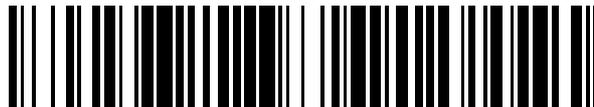


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 397 681**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/00 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.01.2009 E 09700710 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.10.2012 EP 2235201**

54 Título: **Métodos y composiciones para someter a ensayo la homocisteína**

30 Prioridad:

04.01.2008 US 969803

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

08.03.2013

73 Titular/es:

**GENERAL ATOMICS (100.0%)
3550 GENERAL ATOMICS COURT P.O. BOX
85608
SAN DIEGO, CA 92186-5608, US**

72 Inventor/es:

**YUAN, CHONG-SHENG;
DATTA, ABHIJIT y
DOU, CHAO**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 397 681 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

Métodos y composiciones para someter a ensayo la homocisteína

5 CAMPO TÉCNICO

La presente invención se refiere de manera general al campo de la detección de la homocisteína. En particular, la invención proporciona un método para determinar la presencia o concentración de homocisteína (Hcy) en muestras en las que la homocisteína reacciona con un cosustrato de Hcy en una reacción de conversión de Hcy catalizada por un enzima conversor de Hcy para formar un producto de conversión de Hcy y un producto de conversión de cosustrato de Hcy, y el producto de conversión de cosustrato de Hcy se evalúa para determinar la presencia y/o concentración de Hcy en la muestra. El cosustrato de Hcy puede evaluarse directamente o puede convertirse adicionalmente en otro u otros materiales antes de realizar la evaluación. Se proporciona además un kit para someter a ensayo la homocisteína basado en el mismo principio.

15 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La concentración total de homocisteína en los líquidos corporales tales como el plasma o el suero es un marcador importante de enfermedad. Por ejemplo la cuantificación de la homocisteína puede ser un importante indicador de riesgo de enfermedad cardiovascular, puede ser un marcador sensible de deficiencias en cobalamina y folato, y puede utilizarse para diagnosticar errores innatos del metabolismo conocidos como homocistinuria. Se ha informado también que la cuantificación de la homocisteína resulta útil para evaluar defectos de nacimiento en mujeres gestantes y alteraciones cognitivas en personas de edad avanzada. Ver Frantzen *et al.*, Enzyme Conversion Immunoassay for Determining Total Homocysteine in Plasma or Serum, *Clinical Chemistry* 44(2):311-316, 1998.

La homocisteína (Hcy) es un aminoácido que contiene tiol formado a partir de metionina durante las reacciones de transmetilación dependientes de S-adenosilmetionina. La Hcy intracelular se remetilando formando metionina, o se cataboliza irreversiblemente en una serie de reacciones, formando cisteína. La Hcy intracelular se exporta a los líquidos extracelulares, tales como la sangre y la orina, y circula mayoritariamente en forma oxidada y principalmente unida a proteínas plasmáticas (Refsum *et al.*, *Annu. Rev. Medicine* 49:31-62, 1998). La cantidad de Hcy en el plasma y en la orina refleja el equilibrio entre la producción y la utilización de Hcy. Este equilibrio puede resultar perturbado en estados clínicos caracterizados por trastornos genéticos de enzimas que participan en la transulfuración y remetilación de la Hcy (por ejemplo la cistation β -sintasa y la N^{5,10}-metilentetrahidrofolato reductasa o en la deficiencia en la dieta de vitaminas (por ejemplo las vitaminas B₆, B₁₂ y folato) que participan en el metabolismo de la Hcy (Bauval *et al.*, *Cleveland Clinic Journal of Medicine* 64:543-549, 1997). Además, los niveles plasmáticos de Hcy también pueden resultar perturbados por algunas medicaciones, tales como los fármacos antifolato (por ejemplo el metotrexato) utilizados para el tratamiento del cáncer o la artritis (Foody *et al.*, *Clinician Reviews* 8:203-210, 1998).

Algunos casos severos de homocisteinemia son provocados por defectos homocigóticos en genes codificantes de enzimas participantes en el metabolismo de la Hcy. En estos casos, un defecto en un enzima que participa en la remetilación o trans-sulfuración de la Hcy conduce a elevaciones de hasta 50 veces en el nivel de Hcy en la sangre y orina. La forma clásica de dicho trastorno, la homocisteinemia congénita (Hcyemia) está causada por defectos homocigóticos en el gen codificante de la cistation β -sintasa (CBS). Estos individuos sufren complicaciones tromboembólicas a edad temprana, resultando en ictus, infarto de miocardio, hipertensión renovascular, claudicación intermitente, isquemia mesentérica y embolismo pulmonar. Dichos pacientes también pueden manifestar retardo mental y otras anomalías, similares a *ectopia lentis* y deformidades esqueléticas (Perry T., *Homocysteine: Selected aspects in Nyham W.L. ed. Heritable disorders of amino acid metabolism. New York, John Wiley & Sons, páginas 419-451, 1974*). También es conocido que los niveles elevados de Hcy en mujeres gestantes se relacionan con defectos de nacimiento de niños con cierre del tubo neural (Scott, *et al.*, "The etiology of neural tube defects" in Graham, I., Refsum, H., Rosenberg, I.H., and Ureland P.M. ed. "Homocysteine metabolism: from basic science to clinical medicine" Kluwer Academic Publishers, Boston, páginas 133-136, 1995). De esta manera, la utilidad diagnóstica de las determinaciones de Hcy ha sido bien documentada en dichas condiciones clínicas.

Se ha demostrado que niveles incluso leve o moderadamente elevados de Hcy también incrementan el riesgo de aterosclerosis de las arterias coronarias, cerebrales y periféricas, y enfermedades cardiovasculares (Boushey *et al.*, *JAMA* 274:1049-1057, 1995). Se ha demostrado que la prevalencia de Hcyemia es de 42%, 28% y 30% entre pacientes con enfermedad cerebral vascular, enfermedad vascular periférica y enfermedad cardiovascular, respectivamente (Moghadasian *et al.*, *Arch. Intern. Med.* 157:2299-2307, 1997). Una metaanálisis de 27 estudios clínicos ha calculado que cada incremento de 5 mM del nivel de Hcy incrementa el riesgo de enfermedad arterial coronaria en 60% en hombres y en 80% en mujeres, lo que equivale a un incremento de 20 mg/dl⁻¹ (0,5 mmoles/dl) de colesterol plasmático, sugiriendo que la Hcy como factor de riesgo es tan potente como el colesterol en la población general. Los resultados de dichos estudios clínicos concluyeron que la hiperhomocisteinemia es un nuevo factor de riesgo independiente emergente de enfermedad cardiovascular y que podría explicar la mitad de aquellos

pacientes cardiovasculares que no presentan ninguno de los factores de riesgo cardiovascular establecidos (por ejemplo hipertensión, hipercolesterolemia, tabaquismo, diabetes mellitus, obesidad marcada e inactividad física).

