

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 543 010**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/26 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

C12N 9/02 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.01.2010 E 10731334 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.07.2015 EP 2380989**

54 Título: **Método y reactivo para determinar ácido mevalónico, 3-hidroximetilglutaril-coenzima A y coenzima A**

30 Prioridad:

19.01.2009 JP 2009009177

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

13.08.2015

73 Titular/es:

**ASAHI KASEI PHARMA CORPORATION (100.0%)
1-105 Kanda Jinbocho Chiyoda-ku
Tokyo 101-8101, JP**

72 Inventor/es:

MATSUOKA, TAKESHI

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 543 010 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

Método y reactivo para determinar ácido mevalónico, 3-hidroxiacetilglutaril-coenzima A y coenzima A

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un método y un reactivo para medir el ácido mevalónico, 3-hidroxiacetilglutaril-coenzima A y coenzima A.

Antecedentes de la técnica

Hacer el seguimiento de la cantidad de colesterol sintetizado en el cuerpo es muy importante para el diagnóstico de diferentes afecciones patológicas y similares. En el cuerpo, el colesterol es sintetizado por la ruta del mevalonato a partir de acetil-coenzima A a través de la 3-hidroxiacetilglutaril-coenzima A (en lo sucesivo denominada también HMG-CoA), ácido mevalónico (en lo sucesivo denominado también MVA), y similares. Puesto que la conversión de la HMG-CoA en MVA catalizada por la hidroxiacetilglutaril-coenzima A reductasa es una etapa determinante de la velocidad en esta ruta del mevalonato, la cantidad de colesterol sintetizada en el cuerpo se puede calcular midiendo la cantidad de ácido mevalónico (bibliografía de no patente 1). Hasta ahora, el MVA en una muestra biológica se ha medido por un ensayo radioenzimático (bibliografía de no patente 2), cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) (bibliografía de no patente 3 y 11), cromatografía de líquidos-espectrometría de masas (LC-MS) (bibliografía de no patente 4), un ensayo usando anticuerpos (bibliografía de no patente 5) y similares. Sin embargo, como se muestra en los documentos mencionados antes, las concentraciones de MVA en el suero son muy bajas (de 63 a 200 nM [bibliografía de no patente 1], de 20 a 75 nM [bibliografía de no patente 2], 18 nM [bibliografía de no patente 3], de 7,7 a 86,2 nM [bibliografía de no patente 6]), y hasta ahora no se ha descrito una medición de concentraciones de MVA en el suero por un ensayo colorimétrico usando una enzima. Como en el caso del MVA, se piensa que la HMG-CoA también es importante como un indicador del metabolismo del colesterol en el cuerpo, pero hasta ahora no se ha descrito la medición de las concentraciones de HMG-CoA por un ensayo colorimétrico usando una enzima.

25 El ácido mevalónico tiene dos isómeros ópticos, que se denominan ácido D-mevalónico y ácido L-mevalónico por la notación D/L y ácido R-mevalónico y ácido S-mevalónico por la notación R/S. Aunque el ácido D-mevalónico (se puede expresar como ácido R-mevalónico) es metabolizado y puede servir como un sustrato de la mevalonato quinasa y la hidroxiacetilglutaril-coenzima A reductasa en el cuerpo, el ácido L-mevalónico (se puede expresar como ácido S-mevalónico) no es metabolizado en el cuerpo.

30 En la presente memoria descriptiva, una expresión "ácido D,L-mevalónico" o "D,L-MVA" representa ácido mevalónico racémico que es una mezcla de la forma D y la forma L. Cuando en la presente memoria descriptiva se usa simplemente la expresión "ácido mevalónico" o "MVA", la expresión representa ácido D-mevalónico o ácido R-mevalónico.

35 Igualmente, la 3-hidroxiacetilglutaril-coenzima A también tiene dos isómeros ópticos, que se denominan D-3-hidroxiacetilglutaril-coenzima A y L-3-hidroxiacetilglutaril-coenzima A por la notación D/L y como R-3-hidroxiacetilglutaril-coenzima A y S-3-hidroxiacetilglutaril-coenzima A por la notación R/S. Mientras que la D-3-hidroxiacetilglutaril-coenzima A (se puede expresar como S-3-hidroxiacetilglutaril-coenzima A) es metabolizada (puede servir como sustrato de la hidroxiacetilglutaril-coenzima A reductasa) en el cuerpo, la L-3-hidroxiacetilglutaril-coenzima A (se puede expresar como R-3-hidroxiacetilglutaril-coenzima A) no es metabolizada en el cuerpo.

40 En la presente memoria descriptiva, la expresión "D,L-3-hidroxiacetilglutaril-coenzima A" o "D,L-HMG-CoA", representa la 3-hidroxiacetilglutaril-coenzima A racémica que es una mezcla de la forma D y la forma L. Cuando se usa simplemente la expresión "3-hidroxiacetilglutaril-coenzima A" o "HMG-CoA", el término representa la D-3-hidroxiacetilglutaril-coenzima A o S-3-hidroxiacetilglutaril-coenzima A.

45 Además, se cree que la coenzima A (denominada en lo sucesivo también como CoA) es importante como un indicador o similar, del metabolismo de lípidos en el cuerpo. Sin embargo, hasta ahora no se ha descrito la medición conveniente de concentraciones de CoA por un ensayo colorimétrico usando una enzima.

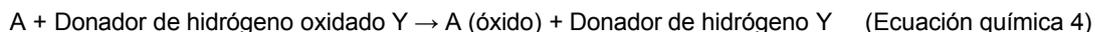
50 Se ha descrito un método cíclico enzimático como método para medir la concentración de un analito con alta sensibilidad por un ensayo colorimétrico usando una enzima. El método cíclico enzimático es un método de amplificación de una señal derivada de un analito A por una reacción cíclica enzimática que implica un aceptor de hidrógeno X y un donador de hidrógeno Y (aquí, el donador de hidrógeno Y y el aceptor de hidrógeno reducido X no son la misma sustancia). El esquema del método enzimático cíclico se representa por una combinación de la siguiente ecuación química 3:

Esquema 1

$A + \text{Aceptor de hidrógeno X} \rightarrow A (\text{óxido}) + \text{Aceptor de hidrógeno reducido X}$ (Ecuación química 3)

y la ecuación química 4:

Esquema 2



5 Aquí, A es un analito, el donador de hidrógeno Y y el aceptor de hidrógeno reducido X no son la misma sustancia, y se añade una enzima que cataliza las ecuaciones químicas 3 y 4, un aceptor de hidrógeno X y un donador de hidrógeno Y, a una solución de ensayo que contiene el analito A para llevar a cabo las reacciones enzimáticas mencionadas antes. El analito A se somete a un ciclo entre A y A (óxido) durante la reacción, y se producen el aceptor de hidrógeno reducido X y el donador de hidrógeno oxidado Y dependiendo del número de ciclos. Por lo tanto se amplifica una señal procedente del analito A, y se puede medir el analito A con alta sensibilidad por la medición colorimétrica de la cantidad de aceptor de hidrógeno reducido X, el donador de hidrógeno oxidado Y, la disminución de aceptor de hidrógeno X o la disminución de donador de hidrógeno Y.

10 En general, cuando se aumenta la cantidad de una enzima añadida a una mezcla de reacción en una reacción cíclica enzimática, el número de reacciones cíclicas enzimáticas por unidad de tiempo aumenta, mejorando así la sensibilidad. Sin embargo, es imposible añadir una enzima a una mezcla de reacción en una determinada cantidad o más, o mejorar la medición de la sensibilidad debido a: 1) la constante de la velocidad de reacción (kcat) de una enzima implicada en una reacción; 2) la cantidad de una enzima que se puede disolver en una mezcla de reacción; 3) la pureza de la enzima usada; y similares. Por lo tanto, la reacción cíclica enzimática tiene un límite inferior de la concentración medible de un analito. Cuando el aceptor de hidrógeno X es dinucleótido de adenina y tionicotinamida oxidado (en lo sucesivo denominado también T-NAD) o fosfato de dinucleótido de adenina y tionicotinamida (en lo sucesivo denominado también T-NADP), y el donador de hidrógeno Y es dinucleótido de adenina y nicotinamida reducido (en lo sucesivo denominado también NADH) o fosfato de dinucleótido de adenina y nicotinamida (en lo sucesivo denominado también NADPH) en el método cíclico enzimático mencionado antes, el límite inferior de la concentración medible de un analito normalmente es aproximadamente de 1 a 10 μM (bibliografía de patentes 1 y 2 y bibliografía de no patentes 7 y 8).

25 Los ejemplos del límite inferior de la concentración medible en un ensayo muy sensible usando el método cíclico enzimático incluyen: 0,2 μM cuando el analito A es ácido cólico, y la enzima que cataliza la reacción cíclica enzimática es la 3 α -esteroide deshidrogenasa (bibliografía de patente 3); 0,2 μM cuando el analito A es glucosa-6-fosfato, y la enzima que cataliza la reacción cíclica enzimática es glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (bibliografía de patente 4); y 0,1 μM cuando el analito A es un colesterol y la enzima que cataliza la reacción cíclica enzimática es la colesterol deshidrogenasa (bibliografía de no patente 9). Además, cuando el aceptor de hidrógeno X es oxígeno y el donador de hidrógeno Y es NADH o NADPH reducido, se podrían medir concentraciones hasta el límite inferior de 0,03 μM usando glicerol-3-fosfato como un analito, que se obtiene por degradación del ácido lisofosfatídico con ácido lisofosfatídico lipasa y usando glicerol-3-fosfato oxidasa y glicerol-3-fosfato deshidrogenasa como enzimas que catalizan una reacción cíclica y detectan peróxido de hidrógeno, que es un aceptor de hidrógeno reducido X, con peroxidasa, 4-aminoantipirina y TOOS (bibliografía de no patente 10).

35 En particular, las reacciones cíclicas enzimáticas en las que el aceptor de hidrógeno X es T-NAD o T-NADP y el donador de hidrógeno Y es NADH o NADPH son, por ejemplo, una reacción representada por una combinación de la siguiente ecuación química 5:

Esquema 3



40 y la siguiente ecuación química 6:

Esquema 4



usando una deshidrogenasa para el analito A (bibliografía de patentes 1, 3 y 4 y bibliografía de no patentes 7 y 8); una reacción representada por una combinación de la siguiente ecuación química 7:

45 Esquema 5



y la siguiente ecuación química 8:

Esquema 6



50 en donde el analito es ácido glutámico, ácido α -cetoglutámico o amoniaco y se usa una glutamato deshidrogenasa para estos analitos (bibliografía de patente 2); o una reacción representada por una combinación de la siguiente ecuación química 9:

Esquema 7

D-gliceraldehído-3-fosfato + Ácido fosfórico + T-NAD → Ácido 1,3-difosfoglicérico + T-NADH (Ecuación química 9)

y la siguiente ecuación química 10:

Esquema 8

5 D-gliceraldehído-3-fosfato + Ácido fosfórico + NAD → Ácido 1,3-difosfoglicérico + NADH (Ecuación química 10)

en donde el analito es D-gliceraldehído-3-fosfato, fósforo inorgánico, o ácido 1,3-difosfoglicérico, y se usa una D-gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa para estos analitos (bibliografía de patente 5), y similares. Además, se ha descrito en la bibliografía de patente 2 que el límite inferior del cloruro amónico que se puede medir es 40 μM, el límite inferior del ácido L-glutámico que se puede medir es 40 μM, y el límite inferior de la L-leucina que se puede medir es 4 μM en una reacción cíclica enzimática en la que se usó leucina deshidrogenasa en lugar de glutamato deshidrogenasa, y el ácido glutámico se substituyó por leucina y el ácido α-cetoglutarico se substituyó por 2-oxoisocaproato en las ecuaciones químicas 7 y 8. En la bibliografía de patente 4 se ha descrito que el límite inferior del ácido fosfórico que se puede medir es 10 μM, y el límite inferior era 0,2 μM cuando la medición se realizaba usando 3-fosfoglicerato quinasa después de convertir el ácido 3-fosfoglicérico en ácido 1,3-difosfoglicérico.

15 Lista de citas

Bibliografía de patentes:

Bibliografía de patente 1: patente japonesa abierta a consulta por el público nº 04-158799

Bibliografía de patente 2: patente japonesa abierta a consulta por el público nº 04-278099

Bibliografía de patente 3: patente japonesa abierta a consulta por el público nº 03-224498

20 Bibliografía de patente 4: patente japonesa abierta a consulta por el público nº 04-335898

Bibliografía de patente 5: patente japonesa abierta a consulta por el público nº 04-349898

Bibliografía de patente 6: patente japonesa abierta a consulta por el público nº 01-144976

Bibliografía de no patentes

Bibliografía de no patente 1: *Proc Natl Acad Sci U S A.*, mayo 1982; 79(9): 3037-41

25 Bibliografía de no patente 2: *J Lipid Res.*, agosto 1979; 20(6): 716-28

Bibliografía de no patente 3: *J Lipid Res.*, junio 1991; 32(6): 1057-60

Bibliografía de no patente 4: *J Lipid Res.*, octubre 2006; 47(10): 2340-5

Bibliografía de no patente 5: *Clin Chem.*, octubre 1998; 44(10): 2152-7

Bibliografía de no patente 6: *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2003; 17(15): 1723-34

30 Bibliografía de no patente 7: *Clin Chim Acta.*, febrero 2003; 328(1-2): 163-71

Bibliografía de no patente 8: *Clin Chem.*, mayo 1994; 40(5): 817-21

Bibliografía de no patente 9: *Clin Chem.*, mayo 2002; 48(5): 737-41

Bibliografía de no patente 10: *Clin Chim Acta.*, 1 de julio 2003; 333 (1): 59-67

Bibliografía de no patente 11: *J. Chromatogr B*, 25 de agosto 2001; 760(1): 179-184

35 **Compendio de la invención**

Problema técnico

De las técnicas convencionales para medir el MVA en una muestra biológica como un indicador de la cantidad de colesterol sintetizado en el cuerpo, por ejemplo, un ensayo radioenzimático usa un isótopo radiactivo, GC-MS y LC-MS requieren dispositivos especiales y un ensayo que usa un anticuerpo usa una reacción de antígeno-anticuerpo, y por lo tanto, estos métodos no pueden tratar muchas muestras o medir sustancias de forma conveniente con una ultra alta sensibilidad y alta precisión. Como en el caso del MVA, la HMG-CoA, que se cree que es importante como un indicador del metabolismo del colesterol en el cuerpo, y para la CoA, que se cree que es importante como un indicador del metabolismo de lípidos en el cuerpo, hasta ahora no se conocía un método que pudiera tratar muchas

40

muestras de forma conveniente con ultra alta sensibilidad y alta precisión.

Además, incluso cuando se usa un método cíclico enzimático, el límite de detección de un analito en una solución de ensayo se cree que es aproximadamente 0,03 μM a partir de publicaciones previas. Por lo tanto, cuando la concentración de un analito en una solución de ensayo es inferior a 30 nM, por ejemplo, 20, 10, 1, 0,5, o 0,25 nM, la sustancia no se podía medir con alta sensibilidad o alta precisión, incluso cuando se usaba un método cíclico enzimático. En particular, en una reacción cíclica enzimática representada por una combinación de la ecuación química 5 y la ecuación química 6, en la que el aceptor de hidrógeno X es T-NAD o T-NADP y el donador de hidrógeno Y es NADH o NADPH, cuando la concentración de un analito en una solución de ensayo es inferior a 100 nM, por ejemplo, 50, 25, 20, 10, 1, 0,5 o 0,25 nM, la sustancia no se podría medir con alta sensibilidad y alta precisión.

Además, como se ha descrito antes, aunque se ha llevado a cabo como una reacción cíclica enzimática en la que el aceptor de hidrógeno X es T-NAD o T-NADP, y el donador de hidrógeno es NADH o ADPH: un sistema de reacción en el que solo están implicados un aceptor de hidrógeno X, un donador de hidrógeno Y y un analito A; un sistema de reacción en el que está implicado ácido fosfórico además de un aceptor de hidrógeno X, un donador de hidrógeno Y y un analito A; o un sistema de reacción en el que están implicados agua y amoniaco además de un aceptor de hidrógeno X, un donador de hidrógeno Y y un analito A, no se ha llevado a cabo una reacción cíclica enzimática usando un sistema de reacción en el que está implicado la coenzima A además de un aceptor de hidrógeno X, un donador de hidrógeno Y y un analito A. Además, como se muestra en las combinaciones de las ecuaciones químicas 3 y 4, ecuaciones químicas 5 y 6, ecuaciones químicas 7 y 8, y ecuaciones químicas 9 y 10, estas reacciones son reacciones en una etapa que implican transferencia de hidrógeno entre una molécula de sustrato y una molécula de aceptor de hidrógeno, o una molécula de sustrato y una molécula de donador de hidrógeno. Por ejemplo, no se conoce hasta ahora un método cíclico enzimático que comprenda una reacción de 3 etapas que incluya dos etapas de reacción de una transferencia de hidrógeno entre una molécula de sustrato y dos moléculas de un aceptor de hidrógeno, o una molécula de sustrato y dos moléculas de un donador de hidrógeno.

Un objeto de la presente invención es proporcionar un método para medir el MVA y HMG-CoA que son indicadores de la cantidad de colesterol sintetizado en el cuerpo y la coenzima A que es un indicador del metabolismo de lípidos en el cuerpo, en una muestra biológica de forma conveniente con ultra alta sensibilidad y alta precisión, así como un reactivo de medición usado para la medición.

Solución del problema

Los autores de la invención llevaron a cabo varias investigaciones para lograr el objeto anterior. Como resultado, los autores de la invención encontraron un método conveniente para medir por colorimetría el ácido mevalónico, 3-hidroximetilglutaril-coenzima A o coenzima A, en una solución de ensayo por un método cíclico enzimático usando hidroximetilglutaril-coenzima A reductasa, con ultra alta sensibilidad y alta precisión, y de esta forma realizan la presente invención.

La ácido mevalónico deshidrogenasa que cataliza la reacción en la que el analito A es ácido mevalónico en las ecuaciones químicas 5 y 6 mencionadas antes, no se ha descrito hasta ahora. La hidroximetilglutaril-coenzima A reductasa (EC1.1.1.34 y/o EC1.1.1.88: en lo sucesivo también denominada HMGR. "Enzyme Handbook: Asakura Publishing Co., Ltd. 1982") se conoce como una enzima que actúa sobre el ácido mevalónico. Una reacción catalizada por la HMGR es una reacción en dos etapas que implica transferencia de hidrógeno entre una molécula de ácido mevalónico y dos moléculas de un aceptor de hidrógeno, o una molécula de HMG-CoA y dos moléculas de un donador de hidrógeno, como se muestra en la ecuación química 11:

Esquema 9

Ácido mevalónico + Coenzima A + 2NAD(P) \rightarrow 3-hidroximetilglutaril-coenzima A + 2NAD(P)H (Ecuación química 11)

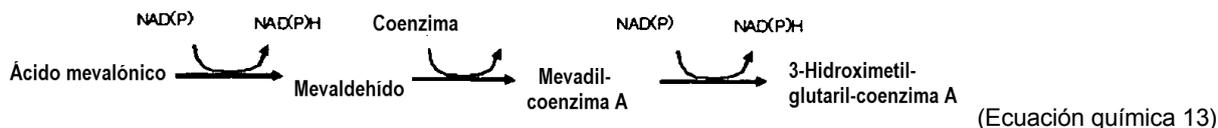
y la ecuación química 12:

Esquema 10

Ácido mevalónico + Coenzima A + 2NADP \rightarrow 3-hidroximetilglutaril-coenzima A + 2NAD(P)H (Ecuación química 12)

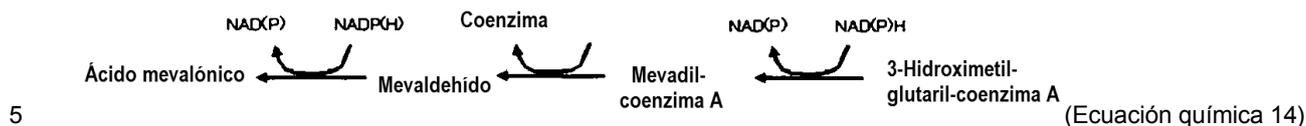
Genome Biol. 2004; 5(11): 248 y *Protein Sci.* 2000 Jun; 9(6):12, 26-34, sugieren que las ecuaciones químicas 11 y 12 anteriores están compuestas de una reacción en tres etapas que incluye dos etapas de reacción de una transferencia de hidrógeno como se muestra en la siguiente ecuación química 13:

Esquema 11



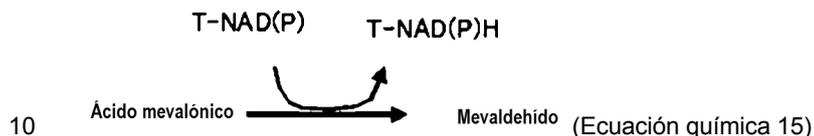
y la ecuación química 14:

Esquema 12



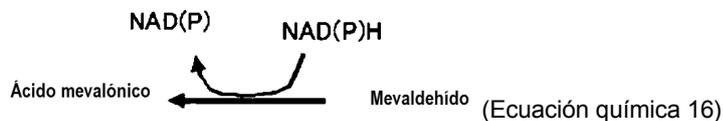
Por consiguiente, cuando se lleva a cabo solo la parte de la reacción del ácido mevalónico y mevaldehído en las ecuaciones químicas 13 y 14, es decir una reacción cíclica enzimática como una reacción de una etapa que implica la transferencia de hidrógeno representada por una combinación de la siguiente ecuación química 15:

Esquema 13



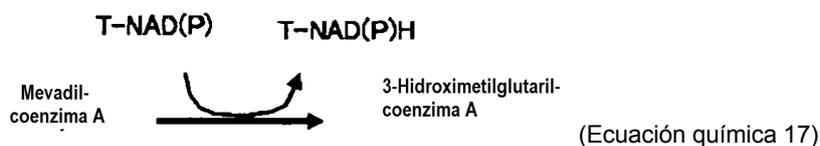
y la ecuación química 16:

Esquema 14



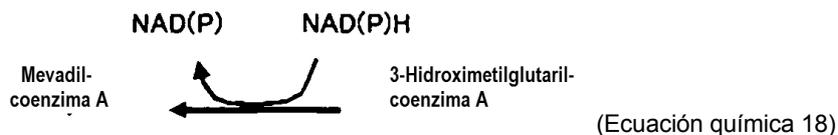
15 usando HMGR en ausencia de coenzima A, se produce una molécula de T-NAD(P)H por una reacción de una etapa. Por lo tanto se puede medir el ácido mevalónico con alta sensibilidad porque aumenta la eficacia de producción de T-NAD(P)H comparado con la producción de dos moléculas de T-NAD(P)H por una reacción de tres etapas. Además, cuando solo se lleva a cabo la parte de la reacción de la mevadil-coenzima A y HMG-CoA en las ecuaciones químicas 13 y 14, es decir, una reacción cíclica enzimática como una reacción de una etapa que implica la transferencia de hidrógeno representada por una combinación de la siguiente ecuación química 17:

20 Esquema 15



y la ecuación química 18:

Esquema 16

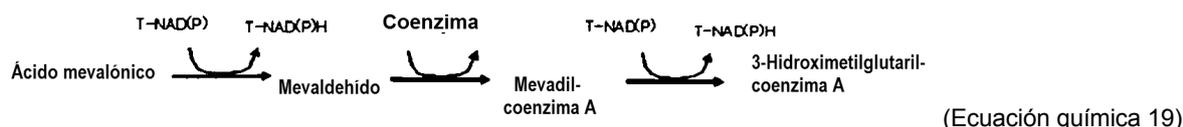


25 usando HMGR en ausencia de coenzima A, se puede medir de forma similar la HMG-CoA con alta sensibilidad. Sin embargo, al contrario de lo que se esperaba, se encontró que una reacción cíclica enzimática representada por una combinación de las ecuaciones químicas 15 y 16 mencionadas antes, no avanza cuando la concentración de MVA es baja, por ejemplo, 45 nM o inferior en una mezcla de reacción (90 nM o inferior en el caso de D,L-MVA) o 9 nM o inferior (18 nM o inferior en el caso de D,L-MVA), previniendo de esta forma la medición del ácido mevalónico con

alta sensibilidad. Además, una reacción cíclica enzimática representada por una combinación de las ecuaciones químicas 17 y 18 mencionadas antes, igualmente no avanza cuando la concentración de HMG-CoA es baja, por ejemplo, 9 nM o inferior, en una reacción química (18 nM o inferior en el caso de D,L-HMG-CoA), previniendo así la medición de la HMG-CoA con alta sensibilidad.

- 5 Por otra parte, debido a que una reacción cíclica enzimática que comprende una reacción de tres etapas que incluye dos etapas de reacción de una transferencia de hidrógeno representada por una combinación de la siguiente ecuación química 19:

Esquema 17



- 10 y la ecuación química 20:

Esquema 18



- 15 es una reacción de múltiples etapas, se ha pensado que la reacción cíclica enzimática no avanza o la eficacia de la reacción es muy baja comparada con la reacción cíclica enzimática previamente descrita que comprende una reacción de una etapa. Sorprendentemente, los autores de la invención encontraron que esta reacción cíclica enzimática avanza eficazmente permitiendo la medición del ácido mevalónico o la HMG-CoA en la solución de ensayo con ultra alta sensibilidad que no se había logrado nunca.

- 20 En otras palabras, los autores de la invención encontraron que: 1) se puede llevar a cabo una reacción cíclica enzimática que implica la coenzima A que no se conocía; 2) se puede llevar a cabo una reacción cíclica enzimática representada por una combinación de las ecuaciones químicas 11 y 12, que comprende una reacción de tres etapas que incluye dos etapas de reacción de una transferencia de hidrógeno, usando la enzima HMGR; y además 3) incluso cuando la concentración de MVA, HMG-CoA y/o coenzima A en una solución de ensayo es menor que 100 nM, por ejemplo una concentración de MVA, HMG-CoA y/o coenzima A tal como 50, 25, 20, 10, 1, 0,5, o 0,25 nM, se puede medir por colorimetría por la reacción enzimática cíclica mencionada antes de 2) con ultra alta sensibilidad, que no se había logrado nunca, y así llevar a cabo la presente invención.

Específicamente, la presente invención se refiere a lo siguiente.

Un método para medir una concentración de un analito en una solución de ensayo, en donde el analito es ácido mevalónico y/o 3-hidroximetilglutaril-coenzima A, que comprende las siguientes etapas (p) y (q): (p) una etapa que permite que una enzima que cataliza una reacción representada por la ecuación química 1:

- 30 Esquema 19



y una enzima que cataliza una reacción representada por la ecuación química 2:

Esquema 20



- 35 actúe en la solución de ensayo que contiene el ácido mevalónico y/o 3-hidroximetilglutaril-coenzima A en presencia de un aceptor de hidrógeno X, un donador de hidrógeno Y y coenzima A; y (q) una etapa de medición de una cantidad de: un aceptor de hidrógeno reducido X que se produce; o un donador de hidrógeno oxidado Y que se produce; o un aceptor de hidrógeno X que disminuye; o un donador de hidrógeno Y que disminuye, en donde el donador de hidrógeno Y y el aceptor de hidrógeno reducido X no son el mismo.

- 40 Un método para medir una concentración de un analito en una solución de ensayo, en donde el analito es coenzima A, que comprende las siguientes etapas (p') y (q'): (p') una etapa que permite que una enzima que cataliza una reacción representada por la ecuación química 1:

Esquema 21

Ácido mevalónico + Coenzima A + 2 Aceptor de hidrógeno X → 3-Hidroximetilglutaril-coenzima A + 2 Aceptor de hidrógeno reducido X (Ecuación química 1)

y una enzima que cataliza una reacción representada por la ecuación química 2:

Esquema 22

5 Ácido mevalónico + Coenzima A + 2 Donador de hidrógeno oxidado Y → 3-Hidroximetilglutaril-coenzima A + 2 Donador de hidrógeno Y (Ecuación química 2)

actúe en la solución de ensayo que contiene la coenzima A en presencia de un aceptor de hidrógeno X, un donador de hidrógeno Y y ácido mevalónico; y (q') una etapa de medición de la cantidad de: un aceptor de hidrógeno reducido X que se produce; o un donador de hidrógeno oxidado Y que se produce; o un aceptor de hidrógeno X que disminuye; o un donador de hidrógeno Y que disminuye, en donde el donador de hidrógeno Y y el aceptor de hidrógeno reducido X no son el mismo.

10 El método de medición mencionado antes, en donde la concentración de analito es inferior a 30 nM, y la etapa de medición de la cantidad de: el aceptor de hidrógeno reducido X que se produce; o el donador de hidrógeno oxidado Y que se produce; o el aceptor de hidrógeno X que disminuye; o el donador de hidrógeno Y que disminuye, se lleva a cabo por un análisis colorimétrico.

15 El método de medición mencionado antes, en donde el aceptor de hidrógeno X se selecciona de un grupo de dinucleótidos de adenina y nicotinamida oxidados.

El método de medición mencionado antes, en donde el donador de hidrógeno Y se selecciona de un grupo de dinucleótidos de adenina y nicotinamida reducidos.

20 El método de medición mencionado antes, en donde los dinucleótidos de adenina y nicotinamida oxidados se seleccionan del grupo que consiste en un dinucleótido de adenina y nicotinamida oxidado, un fosfato de dinucleótido de adenina y nicotinamida oxidado, un dinucleótido de adenina y tionicotinamida oxidado, un fosfato de dinucleótido de adenina y tionicotinamida oxidado, un dinucleótido de nicotinamida y adenina acetilado oxidado y un fosfato de dinucleótido de nicotinamida y adenina acetilado oxidado, y combinaciones de los mismos.

25 El método de medición mencionado antes, en donde los dinucleótidos de adenina y nicotinamida reducidos se seleccionan del grupo que consiste en un dinucleótido de adenina y nicotinamida reducido, un fosfato de dinucleótido de adenina y nicotinamida reducido, un dinucleótido de adenina y tionicotinamida reducido, un fosfato de dinucleótido de adenina y tionicotinamida reducido, un dinucleótido de nicotinamida y adenina acetilado reducido y un fosfato de dinucleótido de nicotinamida y adenina acetilado reducido, y combinaciones de los mismos.

30 El método de medición mencionado antes, en donde: la concentración del analito es inferior a 100 nM; el aceptor de hidrógeno X es un dinucleótido de adenina y tionicotinamida oxidado o un fosfato de dinucleótido de adenina y tionicotinamida oxidado; el donador de hidrógeno Y es un dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido o un fosfato de dinucleótido de adenina y nicotinamida reducido; y la etapa de medir la cantidad del aceptor de hidrógeno reducido X que se produce; o el donador de hidrógeno oxidado Y que se produce; o el aceptor de hidrógeno X que disminuye; o el donador de hidrógeno Y que disminuye, se lleva a cabo por un análisis colorimétrico.

35 El método de medición mencionado antes, en donde la enzima que cataliza la reacción representada por la ecuación química 1 es la hidroximetilglutaril-coenzima A reductasa.

El método de medición mencionado antes, en donde la enzima que cataliza la reacción representada por la ecuación química 2 es la hidroximetilglutaril-coenzima A reductasa.

40 El método de medición mencionado antes, en donde la hidroximetilglutaril-coenzima A reductasa se obtiene del género de *Pseudomonas*, *Variovorax*, *Delftia*, *Comamonas*, o *Archaeoglobus*.

45 El método de medición mencionado antes, en donde la enzima que cataliza la o las reacciones representadas por la ecuación química 1 y/o ecuación química 2 es: (i) una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos representada por cualquiera de las SEQ ID NO: 1 a 3; o (ii) una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos que incluye la eliminación, adición y/o sustitución de uno o varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos representada por cualquiera de las SEQ ID NO: 1 a 3, y que tiene una actividad de catálisis de la o las reacciones representadas por la ecuación química 1 y/o la ecuación química 2.

50 El método de medición mencionado antes, en donde la solución de ensayo contiene ácido mevalónico y 3-hidroximetilglutaril-coenzima A, el analito es 3-hidroximetilglutaril-coenzima A, y el método comprende además la siguiente etapa (o) antes de la etapa (p): (o) una etapa de separación del ácido mevalónico de la solución de ensayo.

El método de medición mencionado antes, en donde la etapa (o) se lleva a cabo por una reacción enzimática, preferiblemente una reacción de mevalonato quinasa.

El método de medición mencionado antes, caracterizado porque la etapa (o) se lleva a cabo por una reacción de mevalonato quinasa, y después la etapa (p) se lleva a cabo sin realizar un procedimiento de aislamiento.

- 5 El método de medición mencionado antes, en donde la mevalonato quinasa mencionada antes es: (i) una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 5; o (ii) una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos que incluye la eliminación, adición y/o sustitución de uno o varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 5 y que tiene una actividad de catálisis de una reacción representada por la ecuación química 21:

Esquema 23



- 10 El método de medición mencionado antes, en donde la solución de ensayo contiene ácido mevalónico y 3-hidroximetilglutaril-coenzima A, el analito es ácido mevalónico, y el método comprende además la siguiente etapa (o') antes de la etapa (p): (o') una etapa de separación de la 3-hidroximetilglutaril-coenzima A de la solución de ensayo.

El método de medición mencionado antes, en donde la etapa (o') se lleva a cabo mediante una reacción enzimática.

- 15 El método de medición mencionado antes, en donde la reacción enzimática es una reacción de la 3-hidroximetilglutaril-coenzima A liasa.

El método de medición mencionado antes, en donde la etapa (o') se lleva a cabo mediante una reacción de la 3-hidroximetilglutaril-coenzima A liasa y después la etapa (p) se lleva a cabo sin llevar a cabo el procedimiento de aislamiento.

- 20 El método de medición mencionado antes, en donde la 3-hidroximetilglutaril-coenzima A liasa es: (a) una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, o (ii) una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos que incluye la eliminación, adición y/o sustitución de uno o varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 y que tiene una actividad de catálisis de una reacción representada por la ecuación química 22.

- 25 Esquema 24



La presente invención se refiere también a lo siguiente.

- 30 Un reactivo para medir el ácido mevalónico y/o la 3-hidroximetilglutaril-coenzima A, que comprende una hidroximetilglutaril-coenzima A reductasa, una coenzima A, un dinucleótido de adenina y tionicotinamida oxidado (fosfato), y un dinucleótido de adenina y nicotinamida reducido (fosfato).

El reactivo de medición mencionado antes, en donde el ácido mevalónico no está contenido sustancialmente en el reactivo.

- 35 Un método para producir un reactivo para medir el ácido mevalónico y/o la 3-hidroximetilglutaril-coenzima A que comprende una hidroximetilglutaril-coenzima A reductasa, una coenzima A, un dinucleótido de adenina y tionicotinamida oxidado (fosfato), y un dinucleótido de adenina y nicotinamida reducido (fosfato), en donde el método comprende una etapa de separar el ácido mevalónico contenido usando mevalonato quinasa.

El reactivo de medición mencionado antes, en donde la 3-hidroximetilglutaril-coenzima A no está sustancialmente contenida en el reactivo.

- 40 Un método para producir un reactivo para medir el ácido mevalónico y/o la 3-hidroximetilglutaril-coenzima A, que comprende una hidroximetilglutaril-coenzima A reductasa, una coenzima A, un dinucleótido de adenina y tionicotinamida oxidado (ácido fosfórico), y un dinucleótido de adenina y nicotinamida reducido (fosfato), en donde el método comprende una etapa de separar la 3-hidroximetilglutaril-coenzima A usando una 3-hidroximetilglutaril-coenzima A liasa.

- 45 Un reactivo para medir la coenzima A, que comprende una hidroximetilglutaril-coenzima A reductasa, un ácido mevalónico, un dinucleótido de adenina y tionicotinamida oxidado (fosfato), y un dinucleótido de adenina y nicotinamida reducido (fosfato).

Un reactivo para medir la 3-hidroximetilglutaril-coenzima A, que comprende una hidroximetilglutaril-coenzima A reductasa, una mevalonato quinasa, una coenzima A, un donador de fosfato, un dinucleótido de adenina y tionicotinamida oxidado (fosfato), y un dinucleótido de adenina y nicotinamida reducido (fosfato).

- 50 Un reactivo para medir el ácido mevalónico que comprende una hidroximetilglutaril-coenzima A reductasa, una

hidroximetilglutaril-coenzima A liasa, una coenzima A, un dinucleótido de adenina y tionicotinamida oxidado (fosfato), y un dinucleótido de adenina y nicotinamida reducido (fosfato).

5 Una cepa bacteriana *Pseudomonas sp.* 1-MV (FERM BP-11063) o un mutante de la misma, que tiene una secuencia de ADNr 16S que tiene una homología de 97% o mayor con una secuencia de SEQ ID NO: 8 y una capacidad para producir una proteína que tiene una actividad de catálisis de la reacción representada por la ecuación química 1 o 2.

