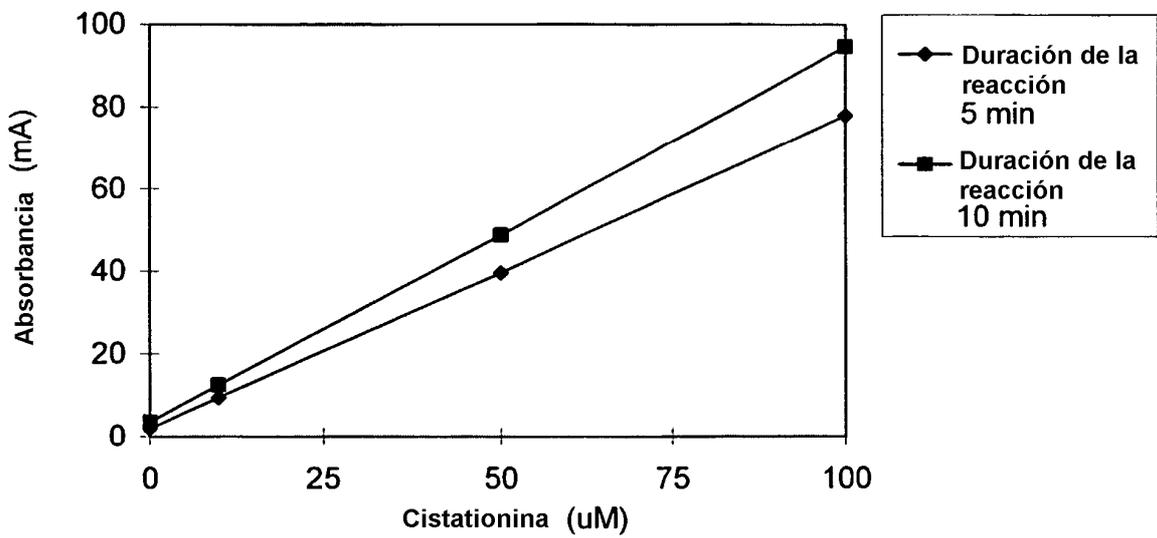


Figura 4

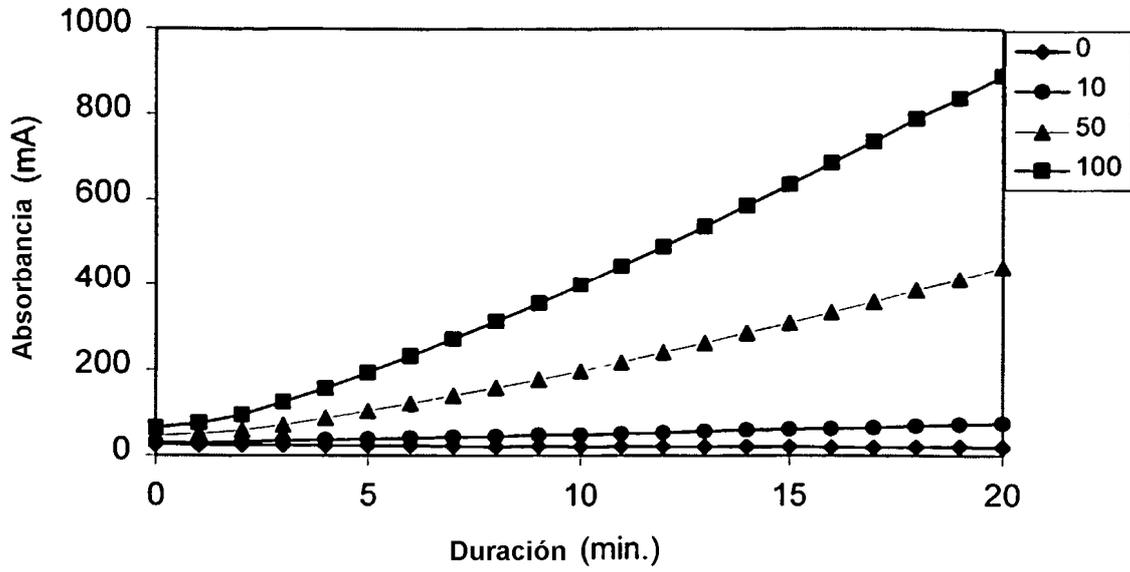


Figura 5