5 La homocisteinemia leve está causada principalmente por la heterocigosidad de los defectos enzimáticos. Un polimorfismo habitual en el gen de la metilentetrahidrofolato reductasa aparentemente influye sobre la sensibilidad de los niveles de homocisteína a la deficiencia de ácido fólico (Boers *et al.*, *J. Inher. Metab. Dis.* 20:301-306, 1997). Además, los niveles plasmáticos de homocisteína también se encuentran significativamente incrementados en los pacientes de trasplante cardiaco y renal (Ueland *et al.*, *J. Lab. Clin. Med.* 114:473-501, 1989), en pacientes de Alzheimer (Jacobsen *et al.*, *Clin. Chem.* 44:2238-2239, 1998), así como en pacientes de diabetes mellitus no dependiente de insulina (Ducloux *et al.*, *Nephrol. Dial. Transplantl.* 13:2890-2893, 1998). La acumulación de datos que relacionan los niveles elevados de homocisteína con la enfermedad cardiovascular ha motivado el inicio de ensayos clínicos multicentro de doble ciego, aleatorizados y controlados con placebo para demostrar la eficacia de la reducción del nivel plasmático de Hcy en la prevención o detención del progreso de las enfermedades vasculares (Diaz-Arrastia *et al.*, *Arch. Neurol.* 55:1407-1408, 1998). La determinación de los niveles plasmáticos de homocisteína debería ser una práctica clínica habitual.

20 Como factor de riesgo de enfermedad cardiovascular se ha recomendado en el contexto clínico la determinación de los niveles plasmáticos totales de Hcy (reducida, oxidada y unida a proteína) (Hornberger *et al.*, *American J. of Public Health* 88:61-67, 1998). Desde 1982 se han descrito varios métodos para determinar el nivel plasmático total de Hcy (Mansoor *et al.*, *Anal. BioChem.* 200:218-229, 1992; Steir *et al.*, *Arch. Intern. Med.* 158:1301-1306, 1998; Ueland *et al.*, *Clin. Chem.* 39: 1764-1779, 1993, y Ueland *et al.*, "Plasma homocysteine and cardiovascular disease", en Francis, R.B.Jr. editores, *Atherosclerotic Cardiovascular Disease, Hemostasis, and Endothelial Function*, New York, Marcel Dekker, páginas 183-236, 1992, y ver también Ueland *et al.*, "Plasma homocysteine and cardiovascular disease", en Francis, R.B.Jr. editores, *Atherosclerotic Cardiovascular Disease, Hemostasis, and Endothelial Function*, New York, Marcel Dekker, páginas 183-236, 1992). El ensayo de la Hcy total en plasma o suero se ve complicado por el hecho de que el 70% de la Hcy plasmática se encuentra unida a proteínas y 20% a 30% existe en forma de mezcla de disulfuros libres simétricos o mayoritariamente asimétricos. La Hcy reducida libre existe únicamente en cantidades residuales (Stehouwer *et al.*, *Kidney International* 55:308-314, 1999).

30 La mayoría de los métodos requiere sofisticadas técnicas cromatográficas, tales como HPLC, cromatografía de gases capilar o espectrometría de masas (CG/EM) para medir directa o indirectamente (por ejemplo mediante la conversión enzimática de Hcy en SAH (S-adenosilhomocisteína) por la SAH hidrolasa, seguido de la separación mediante HPLC o TLC) la Hcy. También se ha utilizado la conversión radioenzimática de Hcy en SAH marcado radioactivamente por la SAH hidrolasa previamente a la separación mediante TLC. En estos ensayos, la separación cromatográfica, que con frecuencia es laboriosa y complicada de realizar, es una etapa clave común a dichos métodos. Más particularmente, dichos métodos requieren equipos altamente especializados y sofisticados y especialistas en análisis bien preparados. La utilización de dichos equipos no está bien aceptada generalmente en la práctica rutinaria de laboratorio clínico.

40 También son conocidos los inmunoensayos de Hcy que utilizan un anticuerpo monoclonal contra SAH (Araki *et al.*, *J. Chromatog.* 422:43-52, 1987). Dichos ensayos se basan en la conversión de Hcy en SAH, que seguidamente es detectada por un anticuerpo monoclonal. Se ha desarrollado un anticuerpo monoclonal contra Hcy unido a albúmina para la determinación de la Hcy unida a albúmina (Stabler *et al.*, *J. Clin. Invest.* 81:466-474, 1988), que es la fracción principal de Hcy plasmático total. También se encuentran disponibles otros protocolos inmunológicos (ver, por ejemplo, las patentes US nº 5.631.127, nº 5.827.645, nº 5.958.717, nº 6.063.581 y nº 5.885.767). Aunque los inmunoensayos evitan una laboriosa etapa de separación cromatográfica y permiten la automatización, la producción de anticuerpos monoclonales resulta cara, tiende a ser impredecible y con frecuencia requiere anticuerpos secundarios e incluso terciarios para la detección. Recientemente se han publicado métodos enzimáticos para el ensayo de homocisteína (Matsuyama *et al.*, *Clinical Chemistry* 47:2155-2156, 2001; Tan *et al.*, *Clinical Chemistry* 49:1029-1030, 2003; patentes US nº 5.885.767, nº 5.998.191, nº 6.046.017, nº 6.174.696, nº 6.664.073 y nº 6.436.658); la totalidad describe ensayos de homocisteína basados en la evaluación de los productos de conversión de la homocisteína generados por enzimas conversores de homocisteína.

55 Otros métodos para determinar la homocisteína en una muestra se describen en las patentes US nº 6.686.172 y solicitud publicada de patente US nº 2002/0119507.

60 Además, la solicitud de patente WO nº 2005/008252 A2 da a conocer métodos y composiciones para el ensayo de homocisteína en una muestra. Con el método dado a conocer en D1, la homocisteína posiblemente presente en una muestra se convierte, por medio de un enzima conversor de Hcy y un cosustrato de Hcy, en un producto de conversión de Hcy y un producto de conversión de cosustrato de Hcy, en el que éste último (es decir, el producto de conversión de cosustrato de Hcy) se evalúa mediante la utilización de, por ejemplo, una SAH hidrolasa. Además, la solicitud de patente WO nº 2007/087541 A2 da a conocer ensayos para evaluar la actividad y/o atributos cinéticos de las metiltransferasas dependientes de S-adenosilmetionina (SAM). Su objetivo es determinar las funciones

biológicas que desempeña este enzima y evaluar la tasa de metilación y afinidad para diversos sustratos, y los métodos y kits dados a conocer en la misma resuelven estos problemas.

- 5 Existe una necesidad de un ensayo eficiente y preciso que pueda llevarse a cabo sin necesidad de personal altamente cualificado o complejos equipos de química analítica. La presente invención satisface esta necesidad y otras cuestiones relacionadas de la técnica.

BREVE DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCIÓN

- 10 En un aspecto la presente invención se refiere a un ensayo de homocisteína en una muestra según las reivindicaciones adjuntas. Según este ensayo, se pone en contacto una muestra que contiene o que se sospecha que contiene homocisteína (Hcy) con un cosustrato de Hcy y un enzima conversor de Hcy en una reacción de conversión de Hcy para formar un producto de conversión de Hcy y un producto de conversión de cosustrato de Hcy, y el producto de conversión de cosustrato de Hcy se evalúa para determinar la presencia, ausencia y/o concentración de Hcy en dicha muestra.

Según la invención, el producto de conversión de cosustrato de Hcy se evalúa sin separación cromatográfica.

- 20 Según la invención, el cosustrato de Hcy es la S-adenosilmetionina (SAM), el enzima conversor de Hcy es la homocisteína S-metiltransferasa dependiente de S-adenosilmetionina (SAM), el producto de conversión de Hcy es la metionina (Met) y el producto de conversión de cosustrato de Hcy es la S-adenosil-L-homocisteína (SAH) y la SAH se evalúa para determinar la presencia, ausencia y/o cantidad de la Hcy en la muestra.