Una cepa bacteriana *Variovorax sp.* 5-MV (FERM BP-11064) o un mutante de la misma, que tiene una secuencia de ADNr 16S que tiene una homología de 97% o mayor con una secuencia de SEQ ID NO: 9 y una capacidad para producir una proteína que tiene una actividad de catálisis de la reacción representada por la ecuación química 1 o 2.

10 Una cepa bacteriana *Delftia sp.* 12-MV (FERM BP-11065) o un mutante de la misma, que tiene una secuencia de ADNr 16S que tiene una homología de 97% o mayor con una secuencia de SEQ ID NO: 10 y una capacidad para producir una proteína que tiene una actividad de catálisis de la reacción representada por la ecuación química 1 o 2.

Una cepa bacteriana *Comamonas sp.* 25-MV (FERM BP-11066) o un mutante de la misma, que tiene una secuencia de ADNr 16S que tiene una homología de 97% o mayor con una secuencia de SEQ ID NO: 11 y una capacidad para producir una proteína que tiene una actividad de catálisis de la reacción representada por la ecuación química 1 o 2.

15 Una proteína de acuerdo con cualquiera de los siguientes (A) a (C): (A) una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; (B) una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene la eliminación, adición y/o sustitución de uno o varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y una actividad de catálisis de una reacción representada por la ecuación química 1 o 2; y (C) una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de 90% o mayor con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y una actividad de catálisis de una reacción representada por la ecuación química 1 o 2.

Un método de medición del ácido mevalónico convencional para medir con precisión una cantidad de ácido mevalónico en una muestra, comprendiendo el método al menos una de las siguientes etapas (i) a (iv):

(i) una etapa de permitir que una mevalonato quinasa actúe sobre el ácido mevalónico en la muestra en presencia de ATP, convirtiendo así el ácido mevalónico y el ATP en fosfato de ácido mevalónico y ADP;

25 (ii) una etapa de permitir que una hexoquinasa dependiente de ADP actúe en el ADP producido en la etapa (i) en presencia de glucosa, produciendo así glucosa-6-fosfato y AMP;

(iii) una etapa de permitir que una glucosa-6-fosfato deshidrogenasa actúe sobre la glucosa-6-fosfato producida en la etapa (ii) en presencia de un dinucleótido de adenina y nicotinamida oxidado (fosfato), produciendo así 6-fosfogluconolactona y un dinucleótido de adenina y nicotinamida reducido (fosfato); y

30 (iv) una etapa de medir el dinucleótido de adenina y nicotinamida reducido (fosfato) producido en la etapa (iii) usando absorbancia.

Un método de medición del ácido mevalónico convencional para medir con precisión el ácido mevalónico en una muestra, que comprende al menos una de las siguientes etapas (i) y (ii):

35 (i) una etapa de permitir que una hidroximetilglutaril-coenzima A reductasa actúe sobre el ácido mevalónico en la muestra en presencia de un dinucleótido de adenina y nicotinamida oxidado (fosfato) y coenzima A, produciendo así 3-hidroximetilglutaril-coenzima A y un dinucleótido de adenina y nicotinamida reducido (fosfato); y

(ii) una etapa de medir el dinucleótido de adenina y nicotinamida reducido (fosfato) producido en la etapa (i) usando absorbancia.

40 Un material de referencia del ácido mevalónico con un valor de precisión de la concentración de ácido mevalónico asignado por el método de medición convencional mencionado antes.

Efecto ventajoso de la invención

45 De acuerdo con la presente invención, el MVA y/o HMG-CoA en una muestra biológica que es un indicador de la cantidad de colesterol sintetizado en el cuerpo, o la CoA en una muestra biológica que es un indicador del metabolismo de lípidos en el cuerpo, se pueden medir de forma conveniente con ultra alta sensibilidad o alta precisión. La medición mencionada antes se puede llevar a cabo para muchas muestras usando un analizador automático para fines generales. Por lo tanto, muchas muestras se pueden medir con precisión en ensayos clínicos rutinarios y similares, lo cual es útil para el diagnóstico de afecciones patológicas y similares.

Breve descripción de los dibujos

50 Figura 1. La figura 1 es una gráfica que muestra los resultados de la medición del MVA usando la reacción cíclica enzimática en el ejemplo 21.

Figura 2. La figura 2 es una gráfica que muestra los resultados de la medición de HMG-CoA usando la reacción cíclica enzimática en el ejemplo 21.

Figura 3. La figura 3 es una gráfica que muestra los resultados de la medición de una actividad residual de HMGR-V en el ejemplo 25.

5 Figura 4. La figura 4 es una gráfica que muestra los resultados de la medición de una actividad residual de HMGR-D en el ejemplo 25.

Figura 5. La figura 5 es una gráfica que muestra los resultados de la medición de una actividad residual de HMGR-C en el ejemplo 25.

10 Figura 6. La figura 6 es una gráfica que muestra los resultados de la medición de una actividad residual de HMGR-P en el ejemplo 25.

Figura 7. La figura 7 es una gráfica que muestra los resultados de la medición de una actividad residual de HMGR-A en el ejemplo 25.

Figura 8. La figura 8 es una gráfica que muestra los resultados de la medición de una actividad relativa de HMGR-V a cada pH en el ejemplo 25.

15 Figura 9. La figura 9 es una gráfica que muestra los resultados de la medición de una actividad relativa de HMGR-D a cada pH en el ejemplo 25.

Figura 10. La figura 10 es una gráfica que muestra los resultados de la medición de una actividad relativa de HMGR-C a cada pH en el ejemplo 25.

20 Figura 11. La figura 11 es una gráfica que muestra los resultados de la medición de una actividad relativa de HMGR-P a cada pH en el ejemplo 25.

Figura 12. La figura 12 es una gráfica que muestra los resultados de la medición de una actividad relativa de HMGR-A a cada pH en el ejemplo 25.

Figura 13. La figura 13 es una gráfica que muestra los resultados del análisis de transcurso del tiempo de reacción usando el método de la MVK en el ejemplo 29.

25 Figura 14. La figura 14 es una gráfica que muestra los resultados del análisis de transcurso del tiempo de reacción usando el método de HMGR en el ejemplo 30.

Descripción de realizaciones

La presente invención se refiere a un método para medir un analito en una solución de ensayo usando una reacción cíclica enzimática representada por una combinación de la ecuación química 1:

30 Esquema 25

Ácido mevalónico + Coenzima A + 2 Aceptor de hidrógeno X → 3-Hidroximetilglutaril-coenzima A + 2 Aceptor de hidrógeno reducido X (Ecuación química 1)

y la ecuación química 2:

Esquema 26

Ácido mevalónico + Coenzima A + 2 Donador de hidrógeno oxidado Y → 3-Hidroximetilglutaril-coenzima A + 2 Donador de hidrógeno Y (Ecuación química 2)

35 En la presente memoria descriptiva, la expresión "solución de ensayo" significa una solución en la que están disueltos MVA, HMG-CoA y/o coenzima A, analitos en el método de medición de la presente invención. Puede ser una solución que contiene agua, ácidos, bases, iones metálicos, sacáridos, alcoholes, aminoácidos, proteínas, sales, componentes de tampón, tensioactivos, agentes quelantes y otros compuestos orgánicos. Los ejemplos de soluciones de ensayo de alimentos incluyen cervezas, zumos, extractos líquidos de alimentos sólidos, y soluciones acuosas diluidas de los mismos. Los ejemplos de soluciones de ensayo de muestras biológicas incluyen sangre, plasma, suero, fluidos intracelulares de células sanguíneas y similares, orina, saliva, lágrimas, extractos tisulares, y soluciones acuosas diluidas de los mismos. Los ejemplos también incluyen soluciones obtenidas por adición de aditivos tales como ácidos, bases, iones metálicos, sacáridos, alcoholes, aminoácidos, proteínas, sales, componentes de tampones, tensioactivos, agentes quelantes y otros compuestos orgánicos, a las soluciones de ensayo mencionadas antes, con el fin de mejorar la estabilidad de un analito, disminuir la fijación a un envase, mejorar la sensibilidad de la medición y similares.

40

45

Cuando una solución de ensayo es orina, como un indicado de la concentración de la orina, se mide la concentración de una sustancia de la orina, por ejemplo, la concentración de creatinina, y el valor obtenido dividiendo la concentración de MVA, HMG-CoA o CoA en la orina por la concentración de creatinina también se

puede usar como el indicador.

En la presente memoria descriptiva, la expresión “aceptor de hidrógeno” significa una sustancia que recibe un electrón en una reacción de oxidación de un sustrato por una enzima en un sentido amplio. Más específicamente, significa la sustancia que recibe un átomo de hidrógeno extraído de un sustrato. Los ejemplos de aceptores de hidrógeno incluyen dinucleótidos de adenina y nicotinamida oxidados, quinonas oxidadas, flavinas, indofenoles, compuestos de tetrazolio, moléculas de oxígeno, compuestos que tienen un grupo SH, tales como cisteína, ferredoxina, citocromo c3, y citocromo c6. Los ejemplos de dinucleótidos de adenina y nicotinamida oxidados incluyen dinucleótido de adenina y nicotinamida oxidado (en lo sucesivo denominado NAD), fosfato del dinucleótido de adenina y nicotinamida oxidado (en lo sucesivo denominado también NADP), dinucleótido de adenina y tionicotinamida oxidado (en lo sucesivo denominado también T-NAD), fosfato de dinucleótido de adenina y tionicotinamida oxidado (en lo sucesivo denominado también T-NADP), dinucleótido de adenina y nicotinamida acetilado oxidado y fosfato de dinucleótido de adenina y nicotinamida acetilado oxidado. Los ejemplos de flavinas incluyen FAD, FMN y riboflavina. Los ejemplos de indofenoles incluyen 2,6-diclorofenolindofenol. Los ejemplos de compuestos de tetrazolio incluyen azul de nitrotetrazolio, WST-1, WST-3, y WST-8

En la presente memoria descriptiva, la expresión “donador de hidrógeno” significa una sustancia que da un electrón en una reacción de reducción de un sustrato por una enzima en un sentido amplio. Más específicamente, significa la sustancia que proporciona un átomo de hidrógeno a un sustrato. Los ejemplos de donadores de hidrógeno incluyen dinucleótidos de adenina y nicotinamida reducidos, quinonas reducidas, riboflavinas reducidas y compuestos que tienen un enlace S-S, tales como glutatión. Los ejemplos de dinucleótidos de adenina y nicotinamida reducidos incluyen dinucleótido de adenina y nicotinamida reducido (en lo sucesivo denominado NADH), fosfato del dinucleótido de adenina y nicotinamida reducido (en lo sucesivo denominado también NADPH), dinucleótido de adenina y tionicotinamida reducido (en lo sucesivo denominado también T-NADH), fosfato de dinucleótido de adenina y tionicotinamida reducido (en lo sucesivo denominado también T-NADPH), dinucleótido de adenina y nicotinamida acetilado reducido y fosfato de dinucleótido de adenina y nicotinamida acetilado reducido.

El aceptor de hidrógeno en la presente memoria descriptiva también se puede denominar en general como un aceptor de electrones, que representa un estado en el que un electrón de un portador de electrones es aceptado fácilmente (oxidado). Mientras que el donador de hidrógeno en la presente memoria descriptiva también se puede denominar un donador de electrones, que representa en estado en el que un electrón de un portador de electrones es liberado fácilmente (reducido). Aquí, el portador de electrones es un nombre genérico de compuestos responsables de una reacción de transferencia de electrones y se puede denominar un portador de hidrógeno.

Los ejemplos del aceptor de hidrógeno X en la ecuación química 1 mencionada antes, incluyen oxígeno, quinonas oxidadas, y dinucleótidos de adenina y nicotinamida oxidados. Cuando la enzima que cataliza la reacción representada por la ecuación química 1 es HMGR, el aceptor de hidrógeno X se selecciona preferiblemente de un grupo de dinucleótidos de adenina y nicotinamida oxidados. Los ejemplos específicos de los mismos incluyen NAD, NADP, T-NAD, T-NADP, dinucleótido de adenina y nicotinamida acetilado oxidado y fosfato de dinucleótido de adenina y nicotinamida acetilado oxidado.

Los ejemplos de donador de hidrógeno Y en la ecuación química 2 mencionada antes incluyen quinonas reducidas y dinucleótidos de adenina y nicotinamida reducidos. Cuando la enzima que cataliza la reacción representada por la ecuación química 2 es HMGR, el donador de hidrógeno Y se selecciona preferiblemente de un grupo de dinucleótidos de adenina y nicotinamida reducidos. Los ejemplos específicos de los mismos incluyen NADH, NADPH, T-NADH, T-NADPH, dinucleótido de adenina y nicotinamida acetilado reducido y fosfato de dinucleótido de adenina y nicotinamida acetilado reducido.

Se usa preferiblemente una combinación de T-NAD y NADH, T-NAD y NADPH, T-NADP y NADH o T-NADP y NADPH como una combinación de un aceptor de hidrógeno X y un donador de hidrógeno Y en un método de medición que usa una reacción cíclica enzimática representada por una combinación de las ecuaciones químicas 1 y 2 catalizada por una enzima tal como la HMGR, en la que un analito es el MVA y/o HMG-Coa o CoA, puesto que la cantidad de T-NADH o T-NADPH producido por la reacción cíclica enzimática se puede medir por la absorbancia a la longitud de onda de 380 a 430 nm. Se puede seleccionar una combinación adecuada dependiendo de la reactividad de la enzima usada, tal como la HMGR. Por ejemplo, cuando se usa la HMGR derivada del género *Pseudomonas*, *Variovorax*, *Delftia*, *Comamonas*, o *Archaeoglobus* como la enzima, se prefiere una combinación de T-NAD y NADH.

El método de medición de la presente invención comprende la etapa de permitir que una enzima que cataliza las reacciones mencionadas antes representadas por las ecuaciones químicas 1 y 2 actúe en la solución de ensayo. Dichas enzimas no están particularmente limitadas siempre que las enzimas catalicen las reacciones representadas por las ecuaciones químicas 1 y 2 y lleven a cabo una reacción cíclica enzimática mediante una combinación de las mismas. Los ejemplos representativos de dichas enzimas incluyen una hidroximetilglutaril-coenzima A reductasa (HMGR).

La HMGR es una enzima que cataliza las reacciones representadas por las ecuaciones químicas 1 y 2, más específicamente, la reacción representada la ecuación química 11 y la reacción representada por 12, que es una

reacción inversa de la reacción representada por la ecuación química 11. Por lo tanto, se pueden usar todas las HMGR previamente descritas, tales como las HMGR presentes en mamíferos tales como seres humanos, ratones y ratas, levaduras, arqueas, eubacterias, y similares, en el método de medición de la presente invención. Además, como con el método de medición en el ejemplo 1 descrito más adelante, la actividad de la HMGR se puede determinar usando el reactivo de medición A. Puesto que la presencia o ausencia de la HMGR en un extracto de un tejido, una célula o similar se pueden confirmar fácilmente por esta medición, se puede descubrir una HMGR nueva, y la HMGR nueva se puede usar como la HMGR de la presente invención. Como HMGR nuevas, los autores de la invención descubrieron HMGR obtenidas de los géneros de *Pseudomonas*, *Variovorax*, *Delftia*, *Comamonas*, y *Archaeoglobus*, más específicamente, HMGR obtenidas de *Pseudomonas sp.* 1-MV (FERM BP-11063), *Variovorax sp.* 5-MV (FERM BP-11064), *Delftia sp.* 12-MV (FERM BP-11065), y *Comamonas sp.* 25-MV (FERM BP-11066).

Específicamente, la presente invención proporciona las cepas bacterianas mencionadas antes, *Pseudomonas sp.* 1-MV (FERM BP-11063), *Variovorax sp.* 5-MV (FERM BP-11064), *Delftia sp.* 12-MV (FERM BP-11065), y *Comamonas sp.* 25-MV (FERM BP-11066) y mutantes de estas cepas bacterianas cuyas secuencias de ADNr 16S tienen una homología de 95% o mayor, preferiblemente 97% o mayor, más preferiblemente 98% o mayor, además preferiblemente 98,5% o mayor, en particular preferiblemente 98,7% o mayor, que la de cualquiera de estas cepas bacterianas y que tienen una capacidad para producir una proteína que tiene una actividad de catálisis de la reacción de la ecuación química 1 o 2. Se sabe en general que las cepas bacterianas que tienen una secuencia de ADNr 16S de 97% o mayor, en particular, 98,7% o mayor homología, es muy probable que pertenezcan a la misma especie (*Microbiology Today* 2006; 33: 152-155).

Además, como enzima que cataliza las reacciones representadas por las ecuaciones químicas 1 y 2, también se puede usar una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos (si la HMGR tiene una dominio de transmembrana, preferiblemente una secuencia de aminoácidos que excluye una secuencia para la parte del dominio de transmembrana) que tiene una homología de 60% o mayor, preferiblemente 75% o mayor, más preferiblemente 90% o mayor, con la de un HMGR conocida (por ejemplo, HMGR mostrada en la tabla 1 de *Genome Biol.* 2004; 5(11): 248) y que cataliza las reacciones representadas por las ecuaciones químicas 1 y 2. Por ejemplo, las proteínas que tienen una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 1 a 3 tienen actividad de HMGR y por lo tanto, se pueden usar estas proteínas. Además, también se pueden usar enzimas que catalizan las reacciones representadas por las ecuaciones químicas 1 y 2 que tienen una secuencia de aminoácidos que incluye eliminación, adición y/o sustitución de uno o varios (por ejemplo de 1 a 9, más preferiblemente de 1 a 5) aminoácidos en una secuencia de aminoácidos obtenida por modificación de una secuencia de nucleótidos o una secuencia de aminoácidos de HMGR, o cualquiera de dichas secuencias de aminoácidos con la que se fusiona otra proteína o péptido para mejorar características tales como reactividad, estabilidad, productividad, y eficacia de purificación. También se pueden usar enzimas que catalizan las reacciones representadas por las ecuaciones químicas 1 y 2 que se obtienen por modificación química de HMGR con PEG o similares, o polimerización de HMGR para mejorar las características tales como reactividad y estabilidad. Cuando un inhibidor de la HMGR humana, tal como un fármaco de estatina, está contenido en una solución de ensayo, se puede usar HMGR que no es inhibida por el inhibidor o es inhibida en una cantidad mínima (por ejemplo, la HMGR que no deriva de seres humanos, HMGR alterada, HMGR modificada o similares), o se puede usar una concentración alta de HMGR de modo que la reacción no es afectada por el inhibidor. Por ejemplo, se puede usar la HMGR derivada de *Pseudomonas sp.* 1-MV (FERM BP-11063), porque está HMGR no es inhibida por la mevastatina o mevinolina.

Cuando la HMGR se usa como una enzima que cataliza las reacciones representadas por las ecuaciones químicas 1 y 2, la HMGR se puede producir de acuerdo con técnicas conocidas para los expertos en la técnica como se describe más adelante. Por ejemplo, se cultivan levaduras, arqueas, eubacterias y similares que producen HMGR para acumular HMGR en las células o para secretar HMGR en el caldo de cultivo, y después la HMGR se puede purificar de acuerdo con un método de purificación de enzimas. Las levaduras, hongos, arqueas, eubacterias y similares que producen HMGR se pueden cultivar en un medio adecuado para aumentar la cantidad de HMGR producida (un medio en el que se añaden extractos de levadura, fuentes de nitrógeno tales como cloruro amónico, fuentes de carbono tales como glucosa, sales y similares, en combinación, y si es necesario se añaden aditivos que pueden aumentar la producción de HMGR, tales como ácido mevalónico) en condiciones de cultivo adecuadas (se establecen el pH adecuado, temperatura, cantidad de oxígeno disuelto, y tiempo de cultivo). Los organismos genéticamente modificados que producen HMGR de forma eficaz, se pueden preparar preparando un fragmento en el que el gen de la HMGR se coloca en la dirección 3' de un promotor adecuado, conectando el fragmento a un plásmido de replicación autónoma, e introduciendo el plásmido en una bacteria tal como *Escherichia coli*, una levadura, un hongo, una célula de insecto, una célula de mamífero, y similares, o incorporando el fragmento en el ADN cromosómico de una bacteria tal como *Escherichia coli*, una levadura, un hongo, una célula de insecto o una célula de mamífero. Los genes y promotores de la HMGR se pueden obtener por clonación genómica de ADN o ADNc de organismos que tienen estos genes y promotores, usando métodos conocidos o sintetizando químicamente estos genes y promotores basándose en información de secuencia. Por ejemplo, la HMGR se puede expresar en una *Escherichia coli* recombinante preparando un fragmento en el que el gen de la HMGR está unido en la dirección 3' de promotores inducibles, tales como el promotor *lac*, promotor *trp*, promotor PL, y promotor T7, o promotores no inducibles, tales como promotor de piruvato oxidasa (en lo sucesivo denominado también promotor POP; véase la SEQ ID NO: 4 y bibliografía de patente 6), incorporando el fragmento en plásmidos multicopia de replicación autónoma, tales como pUC18 y pHSG396, e introduciendo plásmidos en *Escherichia coli*. Para purificar el HMGR

- acumulado en las células, las células microbianas se aíslan de un caldo de cultivo por filtración, centrifugación o similares, se suspenden en un tampón con pH adecuado (por ejemplo, pH de 5,0 a 8,0 para tampón de fosfato, o pH de 7,0 a 10,0 para tampón de Tris), con la adición de tensioactivos, sales metálicas, sacáridos, aminoácidos, polioles, agentes quelantes y similares, si es necesario, y se alteran con lisozima, presión osmótica, ultrasonidos, perlas de vidrio, prensa de French, homogeneización, o similares, y después se separa la materia insoluble por filtración, centrifugación o similares, para obtener una solución que contiene HMGR bruta. Para purificar la HMGR secretada de un caldo de cultivo, las células microbianas se separan de un caldo de cultivo por filtración, centrifugación o similares, para obtener una solución que contiene HMGR bruta. La HMGR purificada se puede obtener tratando la solución que contiene la HMGR bruta con medidas conocidas para purificar proteínas y enzimas.
- Por ejemplo, la HMGR se puede purificar seleccionando y usando adecuadamente en combinación métodos de purificación de enzimas, tales como precipitación fraccionada usando disolventes orgánicos tales como acetona y etanol, desalando usando sulfato de amonio o similares, tratamiento con calor, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrófoba, cromatografía de afinidad, cromatografía con hidroxipatito y filtración con gel. Se puede usar una solución obtenida por adición de sales, tensioactivos, sales de metales, sacáridos, aminoácidos, polioles, agentes quelantes, coenzimas y similares, a un tampón con pH adecuado, según sea necesario durante el procedimiento de purificación. La HMGR purificada se puede almacenar como una solución, un producto congelado, un producto liofilizado, o similares, con la adición de uno o más estabilizantes, tales como, por ejemplo, sales, componentes de tampones, tensioactivos, sales de metales, sacáridos, aminoácidos, polioles, agentes quelantes, coenzimas, y similares, en combinación si es necesario.
- Cuando un analito en una solución de ensayo es MVA y/o HMG-CoA, en una etapa de permitir que actúe una enzima que cataliza las reacciones representadas por las ecuaciones químicas 1 y 2, se pueden seleccionar de forma adecuada coenzima A, dinucleótidos de adenina y nicotinamida oxidados, dinucleótidos de adenina y nicotinamida reducidos, ácidos, álcalis, componentes de tampones, sales, tensioactivos, agentes quelantes, iones metálicos, sacáridos, aminoácidos, péptidos, proteínas, ácidos nucleicos, colorantes, alcoholes, polioles, disolventes orgánicos, conservantes y similares, y se pueden añadir cantidades adecuadas de estos componentes como componentes de una mezcla de reacción usada para permitir que la enzima actúe, de modo que pueda avanzar adecuadamente una reacción cíclica enzimática representada por una combinación de reacciones representadas por las ecuaciones químicas 1 y 2, y que se eviten influencias de las impurezas derivadas de las materias primas que constituyen la solución de ensayo o la mezcla de reacción.
- Más adelante se citan ejemplos más específicos de sustancias que se pueden añadir a la mezcla de reacción mencionada antes, pero dichas sustancias no se limitan a estos ejemplos. Los ejemplos de dinucleótidos de adenina y nicotinamida oxidados y dinucleótidos de adenina y nicotinamida reducidos incluyen las sustancias mencionadas antes. Los ejemplos de ácidos incluyen ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, ácido cítrico y ácido acético. Los ejemplos de álcalis incluyen hidróxido sódico, hidróxido potásico, amoniaco, etanolamina y etilendiamina. Los ejemplos de componentes de tamponamiento incluyen tampones de acetato, tampones de citrato, tampones de fosfato, tampones de carbonato, tampones de borato, tampones de etanolamina, tampones de aminoácidos tales como tampón de glicina, tampones de Tris, y tampones de Good tales como HEPES, PIPES, CAPS y CAPSO. Los ejemplos de sales incluyen sales de sodio inorgánicas y orgánicas tales como cloruro sódico, sulfato sódico, carbonato sódico, bicarbonato sódico, acetato sódico y nitrato sódico y sales de potasio similares, sales de amonio y sales de litio. Se prefieren los componentes de tampones y sales que comprenden iones carbonato e iones hidrogenocarbonato para evitar la influencia del dióxido de carbono en la atmósfera cuando el reactivo líquido tiene pH alto (por ejemplo, pH 8,5 o mayor o pH 9,0 o mayor). Los ejemplos de tensioactivos incluyen tensioactivos aniónicos tales como SDS y SLS, tensioactivos catiónicos tales como DTAC, tensioactivos anfólicos tales como palmitoil-lisolecitina, CHAPS y CHAPSO, tensioactivos no iónicos tales como Triton y Tween, tensioactivos que tiene una cadena principal de esteroide tales como DOC, tensioactivos que tienen una cadena principal de azúcar, tales como n-decil- β -D-maltósido o n-octil- β -D-glucósido, y tensioactivos tales como sales de N-acil-aminoácido y carboxilatos de éteres de alquilo. Los ejemplos de agentes quelantes incluyen EDTA, EGTA, IDA, NTPO y TPEN. Los ejemplos de iones metálicos incluyen metales tales como sodio, potasio, litio, magnesio, calcio, cinc, hierro, oro, plata y cobre. Los ejemplos de sacáridos incluyen monosacáridos y polisacáridos, tales como glucosa, fructosa, xilosa, inositol, sorbitol, sacarosa y trehalosa. Los ejemplos de aminoácidos incluyen D y L-aminoácidos, tales como glicina, alanina, ornitina y norleucina. Los ejemplos de péptidos incluyen péptidos que tienen una longitud de aproximadamente 2 a 10 aminoácidos, tales como, por ejemplo, dipéptidos, tripéptidos e hidrolisados de proteínas obtenidos mediante proteasas. Los ejemplos de proteínas incluyen lisozimas, albúmina, sericina, caseína, catalasa y peroxidasa. Los ejemplos de ácidos nucleicos incluyen varios desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos. Los ejemplos de colorantes incluyen clorofila, clorofilina, tartrazina, azul de metileno, rojo de metilo y fenoltaleína. Los ejemplos de alcoholes incluyen metanol, etanol y octanol. Los ejemplos de polioles incluyen etilenglicol, glicerol y propilenglicol. Los ejemplos de disolventes orgánicos incluyen dimetilsulfóxido, dimetilformamida y fenol. Los ejemplos de conservantes incluyen sustancias antibacterianas tales como azida sódica, Kathon CG y Proclin, sustancias bacteriostáticas y antibióticos tales como kanamicina.
- Cuando un analito en una solución de ensayo es MVA y/o HMG-CoA, en la etapa de permitir que actúe una enzima que cataliza una reacción representada por las ecuaciones químicas 1 y 2, las condiciones de reacción de la enzima se pueden ajustar de forma adecuada. Por ejemplo, se puede usar como una temperatura de reacción de 20°C a 55°C, preferiblemente de 25°C a 45°C, más preferiblemente de 30°C a 40°C, se puede usar como tiempo de

reacción de 1 min a 2 horas, preferiblemente de 3 min a 35 min, más preferiblemente de 5 min a 31 min, y se puede usar como pH un pH de 6,0 a 11,0, preferiblemente pH de 7,0 a 11,0, más preferiblemente pH de 7,5 a 11,0, además preferiblemente pH de 8,5 a 10,5. Además, la concentración de un componente de tampón basado en un volumen total de una mezcla de reacción puede ser de 5 a 500 mM, preferiblemente de 10 a 200 mM, más preferiblemente de 20 a 100 mM, por ejemplo, cuando se usa el tampón de Tris, tampón de Hepes, tampón de fosfato, tampón de carbonato, tampón de glicina, tampón de CAPS o tampón de CAPSO. La concentración de coenzima A puede ser de 0,001 a 20 mM, preferiblemente de 0,01 a 10 mM, más preferiblemente de 0,1 a 5 mM.

Cuando un analito en una solución de ensayo es MVA y/o HMGO-CoA, y el aceptor de hidrógeno X es T-NAD(P), la concentración del aceptor de hidrógeno X basada en el volumen total de la mezcla de reacción es de 0,01 a 20 mM, preferiblemente de 0,1 a 10 mM, más preferiblemente de 0,2 a 4 mM, preferiblemente de 0,5 a 8 mM, en la etapa de permitir que actúe una enzima que cataliza las reacciones representadas por las ecuaciones químicas 1 y 2. Cuando un donador de hidrógeno Y es NAD(P)H, la concentración del donador de hidrógeno Y es de 0,001 a 5 mM, preferiblemente de 0,01 a 2 mM, más preferiblemente de 0,02 a 1 mM. Cuando la enzima que cataliza las reacciones representadas por las ecuaciones químicas 1 y 2 es HMGR, la concentración de la enzima basada en el volumen total de la mezcla de reacción se puede ajustar para lograr la sensibilidad adecuada, y es de 1 a 1000 U/ml, preferiblemente de 10 a 500 U/ml, más preferiblemente de 20 a 200 U/ml, por ejemplo. Aquí, una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de una enzima necesaria para producir 1 micromol de NADH por minuto a 37°C, en presencia de MVA, CoA y NAD.

Los ejemplos de métodos para medir la cantidad de un aceptor de hidrógeno reducido X o un donador de hidrógeno oxidado Y que se produce en la etapa de permitir que actúe la enzima, o la cantidad del aceptor de hidrógeno X o un donador de hidrógeno Y que disminuye en la etapa, incluyen métodos que usan análisis colorimétricos, fluorescencia, quimiluminiscencia o bioluminiscencia, métodos para medir el voltaje o una corriente usando electrodos, tales como voltametría o amperometría, y en vista de una medición conveniente, se desea un método que use análisis colorimétrico. Por ejemplo, cuando un aceptor de hidrógeno reducido X es T-NADH o T-NADPH, se desea el análisis colorimétrico de absorbancia a una longitud de onda de 380 a 430 nm. En la presente memoria descriptiva, la expresión "análisis colorimétrico" también se llama espectrometría de absorción o fotometría de absorción y es un método de medición de la absorbancia pasando una luz que tiene una longitud de onda particular (por ejemplo, una luz que tiene una longitud de onda de 340 ± 5 nm) a través de una solución de analito, y determinando la concentración de una sustancia presente en la solución de analito a partir de la absorbancia obtenida de acuerdo con la ley de Lambert-Beer.

Incluso cuando la concentración de un analito en una solución de ensayo es muy baja, la concentración se puede medir con ultra alta sensibilidad y alta precisión, en el método de medición de la presente invención. Por ejemplo, cuando un analito en una solución de ensayo es MVA y/o HMG-CoA, la concentración de MVA y/o HMG-CoA en la solución de ensayo es al menos la concentración mínima del límite de detección y 1000 nM o menor, preferiblemente 500 nM o menor, más preferiblemente 250 nM o menor, además preferiblemente 100 nM o menor, y además más preferiblemente 50 nM o menor. Aquí, la concentración mínima del límite de detección de MVA y/o HMG-CoA en una solución de ensayo es 20 nM o menor, preferiblemente 10 nM o menor, más preferiblemente 5 nM o menor, además preferiblemente 2,5 nM o menor, además más preferiblemente 0,5 nM o menor. La expresión "concentración mínima del límite de detección" usada en la presente memoria, representa la concentración mínima a la que el intervalo de la media ± 3 SD obtenido por varias mediciones de soluciones de ensayo que tienen una serie de varias concentraciones no solapa con el intervalo de la media ± 3 SD obtenido por medición de la solución de ensayo que tiene una concentración de 0, usando la misma técnica. Aquí, SD se refiere a la desviación estándar.

Cuando un analito en una solución de ensayo es CoA, en la etapa de permitir que actúe una enzima que cataliza las reacciones representada por las ecuaciones químicas 1 y 2, la mezcla de reacción mencionada antes en la que el analito es MVA y/o HMG-CoA, se puede usar como la mezcla de reacción para la acción enzimática sustituyendo la CoA por MVA. Aquí la concentración de MVA puede ser de 0,0005 a 10 mM, preferiblemente de 0,005 a 2,5 mM, más preferiblemente de 0,05 a 0,5 mM. Aunque se puede usar D,L-MVA, la concentración de D,L-MVA es aproximadamente el doble de la concentración de MVA mencionada antes, que es un indicador usado en la presente invención.

Además, la concentración de un analito en una solución de ensayo se puede medir con sensibilidad ultra alta y precisión alta, en el método de medición de la presente invención. Cuando el analito en la solución de ensayo es CoA, la concentración de CoA en la solución de ensayo es, por lo tanto, al menos la concentración mínima del límite de detección y 10 μ M o menor, preferiblemente 5000 nM o menor, más preferiblemente 1000 nM o menor, además preferiblemente 500 nM o menor. Aquí, la concentración mínima del límite de detección en la solución de ensayo es 100 nM o menor, preferiblemente 50 nM o menor. La expresión "concentración mínima del límite de detección" usada en la presente memoria, representa la concentración mínima a la que el intervalo de la media ± 3 SD obtenido por varias mediciones de soluciones de ensayo que tienen una serie de varias concentraciones no solapa con el intervalo de la media ± 3 SD obtenido por medición de la solución de ensayo que tiene una concentración de 0, usando la misma técnica.

En el método de medición de acuerdo con la presente invención, cuando un analito en una solución de ensayo es MVA o HMG-CoA, y tanto el MVA como el HMG-CoA están presentes en la solución de ensayo, se obtiene mediante

la medición la suma de las concentraciones de ambas sustancias, pero no se puede obtener la concentración de MVA o HMG-CoA solo. Por consiguiente, cuando están presentes el MVA y la HMG-CoA en una solución de ensayo, y se va a medir la concentración de HMG-CoA sola, es conveniente que: 1) se preparen dos muestras, es decir, una muestra de la que se ha separado la HMG-CoA en la solución de ensayo y una muestra de la que no se ha separado la HMG-CoA, y se permite que actúe una enzima que cataliza las reacciones representada por las ecuaciones químicas 1 y 2 en ambas muestras, y la concentración de HMG-CoA en la solución de ensayo se calcula a partir de la diferencia entre estas mediciones; o 2) la etapa de separar el MVA de la solución de ensayo se lleve a cabo antes de la etapa de permitir que actúe una enzima que cataliza las reacciones representada por las ecuaciones químicas 1 y 2, en la solución de ensayo. El apartado 1) anterior se puede llevar a cabo preparando una muestra obtenida separando la HMG-CoA de la solución de ensayo mediante la etapa de separación de la HMG-CoA de una solución de ensayo descrita más adelante. La etapa de separar el MVA de la solución de ensayo del apartado 2) anterior no está particularmente limitada siempre que el MVA se pueda separar sin separar la HMG-CoA, que es el analito. Por ejemplo, se puede usar un método de tratamiento de una solución de ensayo con un adsorbente específico para el MVA o una membrana selectiva para el MVA, un método de conversión del MVA en una sustancia que no está implicada en la reacción representada por la ecuación química 1, y similares. Los ejemplos del método de conversión del MVA en una sustancia que no está implicada en la reacción representada por la ecuación química 1, incluye métodos que usan una reacción enzimática. Por ejemplo, como se muestra en la siguiente ecuación química 21:

Esquema 27

20 $\text{Ácido mevalónico} + \text{ATP} \rightarrow \text{Fosfato de ácido mevalónico} + \text{ADP}$ (Ecuación química 21)

el MVA se convierte en fosfato de ácido mevalónico, que no está implicado en la reacción representada por la ecuación química 1, usando una enzima en presencia de un donador de fosfato tal como el ATP y un ion magnesio o un ion manganeso. Los ejemplos de la enzima incluyen la mevalonato quinasa (EC2.7.1.36: en lo sucesivo denominada MVK). En la etapa de separar el MVA mediante una reacción enzimática se pueden optimizar el pH, tampón, concentración de sales y similares de la mezcla de reacción. Además, se pueden añadir fosfomevalonato quinasa (EC2.7.4.2), que fosforila más el fosfato del ácido mevalónico producido por la ecuación química 21, fosfoenolpiruvato y piruvato quinasa para separar el ADP, o glucosa y hexoquinasa dependiente de ADP, según sea necesario.

