

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 535 160**

51 Int. Cl.:

**C01B 25/42** (2006.01)

**C12Q 1/66** (2006.01)

**G01N 21/76** (2006.01)

**G01N 33/84** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.11.2007 E 07819639 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.01.2015 EP 2102103**

54 Título: **Procedimiento para detectar pirofosfato con detección de bioluminiscencia**

30 Prioridad:

**20.11.2006 DE 102006054562**

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

**05.05.2015**

73 Titular/es:

**BAYER INTELLECTUAL PROPERTY GMBH  
(100.0%)  
Alfred-Nobel-Strasse 10  
40789 Monheim , DE**

72 Inventor/es:

**BURKHARDT, NILS y  
HEITMEIER, STEFAN**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 535 160 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

Procedimiento para detectar pirofosfato con detección de bioluminiscencia

5 La invención se refiere a procedimientos para detectar pirofosfato con detección de bioluminiscencia. Además, se describen procedimientos para medir reacciones químicas, particularmente catalizadas por enzima, en las que se produce o se consume pirofosfato. Dichas reacciones se catalizan, por ejemplo, por guanilato ciclasas, adenilato ciclasas, ADN o ARN polimerasas.

10 Los nuevos procedimientos se caracterizan por una alta sensibilidad y una baja susceptibilidad de error, admiten fácilmente automatización y miniaturización y son adecuados además para la realización de mediciones continuas. Los procedimientos pueden utilizarse con especial ventaja en el campo del diagnóstico médico y de la investigación biomédica, incluyendo la investigación de principios activos farmacéuticos.

El pirofosfato (difosfato (V), P<sub>2</sub>i) es un metabolito básico del metabolismo celular que se produce o consume en numerosas reacciones enzimáticas; así, por ejemplo, se realizan reacciones metabólicas básicas como la síntesis de polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos con producción de pirofosfato. El pirofosfato aparece además también en el entorno inanimado y se produce o consume en distintas reacciones industriales.

15 Los procedimientos para detectar y cuantificar pirofosfato pueden utilizarse por tanto en distintos campos; es de especial interés el uso en el campo del diagnóstico médico, la investigación biomédica, particularmente la investigación de principios activos, y la investigación de medicamentos, así como en el campo del análisis ambiental y alimentario. A este respecto, es importante, además del análisis de los contenidos de pirofosfato, sobre todo la medición de reacciones químicas en las que se produce o consume pirofosfato, así como la determinación de las actividades enzimáticas que catalizan dichas reacciones.

20 En el campo del diagnóstico médico, se ofrece el empleo de procedimientos para detectar pirofosfato en todas partes donde el contenido de pirofosfato de la muestra de ensayo pueda ser un indicador de una alteración patológica. Pueden ser especialmente interesantes muestras de fluidos corporales o procesamientos de tejidos, por ejemplo, muestras de sangre, suero, orina, líquido cefalorraquídeo, líquido sinovial o procesamientos de las mismas. Los procedimientos para analizar dichas muestras de ensayo deben caracterizarse por la sensibilidad más alta posible y una baja susceptibilidad de error, particularmente frente a componentes de muestra típicos como, por ejemplo, fosfato o ATP. Además, es deseable para una realización eficaz y económica de los análisis que los procedimientos admitan una fácil automatización y miniaturización.

25 En el campo de la investigación biomédica, particularmente de la investigación de principios activos farmacéuticos, se exploran regularmente para el descubrimiento de nuevos candidatos a principios activos grandes colecciones de sustancias de algo más de un millón de sustancias con ayuda de procedimientos automatizados (cribado de alto rendimiento; High Throughput Screening); a este respecto, el cribado se dirige normalmente a la identificación de moduladores de una actividad biológica, por ejemplo una actividad enzimática, que podría ser la diana de una terapia médica. Las enzimas que catalizan reacciones productoras o consumidoras de pirofosfato, y podrían ser la diana de una terapia médica son, por ejemplo, guanilato ciclasas, adenilato ciclasas, ADN y ARN polimerasas así como escualeno sintasa. Los procedimientos para medir dichas actividades enzimáticas en cribado farmacológico de alto rendimiento deben admitir una fácil automatización y también miniaturización para limitar los costes de reactivos y sustancias de ensayo. Además, para detectar también actividades enzimáticas bajas, es deseable una sensibilidad lo más alta posible, y para conseguir una alta calidad de datos, una susceptibilidad de error lo más baja posible.

30 Para caracterizar además la cinética enzimática de los moduladores, incluyendo la determinación del mecanismo de inhibición, la velocidad de producción y disociación del complejo enzima-modulador o los gastos de energía ligados a la producción y disociación del complejo enzima-modulador, se registra y evalúa normalmente el desarrollo de las reacciones enzimáticas examinadas. Los procedimientos adecuados deben por tanto reproducir el desarrollo de la reacción con una resolución temporal lo más alta posible, idealmente de forma continua.

35 Puede ser deseable una medición continua de la concentración de pirofosfato también en aplicaciones en el campo del análisis genómico y del análisis de la expresión génica, por ejemplo, en la secuenciación de ácidos nucleicos (pirosecuenciación) o la medición de amplificaciones de ácidos nucleicos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR cuantitativa). A este respecto, los procedimientos adecuados se caracterizan adicionalmente por una susceptibilidad de error lo más baja posible frente a fosfato y ATP.

40 La bioluminiscencia es un fenómeno ampliamente extendido en la naturaleza, pero también aprovechado industrialmente, y designa la emisión de luz en el desarrollo de una reacción química catalizada por enzima; las reacciones bioluminogénicas se catalizan por ejemplo por luciferasas o fotoproteínas. Es conocida desde hace tiempo la descarboxilación oxidativa catalizada por luciferasa de *Photinus pyralis* de D-luciferina hasta oxiluciferina en presencia de trifosfato de adenosina (ATP), Mg<sup>2+</sup> y oxígeno (O<sub>2</sub>). Se exponen más detalladamente exámenes para la caracterización de esta reacción, así como del mecanismo de reacción, por ejemplo, en McElroy, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 33 (1947) 342-345, McElroy, J. Biol. Chem. 191 (1951) 547-557, McElroy *et al.*, Arch. Biochem. Biophys. 46 (1953) 399-416, Green y McElroy, Biochim. Biophys. Acta 20 (1956) 170-176, Bitler y McElroy, Arch. Biochem. Biophys. 72 (1957) 358-368, Rhodes *et al.*, J. Biol. Chem. 233 (1958) 1528-1537, White *et al.*, J. Am.

Chem. Soc. 85 (1963) 337-343, Denburg *et al.*, Arch. Biochem. Biophys. 134 (1969) 381-394, Lee *et al.*, Arch. Biochem. Biophys. 141 (1970) 38-52, Denburg y McElroy, Arch. Biochem. Biophys. 141 (1970) 668-675, Lundin, (1993) en: "Biolum. Chemilum.: Status Report" (Ed. Szalay, Kricka), 291-295, Fontes *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Comun. 237 (1997) 445-450, Fontes *et al.*, FEBS Lett. 438 (1998) 190-194, Sillero *et al.*, Pharmacol. Therap. 87 (2000) 91-102, WO 9640988 y Eriksson *et al.*, Anal. Biochem. 293 (2001) 67-70; a este respecto, se describen tanto efectos activadores como inhibidores del pirofosfato. La luz luminiscente emitida en la reacción puede medirse muy sensibilmente y seguirse exactamente así el desarrollo de la reacción. La reacción catalizada por luciferasa de *Photinus pyralis* se utiliza habitualmente para detectar ATP, pero también para medir reacciones enzimáticas en la que se produce o consume ATP (Lundin (1982), en "Luminescent Assays: Perspectives in Endocrinology and Clin. Chem." (Ed. Serio, Pazzagli) 29-45). El gen de luciferasa de *Photinus pyralis* se usa además a menudo como gen indicador en sistemas de ensayo celulares (Gould *et al.*, Anal. Biochem. 175 (1988) 5-13).

Es conocido que todas las luciferasas de coleópteros (luciferasas aisladas de las superfamilias *Elateroidea* y *Cantharoidea*) catalizan una reacción bioluminogénica que consume el mismo sustrato, trifosfato de adenosina (ATP), luciferina y oxígeno molecular. Se supone que todas las luciferasas de coleóptero usan el mismo mecanismo de reacción (documento US 6.387.675 B1).

En el estado de la técnica, son conocidos distintos procedimientos para detectar pirofosfato.

Flynn *et al.*, J. Biol. Chem. 211 (1954) 791-796, Grindey *et al.*, Anal. Biochem. 33 (1970) 114-119, Putnins *et al.*, Anal. Biochem. 68 (1975) 185-195, Heinonen *et al.*, Anal. Biochem. 117 (1981) 293-300 y Mansurova *et al.*, Anal. Biochem. 176 (1991) 390-94 describen procedimientos de detección química directa de pirofosfato. En los procedimientos descritos, se hace reaccionar la muestra de ensayo que contiene pirofosfato con una solución ácida de molibdato y un reactivo de tiol reductor (cisteína, disulfuro/tioglicerol o mercaptoetanol) y se cuantifican los complejos azules generados por espectrometría UV. Es problemática la susceptibilidad de error de estos procedimientos de detección, particularmente frente a fosfato. Además, es desventajoso para una realización automatizada eficaz la lenta producción de complejo (con cisteína >10-15 min).

Heinonen *et al.*, Anal. Biochem. 59 (1974) 366-374 y Russel *et al.*, J. Clin. Invest. 50 (1971) 961-969 describen procedimientos radiactivos de detección que comprenden varias etapas operativas costosas y solo admiten por tanto difícilmente la automatización. Además, estos procedimientos no son adecuados para mediciones continuas para la determinación del desarrollo temporal de una concentración de pirofosfato en muestra.