- 25 En estos ensayos SAM puede utilizarse en cualquier forma adecuada. Puede añadirse a la muestra directamente. En algunas realizaciones, SAM se produce en una mezcla de ensayo *in situ*, mediante una reacción adicional entre ATP y metionina, catalizada por la SAM sintasa. En estas realizaciones, el ATP y la metionina y la SAM sintasa se incluyen en la mezcla de ensayo; pueden añadirse antes o durante el ensayo. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, en el caso de que se utilice SAM en un ensayo o kit, puede sustituirse alternativamente por ATP, metionina y SAM sintasa.

- 30 Según la invención, SAH es convertida en adenina y S-ribosil-homocisteína por una adenosilhomocisteína nucleosidasa (E.C. 3.2.2.9). La S-ribosil-homocisteína puede ser convertida en Hcy y ribosa por una S-ribosil-homocisteinasa (E.C. 3.2.1.148), lo que permite que Hcy reentre en la reacción inicial con SAM y homocisteína metiltransferasa (HMTasa), formando una reacción cíclica. La adenina formada en dicha reacción cíclica puede detectarse para medir el grado de la reacción, lo que se correlaciona con la concentración de Hcy presente en la muestra. Alternativamente, puede detectarse la ribosa formada en dicha etapa.

- 40 La adenina puede detectarse directamente, tal como mediante un anticuerpo específico de adenina, utilizando métodos tales como los comentados anteriormente. Alternativamente, la adenina puede detectarse mediante conversión en otros materiales que se detectan fácilmente mediante espectrofotometría. En algunas realizaciones, la adenina es convertida por un enzima adenina desaminasa (E.C. 3.5.4.2) en NH₃ (amonio) e hipoxantina. A continuación, puede detectarse amonio o hipoxantina utilizando métodos tales como un anticuerpo específico para la hipoxantina, o mediante seguimiento de una reacción enzimática que se conozca que consume eficientemente amonio libre. La hipoxantina también puede medirse mediante la utilización de una reacción de Trinder, para detectar el peróxido de hidrógeno formado a partir de hipoxantina en presencia de xantina oxidasa.

- 50 Una realización de dicho método utiliza la glutamato deshidrogenasa (GLDH) para convertir el amonio formado por la acción de la adenina desaminasa, conjuntamente con α -cetoglutarato añadido, en glutamato. Dicha reacción oxida concurrentemente NADH en NAD⁺ y puede realizarse un fácil seguimiento espectrofotométricamente mediante observación de la desaparición de NADH o la aparición de NAD⁺ utilizando métodos conocidos.

- 55 Otra realización de dicho método utiliza una adenina fosforibosiltransferasa (E.C. 2.4.2.7) y 5-fosfo- α -D-ribosa 1-difosfato (PRPP) en AMP y difosfato; a continuación puede realizarse un seguimiento del AMP o del difosfato utilizando métodos conocidos. Los métodos para la detección específica del AMP, tales como la unión de anticuerpos selectivos, son conocidos de la técnica. La presente invención se refiere a un método para someter a ensayo la homocisteína (Hcy) en una muestra según las reivindicaciones, comprendiendo el método: a) poner en contacto una muestra que contiene o que se sospecha que contiene Hcy, con un cosustrato de Hcy y un enzima conversor de Hcy en una reacción de conversión de Hcy para formar un producto de conversión de Hcy y un producto de conversión de cosustrato de Hcy, en el que el cosustrato de Hcy es la S-adenosilmetionina (SAM), el enzima conversor de Hcy es la homocisteína S-metiltransferasa dependiente de S-adenosilmetionina (SAM), el producto de conversión de Hcy es la metionina (Met) y el producto de conversión de cosustrato de Hcy es la S-adenosil-L-homocisteína (SAH), y b) evaluar la SAH para determinar la presencia, ausencia y/o cantidad de Hcy en la muestra, en la que la SAH se evalúa sin separación cromatográfica.

Preferentemente, la evaluación de SAH no implica una reacción enzimática generadora de H_2O_2 y la detección de H_2O_2 .

5 En algunas realizaciones, SAH es convertida por una adenosilhomocisteína nucleosidasa en adenina y S-ribosil-homocisteína, y se detecta la adenina. En ocasiones resulta conveniente detectar la adenina directamente, o detectar la adenina mediante la conversión de la misma en amonio e hipoxantina mediante la actividad de una adenina desaminasa. A continuación, se detecta el amonio mediante un método convencional, tal como mediante el seguimiento de la formación de NAD^+ o la desaparición de $NADH$ ya que el amonio y el α -cetoglutarato reaccionan formando glutamato en presencia de glutamato deshidrogenasa. En otros ejemplos se detecta hipoxantina directamente o mediante su conversión en otro producto de conversión tal como la xantina, que puede catalizarse con un enzima que consume hipoxantina, tal como xantina oxidasa. En otros ejemplos se detecta adenina a partir de su conversión en AMP y difosfato, catalizada por adenina fosforibosiltransferasa en presencia de 5-fosfo- α -D-ribose 1-difosfato (PRPP) añadido.

15 Los métodos de la invención pueden utilizarse para someter a ensayo la homocisteína en cualquier muestra, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, un líquido corporal o un tejido biológico. El líquido corporal puede seleccionarse de entre el grupo que consiste de orina, sangre, plasma, suero, saliva, semen, heces, esputo, líquido cerebroespinal, lágrimas, moco y líquido amniótico. En algunas realizaciones el líquido corporal es sangre. En algunas realizaciones la muestra de sangre se separa adicionalmente en una fracción de plasma o suero.

20 En algunas realizaciones, previamente o concurrentemente al contacto entre la muestra y el cosustrato de Hcy con el enzima conversor de Hcy, la Hcy oxidasa o conjugada en la muestra se convierte en Hcy reducida. En algunas realizaciones la muestra se somete a tratamiento con ditioneitol, hidrocloreto de tris(2-carboxietil)-fosfina (TCEP) u otro agente reductor, en cantidades apropiadas para producir homocisteína libre en la muestra.

25 El método de la invención puede comprender además una etapa de eliminación del agente reductor utilizado para convertir Hcy oxidado o conjugado en Hcy reducido previamente o concurrentemente al contacto de la muestra con el cosustrato de Hcy y el enzima conversor de Hcy. Por ejemplo, el agente reductor puede eliminarse mediante adición de N-etilmaleimida u otros compuestos tiorreactivos.

30 Todavía otro aspecto de la presente invención se refiere a un kit para determinar la presencia o la concentración de homocisteína en una muestra según las reivindicaciones adjuntas.

35 Según la invención el kit comprende: a) una homocisteína S-metiltransferasa dependiente de S-adenosilmetionina (SAM), b) S-adenosilmetionina (SAM) o ATP, metionina y SAM sintasa, y c) un reactivo para evaluar SAH, en el que el kit no comprende un enzima o un reactivo para generar H_2O_2 ni un reactivo para detectar H_2O_2 , en el que el reactivo para evaluar SAH es la SAH nucleosidasa, o un reactivo para la detección de la adenina formada por la acción de la SAH nucleosidasa sobre SAH. Alternativamente, puede ser un reactivo para la conversión de adenina en uno o más productos de conversión de la adenina, tal como amonio e hipoxantina, o AMP y difosfato: entre los reactivos adecuados para dichas conversiones se incluyen la adenina desaminasa y la adenina fosforibosiltransferasa.