30 Cuando se lleva a cabo la etapa de separar el MVA en una solución de ensayo usando una reacción enzimática (por ejemplo, MVK) como se ha descrito antes, y la solución de ensayo se somete como está a una reacción cíclica enzimática representada por una combinación de las ecuaciones químicas 1 y 2, la enzima mencionada antes (por ejemplo MVK) actúa sobre el MVA que se convierte en HMG-CoA por la ecuación química 2. Por lo tanto, después de la etapa de separar el MVA de la solución de ensayo usando una reacción enzimática es deseable separar la enzima usada o terminar la reacción de la enzima. Por ejemplo, la enzima se puede separar por ultrafiltración usando una membrana. Cuando la enzima es MVK, por ejemplo, la MVK se puede separar sin separar la HMG-CoA por ultrafiltración usando una membrana que tiene un corte de exclusión de peso molecular de 5000 a 30.000. Además, para terminar la reacción de la enzima, se pueden usar métodos para inactivar la enzima requerida sin degradar la HMG-CoA, tales como tratamiento con calor, tratamiento con ácido, tratamiento con álcali y la adición de una sustancia que inactiva la enzima, métodos de añadir una sustancia que inhibe la actividad de una enzima prevista (por ejemplo, MVK) pero no inhibe la actividad de una enzima que cataliza las reacciones de las ecuaciones químicas 1 y 2 (por ejemplo, HMGR) a la mezcla de reacción, y similares. Los ejemplos de una sustancia que inhibe una reacción de la MVK, pero no inhibe una reacción cíclica enzimática de la HMGR, incluyen agentes quelantes que forman un quelato con un ion magnesio (por ejemplo, EDTA, EGTA y NTA). De los métodos mencionados antes de separación de una enzima o métodos de terminación de la reacción de la enzima, son preferidos los métodos que usan tratamiento con álcali y los métodos de adición de un agente quelante, porque no se requiere un procedimiento de aislamiento, y se pueden llevar a cabo una serie de procedimientos en el mismo recipiente de reacción usando un analizador automático. La expresión "procedimiento de aislamiento" usado en la presente memoria, se refiere a un procedimiento de cromatografía en columna, un procedimiento de filtración con membrana, un procedimiento de aislamiento por adsorción, un procedimiento de aislamiento por extracción, un procedimiento de aislamiento por precipitación, y similares, que se llevan a cabo durante una serie de etapas de medición de la HMG-CoA en una solución de ensayo.

La enzima que se puede usar en la etapa de separación del MVA no está limitada siempre que la enzima pueda convertir el MVA en una sustancia que no está implicada en la reacción representada por la ecuación química 1. Por ejemplo, se puede usar una enzima que cataliza la reacción representada por la ecuación química 21. Los ejemplos específicos de dichas enzimas incluyen MVK derivadas de mamíferos tales como seres humanos, ratones y ratas, de eucariotas tales como levaduras y de procariotas tales como *Enterococcus faecalis*. Además las proteínas que tienen una secuencia de aminoácidos de homología de 60% o mayor, preferiblemente 75% o mayor, más preferiblemente 90% o mayor con las secuencias de aminoácidos de las MVK y que pueden separar el MVA por una reacción enzimática, también se pueden seleccionar y usar adecuadamente como las enzimas, teniendo en cuenta la estabilidad, reactividad, productividad y similares, de estas enzimas. Por ejemplo, una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 5 derivada de *Saccharomyces cerevisiae* (*Curr. Genet.* 1991 Jan; 19[1]: 9-14) es una enzima que cataliza la reacción representada

por la ecuación química 21, y, por lo tanto, se puede usar. Además, también se pueden usar enzimas que pueden separar el MVA por una reacción enzimática, que se obtienen por modificación de una secuencia de nucleótidos o una secuencia de aminoácidos de la MVK para incluir la eliminación, adición y/o sustitución en la secuencia de aminoácidos, para mejorar las características tales como reactividad, estabilidad, productividad y eficacia de la purificación. También se pueden usar enzimas que pueden separar el MVA por una reacción enzimática, en la que la MVK es modificada químicamente con PEG o similar, o se polimeriza para mejorar características tales como la reactividad y estabilidad.

Las enzimas que se pueden usar en la etapa de separar el MVA, se pueden producir de acuerdo con técnicas conocidas para los expertos en la técnica, como se ha descrito antes sobre la producción de HMGR. Por ejemplo, la MVK se produce por cultivo de levaduras, arqueas, eubacterias y similares, para producir MVK para acumular MVK en las células o secretar la MVK en el caldo de cultivo, y después la MVK se puede purificar de acuerdo con métodos comunes de purificación de enzimas.

Cuando se usa una reacción enzimática en la etapa de separar el MVA de una solución de ensayo, se pueden seleccionar adecuadamente como componentes donadores de fosfato, compuestos de magnesio, ácidos, álcalis, componentes de tampones, sales, tensioactivos, agentes quelantes, iones metálicos, sacáridos, aminoácidos, péptidos, proteínas, ácidos nucleicos, colorantes, alcoholes, polioles, disolventes orgánicos, conservantes y similares, y añadir en cantidades adecuadas a la mezcla de reacción además de la enzima, de modo que el MVA debe ser separado de forma adecuada por la enzima y se pueden evitar influencias de impurezas derivadas de materias primas que constituyen la solución de ensayo y la mezcla de reacción. Como donadores de fosfato, se pueden usar nucleótidos tales como GTP, CTP, TTP, UTP y ITP, además de ATP. Los compuestos de magnesio no están limitados siempre que estos compuestos contengan iones magnesio y se puede usar sulfato de magnesio, cloruro de magnesio, acetato de magnesio, nitrato de magnesio y similares. También se pueden usar compuestos de manganeso en lugar de compuestos de magnesio.

Cuando se usa una reacción enzimática en la etapa de separar el MVA de una solución de ensayo, las condiciones de reacción se pueden ajustar de forma adecuada. Por ejemplo, se puede usar como la temperatura de reacción de 20°C a 55°C, preferiblemente de 25°C a 45°C, más preferiblemente de 30°C a 40°C, se puede usar como tiempo de reacción de 0,5 min a 24 horas, preferiblemente de 1 min a 30 min, más preferiblemente de 1 min a 5 min, y se puede usar como pH un pH de 6,0 a 11,0, preferiblemente pH de 7,5 a 11,0, más preferiblemente pH de 8,5 a 10,5. Además, la concentración de un componente de tampón en el volumen total de la mezcla de reacción puede ser de 5 a 500 mM, preferiblemente de 10 a 200 mM, más preferiblemente de 20 a 100 mM, por ejemplo, cuando se usa el tampón de Tris, tampón de Hepes, tampón de fosfato, tampón de carbonato, tampón de glicina, tampón de CAPS o tampón de CAPSO. Cuando el donador de fosfato es ATP, la concentración puede ser de 0,01 a 20 mM, preferiblemente de 0,1 a 10 mM. Cuando el compuesto de magnesio es cloruro de magnesio, su concentración puede ser de 0,01 a 20 mM, preferiblemente de 0,1 a 10 mM, y la concentración de MVK puede ser de 0,01 a 1000 U/ml, preferiblemente de 0,1 a 10 U/ml. Aquí, una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de una enzima necesaria para producir 1 micromol de NADH por minuto a 37°C, en presencia de MVA, ATP, NAD, glucosa, hexoquinasa dependiente de ADP, y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

Cuando una reacción enzimática se termina por tratamiento con álcali después de usar la reacción enzimática en la etapa de separar el MVA de una solución de ensayo, por ejemplo, se añade NaOH a la mezcla de reacción en una concentración de 0,01 a 0,5 M, preferiblemente de 0,02 a 0,2 M para ajustar el pH a un nivel mayor y de esta forma inactivar la enzima. Después de 0,1 a 10 minutos, preferiblemente de 0,5 a 5 min, se añade a la mezcla de reacción un tampón tal como glicina, en una concentración de 0,01 a 0,5 M, preferiblemente de 0,02 a 0,2 M, y se añade a la mezcla de reacción un ácido tal como ácido cítrico en una concentración de 0,005 a 0,1 M, preferiblemente de 0,01 a 0,05 M, para ajustar el pH, de modo que pueda reaccionar la enzima que cataliza las reacciones representadas por las ecuaciones químicas 1 y 2. Después, se deja que actúe la enzima que cataliza las reacciones representadas por las ecuaciones químicas 1 y 2, y se puede medir la concentración de HMG-CoA.

Además, cuando se añade EDTA como un agente quelante para inhibir una reacción de una enzima después de usar una reacción enzimática en la etapa de separar el MVA de una solución de ensayo, el EDTA se añade en una cantidad molar de 0,5 a 50 veces, preferiblemente de 1 a 20 veces la cantidad molar de los iones magnesio añadidos a la mezcla de reacción para la reacción enzimática. Después, se deja que actúe la enzima que cataliza las reacciones representadas por las ecuaciones químicas 1 y 2, y se puede medir la concentración de HMG-CoA.

Cuando el MVA está contenido en un reactivo de medición para medir el MVA y/o HMG-CoA, se puede usar la técnica mencionada antes para separar el MVA y obtener un reactivo de medición que no contiene sustancialmente MVA. Cuando se usa MVK, por ejemplo, en la técnica mencionada antes: se puede usar una técnica de llevar a cabo una reacción enzimática que usa de 1 a 100 días, preferiblemente de 1 a 30 días como tiempo de reacción, de 2°C a 20°C como la temperatura de la reacción, y de 0,0001 a 1 U/ml como la concentración de MVK; o una técnica de llevar a cabo una reacción enzimática que usa de 1 min a 3 h como tiempo de reacción, de 25°C a 40°C como la temperatura de reacción, y de 0,001 a 10 U/ml como la concentración de MVK (por ejemplo, véanse los ejemplos 18 y 19 descritos más adelante). Por ejemplo, se puede usar un reactivo de medición que contiene MVA disminuido al 50% o menor, preferiblemente al 30% o menor, más preferiblemente al 20% o menor, comparado con antes de la separación del MVA. Cuando el reactivo de medición así obtenido se usa para medir el MVA y/o HMG-CoA, la

reacción del blanco disminuye, y mejora la relación S/N, y por lo tanto, se mejora la sensibilidad de la medición.

5 Cuando están presentes tanto el MVA como la HMG-CoA en una solución de ensayo en el método de medición de acuerdo con la presente invención, y solo se va a medir la concentración de MVA: 1) se preparen dos muestras, es decir, una muestra obtenida separando el MVA de la solución de ensayo y una muestra de la que no se ha separado el MVA, y se permite que actúe una enzima que cataliza las reacciones representada por las ecuaciones químicas 1 y 2 en ambas muestras, y la concentración de MVA en la solución de ensayo se calcula a partir de la diferencia entre las cantidades medidas de estas muestras; o 2) es conveniente llevar a cabo la etapa de separar la HMG-CoA de la solución de ensayo antes de la etapa de permitir que actúe una enzima que cataliza las reacciones representada por las ecuaciones químicas 1 y 2, en la solución de ensayo. En el apartado 1) anterior, una muestra obtenida separando el MVA de la solución de ensayo se puede preparar usando la etapa de separación de MVA descrita antes de la solución de ensayo. La etapa de separar la HMG-CoA de la solución de ensayo para el apartado 2) anterior no está particularmente limitada siempre que la HMG-CoA se pueda separar sin separar el MVA, que es el analito, y los ejemplos de los mismos incluyen métodos de tratamiento de una solución de ensayo con un adsorbente específico para la HMG-CoA o una membrana selectiva para la HMG-CoA y métodos de conversión de la HMG-CoA en una sustancia que no está implicada en la reacción representada por la ecuación química 2. Los ejemplos de los métodos de conversión de la HMG-CoA en una sustancia que no está implicada en la reacción representada por la ecuación química 2, incluye métodos que usan una reacción enzimática. Los ejemplos de métodos que usan una reacción enzimática incluyen, un método de conversión de la HMG-CoA en ácido acetoacético y acetil-coenzima A usando una enzima tal como la hidroximetilglutaril-coenzima A liasa (EC4.1.3.4: en lo sucesivo denominada HMGL), como se muestra en la siguiente ecuación química 22:

Esquema 28

3-Hidroximetilglutaril-coenzima A \rightarrow ácido acetoacético + acetil-coenzima A (Ecuación química 22)

un método de conversión de la HMG-CoA en ácido 3-hidroximetilglutárico y coenzima A usando una enzima tal como la hidroximetilglutaril-coenzima A hidrolasa (EC3.1.2.5), como se muestra en la siguiente ecuación química 23:

25 Esquema 29

3-Hidroximetilglutaril-coenzima A + H₂O \rightarrow ácido 3-hidroximetilglutárico + coenzima A (Ecuación química 23);

y un método de conversión de la HMG-CoA en acetil-coenzima A y acetoacetil-coenzima A usando una enzima tal como la hidroximetilglutaril-coenzima A sintasa (EC2.3.3.10), como se muestra en la siguiente ecuación química 24:

Esquema 30

30 3-Hidroximetilglutaril-coenzima A + coenzima A \rightarrow acetoacetil-coenzima A + acetil-coenzima A + H₂O (Ecuación química 24).

En la etapa de separar la HMG-CoA por una reacción enzimática, se pueden optimizar el pH, tampón, concentración de sales, y similares de la mezcla de reacción. Además, se puede añadir si es necesario una enzima que actúa además en un producto (por ejemplo, ácido acetoacético descarboxilasa (EC4.1.1.4), que degrada el ácido acetoacético producido por la ecuación química 22, en dióxido de carbono y ácido acético).

35 Cuando se lleva a cabo la etapa de separar la HMG-CoA de una solución de ensayo usando una reacción enzimática (por ejemplo, HMGL) como se ha descrito antes, y la solución de ensayo se somete como está a una reacción cíclica enzimática representada por una combinación de las ecuaciones químicas 1 y 2, la enzima mencionada antes (por ejemplo HMGL) actúa sobre la HMG-CoA que se convierte en MVA por la ecuación química 1. Por lo tanto, después de la etapa de separar la HMG-CoA de la solución de ensayo usando una reacción enzimática, es deseable separar la enzima usada o terminar la reacción de la enzima. Por ejemplo, la enzima se puede separar por ultrafiltración usando una membrana. Cuando la enzima es HMGL, por ejemplo, la HMGL se puede separar por ultrafiltración usando una membrana que tiene un corte de exclusión de peso molecular de 5000 a 30.000, sin separar el MVA. Además, para terminar la reacción de la enzima, se pueden usar métodos para inactivar una enzima prevista sin degradar el MVA, tales como tratamiento con calor, tratamiento con ácido, tratamiento con álcali y la adición de una sustancia que inactiva la enzima, métodos de añadir una sustancia que inhibe la actividad de una enzima prevista (por ejemplo, HMGL) pero no inhibe la actividad de una enzima que cataliza las reacciones representadas por las ecuaciones químicas 1 y 2 (por ejemplo, HMGR) a la mezcla de reacción, y similares. De los métodos mencionados antes de separación de la enzima o de terminación de la reacción de la enzima, se prefiere el método por tratamiento con álcali, porque no se requiere un procedimiento de aislamiento, y se pueden llevar a cabo una serie de procedimientos en el mismo recipiente de reacción usando un analizador automático. La expresión "procedimiento de aislamiento" usado en la presente memoria, se refiere a un procedimiento de cromatografía en columna, un procedimiento de filtración con membrana, un procedimiento de aislamiento por adsorción, un procedimiento de aislamiento por extracción, un procedimiento de aislamiento por precipitación, y similares, durante una serie de etapas de medición del MVA en una solución de ensayo.

La enzima que se puede usar en la etapa de separar la HMG-CoA no está limitada siempre que la enzima pueda

convertir la HMG-CoA en una sustancia que no está implicada en la reacción representada por la ecuación química 2. Por ejemplo, se pueden usar las enzimas mencionadas antes que catalizan las reacciones representadas por las ecuaciones químicas 22 a 24. Los ejemplos específicos de dichas enzimas incluyen HMGL obtenida de mamíferos, tales como seres humanos, ratones y ratas, y de procariotas tales como *Pseudomonas mevalonii*. Además las proteínas que tienen una secuencia de aminoácidos de homología de 60% o mayor, preferiblemente 75% o mayor, más preferiblemente 90% o mayor con las secuencias de aminoácidos de estas HMGL y que puedan separar la HMG-CoA por una reacción enzimática, también se pueden seleccionar y usar adecuadamente como las enzimas, teniendo en cuenta la estabilidad, reactividad, productividad y similares, de estas enzimas. Por ejemplo, los autores de la invención encontraron que una proteína derivada de *Pseudomonas putida* KT2440 (ATCC47054) que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, que tiene una homología de 60% con la HMGL derivada de *Pseudomonas mevalonii* que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 (*J Bacteriol.* 1989 Dec; 171(12): 6468-72), es una enzima que cataliza la reacción representada por la ecuación química 22. Por lo tanto, se puede usar esta enzima. Además, también se puede usar una enzima que pueda separar la HMG-CoA por una reacción enzimática, y que se obtenga por modificación de una secuencia de nucleótidos o una secuencia de aminoácidos de la HMGL para incluir eliminación, adición y/o sustitución en la secuencia de aminoácidos, para así mejorar características tales como la reactividad, estabilidad, productividad y eficacia de la purificación. También se pueden usar enzimas que pueden separar la HMG-CoA por una reacción enzimática, en la que la HMGL es modificada químicamente con PEG o similar, o se polimeriza para mejorar características tales como la reactividad y estabilidad.

Las enzimas que se pueden usar en la etapa de separar la HMG-CoA, se pueden producir de acuerdo con técnicas conocidas para los expertos en la técnica, como se ha descrito antes sobre la producción de HMGR. Por ejemplo, la HMGL se produce por cultivo de levaduras, arqueas, eubacterias y similares, que producen HMGL para acumular HMGL en las células o secretar la HMGL en el caldo de cultivo, y después la HMGL se puede purificar de acuerdo con métodos comunes de purificación de enzimas.

Cuando se usa una reacción enzimática en la etapa de separar la HMG-CoA de una solución de ensayo, se pueden seleccionar adecuadamente como componentes ácidos, álcalis, componentes de tampones, sales, tensioactivos, agentes quelantes, iones metálicos, sacáridos, aminoácidos, péptidos, proteínas, ácidos nucleicos, colorantes, alcoholes, polioles, disolventes orgánicos, conservantes y similares, y añadir en cantidades adecuadas a la mezcla de reacción además de una enzima, de modo que la HMG-CoA debe ser separada de forma adecuada por la enzima y se pueden evitar influencias de impurezas derivadas de materias primas que constituyen la solución de ensayo y la mezcla de reacción.

Cuando se usa una reacción enzimática en la etapa de separar el MVA de una solución de ensayo, las condiciones de reacción se pueden ajustar de forma adecuada. Por ejemplo, se puede usar como temperatura de reacción de 20°C a 55°C, preferiblemente de 25°C a 45°C, más preferiblemente de 30°C a 40°C, se puede usar como tiempo de reacción de 0,5 min a 24 horas, preferiblemente de 1 min a 30 min, más preferiblemente de 1 min a 5 min, y se puede usar como pH un pH de 6,0 a 11,0, preferiblemente pH de 7,5 a 11,0, más preferiblemente pH de 8,5 a 10,5. Además la concentración de un componente de tampón en el volumen total de la mezcla de reacción puede ser de 0,1 a 500 mM, preferiblemente de 1 a 100 mM, más preferiblemente de 3 a 50 mM, por ejemplo, cuando se usa el tampón de Tris, tampón de Hepes, tampón de fosfato, tampón de carbonato, tampón de glicina, tampón de CAPS o tampón de CAPSO. La concentración de HMGL puede ser de 0,01 a 1000 U/ml, preferiblemente de 0,1 a 10 U/ml. Aquí, una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de una enzima necesaria para disminuir 1 micromol de NADH por minuto a 37°C, en presencia de HMG-CoA, NADH, y 3-hidroxitubirato deshidrogenasa.

Cuando la reacción enzimática se termina por tratamiento con álcali después de usar una reacción enzimática en la etapa de separar la HMG-CoA de una solución de ensayo, por ejemplo, se añade NaOH a la mezcla de reacción en una concentración de 0,01 a 0,5 M, preferiblemente de 0,02 a 0,2 M para ajustar el pH a un nivel mayor y de esta forma inactivar la enzima. Después de 0,1 a 10 minutos, preferiblemente de 0,5 a 5 min, se añade a la mezcla de reacción un tampón tal como glicina, en una concentración de 0,01 a 0,5 M, preferiblemente de 0,02 a 0,2 M, y se añade a la mezcla de reacción un ácido tal como ácido cítrico en una concentración de 0,005 a 0,1 M, preferiblemente de 0,01 a 0,05 M, para ajustar el pH, de modo que pueda reaccionar la enzima que cataliza las reacciones representadas por las ecuaciones químicas 1 y 2. Después, se deja que actúe la enzima que cataliza las reacciones representadas por las ecuaciones químicas 1 y 2, y se puede medir la concentración de MVA.

Cuando la HMG-CoA está contenida en un reactivo de medición para medir el MVA y/o HMG-CoA, se puede usar la técnica mencionada antes para separar la HMG-CoA y obtener un reactivo de medición que no contiene sustancialmente HMG-CoA. Cuando se usa, por ejemplo HMGL en la técnica mencionada antes: se puede usar una técnica de llevar a cabo una reacción enzimática que usa de 1 a 100 días, preferiblemente de 1 a 30 días como tiempo de reacción, de 2°C a 20°C como la temperatura de la reacción, y de 0,0001 a 1 U/ml como la concentración de HMGL; o una técnica de llevar a cabo una reacción enzimática que usa de 1 min a 3 h como tiempo de reacción, de 25°C a 40°C como la temperatura de reacción, y de 0,001 a 10 U/ml como la concentración de HMGL (por ejemplo, véase el ejemplo 20 descrito más adelante). Cuando el reactivo de medición así obtenido se usa para medir el MVA y/o HMG-CoA, la reacción del blanco disminuye, y mejora la relación S/N, y por lo tanto, mejora la sensibilidad de la medición.

La presente invención también proporciona reactivos de medición para medir el MVA, HMG-CoA o CoA. En la

presente memoria descriptiva, la expresión “reactivo de medición” (denominado también “reactivo para medir”) incluye no solo un reactivo si no también una combinación de reactivos que consiste en dos o más reactivos. Cuando el reactivo de medición consiste en dos o más reactivos, se pueden usar simultáneamente al mismo tiempo todos los reactivos para medir un analito, o se puede usar cada reactivo por separado en etapas individuales.

5 Cuando el reactivo consiste en 2 a 4 reactivos de medición, se pueden añadir simultáneamente dos o más reactivos o se pueden añadir sucesivamente a la muestra seleccionando los tiempos adecuados a los que se completa una reacción necesaria después de la adición de cada reactivo, por ejemplo, a intervalos de 1 segundo a 30 min, preferiblemente de 1 min a 10 min.

10 Un reactivo de medición usado para medir el MVA y/o HMG-CoA en una solución de ensayo contiene una enzima que cataliza las reacciones representadas por las ecuaciones químicas 1 y 2, CoA, un aceptor de hidrógeno X y un donador de hidrógeno Y. Más específicamente, contiene HMGR, CoA, dinucleótidos de nicotinamida y adenina oxidados y dinucleótidos de nicotinamida y adenina reducidos. Además, se pueden seleccionar y añadir adecuadamente en combinación, ácidos, álcalis, componentes de tampones, sales, tensioactivos, agentes quelantes, iones metálicos, sacáridos, aminoácidos, péptidos, proteínas, ácidos nucleicos, colorantes, alcoholes,

15 polioles, disolventes orgánicos, conservantes y similares, teniendo en cuenta que el reactivo de medición está hecho preferiblemente para una reacción cíclica enzimática representada por una combinación de las ecuaciones químicas 1 y 2, que evita las influencias de impurezas en la solución de ensayo y la mezcla de reacción (por ejemplo, de modo que la composición debe ser la misma que la de la mezcla de reacción en el método mencionado antes para la medición de MVA y/o HMG-CoA), o mejora la estabilidad en el almacenamiento del reactivo de medición.

20 En particular, un reactivo de medición usado para medir la HMG-CoA en una solución de ensayo preferiblemente contiene sustancias usadas para la etapa de separar el MVA de una solución de ensayo, más específicamente, MVK y un donador de fosfato además del reactivo mencionado antes para medir el MVA y/o HMG-CoA. Los ejemplos de dicho reactivo de medición incluyen reactivos de medición que contienen HMGR, MVK, CoA, un donador de fosfato, T-NAD(P), y NAD(P)H. Aquí, el reactivo de medición preferiblemente consiste en dos o más reactivos, y: MVK y un donador de fosfato; y HMGR; CoA; T-NAD(P); o NAD(P)H; están contenidos en reactivos separados. Además, se seleccionan adecuadamente ácidos, álcalis, componentes de tampones, sales, tensioactivos, agentes quelantes, iones metálicos, sacáridos, aminoácidos, péptidos, proteínas, ácidos nucleicos, colorantes, alcoholes, polioles, disolventes orgánicos, conservantes y similares, y se pueden añadir en combinación con el reactivo de medición que se va a usar preferiblemente para una reacción enzimática para separar el MVA o terminar la reacción enzimática

25 después de separar el MVA (por ejemplo, de modo que la composición debería ser la misma que la de la mezcla de reacción en el método de medición de HMG-CoA mencionado antes, incluyendo la reacción enzimática catalizada por la MVK).

30 En particular, un reactivo de medición usado para medir el MVA en una solución de ensayo preferiblemente contiene además sustancias usadas en la etapa de separar la HMG-CoA de una solución de ensayo, más específicamente, la HMGL además del reactivo mencionado antes para medir el MVA y/o HMG-CoA. Los ejemplos de dicho reactivo de medición incluyen reactivos de medición que contienen HMGR, HMGL, CoA, T-NAD(P), y NAD(P)H. Aquí, el reactivo de medición preferiblemente consiste en dos o más reactivos, y la HMGR y HMGL están contenidos en reactivos separados. Además, se seleccionan adecuadamente ácidos, álcalis, componentes de tampones, sales, tensioactivos, agentes quelantes, iones metálicos, sacáridos, aminoácidos, péptidos, proteínas, ácidos nucleicos, colorantes, alcoholes, polioles, disolventes orgánicos, conservantes y similares, y se pueden añadir en combinación

35 con el reactivo de medición que se va a usar preferiblemente para una reacción enzimática para separar la HMG-CoA o terminar la reacción enzimática después de separar la HMG-CoA (por ejemplo, de modo que la composición debería ser la misma que la de la mezcla de reacción en el método de medición de MVA mencionado antes, incluyendo la reacción enzimática catalizada por la HMGL).

40 El reactivo de medición usado para medir la CoA en una solución de ensayo contiene una enzima que cataliza las reacciones representadas por las ecuaciones químicas 1 y 2, MVA, un aceptor de hidrógeno X y un donador de hidrógeno Y. Más específicamente, contiene HMGR, MVA, dinucleótidos de nicotinamida y adenina oxidados y dinucleótidos de nicotinamida y adenina reducidos. Además, se pueden seleccionar y añadir adecuadamente en combinación, ácidos, álcalis, componentes de tampones, sales, tensioactivos, agentes quelantes, iones metálicos, sacáridos, aminoácidos, péptidos, proteínas, ácidos nucleicos, colorantes, alcoholes, polioles, disolventes orgánicos, conservantes y similares, teniendo en cuenta que el reactivo de medición está hecho preferiblemente para una reacción cíclica enzimática representada por una combinación de las ecuaciones químicas 1 y 2, que evita las influencias de impurezas en una solución de ensayo y una mezcla de reacción (por ejemplo, de modo que la composición debe ser la misma que la de la mezcla de reacción en el método mencionado antes para la medición de la CoA), y mejora la estabilidad en el almacenamiento del reactivo de medición.

45

50

55

El reactivo de medición mencionado antes se puede almacenar en forma de una solución, un producto congelado de una solución, un producto liofilizado, y una solución disuelta del mismo, y similares. Además, es conveniente que el mencionado reactivo de medición antes de usar consista en 1 a 4 soluciones de reactivos de medición.

60 Por ejemplo, un reactivo para medir el MVA y la HMG-CoA puede consistir en 1 a 4 reactivos. Cuando el reactivo consiste en un reactivo, el reactivo consiste en un reactivo que contiene al menos 4 componentes de HMGR, CoA, NADH y T-NAD. Cuando el reactivo consiste en 2 reactivos, los 4 componentes mencionados antes se dividen

adecuadamente en dos teniendo en cuenta la estabilidad del reactivo. Por ejemplo, el reactivo consiste en: un reactivo que contiene al menos HMGR, CoA y T-NAD; y un reactivo que contiene al menos NADH. Cuando el reactivo consiste en 3 reactivos, los 4 componentes mencionados antes se dividen en tres. Por ejemplo, el reactivo puede consistir en: un reactivo que contiene al menos HMGR y T-NAD; un reactivo que contiene al menos CoA; y un reactivo que contiene al menos NADH. Cuando el reactivo consiste en 4 reactivos, los 4 componentes mencionados antes se dividen en cuatro. Por ejemplo, el reactivo puede consistir en: un reactivo que contiene al menos HMGR; un reactivo que contiene al menos T-NAD; un reactivo que contiene al menos CoA; y un reactivo que contiene al menos NADH.

Por ejemplo, cuando tanto el MVA como la HMG-CoA están presentes en una solución de ensayo, un reactivo para medir la concentración solo de HMG-CoA puede consistir en 2 a 4 reactivos. Cuando el reactivo consiste en 2 reactivos, 4 componentes de HMGR, CoA, NADH y T-NAD se dividen adecuadamente en: un primer reactivo que contiene al menos un componente esencial para permitir que avance la reacción representada por la ecuación química 21 catalizada por la MVK; y un segundo reactivo que contiene al menos un componente para terminar la reacción catalizada por la MVK; teniendo en cuenta la estabilidad del reactivo y similares, de modo que una reacción cíclica enzimática empieza cuando se añade el segundo reactivo. Por ejemplo, el reactivo puede ser compuesto, de modo que el primer reactivo debe contener MVK, ATP y cloruro de magnesio, y el segundo reactivo debe contener EDTA, HMGR, CoA, NADH y T-NAD. Cuando el reactivo consiste en 3 reactivos, 4 componentes de HMGR, CoA, NADH y T-NAD se pueden dividir en: un primer reactivo que contiene al menos un componente esencial que permite que avance la reacción representada por la ecuación química 21 catalizada por la MVK; y un segundo reactivo que contiene al menos un componente para terminar la reacción catalizada por la MVK; y un tercer reactivo que contiene un componente que permite que empiece una reacción cíclica enzimática después de la adición del tercer reactivo; teniendo en cuenta la estabilidad del reactivo y similares. Alternativamente, cuando el reactivo consiste en 3 reactivos, 4 componentes se pueden dividir adecuadamente en: un primer reactivo que contiene al menos un componente esencial para permitir que avance la reacción representada por la ecuación química 21 catalizada por la MVK; y un tercer reactivo que contiene al menos un componente para terminar la reacción catalizada por la MVK y un componente que permite que empiece una reacción cíclica enzimática después de la adición del tercer reactivo; y un segundo reactivo que contiene otros componentes; teniendo en cuenta la estabilidad del reactivo y similares. Cuando el reactivo consiste en 4 reactivos, 4 componentes de HMGR, CoA, NADH y T-NAD se pueden dividir en: un primer reactivo que contiene al menos un componente esencial para permitir que avance la reacción representada por la ecuación química 21 catalizada por la MVK; un segundo reactivo que contiene al menos un componente para terminar la reacción catalizada por la MVK; un cuarto reactivo que contiene un componente que permite que empiece una reacción cíclica enzimática después de la adición del cuarto reactivo; y un tercer reactivo que contiene otros componentes; teniendo en cuenta la estabilidad del reactivo y similares. Alternativamente, cuando el reactivo consiste en 3 reactivos, 4 componentes se pueden dividir en: un primer reactivo que contiene al menos un componente esencial para permitir que avance la reacción representada por la ecuación química 21 catalizada por la MVK; un tercer reactivo que contiene al menos un componente para terminar la reacción catalizada por la MVK; un cuarto reactivo que contiene un componente que permite que empiece una reacción cíclica enzimática después de la adición del cuarto reactivo; y un segundo reactivo que contiene otros componentes; teniendo en cuenta la estabilidad del reactivo y similares. Alternativamente, cuando el reactivo consiste en 4 reactivos, los 4 componentes se pueden dividir en un primer reactivo que contiene al menos un componente esencial para permitir que avance la reacción representada por la ecuación química 21 catalizada por la MVK; un cuarto reactivo que contiene al menos un componente para terminar la reacción catalizada por la MVK; y un componente para permitir que empiece una reacción cíclica enzimática después de la adición del cuarto reactivo; y un segundo reactivo y un tercer reactivo que contienen otros componentes; teniendo en cuenta la estabilidad del reactivo y similares.

Por ejemplo, cuando están presentes tanto el MVA como la HMG-CoA en una solución de ensayo, un reactivo para medir la concentración de solo el MVA puede consistir en 2 a 4 reactivos. Cuando el reactivo consiste en 2 reactivos, 4 componentes de HMGR, CoA, NADH y T-NAD se dividen adecuadamente en: un primer reactivo que contiene al menos un componente esencial para permitir que avance la reacción representada por la ecuación química 22 catalizada por la HMGL; y un segundo reactivo que contiene al menos un componente para inactivar la HMGL y un componente para permitir que empiece la reacción cíclica enzimática después de la adición del segundo reactivo; teniendo en cuenta la estabilidad del reactivo y similares. Cuando el reactivo consiste en 3 reactivos, 4 componentes de HMGR, CoA, NADH y T-NAD se pueden dividir en: un primer reactivo que contiene al menos un componente esencial para permitir que avance la reacción representada por la ecuación química 22 catalizada por la HMGL; un segundo reactivo que contiene al menos un componente para inactivar la HMGL; y un tercer reactivo que contiene un componente para permitir que empiece la reacción cíclica enzimática después de la adición del tercer reactivo; teniendo en cuenta la estabilidad del reactivo y similares. Alternativamente, cuando el reactivo consiste en 3 reactivos, 4 componentes se pueden dividir en: un primer reactivo que contiene al menos un componente esencial para permitir que avance la reacción representada por la ecuación química 22 catalizada por la HMGL; un tercer reactivo que contiene al menos un componente para inactivar la HMGL y un componente que permite que empiece una reacción cíclica enzimática después de la adición del tercer reactivo; y un segundo reactivo que contiene otros componentes; teniendo en cuenta la estabilidad del reactivo y similares. Cuando el reactivo consiste en 4 reactivos, 4 componentes de HMGR, CoA, NADH y T-NAD se pueden dividir en: un primer reactivo que contiene al menos un componente esencial para permitir que avance la reacción representada por la ecuación química 22 catalizada por la HMGL; un segundo reactivo que contiene al menos un componente para inactivar la HMGL; un cuarto reactivo que

5 contiene un componente que permite que empiece una reacción cíclica enzimática después de la adición del cuarto reactivo; y un tercer reactivo que contiene otros componentes; teniendo en cuenta la estabilidad del reactivo y similares. Por ejemplo, cuando el reactivo consiste en 4 reactivos, el reactivo puede consistir en; un primer reactivo que contiene HMGL; un segundo reactivo que contiene hidróxido sódico; un tercer reactivo que contiene componentes de tampones, ácidos, HMGR, CoA y T-NAD; y un cuarto reactivo que contiene NADH. Alternativamente, cuando el reactivo consiste en 4 reactivos, los 4 componentes se pueden dividir en: un primer reactivo que contiene al menos un componente esencial para permitir que avance la reacción representada por la ecuación química 22 catalizada por la HMGL; un tercer reactivo que contiene al menos un componente para inactivar la HMGL; un cuarto reactivo que contiene un componente que permite que empiece una reacción cíclica enzimática después de la adición del cuarto reactivo; y un segundo reactivo que contiene otros componentes; teniendo en cuenta la estabilidad del reactivo y similares. Alternativamente, cuando el reactivo consiste en 4 reactivos, los 4 componentes se pueden dividir en: un primer reactivo que contiene al menos un componente esencial para permitir que avance la reacción representada por la ecuación química 22 catalizada por la HMGL; un cuarto reactivo que contiene al menos un componente para inactivar la HMGL y un componente para permitir que empiece una reacción cíclica enzimática después de la adición del cuarto reactivo; y un segundo reactivo y un tercer reactivo que contienen otros componentes; teniendo en cuenta la estabilidad del reactivo y similares.

20 En general, cuando la cantidad de una sustancia A presente en una solución de ensayo se mide usando un reactivo de medición, convirtiendo la cantidad en la intensidad de una señal tal como absorbancia, la cantidad de luminiscencia o la cantidad de electricidad, es necesaria una curva de calibración obtenida usando una solución de ensayo que contiene una cantidad conocida de la sustancia A (denominada "calibrador"). La curva de calibración representa la relación entre la intensidad de la señal y la concentración de la sustancia A. Por lo tanto, en un laboratorio habitual, una cantidad desconocida de una sustancia A en una solución de ensayo se mide no solo usando los reactivos de medición sino también un calibrador.