En el estado de la técnica, son conocidas además detecciones de pirofosfato con reacciones enzimáticas acopladas; en estos procedimientos se hace reaccionar enzimáticamente pirofosfato y se detecta como producto de reacción de una o varias de las reacciones enzimáticas acopladas.

Se describe uno de dichos procedimientos, por ejemplo, por Johnson *et al.*, Anal. Biochem. 26 (1968) 137-145; a este respecto, se hace reaccionar pirofosfato con UDP-glucosa con catálisis de glucosa pirofosfatasa hasta UTP y glucosa-1-P; se isomeriza la glucosa-1-P producida con catálisis de fosfoglucomutasa hasta glucosa-6-P, que reacciona con consumo de NADP y catálisis de glucosa-6-P deshidrogenasa hasta gluconolactona-6-P. El NADPH así producido se cuantifica mediante medición de la absorción UV y se emplea para la determinación del contenido de pirofosfato de la muestra de ensayo. Se describen otros procedimientos para detectar pirofosfato con reacciones enzimáticas acopladas, por ejemplo, en Cartier *et al.*, Anal. Biochem. 61 (1974) 416-428, Cheung *et al.*, Anal. Biochem. 83 (1977) 61-63, Reeves *et al.*, Anal. Biochem. 28 (1969) 282-287, Arakawa *et al.*, Anal. Biochem. 333 (2004) 296-302, Guillory *et al.*, Anal. Biochem. 39 (1971) 170-180, Cook *et al.*, Anal. Biochem. 91 (1978) 557-565, Jansson *et al.*, Anal. Biochem. 304 (2002) 135-137, Tagiri-Endo, Anal. Biochem. 315 (2003) 170-174, Drake *et al.*, Anal. Biochem. 94 (1979) 117-120, Nyren *et al.*, Anal. Biochem. 151 (1985) 504-509 y Barshop *et al.*, Anal. Biochem. 197 (1991) 266-72.

Estos procedimientos adolecen de la desventaja de que las enzimas y otros reactivos necesarios se procuran a menudo con baja disponibilidad o solo a un alto coste. Además, estos procedimientos son básicamente susceptibles de error frente a sustancias que modulen la actividad enzimática de la enzima de acoplamiento usada; esto limita considerablemente su utilidad particularmente en el campo del diagnóstico médico y la investigación biomédica, por ejemplo el cribado farmacológico de alto rendimiento.

En el estado de la técnica, es además conocido el uso de detección de fosfato para la detección indirecta de pirofosfato; a este respecto, se descompone en primer lugar el pirofosfato enzimática o químicamente y se detecta y cuantifica el fosfato generado. Dichos procedimientos se representan, por ejemplo, en Fiske *et al.*, J. Biol. Chem. 66 (1925) 375, Silcox *et al.*, J. Clin. Invest. 52 (1973) 1863-1870, Gibson *et al.*, Anal. Biochem. 254 (1997) 18-22, Cogan *et al.*, Anal. Biochem. 271 (1999) 29-35, Upson *et al.*, Anal. Biochem. 243 (1996) 41-45, WO 0042214 y Baykov *et al.*, Anal. Biochem. 119 (1982) 211-213. Estos procedimientos no son normalmente adecuados para mediciones continuas, y son básicamente susceptibles de error frente a fosfato. Fabbrizzi *et al.*, Angew. Chem. Int. Ed. 41 (2002) 3811-3814, describen un procedimiento de detección con detección de fluorescencia que se basa en el desplazamiento mediado por pirofosfato de una molécula indicadora de una molécula receptora selectiva. El procedimiento solo posee una sensibilidad baja con un límite de detección en el intervalo de concentración micromolar.

- Es de sensibilidad igualmente baja el procedimiento de Eriksson *et al.*, Anal. Biochem. 293 (2001) 67-70, con un límite de detección en el intervalo de concentración media micromolar. En este sentido, se usa una reacción de luminiscencia catalizada por luciferasa con ambos enantiómeros de luciferina, D-luciferina y L-luciferina, así como una pequeña cantidad de ATP. La detección se realiza mediante el efecto inhibitor del pirofosfato sobre la reacción de luminiscencia y la reducción así asociada de emisión de luz. Eriksson *et al.* describen además el uso de este procedimiento de detección para determinar la actividad enzimática pirofosfatasa; a este respecto, se degrada el pirofosfato existente mediante pirofosfatasa y se mide el aumento de emisión de luz.
- El documento DE 19602662 describe un procedimiento para detectar pirofosfato en el que se hace reaccionar una mezcla preincubada de luciferasa, L-luciferina, ATP y pirofosfatasa con la muestra de ensayo de pirofosfato y se crea así un destello de luz; el destello de luz se registra y se emplea para determinar la concentración de pirofosfato. Se describe la detección de pirofosfato a concentraciones de 10 a 100  $\mu\text{M}$ . El procedimiento no es adecuado para mediciones continuas.
- El documento DE 10250491 describe un procedimiento de detección de pirofosfato que usa una polimerasa con actividad de pirofosforólisis y un sustrato indicador oligonucleotídico marcado específico; el pirofosfato añadido conduce a la degradación pirofosforolítica del sustrato indicador con liberación de un mononucleótido marcado que finalmente se cuantifica. Es desventajosa la susceptibilidad de error de este procedimiento frente a sustancias intercalantes de ácidos nucleicos, lo que limita en gran medida el uso en el campo de la investigación de principios activos farmacéuticos, incluyendo el cribado farmacológico de alto rendimiento.
- El documento WO 0036151 se refiere a un procedimiento para detectar la descomposición enzimática de pirofosfato a partir de trifosfatos de nucleótido. Los sustratos usados son trifosfatos de nucleótido que están modificados tanto con un fluoróforo como con un apagador de fluorescencia; la descomposición enzimática del sustrato libera pirofosfato marcado con fluoróforo, que se detecta y finalmente se cuantifica. A causa de los marcajes introducidos, los sustratos descritos solo son utilizables limitadamente, dependiendo de la enzima descomponedora, en lugar de los trifosfatos de nucleótido naturales.
- En el estado de la técnica, son conocidos además procedimientos para medir la actividad enzimática de guanilato ciclasas.
- Las guanilato ciclasas (E.C. 4.6.1.2) catalizan la reacción de trifosfato de guanosina (GTP) hasta monofosfato de 3',5'-guanosa cíclico (GMPc) y pirofosfato.
- Domino *et al.*, Methods in Enzymology 105 (1991) 345-355, describen un procedimiento que usa GTP marcado radiactivamente que se hace reaccionar en el desarrollo de la reacción catalizada por guanilato ciclasa hasta GMPc. El GMPc producido se separa del GTP no reaccionado, se cuantifica mediante medición de radiactividad y se emplea para el cálculo de la actividad enzimática. El procedimiento comprende varias etapas costosas y solo admite por tanto una difícil automatización. Además, el procedimiento no es adecuado para la realización de mediciones continuas.
- Además, son conocidos distintos inmunoensayos que usan anticuerpos específicos de GMPc (descripción del producto "CatchPoint cGMP Fluorescent Assay Kit", Molecular Devices; descripción del producto "HTRF cGMP Assay", Cisbio international, descripción del producto "cGMP EIA Kit", Alexis Biochemicals, descripción del producto "HitHunter cGMP Assay", DiscoverRx). Se realiza a este respecto la detección del GMPc producido indirectamente mediante el desplazamiento y cuantificación de una de las sondas unidas a anticuerpo (inmunoensayo competitivo). Son desventajosos en estos procedimientos los altos costes de reactivos o gastos de preparación para la provisión de los anticuerpos necesarios, lo que limita en gran medida el uso en experimentos de alto rendimiento como, por ejemplo, cribado farmacológico de alto rendimiento. Los procedimientos no son además adecuados para la realización de mediciones continuas. Además, varios procedimientos comprenden etapas operativas costosas, particularmente procedimientos de lavado, que dificultan en gran medida una automatización eficaz.
- El documento US 20040229251 describe un procedimiento en el que se usa GTP marcado con fluoróforo, especialmente GTP marcado con BODIPY, como sustrato sustituto. El procedimiento descrito adolece de la desventaja intrínseca de que la reacción no se lleva a cabo con el sustrato natural, lo que puede conducir a artefactos sistemáticos. Los altos costes de reactivos o gastos de preparación para la provisión del sustrato sustituto descrito limitan además las posibilidades de empleo en el campo de los experimentos de alto rendimiento, incluyendo el cribado farmacológico de alto rendimiento.
- En el estado de la técnica son además conocidos procedimientos para medir la actividad enzimática de escualeno sintasa.
- La escualeno sintasa (E.C. 2.5.1.21) es una enzima bifuncional que, en una primera etapa catalítica, media la condensación de dos moléculas de pirofosfato de farnesilo (FPP) hasta pirofosfato de preescualeno. En una segunda etapa catalítica, se hace reaccionar el pirofosfato de preescualeno hasta escualeno. En ambas etapas, se produce una molécula de pirofosfato cada vez y se consumen dos moléculas de NADPH.