40 En algunas realizaciones, el kit de la invención comprende además un agente reductor tal como ditioneitol (DTT) o TCEP.

45 El kit de la invención puede presentarse en cualquier envase adecuado y puede incluir además instrucciones para la puesta en práctica de los métodos descritos en la presente memoria. El kit puede incluir opcionalmente componentes adicionales tales como tampones.

50 Los ensayos descritos en la presente memoria pueden utilizarse para cualesquiera fines adecuados, por ejemplo pronósticos, diagnósticos, de cribado de fármacos o con fines de seguimiento de un tratamiento. Los ensayos pueden automatizarse fácilmente. Además, los ensayos pueden adaptarse para la utilización en sistemas de atención de proximidad al paciente y en kits de ensayo domésticos. Por ejemplo, los sistemas de proximidad de análisis sanguíneos pueden adaptarse para medir los niveles de homocisteína utilizando los métodos proporcionados en la presente memoria. Los kits de ensayo domésticos también pueden adaptarse para la utilización con los métodos proporcionados en la presente memoria.

60 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 ilustra un método de ensayo ejemplar de la homocisteína. Hcy: L-homocisteína; SAM: S-adenosilmetionina; HMTasa: homocisteína S-metiltransferasa dependiente de SAM, y SAHasa: S-adenosil-L-homocisteína hidrolasa.

La figura 2 ilustra una curva de respuesta a dosis séricas de homocisteína, obtenida en el experimento descrito en el Ejemplo 1.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Para mayor claridad de exposición, y sin carácter limitativo, la descripción detallada de la invención se ha dividido en las subsecciones siguientes.

A. Definiciones

A menos que se indique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria presentan los mismos significados entendidos comúnmente por el experto ordinario en la materia a la que se refiere la presente invención. Todas las patentes, solicitudes, solicitudes publicadas y otras publicaciones a las que se hace referencia en la presente memoria se incorporan como referencia en su totalidad. En el caso de que una definición proporcionada en la presente sección sea contraria o inconsistente con una definición proporcionada en las patentes, solicitudes, solicitudes publicadas y otras publicaciones que se incorporan como referencia en la presente memoria, la definición proporcionada en la presente sección prevalecerá sobre la definición que se incorpora como referencia en la presente memoria.

Tal como se utiliza en la presente memoria, "un" o "una" se refiere a "por lo menos uno o una" o a "uno o una o más".

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "homocisteína (Hcy)" se refiere a un compuesto con la fórmula molecular siguiente: $\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$. Biológicamente, Hcy se produce mediante desmetilación de la metionina y es un intermediario en la biosíntesis de la cisteína a partir de metionina. El término "Hcy" comprende Hcy libre (en la forma reducida) y Hcy conjugada (en la forma oxidada). Hcy puede conjugarse con proteínas, péptidos, consigo mismo o con otros tioles mediante enlace disulfuro.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "reacción de conversión de homocisteína (Hcy)" se refiere a una reacción en la que un compuesto reacciona con una molécula de Hcy durante la que un grupo químico (por ejemplo un grupo metilo) se transfiere desde el compuesto a la molécula de Hcy, formando dos productos de reacción. El compuesto que reacciona con la molécula de Hcy y que proporciona el grupo químico se denomina "cosustrato de homocisteína (Hcy)". El enzima que cataliza la reacción se denomina "enzima conversor de homocisteína (Hcy)". El producto de reacción que contiene la totalidad o parte de la molécula original de Hcy se denomina "producto de conversión de homocisteína (Hcy)". El producto de reacción que no contiene ningún elemento de la molécula original de Hcy se denomina "producto de conversión de cosustrato de Hcy".

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "homocisteína S-metiltransferasa dependiente de SAM" se refiere a un enzima que cataliza la formación de la metionina y la S-adenosil-L-homocisteína (SAH) a partir de homocisteína y S-adenosilmetionina (SAM). Pretende comprender la homocisteína S-metiltransferasa dependiente de SAM con sustituciones conservadoras de aminoácidos que no alteran sustancialmente su actividad.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "SAH hidrolasa" se refiere a un enzima eucariótico ubicuo que también se encuentra en algunos procariontes, que cataliza la hidrólisis de SAH en adenosina (Ado) y Hcy. La SAH hidrolasa también cataliza la formación de SAH a partir de Ado y Hcy. El coenzima de la SAH hidrolasa es NAD^+/NADH . La SAH hidrolasa puede presentar varias actividades catalíticas. En la dirección hidrolítica, la primera etapa implica la oxidación del grupo 3'-hidroxilo de SAH (actividad 3'-oxidante) por NAD^+ unido a enzima (E- NAD^+), seguido de la eliminación β de L-Hcy, proporcionando 3'-ceto-4',5'-dihidro-5'-desoxi-Ado. La adición de Michael de agua en la posición 5' en dicho intermediario fuertemente unido (actividad 5'-hidrolítica) proporciona 3'-ceto-Ado, que seguidamente es reducido por NADH unido a enzima (E-NADH) formando Ado (actividad 3'-reductora). Pretende comprender la SAH hidrolasa con sustituciones conservadoras de aminoácidos que no alteran sustancialmente su actividad.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "evaluar" pretende incluir la determinación cuantitativa y cualitativa en el sentido de obtención de un valor absoluto de la cantidad o concentración del analito, por ejemplo homocisteína o Ado, presente en la muestra, y también de obtención de un índice, proporción, porcentaje, valor visual o de otro tipo, indicativo del nivel de analito en la muestra. La evaluación puede ser directa o indirecta y la especie química detectada de hecho evidentemente no es necesariamente el analito mismo sino que puede ser, por ejemplo, un derivado de la misma o alguna otra sustancia.

Tal como se utiliza en la presente memoria, "adenosina desaminasa" se refiere a un enzima que cataliza la

desaminación de la adenosina para formar inosina. Pretende comprender la adenosina desaminasa con sustituciones conservadoras de aminoácidos que no alteran sustancialmente su actividad.

5 Tal como se utiliza en la presente memoria, "adenosina quinasa" se refiere a un enzima que cataliza la formación de adenosín-5'-monofosfato y ADP a partir de adenosina y ATP. Pretende comprender la adenosina quinasa con sustituciones conservadoras de aminoácidos que no alteran sustancialmente su actividad.

10 Tal como se utiliza en la presente memoria, "adenosina desaminasa" se refiere a un enzima que cataliza la desaminación de la adenina para formar hipoxantina y amonio. Pretende comprender la adenosina desaminasa con sustituciones conservadoras de aminoácidos que no alteran sustancialmente su actividad.

15 Tal como se utiliza en la presente memoria, "adenina fosforibosiltransferasa" se refiere a un enzima que cataliza la reacción de la adenina con 5-fosfo- α -D-ribosa 1-difosfato para formar AMP y difosfato. Pretende comprender adenina fosforibosiltransferasas con sustituciones conservadoras de aminoácidos que no alteran sustancialmente su actividad.

20 Tal como se utiliza en la presente memoria, "adenosilhomocisteína" o "SAH nucleosidasa" se refiere a un enzima que cataliza la conversión de SAH en adenina y S-ribosil-homocisteína. Pretende comprender homocisteína nucleosidasa con sustituciones conservadoras de aminoácidos que no alteran sustancialmente su actividad.

Tal como se utiliza en la presente memoria, "S-ribosil-homocisteinasa" se refiere a un enzima que cataliza la conversión de S-ribosil-homocisteína en homocisteína y ribosa. Pretende comprender S-ribosil-homocisteinasa con sustituciones conservadoras de aminoácidos que no alteran sustancialmente su actividad.