25 Cuando la cantidad de una sustancia A se mide en diferentes laboratorios, puede haber una diferencia entre las cantidades de la sustancia A en una solución de ensayo medida en un "laboratorio a" y las cantidades medidas en un "laboratorio b". Esta diferencia se produce debido a las diferencias en los reactivos de medición y los propios procedimientos de medición, aparatos de medición, calibradores, medidores, y similares. Es necesario minimizar estas diferencias entre laboratorios en laboratorios clínicos y similares, en la práctica médica. Para minimizar estas diferencias entre laboratorios es suficiente establecer la trazabilidad de la medición de una sustancia A, es decir, establecer un material de referencia de la sustancia A y método estándar para medir la sustancia A, asignar el valor de la concentración de la sustancia A presente en un calibrador usado habitualmente basado en el material de referencia y el método estándar para medir la sustancia por un método de medición rutinario (*Clin Chem.* 2009 Jun; 55(6): 1067-75).

35 Aquí, para establecer la trazabilidad de la medición del MVA, es necesario establecer primero un material de referencia y un método de medición estándar. En relación con esto, no se conoce la pureza exacta del MVA y D,L-MVA (por ejemplo, D-Mevalonolactona [Código de producto M1374] de Tokyo Chemical Industry Co., Ltd y (±)-Mevalonolactona [lactona del ácido DL-mevalónico] [Número de producto M4667] de Sigma) comercializados como reactivos generales. Como métodos de medición de su pureza, solo se conocen métodos con especificidad baja, tales como valoración, métodos que no pueden medir cantidades absolutas sin un material de referencia, tales como cromatografía de gases (GC), métodos que usan polarimetría o RMN que mide solo la relación de contenido de isómeros ópticos (*J. Lipid Res.*, mayo 1982; 23 (4): 645-52), y un método de medición de la disminución de NADH por acoplamiento de la piruvato quinasa y lactato deshidrogenasa a MVK (*Methods Enzymol.* 1969; 15: 393-454), que parece que tiene una precisión inadecuada como se describe más adelante. Por lo tanto, no ha habido un material de referencia o método de medición estándar adecuados. Por consiguiente, como candidato de método de medición estándar, los autores de la invención han desarrollado dos métodos para medir una cantidad precisa de MVA basada en el coeficiente de absorbancia del NAD(P)H en un sistema de reacción en el que aumenta el NAD(P)H, usando la especificidad enzimática.

Un método es un método que usa las reacciones representadas por la ecuación química 21 usando MVK:

Esquema 31

50 $\text{Ácido mevalónico} + \text{ATP} \rightarrow \text{Fosfato de ácido mevalónico} + \text{ADP}$ (Ecuación química 21)

Ecuación química 25 usando hexoquinasa dependiente de ADP (glucoquinasa específica de ADP [EC2.7.1.47]):

Esquema 32

$\text{Glucosa} + \text{ADP} \rightarrow \text{Glucosa-6-fosfato} + \text{AMP}$ (Ecuación química 25)

Ecuación química 26 usando glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (EC1.1.1.49):

55 Esquema 33

$\text{Glucosa-6-fosfato} + \text{NAD(P)} \rightarrow \text{6-Fosfogluconolactona} + \text{NAD(P)H}$ (Ecuación química 26)

y Ecuación química 27 usando 6-fosfogluconolactonasa (EC3.1.1.31):

Esquema 34

6-Fosfogluconolactona \rightarrow Ácido 6-fosfogluconico + H₂O (Ecuación química 27)

5 en combinación, en donde todas las moléculas de MVA (D-MVA) se pueden convertir en NAD(P)H, y se puede medir una cantidad precisa de MVA (D-MVA) usando el coeficiente de absorbancia del NAD(P)H. Aquí, la reacción representada por la ecuación química 27 avanza sin ser catalizada por una enzima, cuando se ajusta el pH (por ejemplo, a 8,0 o mayor, preferiblemente 8,5 o mayor, más preferiblemente 9,0 o mayor). Por lo tanto, se puede usar en algunos casos la 6-fosfogluconolactonasa (EC3.1.1.31). Además, se puede usar un sustrato en el que la hexoquinasa dependiente de ADP actúe en lugar de glucosa en la reacción representada por la ecuación química 10 25, y llevar a cabo una reacción correspondiente a la ecuación química 26 usando una deshidrogenasa para el producto.

Otro método es un método que usa una reacción representada por la ecuación química 11 usando HMGR:

Esquema 35

Ácido mevalónico + Coenzima A + 2NAD(P) \rightarrow 3-hidroximetilglutaril-coenzima A + 2NAD(P)H (Ecuación química 11)

15 preferiblemente usando la ecuación química 22 usando HMGL:

Esquema 36

3-Hidroximetilglutaril-coenzima \rightarrow ácido acetoacético + acetil-coenzima A (Ecuación química 22)

20 en combinación, en donde todas las moléculas de MVA (D-MVA) se pueden convertir en NAD(P)H, y se puede medir una cantidad precisa de MVA (D-MVA) basándose en el coeficiente de absorbancia del NAD(P)H. Aquí, la ecuación química 22 se puede sustituir por la ecuación química 23 usando la hidroximetilglutaril-coenzima A hidrolasa (EC3.1.2.5):

Esquema 37

3-Hidroximetilglutaril-coenzima A + H₂O \rightarrow ácido 3-hidroximetilglutárico + coenzima A (Ecuación química 23)

o la ecuación química 24 usando hidroximetilglutaril-coenzima A sintasa (EC2.3.3.10):

25 Esquema 38

3-Hidroximetilglutaril-coenzima A + coenzima A \rightarrow acetoacetil-coenzima A + acetil-coenzima A + H₂O (Ecuación química 24).

30 En una solución acuosa, se considera que el MVA está en un estado de equilibrio de lactona en el que un grupo hidroxilo y un grupo carboxilo en una molécula se deshidratan y se genera ácido hidroxicarboxílico por hidrólisis de lactona. Se considera que la MVK o HMGR no actúan sobre el MVA en estado de lactona sino sobre el MVA en estado de ácido hidroxicarboxílico, en vista de un sustrato implicado en la reacción y una estructura del producto. El pH óptimo de una reacción de MVA en fosfato de ácido mevalónico por la MVK y una reacción de MVA en la HMG-CoA por la HMGR, está en una región alta del pH. Una de las razones por la que esta región del pH es óptima es que la lactona se hidroliza con una región de pH alta, y por lo tanto el equilibrio se desplaza hacia el ácido hidroxicarboxílico. Por lo tanto, para medir el MVA con precisión mediante una reacción enzimática que usa MVK o HMGR, es importante desplazar el equilibrio hacia el ácido hidroxicarboxílico. Para este propósito, se puede añadir lactonasa para hidrolizar la lactona del MVA, pero por conveniencia es deseable que el pH de la reacción esté en la región de pH alto (el pH de un reactivo o una mezcla de reacción es 8,5 o mayor, preferiblemente 9,0 o mayor, más preferiblemente 9,5 o mayor, todavía preferiblemente 10,0 o mayor). Además, el pH óptimo de una reacción por deshidrogenasa o similar para producir NAD(P)H está en la región de pH alto, siempre que se pueda mantener la estabilidad de los componentes implicados en una reacción, tal como una enzima y un sustrato. También se sabe en general que el pH óptimo de una reacción para producir NAD(P) está en la región de pH bajo, siempre que se pueda mantener la estabilidad de los componentes implicados en una reacción, tal como una enzima y un sustrato. Cuando se mide un aumento del NAD(P)H por deshidrogenasa, es conveniente que el pH esté en una región de pH alto. Cuando se mide una disminución del NAD(P)H, es conveniente que el pH esté en una región de pH bajo. Sin embargo, en el método descrito antes de medición de una disminución de NADH mediante acoplamiento de piruvato quinasa y lactato deshidrogenasa con MVK, hay un problema de pH contradictorio que establece que la región de pH alto es deseable en una reacción catalizada por MVK, mientras que es conveniente una región de pH bajo en una reacción catalizada por la lactato deshidrogenasa (el pH se estableció de 7,3 a 7,4 en *Methods Enzymol.* 1969; 15: 393-454). Además, la cantidad de NADH que se puede añadir a un sistema de reacción está limitada debido a un problema de absorbancia, y también hay problemas de una reacción con absorbancia del blanco alta y otros. Por lo tanto, este sistema de reacción no es adecuado para medir una cantidad precisa de MVA. Además, como se ha descrito antes, cuando se mide con precisión el MVA mediante una reacción enzimática usando MVK o HMGR, es

importante que el pH de la reacción esté en una región de pH alto, por ejemplo, el pH de un reactivo o una mezcla de reacción es 8,5 o mayor, preferiblemente 9,0 o mayor, más preferiblemente 9,5 o mayor, además preferiblemente 10,0 o mayor, para desplazar el equilibrio hacia el ácido hidroxicarboxílico. Sin embargo, en vista de la estabilidad de una coenzima (por ejemplo CoA) y la estabilidad y reactividad de la MVK, HMGR y enzimas de acoplamiento usadas con la MVK y HMGR, no se podría pensar nunca que una reacción pudiera avanzar de forma estable y suficientemente en dicha región de pH alto. Sin embargo, para su sorpresa, los autores de la invención encontraron que la reacción avanza de forma estable y adecuada en el sistema de reacción mencionado antes usando la MVK o HMGR, en el que aumenta el NAD(P)H, y encontraron un método para medir una cantidad precisa del MVA basándose en el coeficiente de absorbancia del NAD(P)H mediante una reacción de tiempo corto (por ejemplo, en el espacio de 30, 15 o 10 min) con precisión alta.

Mediante estos métodos, se puede proporcionar un material de referencia con un valor asignado con precisión de la concentración de MVA, y se puede establecer la trazabilidad de la medición del MVA.

En el caso de la CoA, de forma similar al caso del MVA, se puede proporcionar un material de referencia con un valor asignado preciso de concentración de CoA y la trazabilidad de la medición de CoA se puede establecer por un método que usa reacciones representadas por las ecuaciones químicas para la HMGR y la HMGL en combinación, un método que usa reacciones representadas por las ecuaciones químicas para la HMGR y la hidroximetilglutaril-coenzima A hidrolasa en combinación, o un método que usa reacciones representadas por las ecuaciones químicas para la HMGR y la hidroximetilglutaril-coenzima A sintetasa en combinación.

En el caso de la HMG-CoA, de forma similar al caso del MVA, se puede proporcionar un material de referencia con un valor asignado preciso de concentración de HMG-CoA y la trazabilidad de la medición de la HMG-CoA se puede establecer por un método que produce MVA y CoA a partir de HMG-CoA por la HMGR y usando el MVA producido en reacciones representadas por las ecuaciones químicas mencionadas antes para la MVK, hexoquinasa dependiente de ADP, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y 6-fosfogluconolactona en combinación.

Además, se pueden añadir adecuadamente aditivos tales como ácidos, bases, iones metálicos, sacáridos, alcoholes, aminoácidos, péptidos, proteínas, sales, componentes de tampones, tensioactivos, agentes quelantes, componentes de la sangre y otros compuestos orgánicos, a dicho material de referencia de MVA, CoA o HMG-CoA, para mejorar características tales como la estabilidad en el almacenamiento, y la forma puede ser una solución, un producto congelado o un producto liofilizado.

Ejemplos

En lo sucesivo, la presente invención se describirá más específicamente con referencia a los ejemplos. Sin embargo, el alcance de la presente invención no está limitado a los siguientes ejemplos y similares. El medio y los reactivos usados en cada ejemplo se resumirán en los ejemplos de preparación descritos más adelante.

En las tablas y figuras en los siguientes ejemplos, así como en la presente memoria descriptiva, cuando se usa la expresión "ácido D,L-mevalónico" o "D,L-MVA", la expresión representa un ácido mevalónico racémico, que es una mezcla de la forma D y la forma L. Cuando se usa simplemente la expresión "ácido mevalónico" o "MVA", la expresión representa ácido D-mevalónico o ácido R-mevalónico.

Además, en las tablas y figuras en los siguientes ejemplos, así como en la presente memoria descriptiva, cuando se usa la expresión "D,L-3-hidroximetilglutaril-coenzima A" o "D,L-HMG-CoA", la expresión representa la 3-hidroximetilglutaril-coenzima A que es una mezcla de la forma D y la forma L. Cuando se usa simplemente la expresión "3-hidroximetilglutaril-coenzima A" o "HMG-CoA", el término representa la D-3-hidroximetilglutaril-coenzima A o S-3-hidroximetilglutaril-coenzima A.

Además, en los ejemplos, se usó M4667 fabricado por Sigma como D,L-MVA, y se usó H6132 fabricado por Sigma como D,L-HMG-CoA, salvo que se especifique otra cosa. Las concentraciones de MVA (es decir, concentraciones de D-MVA) y las concentraciones de HMG-CoA (es decir, concentraciones de D-HMG-CoA) en los ejemplos se calcularon y expresaron como los valores mitad de los del D,L-MVA y D,L-HMG-CoA.

Cuando se usó el analizador automático 7170S (Hitachi, Ltd.) para medir, la longitud de onda de la medición especificada se usó como la longitud de onda principal, y 660 nm se usó como la sublongitud de onda para la medición. Igualmente, cuando se usó el analizador automático BM9020 (JEOL Ltd.) para medir, la longitud de onda de la medición especificada se usó como la longitud de onda principal, y 658 nm se usó como la sublongitud de onda para la medición.

Ejemplo 1. Producción de HMGR derivado de *Pseudomonas sp.* 1-MV (FERM BP-11063)

Identificación de *Pseudomonas sp.* 1-MV (FERM BP-11063)

Pseudomonas sp. 1-MV (FERM BP-11063) aislado del suelo se identificó como un género de *Pseudomonas* estrechamente relacionado con *Pseudomonas migulae* basándose en las características mostradas en la siguiente tabla 1 y la secuencia de ADNr 16S (SEQ ID NO: 8) y depositada en el Depósito de Organismos de Patentes

ES 2 543 010 T3

Internacionales del Instituto Nacional de Ciencia Industrial y Tecnología (Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki, Japón 13 de noviembre, 2008.

Tabla 1

Temperatura de cultivo (°C)		30
		forma de varilla (0,6-0,7 x 0,9-1,2 µm)
Tinción Gram		-
Formación de esporas		-
Movilidad		+
Morfología de la colonia	Medio Tiempo de cultivo Diámetro Color Forma Elevación Borde Textura de la superficie Transparencia Consistencia	nutriente agar 48 h 1,0-2,0 mm Amarillo claro Redonda Convexa Entero Lisa Opaca Mantecosa
Ensayo de temperatura de crecimiento (°C)	4 37 41 45	+ + - -
Reacción de catalasa		+
Reacción de oxidasa		+
Producción de ácido y/o gas a partir de glucosa		-/-
Ensayo de Oxidación/Fermentación (O/F)		-/-
Lecitinasa		-
Producción de pigmento fluorescente en medio King B		+

Ensayos bioquímicos	Reducción de nitrato	-
	Producción de indol	-
	Acidificación de glucosa	-
	Arginina dihidrolasa	+
	Ureasa	-
	Hidrólisis de esculina	-
	Hidrólisis de gelatina	-
	β-Galactosidasa	-
	Citocromo oxidasa	+
Ensayos de asimilación	Glucosa	+
	L-Arabinosa	+
	D-Manosa	+
	D-Manitol	+
	N-Acetil-D-glucosamina	-
	Maltosa	-
	Gluconato de potasio	+
	Ácido n-cáprico	+
	Ácido adípico	-
	Ácido dl-málico	+
	Citrato sódico	+
Acetato de fenilo	+	

5

Producción de HMGR derivado de *Pseudomonas sp.* 1-MV (FERM BP-11063)

10 Se prepararon 3 matraces Erlenmeyer que contenía cada uno 167 ml de medio A, y se inoculó aproximadamente una tercera parte de una colonia de *Pseudomonas sp.* 1-MV (FERM BP-11063) en cada uno de los matraces. Las bacterias se cultivaron en estos matraces Erlenmeyer a 28°C durante aproximadamente 18 h con agitación. Después del cultivo, el caldo de cultivo se centrifugó (8 krpm, 20 min) para recoger las bacterias, y las células bacterianas se suspendieron en 30 ml de tampón de hidrocloreuro de Tris 10 mM (pH 7,5), se alteraron por ultrasonidos y se solubilizaron. Después de la solubilización, la solución se centrifugó (15 krpm, 50 min) para obtener una solución de enzima bruta.

La solución de enzima bruta obtenida se adsorbió en una columna de DEAE Sepharose FF (14,5 x 90 mm) equilibrada con tampón de hidrocloreuro de Tris 10 mM (pH 7,5) y eluida con NaCl con un gradiente de 0 → 0,5 M para recoger una fracción que tiene actividad de HMGR. Se añadió sulfato amónico a la fracción obtenida al 13% y la fracción se adsorbió en columna de Phenyl Sepharose FF (14,5 x 90 mm) equilibrada con sulfato amónico al 12% y tampón de hidrocloreuro de Tris 10 mM (pH 7,5) y se eluyó con gradientes de sulfato amónico al 12% y etilenglicol al 0% → sulfato amónico al 0% y etilenglicol al 20%, para recoger una fracción que tenía actividad de HMGR. La fracción obtenida se dializó frente a tampón de hidrocloreuro de Tris 10 mM (pH 7,5), se adsorbió en una columna Blue Sepharose CL6B (14,5 x 90 mm) equilibrada con el tampón de hidrocloreuro de Tris 10 mM (pH 7,5), y se eluyó con gradientes de NaCl 0 M y etilenglicol al 0% → NaCl 1 M y etilenglicol al 20%, para recoger una fracción que tiene actividad de HMGR. La fracción se dializó frente a tampón de hidrocloreuro de Tris 10 mM (pH 7,5), después se sometió a ultrafiltración con una membrana que tenía un corte de exclusión de peso molecular de 10.000 para concentrar la fracción para obtener 17 U de HMGR purificada.

Método para medir la actividad de la HMGR

Se vertieron 0,45 ml de reactivo B en un tubo de ensayo y se calentó preliminarmente a 37°C durante 5 min, se añadieron 0,05 ml de una solución de enzima y la mezcla se hizo reaccionar a 37°C durante 5 min. Tras completarse la reacción, se añadió 1 ml de HCl 0,1 N para terminar la reacción, y se midió la absorbancia (Aa) a una longitud de onda de 550 nm. Se llevó a cabo después el mismo procedimiento usando un tampón de dilución de enzima (tampón de hidrocloreuro de Tris 10 mM (pH 9,0), Tween 80 al 0,1%) como blanco en lugar de una solución de enzima, y se midió la absorbancia (Ab). A partir de la diferencia entre estas absorbancias (Aa - Ab), 1 U de actividad enzimática por mililitro de la solución de enzima se calcula como $U/ml = 0,316 \times (Aa - Ab)$. Debe indicarse que una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima necesaria para producir un micromol de NADH a 37°C por minuto, y la solución de enzima se diluyó con el tampón de dilución de enzima, según fuera necesario.

Ejemplo 2. Producción de HMGR derivado de *Variovorax sp.* 5-MV (FERM BP-11064)

Identificación de *Variovorax sp.* 5-MV (FERM BP-11064)

Variovorax sp. 5-MV (FERM BP-11064) aislado del suelo se identificó como una especie *Variovorax sp.* perteneciente al género de *Variovorax* basándose en las características mostradas en la siguiente tabla 2 y la secuencia de ADNr 16S (SEQ ID NO: 9) y depositada en el Depósito de Organismos de Patentes Internacionales del Instituto Nacional de Ciencia Industrial y Tecnología de Tsukuba en Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki, Japón 13 de noviembre, 2008.

Tabla 2

Temperatura de cultivo (°C)		30
		forma de varilla (0,6-0,7 x 1,5-2,0 μm)
Tinción Gram		-
Formación de esporas		-
Movilidad		+
Morfología de la colonia	Medio Tiempo de cultivo Diámetro Color Forma Elevación Borde Textura de la superficie Transparencia Consistencia	nutriente agar 48 h 1,0-2,0 mm Amarillo Redonda Convexa Entero Lisa Opaca Viscosa
Ensayo de temperatura de crecimiento (°C)	37 45	+ -
Reacción de catalasa		+
Reacción de oxidasa		-
Producción de ácido y/o gas a partir de glucosa		-/-
Ensayo de Oxidación/Fermentación (O/F)		-/-
Crecimiento anaerobio		-

ES 2 543 010 T3

Ensayos bioquímicos	Reducción de nitrato	-
	Producción de indol	-
	Acidificación de glucosa	-
	Arginina dihidrolasa	-
	Ureasa	-
	Hidrólisis de esculina	-
	Hidrólisis de gelatina	-
	β -Galactosidasa	-
	Citocromo oxidasa	-
Ensayos de asimilación	Glucosa	+
	L-Arabinosa	+
	D-Manosa	+
	D-Manitol	+
	N-Acetil-D-glucosamina	+
	Maltosa	-
	Gluconato de potasio	+
	Ácido n-cáprico	+
	Ácido adípico	-
	Ácido dl-málico	+
	Citrato sódico	-
Acetato de fenilo	-	

Producción de HMGR derivada de *Variovorax sp.* 5-MV (FERM BP-11064)

Se obtuvieron 10 U de HMGR purificada a partir de la *Variovorax sp.* 5-MV (FERM BP-11064) descrita antes, por la misma técnica descrita en el ejemplo 1, excepto que el medio A se sustituyó por medio B.

5 Ejemplo 3. Producción de HMGR derivada de *Delftia sp.* 12-MV (FERM BP-11065)

Identificación de *Delftia sp.* 12-MV (FERM BP-11065)

10 *Delftia sp.* 12-MV (FERM BP-11065) aislado del suelo se identificó como una *Delftia sp.* estrechamente relacionada con *Delftia acidovorans* basándose en las características mostradas en la siguiente tabla 3 y la secuencia de ADN 16S (SEQ ID NO: 10) y depositada en el Depósito de Organismos de Patentes Internacionales del Instituto Nacional de Ciencia Industrial y Tecnología de Tsukuba en Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki, Japón 13 de noviembre, 2008.

Tabla 3

Temperatura de cultivo (°C)		30
		forma de varilla (0,5-0,6 x 0,9-1,0 μ m)
Tinción Gram		-
Formación de esporas		-
Movilidad		+
Morfología de la colonia	Medio Tiempo de cultivo Diámetro Color Forma Elevación Borde Textura de la superficie Transparencia Consistencia	nutriente agar 48 h 3,0-4,0 mm Amarillo claro Redonda Convexa Rizoide Lisa Opaca Mantecosa
Ensayo de temperatura de crecimiento (°C)	37 45	+ -
Reacción de catalasa		+
Reacción de oxidasa		+
Producción de ácido y/o gas a partir de glucosa		-/-
Ensayo de Oxidación/Fermentación (O/F)		-/-

Ensayos bioquímicos	Reducción de nitrato	+
	Producción de indol	-
	Acidificación de glucosa	-
	Arginina dihidrolasa	-
	Ureasa	-
	Hidrólisis de esculina	-
	Hidrólisis de gelatina	-
	β-Galactosidasa	-
	Citocromo oxidasa	+
Ensayos de asimilación	Glucosa	-
	L-Arabinosa	-
	D-Manosa	-
	D-Manitol	+
	N-Acetil-D-glucosamina	-
	Maltosa	-
	Gluconato de potasio	+
	Ácido n-cáprico	+
	Ácido adípico	+
	Ácido dl-málico	-
	Citrato sódico	-
	Acetato de fenilo	+

Producción de HMGR derivada de *Delftia sp.* 12-MV (FERM BP-11065)

Se obtuvieron 60 U de HMGR purificada a partir de la *Delftia sp.* 12-MV (FERM BP-11065) descrita antes, por la misma técnica descrita en el ejemplo 1.

5 Ejemplo 4. Producción de HMGR derivada de *Comamonas sp.* 25-MV (FERM BP-11066)

Identificación de *Comamonas sp.* 25-MV (FERM BP-11066)

10 *Comamonas sp.* 25-MV (FERM BP-11066) aislado del suelo se identificó como una *Comamonas sp.*, estrechamente relacionada con *Comamonas testosteroni* basándose en las características mostradas en la siguiente tabla 4 y la secuencia de ADNr 16S (SEQ ID NO: 11) y depositada en el Depósito de Organismos de Patentes Internacionales del Instituto Nacional de Ciencia Industrial y Tecnología de Tsukuba en Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki, Japón 13 de noviembre, 2008.

Tabla 4

Temperatura de cultivo (°C)		30
		forma de varilla (0,6-0,7 x 0,9-1,0 μm)
Tinción Gram		-
Formación de esporas		-
Movilidad		+
Morfología de la colonia	Medio Tiempo de cultivo Diámetro Color Forma Elevación Borde Textura de la superficie Transparencia Consistencia	nutriente agar 48 h 3,0-4,0 mm Amarillo claro Redonda Convexa Entero Lisa Opaca Mantecosa
Ensayo de temperatura de crecimiento (°C)	4 37 42 45	- + + w -
Reacción de catalasa		+
Reacción de oxidasa		+
Producción de ácido y/o gas a partir de glucosa		-/-
Ensayo de Oxidación/Fermentación (O/F)		-/-
Actividad de lipasa		-

Ensayos bioquímicos	Reducción de nitrato	+
	Producción de indol	-
	Acidificación de glucosa	-
	Arginina dihidrolasa	-
	Ureasa	-
	Hidrólisis de esculina	-
	Hidrólisis de gelatina	-
	β -Galactosidasa	-
	Citocromo oxidasa	+
	Ensayos de asimilación	Glucosa
L-Arabinosa		-
D-Manosa		-
D-Manitol		-
N-Acetil-D-glucosamina		-
Maltosa		-
Gluconato de potasio		+
Ácido n-cáprico		-
Ácido adípico		+
Ácido dl-málico		+
Citrato sódico		-
Acetato de fenilo		-

Producción de HMGR derivada de *Comamonas sp.* 25-MV (FERM BP-11066)

5 Se obtuvieron 27 U de HMGR purificada a partir de la *Comamonas sp.* 25-MV (FERM BP-11066) descrita antes, por la misma técnica descrita en el ejemplo 1, excepto que el medio A se sustituyó por medio C

Ejemplo 5. Expresión en *Escherichia coli* y purificación de HMGR derivada de *Pseudomonas sp.* 1-MV (FERM BP-11063)

10 Se llevó a cabo la PCR usando ADN cromosómico de *Pseudomonas sp.* 1-MV (FERM BP-11063) del ejemplo 1, como un molde y cebadores que tenían las secuencias de SEQ ID NO: 14 y 15, para obtener un fragmento de ADN que incluye el gen de HMGR (SEQ ID NO: 12). Un fragmento obtenido por digestión del fragmento de ADN obtenido con *Xba*I y *Sac*I, se ligó con un fragmento obtenido por digestión de forma similar del plásmido pPOW1 con *Xba*I y *Sac*I, en donde el plásmido pPOW1 se obtuvo por sustitución de la región del sitio *Hind*III al sitio *Eco*I en el sitio de multiclonación del plásmido pHSG398 con un fragmento de ADN (SEQ ID NO: 24) que incluía una secuencia de promotor POP. El plásmido pPOW1-HMGRps obtenido, se introdujo en la cepa de *Escherichia coli* W3110 para
 15 obtener bacterias recombinantes productoras de HMGR. Estas bacterias se cultivaron en 1,6 litros de un medio que contenía extracto de levadura al 3%, sorbitol al 4,5%, antiespumante 028 al 0,1%, y cloranfenicol 30 μ g/ml a 30°C durante dos días, mientras se controlaba el pH del cultivo de modo que el pH más bajo debería ser 7,2. Después de obtener las células bacterianas del caldo de cultivo por centrifugación, las células bacterianas se suspendieron en tampón de hidrócloruro de Tris 10 mM (pH 7,5) y EDTA 5 mM. Después, se añadió lisozima, y la suspensión se trató
 20 a 37°C durante 30 min para alterar las células bacterianas y se centrifugó para separar las materias insolubles para obtener una solución de enzima bruta.

25 La solución de enzima bruta obtenida se adsorbió en una columna Q Sepharose Big Beads (45,5 x 510 mm) equilibrada con tampón de hidrócloruro de Tris 10 mM (pH 8,5) y eluida con tampón de hidrócloruro de Tris 10 mM (pH 8,5), NaCl 0,1 M y Tween 80 al 0,1% para recoger una fracción que tiene actividad de HMGR. Se añadió sulfato amónico a la fracción obtenida al 37,5%, el precipitado se recogió por centrifugación y después se disolvió en tampón de hidrócloruro de Tris 10 mM (pH 8,5) y la solución se dializó frente a tampón de hidrócloruro de Tris 10 mM (pH 8,5) y glicerol al 5%. La solución dializada que contenía HMGR se adsorbió en una columna DEAE Sepharose FF (22,5 x 210 mm) equilibrada con tampón de hidrócloruro de Tris 10 mM (pH 8,5) y glicerol al 5% y eluida con NaCl con un gradiente de 0 \rightarrow 0,25 M para recoger una fracción que tenía actividad de HMGR. Se añadió sulfato amónico a la fracción obtenida al 20%, y la fracción se adsorbió en la columna Phenyl Sepharose FF (22,5 x
 30 410 mm) equilibrada con sulfato amónico al 20%, tampón de hidrócloruro de Tris 10 mM (pH 7,5), y glicerol al 5%, y se eluyó con gradientes de sulfato amónico al 20% y Tween 80 al 0% \rightarrow sulfato amónico al 0% y Tween 80 al 0,1% para recoger una fracción que tenía actividad de HMGR. La fracción obtenida se dializó frente a tampón de hidrócloruro de bis-Tris 10 mM (pH 6,0) y glicerol al 5%, después se adsorbió en una columna Blue Sepharose CL6B (45,5 x 310 mm) equilibrada con tampón de hidrócloruro de bis-Tris 10 mM (pH 6,0) y glicerol al 5%, y se eluyó con un gradiente de NaCl 0 M y Tween 80 al 0% \rightarrow NaCl 2,5 M y Tween 80 al 0,1% para recoger una fracción que tenía actividad de HMGR. La fracción obtenida se dializó frente a tampón de hidrócloruro de bis-Tris 10 mM (pH 6,0) y glicerol al 5%, después se adsorbió en una columna de hidroxapatito (25,5 x 210 mm) equilibrada con tampón de hidrócloruro de bis-Tris 10 mM (pH 6,0), glicerol al 5%, y Tween 80 al 0,1%, y se eluyó con un gradiente de tampón

de hidrocloreuro de bis-Tris 10 mM (pH 6,0) → tampón de fosfato potásico 80 mM (pH 6,0) para recoger una fracción que tenía actividad de HMGR. La fracción se concentró por ultrafiltración con una membrana que tenía un corte de exclusión de peso molecular 10.000 para obtener 13 kU de HMGR purificada.

5 Ejemplo 6. Expresión de HMGR derivada de *Pseudomonas mevalonii* (*J Bacteriol.* 1989 Jun; 171(6): 2994-3001) en *Escherichia coli*

10 Se sintetizó químicamente un fragmento de ADN en el que un sitio *Xba*I está unido al extremo 5' y un sitio *Sca*I está unido al extremo 3' del gen de la HMGR (SEQ ID NO: 13) de *Pseudomonas mevalonii*. Un fragmento obtenido por digestión de este fragmento de ADN con *Xba*I y *Sca*I se ligó a un fragmento obtenido por digestión similar del plásmido pPOW1 con *Xba*I y *Sca*I. El plásmido pPOW1-HMGRpm obtenido se introdujo en la cepa de *Escherichia coli* W3110 para obtener las bacterias recombinantes productoras de HMGR. Estas bacterias se inocularon en 160 ml de un medio (pH 7,5) que contenía extracto de levadura al 3%, sorbitol al 0,3%, y cloranfenicol 30 µg/ml, y se cultivaron a 37°C durante un día. Se confirmaron aproximadamente 0,2 U/ml de actividad de HMGR por mililitro de caldo de cultivo.

15 Ejemplo 7. Expresión en *Escherichia coli* y purificación de HMGR derivada de *Archaeoglobus fulgidus* (NBRC100126) (*Protein Sci.* junio 2000; 9(6): 1226-34)

20 Se llevó a cabo la PCR usando ADN cromosómico de *Archaeoglobus fulgidus* (NBRC100126), como un molde y cebadores que tenían las secuencias de SEQ ID NO: 16 y 17, para obtener un fragmento de ADN que incluye el gen de HMGR. Un fragmento obtenido por digestión del fragmento de ADN obtenido con *Xba*I y *Sac*I, se ligó con un fragmento obtenido por digestión de forma similar del plásmido pPOW1 con *Xba*I y *Sac*I. El plásmido obtenido pPOW1-HMGRaf se introdujo en la cepa de *Escherichia coli* W3110 para obtener bacterias recombinantes productoras de HMGR.

25 Las bacterias obtenidas se inocularon en 5 matraces que contenía cada uno 160 ml de un medio (pH 7,5) que contenía extracto de levadura al 3%, sorbitol al 0,3% y cloranfenicol 30 µg/ml y se cultivaron a 37°C durante dos días. Las células bacterianas se obtuvieron del caldo de cultivo por centrifugación y después se suspendieron en tampón de hidrocloreuro de Tris 10 mM (pH 7,5). Después, las células bacterianas se alteraron por ultrasonidos, y se separaron los materiales insolubles por centrifugación para obtener una solución de enzima bruta que contenía 315 U de HMGR. La solución de enzima bruta obtenida se sometió a tratamiento térmico a 80°C durante 30 min, después los materiales insolubles se separaron por centrifugación, y la solución se adsorbió en una columna de DEAE Sepharose FF (14,5 x 90 mm) equilibrada con tampón de hidrocloreuro de Tris 10 mM (pH 8,5) y eluida con NaCl con un gradiente de 0 → 0,5 M para recoger una fracción que tenía actividad de HMGR. Se añadió sulfato amónico a la fracción obtenida al 15% y la fracción se adsorbió en una columna Phenyl Sepharose FF (14,5 x 35 mm) equilibrada con sulfato amónico al 15% y tampón de hidrocloreuro de Tris 10 mM (pH 7,5) y se eluyó con gradientes de sulfato amónico al 15%, glicerol al 0% y Tween 80 al 0% → sulfato amónico al 0%, glicerol al 5% y Tween 80 al 0,1% para recoger una fracción que tenía actividad de HMGR. La fracción se concentró por ultrafiltración con una membrana que tenía un corte de exclusión de peso molecular de 10.000 para obtener 17 U de HMGR purificada.

Ejemplo 8. Expresión en *Escherichia coli* y purificación de MVK derivada de *Saccharomyces cerevisiae* (NBRC1136)

40 Usando ADN cromosómico de *Saccharomyces cerevisiae* (NBRC1136) como un molde, se llevó a cabo la PCR con los cebadores que tienen las secuencias de SEQ ID NO: 18 y 19 para obtener un fragmento de ADN que corresponde a la primera mitad del gen de MVK y con cebadores que tienen las SEQ ID NO: 20 y 21 para obtener un fragmento de ADN que corresponde a la última mitad del gen de MVK. Se llevó a cabo la PCR usando estos fragmentos de ADN obtenidos que corresponden a la primera mitad y la última mitad como moldes y los cebadores que tiene las SEQ ID NO: 18 y 21 para obtener un fragmento de ADN que incluye el gen de MVK de longitud completa. El gen de MVK en el fragmento de ADN obtenido tiene la SEQ ID NO: 5, en la que A se sustituyó por T en la posición 819, pero la secuencia de aminoácidos traducida no cambiaba. Un fragmento obtenido por digestión con *Xba*I y *Sca*I del ADN obtenido que incluía el gen de MVK de longitud completa se ligó con un fragmento obtenido por digestión similar del plásmido pPOW1 con *Xba*I y *Sca*I. El plásmido pPOW1-MVK obtenido se introdujo en la cepa de *Escherichia coli* W3110 para obtener bacterias recombinantes productoras de MVK.

50 Las bacterias obtenidas se inocularon en 3 matraces que contenía cada uno 160 ml de un medio (pH 8,0) que contenía extracto de levadura al 3%, sorbitol al 0,3% y cloranfenicol 30 µg/ml y se cultivaron a 25°C durante 3 días. Las células bacterianas se obtuvieron del caldo de cultivo por centrifugación y después se suspendieron en tampón de hidrocloreuro de Tris 10 mM (pH 7,5). Después, las células bacterianas se alteraron por ultrasonidos, y se separaron los materiales insolubles por centrifugación para obtener una solución de enzima bruta que contenía 5660 U de MVK. La solución de enzima bruta obtenida se adsorbió en una columna de DEAE Sepharose FF (14,5 x 90 mm) equilibrada con tampón de hidrocloreuro de Tris 10 mM (pH 7,5) y eluida con NaCl con un gradiente de 0 → 0,5 M para recoger una fracción que tenía actividad de MVK. Se añadió sulfato amónico a la fracción obtenida al 15% y la fracción se adsorbió en una columna HiTrap Phenyl FF (highsub) (5 ml) equilibrada con sulfato amónico al 15% y tampón de hidrocloreuro de Tris 10 mM (pH 7,5) y se eluyó con un gradiente de sulfato amónico al 15% → sulfato amónico al 0%, para recoger una fracción que tenía actividad de MVK. La fracción se concentró por ultrafiltración

con una membrana que tenía un corte de exclusión de peso molecular de 10.000 para obtener 3304 U de MVK purificada.