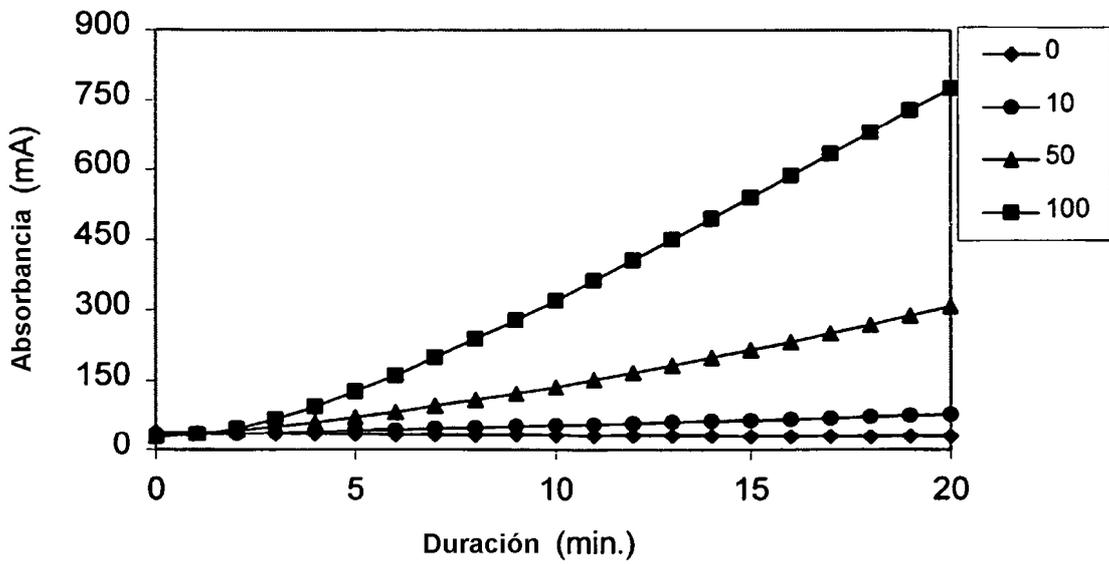


Figura 6

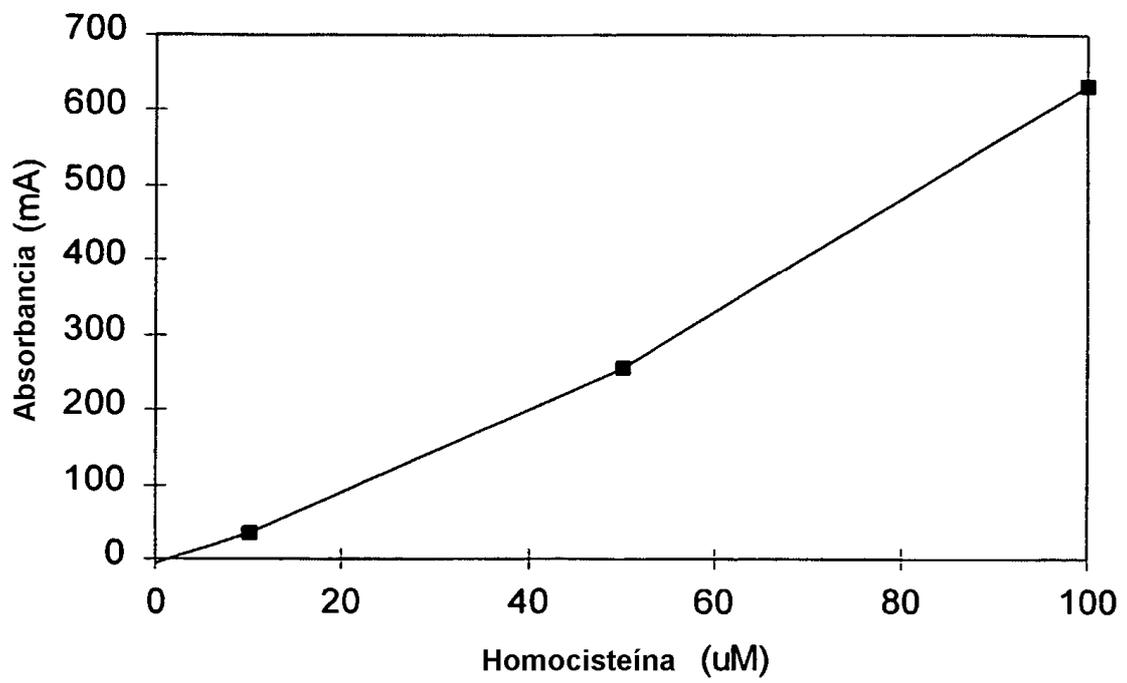


Figura 7