25 Tal como se utiliza en la presente memoria, "suero" se refiere a la parte líquida de la sangre obtenida tras la eliminación del coágulo de fibrina y las células sanguíneas, diferente del plasma en la sangre circulante.

30 Tal como se utiliza en la presente memoria, "plasma" se refiere a la parte líquida no celular de la sangre, diferenciada del suero obtenido tras la coagulación.

Tal como se utiliza en la presente memoria, "producción por medios recombinantes" se refiere a métodos de producción que utilizan métodos de ácidos nucleicos recombinantes que se basan en métodos bien conocidos de la biología molecular para expresar proteínas codificadas por ácidos nucleicos clonados.

35 Tal como se utiliza en la presente memoria, "líquido" se refiere a cualquier composición que puede fluir. De esta manera, los líquidos comprenden composiciones que se encuentran en forma de semisólidos, pastas, soluciones, mezclas acuosas, geles, lociones, cremas y otras composiciones similares.

40 Tal como se utiliza en la presente memoria, "muestra" se refiere a cualquier cosa que puede contener un analito para el que se desee un ensayo de analito. La muestra puede ser una muestra biológica, tal como un líquido biológico o un tejido biológico. Entre los ejemplos de líquidos biológicos se incluyen orina, sangre, plasma, suero, saliva, semen, heces, esputo, líquido cerebrospinal, lágrimas, moco, líquido amniótico o similares. Los tejidos biológicos son agregados de células, habitualmente de un tipo particular conjuntamente con su sustancia intercelular que forma uno de los materiales estructurales de una estructura humana, animal, vegetal, bacteriana, fúngica o vírica, incluyendo tejidos conectivos, epiteliales, musculares y nerviosos. Entre los ejemplos de tejidos biológicos se incluyen también órganos, tumores, nódulos linfáticos, arterias y una o más células individuales.

50 Tal como se utiliza en la presente memoria, "enfermedad o trastorno" se refiere a una condición patológica en un organismo que resulta de, por ejemplo, la infección o un defecto genético, y caracterizado por síntomas identificables.

55 Tal como se utiliza en la presente memoria, "anticuerpo" incluye no sólo anticuerpos policlonales o monoclonales intactos, sino también fragmentos de los mismos (tales como Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv), Fv de cadena sencilla (scFv), un diacuerpo, un anticuerpo multiespecífico formado a partir de fragmentos de anticuerpo, mutantes de los mismos, proteínas de fusión que comprenden una parte anticuerpo, y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende un sitio de reconocimiento de antígeno de la especificidad requerida. Un anticuerpo incluye un anticuerpo de cualquier clase, tal como IgG, IgA o IgM (o subclase de los mismos) y el anticuerpo no debe ser necesariamente de ninguna clase en particular.

60 B. Métodos para someter a ensayo la homocisteína

La invención proporciona un método para someter a ensayo la homocisteína (Hcy) en una muestra, comprendiendo el método: a) poner en contacto una muestra que contiene o que se sospecha que contiene Hcy con un cosustrato

de Hcy y un enzima conversor de Hcy en una reacción de conversión de Hcy para formar un producto de conversión de Hcy y un producto de conversión de cosustrato de Hcy, y b) evaluar dicho producto de conversión de cosustrato de Hcy para determinar la presencia, ausencia y/o concentración de Hcy en dicha muestra.

5 Según la invención, el producto de conversión de cosustrato de Hcy se evalúa sin separación cromatográfica.

Según la invención, el enzima conversor de Hcy es una homocisteína S-metiltransferasa dependiente de S-adenosilmetionina (SAM). En el caso de que se utilice una homocisteína S-metiltransferasa dependiente de SAMP como el enzima conversor de Hcy, el cosustrato de Hcy es la S-adenosilmetionina (SAM), el producto de conversión de Hcy es la metionina (Met) y el producto de conversión de cosustrato de Hcy es la S-adenosil-L-homocisteína (SAH) y la SAH se evalúa para determinar la presencia, ausencia y/o cantidad de la Hcy en la muestra según las reivindicaciones adjuntas.

15 Puede utilizarse cualquier homocisteína S-metiltransferasa dependiente de S-adenosilmetionina (SAM) que transfiera un grupo metilo de SAM a Hcy. Por ejemplo, puede utilizarse la S-adenosilmetionina:L-homocisteína S-metiltransferasa descrita por Shapiro y Stanley K (Methods Enzymol. 17 parte B, Sulfur Amino acids, páginas 400 a 405, 1971) y Shapiro S.K. (Biochim. Biophys. Acta 29:405-9, 1958). También pueden utilizarse la homocisteína S-metiltransferasa (E.C. 2.1.1.10) codificada por el ácido nucleico que presenta el nº de acceso de GenBank AF297394 siguiente y la secuencia de aminoácidos que presenta los números de acceso de GenBank siguientes: AAG10301, CAA16035, NP_856132, NP_302039, CAD97346, T51939, T51941 y CAC30428. Preferentemente puede utilizarse la homocisteína S-metiltransferasa dependiente de SAM procedente de *Escherichia coli* (Thanbichler *et al.*, J. Bacteriol., 181(2):662-5, 1999) o de *S. cerevisiae* (Shapiro *et al.*, J. Biol. Chem., 239(5):1551-6, 1964, y Thomas *et al.*, J Biol. Chem., 275(52):40718-24, 2000).

25 En estos ensayos SAM puede utilizarse en cualquier forma adecuada. Puede añadirse a la muestra directamente. En algunas realizaciones, SAM se produce en una mezcla de ensayo in situ, mediante una reacción adicional entre ATP y metionina, catalizada por la SAM sintasa. En estas realizaciones, el ATP y la metionina y la SAM sintasa se incluyen en la mezcla de ensayo; pueden añadirse antes o durante el ensayo. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, en el caso de que se utilice SAM en un ensayo o kit, puede sustituirse alternativamente por ATP, metionina y SAM sintasa.

Los métodos descritos en la presente memoria pueden utilizarse para someter a ensayo cualquier muestra, por ejemplo un líquido corporal o un tejido biológico. Entre los ejemplos de líquidos biológicos se incluyen orina, sangre, plasma, suero, saliva, semen, heces, esputo, líquido cerebroespinal, lágrimas, moco y líquido amniótico. Preferentemente el líquido corporal que debe someterse a ensayo es sangre. La muestra de sangre puede someterse a ensayo directamente o puede tratarse antes de someterla a ensayo. Por ejemplo, la muestra de sangre puede separarse adicionalmente en una fracción de plasma o suero.

40 Previamente o concurrentemente al contacto entre la muestra y el cosustrato de Hcy con el enzima conversor de Hcy, la Hcy oxidada o conjugada en la muestra puede convertirse en Hcy reducida. En el plasma o en la orina pueden encontrarse proporciones significativas de homocisteína unidas mediante enlace disulfuro a proteínas circulantes, tales como la albúmina, y la homocisteína también puede encontrarse presente en forma de otros derivados disulfuro (generalmente conjugados de homocisteína--cisteína). Por lo tanto, con el fin de obtener una estimación de la homocisteína total presente en la muestra puede resultar deseable tratar la muestra con un agente reductor para cortar los enlaces disulfuro y liberar la homocisteína libre.