- Son conocidos varios procedimientos radiactivos en el estado de la técnica (A. Qureshi *et al.*, J. Biol. Chem. 248 (1973) 1848, Ishihara *et al.*, Bioorg. Med. Chem. 11 (2003) 2403, H. Hiyoshi *et al.*, J. Lip. Res. 41 (2000) 1136). En estos procedimientos, se utiliza FPP marcado radiactivamente como sustrato y el escualeno producido durante la reacción se incorpora a disolventes orgánicos, se separa cromatográficamente y finalmente se cuantifica. Estos procedimientos son experimentos extraordinariamente costosos y solo admiten una difícil automatización. Además, estos procedimientos no permiten mediciones continuas.
- El documento US 20030157583 describe un procedimiento que se basa en la medición del consumo de NADPH que, como ya se ha representado anteriormente, está acoplado con la progresión de la reacción. Este procedimiento posee solo una sensibilidad limitada y no es adecuado para medir bajas actividades enzimáticas.
- Son estado de la técnica además sistemas de luminiscencia estabilizados que alargan el tiempo de vida medio de la reacción de luminiscencia usando luciferina/luciferasa de coleóptero (documento WO2006013837).
- Además, McElroy *et al.* (Arch. Biochem. Biophys. 46 (1953) 399-416) dan a conocer el modo de acción del pirofosfato en los mismos.
- Ahmad *et al.* describe aspectos analíticos de la cinética de reacción de la reacción de luminiscencia de luciérnaga (Ahmad *et al.* "BIOLUMIN. CHEMILUMIN., [INT. SYMP. ANAL. APPL. BIOLUMIN. CHEMILUMIN.]", 2ND, MEETING DATE 1980, 435-41. EDITOR(ES): DELUCA, MARLENE A.; MCELROY, WILLIAM DAVID. EDITORIAL: ACADEMIC, NUEVA YORK, N. Y. CODEN: 45UJAC, 1981).
- Además, se da a conocer en Ronaghi M. *et al.* (Anal Biochem. 1 de nov. de 1996; 242(1): 84-9.) un procedimiento para la secuenciación a tiempo real mediante la determinación de la liberación de pirofosfato.
- El documento DE19602662 describe un procedimiento para la determinación bioluminométrica usando L-luciferina. El documento WO9640988 da a conocer reactivos de apagamiento y ensayos de luminiscencia mediada por enzima. Adicionalmente, se describe en el estado de la técnica la influencia de deshidroluciferina, coenzima A y trifosfato de nucleótido sobre la reacción de luminiscencia (Fontes *et al.*, Biochem Biophys Res Commun. 18 de agosto de 1997; 237(2): 445-50).
- La invención está basada en el objetivo de superar las desventajas y limitaciones citadas del estado de la técnica y procurar un procedimiento para detectar pirofosfato que se caracterice por una alta sensibilidad y baja susceptibilidad de error, admita una fácil automatización y miniaturización y además sea adecuado para la realización de mediciones continuas.
- El objetivo se consigue según la invención mediante procedimientos para detectar pirofosfato con detección de bioluminiscencia.
- Son objeto de la invención procedimientos para detectar pirofosfato que comprenden las siguientes etapas:
- (a) provisión de una composición que comprende deshidroluciferina, luciferina, ATP y una luciferasa que es activable por pirofosfato, por ejemplo, una luciferasa de *Photinus pyralis*;
  - (b) puesta en contacto de la composición con la muestra de ensayo y
  - (c) medición de la luminiscencia.
- La composición usada en la etapa (a) del procedimiento según la invención es en una realización preferida una solución acuosa que comprende deshidroluciferina, luciferina, ATP y luciferasa de *Photinus pyralis* y puede obtenerse mediante combinación de soluciones acuosas de los componentes individuales. Luciferina, ATP y luciferasa de *Photinus pyralis* son comercialmente obtenibles, prefiriéndose productos de alta pureza y, en el caso de la luciferasa de *Photinus pyralis*, además de alta actividad enzimática específica. La deshidroluciferina es fácilmente accesible según un procedimiento descrito en el estado de la técnica a partir de luciferina obtenible comercialmente (Bitler y McElroy, Arch. Biochem. Biophys. 72 (1957) 358). Las soluciones acuosas de los componentes individuales admiten la presentación a las concentraciones necesarias sin problemas.
- Es objetivo de la invención el uso de luciferasas no recombinantes o recombinantes y variantes derivadas o mutadas de las mismas, caracterizadas porque catalizan reacciones bioquímicas bioluminogénicas.
- Es objetivo de la invención el uso de luciferasas no recombinantes o recombinantes cuya reacción bioquímica bioluminogénica es activable por pirofosfato y las variantes derivadas o mutadas de las mismas. Puede tener lugar la activación de una reacción bioquímica bioluminogénica de una luciferasa mediante la anulación de la inhibición de producto o mediante activación enzimática directa, por ejemplo alostérica, o mediante otros mecanismos.
- Es objetivo de la invención el uso de luciferasas y luciferasas recombinantes originalmente aisladas de insectos de las superfamilias *Elateroidea* y *Cantharoidea*, caracterizadas porque catalizan reacciones bioquímicas

- bioluminogénicas consumidoras de ATP y luciferina, seleccionadas, por ejemplo pero sin limitación, de los insectos *Photinus pyralis*, *Pyrophorus plagiophthalmus*, *Luciola cruciata*, *Luciola lateralis* o *Luciola mingrelica* (documento US 6.387.675 B1, Wood *et al.*, *J. Biolum. Chemilum.* 4 (1989) 289-301, Wood *et al.*, *J. Biolum. Chemilum.* 4 (1989) 31-39, Tatsumi *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* 1131 (1992) 161-165). Es un objetivo especialmente preferido de la invención el uso de luciferasa de *Photinus pyralis*.
- 5 Es objetivo de la invención el uso de mutantes de luciferasa que se caracterizan porque poseen propiedades de bioluminiscencia espectral modificadas seleccionados, por ejemplo pero sin limitación, de sustituciones que corresponden a las posiciones aminoácidas 215, 224, 232, 236, 237, 242, 244, 245, 248, 282, 283 o 348 de la luciferasa LucPplGR de *Pyrophorus plagiophthalmus* (documento US 6.387.675 B1).
- 10 Es otro objetivo de la invención el uso de mutantes de luciferasa que se caracterizan porque poseen una estabilidad térmica modificada seleccionados, por ejemplo pero sin limitación, de sustituciones que corresponden a la posición aminoácida 217 de luciferasas de *Luciola cruciata* o *Luciola lateralis* por un aminoácido hidrófobo (documento US 5.229.285).
- 15 Es otro objetivo de la invención el uso de mutantes de luciferasa que se caracterizan porque poseen una estabilidad térmica modificada seleccionados, por ejemplo pero sin limitación, de sustituciones que corresponden a la posición aminoácida 286 (serina por asparagina), la posición aminoácida 326 (glicina por serina), la posición aminoácida 433 (histidina por tirosina) o la posición aminoácida 452 (prolina por serina) de luciferasa de *Luciola cruciata* (documento US 5.219.737).
- 20 La realización preferida de la composición como solución acuosa que comprende los componentes enumerados contiene:
- deshidroluciferina en un intervalo de concentración preferido de 5 a 250  $\mu\text{M}$ , siendo más preferible el intervalo de 10 a 100  $\mu\text{M}$ , y siendo el más preferible el intervalo de 20 a 40  $\mu\text{M}$ ,
- luciferina en un intervalo de concentración preferido de 10 a 500  $\mu\text{M}$ , siendo más preferible el intervalo de 30 a 300  $\mu\text{M}$  y siendo el más preferible el intervalo de 70 a 200  $\mu\text{M}$ ,
- 25 ATP en un intervalo de concentración preferido de 10 a 500  $\mu\text{M}$ , siendo más preferible el intervalo de 30 a 300  $\mu\text{M}$  y siendo el más preferible el intervalo de 70 a 200  $\mu\text{M}$ , y
- luciferasa de *Photinus pyralis* en un intervalo de concentración preferido de 0,1 a 10 nM, siendo más preferible el intervalo de 0,3 a 3 nM y siendo el más preferible el intervalo de 0,5 a 2 nM.
- 30 La composición usada en la etapa (a) del procedimiento según la invención puede contener componentes adicionales, por ejemplo sustancias tampón, sales monovalentes y divalentes, agentes de reducción, particularmente aquellos que contienen grupos mercapto libres, proteínas, polímeros sintéticos y detergentes.
- Son ejemplos de sustancias tampón HEPES, TEA, Tris, tricina, MES y MOPS, prefiriéndose TEA y Tris. Las sustancias tampón están contenidas preferiblemente a concentraciones de 10 a 100 mM. El valor de pH se encuentra preferiblemente en el intervalo de 7,0 a 8,0, aún más preferiblemente en el intervalo de 7,3 a 7,7.
- 35 Son ejemplos de sales monovalentes NaCl, KCl,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , acetato de sodio, acetato de potasio y acetato de amonio, prefiriéndose NaCl y KCl. Las sales monovalentes están contenidas preferiblemente a concentraciones de 0 a 200 mM.
- Son ejemplos de sales divalentes  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4$ , acetato de magnesio,  $\text{MnCl}_2$  y  $\text{CaCl}_2$ , prefiriéndose  $\text{MgCl}_2$ . Las sales divalentes están contenidas preferiblemente a concentraciones de 1 a 10 mM.
- 40 Son ejemplos de agentes de reducción, particularmente aquellos que contienen grupos mercapto libres, mercaptoetanol, DTE, DTT y glutatión, prefiriéndose DTT. Los agentes de reducción están contenidos preferiblemente a concentraciones de 0,2 a 20 mM.
- Son ejemplos de proteínas o polímeros sintéticos adicionales BSA, HSA, hemoglobina, caseína y PEG, prefiriéndose BSA. Las proteínas o polímeros sintéticos adicionales están contenidos preferiblemente a concentraciones de 0,01 a 1 % (en peso por volumen).
- 45 Son ejemplos de detergentes Brij, Tween, CHAPS, TRITON y NP-40, prefiriéndose Brij y CHAPS. Los detergentes están contenidos preferiblemente a concentraciones de 0,001 a 0,01 % (en peso por volumen).
- Una realización especialmente preferida de la composición contiene como componentes adicionales TEA 50 mM (pH = 7,5),  $\text{MgCl}_2$  2 mM, DTT 0,4 mM, BSA al 0,1 % (p/v) (fracción V) y Brij-35 al 0,005 % (p/v).
- 50 Como ya se ha puesto de manifiesto antes, puede obtenerse la realización preferida de la composición como una solución acuosa que comprende deshidroluciferina, luciferina, ATP y luciferasa de *Photinus pyralis* mediante la combinación de soluciones acuosas de los componentes individuales; a este respecto, se combinan preferiblemente

en primer lugar soluciones acuosas de luciferasa de *Photinus pyralis*, deshidroluciferina y ATP y a continuación se añade luciferina, preferiblemente en solución acuosa. Las soluciones combinadas en primer lugar de luciferasa de *Photinus pyralis*, deshidroluciferina y ATP pueden incubarse antes de la adición de luciferina, prefiriéndose un tiempo de incubación en el intervalo de 1 a 15 min y una temperatura de incubación en el intervalo de 15 a 30 °C.