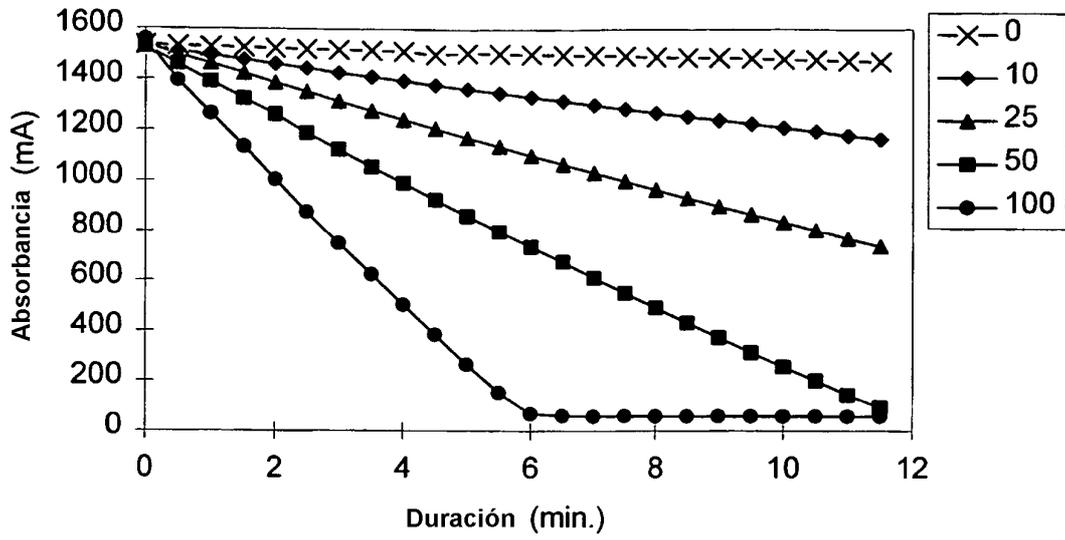


Figura 8

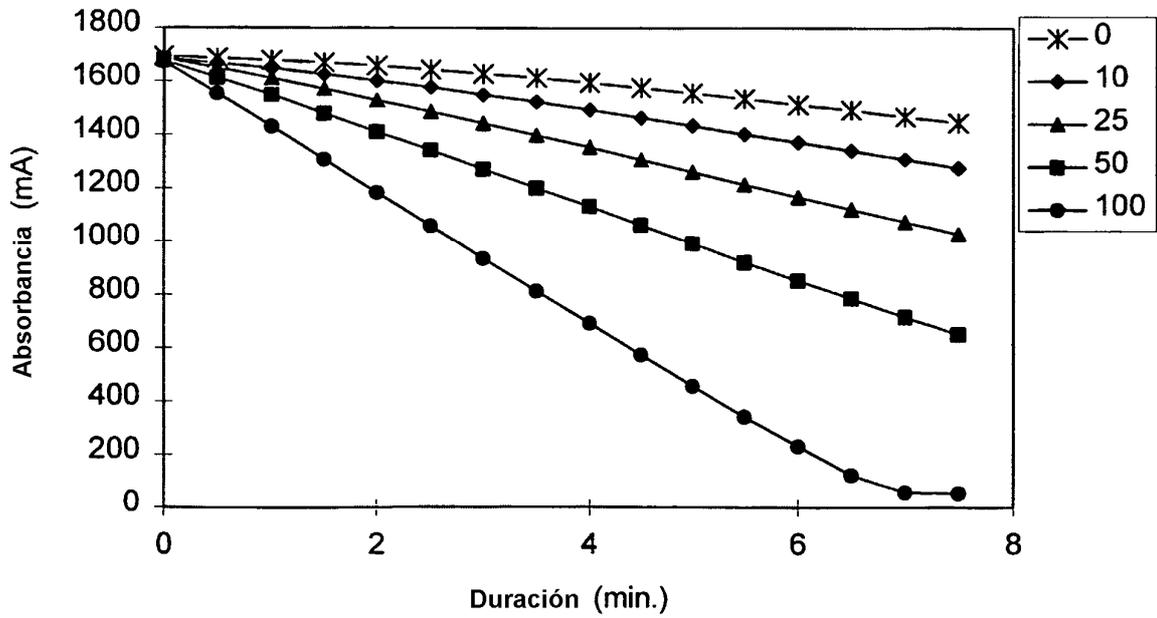


Figura 9

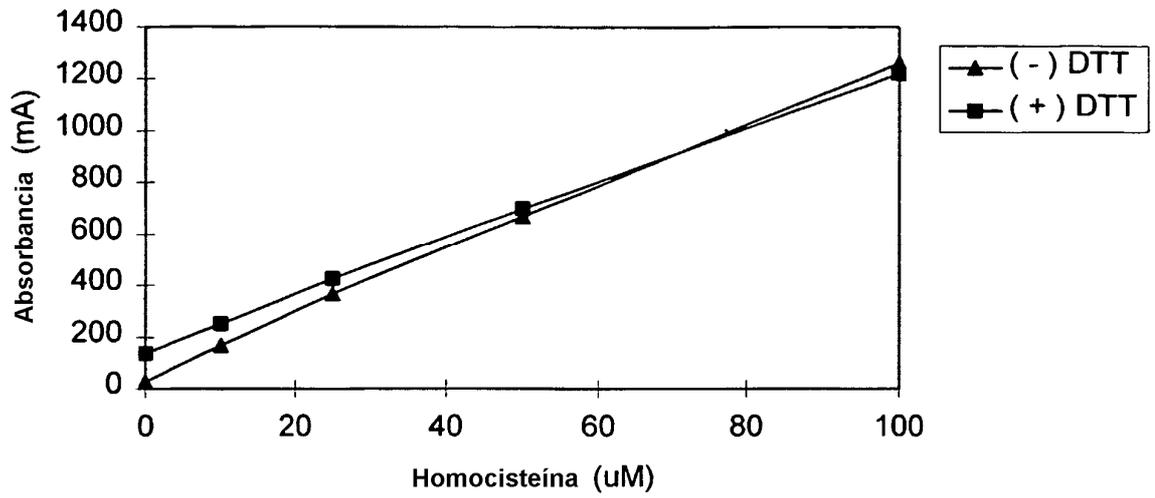