Método de medición de la actividad de la MVK

5 Se vertieron 0,5 ml de reactivo C en un tubo de ensayo y se calentó preliminarmente a 37°C durante 5 min, se añadieron 0,01 ml de una solución de enzima para llevar a cabo la reacción a 37°C durante 5 min. Tras completarse la reacción, se añadió 1 ml de HCl 0,1 N para terminar la reacción, y se midió la absorbancia (Aa) a una longitud de onda de 550 nm. Se llevó a cabo después el mismo procedimiento usando un reactivo Cb para medir la absorbancia (Ab) como un blanco. A partir de la diferencia entre estas absorbancias (Aa - Ab), 1 U de actividad enzimática por mililitro de la solución de enzima se calculó como $U/ml = 1,589 \times (Aa - Ab)$. Debe indicarse que una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de una enzima necesaria para producir un micromol de NADH a 37°C por minuto, y la solución de enzima se diluyó con un tampón de dilución de enzima (tampón de hidrocloreuro de Tris 10 mM (pH 7,5), BSA al 0,1%), para la medición según fuera necesario.

Ejemplo 9. Expresión en *Escherichia coli* y purificación de HMGL derivada de *Pseudomonas putida* KT2440 (ATCC47054)

15 Se llevó a cabo la PCR usando ADN cromosómico de *Pseudomonas putida* KT2440 (ATCC47054), como un molde y cebadores que tenían las secuencias de SEQ ID NO: 22 y 23, para obtener un fragmento de ADN que incluía el gen de HMGL. Un fragmento obtenido por digestión con *Xba*I y *Sac*I del fragmento de ADN obtenido, se ligó con un fragmento obtenido por digestión de forma similar del plásmido pPOW1 con *Xba*I y *Sac*I. El plásmido obtenido
20 de HMGL.

Las bacterias obtenidas se cultivaron en 1,6 litros de un medio que contenía extracto de levadura al 3%, sorbitol al 4,5%, antiespumante O28 al 0,1%, y cloranfenicol 30 µg/ml a 30°C durante dos días, mientras se controlaba el pH del cultivo de modo que el pH más bajo debería ser 7,0 para obtener un caldo de cultivo que tenía una actividad de HMGL de 35,7 U/ml. Las bacterias también se cultivaron en 1,6 litros de un medio que tenía la misma composición a 30°C durante dos días, mientras se controlaba el pH del cultivo de modo que el pH más bajo debería ser 6,5 para obtener un caldo de cultivo que tenía una actividad de HMGL de 36,7 U/ml. Estos caldos de cultivo se centrifugaron juntos para obtener las células bacterianas y después se suspendieron en tampón de hidrocloreuro de Tris 10 mM (pH 7,5). Después, las células bacterianas se alteraron mediante ultrasonidos y se separaron las materias insolubles por centrifugación para obtener una solución de enzima bruta que contenía HMGL. La solución de enzima bruta
30 obtenida se adsorbió en una columna Q Sepharose Big Beads Column (45,5 x 510 mm) equilibrada con tampón de hidrocloreuro de Tris 10 mM (pH 7,5), la columna se lavó con tampón de hidrocloreuro de Tris 10 mM (pH 7,5) y NaCl 0,1 M, la solución se eluyó con tampón de hidrocloreuro de Tris 10 mM (pH 8,5) y NaCl 0,3 M para recoger una fracción que tiene actividad de HMGL. Se añadió sulfato amónico a la fracción obtenida al 37,5%, los precipitados se recogieron por centrifugación y se disolvieron en tampón de hidrocloreuro de Tris 10 mM (pH 8,5) y la solución se dializó frente a tampón de hidrocloreuro de Tris 10 mM (pH 8,5). La solución dializada que contenía HMGL se adsorbió en una columna DEAE Sepharose FF (22,5 x 210 mm) equilibrada con tampón de hidrocloreuro de Tris 10 mM (pH 8,5) y glicerol al 5% y eluida con NaCl con un gradiente de 0 → 0,5 M para recoger una fracción que tenía actividad de HMGL. Se añadió sulfato amónico a esta fracción al 15%, y la fracción se adsorbió en la columna Phenyl Sepharose FF (22,5 x 100 mm) equilibrada con sulfato amónico al 15% y tampón de hidrocloreuro de Tris 10 mM (pH 7,5), y se eluyó con gradientes de sulfato amónico al 15% y etilenglicol al 0% → sulfato amónico al 0% y etilenglicol al 10% para recoger una fracción que tenía actividad de HMGL. La fracción obtenida se dializó frente a tampón de hidrocloreuro de Tris 10 mM (pH 7,5) y la fracción se concentró por ultrafiltración con una membrana que tenía un corte de exclusión de peso molecular 10.000 para obtener 20 kU de HMGL purificada.

Método de medición de la actividad de HMGL

45 Se pusieron 0,070 ml de reactivo D1 y 0,006 ml de una solución de enzima en una celda y se incubaron a 37°C durante 5 min, después se añadieron 0,020 ml de reactivo D2. La mezcla se hizo reaccionar a 37°C durante 5 min y se midió la tasa de absorbancia (Aa) por minuto desde la parte donde la absorbancia a una longitud de onda de 340 nm después de la adición del reactivo D2 disminuía de forma lineal. Se llevó a cabo además el mismo procedimiento como un blanco usando tampón de dilución de enzima (tampón de hidrocloreuro de Tris 10 mM (pH 9)) en lugar de una solución de enzima para medir la tasa de disminución de absorbancia (Ab) por minuto. A partir de la diferencia de estas tasas de disminución de absorbancia (Aa - Ab), 1 U de actividad enzimática por mililitro de la solución de enzima se calculó como $U/ml = 2,54 \times (Aa - Ab)$. Debe indicarse que una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de una enzima necesaria para disminuir un micromol de NADH a 37°C por minuto, y la solución de enzima se diluyó con el tampón de dilución de enzima según fuera necesario. La medición se llevó a cabo usando el
55 analizador automático BM9020 (JEOL Ltd.).

Ejemplo 10. Medición de MVA y HMG-CoA por el método cíclico enzimático usando HMGR derivada de *Pseudomonas sp.* 1-MV (FERM BP-11063) que se expresó en *Escherichia coli*

Se añadieron 135 µl de los reactivos E1 a E5 como un primer reactivo de medición a 15 µl de una solución de

muestra (agua destilada, MVA 10, 50 o 100 nM o HMG-CoA 10, 50 o 100 nM) a 37°C, 5 minutos después se añadieron 15 µl de reactivo E11 o E12 como un segundo reactivo de medición, y después se midieron los cambios en la absorbancia [mABS] a una longitud de onda de 410 nm a 37°C a lo largo de 5 minutos. La medición se realizó usando el analizador automático BM9020 (JEOL Ltd.). Los resultados se muestran en la tabla 5. Se muestra que tanto el MVA como la HMG-CoA en una solución de muestra se pueden cuantificar al menos en el intervalo de 10 a 100 nM en presencia de CoA. Puesto que en ausencia de CoA no se produce una reacción cíclica enzimática, se muestra que las reacciones cíclicas enzimáticas representadas por las ecuaciones químicas 15 y 16 no se producen y que las reacciones cíclicas enzimáticas representadas por las ecuaciones químicas 17 y 18 tampoco se producen. En presencia de HMGL, no se produce una reacción cíclica enzimática, incluso en presencia de CoA cuando una muestra contiene MVA. Por lo tanto, se muestra que las reacciones cíclicas enzimáticas representadas por las ecuaciones químicas 15 y 16 no se producen, y que las reacciones cíclicas enzimáticas que se producen son reacciones de múltiples etapas representadas por las ecuaciones químicas 19 y 20 en un método cíclico enzimático. En presencia de MVK, no se produce una reacción cíclica enzimática incluso en presencia de CoA, cuando la muestra contiene HMG-CoA. Por lo tanto, se muestra que las reacciones cíclicas enzimáticas representadas por las ecuaciones químicas 17 y 18 no se producen, y que las reacciones cíclicas enzimáticas que se producen son reacciones de múltiples etapas representadas por las ecuaciones químicas 19 y 20 en un método cíclico enzimático. Además, cuando se usó el reactivo E3 como el primer reactivo de medición, la absorbancia de una muestra de agua destilada aumentó comparado con cuando se usó el reactivo E2, y el aumento era inhibido cuando se usaba el reactivo E4. A partir de estos resultados, se sugiere que el MVA está presente en el ATP.

20 Tabla 5

Reactivo		Solución de la muestra						
Primer reactivo de medición	Segundo reactivo de medición	MVA				HMGC0A		
		DW	10 nM	50 nM	100 nM	10 nM	50 nM	100 nM
E1	E11 +HMGR	1,2	1,1	1,2	1,1	0,6	1,1	10
E1	E12	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,6	0,8
E2 +CoA	E11 +HMGR	5,0	14,4	50,0	97,2	9,7	26,4	42,0
E2 +CoA	E12	0,7	0,7	0,7	0,8	0,7	0,7	0,6
E3 +CoA+ATP+Mg	E11 +HMGR	26,3	35,3	68,9	112,8	30,8	45,9	60,1
E3 +CoA+ATP+Mg	E12	0,6	0,8	0,8	0,7	0,8	0,8	0,8
E4 +CoA+ATP+Mg+MVK	E11 +HMGR	1,6	1,4	1,7	2,0	1,7	2,3	3,0
E4 +CoA+ATP+Mg+MVK	E12	0,9	1,0	0,9	0,8	0,6	0,8	0,9
E5 +CoA+HMGL	E11 +HMGR	1,9	1,9	1,8	2,0	1,7	1,5	1,8
E5 +CoA +HMGL	E12	1,2	1,5	1,3	1,1	1,3	1,1	1,3

Ejemplo 11. Medición de MVA por el método cíclico enzimático usando HMGR derivada de *Pseudomonas sp.* 1-MV (FERM BP-11063) que se expresó en *Escherichia coli*

Se añadieron 180 µl de reactivo F1 a 20 µl de una solución de muestra (en la que se disolvió MVA en agua destilada o suero de control Consera N [Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.] para obtener 0, 0,25, 0,5, 1, 2,5, 5, 10, 25, o 50 nM), y la mezcla se dejó reposar a 37°C durante 5 min. Después, se añadieron 20 µl de reactivo F2 y después se midieron los cambios en absorbancia a una longitud de onda de 405 nm a lo largo de 17 minutos. La medición se realizó por cuadruplicado usando un analizador automático 7170S (Hitachi, Ltd.). Los resultados se muestran en las tablas 6 y 7. El límite de medición del MVA se muestra que es 0,5 nM en la tabla 6 y 0,25 nM en la tabla 7.

30 Tabla 6

en DW MVA [nM]	[mABS]			en DW MVA [nM]	[mABS]			en DW MVA [nM]	[mABS]		
	ΔA405	AV	SD		ΔAa405	AV	SD		ΔA405	AV	SD
0	10,3 10,3 10,3 10,3	10,30	0,00	1	13,0 13,1 13,1 13,1	13,08	0,05	10	46,8 46,5 46,6 46,2	46,53	0,25
0,25	11,0 10,7 10,8 10,2	10,68	0,34	2,5	18,7 18,7 19,0 18,6	18,75	0,17	25	99,3 99,8 99,9 99	99,50	0,42
0,5	11,2 11,3 11,1 11,4	11,25	0,13	5	27,8 28,2 28,0 27,8	27,95	0,19	50	1829 184,2 185,5 185,6	184,55	1,27

Tabla 7

en Consera MVA [nM]	[mABS]			en Consera MVA [nM]	[mABS]			en Consera MVA [nM]	[mABS]		
	Δ A405	AV	SD		ΔA405	AV	SD		ΔA405	AV	SD
0	15,1	15,20	0,14	1	18,8	18,90	0,27	10	49,8	49,50	0,29
	15,2				49,6						
	15,1				49,1						
	15,4				49,5						
0,25	16,1	16,23	0,19	2,5	23,7	23,93	0,26	25	95,6	95,78	0,43
	16,2				95,9						
	16,1				95,3						
	16,5				96,3						
0,5	17,7	17,33	0,38	5	31,5	32,25	0,76	50	167,2	167,30	0,26
	17,4				167,6						
	16,8				167,0						
	17,4				167,4						

Ejemplo 12. Medición de CoA por el método cíclico enzimático usando HMGR derivada de *Pseudomonas sp.* 1-MV (FERM BP-11063) que se expresó en *Escherichia coli*

- 5 Se añadieron 135 µl de reactivo G1 a 15 µl de una solución de muestra (agua destilada, CoA 100 o 1000 nM), y la mezcla se incubó durante 5 min. Después, se añadieron 15 µl de solución de MVA (0, 0,0005, 0,005, o 0,05 mM) y se midieron los cambios en absorbancia [mABS] a una longitud de onda a 410 nm a lo largo de 26 min. Los resultados se muestran en la tabla 8.

Tabla 8

Solución de MVA	Muestra de CoA		
	0 nM	100 nM	1000 nM
0,05 mM	39,13	51,14	145,65
0,005 mM	8,39	9,27	18,13
0,0005 mM	5,33	5,1	5,98
0 mM	4,98	4,1	4,51

10

Igualmente, se añadieron 135 µl de reactivo G1 a 15 µl de una solución de muestra (agua destilada, CoA 10, 20, 50, 100, o 200 nM), y la mezcla se incubó durante 5 min. Después, se añadieron 15 µl de solución de MVA (0,5, 2,5, o 5 mM) y se midieron los cambios de absorbancia [mABS] a una longitud de onda de 410 nm a lo largo de 5 min. Los resultados se muestran en la tabla 9.

- 15 Tabla 9

Solución de MVA	Muestra de CoA					
	0 nM	10 nM	20 nM	50 nM	100 nM	200 nM
0,5 mM	63,44	72,45	73,68	78,64	86,68	102,81
2,5 mM	178,89	184,18	186,28	194,82	207,40	231,64
5 mM	287,91	291,88	295,75	304,31	317,0	341,95

- 20 Además, se añadieron de forma similar 135 µl de reactivo G2 a una solución de muestra (agua destilada, CoA 5, 10, 20, 50 o 100 nM), y la mezcla se incubó durante 5 min. Después, se añadieron 15 µl de solución de MVA (2,5 mM) y se midieron por cuadruplicado los cambios de absorbancia [mABS] a una longitud de onda de 410 nm a lo largo de 5 min. Los resultados se muestran en la tabla 10.

Tabla 10

muestra	CoA 0 nM				CoA 5 nM				CoA 10 nM			
[mABS]	420,63	419,32	417,68	420,68	422,13	421,90	421,88	422,68	424,33	427,64	427,28	424,70
media	419,58				422,15				425,99			
SD	1,41				0,37				1,71			

muestra	CoA 20 nM				CoA 50 nM				CoA 100 nM			
[mABS]	429,85	429,57	425,47	425,67	435,66	435,89	437,34	436,87	452,31	453,23	453,92	452,07
media	427,64				436,44				452,88			
SD	2,39				0,80				0,85			

Se muestra que la concentración mínima de CoA del límite de detección es al menos 50 nM o inferior. La medición se llevó a cabo usando el analizador automático BM9020 (JEOL Ltd.).

5 Ejemplo 13. Medición de MVA y HMG-CoA por el método cíclico enzimático usando HMGR derivada de *Pseudomonas sp.* 1-MV (FERM BP-11063) que se expresó en *Escherichia coli* después de tratamiento de la muestra usando MVK derivada de *Saccharomyces cerevisiae* (NBRC1136) que se había expresado en *Escherichia coli*

10 Se añadieron 100 µl de reactivo H1 o H2 a 100 µl de una solución de muestra (agua destilada, MVA 250 nM o HMG-CoA 750 nM), y la mezcla se incubó a 37°C durante 5 min. Después, 1) se separó la MVK por ultrafiltración con una membrana que tenía un corte de exclusión molecular de 10.000, o 2) se añadió 1 µl de solución de EDTA 100 mM para terminar la reacción catalizada por la MVK. Después se añadieron 180 µl del reactivo F1 a 20 µl de la muestra de 1) o 2), y la mezcla se dejó reposar a 37°C durante 5 min. Se añadieron 20 µl de reactivo F2, y después se midieron los cambios de absorbancia [mABS] a una longitud de onda de 405 nm a lo largo de 5 min. La medición después de filtración con una membrana o la adición de EDTA se llevó a cabo usando el analizador automático 7170S (Hitachi, Ltd.). Los resultados se muestran en la tabla 11. Se muestra que el tratamiento con MVK separó el MVA de la muestra, y que el tratamiento con MVK no afectó a la medición de la HMG-CoA.

Tabla 11

		muestra 1	muestra 2	muestra 3
MVA	[nM]	0	250	0
HMGCoA	[nM]	0	0	750
1) membrana	Reactivo G1	8,3	126,2	311,5
	Reactivo G2	6,3	5,9	319,5
2) +EDTA	Reactivo G1	4,6	119,4	341,2
	Reactivo G2	2,6	3,2	356,0

20 Ejemplo 14. Medición de HMG-CoA por el método cíclico enzimático usando HMGR derivada de *Pseudomonas sp.* 1-MV (FERM BP-11063) que se expresó en *Escherichia coli* y MVK derivada de *Saccharomyces cerevisiae* que se expresó en *Escherichia coli* (NBRC1136) (tratamiento alcalino)

25 Se añadieron 80 µl del reactivo J1(+) o J1(-) a 16 µl de una solución de muestra (agua destilada, MVA 10, 50 o 100 nM o HMG-CoA 10, 50 o 100 nM) a 37°C, y la mezcla se incubó durante 1,7 minutos. Después, se añadieron 24 µl del reactivo J2, la mezcla se incubó más durante 3,3 minutos, después se añadieron 40 µl de reactivo J3, y la mezcla se incubó más durante 3,8 minutos. Después se añadieron 16 µl del reactivo J4, y después se midieron los cambios en la absorbancia [mABS] a una longitud de onda de 410 nm a lo largo de 22,0 minutos. La medición se llevó a cabo usando el analizador automático BM9020 (JEOL Ltd.). Los resultados se muestran en la tabla 12. Se muestra que aproximadamente 99% del MVA en la muestra se separó por tratamiento con MVK en 1,7 minutos. Además, también se muestra que a los valores medidos de HMG-CoA en la muestra no les afecta el tratamiento con MVK. 30 Además, también se muestra que el MVA contaminado con reactivo J1(+) se separó por tratamiento con MVK.

Tabla 12

Reactivo	Muestra						
	DW	MVA			HMGCoA		
		10 nM	50 nM	100 nM	10 nM	50 nM	100 nM
J1(+) J2, J3, J4	16,55	16,76	17,31	18,37	23,39	50,48	85,16
J1 (-), J2, J3, J4	65,43	85,15	160,91	246,04	71,20	97,74	130,10

35 Ejemplo 15. Medición de HMG-CoA por el método cíclico enzimático usando HMGR derivada de *Pseudomonas sp.* 1-MV (FERM BP-11063) que se expresó en *Escherichia coli* y MVK derivada de *Saccharomyces cerevisiae* (NBRC1136) que se expresó en *Escherichia coli* (tratamiento con EDTA)

40 Se añadieron 80 µl del reactivo K1(+) o K1(-) a 16 µl de una solución de muestra (solución acuosa de MVA y HMG-CoA con las concentraciones mostradas en la tabla 13) a 37°C, y la mezcla se incubó durante 1,7 minutos. Después, se añadieron 24 µl del reactivo K2, y la mezcla se incubó más durante 3,3 minutos. Después, se añadieron 40 µl del reactivo K3, y la mezcla se incubó más durante 3,8 minutos. Después, se añadieron 16 µl del reactivo K4(+) o K4(-), y se midieron los cambios en la absorbancia [mABS] a una longitud de onda de 410 nm a lo largo de 22,0 minutos. La medición se llevó a cabo usando el analizador automático BM9020 (JEOL Ltd.). Las combinaciones de reactivos usados y los resultados se muestran en la tabla 13.

Tabla 13

Reactivo	muestra 1	muestra 2	muestra 3	muestra 4	muestra 5	muestra 6	muestra 7	muestra 8	muestra 9	
	MVA HMGCoA	0 nM 0 nM	5 nM 0 nM	10 nM 0 nM	25 nM 0 nM	50 nM 0 nM	0 nM 5 nM	0 nM 10 nM	0 nM 25 nM	0 nM 50 nM
K1(+), K2, K3, K4(+)		25,63	25,81	25,47	25,42	26,38	31,60	37,41	54,82	83,59
K1(-), K2, K3, K4(-)		27,81	37,50	47,71	77,41	124,14	33,55	40,00	56,73	84,57

5 Igualmente, la medición descrita antes se llevó a cabo para soluciones obtenidas por adición de la solución de muestra a suero de control, de modo que las concentraciones de MVA y HMG-CoA deberían ser las concentraciones mostradas en la tabla 14. Los resultados se muestran en la tabla 14.

Tabla 14

Reactivo	muestra 1	muestra 2	sample3	muestra 4	muestra 5	muestra 6	muestra 7	
	MVA HMG-CoA	0 nM 0 nM	5 nM 5 nM	10 nM 10 nM	25 nM 25 nM	50 nM 50 nM	50 nM 100 nM	50 nM 250 nM
K1(+), K2, K3, K4(+)		24,22	24,75	26,75	31,38	39,55	56,21	107,52
K1 (-), K2, K3, K4(-)		29,61	37,54	47,20	74,46	120,27	13524	181,37

Se muestra que hasta 50 nM se separó el MVA presente en la muestra quedando menos de 1%. Además, se muestra que el tratamiento con MVK no afecta a la medición del HMG-CoA.

10 Ejemplo 16. Medición de MVA por el método cíclico enzimático usando HMGR derivada de *Pseudomonas sp.* 1-MV (FERM BP-11063) que se expresó en *Escherichia coli* y HMGL derivada de *Pseudomonas putida* KT2440 (ATCC47054) que se expresó en *Escherichia coli* (filtración con membrana)

15 Se añadieron 70 µl del reactivo L1 o L2 a 70 µl de cada una de las soluciones de muestra 1 a 6 mostradas en la tabla 15, y la mezcla se incubó a 37°C durante 5 minutos. Después, la HMGL se separó por ultrafiltración con una membrana que tenía un corte de exclusión molecular de 10.000. Después, se añadieron 180 µl del reactivo F1 a 20 µl de una muestra filtrada, la mezcla se dejó reposar a 37°C durante 5 minutos, se añadieron 20 µl del reactivo F2, y después se determinaron los cambios en absorbancia [mABS] a una longitud de onda de 405 nm a lo largo de 5 minutos. Después de filtración con una membrana, la medición se llevó a cabo usando el analizador automático 7170S (Hitachi, Ltd.). Los resultados se muestran en la tabla 16. Se muestra que el tratamiento con HMGL separó la HMG-CoA de la muestra. Además, se muestra que el tratamiento con HMGL no afectó a la medición del MVA.

20

Tabla 15

	muestra 1	muestra 2	muestra 3	muestra 4	muestra 5	muestra 6
MVA	50 nM	50 nM	50 nM	0 nM	0 nM	0 nM
HMGCoA	0 nM	250 nM	750 nM	0 nM	250 nM	750 nM

Tabla 16

	muestra 1	muestra 2	muestra 3	muestra 4	muestra 5	muestra 6
Reactivo L1	136,7	136,0	132,8	19,1	20,1	20,2
Reactivo L2	135,9	407,3	769,4	20,3	336,6	706,6

25 Ejemplo 17. Medición de MVA por el método cíclico enzimático usando HMGR derivada de *Pseudomonas sp.* 1-MV (FERM BP-11063) que se expresó en *Escherichia coli* y HMGL derivada de *Pseudomonas putida* KT2440 (ATCC47054) que se expresó en *Escherichia coli* (tratamiento alcalino)

30 Se añadieron 80 µl del reactivo M1(+) o M1(-) a 16 µl de una solución de muestra (solución acuosa de MVA o HMG-CoA en las concentraciones mostradas en la tabla 17) a 37°C, y la mezcla se incubó durante 1,7 minutos. Después, se añadieron 24 µl del reactivo M2, y la mezcla se incubó más durante 3,3 minutos, después se añadieron 40 µl del reactivo M3, y la mezcla se incubó más durante 3,8 minutos. Después, se añadieron además 16 µl del reactivo M4, y después se midieron los cambios en absorbancia [mABS] a una longitud de onda de 410 nm a lo largo de 22,0 minutos. La medición se llevó a cabo usando el analizador automático BM9020 (JEOL Ltd.). Las combinaciones de reactivos usados para la medición y los resultados se muestran en la tabla 17.

Tabla 17

Reactivo	muestra 1	muestra 2	muestra 3	muestra 4	muestra 5	muestra 6	muestra 7	muestra 8	muestra 9
	MVA 0 nM	5 nM	10 nM	25 nM	50 nM	0 nM	0 nM	0 nM	0 nM
M1(+), M2, M3, M4	21,94	30,47	40,59	64,50	108,38	24,28	23,65	24,71	24,87
M1(-), M2, M3, M4	21,78	30,58	39,89	66,53	107,73	27,53	31,69	43,47	62,41

5 Igualmente, las soluciones preparadas por adición de MVA y HMG-CoA al suero de control Consera N (Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.) en las concentraciones mostradas en las tablas 18 y 19, se usaron como soluciones de muestra para llevar a cabo la medición descrita antes. Los resultados se muestran en las tablas 18 y 19.

Tabla 18

Reactivo	muestra 1	muestra 2	muestra 3	muestra 4	muestra 5	muestra 6	muestra 7
	MVA 0 nM	0 nM	0 nM	0 nM	0 nM	0 nM	0 nM
M1 (+), M2, M3, M4	22,66	22,76	22,75	22,18	22,26	22,65	23,53
M1 (-), M2, M3, M4	22,09	22,68	23,73	25,93	29,99	3929	62,20

Tabla 19

Reactivo	muestra 1	muestra 2	muestra 3	muestra 4	muestra 5	muestra 6	muestra 7
	MVA 0 nM	5 nM	10 nM	25 nM	50 nM	50 nM	50 nM
M1 (+), M2, M3, M4	22,66	28,18	34,78	53,46	83,90	82,72	83,21
M1 (-), M2, M3, M4	22,09	27,73	35,30	55,70	88,77	98,06	120,26

10 Se muestra que hasta 250 nM se separó la HMG-CoA presente en las muestras, quedando menos de 4%. También se muestra que hasta 100 nM se separó la HMG-CoA quedando menos de 1%. Además, se muestra que el tratamiento con HMGL no afecta a la medición de MVA.

15 Ejemplo 18. Producción del reactivo para el método cíclico enzimático para medir el MVA y/o HMG-CoA, que comprende la etapa de separar el MVA contaminante usando MVK derivada de *Saccharomyces cerevisiae* (NBRC1136) que se expresó en *Escherichia coli* (adición de EDTA)

10 ml de cada uno de: Reactivo N2 preparado por adición de ATP 1 mM y cloruro de magnesio 1 mM al reactivo N1; y reactivo N3 preparado por adición de MVK 0,3 U/ml al reactivo N2; se dejaron reposar a 37°C durante 20 minutos. Después se añadieron 0,1 ml de EDTA 0,5 M a cada uno de estos reactivos para preparar los reactivos N2E y N3E.

20 Se añadieron 135 µl de reactivos N1, N2E o N3E a 15 µl de una solución de muestra (agua destilada o una solución de 570 U/ml de HMGR derivada de *Pseudomonas sp.* 1-MV [FERM BP-11063] que se expresó en *Escherichia coli* y disuelta en Tris-HCl 10 mM [pH 7,5]) a 37°C, 5 min después se añadieron 15 µl de agua destilada o solución de MVA 50 nM, y después se midieron los cambios en absorbancia [mABS] a una longitud de onda de 410 nm a lo largo de 22 minutos. La medición se llevó a cabo usando el analizador automático BM9020 (JEOL Ltd.). Los resultados se muestran en la tabla 20.

25 Tabla 20

Reactivo	muestra	
	DW	HMGR 570 U/ml
N1, DW	2,62	70,85
N2E, DW	3,86	96,01
N3E, DW	2,12	13,92
N1, MVA 50 nM	2,65	192,12
N2E, MVA 50 nM	3,91	226,48
N3E, MVA 50 nM	1,97	148,94

30 Mediante la separación del MVA presente en el reactivo N1 con MVK, la absorbancia de un blanco disminuía de 70,85 a 13,92, y la sensibilidad en el momento de la medición de MVA 50 nM mejoró ligeramente de 121,27 (calculado por 192,12 - 70,85) a 135,02 (calculado por 148,94 - 13,92). Además, al separar el MVA presente en el reactivo N2E con MVK, la absorbancia de un blanco disminuyó de 96,01 a 13,92, y la sensibilidad en el momento de la medición de MVA 50 nM era prácticamente igual, con 130,47 (calculado por 226,48 - 96,01) frente a 135,02 (calculado por 148,94 - 13,92). El MVA que puede estar contaminando en CoA, T-NAD, NADH, ATP, y similares, y el

MVA que puede estar contaminando durante la etapa de producción de reactivos, se puede reducir por tratamiento con MVK, al 17,3% o menor, y 12,8% o menor, respectivamente, de las cantidades antes del tratamiento, y se obtienen reactivos con alta sensibilidad y alta precisión y con absorbancia baja en una medición de un blanco, lo que es preferible para la medición.

- 5 Ejemplo 19. Producción de reactivos del método cíclico enzimático para medir el MVA y/o HMG-CoA, que comprende la etapa de separar el MVA contaminante usando MVK derivada de *Saccharomyces cerevisiae* (NBRC1136) que se expresó en *Escherichia coli* (filtración con membrana)

10 2 ml de cada uno de: Reactivo N4 preparado por adición de ATP 1 mM y cloruro de magnesio 1 mM al reactivo N1; y reactivo N5 preparado por adición de MVK al reactivo N4 a 0,4 U/ml; se dejaron reposar a 37°C durante 20 minutos. Después, se llevó a cabo la ultrafiltración con una membrana que tenía un corte de exclusión molecular de 10.000, para preparar los reactivos N4F y N5F.

15 Se añadieron 135 µl del reactivo N4F o N5F a 15 µl de una solución de muestra (agua destilada o una solución de 320 U/ml HMGR derivada de *Pseudomonas sp.* 1-MV [FERM BP-11063] que se expresó en *Escherichia coli* y disuelta en Tris-HCl 10 mM [pH 7,5]) a 37°C, 5 minutos más tarde se añadieron 15 µl de agua destilada o solución de MVA 50 nM, y después se midieron los cambios en absorbancia [mABS] a una longitud de onda de 410 nm a lo largo de 26 minutos. La medición se llevó a cabo usando el analizador automático BM9020 (JEOL Ltd.). Los resultados se muestran en la tabla 21.

Tabla 21

Reactivo	muestra	
	DW	HMGR 320 U/ml
N4F, DW	5,17	58,57
N5F, DW	5,53	10,41
N4F, MVA 50 nM	5,23	129,04
N5F, MVA 50 nM	5,61	86,78

- 20 Mediante la separación del MVA presente en el reactivo N4F con MVK, la absorbancia de un blanco disminuyó de 58,57 a 10,41, y la sensibilidad en el momento de la medición de MVA 50 nM era casi igual, con 70,47 (calculado por 129,04 - 58,57) frente a 76,37 (calculado por 86,78 - 10,41). El MVA que puede estar contaminando en CoA, T-NAD, NADH, ATP, y similares, y el MVA que puede estar contaminando durante la etapa de producción de reactivos, se podía reducir al 9,1% o menor por tratamiento con MVK, de forma similar al ejemplo 18, y se obtenían reactivos que son preferibles para la medición con alta sensibilidad y alta precisión y con absorbancia baja en una reacción de un blanco.

Ejemplo 20. Producción de reactivos del método cíclico enzimático para medir el MVA y/o HMG-CoA, que comprende la etapa de separar el HMG-CoA contaminante usando HMGL derivada de *Pseudomonas putida* KT2440 (ATCC47054) que se expresó en *Escherichia coli* (filtración con membrana)

- 30 2 ml de cada uno de: Reactivo N6 preparado por adición de HMGL 0,5 U/ml al reactivo N1; reactivo N7 preparado por adición de HMG-CoA 125 nM al reactivo N1; y reactivo N8 preparado por adición de HMGL 0,5 U/ml al reactivo N7; se dejaron reposar a 37°C durante 20 minutos. Después, se llevó a cabo la ultrafiltración con una membrana que tenía un corte de exclusión molecular de 10.000, para preparar los reactivos N1F, N6F, N7F o N8F.

35 Se añadieron 135 µl de los reactivos N1F, N6F, N7F o N8F a 15 µl a una solución de muestra (agua destilada o una solución de MVA 10, 50 o 100 nM) a 37°C. 5 min más tarde, se añadieron 15 µl de una solución (solución de HMGR 320 U/ml derivada de *Pseudomonas sp.* 1-MV [FERM BP-11063] que se expresó en *Escherichia coli* y disuelta en Tris-HCl 10 mM [pH 7,5]), y después se midieron los cambios en absorbancia [mABS] a una longitud de onda de 410 nm a lo largo de 4,6 minutos. La medición se llevó a cabo usando el analizador automático BM9020 (JEOL Ltd.). Los resultados se muestran en la tabla 22.

40 Tabla 22

Reactivo	DW	MVA		
		10 nM	50 nM	100 nM
N1F	4,25	10,56	35,99	70,07
N6F	4,23	11,13	36,73	72,16
N7F	305,99	311,02	334,36	356,70
N8F	3,81	10,62	36,23	71,22

Al separar la HMG-CoA presente en el reactivo N7 con HMGL, la absorbancia de un blanco disminuyó de 305,99 a 3,81, y la sensibilidad en el momento de la medición de MVA 100 nM mejoró de 50,71 (calculado por 356,70 - 305,99) a 67,41 (calculado por 71,22 - 3,81). Incluso si la HMG-CoA contamina durante la etapa de producción de

los reactivos, el tratamiento con HMGL podía separar totalmente HMG-CoA 125 nM, y se obtenían reactivos que son preferibles para la medición con alta sensibilidad y alta precisión y con absorbancia baja en una reacción de un blanco.

5 Ejemplo 21. Medición de MVA y/o HMG-CoA por el método cíclico enzimático usando HMGR derivada de *Archaeoglobus fulgidus* (NBRC100126) que se expresó en *Escherichia coli*

10 Se añadieron 135 µl del reactivo N3E descrito en el ejemplo 18 a 15 µl de una solución de muestra (agua destilada o soluciones de MVA o soluciones de HMG-CoA mostradas en la tabla 23) a 37°C. 5 min más tarde, se añadieron 15 µl de solución de HMGR 12 U/ml disuelta en Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), y se midieron los cambios en la absorbancia [mABS] a una longitud de onda de 410 nm lo largo de 26 minutos. La medición se llevó a cabo usando el analizador automático BM9020 (JEOL Ltd.). Los resultados se muestran en la tabla 23 y figuras 1 y 2. Se muestra que el MVA y HMG-CoA se pueden medir con alta precisión.

Tabla 23

DW	MVA[nM]				HMGCoA[nM]			
	5	10	25	50	5	10	25	100
14,31	15,73	17,37	22,23	30,13	14,59	15,62	18,02	31,09

Ejemplo 22. Reacción cíclica enzimática usando HMGR producida por *Pseudomonas sp.* 1-MV (FERM BP-11063)

15 Se añadieron 180 µl del reactivo P1(+) o P1(-) a 10 µl de solución de HMGR (solución de HMGR 3,3 U/ml producida por el método descrito en el ejemplo 1 o solución de HMGR 3,3 U/ml producida por el método descrito en el ejemplo 1 y sometida a cromatografía en columna de hidroxiapatito de la misma forma descrita en el ejemplo 5) a 37°C. 5 min más tarde, se añadieron 20 µl del reactivo P2, y se midieron los cambios en la absorbancia [mABS] a una longitud de onda de 405 nm a lo largo de 5 minutos. La medición se llevó a cabo usando el analizador automático 7170S (Hitachi, Ltd.). Los resultados se muestran en la tabla 24. Se muestra que se produjo una reacción cíclica enzimática y se pudo medir el MVA. Además, se muestra que cuando se sometió una solución de HMGR de alta pureza a la cromatografía en columna de hidroxiapatito, la señal del blanco era baja y la sensibilidad de la medición era alta.