5 Se prefiere especialmente la fabricación de una composición usada preferiblemente en la etapa (a) del procedimiento según la invención según el siguiente procedimiento que comprende las etapas de:

(a) combinación de soluciones acuosas de luciferasa de *Photinus pyralis*, deshidroluciferina y ATP, que contienen respectivamente como componentes adicionales TEA 50 mM (pH = 7,5), MgCl<sub>2</sub> 2 mM, DTT 0,4 mM, BSA al 0,1 % (p/v) (fracción V) y Brij-35 al 0,005 % (p/v),

10 (b) incubación de la combinación de (a) durante 5 a 10 min a una temperatura de 20 a 25 °C;

(c) complementación de la combinación incubada de (b) con una solución acuosa de luciferina que contiene como componentes adicionales TEA 50 mM (pH = 7,5), MgCl<sub>2</sub> 2 mM, DTT 0,4 mM, BSA al 0,1% (p/v) (fracción V) y Brij-35 al 0,005 % (p/v).

15 Puede almacenarse una composición usada en la etapa (a) del procedimiento según la invención, que comprende en solución acuosa deshidroluciferina, luciferina, ATP y luciferasa de *Photinus pyralis*, así como componentes adicionales. La estabilidad al almacenamiento de la composición depende entre otros de la selección y concentración de los componentes adicionales y de las condiciones de almacenamiento. Normalmente, se alcanza una estabilidad al almacenamiento de varios días a semanas. Las temperaturas de almacenamiento preferidas se encuentran en el intervalo de 2 a 10 °C. La composición puede almacenarse también en estado congelado, preferiblemente a menos de -70 °C; a este respecto se lleva a cabo el enfriamiento de la composición lo más rápido posible, preferiblemente instantáneamente.

20 Puede almacenarse una composición usada en la etapa (a) del procedimiento según la invención, que comprende en solución acuosa deshidroluciferina, luciferina, ATP y luciferasa de *Photinus pyralis*, así como los componentes adicionales TEA 50 mM (pH = 7,5), MgCl<sub>2</sub> 2 mM, DTT 0,4 mM, BSA al 0,1 % (p/v) (fracción V) y Brij-35 al 0,005 % (p/v), normalmente durante varios días, pero al menos 24 horas, a 4 a 10 °C.

La muestra de ensayo es preferiblemente una muestra esencialmente acuosa, en la que puede tratarse de una muestra como tal ya esencialmente acuosa o el producto de una preparación de muestra llevada a cabo anteriormente, por ejemplo una extracción.

30 La muestra de ensayo puede proceder de una fuente natural que comprende el entorno vivo o inanimado. Son ejemplos de muestras de ensayo del entorno inanimado muestras de agua o extractos de tierra, arena o rocas. Son ejemplos de muestras de ensayo del entorno vivo muestras de organismos animales o vegetales. Son de especial interés muestras del cuerpo humano, en las que puede tratarse de muestras de tejido o muestras de fluidos corporales o preparaciones de los mismos. Son ejemplos de dichos fluidos corporales sangre, suero, orina, líquido cefalorraquídeo, líquido sinovial o preparaciones de los mismos.

35 La muestra de ensayo puede ser además también una reacción química en la que se genera o consume pirofosfato. Son de especial interés a este respecto reacciones químicas catalizadas enzimáticamente (reacciones enzimáticas) en las que se genera o consume pirofosfato. Dichas reacciones se catalizan, por ejemplo, por guanilato ciclasas, adenilato ciclasas, ADN o ARN polimerasas, escualeno sintasa o pirofosfatasa.

40 En una realización preferida, se lleva a cabo el procedimiento según la invención en fase homogénea. En esta realización, el procedimiento según la invención admite una automatización y miniaturización especialmente fáciles. Para ello, se combina la composición de la etapa (b) del procedimiento en forma de solución acuosa que comprende deshidroluciferina, luciferina, ATP y luciferasa de *Photinus pyralis* con la muestra de ensayo esencialmente acuosa. El volumen de ensayo resultante se encuentra preferiblemente por debajo de 1000 µl, más preferiblemente por debajo de 100 µl, lo más preferiblemente por debajo de 10 µl.

45 La combinación de composición y muestra de ensayo puede llevarse a cabo con dispositivos comerciales para el manejo de líquidos (Liquid Handling Systems). Son ejemplos de dispositivos adecuados dispositivos de pipeteado, incluyendo micropipetas y pipeteado paralelo, dispositivos de dispensación, incluyendo sistemas basados en el efecto piezoeléctrico, sistemas de chorro de burbujas así como aparatos de dispensación con control de válvula y dispositivos de transferencia, incluyendo sistemas basados en jeringas de aguja.

50 El procedimiento según la invención puede realizarse en recipientes de reacción comerciales, preferiblemente microplacas de 96, 384 o 1536 pocillos. Se prefieren especialmente microplacas de 1536 pocillos. Son además adecuados como cámaras de reacción capilares o sistemas capilares así como cavidades de materiales porosos, incluyendo geles poliméricos y microesferas porosas (perlas). Además, es concebible la realización sobre microsoportes (chips) o en películas líquidas sobre portaobjetos microscópicos o sobre microesferas (perlas). El procedimiento podría realizarse también como un proceso o proceso parcial de un concepto de "laboratorio en un chip".

En una realización adicional, el procedimiento según la invención puede llevarse a cabo también en una estructura de fases heterogénea. A este respecto, se presenta al menos un componente de la muestra de ensayo o la composición en una fase adicional.

5 En una realización preferida, se inmoviliza luciferasa de *Photinus pyralis* sobre un soporte sólido adecuado y se activa mediante la puesta en contacto con una composición acuosa que comprende deshidroluciferina, luciferina y ATP. A continuación, se pone en contacto la muestra de ensayo esencialmente acuosa con la luciferasa inmovilizada, preferiblemente en mezcla con la composición activadora, y se mide la luminiscencia emitida. La inmovilización de la luciferasa puede realizarse, según el dispositivo, por ejemplo sobre la superficie de capilares, sistemas capilares, microsoportes (chips) o microesferas (perlas).

10 La luminiscencia para medir en la etapa (c) del procedimiento según la invención se correlaciona con la concentración de pirofosfato en la muestra de ensayo (ejemplo comparativo 1), conduciendo una mayor concentración de pirofosfato a una señal de luminiscencia más fuerte. En el intervalo de concentración inferior a pirofosfato 20  $\mu\text{M}$ , se observa normalmente una correlación lineal entre la señal de luminiscencia y la concentración de pirofosfato (ejemplo comparativo 1). El procedimiento según la invención es por tanto especialmente adecuado para detectar pirofosfato a concentraciones menores de 20  $\mu\text{M}$ . El intervalo preferido es una concentración de pirofosfato en la muestra de ensayo de 20 nM a 20  $\mu\text{M}$ , es más preferido el intervalo de 50 nM a 10  $\mu\text{M}$  y es el intervalo más preferido de 100 nM a 1  $\mu\text{M}$ .

20 Para una determinación cuantitativa de la concentración de pirofosfato en la muestra de ensayo, se tratan de igual modo muestras de referencia adicionales de concentración conocida de pirofosfato y se miden como la muestra de ensayo; a partir de este examen adicional, se deduce una correlación de la señal de luminiscencia y la concentración de pirofosfato en las condiciones experimentales dadas, pudiendo interpolar gráficamente por ejemplo los datos de medición o aproximar mediante procesamiento electrónico. A partir de la correlación deducida, se admite atribuir directamente una concentración de pirofosfato al valor de luminiscencia medido en la muestra de ensayo.

25 La medición de luminiscencia en la etapa (c) del procedimiento según la invención puede llevarse a cabo con aparatos de medición de luminiscencia comerciales; pero pueden ser necesarios según la realización del procedimiento, particularmente del recipiente de reacción, aparatos de lectura especiales.

30 La preparación de ensayo se mide directamente en el recipiente de reacción; a este respecto, se prefieren mediciones directas en microplacas de 96, 384 o 1536 pocillos. Según la realización del procedimiento, puede ser sin embargo también ventajoso transferir la preparación de ensayo total o parcialmente a otro recipiente adecuado para la medición y medir solo entonces.