Figura 10

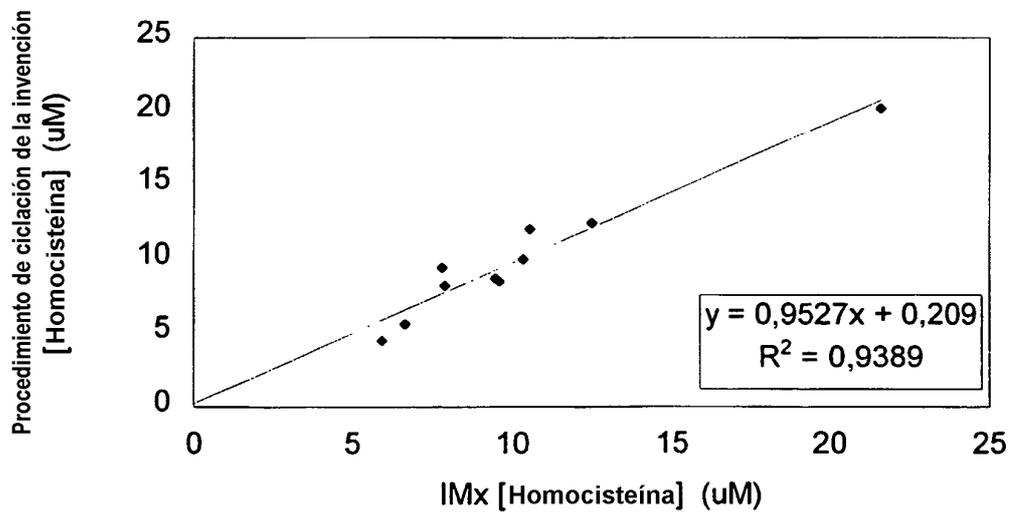


Figura 11

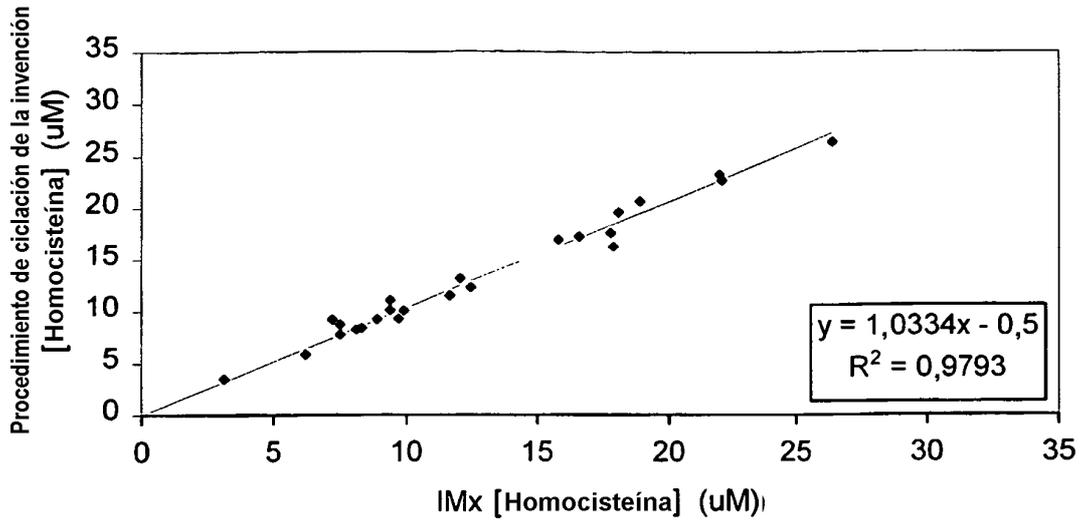