Puede utilizarse cualquier agente reductor adecuado. Los disulfuros son reducidos fácil y específicamente por los tioles (por ejemplo tri-n-butilfosfina (TBP), ditiotreitil (DTT), ditioneiritil (DTE), 2-mercaptoetanol, cisteína-tioglicolato, ácido tioglicólico, tris(2-carboxietil)fosfina, metales libres, glutatión y compuestos similares). La reducción química directa puede conseguirse utilizando borohidruros (por ejemplo el borohidruro sódico) o amalgamas (por ejemplo amalgama sódica), o pueden utilizarse reactivos más especializados tales como fosfinas o fosforotioatos. Se proporciona una revisión de la reducción de los disulfuros en Jocelyn, Methods of Enzymology 143: 243-256, 1987, en la que se lista un amplio abanico de agentes reductores adecuados. El agente reductor también puede ser hidrocloreuro de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP). Preferentemente el ditiotreitil o TCEP se proporciona a una concentración de hasta aproximadamente 30 mM.

El método de la invención puede comprender además una etapa de eliminación del agente reductor utilizado para convertir Hcy oxidado o conjugado en Hcy reducido previamente o concurrentemente al contacto de la muestra con el cosustrato de Hcy y el enzima conversor de Hcy. Por ejemplo, el agente reductor puede eliminarse mediante adición de N-etilmaleimida u otros compuestos tiorreactivos.

C. Kits para someter a ensayo la homocisteína

5 En otro aspecto la presente invención se refiere a un kit para someter a ensayo la Hcy en una muestra, comprendiendo el kit: a) un enzima conversor de Hcy, b) un cosustrato de Hcy, y c) un reactivo para evaluar el producto de conversión de cosustrato de Hcy según las reivindicaciones adjuntas. En cada realización, el kit puede empaquetarse y puede comprender además instrucciones para utilizar los elementos en el kit para la puesta en práctica de un método de la invención.

10 Según la invención el kit comprende: a) una homocisteína S-metiltransferasa dependiente de S-adenosilmetionina (SAM), b) S-adenosilmetionina (SAM) o ATP, metionina y una SAM sintasa, c) una SAH nucleosidasa, y d) un reactivo para evaluar la adenina. El kit puede comprender además S-ribosil homocisteinasa.

15 Un reactivo para evaluar la adenina puede ser adenina desaminasa o adenina fosforibosiltransferasa o 5-fosfo- α -D-ribosa 1-difosfato, o xantina oxidasa, o glutamato deshidrogenasa, o un reactivo para detectar el amonio formado a partir de adenina, pudiendo ser el reactivo α -cetoglutarato y/o glutamato deshidrogenasa y/o NADH.

20 En todavía otro aspecto, la invención se refiere a un kit para someter a ensayo Hcy en una muestra, comprendiendo el kit: a) una homocisteína S-metiltransferasa dependiente de S-adenosilmetionina (SAM), b) S-adenosilmetionina (SAM), y c) un reactivo para evaluar la adenina, en el que el kit no comprende un enzima o un reactivo para generar H_2O_2 y un reactivo para detectar H_2O_2 .

El kit descrito en la presente memoria puede comprender además un agente reductor, por ejemplo ditiotreitolo o hidrocloreuro de tris(2-carboxietil)-fosfina (TCEP).

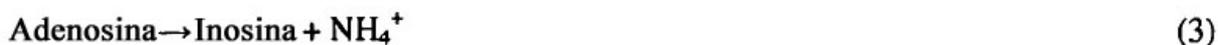
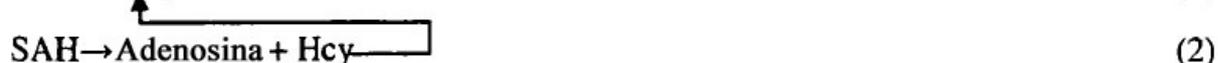
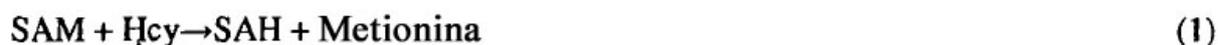
25 Los kits de la invención puede presentarse en cualquier envase adecuado. Por ejemplo, los envases comentados en la presente memoria en relación a los sistemas diagnósticos son los utilizados habitualmente en sistemas diagnósticos. Entre dichos envases se incluyen el vidrio y el plástico, tal como polietileno, polipropileno y policarbonato, botellas y viales, sobre laminados con plástico o metalizados con aluminio, y similares. Los envases pueden incluir además recipientes apropiados para la utilización en autoanalizadores. Los envases típicamente incluyen instrucciones para la realización de los ensayos descritos en la presente memoria.

D. Ejemplos

35 Los ejemplos siguientes se incluyen únicamente con fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la invención.

Ejemplo 1. Acoplamiento de GLDH-NADH para detectar el NH_4^+ generado por el ciclado enzimático utilizando SAM purificado

40 En el presente estudio se utilizan las reacciones acopladas de ciclado enzimático siguientes:



45 En el esquema (1), la reacción está catalizada por una homocisteína S-metiltransferasa dependiente de SAM. En el esquema (2), la reacción está catalizada por una SAH hidrolasa. En el esquema (3), la reacción está catalizada por una adenosina desaminasa. En el esquema (4), la reacción está catalizada por una L-glutamato deshidrogenasa. El $NAD(P)^+$ se detecta espectrofotométricamente a 340 nm. En las Tablas 1 y 2 a continuación se proporciona una descripción más detallada de los reactivos utilizados en el presente estudio.

50

Tabla 1. Composiciones de reactivo 1

Reactivo químico 1	Concentración
Fosfato potásico	15 mM
NAD(P)H	5 mM
GLDH	2 KU/L
BSA	1,2 g/l
Adenosina desaminasa	50 KU/l
Homocisteína metiltransferasa	10 KU/l
DTT	0,2 mM
α-cetoglutarato	30 mM
SAM	3 mM

Tabla 2. Composiciones de reactivo 2

Reactivo químico 2	Concentración
Tris-HCl	15 mM
BSA	1,2 g/L
SAH hidrolasa	10 KU/l

5 En el presente estudio, se mezclaron 180 ml de reactivo 1 con 20 ml de una muestra de suero o plasma para el análisis y la mezcla se incubó a 37°C durante 5 minutos. A continuación, se añadieron sesenta (60) ml de reactivo 2 a la mezcla y se incubó a 37°C durante 5 minutos adicionales. Se midió el cambio de la absorbancia a 340 nm durante 2 a 5 minutos tras la adición del reactivo 2. En la figura 2 se muestra un resultado de ensayo ejemplar.

10 Ejemplo 2. Acoplamiento de GLDH-NADH para detectar el NH₄⁺ generado por el ciclado enzimático utilizando SAM convertido concurrentemente por la SAM sintasa a partir de ATP y metionina

En el presente estudio se utilizaron las reacciones acopladas de ciclado enzimático siguientes:



15 En el esquema (1), la reacción está catalizada por una SAM sintasa. En el esquema (2), la reacción está catalizada por una homocisteína S-metiltransferasa dependiente de SAM. En el esquema (3), la reacción está catalizada por una SAH hidrolasa. En el esquema (4), la reacción está catalizada por una adenosina desaminasa. En el esquema (5), la reacción está catalizada por una L-glutamato deshidrogenasa. El NAD(P)⁺ se detecta espectrofotométricamente a 340 nm. En las Tablas 3 y 2 a continuación se proporciona una descripción más
20 detallada de los reactivos utilizados en el presente estudio.

Tabla 3. Composiciones de reactivo 3

Reactivo químico 3	Concentración
Tampón de Good	15 mM
NAD(P)H	5 mM
GLDH	2 KU/l
BSA	1,2 g/l
TCEP	0,2 mM
α-cetoglutarato	30 mM
ATP	10 mM

Metionina	5 mM
SAM sintasa	10 KU/l
Adenosina desaminasa	50 KU/l
Homocisteína metiltransferasa	20 KU/l
ZnCl ₂	10 mM

Tabla 4. Composiciones de reactivo 4

Reactivo químico 4	Concentración
Fosfato sódico	15 mM
BSA	1,2 g/l
SAH hidrolasa	10 KU/l

5 En el presente estudio, se mezclaron 270 ml de reactivo con 20 ml de una muestra de suero o plasma para el análisis y la mezcla se incubó a 37°C durante 5 minutos. A continuación, se añadieron sesenta (60) ml de reactivo 2 a la mezcla y se incubó a 37°C durante 5 minutos adicionales. Se midió el cambio de la absorbancia a 340 nm durante 2 a 5 minutos tras la adición del reactivo 2.

10 Ejemplo 3. Acoplamiento adenosina quinasa--piruvato quinasa--lactato deshidrogenasa--NADH para detectar la adenosina generada por el ciclado enzimático

En el presente estudio se utilizaron las reacciones acopladas de ciclado enzimático siguientes:



15 En el esquema (1), la reacción está catalizada por una homocisteína S-metiltransferasa dependiente de SAM. En el esquema (2), la reacción está catalizada por una SAH hidrolasa. En el esquema (3), la reacción está catalizada por una adenosina quinasa. En el esquema (4), la reacción está catalizada por una piruvato quinasa. En el esquema (5), la reacción está catalizada por una lactato deshidrogenasa. El NAD(P)⁺ se detecta espectrofotométricamente a 340 nm. En las Tablas 5 y 6 a continuación se proporciona una descripción más detallada de los reactivos utilizados en el presente estudio.

20

Tabla 5. Composiciones de reactivo 5

Reactivo químico 5	Concentración
Fosfato potásico	15 mM
NADH	5 mM
GLDH	2 KU/L
BSA	1,2 g/L
Adenosina quinasa	10 KU/l
Homocisteína metiltransferasa	10 KU/l
DTT	0,2 mM
MgCl ₂	15 mM
Piruvato quinasa	5 KU/l
Lactato deshidrogenasa	25 KU/l
SAM	3 mM

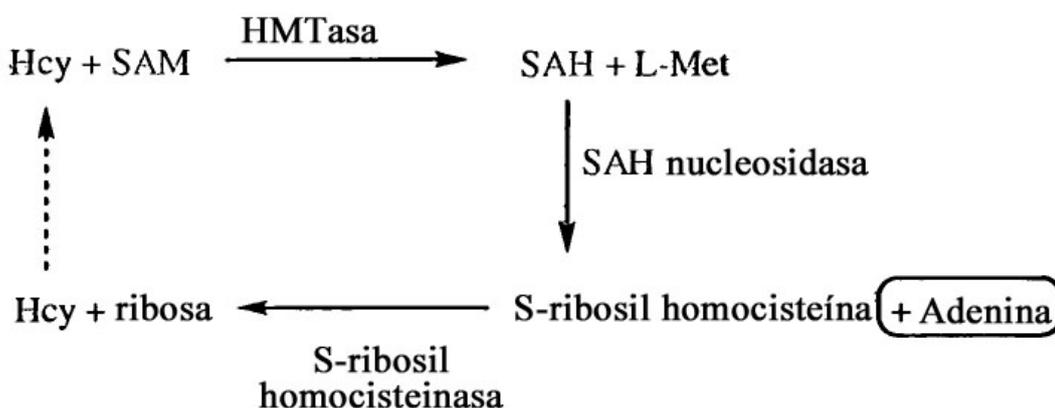
Tabla 6. Composiciones de reactivo 6

Reactivo químico 6	Concentración
Tris-HCl	15 mM
BSA	1,2 g/L
SAH hidrolasa	10 KU/l

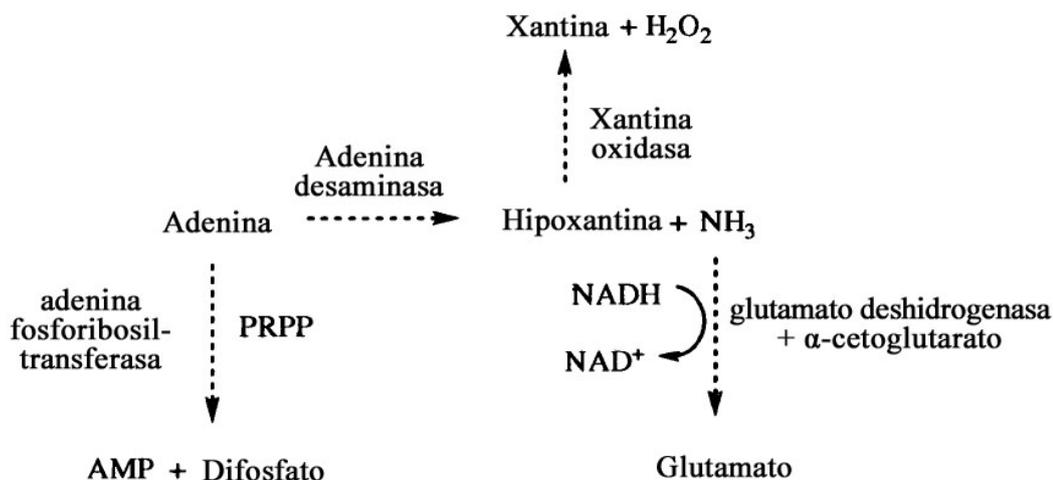
En el presente estudio se mezclaron 180 ml de reactivo con 20 ml de una muestra de suero o plasma para el análisis y la mezcla se incubó a 37°C durante 5 minutos. A continuación, se añadieron sesenta (60) ml de reactivo 2 a la mezcla y se incubó a 37°C durante 5 minutos adicionales. Se midió el cambio de la absorbancia a 340 nm durante 2 a 5 minutos tras la adición del reactivo 2.

Ejemplo 4. Utilización de SAH nucleosidasa para convertir SAH en adenina y S-ribosil-homocisteína y ciclado de S-ribosil-homocisteína utilizando S-ribosil-homocisteinasa

En el presente método se utilizó el sistema de ciclado siguiente:



El presente método convierte SAM y Hcy en SAH y L-metionina y utiliza la SAH nucleosidasa y la S-ribosil-homocisteinasa para ciclar SAH de nuevo en Hcy para completar el ciclo. Forma L-metionina como producto de conversión de la homocisteína. El producto de conversión de cosustrato SAH seguidamente se detecta a partir de su conversión en S-ribosil-homocisteína y adenina: la S-ribosil-homocisteína se utiliza en el ensayo de ciclado y la adenina formada puede detectarse de una diversidad de maneras. El Esquema siguiente ilustra algunas de las opciones de evaluación de la adenina.



La adenina se detecta a partir de la conversión en AMP y difosfato, en la que el AMP o el difosfato se evalúan mediante métodos conocidos de la técnica tales como la utilización de anticuerpos selectivos para el AMP.