35 Si se determina la concentración de pirofosfato en la muestra de ensayo en distintos puntos temporales, puede llevarse a cabo repetidamente la medición de la luminiscencia en la etapa (c) del procedimiento según la invención, midiendo la preparación de ensayo directamente en el recipiente de reacción, o transferirse alícuotas de los puntos temporales deseados a otros recipientes adecuados para la medición y medirlas. En ambos casos, la reacción de detección debería interferir lo menos posible con aquellos procesos de la muestra de ensayo que determinan o influyen en la concentración de pirofosfato. En un enfoque alternativo, pueden retirarse también directamente de la muestra de ensayo alícuotas en los puntos temporales deseados, poner en contacto estas alícuotas con la composición y medir entonces.

40 Después de poner en contacto la muestra de ensayo de la etapa (b) del procedimiento según la invención con la composición, se produce la señal de luminiscencia resultante y para medir en la etapa (c) rápidamente, normalmente durante segundos. La señal posee generalmente una intensidad que puede determinarse fiablemente con aparatos de medición de luminiscencia comerciales en cortos tiempos de integración, normalmente durante segundos.

45 El procedimiento según la invención posibilita por tanto una determinación especialmente rápida y actual de las concentraciones de pirofosfato. A causa de la velocidad, el procedimiento es adecuado preferiblemente también para una determinación temporalmente precisa de la concentración de pirofosfato en una muestra de ensayo, pudiendo procederse del modo ya citado anteriormente.

50 Las determinaciones temporalmente precisas de las concentraciones de pirofosfato son de particular interés cuando se trata en la muestra de ensayo de reacciones químicas, incluyendo catalizadas por enzima, en las que se produce o consume pirofosfato. Como base del desarrollo temporal de la concentración de pirofosfato, puede calcularse la velocidad de conversión de la reacción analizada y también la actividad de la enzima eventualmente utilizada de modo conocido.

Son un objetivo adicional de la invención procedimientos para detectar pirofosfato que comprenden las siguientes etapas:

55 (a) puesta en contacto de los componentes de una composición que comprende deshidroluciferina, luciferina, ATP y una luciferasa que es activable por pirofosfato, p.ej. una luciferasa de *Photinus pyralis*, con la muestra de ensayo y

(b) medición de la luminiscencia.

La etapa (a) del procedimiento debería llevarse a cabo según el orden en que se combinan los componentes de la composición y la muestra de ensayo, preferiblemente rápidamente, es decir durante minutos. La señal de luminiscencia para medir en la etapa (b) del procedimiento podría desarrollarse según el orden en que se combinan los componentes de la combinación y la muestra de ensayo, y dependiendo de los componentes adicionales, en primer lugar durante un intervalo temporal corto y solo entonces estabilizarse; para la determinación de la concentración de pirofosfato, ha de emplearse en estos casos la intensidad de luminiscencia estabilizada.

La composición, así como los componentes individuales comprendidos, se conforman y combinan preferiblemente como soluciones acuosas; las soluciones pueden contener, como ya se ha expuesto anteriormente, componentes adicionales.

La combinación de los componentes acuosos, así como la puesta en contacto con la muestra de ensayo y también la posterior medición de la luminiscencia, pueden llevarse a cabo del modo ya ilustrado anteriormente.

En una realización preferida del procedimiento, se procura en la etapa (a) en primer lugar una combinación que comprende deshidroluciferina, ATP y luciferasa de *Photinus pyralis*; se pone en contacto entonces la combinación con la muestra de ensayo y finalmente se añade luciferina.

La combinación que comprende deshidroluciferina, ATP y luciferasa de *Photinus pyralis* puede almacenarse. La estabilidad al almacenamiento de la combinación depende entre otros de la selección y concentración de los componentes adicionales y de las condiciones de almacenamiento.

Son objetivo de la invención además procedimientos para medir el desarrollo temporal de una reacción enzimática productora o consumidora de pirofosfato que comprenden las siguientes etapas:

(a) provisión de una composición que comprende deshidroluciferina, luciferina, ETP y una luciferasa que es activable por pirofosfato, p.ej. una luciferasa de *Photinus pyralis*;

(b) puesta en contacto de la composición con la reacción enzimática productora o consumidora de pirofosfato; y

(c) medición continua de la luminiscencia.

La composición que comprende deshidroluciferina, luciferina, ATP y luciferasa de *Photinus pyralis*, como ya se ha expuesto anteriormente, se conforma preferiblemente como solución acuosa y puede contener componentes adicionales.

La provisión de la composición mediante combinación de los componentes preferiblemente acuosos, así como la puesta en contacto con la muestra de ensayo, pueden llevarse a cabo igualmente del modo ilustrado anteriormente.

Para la medición continua de luminiscencia en la etapa (c) del procedimiento, se llevan a cabo mediciones individuales en un periodo corto con cortos intervalos de integración. Con aparatos comerciales, pueden medirse fiablemente señales de luminiscencia típicas con intervalos de integración en el intervalo de pocos segundos, a veces también de menos de un segundo, y en un corto periodo, es decir, en un periodo de menos de un segundo.

El procedimiento según la invención posibilita, como ya se puso de manifiesto antes, una determinación especialmente rápida y actual de la concentración respectiva de pirofosfato. Con la ayuda de la medición de luminiscencia continua descrita, puede determinarse y seguirse el desarrollo de la concentración de pirofosfato con alta resolución temporal. En una reacción productora o consumidora de pirofosfato, puede emplearse el desarrollo temporal de la concentración de pirofosfato como indicador del desarrollo de la reacción y calcularse de modo conocido la conversión de reacción alcanzada respectiva, así como la velocidad de reacción respectiva, incluyendo la actividad respectiva de la enzima utilizada.

El inicio y la duración de la medición de luminiscencia continua en la etapa (c) del procedimiento pueden variar según el fin experimental. En una realización preferida, se inicia la reacción enzimática inmediatamente antes del inicio de la medición de luminiscencia. De este modo, puede conseguirse la determinación de las velocidades de reacción de partida pretendida en muchos exámenes de cinética enzimática.

Son objetivo de la invención además procedimientos para medir el desarrollo temporal de una reacción enzimática productora o consumidora de pirofosfato que comprenden las siguientes etapas:

(a) puesta en contacto de uno o varios componentes de la reacción enzimática productora o consumidora de pirofosfato con una composición que comprende deshidroluciferina, luciferina, ATP y una luciferasa que sea activable por pirofosfato, p.ej. una luciferasa de *Photinus pyralis*;

(b) puesta en contacto de la combinación de (a) con los componentes restantes de la reacción enzimática productora o consumidora de pirofosfato; y

(c) medición continua de la luminiscencia.

La composición que comprende deshidroluciferina, luciferina, ATP y luciferasa de *Photinus pyralis* se conforma, como ya se ha expuesto anteriormente, preferiblemente como una solución acuosa que puede contener componentes adicionales.

5 La provisión de la composición mediante combinación de los componentes preferiblemente acuosos, la puesta en contacto con los componentes de la reacción enzimática productora o consumidora de pirofosfato y la medición continua de la luminiscencia pueden llevarse a cabo igualmente del modo ilustrado anteriormente.

10 En una realización preferida, se incuba la combinación de la etapa (a) del procedimiento antes de la etapa (b); la incubación se realiza preferiblemente a la temperatura de reacción prevista, por ejemplo a 37 °C, y durante un periodo que basta para llevar al menos el volumen total de la combinación a la temperatura de reacción prevista. Se prefiere además conformar la etapa (a) de modo que se ponga en contacto en la etapa (b) solo un componente restante de la reacción enzimática productora o consumidora de pirofosfato con la combinación de la etapa (a) y se inicie así la reacción (ejemplo comparativo 2: medición de una reacción enzimática catalizada por guanilato ciclasa vascular soluble). A este respecto, se añade el componente restante preferiblemente con la ayuda de un dispositivo  
15 dispensador directamente al aparato de medición de luminiscencia, de modo que pueda iniciarse la medición continua de luminiscencia inmediatamente, es decir, con un periodo temporal normalmente menor de un segundo. Como alternativa, la medición puede iniciarse también ya antes de la adición del componente restante, empleándose para la determinación de la velocidad de reacción de partida o la actividad enzimática los correspondientes segmentos de medición.

20 Son objetivo de la invención además procedimientos para medir el desarrollo temporal de una reacción enzimática productora o consumidora de pirofosfato que comprenden las siguientes etapas:

(a) puesta en contacto de los componentes de la reacción enzimática productora o consumidora de pirofosfato con los componentes de una composición que comprende deshidroluciferina, luciferina, ATP y una luciferasa que es activable por pirofosfato, p.ej. una luciferasa de *Photinus pyralis*;

25 (b) medición continua de la luminiscencia.

La composición que comprende deshidroluciferina, luciferina, ATP y luciferasa de *Photinus pyralis*, como ya se ha expuesto, se conforma preferiblemente como una solución acuosa y puede contener componentes adicionales. La puesta en contacto de los componentes de la composición con los componentes de la reacción enzimática productora o consumidora de pirofosfato y la medición continua de la luminiscencia pueden llevarse a cabo  
30 igualmente del modo ilustrado anteriormente.

La etapa (a) del procedimiento debería llevarse a cabo según el orden en que se combinan los componentes de la composición y los componentes de la reacción enzimática productora o consumidora de pirofosfato, preferiblemente rápidamente, es decir durante minutos. La señal de luminiscencia para medir en la etapa (b) del procedimiento podría desarrollarse según el orden en que se combinan los componentes de la combinación y los componentes de  
35 la reacción enzimática productora o consumidora de pirofosfato, y dependiendo de los componentes adicionales, en primer lugar durante un intervalo temporal corto y solo entonces estabilizarse; para la determinación de la velocidad de reacción o la actividad enzimática, han de emplearse en estos casos los segmentos posteriores adecuados de la medición de luminiscencia continua.