Tabla 24

	Producida como en el ejemplo 1 HMGR 3,3 U/ml	+ Hidroxiapatito HMGR 3,3 U/ml
P1 (+) MVA 0,01 mM	935,7	1315,9
P1 (-) MVA 0 mM	535,6	20,5
delta	400,1	1295,4

25

Ejemplo 23. Reacción cíclica enzimática usando HMGR producida a partir de *Variovorax sp.* 5-MV (FERM BP-11064)

30 Se añadieron 180 µl del reactivo P1(+) o P1(-) a 10 µl de solución de HMGR (solución de HMGR 6,3, 3,2 o 1,6 U/ml producida por el método descrito en el ejemplo 2) a 37°C. 5 minutos más tarde, se añadieron 20 µl del reactivo P2, y se midieron los cambios en la absorbancia [mABS] a una longitud de onda de 405 nm a lo largo de 5 minutos. La medición se llevó a cabo usando el analizador automático 7170S (Hitachi, Ltd.). Los resultados se muestran en la tabla 25. Se muestra que se produjo una reacción cíclica enzimática, se pudo medir el MVA, y aumentó la sensibilidad de la medición al aumentar la HMGR.

Tabla 25

	HMGR [U/ml]		
	6,3	3,2	1,6
P1(+) MVA 0,01 mM	1154,6	629,2	303,3
P1(-) MVA 0 mM	94,5	47,9	25
delta	1060,1	581,3	278,3

35

Ejemplo 24. Reacción cíclica enzimática usando HMGR producida a partir de *Delftia sp.* 12-MV (FERM BP-11065) y HMGR producida a partir de *Comamonas sp.* 25-MV (FERM BP-11066)

40 Se añadieron 180 µl del reactivo P1(+) o P1(-) a 10 µl de solución de HMGR (solución de HMGR 12,0 U/ml producida por el método descrito en el ejemplo 3 o solución de HMGR 5,4 U/ml producida por el método descrito en el ejemplo 4) a 37°C. 5 minutos más tarde, se añadieron 20 µl del reactivo P2, y se midieron los cambios en la absorbancia [mABS] a una longitud de onda de 405 nm a lo largo de 5 minutos. La medición se llevó a cabo usando

el analizador automático 7170S (Hitachi, Ltd.). Los resultados se muestran en la tabla 26. Se muestra que se produjo una reacción cíclica enzimática, y se podía medir el MVA.

Tabla 26

	Delftia sp. 12-MV HMGR 12,0 U/ml	Comamonas sp. 25-MV HMGR 5,4 U/ml
P1(+) MVA 0,01 mM	462,4	497,3
P1(-) MVA 0 mM	377,4	468,7
delta	85,0	28,6

5 Ejemplo 25. Propiedades fisicoquímicas de HMGR (HMGR-V) derivada de *Variovorax sp.* 5-MV (FERM BP-11064), HMGR (HMGR-D) derivada de *Delftia sp.* 12-MV (FERM BP-11065), HMGR (HMGR-C) derivada de *Comamonas sp.* 25-MV (FERM BP-11066), HMGR (HMGR-P) derivada de *Pseudomonas sp.* 1-MV (FERM BP-11063) que se expresó en *Escherichia coli*, y HMGR (HMGR-A) derivada de *Archaeoglobus fulgidus* (NBRC100126) que se expresó en *Escherichia coli*

10 Estabilidad térmica

Cada HMGR se disolvió en Tris-HCl 10 mM (pH 7,5) y BSA al 0,05% para obtener una solución de aproximadamente 0,4 U/ml. Esta solución de enzima se trató a diferentes temperaturas durante 10 min, y después se midió una actividad residual (%). Los resultados se muestran en la tabla 27.

Tabla 27. Estabilidad térmica (%)

°C	HMGR-V	HMGR-D	HMGR-C	HMGR-P	HMGR-A
4	100	100	100	100	100
37	91	100	94	99	106
42	-	100	-	-	-
50	95	103	-	-	-
55	103	96	-	98	-
60	103	40	81	97	-
65	102	1	29	26	-
70	93	-	15	-	-
72,5	55	-	-	-	-
75	11	-	-	-	-
80	-	-	-	-	41
85	-	-	-	-	35
90	-	-	-	-	27

15

Estabilidad frente a pH

Cada HMGR se disolvió en tampón 20 mM con diferentes pH y BSA al 0,05% para obtener una solución de aproximadamente 0,4 U/ml. Estas soluciones de enzima se trataron durante 10 min a las siguientes temperaturas: HMGR-V a 72,5°C, HMGR-D a 60°C, HMGR-C a 65°C, HMGR-P a 65°C, y HMGR-A a 80°C. Después, se midió una actividad residual (%). Se usaron los siguientes tampones: ácido acético-acetato sódico a pH de 4,0 a 6,0, fosfato potásico a pH de 6,0 a 7,5, Tris-HCl a pH de 7,0 a 10,0, y CAPS a pH de 9,5 a 11,0. Los resultados se muestran en las figuras 3 a 7. Estas soluciones de enzimas eran estables al siguiente pH: HMGR-V a pH de 6,0 a 8,0; HMGR-D a pH de 5,5 a 8,5; HMGR-C a pH 4,0, pH de 6,0 a 10,0 y pH 11,0; HMGR-P a pH de 4,5 a 8,5; y HMGR-A a pH 4,0 y pH de 6,0 a 11,0.

20

25 pH óptimo

Cada HMGR se diluyó en Tris-HCl 10 mM (pH 7,5) y BSA al 0,05% a aproximadamente 0,4 U/ml. La actividad de HMGR de estas soluciones de enzimas se midió en una mezcla de reacción que contenía BSA al 0,05%, usando el reactivo B en la que se sustituyó Tris-HCl 50 mM (pH 8,5) por tampones 50 mM a diferentes pH. La actividad relativa (%) a cada pH se muestra en las figuras 8 a 12. Se usaron los siguientes tampones: fosfato potásico a pH de 6,0 a 7,5, Tris-HCl a pH de 7,0 a 10,0, y CAPS a pH de 9,5 a 11,0. La mayor actividad era a pH de 9,0 a 10,5 en todas las soluciones de HMGR. Los valores de pH óptimos son como sigue: HMGR-V, pH de 7,5 a 10,0; HMGR-D, pH de 8,5 a 10,0; HMGR-C, pH de 7,0 a 10,0; HMGR-P, pH de 7,0 a 10,0; y HMGR-A, pH de 7,0 a 10,5.

30

Valor de Km: MVA

La concentración de MVA en el reactivo B se cambió de 0,005 mM a 5 mM para determinar el valor de Km de cada HMGR. Los valores de Km eran los siguientes: HMGR-V, 0,36 mM; HMGR-D, 0,18 mM; HMGR-C, 0,66 mM; HMGR-P, 0,47 mM; y HMGR-A, 0,25 mM.

35

Valor de Km: CoA

Se añadió BSA al 0,5% al reactivo B, la concentración de CoA se cambió de 0,01 mM a 5 mM y se determinó el valor de Km de cada HMGR. Los valores de Km eran los siguientes: HMGR-V, 0,066 mM; HMGR-D, 0,038 mM; HMGR-C, 0,073 mM; HMGR-P, 0,097 mM; y HMGR-A, 0,035 mM.

5 Valor de Km: NAD

Se añadió BSA al 0,5% al reactivo B, la concentración de CoA se fijó en 0,5 mM, las concentraciones de NAD se cambiaron de 0,005 a 5 mM, y se determinó el valor de Km de cada HMGR. Los valores de Km eran los siguientes: HMGR-V, 0,19 mM; HMGR-D, 0,08 mM; HMGR-C, 0,26 mM; HMGR-P, 0,29 mM; y HMGR-A, 0,17 mM.

Peso molecular: filtración en gel

10 Usando el gel TSK G3000SWxL (Tosoh Corporation), se determinó el peso molecular de cada HMGR por filtración en gel usando Pi-K 50 mM (pH 7,5), sulfato sódico 0,2 M y azida sódica al 0,05% como fase móviles. Los pesos moleculares eran los siguientes: HMGR-V, 330.000; HMGR-D, 260.000; HMGR-C, 270.000; HMGR-P, 280.000; HMGR-A, 410.000.

Peso molecular: SDS-PAGE

15 Se determinó el peso molecular de cada HMGR por SDS-PAGE. Los pesos moleculares eran los siguientes: HMGR-V, 42.000; HMGR-D, 42.000; HMGR-C, 42.000; HMGR-P, 45.000; y HMGR-A, 40.000.

Secuencia de aminoácidos

20 La secuencia de aminoácidos N terminal de HMGR-V se muestra en la SEQ ID NO: 25, pero el primer aminoácido es Met o Val. La secuencia de aminoácidos N terminal de HMGR-D se muestra en la SEQ ID NO: 26, pero el primer aminoácido es Met, Val o Thr, y el aminoácido 24 es Asp o Ala. La secuencia de aminoácidos N terminal de HMGR-C se muestra en la SEQ ID NO: 27, pero el primer aminoácido es Met, Ala o Thr, el aminoácido 23 es Thr o Leu, y el aminoácido 35 es Leu o Glu.

25 Ejemplo 26. Medición de MVA en el plasma y suero humanos por el método cíclico enzimático usando HMGR derivada de *Pseudomonas sp.* 1-MV (FERM BP-11063) que se expresó en *Escherichia coli* y MVK derivada de *Saccharomyces cerevisiae* (NBRC1136) que se expresó en *Escherichia coli*

30 Se añadieron 150 µl de reactivo Q1A o Q1B a 5 µl de una solución de muestra (agua destilada, MVA 50 nM [D,L-MVA 100 nM], Plasma 1, Plasma 2, Suero 1 o Suero 2), y la mezcla se dejó reposar a 37°C durante 5 minutos. Después, se añadieron 50 µl del reactivo Q2, y 1 min después de la adición, se midieron los cambios en la absorbancia a la longitud de onda de 405 nm (sub-longitud de onda, 660 nm) a lo largo de 4 minutos. Los resultados se muestran en la tabla 28. Los valores calculados usando los valores medidos después de separar la MVK muestran concentraciones de D-MVA más precisas porque se restó el valor de blanco por reacción de HMG-CoA presente en la muestra o reacción no específica. La medición se llevó a cabo usando el analizador automático 7170S (Hitachi, Ltd.). Las muestras de plasma y suero se adquirieron en Kohjin Bio Co., Ltd. (Plasma 1: plasma humano normal (mezclado) con citrato sódico; Plasma 2: plasma humano normal (mezclado) con heparina; Suero 1: suero humano normal (mezclado); Suero 2: suero humano normal (sujeto individual)).

Tabla 28

muestra	Reactivo Q1A		Reactivo Q1B		Cálculo (Q1A- Q1B)	
	Δ405 [mASS]	D-MVA [nM]	Δ405 [mABS]	Δ405 [mABS]	D-MVA [nM]	
DW	13,15	0,0	10,25	2,90	0,0	
D-MVA 50 nM	32,20	50,0	10,40	21,80	50,0	
Plasma 1	34,90	57,1	16,50	18,40	41,0	
Plasma 2	27,70	38,2	12,90	14,80	31,5	
Suero 1	64,40	134,5	11,15	53,25	133,2	
Suero 2	40,55	71,9	18,65	21,90	50,3	

40 Ejemplo 27. Medición de MVA en orina humana por el método cíclico enzimático usando HMGR derivada de *Pseudomonas sp.* 1-MV (FERM BP-11063) que se expresó en *Escherichia coli* y MVK derivada de *Saccharomyces cerevisiae* (NBRC1136) que se expresó en *Escherichia coli*

Se añadieron 120 µl del reactivo R1 a 7,5 µl de una solución de muestra (agua destilada, MVA 50 nM [D,L-MVA 100 nM], orina diluida 1 [orina 1 diluida 200 veces con agua destilada], orina diluida 2 [orina 2 diluida 200 veces con agua destilada]), y la mezcla se dejó reposar a 37°C durante 5 minutos. Después, se añadieron 30 µl del reactivo R2, y después se midieron los cambios en absorbancia a una longitud de onda de 410 nm a lo largo de 10 minutos. La

medición se llevó a cabo usando el analizador automático BM9020 (JEOL Ltd.). Las orinas 1 y 2 se recogieron del mismo sujeto a las 4:00 y 17:00 el mismo día. Se midió la creatinina en la muestra de orina usando un reactivo de medición de creatinina (L Type Wako CRE·M: Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). Los resultados se muestran en las tablas 29 y 30. El valor corregido con creatinina sirve como un indicador con influencia reducida de la concentración de orina.

5

Tabla 29

muestra	$\Delta 405$ [mABS]	D-MVA [nM]
DW	27,8	0,0
D-MVA 50 nM	86,0	50,0
Orina diluida 1	57,7	25,7
Orina diluida 2	41,0	11,3

Tabla 30

	D-MVA [nM]	Creatinina [mg/dl]	D-MVA/Cre [nM-dl/mg]
Orina 1	5137	243	21,1
Orina 2	2268	120	18,9

- 10 Ejemplo 28. Medición de MVA en alimento por el método cíclico enzimático usando HMGR derivada de *Pseudomonas sp.* 1-MV (FERM BP-11063) que se expresó en *Escherichia coli* y MVK derivada de *Saccharomyces cerevisiae* (NBRC1136) que se expresó en *Escherichia coli*

Se añadieron 80 μ l del reactivo K1(+) o K1(-) a 16 μ l de una solución de muestra (agua destilada, solución de MVA, muestras 1 a 12 en la tabla 33) a 37°C, la mezcla se incubó durante 1,7 minutos, se añadieron además 24 μ l del reactivo K2, la mezcla se incubó durante otros 3,3 minutos, se añadieron 40 μ l de reactivo K3, y la mezcla se incubó durante otros 3,8 minutos. Después, se añadieron 16 μ l del reactivo K4(+) o K4(-), y se midieron los cambios en la absorbancia a una longitud de onda de 410 nm a lo largo de 22,0 minutos [mABS]. La medición se llevó a cabo usando un analizador automático BM9020 (JEOL Ltd.). Las combinaciones de reactivos usadas para la medición y los valores medidos se muestran en las tablas 31 y 32. Los valores medidos de MVA [nM] se obtuvieron dibujando una curva de calibración, usando agua destilada y D-MVA 100 nM (200 nM como D,L-MVA). Cuando se midió el agua destilada, las diferencias en absorbancia [mABS] se anotaron entre las combinaciones de reactivos K1(+), K2, K3, y K4(+) y reactivos K1(-), K2, K3, y K4(-). Esto puede ser debido al MVA contenido en los reactivos como se explica en el ejemplo 19. Los métodos para preparar las muestras 1 a 12 se muestran en la tabla 33. Los números de muestra en la tabla 33 corresponden a los números de muestra en las tablas 31 y 32.

- 25 Tabla 31

	DW	MVA 2,5 nM	MVA 5 nM	MVA 25 nM	MVA 50 nM	MVA 100 nM	muestra 1	muestra 2	muestra 3
K1 (+), K2, K3, K4 (+) [mABS]	11,8	12,3	12,5	11,9	12,6	13,4	22,9	29,6	12,5
K1 (-), K2, K3, K4 (-) [mABS]	121,8	130,3	140,1	206,1	282,6	413,2	303,0	169,9	348,4
delta [mABS]	110,0	118,0	127,6	194,2	270,0	399,8	280,1	140,3	335,9
Valor medido de MVA [nM]	0,0	2,8	6,1	29,1	55,2	100,0	58,7	10,5	78,0

Tabla 32

	muestra 4	muestra 5	muestra 6	muestra 7	muestra 8	muestra 9	muestra 10	muestra 11	muestra 12
K1 (+), K2, K3, K4 (+) [mABS]	25,6	16,7	13,1	13,3	16,4	15,6	9,1	13,4	12,6
K1 (-), K2, K3, K4 (-) [mABS]	235,1	128,8	404,3	363,9	195,2	221,6	129,2	198,6	246,0
delta [mABS]	209,5	112,1	391,2	350,6	178,8	206,0	120,1	185,2	233,4
Valor medido de MVA [nM]	34,3	0,7	97,0	83,0	23,7	33,1	3,5	25,9	42,6

Tabla 33

muestra	Producto	Método de preparación
1	Zumo de manzana	Diluir zumo al 100% 25 veces con agua destilada.
2	Zumo de piña	Diluir zumo al 100% 5 veces con agua destilada.
3	Harina	Suspender 100 mg de harina en 1 ml de agua destilada, centrifugar, y diluir el líquido sobrenadante 20 veces
4	Zanahoria	Suspender 500 mg de zanahorias ralladas en 12 ml de agua destilada, centrifugar, y diluir el líquido sobrenadante 5 veces con agua destilada.
5	Té negro	Diluir té negro 5 veces con agua destilada.
6	Sake japonés	Diluir sake japonés 100 veces con agua destilada.
7	Cerveza	Diluir cerveza 100 veces con agua destilada.
8	Whisky	Diluir whisky 5 veces con agua destilada.
9	Pan	Suspender 200 mg de pan en 1 ml de agua destilada, centrifugar, y diluir el líquido sobrenadante 5 veces con agua destilada.
10	Arroz	Suspender 200 mg de arroz en 1 ml de agua destilada, centrifugar, y diluir el líquido sobrenadante 5 veces con agua destilada.
11	Yogur	Suspender 300 mg de yogur en 1 ml de agua destilada, centrifugar, y diluir el líquido sobrenadante 5 veces con agua destilada.
12	Carne de salmón	Suspender 200 mg de carne de salmón en 1 ml de agua destilada, centrifugar, y diluir el líquido sobrenadante 20 veces con agua destilada.

Ejemplo 29. Método de medición de MVA estándar (método de MVK) y material de referencia de MVA

- 5 Se pesó con precisión lactona del ácido D,L-mevalónico (Sigma M4667) para preparar una solución 0,5 M, y esta solución se diluyó con precisión para preparar soluciones de D,L-MVA 0,05, 0,1, 0,2, y 0,5 mM. Se pesó con precisión lactona del ácido D-mevalónico (Tokyo Chemical Industry M1347) para preparar una solución 0,5 M, y esta solución se diluyó con precisión para preparar soluciones de D-MVA 0,05, 0,1, 0,2, y 0,5 mM.

Se prepararon dos soluciones de NADH A y B. Las absorbancias en cm^{-1} medidas a 340 nm usando un espectrofotómetro de monocromador doble (Shimadzu UV-2550) eran 1,0915 y 2,683.

- 10 Para confirmar la precisión del analizador automático BM9020 (JEOL Ltd.) a una longitud de onda de medición de 340 nm y una sub-longitud de onda de 658 nm, se añadieron 75 μl de agua destilada a 25 μl de solución acuosa de NADH A o B a 37°C, se midió la absorbancia Aa, se añadieron además 75 μl de agua destilada 8,8 minutos más tarde, y se midió la absorbancia Ab. La absorbancia Aa y la absorbancia Ab de la solución acuosa A eran 0,23602 y 0,13452, respectivamente. La absorbancia Aa y la absorbancia Ab de la solución acuosa NADH B eran 0,59107 y 0,33786, respectivamente. Los coeficientes del dispositivo BM9020 para estas soluciones eran 0,86 (= $0,23602/1,0915 \times 25/[25 + 75]$), 0,86 (= $0,13425/1,0915 \times 25/[25 + 75 + 75]$), 0,88 (= $0,59107/2,683 \times 25/[25 + 75]$), y 0,88 (= $0,33786/2,683 \times 25/[25 + 75 + 75]$), con una media de 0,87.

Se usó MVK derivada de *Saccharomyces cerevisiae* (NBRC1136) que se expresó en *Escherichia coli*

- 20 Se añadieron 75 μl de reactivo S1 a 25 μl de agua destilada, una solución de D,L-MVA o una solución de D-MVA a 37°C, se añadieron 75 μl de reactivo S2 8,8 minutos más tarde, y se midieron la absorbancia [ABS] A1 antes de la adición de S2 y la absorbancia [ABS] A2 6 minutos después de la adición de S2 a una longitud de onda de medición de 340 nm usando el analizador automático BM9020 (JEOL Ltd.). Los transcurros de los tiempos de reacción cuando las muestras eran agua destilada, D,L-MVA 0,5 mM y D-MVA 0,5 mM se muestran en la figura 13.

- 25 A partir de estos resultados y el coeficiente de absorbancia molar de NADH de $6,3 \times 1000$ ($1/[\text{mol} \cdot \text{cm}]$), se calculó el NADH producido como sigue:

$$\text{NADH producido (nmol)} = (A2 \times 175 - A1 \times 100) / (6,3 \times 0,87).$$

- 30 La cantidad de NADH producida a partir de D-MVA es la diferencia entre el valor de NADH producido y el valor a partir de una reacción del blanco usando una muestra de agua destilada. Mediante esta ecuación, se determinó la cantidad de D-MVA contenida en la solución de D,L-MVA o solución de D-MVA. Los resultados se muestran en la tabla 34. El contenido medio de D-MVA en la lactona del ácido D,L-mevalónico (Sigma M4667) era 0,5, y el contenido medio de D-MVA en la lactona del ácido D-mevalónico (Tokyo Chemical Industry M1347) era 0,88. Por lo tanto, se muestra que se puede medir una cantidad precisa de MVA estableciendo el método de medición convencional, y se puede preparar el material de referencia del MVA.

Tabla 34

	agua destilada	D,L-MVA				D-MVA			
		0,05 mM	0,1 mM	0,2 mM	0,5 mM	0,05 mM	0,1 mM	0,2 mM	0,5 mM
A1	0,03242	0,03258	0,03250	0,03247	0,03249	0,03248	0,03254	0,03261	0,03280
A2	0,06444	0,08409	0,10358	0,14051	0,25678	0,09910	0,13427	0,20007	0,40341
NADH (nmol)	1,466	2,090	2,714	3,894	7,606	2,572	3,693	5,793	12,282
NADH (nmol) derivado de D-MVA		0,624	1,248	2,428	6,140	1,106	2,227	4,327	10,816
Contenido de D-MVA		0,50	0,50	0,49	0,49	0,88	0,89	0,87	0,87

Ejemplo 30. Método de medición de MVA convencional (método de HMGR) y material de referencia de MVA

Se usaron soluciones de D-MVA en diferentes concentraciones preparadas en el ejemplo 29.

- 5 Como coeficiente del aparato para el analizador automático BM9020 (JEOL Ltd.), se usó 0,87, que se determinó en el ejemplo 29.

Se usaron HMGR derivada de *Pseudomonas sp.* 1-MV (FERM BP-11063) y expresada en *Escherichia coli* y HMGL derivada de *Pseudomonas putida* KT2440 (ATCC47054) y expresada en *Escherichia coli*.

- 10 Se añadieron 75 µl de reactivo T1 a 25 µl de agua destilada, una solución de D,L-MVA o una solución de D-MVA a 37°C, se añadieron 75 µl de reactivo T2 5 minutos más tarde, y se midieron la absorbancia [ABS] A1 antes de la adición de T2 y la absorbancia [ABS] A2 13 minutos después de la adición de T2 a una longitud de onda de medición de 340 nm usando un analizador automático BM9020 (JEOL Ltd.). Los transcurros de los tiempos de reacción cuando las muestras eran agua destilada, D,L-MVA 0,5 mM y D-MVA 0,5 mM se muestran en la figura 14.

- 15 A partir de estos resultados y el coeficiente de absorbancia molar de NADH de $6,3 \times 1000$ (1/[mol·cm]), se calculó el NADH producido como sigue:

$$\text{NADH producido (nmol)} = (A2 \times 175 - A1 \times 100) / (6,3 \times 0,87).$$

- 20 La cantidad de NADH producida a partir de D-MVA es la diferencia entre el valor de NADH producido y el valor a partir de una reacción del blanco usando una muestra de agua destilada. Mediante esta ecuación, se determinó la cantidad de D-MVA contenida en la solución de D,L-MVA o solución de D-MVA. Los resultados se muestran en la tabla 35. El contenido medio de D-MVA en la lactona del ácido D,L-mevalónico (Sigma M4667) era 0,5, y el contenido medio de D-MVA en la lactona del ácido D-mevalónico (Tokyo Chemical Industry M1347) era 0,90. Por lo tanto, se muestra que se puede medir una cantidad precisa de MVA estableciendo el método de medición convencional, y que se puede preparar el material de referencia del MVA.

Tabla 35

	agua destilada	D,L-MVA				D-MVA			
		0,05 mM	0,1 mM	0,2 mM	0,5 mM	0,05 mM	0,1 mM	0,2 mM	0,5 mM
A1	0,07588	0,07575	0,07643	0,07571	0,07573	0,07581	0,07580	0,07586	0,07588
A2	0,03996	0,07974	0,11890	0,19610	0,43355	0,11079	0,18304	0,32062	0,73029
NADH (nmol)	-0,109	1,164	2,402	4,880	12,461	2,154	4,461	8,853	21,933
NADH (nmol) derivado de D-MVA		1,272	2,510	4,988	12,569	2,263	4,570	8,961	22,041
Contenido de D-MVA		0,51	0,50	0,50	0,50	0,91	0,91	0,90	0,88

25

Ejemplo de preparación 1. Medio

Los medios usados en los ejemplos mencionados antes se describen a continuación.

Medio A

El medio A se preparó añadiendo 3% de A2 y 0,5% de A3 a A1

Tabla 36

A1	
0,7%	Extracto de levadura
1 mg/ml	tiamina
2 mg/ml	riboflavina
2 mg/l	ácido nicotónico
2 mg/l	pantotenato de calcio
2 mg/l	piridoxina HCl
0,1 mg/l	biotina
1 mg/l	ácido p-aminobenzoico
0,1 mg/l	ácido fólico

(Ajustado a pH 5,5 y después tratado en autoclave)

A2	
128 g/l	Na ₂ HPO ₄ -7H ₂ O
30 g/l	KH ₂ PO ₄
5 g/l	NaCl
10 g/l	NH ₄ Cl

5 (Ajustado a pH 5,5 y después tratado en autoclave)

A3	
5%	ácido D,L-mevalónico

(Esterilizado por filtración)

Medio B

El medio B se preparó añadiendo 3% de B2 y 0,5% de B3 a B1

Tabla 37

B1	
0,7%	Extracto de levadura
1 mg/ml	tiamina
2 mg/ml	riboflavina
2 mg/l	ácido nicotónico
2 mg/l	pantotenato de calcio
2 mg/l	piridoxina HCl
0,1 mg/l	biotina
1 mg/l	ácido p-aminobenzoico
0,1 mg/l	ácido fólico

10 (Ajustado a pH 7 y después tratado en autoclave)

B2	
128 g/l	Na ₂ HPO ₄ -7H ₂ O
30 g/l	KH ₂ PO ₄
5 g/l	NaCl
10 g/l	NH ₄ Cl

(Ajustado a pH 7 y después tratado en autoclave)

B3	
5%	ácido D,L-mevalónico

(Esterilizado por filtración)

Medio C

El medio C se preparó añadiendo 3% de C2 y 0,5% de C3 a C1

Tabla 38

C1	
0,7%	Extracto de levadura
1 mg/ml	tiamina
2 mg/ml	riboflavina
2 mg/l	ácido nicotónico
2 mg/l	pantotenato de calcio
2 mg/l	piridoxina HCl
0,1 mg/l	biotina
1 mg/l	ácido p-aminobenzoico
0,1 mg/l	ácido fólico

(Ajustado a pH 9 y después tratado en autoclave)

C2	
128 g/l	Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O
30 g/l	KH ₂ PO ₄
5 g/l	NaCl
10 g/l	NH ₄ Cl

5 (Ajustado a pH 9 y después tratado en autoclave)

C3	
5%	ácido D,L-mevalónico

(Esterilizado por filtración)

Ejemplo de preparación 2. Reactivos

Las composiciones de los reactivos usados en los ejemplos mencionados antes se muestran a continuación.

Tabla 39

10 Reactivo A

50 mM	Tris-HCl (pH 8,5)
0,005%	cloruro de nitroazul de tetrazolio
0,2 mM	coenzima A
0,1%	triton X-100
1 mM	NAD
1 mM	NADP
5 U/ml	Diaforasa (Fabricado por Toyobo Co., Ltd.)
5 mM	ácido D,L-mevalónico

Tabla 40

Reactivo B

50 mM	Tris-HCl (pH 8,5)
0,005%	cloruro de nitroazul de tetrazolio
0,2 mM	coenzima A
0,1%	triton X-100
1 mM	NAD
1 mM	NADP
5 U/ml	Diaforasa (Fabricado por Toyobo Co., Ltd.)
5 mM	ácido D,L-mevalónico

Tabla 41

Reactivo C

50 mM	Tris-HCl (pH 7,5)
0,005%	cloruro de nitroazul de tetrazolio
5 mM	Glucosa
1 mM	MgCl ₂
1 mM	NAD
1 mM	ATP
5 U/ml	Hexoquinasa dependiente de ADP (ADP-HKP fabricado por Asahi Kasei Pharma Corporation)
5 U/ml	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (fabricada por Toyobo Co., Ltd.)
5 U/ml	Diaforasa (fabricada por Toyobo Co., Ltd.)
2 mM	ácido D,L-mevalónico

Tabla 42

5 Reactivo Cb

50 mM	Tris-HCl (pH 7,5)
0,005%	cloruro de nitroazul de tetrazolio
5 mM	Glucosa
1 mM	MgCl ₂
1 mM	NAD
1 mM	ATP
5 U/ml	Hexoquinasa dependiente de ADP (ADP-HKP fabricado por Asahi Kasei Pharma Corporation)
5 U/ml	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (fabricada por Toyobo Co., Ltd.)
5 U/ml	Diaforasa (fabricada por Toyobo Co., Ltd.)

Tabla 43

Reactivo D1

25 mM	Tris-HCl (pH 9)
0,25 mM	NAD
6,25 U/ml	3-Hidroxiubutirato deshidrogenasa (3-HBDH II: fabricada por Asahi Kasei Pharma Corporation)

10 Tabla 44

Reactivo D2

0,75 mM	D,L-HMG-CoA
---------	-------------

Tabla 45

Reactivo E1

50 mM	Glicina-NaOH (pH 10,0)
1 mM	T-NAD
0,2 mM	NADH

15 Tabla 46

Reactivo E2

50 mM	Glicina-NaOH (pH 10,0)
1 mM	T-NAD
0,2 mM	NADH
1 mM	CoA

Tabla 47

Reactivo E3

50 mM	Glicina-NaOH (pH 10,0)
1 mM	T-NAD
0,2 mM	NADH
1 mM	CoA
1 mM	ATP
1 mM	MgCl ₂

Tabla 48

Reactivo E4

50 mM	Glicina-NaOH (pH 10,0)
1 mM	T-NAD
0,2 mM	NADH
1 mM	CoA
1 mM	ATP
1 mM	MgCl ₂
1 U/ml	MVK

5 Tabla 49

Reactivo E5

50 mM	Glicina-NaOH (pH 10,0)
1 mM	T-NAD
0,2 mM	NADH
1 mM	CoA
1 U/ml	HMGL

Tabla 50

Reactivo E11

10 mM	Tris-HCl (pH 8,0)
400 U/ml	HMGR

10

Tabla 51

Reactivo E12

10 mM	Tris-HCl (pH 8,0)
-------	-------------------

Tabla 52

Reactivo F1

50 mM	Glicina-NaOH (pH 10,0)
1 mM	T-NAD
57 U/ml	HMGR

15

Tabla 53

Reactivo F2

50 mM	Glicina-NaOH (pH 10,0)
0,2 mM	NADH

20 Tabla 54

Reactivo G1

50 mM	Glicina-NaOH (pH 10,0)
1 mM	T-NAD
0,2 mM	NADH
32 U/ml	HMGR

Tabla 55

Reactivo G2

50 mM	Glicina-NaOH (pH 10,0)
1 mM	T-NAD
0,2 mM	NADH
63 U/ml	HMGR

Tabla 56

Reactivo H1

20 mM	Glicina-NaOH (pH 9,0)
2 mM	ATP
2 mM	MgCl ₂

5 Tabla 57

Reactivo H2

20 mM	Glicina-NaOH (pH 9,0)
2 mM	ATP
2 mM	MgCl ₂
2 U/ml	MVK

Tabla 58

Reactivo J1(+)

20 mM	Glicina-NaOH (pH 10,5)
2 mM	ATP
2 mM	MgCl ₂
2 U/ml	MVK

10

Tabla 59

Reactivo J1(-)

20 mM	Glicina-NaOH (pH 10,5)
2 mM	ATP
2 mM	MgCl ₂

Tabla 60

Reactivo J2

0,222 M	NaOH
---------	------

15

Tabla 61

Reactivo J3

200 mM	Glicina-NaOH
44,5 mM	Ácido cítrico
4 mM	CoA
4 mM	T-NAD
160 U/ml	HMGR
pH 5,7	

20 Tabla 62

Reactivo J4

50 mM	Glicina-NaOH (pH 10,0)
1,8 mM	NADH

Tabla 63

Reactivo K1(+)

20 mM	Glicina-NaOH (pH 10,5)
2 mM	ATP
2 mM	MgCl ₂
2 U/ml	MVK

25

Tabla 64

Reactivo K1(-)

20 mM	Glicina-NaOH (pH 10,5)
2 mM	ATP
2 mM	MgCl ₂

Tabla 65

5 Reactivo K2

200 mM	Glicina-NaOH (pH 10,0)
--------	------------------------

Tabla 66

Reactivo K3

50 mM	Glicina-NaOH (pH 10,0)
4 mM	CoA
4 mM	T-NAD
50 U/ml	HMGR

10 Tabla 67

Reactivo K4(+)

50 mM	Glicina-NaOH (pH 10,0)
50 mM	EDTA
1,8 mM	NADH

Tabla 68

Reactivo K4(-)

50 mM	Glicina-NaOH (pH 10,0)
50 mM	EDTA
1,8 mM	NADH
10 U/ml	MVK

15

Tabla 69

Reactivo L1

20 mM	Tris-HCl (pH 9,0)
11 U/ml	HMGL

Tabla 70

20 Reactivo L2

20 mM	Tris-HCl (pH 9,0)
-------	-------------------

Tabla 71

Reactivo M1(+)

10 mM	Tris-HCl (pH 9,0)
0,4 U/ml	HMGL

25 Tabla 72

Reactivo M(-)

10 mM	Tris-HCl (pH 9,0)
-------	-------------------

Tabla 73

Reactivo M2

0,222 M	NaOH
---------	------

Tabla 74

5 Reactivo M3

200 mM	Glicina-NaOH
44,5 mM	Ácido cítrico
4 mM	CoA
4 mM	T-NAD
50 U/ml	HMGR
pH 5,7	

Tabla 75

Reactivo M4

50 mM	Glicina-NaOH (pH 10,0)
1,8 mM	NADH

10 Tabla 76

Reactivo N1

50 mM	Glicina-NaOH (pH 10,0)
1 mM	T-NAD
0,2 mM	NADH
1 mM	CoA

Tabla 77

Reactivo P1(+)

50 mM	Tris-HCl (pH 8,5)
1 mM	T-NAD
1 mM	CoA
0,01 mM	MVA

15

Tabla 78

Reactivo P1(-)

50 mM	Tris-HCl (pH 8,5)
1 mM	T-NAD
1 mM	CoA

Tabla 79

20 Reactivo P2

50 mM	Tris-HCl (pH 8,5)
2 mM	NADH

Tabla 80

Reactivo Q1A

50 mM	Glicina-NaOH
0,18 mM	NADH
30 mM	NaHCO ₃
0,7 mM	MgCl ₂
0,7 mM	ATP
0,07%	Tween80
0,05%	NaN ₃
p H 9,4	

Tabla 81

Reactivo Q1A

50 mM	Glicina-NaOH
0,18 mM	NADH
30 mM	NaHCO ₃
0,7 mM	MgCl ₂
0,7 mM	ATP
0,07%	Tween80
0,05%	NaN ₃
0,8 U/ml	MVK
pH 9,4	

5 Tabla 82

Reactivo Q2

100 mM	HEPES
6 mM	EDTA
2,4 mM	CoA
30 mM	T-NAD
67 U/ml	HMGR
0,02%	ProClin300
pH 6,0	

Tabla 83

Reactivo R1

100 mM	Glicina-NaOH (pH 9,5)
1,84 mM	T-NAD
1,23 mM	CoA
20 U/ml	HMGR

10

Tabla 84

Reactivo R2

989 mM	Glicina-NaOH (pH 9,5)
1,13 mM	NADH

Tabla 85

15 Reactivo S1

10 mM	Glicina-NaOH (pH 10,5)
5 mM	Glucosa
1 mM	MgCl ₂
1 mM	NAD
1 mM	ATP
0,5 U/ml	MVK
10 U/ml	Hexoquinasa dependiente de ADP (ADP-HKP II: fabricado por Asahi Kasei Pharma Corporation)

Tabla 86

Reactivo S2

10 mM	Tris-HCl (pH 8,5)
5 U/ml	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (fabricada por Toyobo Co., Ltd.)

Tabla 87

Reactivo T1

50 mM	Glicina-NaOH (pH 10,5)
2 mM	NAD
2 mM	CoA
5 U/ml	HMGL

Tabla 88

5 Reactivo T2

10 mM	Tris-HCl (pH 8,5)
5 U/ml	HMGR

Esta solicitud se basa en la solicitud de patente japonesa nº 2009-009177 presentada el 19 de enero, 2009, y su contenido se incorpora en la presente memoria por referencia en esta solicitud.

Aplicabilidad industrial

- 10 De acuerdo con la presente invención, el MVA y/o HMG-CoA en una muestra biológica que es un indicador de la cantidad de colesterol sintetizado en el cuerpo o CoA en una muestra biológica que es un indicador del metabolismo de lípidos en el cuerpo, se pueden medir de forma conveniente con sensibilidad ultra alta y precisión alta. La medición mencionada antes se puede llevar a cabo para muchas muestras, usando un analizador automático para fines generales. Por lo tanto, muchas muestras se pueden medir con precisión en ensayos clínicos rutinarios y similares, y por lo tanto, la presente invención tiene aplicabilidad industrial en el diagnóstico de afecciones patológicas y similares.

Texto libre para la lista de secuencias

- SEQ ID NO: 1 es la secuencia de aminoácidos de HMGR derivada de *Pseudomonas sp.* 1-MV (FERM BP-11063).
- SEQ ID NO: 2 es la secuencia de aminoácidos de HMGR derivada de *Pseudomonas mevalonii*.
- 20 SEQ ID NO: 3 es la secuencia de aminoácidos de HMGR derivada de *Archaeoglobus fulgidus* (NBRC100126).
- SEQ ID NO: 4 es la secuencia de nucleótidos del promotor POP.
- SEQ ID NO: 5 es la secuencia de nucleótidos del gen de MVK de *Saccharomyces cerevisiae* (NBRC1136).
- SEQ ID NO: 6 es la secuencia de aminoácidos de HMGL derivada de *Pseudomonas mevalonii*.
- SEQ ID NO: 7 es la secuencia de aminoácidos de HMGL derivada de *Pseudomonas putida* KT2440 (ATCC47054).
- 25 SEQ ID NO: 8 es la secuencia de nucleótidos de ADNr 16S de *Pseudomonas sp.* 1-MV (FERM BP-11063).
- SEQ ID NO: 9 es la secuencia de nucleótidos de ADNr 16S de *Variovorax sp.* 5-MV (FERM BP-11064).
- SEQ ID NO: 10 es la secuencia de nucleótidos de ADNr 16S de *Delftia sp.* 12-MV (FERM BP-11065).
- SEQ ID NO: 11 es la secuencia de nucleótidos de ADNr 16S de *Comamonas sp.* 25-MV (FERM BP-11066).
- 30 SEQ ID NO: 12 es la secuencia de nucleótidos del gen de HMGR derivada de *Pseudomonas sp.* 1-MV (NBRC-11063).
- SEQ ID NO: 13 es la secuencia de nucleótidos del gen de HMGR derivada de *Pseudomonas mevalonii*.
- SEQ ID NO: 14 es la secuencia de nucleótidos de un cebador directo para la amplificación de HMGR derivada de *Pseudomonas sp.* 1-MV (FERM BP-11063).
- SEQ ID NO: 15 es la secuencia de nucleótidos de un cebador inverso para la amplificación de HMGR derivada de *Pseudomonas sp.* 1-MV (FERM BP-11063).
- 35 SEQ ID NO: 16 es la secuencia de nucleótidos de un cebador directo para la amplificación de HMGR derivada de *Archaeoglobus fulgidus* (NBRC100126).
- SEQ ID NO: 17 es la secuencia de nucleótidos de un cebador inverso para la amplificación de HMGR derivada de *Archaeoglobus fulgidus* (NBRC100126).

ES 2 543 010 T3

SEQ ID NO: 18 es la secuencia de nucleótidos de un cebador directo para la amplificación de la primera mitad de la MVK derivada de *Saccharomyces cerevisiae* (NBRC1136).

SEQ ID NO: 19 es la secuencia de nucleótidos de un cebador inverso para la amplificación de la primera mitad de la MVK derivada de *Saccharomyces cerevisiae* (NBRC1136).

5 SEQ ID NO: 20 es la secuencia de nucleótidos de un cebador directo para la amplificación de la mitad final de la MVK derivada de *Saccharomyces cerevisiae* (NBRC1136).

SEQ ID NO: 21 es la secuencia de nucleótidos de un cebador inverso para la amplificación de la mitad final de la MVK derivada de *Saccharomyces cerevisiae* (NBRC1136).

10 SEQ ID NO: 22 es la secuencia de nucleótidos de un cebador directo para la amplificación de HMGL derivada de *Pseudomonas putida* KT2440.

SEQ ID NO: 23 es la secuencia de nucleótidos de un cebador inverso para la amplificación de HMGL derivada de *Pseudomonas putida* KT2440.

SEQ ID NO: 24 es la secuencia de nucleótidos del promotor POP y un sitio de clonación unido al mismo.

15 SEQ ID NO: 25 es la secuencia de aminoácidos N terminal de HMGR derivada de *Variovorax* sp. 5-MV (FERM BP-11064).

SEQ ID NO: 26 es la secuencia de aminoácidos N terminal de HMGR derivada de *Delftia* sp. 12-MV (FERM BP-11065).

SEQ ID NO: 27 es la secuencia de aminoácidos N terminal de HMGR derivada de *Comamonas* sp. 25-MV (FERM BP-11066).

20

Lista de secuencias

<110> Asahi Kasei Pharma Corporation

5 <120> Método y reactivo para medir ácido mevalónico, 3-hidroximetilglutaril coenzima A y coenzima A

<130> F109202

<150> JP2009-009177

10 <151> 2009-01-19

<160> 27

<170> PatentIn version 3.5

15 <210> 1
<211> 428

<212> PRT

<213> Pseudomonas sp.

20 <400> 1

Met Ser Ile Asp Ser Arg Leu Pro Asn Phe Arg Ser Leu Ser Pro Val
1 5 10 15

Gln Arg Leu Glu His Leu Gln Gln Leu Leu Gln Leu Pro Ala Asp Asp
20 25 30

Val Ala Leu Leu Arg Asp Ala Gly Ala Leu Pro Leu Asp Ile Ala Asp
35 40 45

Gly Met Ile Glu Asn Val Ile Gly Lys Phe Glu Leu Pro Tyr Ala Val
50 55 60

Ala Ser Asn Phe Gln Ile Asn Gly Arg Asp Val Val Val Pro Leu Val
65 70 75 80

Val Glu Glu Pro Ser Val Val Ala Ala Ala Ser Phe Met Ala Lys Leu
85 90 95

Ala Arg Asp Ala Gly Gly Phe Met Thr Ser Ser Ser Leu Pro Leu Met
100 105 110

Arg Ala Gln Val Gln Ile Val Asp Ile Ala Asp Pro Tyr Asn Ala Arg
115 120 125

Leu Ser Leu Met Arg Arg Lys Glu Glu Ile Ile Glu Leu Ala Asn Arg
130 135 140

Lys Asp Gln Leu Leu Asn Lys Leu Gly Gly Gly Cys Arg Asp Ile Glu
145 150 155 160

ES 2 543 010 T3

Val His Thr Phe Ala Gln Ser Pro Arg Gly Pro Met Leu Val Ala His
 165 170 175

Leu Ile Val Asp Val Arg Asp Ala Met Gly Ala Asn Thr Val Asn Thr
 180 185 190

Met Ala Glu Ala Val Ala Pro Leu Met Glu Glu Ile Thr Gly Gly Lys
 195 200 205

Val Arg Leu Arg Ile Leu Ser Asn Leu Ala Asp Leu Arg Leu Ala Arg
 210 215 220

Ala Gln Val Arg Ile Ala Pro Gln Leu Leu Thr Thr Ser Glu Tyr Lys
 225 230 235 240

Gly Glu Asp Val Ile Glu Gly Ile Leu Asp Ala Tyr Asn Phe Ala Val
 245 250 255

Val Asp Pro Tyr Arg Ala Ala Thr His Asn Lys Gly Ile Met Asn Gly
 260 265 270

Ile Asp Pro Leu Ile Val Ala Thr Gly Asn Asp Trp Arg Ala Val Glu
 275 280 285

Ala Gly Ala His Ala Tyr Ala Cys Arg Asp Gly His Tyr Gly Ser Leu
 290 295 300

Thr Thr Trp Glu Lys Asp Gly Asn Gly His Leu Val Gly Thr Leu Glu
 305 310 315 320

Met Pro Met Pro Val Gly Leu Val Gly Gly Ala Thr Lys Thr His Pro
 325 330 335

Leu Ala Gln Leu Ser Leu Arg Ile Leu Gly Val Lys Thr Ala Gln Glu
 340 345 350

Leu Ala Glu Ile Ala Val Ala Val Gly Leu Ala Gln Asn Leu Gly Ala
 355 360 365

Leu Arg Ala Leu Ser Thr Glu Gly Ile Gln Arg Gly His Met Ala Leu
 370 375 380

His Ala Arg Asn Ile Ala Leu Ser Ala Gly Ala Arg Gly Glu Glu Val
 385 390 395 400

Asp Trp Leu Val Lys Arg Met Val Glu Ala Arg Asp Val Arg Ala Asp
 405 410 415

Asn Ala Ala Gln Leu Leu Lys Gln Lys Arg Ala Leu
 420 425

5 <210> 2
 <211> 428
 <212> PRT

ES 2 543 010 T3

<213> Pseudomonas mevalonii

<400> 2

Met Ser Leu Asp Ser Arg Leu Pro Ala Phe Arg Asn Leu Ser Pro Ala
1 5 10 15

Ala Arg Leu Asp His Ile Gly Gln Leu Leu Gly Leu Ser His Asp Asp
20 25 30

Val Ser Leu Leu Ala Asn Ala Gly Ala Leu Pro Met Asp Ile Ala Asn
35 40 45

Gly Met Ile Glu Asn Val Ile Gly Thr Phe Glu Leu Pro Tyr Ala Val
50 55 60

Ala Ser Asn Phe Gln Ile Asn Gly Arg Asp Val Leu Val Pro Leu Val
65 70 75 80

Val Glu Glu Pro Ser Ile Val Ala Ala Ala Ser Tyr Met Ala Lys Leu
85 90 95

Ala Arg Ala Asn Gly Gly Phe Thr Thr Ser Ser Ser Ala Pro Leu Met
100 105 110

His Ala Gln Val Gln Ile Val Gly Ile Gln Asp Pro Leu Asn Ala Arg
115 120 125

Leu Ser Leu Leu Arg Arg Lys Asp Glu Ile Ile Glu Leu Ala Asn Arg
130 135 140

Lys Asp Gln Leu Leu Asn Ser Leu Gly Gly Gly Cys Arg Asp Ile Glu
145 150 155 160

Val His Thr Phe Ala Asp Thr Pro Arg Gly Pro Met Leu Val Ala His
165 170 175

5 Leu Ile Val Asp Val Arg Asp Ala Met Gly Ala Asn Thr Val Asn Thr

ES 2 543 010 T3

Met Gln Val Leu Arg Leu Asp Arg Arg His Tyr Lys Ser Gly Lys Ile
 1 5 10 15

Arg Arg Ala Met Ser Ser Arg Ile Pro Gly Phe Tyr Lys Leu Ser Val
 20 25 30

Glu Glu Arg Leu Lys Lys Val Ala Glu Phe Ala Gly Leu Ser Asp Glu
 35 40 45

Glu Val Lys Ala Val Leu Ser Gln Gly Leu Pro Leu Asp Val Ala Asp
 50 55 60

Arg Met Ile Glu Asn Val Ile Gly Thr Phe Glu Leu Pro Leu Gly Ile
 65 70 75 80

Ala Thr Asn Phe Leu Ile Asp Gly Lys Asp Tyr Leu Ile Pro Met Ala
 85 90 95

Ile Glu Glu Pro Ser Val Val Ala Ala Ala Ser Asn Ala Ala Arg Met
 100 105 110

Ala Arg Glu Ser Gly Gly Phe Thr Thr Asp Tyr Thr Gly Ser Leu Met
 115 120 125

Ile Gly Gln Ile Gln Val Thr Lys Leu Leu Asn Pro Asn Ala Ala Lys
 130 135 140

Phe Glu Val Leu Arg Gln Lys Asp Glu Ile Ile Glu Arg Ala Asn Glu
 145 150 155 160

Cys Asp Pro Met Leu Val Asn Leu Gly Gly Gly Cys Lys Asp Ile Glu
 165 170 175

Ala Arg Val Ile Asp Thr Ile Met Gly Lys Met Leu Ile Val His Leu
 180 185 190

Ile Val Asp Val Lys Asp Ala Met Gly Ala Asn Ala Val Asn Thr Met
 195 200 205

ES 2 543 010 T3

Cys Glu Lys Val Ala Pro Phe Ile Glu Arg Ile Thr Gly Gly Lys Val
 210 215 220

Tyr Leu Arg Ile Ile Ser Asn Leu Ala Ala Tyr Arg Leu Ala Arg Ala
 225 230 235 240

Lys Ala Val Phe Asp Lys Asp Val Ile Gly Gly Glu Glu Val Val Glu
 245 250 255

Gly Ile Met Leu Ala Tyr Ala Phe Ala Ala Ala Asp Pro Phe Arg Cys
 260 265 270

Ala Thr His Asn Lys Gly Ile Met Asn Gly Ile Ser Ala Leu Met Ile
 275 280 285

Ala Thr Gly Asn Asp Phe Arg Ala Ile Glu Ala Gly Ala His Ser Tyr
 290 295 300

Ala Ala Ile Gly Gly Tyr Lys Pro Leu Thr Thr Tyr Glu Val Asp Arg
 305 310 315 320

Lys Gly Asn Leu Val Gly Thr Ile Glu Ile Pro Met Ala Val Gly Val
 325 330 335

Ile Gly Gly Ala Thr Lys Val Asn Pro Leu Ala Lys Ile Ser Leu Lys
 340 345 350

Ile Leu Gly Val Asn Thr Ala Glu Glu Leu Ala Arg Val Ala Ala Ala
 355 360 365

Leu Gly Leu Ala Gln Asn Phe Ala Ala Leu Arg Ala Leu Ala Thr Glu
 370 375 380

Gly Ile Gln Arg Gly His Met Glu Leu His Ala Arg Asn Leu Ala Ile
 385 390 395 400

Met Ala Gly Ala Thr Gly Asp Glu Val Asp Arg Val Val Glu Ile Met
 405 410 415

Val Arg Asp Gly Lys Ile Arg Leu Asp Tyr Ala Lys Glu Val Leu Glu
 420 425 430

Arg Leu Arg Ser
 435

<210> 4
 <211> 202
 <212> DNA
 <213> Aerococcus viridans
 <400> 4

5

ES 2 543 010 T3

aaaagtcttt gatttataag ggtttctgga cttcttactg tactagtaca atttcgcccc 60
 ttgtaccatt tttctgatac agaaacaata ttgtactgaa aaaagggtat ttttggtctaa 120
 ttatggacct cacaaaggat atttgtggca attcattgga ataagctggt ttaagtgcta 180
 ttatttcaat tgtgatattt tt 202

<210> 5
 <211> 1332
 <212> DNA
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

5

<400> 5

atgtcattac cgttcttaac ttctgcaccg gaaagggtta ttatTTTTTg tgaacactct 60
 gctgtgtaca acaagcctgc cgtcgtctgt agtgtgtctg cgttgagaac ctacctgcta 120
 ataagcgagt catctgcacc agatactatt gaattggact tcccggacat tagctttaat 180
 cataagtggc ccatcaatga tttcaatgcc atcaccgagg atcaagtaaa ctccccaaaa 240
 ttggccaagg ctcaacaagc caccgatggc ttgtctcagg aactcgttag tcttttggat 300
 ccgttgttag ctcaactatc cgaatccttc cactaccatg cagcgttttg tttcctgtat 360
 atgtttgttt gcctatgccc ccatgccaag aatattaagt tttctttaa gtctacttta 420
 cccatcggtg ctgggttggg ctcaagcgc tctatttctg tatcactggc cttagctatg 480
 gcctacttgg ggggttaat aggatcta at gacttggaaa agctgtcaga aaacgataag 540
 catatagtga atcaatgggc cttcataggt gaaaagtgta ttcacggtac cccttcagga 600
 atagataacg ctgtggccac ttatggtaat gcctgctat ttgaaaaaga ctacataat 660
 ggaacaataa acacaacaa ttttaagttc ttagatgatt tcccagccat tccaatgatc 720
 ctaacctata ctagaattcc aaggtctaca aaagatcttg ttgctcgcgt tcgtgtggtg 780
 gtcaccgaga aatttcctga agttatgaag ccaattcttg atgccatggg tgaatgtgcc 840
 ctacaaggct tagagatcat gactaagtta agtaaagtga aaggcaccga tgacgaggct 900
 gtagaaacta ataatgaact gtatgaacaa ctattggaat tgataagaat aaatcatgga 960
 ctgcttgtct caatcgggtg ttctcatcct ggattagaac ttattaaaaa tctgagcgat 1020
 gatttgagaa ttggctccac aaaacttacc ggtgctgggtg gcggcgggtg ctctttgact 1080
 ttggttacgaa gagacattac tcaagagcaa attgacagct tcaaaaagaa attgcaagat 1140
 gattttagtt acgagacatt tgaacagac ttgggtggga ctggctgctg tttgttaagc 1200
 10 gcaaaaaatt tgaataaaga tcttaaaatc aaatccctag tattccaatt atttgaaaat 1260
 aaaactacca caaagcaaca aattgacgat ctattattgc caggaaacac gaatttacca 1320
 tggacttcat aa 1332

<210> 6
 <211> 301
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas mevalonii*

15

<400> 6

20

ES 2 543 010 T3

Met Gln Ala Val Lys Val Phe Glu Val Gly Pro Arg Asp Gly Leu Gln
 1 5 10 15

Asn Glu Arg Gln Pro Leu Ser Val Ala Ala Arg Val Gly Leu Ile Gly
 20 25 30

Glu Leu Ala Gly Thr Gly Leu Arg His Ile Glu Ala Gly Ala Phe Val
 35 40 45

Ser Pro Arg Trp Val Pro Gln Met Ala Gly Ser Asp Glu Val Leu Arg
 50 55 60

Gln Leu Pro Ser Asn Asp Gly Val Ser Tyr Thr Ala Leu Val Pro Asn
 65 70 75 80

Arg Gln Gly Phe Glu Ala Ala Gln Arg Ala Gly Cys Arg Glu Val Ala
 85 90 95

Val Phe Ala Ala Ala Ser Glu Ala Phe Ser Arg Asn Asn Ile Asn Cys
 100 105 110

Ser Ile Asp Glu Ser Phe Glu Arg Phe Thr Pro Val Leu Arg Ala Ala
 115 120 125

Asn Glu Ala Ser Ile Arg Val Arg Gly Tyr Val Ser Cys Val Leu Gly
 130 135 140

Cys Pro Phe Ser Gly Ala Val Ala Pro Glu Ala Val Ala Lys Val Ala
 145 150 155 160

Arg Arg Leu Tyr Glu Leu Gly Cys Tyr Glu Ile Ser Leu Gly Asp Thr
 165 170 175

Ile Gly Ala Gly Arg Pro Asp Glu Thr Ala Gln Leu Phe Glu Leu Cys
 180 185 190

ES 2 543 010 T3

Ala Arg Gln Leu Pro Val Ala Ala Leu Ala Gly His Phe His Asp Thr
 195 200 205

Trp Gly Met Ala Ile Ala Asn Val His Ala Ala Leu Ala Gln Gly Val
 210 215 220

Arg Thr Phe Asp Ser Ser Val Ala Gly Leu Gly Gly Cys Pro Tyr Ser
 225 230 235 240

Pro Gly Ala Ser Gly Asn Val Ala Thr Glu Asp Leu Leu Tyr Leu Leu
 245 250 255

His Gly Leu Gly Tyr Ser Thr Gly Val Asp Leu Glu Ala Val Ala Gln
 260 265 270

Val Gly Val Arg Ile Ser Ala Gln Leu Gly Thr Ala Asn Arg Ser Arg
 275 280 285

Ala Gly Leu Ala Leu Ala Ala Arg Ser Ala Arg Glu His
 290 295 300

<210> 7

<211> 299

5

<212> PRT

<213> Pseudomonas putida

<400> 7

Met Ser Leu Pro Lys His Val Arg Leu Val Glu Val Gly Pro Arg Asp
 1 5 10 15

Gly Leu Gln Asn Glu Ala Gln Pro Ile Ser Val Ala Asp Lys Val Arg
 20 25 30

Leu Val Asn Asp Leu Thr Glu Ala Gly Leu Ala Tyr Ile Glu Val Gly
 35 40 45

Ser Phe Val Ser Pro Lys Trp Val Pro Gln Met Ala Gly Ser Ala Glu
 50 55 60

Val Phe Ala Gly Ile Gln Gln Arg Pro Gly Val Thr Tyr Ala Ala Leu
 65 70 75 80

Ala Pro Asn Leu Arg Gly Phe Glu Asp Ala Leu Ala Ala Gly Val Lys
 85 90 95

Glu Val Ala Val Phe Ala Ala Ala Ser Glu Ala Phe Ser Gln Arg Asn
 100 105 110

10

ES 2 543 010 T3

Ile Asn Cys Ser Ile Ser Glu Ser Leu Lys Arg Phe Glu Pro Ile Met
 115 120 125

Asp Ala Ala Arg Ser His Gly Met Arg Val Arg Gly Tyr Val Ser Cys
 130 135 140

Val Leu Gly Cys Pro Tyr Glu Gly Lys Val Ser Ala Glu Gln Val Ala
 145 150 155 160

Pro Val Ala Arg Ala Leu His Asp Met Gly Cys Tyr Glu Val Ser Leu
 165 170 175

Gly Asp Thr Ile Gly Thr Gly Thr Ala Gly Asp Thr Arg Arg Leu Phe
 180 185 190

Glu Val Val Ser Ala Gln Val Pro Arg Glu Gln Leu Ala Gly His Phe
 195 200 205

His Asp Thr Tyr Gly Gln Ala Leu Ala Asn Val Tyr Ala Ser Leu Leu
 210 215 220

Glu Gly Ile Ser Val Phe Asp Ser Ser Val Ala Gly Leu Gly Gly Cys
 225 230 235 240

Pro Tyr Ala Lys Gly Ala Thr Gly Asn Ile Ala Ser Glu Asp Val Val
 245 250 255

Tyr Leu Leu Gln Gly Leu Gly Ile Glu Thr Gly Ile Asp Leu Gly Leu
 260 265 270

Leu Ile Ala Ala Gly Gln Arg Ile Ser Gly Val Leu Gly Arg Asp Asn
 275 280 285

Gly Ser Arg Val Ala Arg Ala Cys Ser Ala Gln
 290 295

<210> 8

<211> 1528

5 <212> DNA

<213> Pseudomonas sp.

<400> 8

gagtttgatc ctggctcaga ttgaacgctg gcggcaggcc taacacatgc aagtcgagcg 60

gtagagaraa gcttgcttyt cttgagagcg gcggacgggt gagtaatgcc taggaatctg 120

10 cctggtagtg ggggataacg tccggaacg gacgctaata ccgcatacgt cctacgggag 180

ES 2 543 010 T3

aaagcagggg accttcgggc cttgcgctat cagatgagcc taggtcggat tagctagttg 240
 gtgaggtaat ggctcaccaa ggcgacgatc cgtaactggg ctgagaggat gatcagtcac 300
 actggaactg agacacggtc cagactccta cgggagggcag cagtggggaa tattggacaa 360
 tgggcgaaaag cctgatccag ccatgccgcg tgtgtgaaga aggtcttcgg attgtaaagc 420
 actttaagtt gggaggaagg gcagtaagtt aataccttgc tgttttgacg ttaccgacag 480
 aataagcacc ggctaactct gtgccagcag ccgcggtaat acagaggggt caagcgtaa 540
 tcggaattac tgggcgtaaa gcgcgcgtag gtggtttggt aagttggatg tgaaagcccc 600
 gggctcaacc tgggaactgc attcaaaact gacaagctag agtatggtag aggggtgggg 660
 aatttctgt gtacggtga aatgcgtaga tataggaagg aacaccagtg gcgaaggcga 720
 ccacctggac tgatactgac actgaggtgc gaaagcgtgg ggagcaaaca ggattagata 780
 ccctgtagt ccacgccgta aacgatgtca actagccgtt ggggacctg agtctttagt 840
 ggcgcagcta acgcattaag ttgaccgct ggggagtacg gccgcaaggt taaaactcaa 900
 atgaattgac gggggcccg cacaagcggg gagcatgtgg ttaattcga agcaacgcga 960
 agaaccttac caggccttga catccaatga actttccaga gatggattgg tgccttcggg 1020
 agcattgaga caggtgctgc atggctgtgc tcagctcgtg tcgtgagatg ttgggttaag 1080
 tcccgtaacg agcgaaccc ttgtccttag ttaccagcac gttatgggtg gactcctaag 1140
 gagactgccg gtgacaaaacc ggaggaaggt ggggatgacg tcaagtcac atggccctta 1200
 cggcctgggc tacacacgtg ctacaatggt cggtacagag ggttgccaag ccgcgaggtg 1260
 gagctaatac cacaaaaccg atcgtagtcc ggatcgcagt ctgcaactcg actgogtgaa 1320
 gtcggaatcg ctagtaatcg cgaatcagaa tgtcgcgggt aatacgttcc cgggccttgt 1380
 acacaccgcc cgtcacacca tgggagtggg ttgcaccaga agtagctagt ctaaccttcg 1440
 ggaggacggt taccacggtg tgattcatga ctggggtgaa gtcgtaacaa ggtagccgta 1500
 ggggaacctg cggctggatc acctcctt 1528

<210> 9
 <211> 1526
 <212> DNA
 <213> *Variovorax* sp.

<400> 9

gagtttgatc ctggctcaga ttgaacgctg gcggcatgcc ttacacatgc aagtcgaacg 60
 gcagcgcggg agcaatcctg gcggcgagtg gcgaacgggt gagtaataca tcggaacgtg 120
 cccaatcgtg ggggataacg cagcgaagc tgtgctaata ccgcatacga tctacggatg 180
 aaagcagggg accgcaaggc cttgcgcgaa tggagcggcc gatggcagat taggtagttg 240

5

10

ES 2 543 010 T3

gtgaggtaaa ggctcaccaa gccttcgata thtagctggg ctgagaggac gaccagccac 300
actgggactg agacacggcc cagactccta cgggaggcag cagtggggaa ttttgacaaa 360
tgggcgcaag cctgatccag ccatgccgag tgcaggatga aggcttcggt gttgtaaact 420
gcttttgtag ggaacgaaac ggccttttct aataaagagg gctaatagac gtaccgtaag 480
aataagcacc ggctaactac gtgccagcag ccgcggtaat acgtagggtg caagcgtaa 540
tcggaattac tgggcgtaaa gcgtgcgag gcggtgatgt aagacagttg tgaaatcccc 600
gggctcaacc tgggaactgc atctgtgact gcatcgctgg agtacggcag agggggatgg 660
aattccgctg ttagcagtga aatgcgtaga tatgctggag aacaccgatg gcgaaggcaa 720
tcccctgggc ctgtactgac gctcatgcac gaaagcgtgg ggagcaaaca ggattagata 780
ccctggtagt ccacgccta aacgatgtca actgggtgtt gggctctcac tgactcagta 840
acgaagctaa cgcgtgaagt tgaccgctg gggagtacgg ccgcaagggt gaaactcaaa 900
ggaattgacg gggaccgca caagcgggtg atgatgtggt ttaattcgat gcaacgcgaa 960
aaaccttacc caccttgac atgtacgaa tttgccagag atggcttagt gctcgaaaga 1020
gagccgtaac acaggtgctg catggctgtc gtcagctcgt gtcgtgagat gttgggtaa 1080
gtcccgaac gagcgcaacc cttgtcatta gttgtacat tcagttgggc actctaata 1140
gactgccggt gacaaaccgg aggaaggtgg ggatgacgtc aagtcctcat ggcccttata 1200
gggtgggcta cacacgtcat acaatggctg gtacaaaggg ttgccaaacc gcgaggggga 1260
gctaattcca taaaaccagt cgtagtccgg atcgcagtct gcaactcgac tgcgtgaagt 1320
cggaatcgct agtaatcgtg gatcagaatg tcacggtgaa tacgttcccg ggtcttgtag 1380
acaccgcccg tcacaccatg ggagcgggtt ctgccagaag tagttagctt aaccgcaagg 1440
agggcgatta ccacgcaggt gttcgtgact ggggtgaagt cgtaacaagg tagccgtatc 1500
ggaaggtgag gctggatcac ctccctt 1526

<210> 10
<211> 1524
5 <212> DNA
<213> *Delftia* sp.

<400> 10
gagtttgatc ctggctcaga ttgaacgctg gcggcatgcc ttacacatgc aagtcgaacg 60
gtaacaggtc ttcggacgct gacgagtggc gaacgggtga gtaatacatc ggaacgtgcc 120
cagtcgtggg ggataactac tcgaaagagt agctaatacc gcatacgatc tgaggatgaa 180
agcgggggac cttcgggctt cgcgcgattg gagcggcca tggcagatta ggtagttggt 240
10 gggataaaaag cttaccaagc cgacgatctg tagctggtct gagaggacga ccagccacac 300

ES 2 543 010 T3

tgggactgag acacggccca gactcctacg ggaggcagca gtggggaatt ttggacaatg 360
 ggcgaaagcc tgatccagca atgccgcgtg caggatgaag gccttcgggt tgtaaactgc 420
 ttttgtacgg aacgaaaaag cttctcctaa tacgagaggc ccatgacggt accgtaagaa 480
 taagcaccgg ctaactacgt gccagcagcc gcggaatac gtaggggtgc agcgtaaatc 540
 ggaattactg ggcgtaaagc gtgcgcaggc ggttatgtaa gacagatgtg aaatccccgg 600
 gctcaacctg ggaactgcat ttgtgactgc atggctagag tacggtagag ggggatggaa 660
 ttccgcgtgt agcagtgaaa tgcgtagata tgcggaggaa caccgatggc gaaggcaatc 720
 ccctggacct gtactgacgc tcatgcacga aagcgtgggg agcaaacagg attagatacc 780
 ctggtagtcc acgccctaaa cgatgtcaac tggttgttgg gaattagttt tctcagtaac 840
 gaagctaacg cgtgaagtgt accgcctggg gactacggcc gcaagggtga aactcaaagg 900
 aattgacggg gacccgcaca agcgggtgat gatgtggttt aattcgatgc aacgcgaaaa 960
 accttaccba cctttgacat ggcaggaagt ttccagagat ggattcgtgc tcgaaagaga 1020
 acctgcacac aggtgctgca tggctgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt tgggttaagt 1080
 cccgcaacga gcgcaacct tgtcattagt tgctacattt agttgggac tctaatagaga 1140
 ctgccggtga caaacggag gaagtgggg atgacgtcaa gtcctcatgg cccttatagg 1200
 tggggctaca cacgtcatac aatggctggg acagaggggt gccaacccgc gagggggagc 1260
 taatcccata aaaccagtcg tagtccggat cgcagctcgc aactcgactg cgtgaagtcg 1320
 gaatcgctag taatcgcgga tcagcatgpc gcggtgaata cgttcccggg tcttgtacac 1380
 accgcccgtc acaccatggg agcgggtctc gccagaagta ggtagcctaa ccgcaaggag 1440
 ggcgcttacc acggcggggg tctgactggt ggtgaagtcg taacaaggta gccgtatcgg 1500
 aaggtgcggc tggatcacct cctt 1524

<210> 11
 <211> 1524
 <212> DNA
 <213> Comamonas sp.

5

<400> 11

gagtttgatc ctggctcaga ttgaacgctg gcggcatgct ttacacatgc aagtogaacg 60
 gtaacaggtc ttcgatgct gacgagtggc gaacgggtga gtaatacatc ggaacgtgcc 120
 tagtagtggg ggataactac tcgaaagagt agctaatacc gcatgagatc tacggatgaa 180
 agcaggggac cttcgggcct tgtgctacta gagcggctga tggcagatta ggtagttggt 240
 ggggtaaagg cttaccaagc ctgcgatctg tagctggtct gagaggacga ccagccacac 300
 tgggactgag acacggccca gactcctacg ggaggcagca gtggggaatt ttggacaatg 360

10

ES 2 543 010 T3

ggcgaaagcc tgatccagca atgccgctg caggatgaag gccctcgggt tgtaaactgc 420
 ttttgtacgg aacgaaaagc ctggggctaa tatccccggg tcatgacggt accgtaagaa 480
 taagcaccgg ctaactacgt gccagcagcc gcggaatac gtagggtgca agcgттаатс 540
 ggaattactg ggcgtaaagc gtgcgcaggc ggttttgtaa gacagtgggtg aaatccccgg 600
 gctcaacctg ggaactgcca ttgtgactgc aaggctagag tgcggcagag ggggatggaa 660
 ttccgcgtgt agcagtgaaa tgcgtagata tgcggaggaa caccgatggc gaaggcaatc 720
 ccctgggctt gcaactgacgc tcactgacga aagcgtgggg agcaaacagg attagatacc 780
 ctggtagtcc acgccctaaa cgatgtcaac tggttggttg gtcttaactg actcagtaac 840
 gaagctaacg cgtgaagttg accgcctggg gagtacggcc gcaaggttg aactcaaagg 900
 aattgacggg gacccgcaca agcggtggtt gatgtggttt aattcgatgc aacgcgaaaa 960
 accttaacca cctttgacat ggcaaggaact taccagagat ggtttggtgc tcgaaagaga 1020
 acctgcacac aggtgctgca tggctgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt tgggттаагт 1080
 cccgcaacga gcgcaacct tgccattagt tgetacattc agttgagcac tctaattggga 1140
 ctgccggtga caaacggag gaaggtgggg atgacgtcaa gtccctcatgg cccttatagg 1200
 tggggctaca cacgtcatac aatggctggt acaagggtt gccaacccgc gagggggagc 1260
 taatcccata aagccagtcg tagtccggat cgcagtctgc aactcgactg cgtgaagtcg 1320
 gaatcgctag taatcgtgga tcagaatgtc acggtgaata cgttccccgg tcttgtaac 1380
 accgcccgtc acaccatggg agcgggtctc gccagaagta ggtagcctaa ccgcaaggag 1440
 ggcgcttacc acggcggggt tcgtgactgg ggtgaagtcg taacaaggta gccgtatcgg 1500
 aaggtgcggc tggatcaact cctt 1524

<210> 12
 <211> 1287
 <212> DNA
 <213> Pseudomonas sp.

5

<400> 12

atgagtatcg attcgcgct tccgaatttc cgcagcctgt ccctgtcca gcgcctcgag 60
 cacctgcaac aactgctgca attaccggc gatgacgtcg cctgctgcg tgatgctggc 120
 gccctgccgc tggacatcgc cgacggcatg atcgagaacg taatcggaac gttcgaactg 180
 ccttacgcgg tggccagcaa cttccagatc aatggccgcg acgtggctgt gccgctgggtg 240
 gtcgaggaac cctcgggtgt cgcgcgctg tcgttcatgg ccaagctggc gcgcgatgct 300
 ggcgcttca tgacctccag cagcctgccg ctgatgcgcg ccaggtgca gatcgtcgac 360
 atcgcgacc cgtacaacgc ccgctgagc ctgatgcgcc gcaaggaaga gatcatcgaa 420

10

ES 2 543 010 T3

ctggccaacc gcaaggacca gttgctcaac aaactcggcg gcggtgccg ggacatcgaa 480
 gtccacacct tcgccagag cccacggggg ccgatgctgg tggcgacct gatcgtcgac 540
 gtgcgcatg ccatgggccc caacacggtc aacaccatgg ccgaagccgt ggcgcccgtg 600
 atggaagaaa tcacggggcg caaggtgctg ctgcccgatcc tatcgaacct ggcccacctg 660
 cgctggccc gggcccaggt gcgcatgccc ccgagctgc tgaccacttc cgaatacaag 720
 ggcgaagacg tgatcgaggg cattctcgat gcctacaact ttgcccgtgg cgaccctgac 780
 cgcgcccga cccacaacaa gggcatcatg aacggcatcg acccgtgat cgtcgccacc 840
 ggcaacgact ggcgcccgtt ggaagccggg gccacgcct atgcctgtcg cgatgggac 900
 tatggctcgc tgaccacctg ggagaaggac ggcaacggcc acctggctcg caccctggaa 960
 atgccatgc cggtcggcct ggtcgggtgg gccaccaaga cccaccgct ggcgcaactg 1020
 tcgctgcgca tcctcgggtg gaagaccgcc caggaactgg cggaaatcgc cgtggccgtg 1080
 ggctggcgc agaacctcgg cgcactgccc gcgctgtcca ccgaaggcat ccagcgtggg 1140
 cacatggcgc tgcacgcacg caacatcgcc ctgtcggccc gggcccggg cgaggaagtc 1200
 gattggctgg tcaagcgcac ggtcggggc cgcgacgtgc gcgctgaaa cgccgcccga 1260
 ctgctcaagc aaaagcggc gctgtga 1287

<210> 13

<211> 1287

5 <212> DNA

<213> Pseudomonas mevalonii

<400> 13

atgagcctcg attcccgcct gcccgtttc cgtaacctgt cccctgccg gcgctggac 60
 cacatcggcc agttgctcgg cctgagccac gacgatgtca gcctgctggc caacgcccgt 120
 gccctgccga tggacatcgc caacggcatg atcgaaaacg tcatcggcac cttcgagctg 180
 ccctatgccg tggccagcaa cttccagatc aatggcccgtg atgtgctggg gccgctgggtg 240
 gtggaagagc cctcgatcgt cgcgctgct tcgtacatgg ccaagctggc ccgtgccaac 300
 ggcgcttca ccacctccag cagcgcgccg ctgatgcatg ccagggtaca gatcgtcggc 360
 atacaggacc cgctcaatgc acgcctgagc ctgctgcgcc gcaaagacga aatcattgaa 420
 ctggccaacc gcaaggacca gttgctcaac agcctcggcg gcggtgccg cgacatcgaa 480
 gtgcacacct tcgccgatac cccgctggc ccgatgctgg tggcgacct gatcgtcgat 540
 gtacgcgatg ccatgggccc caacaccgtc aataccatgg ccgaggccgt tgcgcccgtg 600
 atggaagcca tcaccggggg ccaggtacgc ctgcccattc tgtccaacct ggcccacctg 660
 10 cgctggcca gggcccaggt gcggtactt ccgagcaac tggaaacggc cgaattcagt 720

ES 2 543 010 T3

ggcggaggcag tgatcgaagg catcctcgac gcctacgcct tcgctgcggt cgacccttac 780
 cgcgcggccca cccacaacaa gggcatcatg aatggcatcg acccactgat cgtcgccact 840
 ggcaacgact ggcgtgcagt ggaagccggc gcccatgcgt atgcctgccg cagtggtcac 900
 tacggctcgc tgaccacctg gaaaaaggac aacaacggcc atttggtcgg caccctggaa 960
 atgccgatgc ccgtaggcct gtcggcggc gccacaaaa cccatccgct ggcgcaactg 1020
 tcgctgcgca tcctcggcgt gaaaacagcc caggcgctcg ctgagattgc cgtggccgta 1080
 ggcttgccgc aaaacctcgg ggccatgcgc gccctggcca ccgaaggcat ccagcgccgc 1140
 cacatggccc tgcattgcgc caatattgcc gtggtggcgg gcgcccagg cgatgagggtg 1200
 gactggggtg cccggcagtt ggtggaatac cacgacgtgc gcgcccacc cgccgtagca 1260
 ctgctgaaac aaaagcgcgg ccaatga 1287

<210> 14
 <211> 40
 5 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador (FW) para ampliar HMGR derivado de Pseudomonas sp.
 10 <400> 14

ggcttagag gaataacacc atgagtatcg attcgcgcct 40

15 <210> 15
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> cebador (RV) para ampliar HMGR derivado de Pseudomonas sp.
 <400> 15

25 ggcgagctct cacagcgcgc gctttgctt gagcag 36

<210> 16
 <211> 40
 <212> DNA
 30 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador (FW) para ampliar HMGR derivado de Archaeoglobus flugidus

35 <400> 16

ggcttagagg aataacacca tgcaggttct tagactcgac 40

<210> 17
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 45 <223> cebador (RV) para ampliar HMGR derivado de Archaeoglobus flugidus
 <400> 17

ccgagctctc agcttcttaa cctctccaga acctcctg 39

ES 2 543 010 T3

<210> 18
<211> 48
<212> DNA
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador (FW) para ampliar la mitad anterior de MVK derivado de *Saccharomyces cerevisiae*

10 <400> 18
ggctctagag gaataacacc atgtcattac cgttctaac ttctgcac 48

<210> 19
<211> 28
<212> DNA
15 <213> Secuencia artificial

<220>
20 <223> cebador (RV) para ampliar la mitad anterior de MVK derivado de *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 19
25 cacccatggc atcaagaatt ggcttcat 28

<210> 20
<211> 28
<212> DNA
30 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador (FW) para ampliar la mitad posterior de MVK derivado de *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 20
35 atgaagccaa ttctgatgc catgggtg 28

<210> 21
<211> 39
40 <212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
45 <223> cebador (RV) para ampliar la mitad posterior de MVK derivado de *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 21
ggcgaactct tatgaagtcc atggtaaatt cgtgtttcc 39

<210> 22
<211> 45
<212> DNA
50 <213> Secuencia artificial

<220>
55 <223> cebador (FW) para ampliar HMGL derivado de *Pseudomonas putida*

<400> 22
60 ggctctagag gaataacacc atgtccttgc ccaaacacgt ccgcc 45

<210> 23
<211> 39
<212> DNA
65 <213> Secuencia artificial

ES 2 543 010 T3

<220>
 <223> cebador (RV) para ampliar HMGL derivado de Pseudomonas putida

<400> 23

5 ggcgagctcc tattgtgcg tgcacgcccg tgctaccgg 39

<210> 24
 <211> 294
 10 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> promotor POP flanqueados con sitios de clonación artificiales

15 <400> 24

aagcttggggc tgcaggtcga aaaagttctt gatttataag ggtttctgga cttcttactg 60
 tactagtaca atttcgcccc ttgtaccatt tttctgatac agaaacaata ttgtactgaa 120
 aaaaggggat ttttggttaa ttatggacct cacaaaggat atttgtggca attcattgga 180
 ataagctggt ttaagtgcta ttatttcaat tgtgatattt tttcgactct agaggaataa 240
 caccatggcc gtcgacgcta gcatgcatgg atcccgggta ccgagctcga attc 294

20 <210> 25
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Variovorax sp.

25 <400> 25

Xaa Ala Xaa Ser Arg Ile Pro Asn Phe Arg Ala Leu Thr Pro Ala Gln
 1 5 10 15

Arg Leu Glu His Leu Ala Arg Ala Ala Ser Leu Ala Ala Asp Glu Thr
 20 25 30

Ala Leu Val Asp
 35

30 <210> 26
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Delfitia sp.

35 <400> 26

Xaa Ala Xaa Ser Arg Leu Pro Asn Phe Arg Ala Asp Thr Pro Ala Gln
 1 5 10 15

Arg Arg Xaa Phe Leu Ala Xaa Xaa Xaa Gly
 20

<210> 27
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Comamonas sp.

40 <400> 27

45

ES 2 543 010 T3

Xaa Val Xaa Ser Arg Leu Pro Asn Phe Arg Ala Leu Thr Pro Ala Gln
1 5 10 15

Arg Trp Glu His Val Ala Xaa Ala Xaa Asn Leu Xaa Ala Arg Xaa Xaa
 20 25 30

Asn Glu Xaa Glu
 35

REIVINDICACIONES

- 1.- Un método para medir una concentración de un analito en una solución de ensayo, en donde el analito es ácido mevalónico y/o 3-hidroximetilglutaril-coenzima A, que comprende las siguientes etapas (p) y (q):
- (p) una etapa que permite que una enzima que cataliza una reacción representada por la ecuación química 1:
- 5 $\text{Ácido mevalónico} + \text{Coenzima A} + 2 \text{ Aceptor de hidrógeno X} \rightarrow 3\text{-Hidroximetilglutaril-coenzima A} + 2 \text{ Aceptor de hidrógeno reducido X}$ (Ecuación química 1)
- y una enzima que cataliza una reacción representada por la ecuación química 2:
- $\text{Ácido mevalónico} + \text{Coenzima A} + 2 \text{ Donador de hidrógeno oxidado Y} \rightarrow 3\text{-Hidroximetilglutaril-coenzima A} + 2 \text{ Donador de hidrógeno Y}$ (Ecuación química 2)
- actúen en la solución de ensayo que contiene ácido mevalónico y/o 3-hidroximetilglutaril-coenzima A en presencia de un aceptor de hidrógeno X, un donador de hidrógeno Y y coenzima A; y
- 10 (q) una etapa de medición de una cantidad de: un aceptor de hidrógeno reducido X que se produce; o un donador de hidrógeno oxidado Y que se produce; o un aceptor de hidrógeno X que disminuye; o un donador de hidrógeno Y que disminuye,
- en donde el donador de hidrógeno Y y el aceptor de hidrógeno reducido X no son el mismo.
- 2.- Un método para medir una concentración de un analito en una solución de ensayo, en donde el analito es coenzima A, que comprende las siguientes etapas (p') y (q'):
- 15 (p') una etapa que permite que una enzima que cataliza una reacción representada por la ecuación química 1:
- $\text{Ácido mevalónico} + \text{Coenzima A} + 2 \text{ Aceptor de hidrógeno X} \rightarrow 3\text{-Hidroximetilglutaril-coenzima A} + 2 \text{ Aceptor de hidrógeno reducido X}$ (Ecuación química 1)
- y una enzima que cataliza una reacción representada por la ecuación química 2:
- $\text{Ácido mevalónico} + \text{Coenzima A} + 2 \text{ Donador de hidrógeno oxidado Y} \rightarrow 3\text{-Hidroximetilglutaril-coenzima A} + 2 \text{ Donador de hidrógeno Y}$ (Ecuación química 2)
- 20 actúen en la solución de ensayo que contiene la coenzima A en presencia de un aceptor de hidrógeno X, un donador de hidrógeno Y y ácido mevalónico; y
- (q') una etapa de medición de la cantidad de: un aceptor de hidrógeno reducido X que se produce; o un donador de hidrógeno oxidado Y que se produce; o un aceptor de hidrógeno X que disminuye; o un donador de hidrógeno Y que disminuye,
- 25 en donde el donador de hidrógeno Y y el aceptor de hidrógeno reducido X no son el mismo.
- 3.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde:
- el aceptor de hidrógeno X se selecciona de un grupo de dinucleótidos de nicotinamida y adenina oxidados; y/o
- el donador de hidrógeno Y se selecciona de un grupo de dinucleótidos de nicotinamida y adenina reducidos.
- 4.- El método según la reivindicación 3, en donde:
- 30 los dinucleótidos de nicotinamida y adenina oxidados se seleccionan del grupo que consiste en un dinucleótido de adenina y nicotinamida oxidado, un fosfato de dinucleótido de adenina y nicotinamida oxidado, un dinucleótido de adenina y tionicotinamida oxidado, un fosfato de dinucleótido de adenina y tionicotinamida oxidado, un dinucleótido de nicotinamida y adenina acetilado oxidado y un fosfato de dinucleótido de nicotinamida y adenina acetilado oxidado, y combinaciones de los mismos; y/o
- 35 los dinucleótidos de nicotinamida y adenina reducidos se seleccionan del grupo que consiste en un dinucleótido de adenina y nicotinamida reducido, un fosfato de dinucleótido de adenina y nicotinamida reducido, un dinucleótido de adenina y tionicotinamida reducido, un fosfato de dinucleótido de adenina y tionicotinamida reducido, un dinucleótido de nicotinamida y adenina acetilado reducido y un fosfato de dinucleótido de nicotinamida y adenina acetilado reducido, y combinaciones de los mismos.
- 40 5.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde:
- la enzima que cataliza la reacción representada por la ecuación química 1 es la hidroximetilglutaril-coenzima A reductasa; y/o
- la enzima que cataliza la reacción representada por la ecuación química 2 es la hidroximetilglutaril-coenzima A reductasa.
- 45 6.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la enzima que cataliza la o las

reacciones representadas por la ecuación química 1 y/o ecuación química 2 es:

(i) una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos representada por cualquiera de las SEQ ID NO: 1 a 3; o

5 (ii) una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos que incluye la eliminación, adición y/o sustitución de uno o varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos representada por cualquiera de las SEQ ID NO: 1 a 3 y que tiene una actividad de catalizar la o las reacciones representadas por la ecuación química 1 y/o la ecuación química 2.

7.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 a 6, en donde la solución de ensayo contiene ácido mevalónico y 3-hidroximetilglutaril-coenzima A, el analito es 3-hidroximetilglutaril-coenzima A, y el método comprende además la siguiente etapa (o) antes de la etapa (p):

10 (o) una etapa de eliminar el ácido mevalónico de la solución de ensayo.

8.- El método según la reivindicación 7, en donde la etapa (o) se lleva a cabo por una reacción de mevalonato quinasa.

9.- El método según la reivindicación 7, en donde:

15 la etapa (o) se lleva a cabo por una reacción de mevalonato quinasa, y después la etapa (p) se lleva a cabo sin realizar un procedimiento de aislamiento; y

la mevalonato quinasa es:

(i) una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 5; o

20 (ii) una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos que incluye la eliminación, adición y/o sustitución de uno o varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 5 y que tiene una actividad de catalizar una reacción representada por la ecuación química 21:

Ácido mevalónico + ATP → Fosfato de ácido mevalónico + ADP (Ecuación química 21)

25 10.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 a 6, en donde la solución de ensayo contiene ácido mevalónico y 3-hidroximetilglutaril-coenzima A, el analito es ácido mevalónico, y el método comprende además la siguiente etapa (o') antes de la etapa (p):

(o') una etapa de separación de la 3-hidroximetilglutaril-coenzima A de la solución de ensayo.

11.- El método según la reivindicación 10, en donde la etapa (o') se lleva a cabo mediante una reacción enzimática.

12.- Un reactivo para medir el ácido mevalónico y/o la 3-hidroximetilglutaril-coenzima A, que comprende:

30 una hidroximetilglutaril-coenzima A reductasa;

una coenzima A;

un dinucleótido de adenina y tionicotinamida oxidado y/o un fosfato de dinucleótido de adenina y tionicotinamida oxidado; y

35 un dinucleótido de adenina y nicotinamida reducido y/o un fosfato de dinucleótido de adenina y tionicotinamida reducido.

13.- Un reactivo para medir la coenzima A, que comprende:

una hidroximetilglutaril-coenzima A reductasa;

un ácido mevalónico;

40 un dinucleótido de adenina y tionicotinamida oxidado y/o un fosfato de dinucleótido de adenina y tionicotinamida oxidado; y

un dinucleótido de adenina y nicotinamida reducido y/o un fosfato de dinucleótido de adenina y tionicotinamida reducido.

14.- Un reactivo para medir la 3-hidroximetilglutaril-coenzima A, que comprende:

una hidroximetilglutaril-coenzima A reductasa;

una mevalonato quinasa;

una coenzima A;

un donador de fosfato;

5 un dinucleótido de adenina y tionicotinamida oxidado y/o un fosfato de dinucleótido de adenina y tionicotinamida oxidado; y

un dinucleótido de adenina y nicotinamida reducido y/o un fosfato dinucleótido de adenina y tionicotinamida reducido.

15.- Un reactivo para medir el ácido mevalónico que comprende:

una hidroximetilglutaril-coenzima A reductasa;

10 una hidroximetilglutaril-coenzima A liasa;

una coenzima A;

un dinucleótido de adenina y tionicotinamida oxidado y/o un fosfato de dinucleótido de adenina y tionicotinamida oxidado; y

15 un dinucleótido de adenina y nicotinamida reducido y/o un fosfato de dinucleótido de adenina y tionicotinamida reducido.

Figura 1

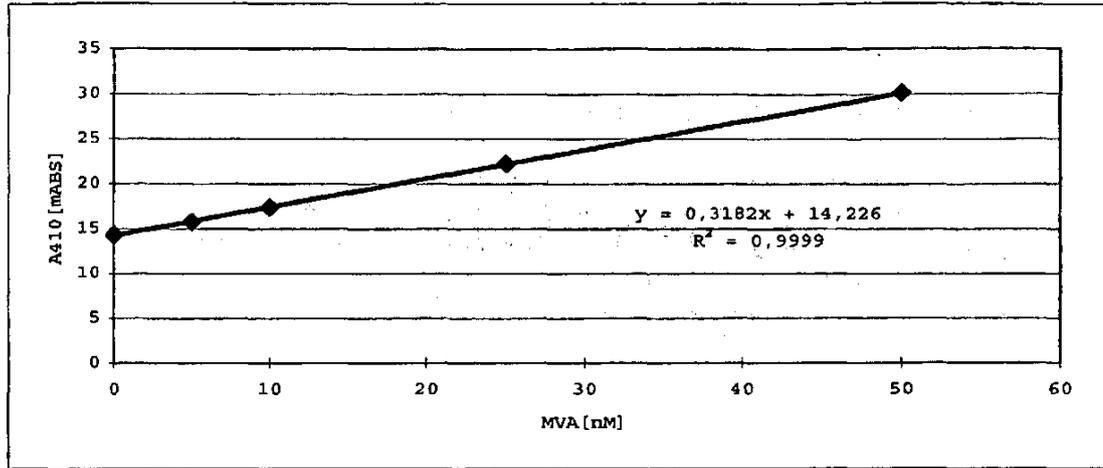


Figura 2

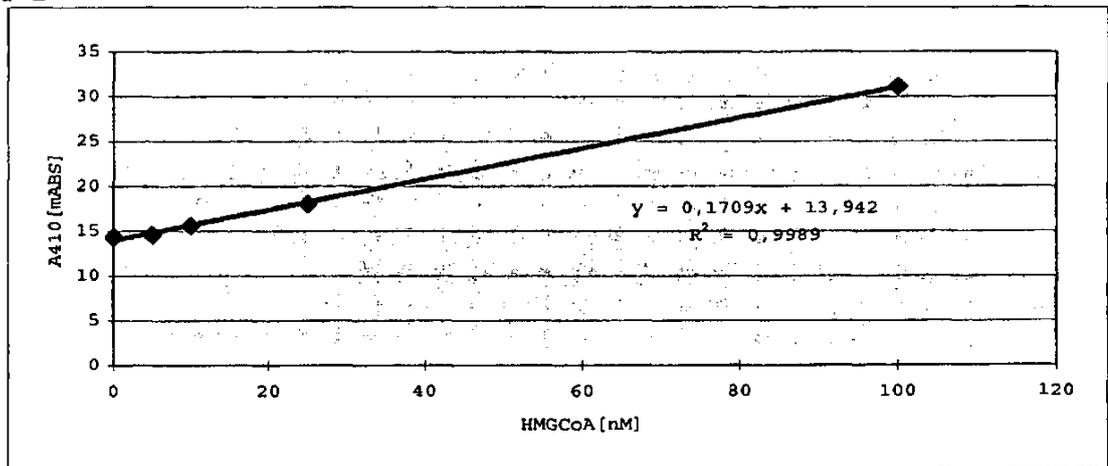


Figura 3

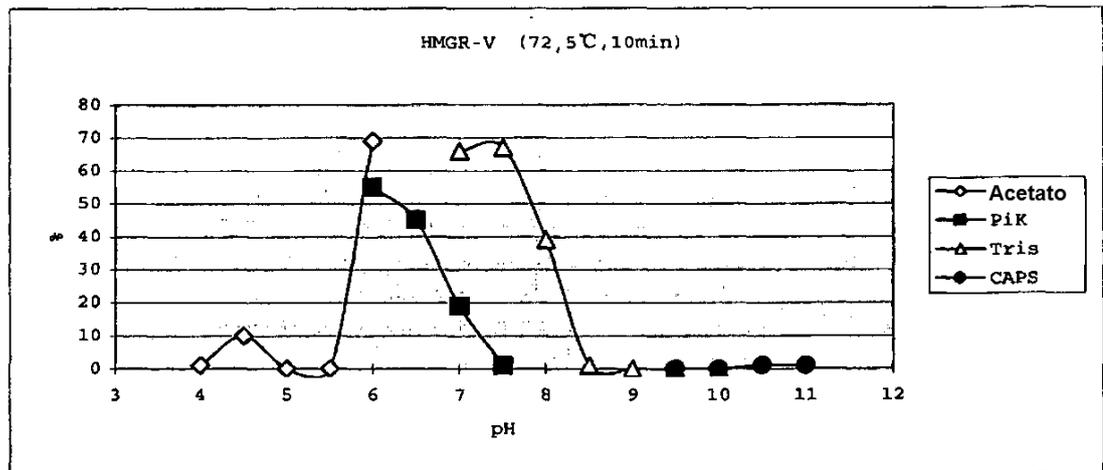


Figura 4

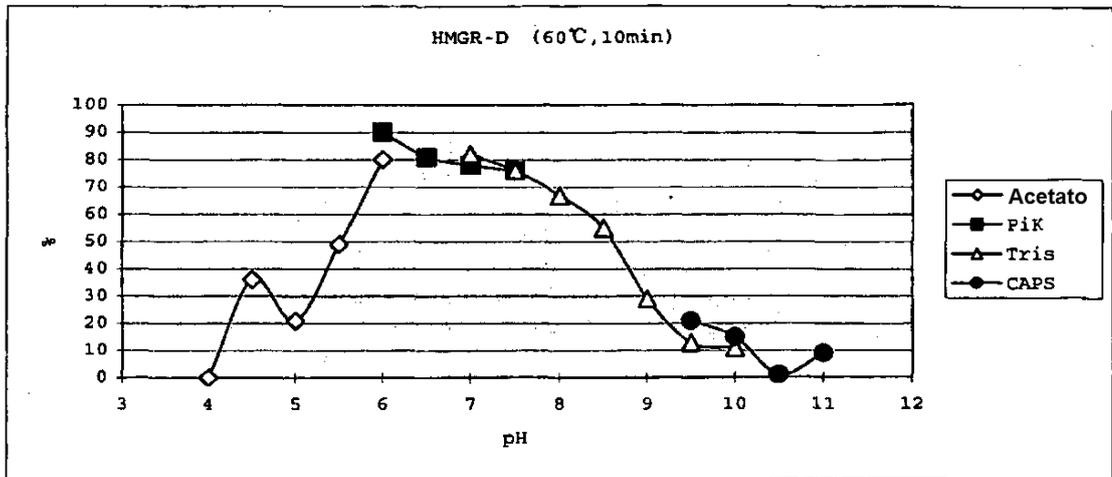


Figura 5

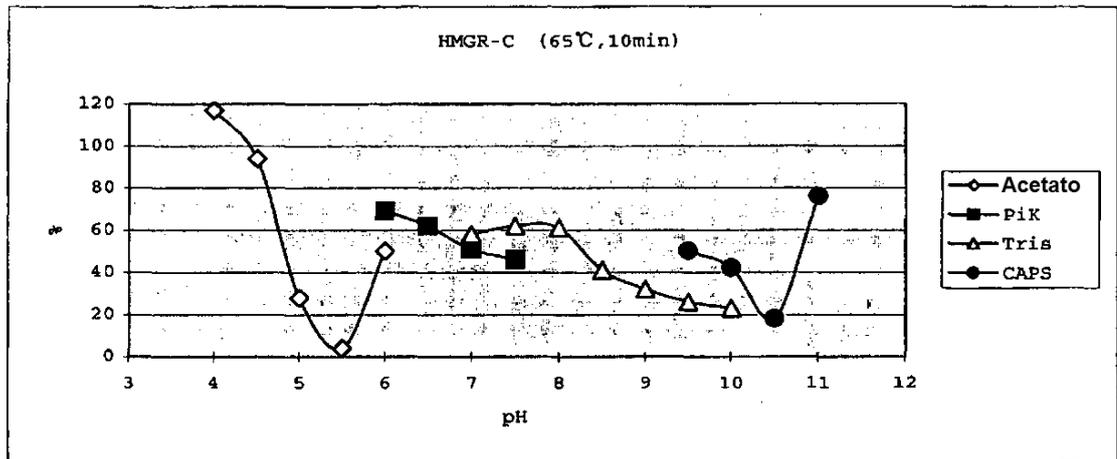


Figura 6

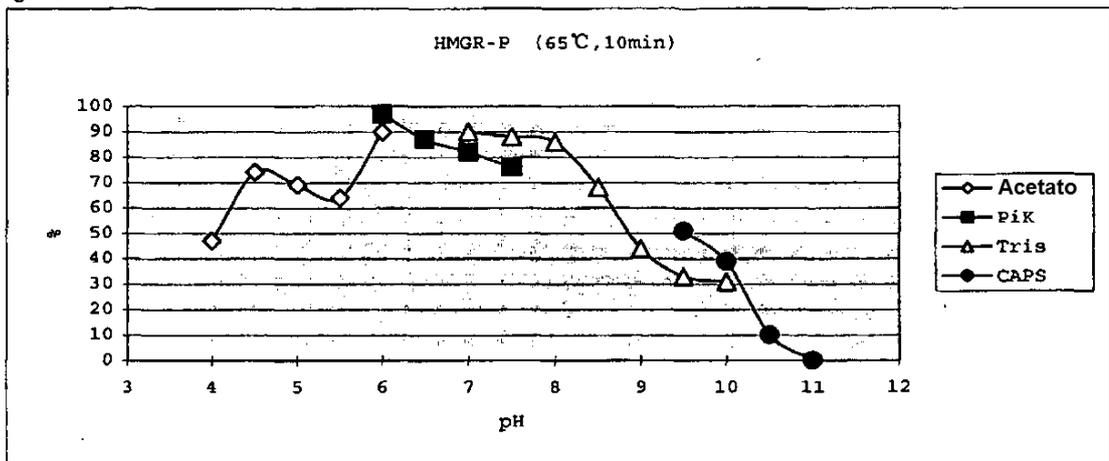


Figura 7

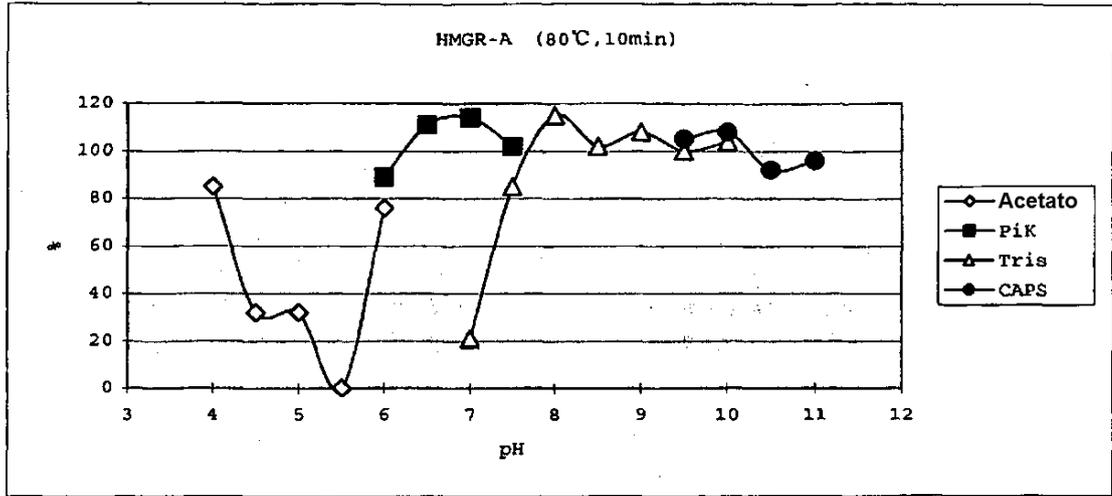


Figura 8

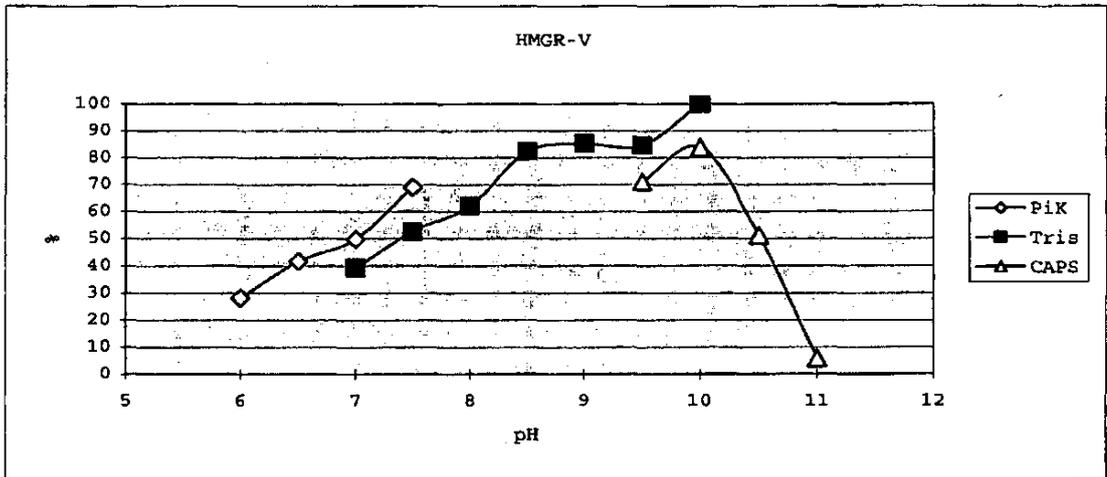


Figura 9

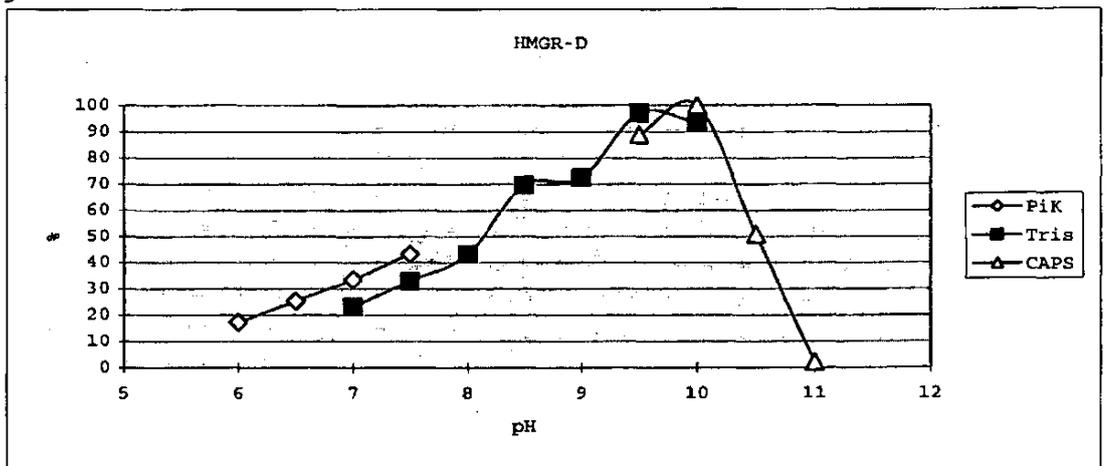


Figura 10

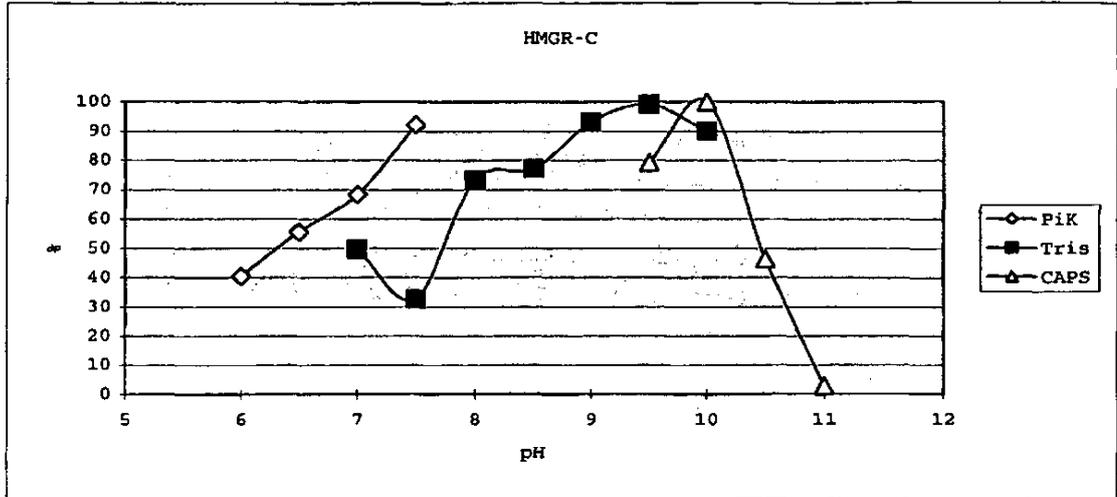


Figura 11

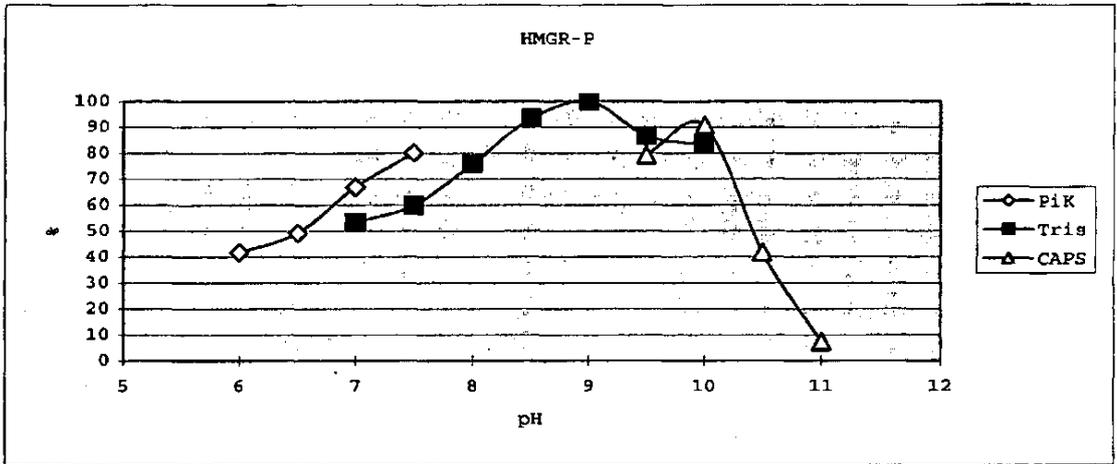


Figura 12

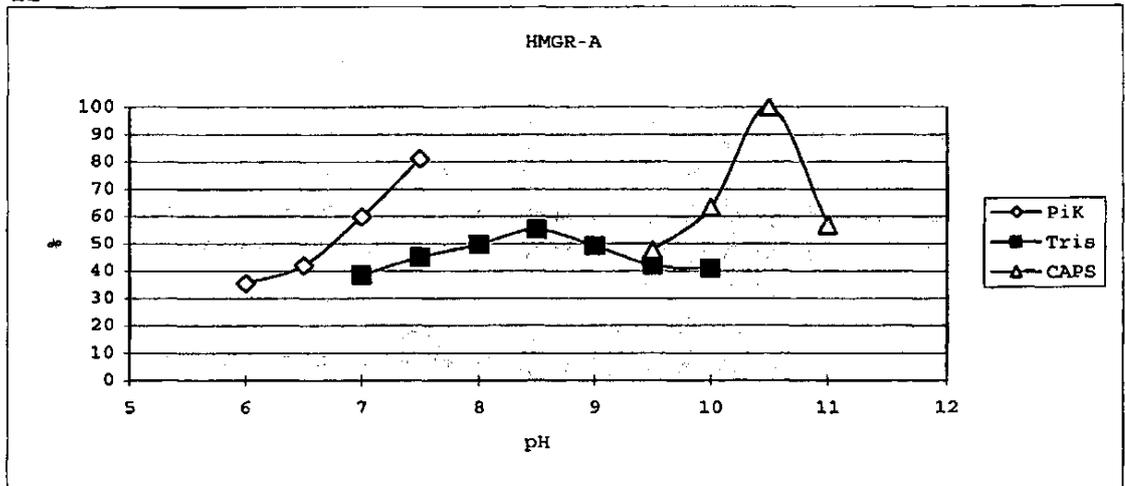


Figura 13

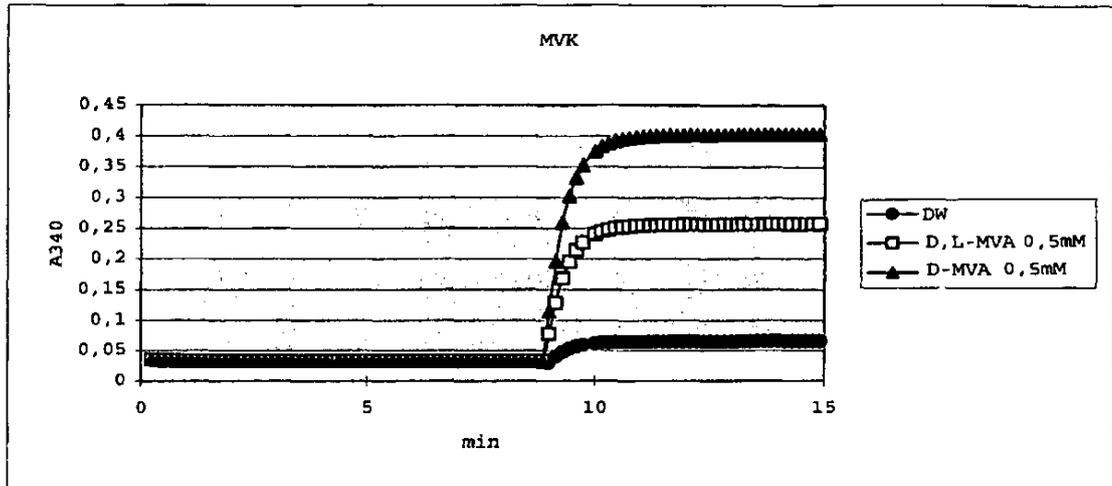


Figura 14