- Alternativamente, la adenina es convertida por la adenina desaminasa en hipoxantina y amonio, detectando la hipoxantina mediante la evaluación del peróxido de hidrógeno formado al ser convertida la hipoxantina en xantina por la xantina oxidasa. Alternativamente, se detecta el amonio mediante seguimiento del consumo de NADH, al reaccionar el amonio con un aceptor tal como el α -cetogluturato en presencia de un enzima de aminación tal como glutamato deshidrogenasa. Estos últimos métodos permiten al usuario evaluar la adenina formada en el presente ensayo de ciclado mediante métodos espectrofotométricos que se encuentran bien establecidos en la técnica y que han sido convenientemente automatizados.
- 5
- 10 Los ejemplos anteriormente proporcionados se incluyen únicamente con fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la invención. Resultan posibles muchas variaciones respecto a los descritos anteriormente. Debido a que las modificaciones y variaciones de los ejemplos descritos anteriormente resultarán evidentes para el experto en la materia, se pretende que la presente invención se encuentre limitada únicamente por el alcance según las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

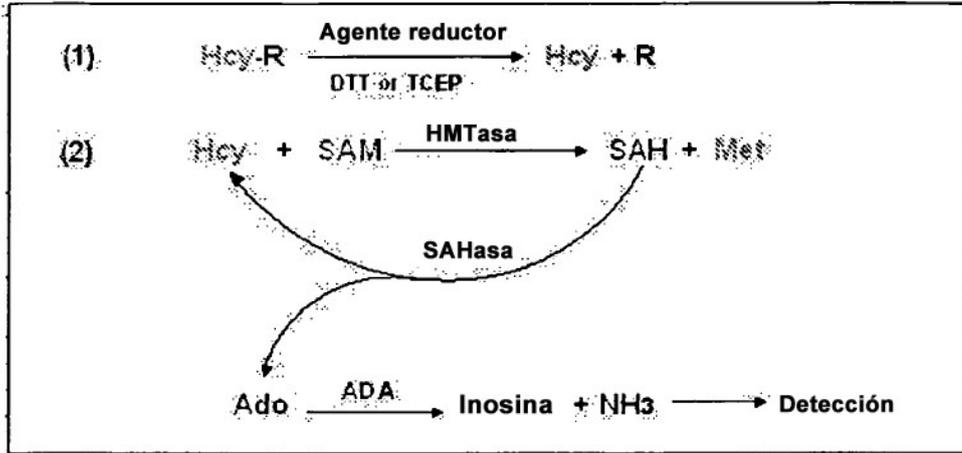
- 1.Método para someter a ensayo la homocisteína (Hcy) en una muestra sin separación cromatográfica, comprendiendo el método:
- 5 a) poner en contacto una muestra que contiene o que se sospecha que contiene Hcy, con un cosustrato de Hcy un enzima conversor de Hcy en una reacción de conversión de Hcy para formar un producto de conversión de Hcy y un producto de conversión de cosustrato de Hcy, en el que el cosustrato de Hcy es la S-adenosilmetionina (SAM), el enzima conversor de Hcy es la homocisteína S-metiltransferasa dependiente de S-adenosilmetionina (SAM), el producto de conversión de Hcy es la metionina (Met) y el producto de conversión de cosustrato de Hcy
- 10 es la S-adenosil-L-homocisteína (SAH),
 b) poner en contacto la mezcla con una adenosilhomocisteína nucleosidasa para convertir SAH en adenina y S-ribosil-homocisteína,
 c) poner en contacto la mezcla con una S-ribosil-homocisteinasa para ciclar la S-ribosil-homocisteína en homocisteína, y
- 15 d) evaluar la cantidad de adenina en la muestra,
- en la que la cantidad de Hcy en la muestra se determina a partir de la cantidad de adenina.
- 2.Método según la reivindicación 1, en el que la adenina es convertida por la adenina desaminasa en amonio e hipoxantina, y se evalúa por lo menos uno de entre amonio e hipoxantina.
- 20 3.Método según la reivindicación 2, en el que la cantidad de amonio formado se mide mediante evaluación de la aparición de NAD^+ o la desaparición de NADH al ser convertido el amonio en glutamato por la acción de la glutamato deshidrogenasa.
- 25 4.Método según la reivindicación 2, en el que se evalúa la hipoxantina mediante seguimiento de su conversión en xantina, estando catalizada la conversión por la xantina oxidasa.
- 5.Método según la reivindicación 1, en el que la adenina se evalúa mediante seguimiento de la formación de AMP y difosfato o ambos, catalizada por la acción de la adenina fosforibosiltransferasa actuando sobre la adenina y el 5-fosfo- α -D-ribosa 1-difosfato (PRPP).
- 30 6.Método según la reivindicación 1, en el que la muestra es un líquido corporal o un tejido biológico.
- 35 7.Método según la reivindicación 6, en el que el líquido corporal es sangre.
- 8.Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la SAM es producida a partir de ATP y metionina por una SAM sintasa.
- 40 9.Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que previamente o concurrentemente al contacto entre la muestra y el cosustrato de Hcy con el enzima conversor de Hcy, la Hcy oxidasa o conjugada en la muestra se convierte en Hcy reducida.
- 45 10.Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que, en la etapa b) la mezcla se pone en contacto con una S-adenosilhomocisteína nucleosidasa y con una S-ribosil-homocisteinasa para generar Hcy, que es ciclada en la reacción de conversión de Hcy por la homocisteína S-metiltransferasa dependiente de SAM para formar un sistema de reacción de ciclado enzimático basado en cosustrato de Hcy, y en el que tras dicha etapa b) sigue la etapa c), en la que se evalúa la adenina formada con el fin de evaluar la presencia o cantidad de Hcy en la muestra.
- 50 11.Método según la reivindicación 10, en el que la evaluación de la adenina no implica una reacción enzimática generadora de H_2O_2 y la detección de H_2O_2 .
- 12.Kit para someter a ensayo Hcy en una muestra, comprendiendo el kit:
- 55 a) una homocisteína S-metiltransferasa dependiente de S-adenosilmetionina (SAM),
 b) S-adenosilmetionina (SAM) o ATP, metionina y una SAM sintasa,
 c) una SAH nucleosidasa, y
 d) un reactivo para evaluar la adenina.
- 60 13.Kit según la reivindicación 12, en el que el reactivo para evaluar la adenina es una adenina desaminasa o una adenina fosforibosiltransferasa.
- 14.Kit según la reivindicación 12, que comprende además S-ribosil-homocisteinasa.

15. Kit para someter a ensayo Hcy en una muestra, comprendiendo el kit:
- a) una homocisteína S-metiltransferasa dependiente de S-adenosilmetionina (SAM),
 - b) S-adenosilmetionina (SAM), o ATP, metionina y una SAM sintasa, y
 - c) un reactivo para evaluar la adenina,

5

en el que el kit no comprende un enzima o un reactivo para generar H_2O_2 y un reactivo para detectar H_2O_2 .

Figura 1. Ensayo de ciclado enzimático basado en producto de conversión de cosustrato de la homocisteína



Hcy-R: homocisteína oxidasa, R: proteína, Hcy, Cys u otros compuestos tio, Hcy: homocisteína reducida (*sustrato*)

SAM: S-adenosil-L-metionina (cosustrato); HMTasa: homocisteína-metionina metiltransferasa

SAH: S-adenosil-L-homocisteína (producto de conversión de cosustrato);

SAHasa: S-adenosil-L-homocisteína hidrolasa; ADA: adenosina desaminasa

Figura 2