Los procedimientos según la invención pueden utilizarse ventajosamente en distintos campos; es de especial interés el empleo en el campo del diagnóstico médico, la investigación biomédica, particularmente la investigación de principios activos y la investigación de medicamentos, así como en el campo del análisis ambiental y alimentario. A este respecto, el empleo del procedimiento según la invención puede dirigirse, además de a la determinación de las concentraciones de pirofosfato, a la medición de conversiones de reacciones químicas y actividades enzimáticas.

Los procedimientos según la invención pueden llevarse a cabo, como ya se ha ilustrado anteriormente, en fase homogénea y en pocas etapas de procesamiento sencillas; por ello son perfectamente adecuados para automatización y miniaturización.

En el campo del diagnóstico médico, se ofrece el empleo de procedimientos según la invención en todas partes donde el contenido de pirofosfato de la muestra de ensayo pueda ser un indicador de una alteración patológica. Pueden ser especialmente interesantes muestras de fluidos corporales o procesamientos de tejidos, por ejemplo, muestras de sangre, suero, orina, líquido cefalorraquídeo, líquido sinovial o procesamientos de las mismas. Los procedimientos según la invención son perfectamente adecuados, a causa de su alta sensibilidad y baja susceptibilidad de error, particularmente frente a constituyentes de muestra típicos como fosfato o ATP, para el análisis de dichas muestras de ensayo. Además, la fácil automatización y miniaturización de los procedimientos según la invención posibilitan una realización especialmente eficaz y económica de los análisis.

55 El empleo automatizado de los procedimientos según la invención puede ser importante además en el campo de la investigación biomédica, particularmente de la investigación de principios activos farmacéuticos; allí se exploran

regularmente para el descubrimiento de nuevos candidatos a principios activos grandes colecciones de sustancias con algo más de un millón de sustancias con ayuda de procedimientos automatizados (cribado de alto rendimiento; High Throughput Screening); además, la fácil automatización de los procedimientos es ventajosa en esta aplicación sobre todo la miniaturización, la alta sensibilidad y la baja susceptibilidad de error. La miniaturización del formato de ensayo y la alta sensibilidad reducen los gastos de la fabricación o suministro de reactivos, así como el consumo de sustancias de ensayo. La baja susceptibilidad de error conduce habitualmente a una alta calidad de datos y una buena reproducibilidad de los resultados de ensayo.

El cribado farmacológico de alto rendimiento se dirige normalmente a la identificación de moduladores de una actividad biológica, por ejemplo una actividad enzimática, que pueden ser la diana de una terapia médica. Los procedimientos según la invención son perfectamente adecuados para dicho empleo en cribado farmacéutico de alto rendimiento, especialmente para el descubrimiento de moduladores de enzimas que catalizan reacciones productoras o consumidoras de pirofosfato; son de especial interés a este respecto, por ejemplo, moduladores de la actividad enzimática de guanilato ciclasas, adenilato ciclasas, ADN o ARN polimerasas o escualeno sintasa. Para ello, se determina la actividad de la enzima afectada según uno de los procedimientos anteriormente descritos según la invención en presencia de una o varias concentraciones adecuadas de sustancia de ensayo, se compara con la actividad de la enzima en ausencia de sustancia de ensayo y se deducen de ello las propiedades moduladoras de la sustancia de ensayo de modo conocido. Las propiedades deducidas habitualmente de una sustancia de ensayo son el efecto activador o inhibidor sobre la actividad enzimática examinada (ejemplos comparativos 3 y 5).

Además, los procedimientos según la invención pueden usarse también para caracterizar adicionalmente la cinética enzimática de moduladores, por ejemplo para determinar el mecanismo de inhibición, la velocidad de producción y disociación del complejo de enzima-modulador o el gasto de energía ligado a la producción y disociación del complejo enzima-modulador. Además, pueden utilizarse ventajosamente los procedimientos según la invención en la caracterización de enzimas y reacciones enzimáticas en las que se produce o consume pirofosfato, incluyendo la caracterización de propiedades de sustrato así como el descubrimiento y optimización de sustratos sustitutos.

Las ventajas de los procedimientos según la invención, particularmente la baja susceptibilidad de error frente a fosfato y ATP, pueden aprovecharse además en aplicaciones en el campo del análisis genómico y el análisis de expresión genómica. Estas aplicaciones se basan en la detección y eventualmente la determinación de la actividad enzimática de polimerasas dependientes de ADN o ARN, incluyendo transcriptasas inversas, con la ayuda de los procedimientos según la invención; a este respecto, es de especial interés el empleo de realizaciones con medición continua de luminiscencia. Son ejemplos de usos posibles en el campo del análisis genómico y el análisis de la expresión génica la secuenciación de ácidos nucleicos (pirosecuenciación) de ADN o ARN y la detección o medición de amplificaciones de ácido nucleico mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Es otro objeto de la invención una composición química que comprende deshidroluciferina, luciferina, ATP y luciferasa que es activable por pirofosfato, por ejemplo luciferasa de *Photinus pyralis*. La composición se conforma, como ya se ha expuesto anteriormente, preferiblemente como una solución acuosa y puede contener componentes adicionales. Las distintas y preferidas posibilidades para la provisión de la composición, así como la estabilidad al almacenamiento y el manejo adicional, ya se han ilustrado igualmente antes.

Se da a conocer además un conjunto de ensayos para la realización de uno de los procedimientos descritos que comprende al menos un primer recipiente adecuado que contiene al menos deshidroluciferina, un segundo recipiente adecuado que contiene al menos luciferina, un tercer recipiente adecuado que contiene al menos ATP y un cuarto recipiente adecuado que contiene al menos luciferasa que es activable por pirofosfato, p.ej. luciferasa de *Photinus pyralis*.

Otros conjuntos de ensayos dados a conocer para la realización de uno de los procedimientos descritos comprenden al menos uno o varios recipientes adecuados que contienen respectivamente al menos uno o varios componentes seleccionados de la lista compuesta por deshidroluciferina, luciferina, ATP y luciferasa que es activable por pirofosfato, p.ej. luciferasa de *Photinus pyralis*, estando contenido cada componente enumerado en al menos uno de los recipientes adecuados.

La divulgación se refiere además a conjuntos de ensayos para la realización de uno de los procedimientos descritos que comprenden al menos un recipiente adecuado que contiene al menos deshidroluciferina, luciferina, ATP y luciferasa que es activable por pirofosfato, p.ej. luciferasa de *Photinus pyralis*.

Los componentes citados pueden presentarse respectivamente en combinación con componentes adicionales; se han representado ya anteriormente ejemplos de componentes adicionales. Los componentes citados o combinaciones de componentes se presentan, en la medida en que la luciferasa no está comprendida, en los recipientes adecuados preferiblemente como un sólido secado o mezcla de sólidos secados, por ejemplo como un liofilizado. Si la luciferasa está comprendida, p.ej. luciferasa de *Photinus pyralis*, los componentes citados o combinaciones de componentes se presentan preferiblemente como una solución acuosa con un contenido de glicerina de 10 a 60 % de proporción volumétrica, preferiblemente 50 % de proporción volumétrica. Para la realización de uno de los procedimientos según la invención, se llevan a solución acuosa o se diluyen en agua los

componentes presentes y combinaciones de componentes según la realización, se combinan o ponen en contacto entre sí y con la muestra de ensayo y se miden.

5 Los recipientes adecuados se caracterizan por una buena estabilidad a largo plazo a temperaturas, incluyendo cambios de temperatura bruscos, en el intervalo de 20 a -80 °C. Se prefieren recipientes opacos con cierre hermético y estanco de materiales plásticos poliméricos.

Los conjuntos de ensayos dados a conocer pueden contener además protocolos de ejemplo para la realización de distintas configuraciones de los procedimientos según la invención, resultados de ensayo, muestras de referencia, notas bibliográficas así como otros materiales.

La invención se ilustra detalladamente mediante los siguientes ejemplos:

### 10 **Ejemplo 1**

Detección de pirofosfato

Se realiza la detección de pirofosfato (PPi) según el procedimiento según la invención. La señal generada en el ensayo aumenta al crecer la concentración de PPi (véase la Fig. 1).

Realización de la detección de PPi

15 Para la realización de la detección de PPi, se dispusieron en una microplaca 40 µl de solución de PPi (Sigma; dilución en serie en tampón: TEA 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, BSA al 0,1 % (fracción V) y Brij al 0,005 %, pH 7,5). A continuación, se añadieron 20 µl de mezcla de detección (luciferasa de luciérnaga 1,2 nM (luciferasa de *Photinus pyralis*, Promega), deshidroluciferina 29 µM (fabricada según Bitler y McElroy, Arch. Biochem. Biophys. 72 (1957) 358), luciferina 122 µM (Promega), ATP 153 µM (Sigma) y DTT 0,4 mM (Sigma) en tampón (TEA 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, BSA al 0,1 % (fracción V), Brij al 0,005 %, pH 7,5). Se midieron luminométricamente a temperatura ambiente las preparaciones de detección.

### 20 **Ejemplo 2**

Medición de la actividad enzimática de GCs mediante la detección de PPi

25 La guanilato ciclasa soluble (GCs) hace reaccionar con estimulación GTP hasta GMPc y pirofosfato (PPi). Se detecta el PPi con la ayuda del procedimiento según la invención. La señal generada en el ensayo aumenta al progresar la conversión y sirve como medida de la actividad enzimática de GCs. Con la ayuda de una curva de referencia de PPi (ejemplo comparativo 1), puede caracterizarse la enzima de modo conocido, p.ej. respecto al índice de conversión, estimulabilidad o constante de Michaelis.