Figura 12

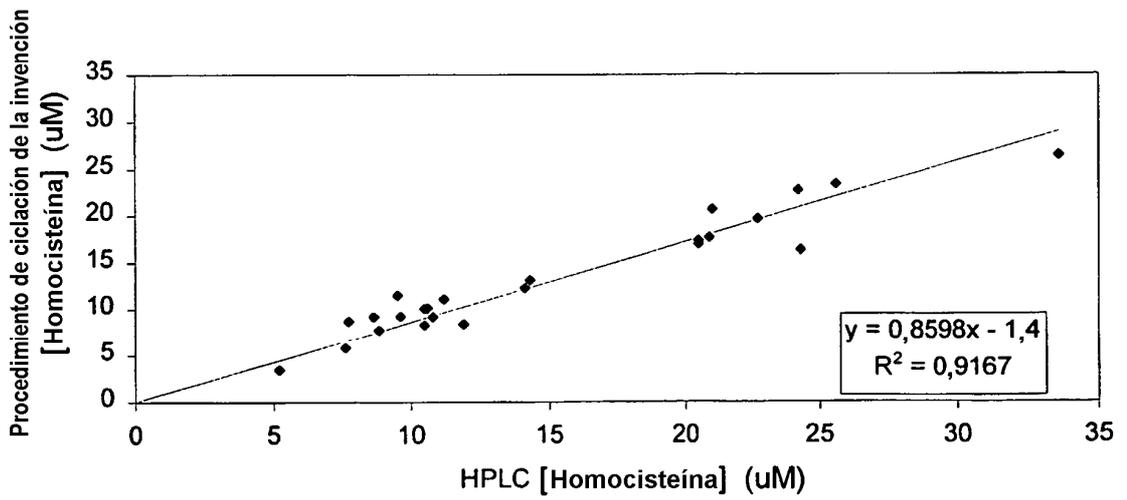


Figura 13

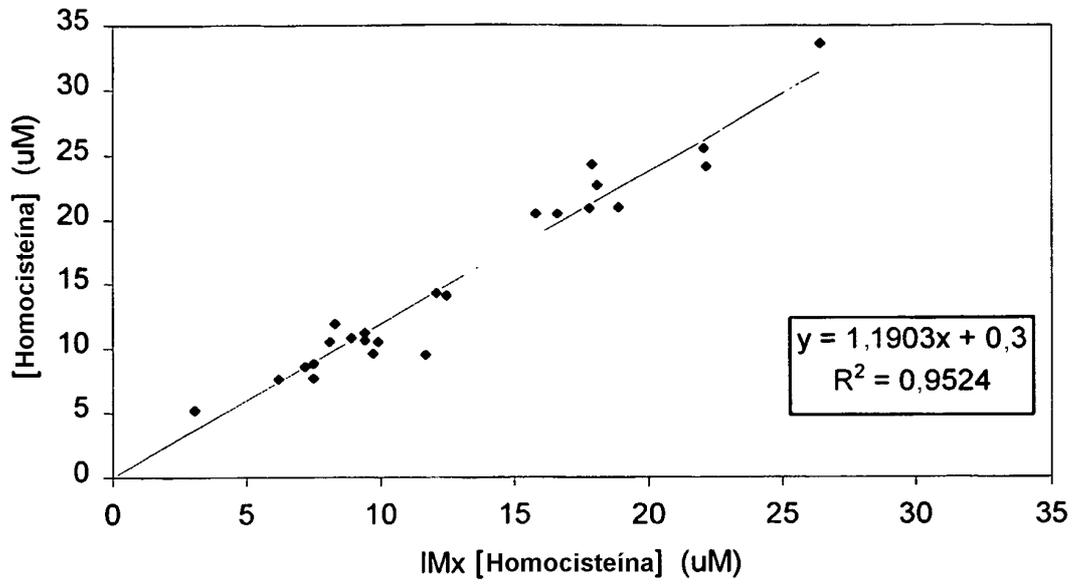


Figura 14

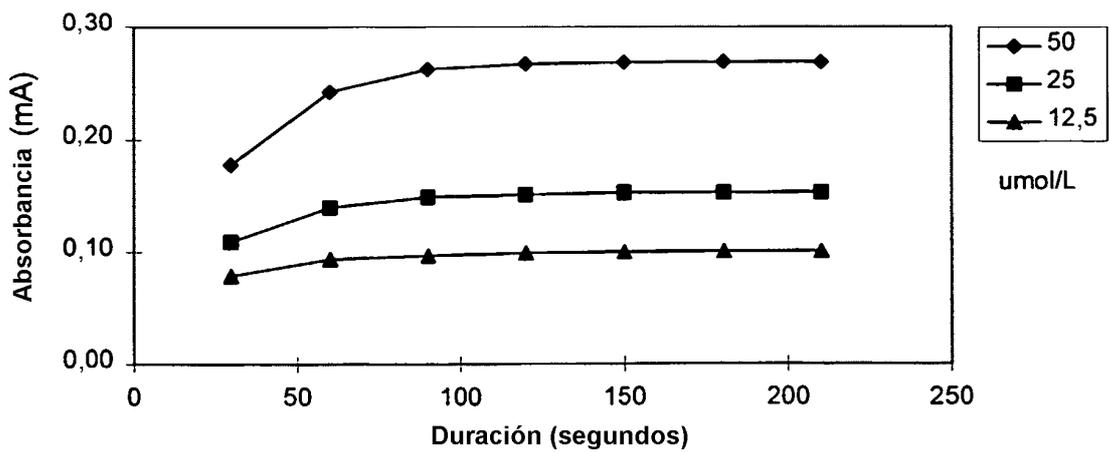


Figura 15

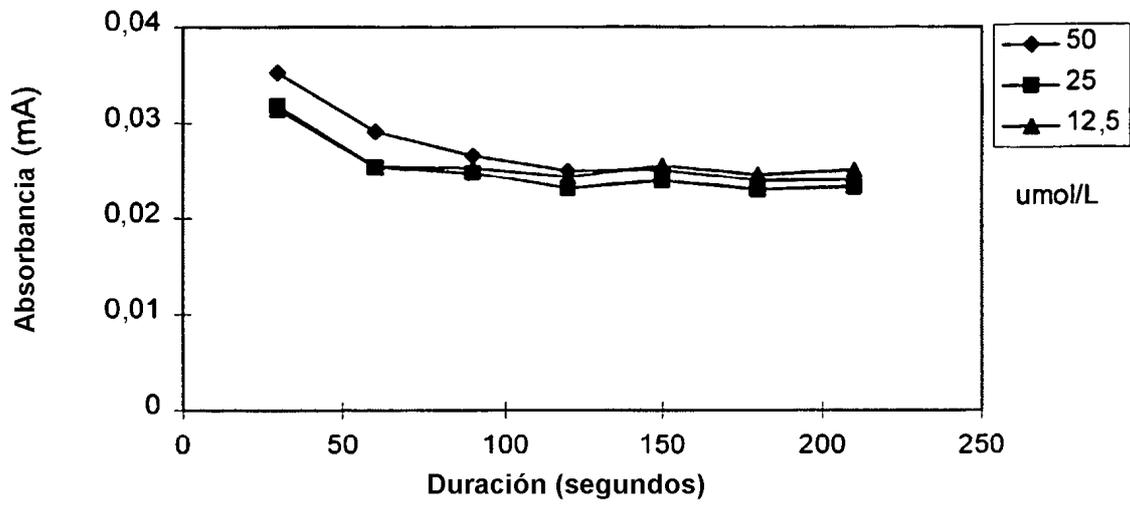


Figura 16