Realización del ensayo

30 Para la realización del ensayo, se dispusieron en una microplaca 29 µl de solución enzimática (guanilato ciclasa soluble 0-10 nM (fabricada según Hönicka *et al.*, Journal of Molecular Medicine 77(1999)14-23), en TEA 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, BSA al 0,1 % (fracción V) y Brij al 0,005 %, pH 7,5) y se añadió 1 µl de solución estimulante (NONOato de DEA 0-10 µM (Alexis) en DMSO). Se incubó la preparación durante 10 min a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 20 µl de mezcla de detección (luciferasa de luciérnaga 1,2 nM (luciferasa de *Photinus pyralis*, Promega), deshidroluciferina 29 µM (fabricada según Bitler y McElroy, Arch. Biochem. Biophys. 72 (1957) 358), luciferina 122 µM (Promega), ATP 153 µM (Sigma) y DTT 0,4 mM (Sigma) en TEA 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, BSA al 0,1 % (fracción V), Brij al 0,005 %, pH 7,5). Se inició la reacción enzimática mediante la adición de 20 µl de solución de sustrato (5'-trifosfato de guanosina 1,25 mM (Sigma) en TEA 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, BSA al 0,1 % (fracción V), Brij al 0,005 %, pH 7,5) y se midió luminométricamente de forma continua.

### 40 **Ejemplo 3**

Caracterización de sustancias de ensayo respecto a la estimulación de la actividad enzimática de GCs

45 La guanilato ciclasa soluble (GCs) hace reaccionar con estimulación GTP hasta GMPc y pirofosfato (PPi). Se detecta el PPi con la ayuda del procedimiento según la invención. La señal generada en el ensayo aumenta al progresar la conversión y sirve como medida de la actividad enzimática de GCs a la estimulación dada (véase la Fig. 2).

Realización del ensayo:

50 Para la realización del ensayo, se dispusieron en una microplaca 29 µl de solución enzimática (guanilato ciclasa soluble 0-10 nM (fabricada según Hönicka *et al.*, Journal of Molecular Medicine 77(1999)14-23) en TEA 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, BSA al 0,1 % (fracción V), Brij al 0,005 %, pH 7,5) y se añadió 1 µl de la sustancia a ensayar (p.ej. BAY 412272 (Alexis) diluida en serie en DMSO). Se incubó la preparación durante 10 min a temperatura ambiente. A continuación se añadieron 20 µl de mezcla de detección (luciferasa de luciérnaga 1,2 nM (luciferasa de *Photinus*

- 5 *pyralis*, Promega), deshidroluciferina 29  $\mu\text{M}$  (fabricada según Bitler y McElroy, *Arch. Biochem. Biophys.* 72 (1957) 358), luciferina 122  $\mu\text{M}$  (Promega), ATP 153  $\mu\text{M}$  (Sigma) y DTT 0,4 mM (Sigma) en TEA 50 mM,  $\text{MgCl}_2$  2 mM, BSA al 0,1 % (fracción V), Brij al 0,005 %, pH 7,5). Se inició la reacción enzimática mediante la adición de 20  $\mu\text{l}$  de solución de sustrato (5'-trifosfato de guanosina 1,25 mM (Sigma) en TEA 50 mM,  $\text{MgCl}_2$  2 mM, BSA al 0,1 % (fracción V), Brij al 0,005 %, pH 7,5) y se midió luminométricamente de forma continua. Puede determinarse la medida de la estimulación mediante la sustancia a ensayar respecto a la señal de la reacción no estimulada.

#### **Ejemplo 4**

Medición de la actividad enzimática de SQS mediante la detección de PPI

- 10 La escualeno sintasa (SQS) hace reaccionar pirofosfato de farnesilo en presencia de NADPH hasta escualeno y pirofosfato (PPI). El PPI se detecta con la ayuda del procedimiento según la invención. La señal generada en el ensayo aumenta al progresar la conversión y sirve como medida de la actividad enzimática de SQS (véase la Fig. 3). Con la ayuda de una curva de referencia de PPI (ejemplo comparativo 1), puede caracterizarse la enzima de modo conocido, p.ej. con respecto al índice de conversión o constante de Michaelis.

Realización del ensayo:

- 15 Para la realización del ensayo, se dispusieron en una microplaca 40  $\mu\text{l}$  de solución enzimática (SQS 0-10 nM (fabricada según Soltis, *Arch. Biochem. Biophys.* 316 (1995) 713) en Tris 50 mM,  $\text{MgCl}_2$  5 mM, glutation 1,5 mM, CHAPS 5 mM, pH 7,5). A continuación, se añadieron 20  $\mu\text{l}$  de mezcla de detección (luciferasa de luciérnaga 1,3 nM (luciferasa de *Photinus pyralis*, Promega), deshidroluciferina 35  $\mu\text{M}$  (fabricada según Bitler y McElroy, *Arch. Biochem. Biophys.* 72 (1957) 358), luciferina 140  $\mu\text{M}$  (Promega), ATP 175  $\mu\text{M}$  (Sigma) y DTT 0,5 mM (Sigma) en Tris 50 mM,  $\text{MgCl}_2$  5 mM, CHAPS 5 mM, BSA al 0,02 % (fracción V), pH 7,5). Se inició la reacción enzimática mediante la adición de 20  $\mu\text{l}$  de solución de sustrato (pirofosfato de farnesilo 10,5  $\mu\text{M}$  (Sigma), NADPH 150  $\mu\text{M}$  (Sigma) en Tris 50 mM,  $\text{MgCl}_2$  5 mM, CHAPS 5 mM, pH 7,5) y se midió luminométricamente de forma continua.

#### **Ejemplo 5**

Caracterización de sustancias de ensayo respecto a la inhibición de la actividad enzimática de SQS

- 25 La escualeno sintasa (SQS) hace reaccionar pirofosfato de farnesilo en presencia de NADPH hasta escualeno y pirofosfato (PPI). El PPI se detecta con la ayuda del procedimiento según la invención. La señal generada en el ensayo aumenta al progresar la conversión y sirve como medida de la actividad enzimática de SQS con la inhibición dada (véase la Fig. 4).

Realización del ensayo:

- 30 Para la realización del ensayo, se dispusieron en una microplaca 39  $\mu\text{l}$  de solución enzimática (SQS 0-10 nM (fabricada según Soltis, *Arch. Biochem. Biophys.* 316 (1995) 713) en Tris 50 mM,  $\text{MgCl}_2$  5 mM, glutation 1,5 mM, CHAPS 5 mM, pH 7,5) y se añadió 1  $\mu\text{l}$  de solución de sustancia de ensayo (dilución en serie en DMSO). Se incubó la preparación durante 10 min a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 20  $\mu\text{l}$  de mezcla de detección (luciferasa de luciérnaga 1,3 nM (luciferasa de *Photinus pyralis*, Promega), deshidroluciferina 35  $\mu\text{M}$  (fabricada según Bitler y McElroy, *Arch. Biochem. Biophys.* 72 (1957) 358), luciferina 140  $\mu\text{M}$  (Promega), ATP 175  $\mu\text{M}$  (Sigma) y DTT 0,5 mM (Sigma) en Tris 50 mM,  $\text{MgCl}_2$  5 mM, CHAPS 5 mM, BSA al 0,02 % (fracción V), pH 7,5). Se inició la reacción enzimática mediante la adición de 20  $\mu\text{l}$  de solución de sustrato (pirofosfato de farnesilo 10,5  $\mu\text{M}$  (Sigma), NADPH 150  $\mu\text{M}$  (Sigma) en Tris 50 mM,  $\text{MgCl}_2$  5 mM, CHAPS 5 mM, pH 7,5) y se midió luminométricamente de forma continua. La medida de la inhibición puede determinarse respecto a la señal de la reacción no inhibida.

- 40 La posible inhibición mediada por sustancia de ensayo de la actividad de luciferasa puede comprobarse como sigue:

- 45 Después del final de la medición luminométrica, se añaden 20  $\mu\text{l}$  de una solución de control que contiene PPI (PPI 5  $\mu\text{M}$  (Sigma), BSA al 0,02 % (fracción V, Sigma), ATP 44  $\mu\text{M}$  (Sigma), luciferina 35  $\mu\text{M}$  (Promega), luciferasa de luciérnaga 0,4 nM (luciferasa de *Photinus pyralis*, Promega), deshidroluciferina 6  $\mu\text{M}$  (fabricada según Bitler y McElroy, *Arch. Biochem. Biophys.* 72 (1957) 358) en Tris 50 mM,  $\text{MgCl}_2$  2 mM, pH 8) y se mide luminométricamente de nuevo.

Si el aumento de señal generado por la adición de la solución de control que contiene PPI en una preparación de reacción inhibida es tan alto como en una preparación de control no inhibida, puede excluirse una inhibición de la reacción de luciferasa.

Ilustraciones de las figuras:

- 50 Fig. 1: Medición de una serie de concentraciones de pirofosfato; ULR, señal luminiscente en unidades de luminiscencia relativa de pirofosfato; concentración de pirofosfato, micromolar

Fig. 2: Medición de la activación de guanilato ciclasa soluble (GCs) mediante distintas concentraciones de BAY 41-2272; ULR, señal de luminiscencia en unidades de luminiscencia relativa; t, tiempo de incubación en minutos; [BAY 41-2272], concentración de BAY 41-2272, micromolar

5 Fig. 3: Medición de la actividad de escualeno sintasa (SQS); ULR (señal de luminiscencia en unidades de luminiscencia relativa); t, tiempo de incubación en minutos; [SQS], concentración de escualeno, nanomolar

Fig. 4: Medición de la inhibición de la síntesis de escualeno por distintas concentraciones de ácido zaragócico; ULR/min, cambio de la señal de luminiscencia por unidad de tiempo en unidades relativas de luminiscencia por minuto; [ácido zaragócico], concentración de ácido zaragócico, nanomolar.

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para detectar pirofosfato, **caracterizado porque** comprende las siguientes etapas:
- (a) puesta en contacto de los componentes de una composición que comprende deshidroluciferina, luciferina, ATP y luciferasa que es activable por pirofosfato, con la muestra de ensayo y
- 5 (b) medición de la luminiscencia.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado porque** la muestra de ensayo procede de una fuente natural que comprende entorno vivo e inanimado.
3. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado porque** la muestra de ensayo procede de un organismo vegetal o animal.
- 10 4. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado porque** la muestra de ensayo procede del cuerpo humano.
5. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado porque** la muestra de ensayo es una reacción química productora o consumidora de pirofosfato.
- 15 6. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado porque** la muestra de ensayo es una reacción enzimática productora o consumidora de pirofosfato.
7. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** se realiza la determinación de la concentración de pirofosfato con resolución temporal.
8. Procedimiento según una de las reivindicaciones 6 o 7, en el que la reacción enzimática se selecciona del grupo compuesto por reacciones enzimáticas productoras de pirofosfato o consumidoras de pirofosfato, reacciones catalizadas por guanilato ciclasa, reacciones catalizadas por adenilato ciclasa, reacciones catalizadas por escualeno sintasa, reacciones catalizadas por pirofosfatasa, reacciones catalizadas por ADN polimerasa o reacciones catalizadas por ARN polimerasa.
- 20 9. Procedimiento según una de las reivindicaciones 6 a 7, **caracterizado porque** la reacción enzimática se cataliza mediante guanilato ciclasa vascular soluble.
- 25 10. Solución acuosa que comprende deshidroluciferina en un intervalo de concentración de 5 a 250  $\mu\text{M}$ , luciferina en un intervalo de concentración de 10 a 500  $\mu\text{M}$ , ATP en un intervalo de concentración de 10 a 500  $\mu\text{M}$  y luciferasa de *Photinus pyralis* en un intervalo de concentración de 0,1 a 10 nM.
- 30 11. Solución acuosa según la reivindicación 10, **caracterizada porque** la luciferasa de *Photinus pyralis* es una luciferasa de *Photinus pyralis* no recombinante o recombinante, luciferasa de *Photinus pyralis* derivada o mutada de la misma o una mezcla derivada de la misma.

Fig. 1:

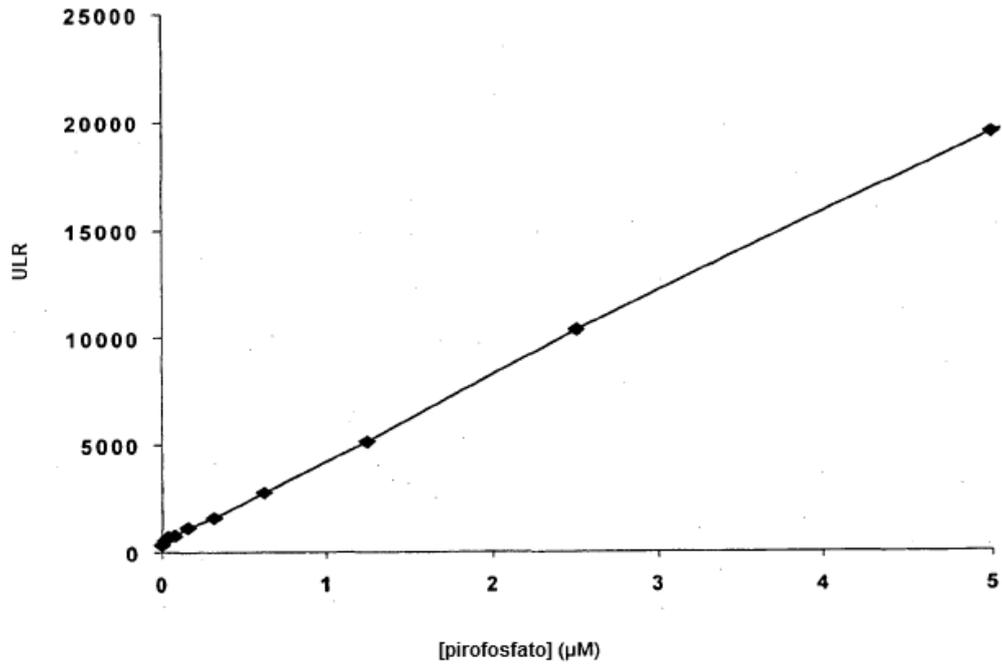


Fig. 2:

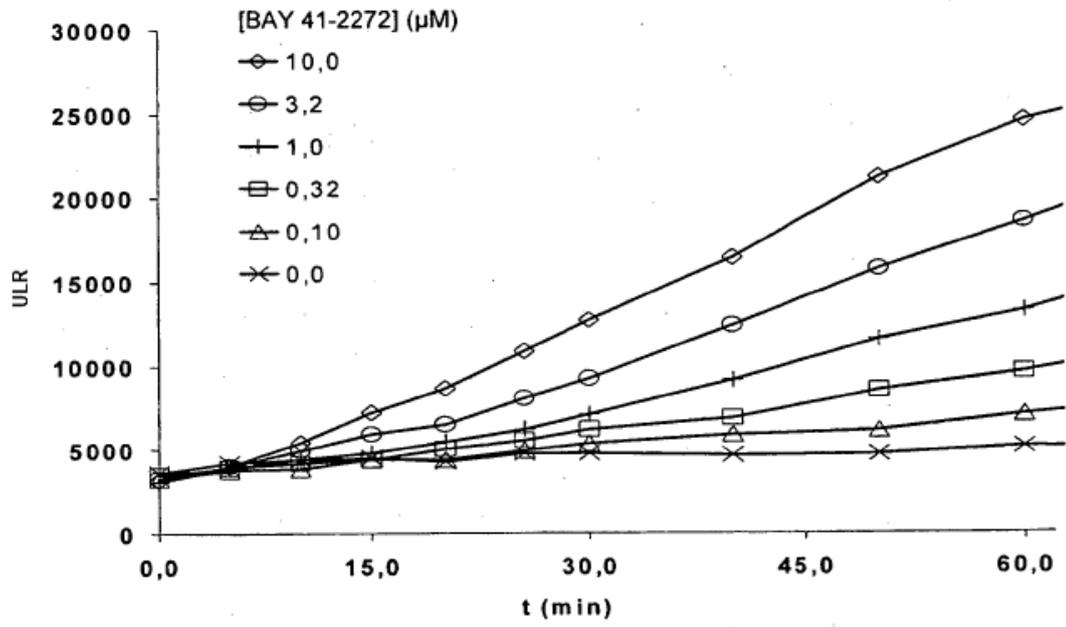


Fig. 3:

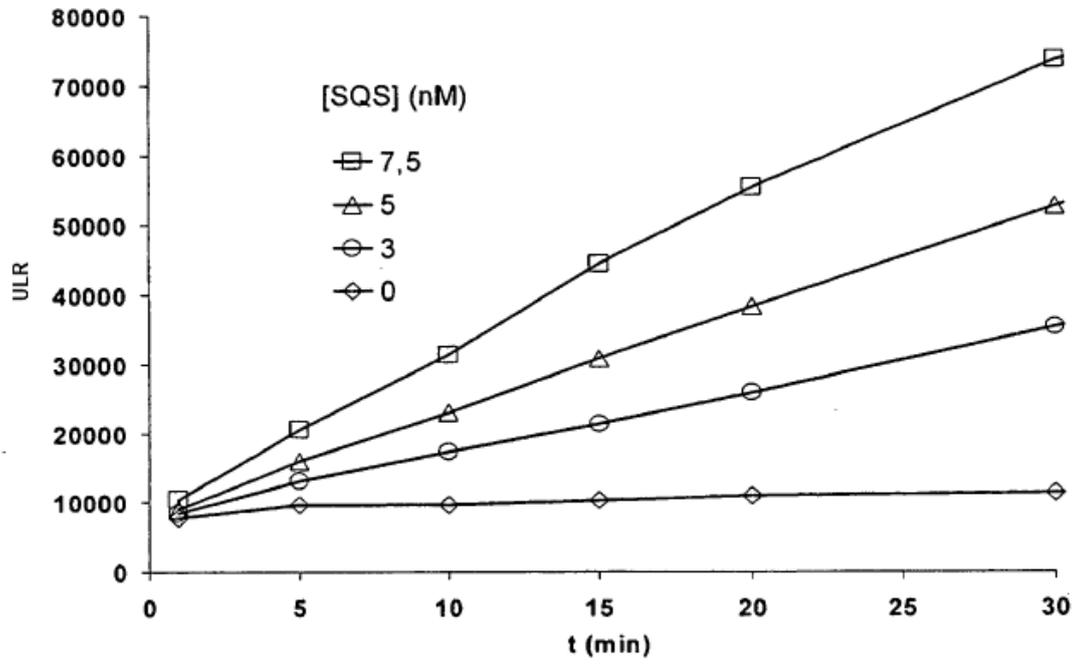


Fig. 4:

