

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 791 302**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/00** (2006.01)

**C12Q 1/04** (2006.01)

**C12Q 1/06** (2006.01)

**C12N 9/14** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.11.2015 PCT/EP2015/075924**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.05.2016 WO16071497**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.11.2015 E 15794123 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.02.2020 EP 3215630**

54 Título: **Métodos analíticos y de diagnóstico que utilizan apirasa de Shigella flexneri**

30 Prioridad:

**07.11.2014 SE 1451332**

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

**03.11.2020**

73 Titular/es:

**APIRAYS BIOSCIENCE AB (100.0%)  
c/o Catharina Lagerstam, Karlavägen 14A  
114 31 Stockholm , SE**

72 Inventor/es:

**ASALAPURAM, PAVANKUMAR y  
RUSSOM, AMAN**

74 Agente/Representante:

**DEL VALLE VALIENTE, Sonia**

ES 2 791 302 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Métodos analíticos y de diagnóstico que utilizan apirasa de *Shigella flexneri*

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a métodos analíticos y de diagnóstico en los que los nucleótidos contaminantes son un problema. En particular, la presente invención se refiere a la determinación o cuantificación de la cantidad de ATP presente en una muestra que puede contener nucleótidos contaminantes, así como a reactivos para su uso en tales métodos y a la producción de tales reactivos.

**Antecedentes**

La adenosina trifosfato (ATP) es una molécula presente en todas las células vivas. Debido a que la concentración de ATP es bastante constante en la célula, la medición del contenido de ATP en una muestra puede usarse como un representante para determinar el número de células viables. Se conocen ensayos bioluminescentes sensibles para medir el ATP basados en luciferasa/luciferina, véase, por ejemplo, el documento US3745090. La luciferasa (por ejemplo, de luciérnaga) es una proteína euglobulina que cataliza la descarboxilación oxidativa de luciferina usando ATP y oxígeno molecular para producir oxiluciferina, un compuesto excitado de una sola fase muy inestable que emite luz tras la relajación a su estado fundamental. Esta reacción emite luz proporcional a la concentración de ATP en la mezcla de reacción, y midiendo la intensidad de la luz emitida es posible monitorizar de manera continua la concentración de ATP presente.

En muchos casos, las muestras que van a analizarse para determinar el contenido de ATP contienen ATP contaminante o bien de manera extracelular o bien presente en un tipo contaminante de células. Por ejemplo, si debe cuantificarse el número de bacterias en cualquier muestra clínica o biológica, cualquier ATP contenido en las células huésped presentes en la muestra interferirá con la medición. En muchas aplicaciones, las células contaminantes pueden lisarse de manera selectiva y liberar el ATP, dando como resultado que todo el ATP contaminante esté en forma extracelular, véanse, por ejemplo, los documentos US4303752 o US20110076706. En otros casos, pueden estar presentes análogos de ATP diferentes del ATP en una muestra e interferir con la medición de ATP.

El ATP extracelular contaminante, o de otra manera ATP o análogos de ATP no deseados puede reducirse o eliminarse hidrolizándolo con una enzima denominada apirasa (ATP-difosfohidrolasa, ATPasa de tipo E, ATPDasa, NTDasa EC 3.6.1.5). La apirasa se usa de manera frecuente en métodos para determinar el ATP bacteriano en presencia de células de mamífero, en el que las células de mamífero se lisan de manera selectiva y se usa apirasa para degradar el ATP extracelular sin afectar al ATP bacteriano. Tras completarse la reacción, la apirasa puede inactivarse y se libera el ATP intracelular de las células bacterianas para medir el ATP bacteriano mediante la adición de luciferina/luciferasa. Se mide la emisión de luz antes y después de la adición de una cantidad conocida de patrón de ATP, como control interno. El ATP bacteriano (en moles) se calcula multiplicando la razón de la luz antes y después de añadir el patrón de ATP con la cantidad de patrón añadida. Normalmente, las células bacterianas contienen alrededor de 1 atomol de ATP por célula, haciendo posible estimar el número de células bacterianas a partir de la cantidad de ATP detectado. Un objeto de la presente invención es proporcionar mejoras para tales métodos analíticos y de diagnóstico.

En este contexto, la apirasa usada más habitualmente es la apirasa de *Solanum tuberosum* (STA; conocida normalmente como apirasa de patata, SEQ ID NO: 9). La STA existe en varias isoformas y cada isoforma difiere en la actividad de degradación de ATP. Sin embargo, la eficacia de la STA en los métodos anteriores está limitada por la acumulación de ADP y análogos de ATP no caracterizados en la reacción de degradación cuando se usa STA. La acumulación de tales contaminantes inhibe la capacidad de degradación de ATP permitiendo que algo del ATP contaminante permanezca intacto, lo que a su vez limita la sensibilidad de los ensayos de determinación de ATP y también aumenta la señal de fondo. Para una descripción de las limitaciones de la STA, véase el documento WO199402816.

Además, la mayoría de las realizaciones del método de secuenciación de ADN, pirosecuenciación (véanse, por ejemplo, las solicitudes de patentes internacionales PCT/GB1997/002631 y PCT/GB1997/003518, o las solicitudes de patentes estadounidenses US2013/0045876 y US2013/0189717) también se basan en la cuantificación del ATP, habitualmente mediante el ensayo de luciferasa/luciferina. Al final de cada ciclo de secuenciación, todos los nucleótidos no incorporados y el ATP en exceso deben eliminarse, por ejemplo, por apirasa. Tal como se detalló anteriormente, las apirasas usadas en la actualidad en las aplicaciones de secuenciación de ADN tienen problemas para lograr la degradación completa debido a la calidad de la enzima (contaminación de NDP cinasa), especificidad del sustrato y variaciones de lote a lote que no sólo dan como resultado, sino que también afecta a la secuenciación de ADN de cadenas largas. Un objeto de la presente invención es proporcionar una mejor eliminación de ATP, sus análogos así como otros nucleótidos de di o trifosfato, por ejemplo, para mejorar la secuenciación de ADN.

Los documentos WO 94/12211 y GB 2 261878 dan a conocer apirasas de *Shigella flexneri* recombinantes,

secuencias, vector y células huésped relacionados. Babu *et al.* (FEBS LETTERS, vol. 512, n.º 1-3 (2002), páginas 8-12) da a conocer la secuencia de aminoácidos de la apirasa de *Shigella flexneri*.

5 Los documentos EP 0781851, WO 2008/015427, WO 2007/061293 y WO 2011/102808 dan a conocer métodos de determinación de ATP, pirosecuenciación, secuenciación por síntesis y similares, en los que se realiza degradación enzimática de nucleótidos no deseados.

#### Definiciones

10 Los siguientes términos y expresiones tienen el significado tal como se definen a continuación en el contexto de la presente divulgación.

Las expresiones *comprenden* o *que comprenden* deben interpretarse de una manera no limitativa, tal como incluir o contener; tener como componente.

15 *Apirasa de Shigella flexneri* (SFA) se define como una apirasa derivada de *Shigella flexneri*, en cualquier grado adecuado de pureza. La SFA puede producirse mediante medios no recombinantes o mediante tecnología de ADN recombinante. La apirasa recombinante de *Shigella flexneri* se abrevia rSFA en el presente documento. La SFA nativa tiene la secuencia según SEQ ID NO: 10. La SFA según la definición tiene actividad de apirasa sustancialmente similar a la rSFA según SEQ ID NO: 4 o SFA según SEQ ID NO: 10. La actividad de apirasa se refiere a la capacidad para catalizar la hidrólisis de nucleósido trifosfatos para dar nucleósido difosfatos, y la hidrólisis de nucleósido difosfatos para dar nucleósido monofosfatos.

25 *Identidad de secuencia* expresada en porcentaje se define como el valor determinado mediante la comparación de dos secuencias alineadas de manera óptima en una ventana de comparación, en el que una porción de la secuencia en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, huecos) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o deleciones) para una alineación óptima de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que se produce el residuo de aminoácido idéntico en ambas secuencias para producir el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes entre el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado por 100 para proporcionar el porcentaje de identidad de secuencia. A menos que se indique lo contrario, la ventana de comparación es la longitud completa de la secuencia a la que se hace referencia. En este contexto, la alineación óptima es la alineación producida por el algoritmo BLASTP implementado en línea por el US National Center for Biotechnology Information (véase el manual de NCBI [Internet], capítulo 16), con los siguientes parámetros de entrada: longitud de palabra = 3, matriz = BLOSUM62, coste de hueco = 11, coste de extensión de hueco = 1.

35 *Análogos de ATP* se refiere a compuestos con similitud estructural y funcional al ATP que compiten con el ATP para unirse a enzimas que interactúan específicamente con ATP. En el presente contexto, el término sólo se aplica a los compuestos que son sustratos para la SFA tal como se definió anteriormente. Preferiblemente, el término se refiere a compuestos que pueden sustituir el ATP como sustrato para luciferasas, tales como luciferasa de luciérnaga. En realizaciones preferibles, el término incluye nucleósido difosfatos y nucleósido trifosfatos. En realizaciones más preferibles, el término se refiere a adenosina difosfato, desoxiadenosina alfa-tio trifosfato, adenosina tetrafosfato, desoxiadenosina trifosfato, desoxiadenosina difosfato, guanosina trifosfato, guanosina difosfato, desoxiguanosina trifosfato, desoxiguanosina difosfato, timidina trifosfato, desoxitimidina trifosfato, timidina difosfato, desoxitimidina trifosfato, citidina difosfato, desoxicitidina trifosfato, citidina trifosfato, desoxicitidina difosfato, uridina difosfato y uridina trifosfato. En las realizaciones más preferibles, análogos de ATP se refiere a: adenosina difosfato, desoxiadenosina alfa-tio trifosfato, adenosina tetrafosfato, desoxiadenosina trifosfato, desoxiadenosina difosfato, guanosina trifosfato, guanosina difosfato, desoxiguanosina trifosfato y desoxiguanosina difosfato.

#### 50 Sumario de la invención

En resumen, la presente invención se refiere a los siguientes puntos. El contenido dado a conocer en los puntos a continuación debe considerarse dado a conocer de la misma manera que si el contenido se hubiera dado a conocer las reivindicaciones de la patente. El alcance de la protección de la patente se determina por el alcance de las reivindicaciones adjuntas. La descripción también da a conocer:

1. Un método, que comprende las etapas de

60 a. proporcionar una muestra que contiene nucleósido difosfatos y/o nucleósido trifosfatos contaminantes, tales como análogos de ATP y/o ATP incluyendo desoxirribonucleósido trifosfatos;

b. reducir la cantidad de los nucleósidos difosfatos y/o nucleósido trifosfatos contaminantes en la muestra con una enzima apirasa, en el que dicha enzima apirasa es una apirasa de *Shigella flexneri*; y

65 c. realizar un análisis de la muestra, en el que dicho análisis comprende un ensayo que podría verse afectado por

## ES 2 791 302 T3

los nucleósidos difosfatos y/o nucleósido trifosfatos contaminantes que no se habían reducido en la etapa b.

2. El método según el punto 1, siendo un método para determinar la cantidad de ATP en una muestra, que comprende las etapas de:

a. reducir la cantidad de análogos de ATP y/o ATP contaminantes en la muestra por degradación con una enzima apirasa;

b. hacer que el ATP que va a determinarse esté disponible para la determinación; y

c. determinar la cantidad de ATP que va a determinarse en la muestra,

en el que la enzima apirasa es una apirasa de *Shigella flexneri*.

3. El método según el punto 2, en el que el método es para determinar la cantidad de ATP presente en una primera población de células en una muestra, que comprende las etapas de:

a. reducir la cantidad de análogos de ATP y/o ATP contaminantes en la muestra por degradación con una enzima apirasa;

b. liberar el ATP que va a determinarse de la primera población de células; y

c. determinar la cantidad de ATP liberado;

en el que la enzima apirasa en la etapa (a) es una apirasa de *Shigella flexneri*.

4. El método según el punto 3, en el que la etapa de liberación (b) implica lisis de la primera población de células.

5. El método según cualquiera de los puntos 3-4, en el que la primera población de células comprende células bacterianas.

6. El método según cualquiera de los puntos 1-5, en el que la muestra es una muestra biológica de un animal.

7. El método según el punto 6, en el que la muestra es una muestra biológica de un ser humano.

8. El método según cualquiera de los puntos 1-7, en el que la muestra es una muestra de sangre, una muestra de plasma, una muestra de suero, una muestra de orina, una muestra fecal o un frotis de un paciente.

9. El método según cualquiera de los puntos 2-8, en el que al menos una fracción del ATP contaminante está presente en una segunda población de células, y la etapa de reducción (a) está precedida por una etapa de liberación selectiva de ATP de la segunda población de células.

10. El método según el punto 9, en el que la segunda población de células son células huésped de un animal del que se deriva la muestra.

11. El método según cualquiera de los puntos 1-10, en el que el método comprende la etapa de añadir un inhibidor de apirasa después de la etapa de reducción.

12. El método según el punto 11, en el que el inhibidor de apirasa comprende ortovanadato o  $Mg^{2+}$ , preferiblemente ortovanadato.

13. El método según el punto 12, en el que está presente ortovanadato en la muestra a una concentración de al menos 0,1 mM, preferiblemente 0,2-25 mM, más preferiblemente 0,5-20 mM, o  $Mg^{2+}$  está presente en la muestra a una concentración de al menos 25 mM, preferiblemente 30-200 mM, más preferiblemente 30-150 mM.

14. El método según cualquiera de los puntos 1-5 ó 11-13, en el que la muestra es una muestra de medio de cultivo celular, una muestra de alimentos, una muestra de bebida, una muestra farmacéutica, una muestra de aguas residuales, una muestra medioambiental tal como un frotis de una superficie o una muestra de agua potable.

15. El método según cualquiera de los puntos 3-14, que comprende la etapa (d) de calcular el número o concentración de células viables de la primera población presentes en la muestra a partir de la cantidad de ATP determinada en la etapa (c).

16. El método según el punto 1, en el que el método es un procedimiento de secuenciación por síntesis, los nucleótidos contaminantes comprenden dNTP en exceso o análogos de los mismos presentes después de un ciclo de secuenciación completado, y el análisis realizado en la muestra es una lectura de secuencia.

17. El método según el punto 1 ó 16, en el que el método es para realizar la pirosecuenciación y comprende las etapas de:

- 5 a. realizar una reacción de pirosecuenciación que comprende la adición de un nucleósido trifosfato;  
b. convertir el pirofosfato liberado en la etapa (a) en ATP a través de una reacción enzimática;  
c. determinar la cantidad de ATP formado en la etapa (b);  
10 d. degradar el nucleósido trifosfato no incorporado de la etapa (a) y el ATP formado en la etapa (b) con una enzima apirasa;  
e. repetir las etapas a-d al menos una vez;  
15 en el que la enzima apirasa es una apirasa de *Shigella flexneri*.

18. El método según cualquiera de los puntos 2-15, en el que la determinación de la cantidad de ATP se realiza con un ensayo bioluminescente.

20 19. El método según el punto 18, en el que la determinación de la cantidad de ATP se realiza con un ensayo bioluminescente utilizando luciferina y luciferasa.

25 20. El método según el punto 19, en el que se proporciona luciferasa en una composición que comprende luciferasa y un inhibidor de apirasa que comprende ortovanadato, en el que la concentración de ortovanadato es preferiblemente al menos 0,2 mM, más preferiblemente al menos 1 mM, aún más preferiblemente 1-3000 mM, lo más preferiblemente 2-200 mM.

30 21. El método según cualquiera de los puntos precedentes, en el que la apirasa de *Shigella flexneri* comprende una secuencia de aminoácidos con al menos una identidad de secuencia del 80%, más preferiblemente al menos del 85%, incluso más preferiblemente al menos del 90%, aún más preferiblemente al menos del 95%, todavía más preferiblemente al menos del 97%, lo más preferiblemente del 100% con SEQ ID NO: 10.

35 22. El método según cualquiera de los puntos precedentes, en el que la apirasa de *Shigella flexneri* comprende una secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO: 4.

40 23. El método según cualquiera de los puntos precedentes, en el que se proporciona apirasa de *Shigella flexneri* en un tampón que tiene un pH en el intervalo de 6-9, preferiblemente 7-8, y una fuerza iónica de al menos 300 mM, en el que la fuerza iónica es preferiblemente 300-1000 mM, más preferiblemente 400-800 mM, incluso más preferiblemente 500-800 mM.

24. Un uso de una apirasa de *Shigella flexneri* para degradar nucleósido trifosfatos o nucleósido difosfatos contaminantes en un método analítico.

45 25. El uso según el punto 24, en el que los nucleósidos contaminantes comprenden análogos de ATP y/o ATP contaminantes, y el método analítico comprende un ensayo para medir ATP.

26. El uso según el punto 25, en el que el ensayo para medir ATP es un ensayo bioluminescente.

50 27. Un uso de una apirasa de *Shigella flexneri* en un ensayo de secuenciación por síntesis, preferiblemente un ensayo de pirosecuenciación.

55 28. El uso según cualquiera de los puntos 24-27, en el que la apirasa comprende una secuencia de aminoácidos con al menos una identidad de secuencia del 80%, más preferiblemente al menos del 85%, incluso más preferiblemente al menos del 90%, aún más preferiblemente al menos del 95%, todavía más preferiblemente al menos del 97%, lo más preferiblemente del 100% con SEQ ID NO: 10.

60 29. El uso según cualquiera de los puntos 24-28, en el que la apirasa comprende una secuencia de aminoácidos con al menos una identidad de secuencia del 95%, preferiblemente al menos del 96%, más preferiblemente al menos del 97%, aún más preferiblemente al menos del 98%, todavía más preferiblemente al menos del 99%, lo más preferiblemente identidad de secuencia completa con SEQ ID NO: 4 y que tiene actividad apirasa.

### Breve descripción de los dibujos

65 Figura 1. Evaluación colorimétrica de apirasa recombinante de *Shigella flexneri* (rSFA). La rSFA sobreexpresada se sometió a prueba de manera colorimétrica usando molibdato de amonio y sulfato de amonio ferroso para comprobar

la localización, calidad y eficacia. Se sometieron a prueba fracciones subcelulares de BL21-A1 de *E. coli* que contenían enzima apirasa y se midieron las densidades ópticas (D.O.) de estas fracciones en un colorímetro para realizar una correlación cualitativa y/o cuantitativa. En el presente documento, los inventores han realizado una comparación cualitativa para localizar la expresión de enzima apirasa entre determinadas fracciones subcelulares del clon desarrollado y muestran su alta actividad a través de análisis colorimétrico.

Figura 2. Localización subcelular de expresión de enzima rSFA. Se resolvieron fracciones subcelulares del vector de expresión BL21-A1 de *E. coli* que porta el gen de apirasa de *Shigella flexneri* (SFA) con 6 histidinas en el plásmido pBL en SDS-PAGE al 10% para comprobar la expresión de la enzima. La expresión de rSFA se encontró a 25 kDa en fracciones de muestras solubles inducidas, que se usó para purificar la enzima apirasa. Las muestras no inducidas e inducidas de fracciones purificadas y los lisados celulares completos, respectivamente. Este experimento mostró que la enzima se localiza en las fracciones solubles del huésped de expresión.

Figura 3. Análisis de secuencia de rSFA El clon transformado de rSFA que porta gen de apirasa con 6x histidinas se secuenció mediante el método de Sanger. El fragmento contenía 780 bases homólogas (figura 3A) de 1134 nucleótidos de SFA virulenta. La figura 3B ilustra la similitud entre la secuencia de referencia de SFA nativa (SEQ ID NO: 10, denominada "SFA") y rSFA (SEQ ID NO: 4, denominada "rSFA"). Las secuencias difieren sólo en los extremos N-terminal y C-terminal.

Figura 4. Comparación entre las actividades apirasa recombinante de *Shigella flexneri* (rSFA) y las actividades de apirasa de patata (STA) Las enzimas, rSFA y STA diluidas en 10x en tampón Tris-EDTA se sometieron a prueba para comparar sus eficacias de degradación de ATP. Tal como puede observarse en la figura, la rSFA era muy eficaz en la eliminación del ATP, mientras que la STA comercial se encontró que era más lenta. Incluso después de 60 min de reacción, la STA no pudo eliminar el ATP completamente, mientras que la rSFA eliminó el ATP en ~15 min con una tasa constante de  $3,87 \text{ min}^{-1}$ . Se midió la luz en el luminómetro 1251 completamente automático (LKB-Wallac, Turku, Finlandia).

Figura 5. Efecto de la rSFA y la STA sobre el ATP y la emisión de luz El efecto de la adición de apirasa recombinante de *Shigella flexneri* (rSFA; rombos), apirasa de patata (STA; cuadrados) y ATP sobre la emisión de luz de la reacción de luciferasa de luciérnaga. La mezcla de reacción consistía en 0,2 ml de reactivo ATP SL y 0,8 ml tampón Tris-EDTA (BioThema AB, Suecia). Las 1<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup> y 4<sup>a</sup> indican la adición de ATP y la 2<sup>a</sup> flecha la adición de apirasa. La luz se midió cada 15 s excepto en las adiciones. Se añadieron diez  $\mu\text{l}$  de ATP  $10 \mu\text{mol/l}$  junto con 10 ml de apirasa. La luz se midió en el luminómetro 1251 completamente automático (LKB-Wallac, Turku, Finlandia).

Figura 6. Eliminación de ATP extracelular en suero Comparación de la eliminación de ATP con rSFA y STA. En análisis de luminiscencia con suero en bruto al 100% (figura 6A), y muestras de suero diluidas al 10% (figura 6B), la rSFA muestra muy buena actividad de eliminación de ATP en comparación con la de la STA.

Figura 7. Comparación de la actividad de rSFA con fuentes comerciales de STA diferentes Comparación de tres productos comerciales diferentes de apirasa de patata denominados STA, A6535 y A6237, con respecto a rSFA en tampón. La rSFA presenta resultados superiores.

Figura 8. Comparación de la actividad de rSFA con fuentes comerciales de STA diferentes en suero al 10% Comparación de productos comerciales de apirasa de patata como STA, A6535 y A6237 con respecto a rSFA en suero al 10%. La rSFA presenta resultados superiores.

Figura 9. Comparación de la actividad de rSFA con respecto a STA comercial, en orina Comparación de STA comercial con respecto a rSFA en orina, la rSFA presenta resultados superiores. Aunque ambas enzimas mostraron actividades iniciales similares, la tasa de acción de STA se dificultó después de 3 min, mientras que la rSFA continuó con la eliminación de ATP. Incluso después de 4 inyecciones posteriores de  $10 \mu\text{l}$  ATP  $10 \mu\text{mol/l}$ , la rSFA mostró una actividad de eliminación de ATP completa cada vez en menos de 3 min pero la STA no pudo digerir el ATP incluso después de 20 min.

Figura 10. Efecto de análogos de ATP contra STA y rSFA en orina La eliminación de ADP a  $10 \mu\text{l}$   $10 \mu\text{mol/L}$  y una mezcla de ATP y ADP a  $10 \mu\text{l}$   $10 \mu\text{mol/l}$  se sometieron a prueba en muestras de orina. La actividad de STA se disminuyó después de o bien la adición de ADP o bien en la mezcla de ATP y ADP, mientras que la actividad de rSFA no se vio afectada.

Figura 11. Optimización del sistema tampón para mejorar la actividad de rSFA Se almacenó una concentración de rSFA igual en el tampón 1, el tampón 2 y el tampón 3 durante aproximadamente 10 meses y se realizaron ensayos de eliminación de ATP. La actividad de la enzima se comprobó de manera intermitente y se encontró que la enzima usada con el tampón 3 mostró muy buena actividad en comparación con los otros dos tampones.

Figura 12. Desarrollo de inhibidores para rSFA Entre los diferentes inhibidores sometidos a prueba, 100 mM de  $\text{MgSO}_4$  y 1 mM de ortovanadato en forma de  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  mostraron acción inhibitoria contra rSFA. El ortovanadato a

1 mM no afectó a la luciferasa en absoluto y al mismo tiempo, inhibió completamente la actividad de la rSFA. El magnesio también pudo inhibir completamente la rSFA a 50 mM, pero también disminuyó la actividad de luciferasa.

Figura 13A-E. Actividad de rSFA sobre ATP, dATP, dTTP, dGTP y dCTP Para comparar la actividad de rSFA en los nucleótidos con respecto a la STA, muestras de ATP, dATP, dTTP, dGTP y dCTP se incubaron con la enzima durante 5 min o 35 min y los productos se detectaron usando cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). En todos los casos, la rSFA dio como resultado una eliminación superior de los trifosfatos de nucleótido y en particular, eliminó de manera eficaz los difosfatos de nucleótido, que la STA eliminó de manera bastante ineficaz.

## Descripción detallada

Los inventores han encontrado de manera sorprendente que la apirasa de *Shigella flexneri* (SFA; denominada como tal a partir del documento WO1994/012211) es más eficaz en la eliminación de nucleósido trifosfatos y nucleósido difosfatos contaminantes o de otra manera no deseados, en particular ATP y/o otros análogos de ATP, que la apirasa de *Solanum tuberosum* usada habitualmente (STA; apirasa de patata).

La tabla 1 muestra una comparación entre apirasa recombinante de *Shigella flexneri* (rSFA) y apirasa de *Solanum tuberosum* (STA; apirasa de patata). La cantidad de STA usada fue ligeramente mayor en cuanto a unidades, y después de un minuto, la cantidad de ATP restante fue menor en las muestras de STA en comparación con la rSFA en casi un factor de 2. Sin embargo, en el punto de tiempo de 17 minutos, la concentración de ATP en las muestras tratadas con rSFA era aproximadamente 20 veces menor en comparación con las muestras tratadas con STA. A los 91 minutos la diferencia era aún más pronunciada, teniendo las muestras tratadas con rSFA una concentración aproximadamente 45 veces menor que las muestras tratadas con STA. Es de destacar que incluso después de 91 minutos de incubación, la cantidad de ATP residual era mayor en las muestras de STA en comparación con las muestras de rSFA a los 17 minutos.

Sin querer limitarse por la teoría puede suponerse que la mayor capacidad para degradar ATP y sus análogos resulta de uno o más de: mayor afinidad por el sustrato, mayor estabilidad de la enzima en las condiciones del ensayo, menor inhibición de los productos finales de reacción. En todas las reacciones a base de ATP, la presencia o acumulación de contaminantes o subproductos como ADP, AMP, ATP, dNTP, dNDP, XMP, etc. puede interferir con el ensayo.

Las preparaciones comerciales de apirasa a menudo contienen una mezcla de isoenzimas con diferentes afinidades relativas por ATP, ADP, xMP como tetra o penta-fosfatos, etc. Además, la actividad de la enzima apirasa de diferentes proveedores comerciales varía con respecto a la actividad inicial y diferentes lotes del mismo producto puede mostrar actividades de hidrolización de ATP sustancialmente variables. Estas variaciones pueden ser obstáculos significativos para el desarrollo de un método analítico robusto y sensible para analizar diversas muestras biológicas.

A este respecto, puede concluirse que la SFA es mucho más eficaz en la eliminación de trazas de dicho ATP contaminante anterior y sus análogos (u otros nucleótidos) en una muestra que generalmente dificulta la actividad y la sensibilidad de la STA. Esto se traduce en términos prácticos en que los ensayos para determinar la cantidad de ATP en una muestra, en la que hay o puede estar presente ATP contaminante, pueden lograr una mayor sensibilidad debido a una mejor eliminación de la mayoría de los análogos de ATP, cuando se usa SFA como apirasa (véanse los ejemplos 6, 7, 8 y 9). De manera adicional, en determinadas circunstancias, el uso de SFA proporciona un ensayo más rápido al eliminar suficientemente el ATP contaminante en un tiempo más corto. La mejor eliminación de dNTP (ejemplo 11) también proporciona métodos mejorados de secuenciación por síntesis usando SFA.

Los inventores también han demostrado que la SFA no solo es estable en las condiciones de reacción, sino que también tolera los ciclos de congelación-descongelación y el almacenamiento en disolución a temperaturas de refrigeración, incluso en forma bruta, sin la adición de estabilizadores. El hecho de que la enzima permanezca activa incluso en altas concentraciones de EDTA indica que no requiere ningún ion metálico divalente para su actividad, a diferencia de la STA. La SFA presenta muy buena actividad entre pH 7,0-7,5, mientras permanece activa entre pH 5,0 y 9,5. Por tanto, la invención proporciona la oportunidad de aplicar SFA en diferentes muestras biológicas y experimentos analíticos con un amplio intervalo de valores de pH. La estabilidad presenta una ventaja práctica sustancial, en particular para laboratorios de campo con equipos limitados en los que las mediciones de ATP se realizan a veces.

Por tanto, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método para reducir la cantidad de nucleósido difosfatos y/o nucleósido trifosfatos contaminantes, que comprende las etapas de

a. proporcionar una muestra que contiene nucleósido difosfatos y/o nucleósido trifosfatos contaminantes, tales como análogos de ATP y/o ATP;

b. reducir la cantidad de los nucleósidos difosfatos y/o nucleósido trifosfatos contaminantes en la muestra con una

enzima apirasa, en el que dicha enzima apirasa es una apirasa de *Shigella flexneri*; y

5 c. opcionalmente, realizar un análisis de la muestra, en el que dicho análisis comprende un ensayo que podría verse afectado por los nucleósidos difosfatos y/o nucleósido trifosfatos contaminantes que no se hubieran reducido en la etapa b.

10 El ensayo puede implicar la determinación de la cantidad o concentración de ATP en la muestra. Por “podría verse afectado” se entiende que el ensayo es de tal carácter que los nucleósidos difosfatos y trifosfatos contaminantes pueden tener posiblemente un efecto de interferencia. La relación no pretende implicar que la reducción en la etapa (b) dé como resultado necesariamente en la eliminación completa de cualquier y todas las interferencias. Más bien, se abarca incluso menos que la reducción completa, incluyendo reducción parcial, reducción sustancial, reducción casi completa de la interferencia.

15 Los nucleósidos trifosfatos contaminantes pueden comprender desoxirribonucleósido trifosfatos (dATP, dTTP, dGTP, dCTP o análogos de los mismos), y el análisis puede ser un ensayo de secuenciación por síntesis, tal como una reacción de pirosecuenciación.

20 Por “reducir” se entiende que la cantidad se reduce significativamente para los fines prácticos de manera que los nucleósidos trifosfatos o nucleósido difosfatos contaminantes no ponen en peligro la precisión de la determinación en las etapas posteriores. Preferiblemente, la reducción da como resultado una eliminación sustancial del nucleótido contaminante hasta un nivel de menos del 0,01% de la cantidad original, más preferiblemente a menos del 0,001% de la cantidad original, lo más preferiblemente a menos del 0,0001% de la cantidad original.

#### 25 Métodos para determinar ATP en una muestra

El método del primer aspecto puede ser un método para determinar la cantidad de ATP en una muestra, que comprende las etapas de:

30 (a) proporcionar una muestra que contiene análogos de ATP y/o ATP contaminantes incluyendo desoxirribonucleósido trifosfatos;

b. reducir la cantidad de análogos de ATP y/o ATP contaminantes y sus análogos en la muestra por degradación con una enzima apirasa;

35 c. hacer que el ATP que va a determinarse esté disponible para la determinación; y

d. determinar la cantidad de ATP que va a medirse en la muestra,

40 en el que la enzima apirasa es una apirasa de *Shigella flexneri*.

45 Por “reducir” en el contexto de la determinación de ATP se entiende que la cantidad se reduce significativamente para los fines prácticos de manera que el ATP contaminante o el análogo de ATP no pone en peligro la precisión de la determinación en las etapas posteriores. Preferiblemente, la reducción da como resultado una eliminación del ATP contaminante o el análogo de ATP hasta un nivel de menos del 0,01% de la cantidad original, más preferiblemente a menos del 0,001% de la cantidad original, lo más preferiblemente a menos del 0,0001% de la cantidad original.

50 La etapa (b) de hacer el ATP que va a determinarse disponible para la determinación puede implicar lisis de células en las que el ATP que va a determinarse puede contener, por ejemplo, mediante calor, agentes desnaturalizantes, detergentes o una combinación de los mismos. La forma de la lisis no importa, siempre que la manera usada sea compatible con la técnica usada en la determinación en la etapa (c). Alternativamente, el ATP puede hacerse disponible sintetizándolo en la muestra, por ejemplo, por medio de conversión enzimática de una especie química diferente al ATP.

#### 55 Métodos para determinar la cantidad de ATP presente en las células

El método del primer aspecto puede ser un método para determinar la cantidad de ATP presente en una primera población de células en una muestra, que comprende las etapas de:

60 (a) proporcionar una muestra que contiene análogos de ATP y/o ATP contaminantes incluyendo desoxirribonucleósidos trifosfatos;

(b) reducir la cantidad de análogos de ATP y/o ATP contaminantes en la muestra mediante degradación con una enzima apirasa;

65 (c) liberar el ATP que va a determinarse de la primera población de células; y

(d) determinar la cantidad de ATP liberado;

en el que la enzima apirasa en la etapa (a) es una apirasa de *Shigella flexneri*.

5 Por "liberar" quiere decirse que el ATP se hace accesible para la determinación en la etapa (c).

La etapa de liberación (b) puede implicar lisis de la primera población de células, por ejemplo, mediante calor, agentes desnaturalizantes, detergentes o una combinación de los mismos. La manera de lisis no importa, siempre que la manera usada sea compatible con la técnica usada en la determinación en la etapa (c).

10 La primera población de células puede comprender células bacterianas. Por ejemplo, puede ser de interés para determinar el número de bacterias presentes en una muestra clínica. Por tanto, la muestra puede ser una muestra biológica de un animal, tal como un ser humano, un canino, un felino, un bovino, un ave o similar. Preferiblemente, la muestra es de un ser humano.

15 La muestra biológica puede ser, por ejemplo, una muestra de sangre, una muestra de plasma, una muestra de suero, una muestra de orina o una muestra fecal. La muestra puede estar en forma de un frotis de un sujeto, por ejemplo, de piel o una membrana mucosa.

20 El método del primer aspecto puede comprender la etapa de añadir un inhibidor de apirasa después de la etapa de reducción. El inhibidor de apirasa añadido puede comprender ortovanadato. En el contexto de la presente invención, el ortovanadato es ventajoso dado que puede inhibir la apirasa de *Shigella flexneri* a una concentración que no inhibe la luciferasa. El ortovanadato como inhibidor de apirasa puede estar presente a una concentración de al menos 0,1 mM, preferiblemente 0,2-25 mM, más preferiblemente 0,5-20 mM, lo más preferiblemente aproximadamente 1 mM en la muestra. Alternativamente, puede usarse magnesio como inhibidor de apirasa. El  $Mg^{2+}$  puede estar presente a una concentración de al menos 25 mM, preferiblemente 30-200 mM, más preferiblemente 30-150 mM en la muestra.

30 En los presentes métodos, puede ser deseable inhibir la actividad apirasa después de que se hayan eliminado los nucleótidos contaminantes, de modo que el posterior análisis de la muestra no se vea afectado perjudicialmente por la apirasa. Por ejemplo, la apirasa puede inhibirse antes de la liberación de ATP de la primera población de células comentada anteriormente, de modo que la apirasa no interfiere con la determinación del ATP liberado eliminando parte del mismo.

35 Al menos una fracción del ATP contaminante (o análogos de ATP) puede estar presente en una segunda población de células, y la etapa de reducción (a) puede precederse por una etapa de liberación selectiva de ATP de la segunda población de células. En los casos en los que la segunda población de células comprende células animales y la primera población comprende células bacterianas, las células animales pueden lisarse normalmente de manera selectiva en condiciones mucho más suaves que la mayoría de tipos de células bacterianas relevantes. Por ejemplo, un detergente suave tal como Triton X-100 puede usarse para lisar selectivamente células animales en presencia de células bacterianas. Véase, por ejemplo, el documento US4303752.

La segunda población de células puede ser células huésped del animal del cual se deriva la muestra biológica.

45 El método según el primer aspecto también puede aplicarse a muestras no biológicas, tales como medio de cultivo celular, alimento, bebidas, productos farmacéuticos, aguas residuales, muestras ambientales tales como frotis de superficies ambientales, agua potable y similares.

50 El método para determinar la cantidad de ATP presente en una primera población de células en una muestra puede comprender adicionalmente la etapa (d) de calcular el número o la concentración de células viables de la primera población presente en la muestra a partir de la cantidad de ATP determinado en la etapa (c). Puesto que la concentración de ATP en una célula es bastante constante, el número de células puede estimarse a partir de la cantidad de ATP determinado, por ejemplo, comparando la lectura con una curva de calibración obtenida de un tipo similar de célula.

55 Métodos para realizar secuenciación por síntesis, tales como pirosecuenciación

60 En términos generales, cualquier procedimiento de secuenciación por síntesis implica la adición secuencial de un desoxinucleótido conocido (o un análogo del mismo) a una mezcla de reacción en la que la síntesis de ADN se producirá dependiente de la secuencia del ADN que va a secuenciarse. La adición se sigue por la determinación de si la síntesis de ADN se produjo realmente (permitiendo la determinación de la secuencia), seguida por la eliminación de nucleótido añadido en exceso antes de que se inicie el siguiente ciclo. Es de importancia que la eliminación sea completa y no se acumulen productos intermedios tales como difosfatos de desoxinucleótidos, ya que esto interferiría con los posteriores ciclos de secuenciación. La eliminación de nucleótidos puede realizarse, según la presente divulgación ventajosamente con SFA, dado que presenta mejores propiedades en la eliminación de nucleótidos (di y trifosfatos de desoxinucleótidos) que la STA comúnmente usada (véase el ejemplo 11). Por

tanto, el método del primer aspecto puede ser un procedimiento de secuenciación por síntesis, los nucleótidos contaminantes consisten en o comprenden dNTP en exceso o análogos de los mismos presentes después de un ciclo de secuenciación completado, y el análisis realizado en la muestra es una lectura de secuencia.

5 La pirosecuenciación es un método de secuenciación de ADN bien establecido de la secuenciación por tipo de síntesis, basado en la detección de pirofosfato (PPi) liberado durante la síntesis de ADN. Brevemente, las etapas de un protocolo típico de pirosecuenciación pueden resumirse de la siguiente manera:

10 1. Un cebador de secuenciación se hibrida con un molde de ADN monocatenario que va a secuenciarse, y se incuba con las siguientes enzimas: una ADN polimerasa, una ATP sulfurilasa, una luciferasa y una apirasa, y los siguientes sustratos: adenosina-5'-fosfosulfato (APS) y luciferina.

15 2. El primero de los cuatro trifosfatos de desoxinucleótidos (dNTP) se agrega a la reacción. Cabe señalar que la desoxiadenosina alfa-tio trifosfato (dATP $\alpha$ S) se usa como un sustituto del desoxiadenosina trifosfato natural (dATP), ya que la ADN polimerasa lo usa de manera eficiente, pero la luciferasa no lo reconoce. La ADN polimerasa cataliza entonces la incorporación del trifosfato de desoxinucleótido en la cadena de ADN, si es complementaria a la base en la cadena molde. Cada acontecimiento de incorporación se acompaña de la liberación de pirofosfato (PPi) en una cantidad equimolar a la cantidad de nucleótido incorporado.

20 3. La ATP sulfurilasa convierte cuantitativamente el PPi en ATP en presencia de adenosina-5'-fosfosulfato. El ATP producido impulsa la conversión mediada por luciferasa de luciferina a oxiluciferina que genera luz visible en cantidades que son proporcionales a la cantidad de ATP. La luz producida en la reacción catalizada por luciferasa se detecta por un detector (tal como una cámara CCD). Cada señal luminosa es proporcional al número de nucleótidos incorporados.

25 4. La apirasa degrada continuamente cualquier dNTP no incorporado y ATP en exceso. Cuando se completa la degradación, puede añadirse otro dNTP para continuar con el siguiente ciclo de secuenciación. La adición de dNTP se realiza de uno en uno. A medida que el procedimiento continúa, la cadena de ADN complementaria se construye y la secuencia de nucleótidos puede determinarse a partir de un gráfico que muestra la salida de luz a lo largo del tiempo en relación con los puntos de tiempo de adición de los dNTP.

35 Dado que las enzimas disponibles comercialmente muestran variaciones de lote a lote en su calidad y actividad, la aplicabilidad de la reacción de pirosecuenciación se limita para secuenciar oligonucleótidos más largos. Sin embargo, la presente invención proporciona que la apirasa de *Shigella flexneri* puede usarse como la apirasa en una reacción de pirosecuenciación con mejores resultados, ya que es más eficiente en la eliminación de los desoxinucleósidos di y trifosfatos (véase el ejemplo 11).

40 Por tanto, la presente invención proporciona un método del primer aspecto, que es un método para realizar la pirosecuenciación y que comprende las etapas de:

- a. realizar una reacción de pirosecuenciación que comprende la adición de un nucleósido trifosfato;
- b. convertir el pirofosfato liberado en la etapa (a) en ATP mediante una reacción enzimática;
- 45 c. determinar la cantidad de ATP formado en la etapa (b);
- d. degradar el nucleósido trifosfato no incorporado de la etapa (a) y el ATP formado en la etapa (b) con una enzima apirasa;
- 50 e. repetir las etapas a-d al menos una vez;

en el que la enzima apirasa es una apirasa de *Shigella flexneri*.

Aspectos generales de los métodos

55 En todos los métodos anteriores, la determinación de ATP puede realizarse con un ensayo bioluminiscente. Preferiblemente, la determinación de ATP se realiza con un ensayo bioluminiscente que utiliza luciferina y luciferasa. La luciferasa puede proporcionarse en una composición según el octavo aspecto, para permitir la inhibición de la apirasa concomitante a la adición de luciferasa.

60 La apirasa de *Shigella flexneri* en los métodos mencionados anteriormente puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia del 80%, más preferiblemente del 85%, incluso más preferiblemente del 90%, aún más preferiblemente del 95%, aún más preferiblemente del 97% de la secuencia según SEQ ID NO: 10. De manera importante, sólo tales desviaciones de secuencia de la apirasa *Shigella flexneri* según SEQ ID NO: 10 que retiene la actividad de apirasa se abarcan en la invención. Más preferiblemente, la apirasa de *Shigella flexneri* en los métodos anteriores comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos

según SEQ ID NO: 4. La apirasa de *Shigella flexneri* puede proporcionarse en una composición según el séptimo aspecto de la divulgación.

#### Reactivos de apirasa y su producción

5 Los aspectos segundo a octavo a continuación no forman parte de la invención reivindicada como tal, pero la divulgación de dichos aspectos puede ser relevante para la invención reivindicada.

10 En un segundo aspecto, se da a conocer en el presente documento una apirasa de *Shigella flexneri* que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos una identidad de secuencia del 95%, más preferiblemente del 96%, aún más preferiblemente del 97%, aún más preferiblemente del 98% incluso más preferiblemente del 99% con la secuencia según SEQ ID NO: 4. De manera importante, sólo tales desviaciones de secuencia de la apirasa de *Shigella flexneri* según SEQ ID NO: 4 que retiene la actividad de apirasa se abarcan en la invención. Más preferiblemente, la apirasa de *Shigella flexneri* del segundo aspecto comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO: 4.

15 En un tercer aspecto, se da a conocer en el presente documento un polinucleótido que codifica para una apirasa según el segundo aspecto.

20 En un cuarto aspecto, se da a conocer en el presente documento un vector que comprende un polinucleótido del tercer aspecto unido operativamente a un promotor que puede inducir la expresión del polinucleótido, preferiblemente por inducción de arabinosa.

25 En un quinto aspecto, se da a conocer en el presente documento una célula huésped que comprende un polinucleótido del tercer aspecto unido operativamente a un promotor que puede inducir la expresión del polinucleótido, o un vector del cuarto aspecto.

30 En un sexto aspecto, se da a conocer en el presente documento un método para producir una apirasa recombinante según el segundo aspecto, que comprende las etapas de:

- cultivar células huésped según el quinto aspecto en condiciones que inducen la expresión del polinucleótido; y
- recuperar la apirasa recombinante producida del cultivo.

35 En un séptimo aspecto, se da a conocer en el presente documento una composición que comprende una apirasa de *Shigella flexneri* que tiene un pH en el intervalo de 6-9, preferiblemente 7-8, y una fuerza iónica de al menos 300 mM. Preferiblemente, el pH es de aproximadamente 7,5. El tampón puede ser un tampón HEPES. La fuerza iónica puede ser de 300-1000 mM, preferiblemente 400-800 mM, más preferiblemente 500-800 mM. El tampón puede comprender NaCl 400-600 mM y MgSO<sub>4</sub> 20-30 mM. Tal como se muestra en el ejemplo 10, el tampón del séptimo aspecto es particularmente ventajoso en cuanto a estabilidad enzimática.

40 En un octavo aspecto, se da a conocer en el presente documento una composición que comprende una luciferasa y un inhibidor de apirasa que comprende ortovanadato. Las ventajas del ortovanadato se comentan en el contexto del primer aspecto de la presente invención. Es ventajoso combinar el inhibidor de apirasa con luciferasa en una sola composición, permitiendo que ambos se añadan en una sola acción. La concentración de ortovanadato debería elegirse de tal manera que la concentración final de ortovanadato en la muestra después de la adición de la composición a una mezcla de reacción que se usa en un ensayo basado en luciferasa sea suficiente para inhibir SFA. La concentración de ortovanadato puede ser de al menos 0,2 mM, preferiblemente al menos 1 mM, más preferiblemente 1-3000 mM, lo más preferiblemente 2-200 mM. La cantidad de actividad luciferasa debería ser suficiente para un ensayo basado en luciferasa después de la adición de la composición a una mezcla de reacción.

#### Usos de la apirasa de SFA

45 En un noveno aspecto, la presente invención se refiere al uso de una apirasa de *Shigella flexneri* para degradar nucleótidos contaminantes (trifosfatos de nucleótidos y/o difosfatos de nucleótidos) en un método analítico. Los nucleótidos contaminantes pueden ser ATP y/o análogos de ATP, y el método analítico puede ser un ensayo para medir ATP. El ensayo para medir ATP puede ser un ensayo bioluminiscente.

60 En un décimo aspecto, la presente invención se refiere al uso de una apirasa de *Shigella flexneri* en una reacción de secuenciación de ADN, preferiblemente una reacción de secuenciación por síntesis, lo más preferiblemente un método de pirosecuenciación.

65 La apirasa en los aspectos noveno o décimo puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia del 80%, más preferiblemente del 85%, incluso más preferiblemente del 90%, aún más preferiblemente del 95%, aún más preferiblemente del 97% de la secuencia según SEQ ID NO: 10. De manera importante, sólo tales desviaciones de secuencia de la apirasa de *Shigella flexneri* nativa según SEQ ID NO: 10 que

retiene la actividad de apirasa se abarcan en la invención. Más preferiblemente, la apirasa en los aspectos noveno y décimo puede ser una apirasa según el segundo aspecto.

5 La disposición de la presente divulgación en secciones con encabezados y subtítulos es simplemente para mejorar la legibilidad y no debe interpretarse como limitativa de ninguna manera, en particular, la división no excluye ni limita de ninguna manera la combinación de características bajo diferentes encabezados y subtítulos entre sí.

Los siguientes ejemplos no deben interpretarse como limitativos de la invención.

10 **Ejemplos**

Para obtener detalles experimentales sobre los ejemplos a continuación, se dirige al lector a una sección separada titulada Materiales y métodos.

15 Ejemplo 1: producción y evaluación colorimétrica de apirasa recombinante de *Shigella flexneri* (SFA)

20 La SFA se produjo y purificó tal como se describe en la sección de Materiales y métodos. La fracción enzimática purificada se examinó usando un ensayo colorimétrico para identificar la presencia de apirasa bacteriana. Tal como puede observarse en la figura 1, el ensayo colorimétrico muestra claramente la diferencia de color que corresponde directamente a los niveles de expresión de la expresión de la enzima apirasa, revelando así su ubicación celular. En todos los casos, puede observarse una clara diferencia en el color entre cultivos no inducidos e inducidos en comparación con el color de la muestra en blanco.

25 Tal como se muestra en la figura 2, puede establecerse una correlación clara entre los resultados colorimétricos y los perfiles de expresión de apirasa de los clones y su localización. La enzima rSFA se sobreexpresó constantemente en cultivos inducidos a 25 kDa, especialmente en lisados de células enteras y fracciones solubles, pero no en fracciones de membrana, lo que indica su ubicación para los procedimientos de purificación adicionales. Los cultivos inducidos revelaron una expresión de ~10 veces más enzima en comparación con la de las células no inducidas, lo que demostró la eficiencia del clon construido. Este SDS-PAGE también muestra la pureza de la producción de apirasa y esta fracción purificada se usó para todos los experimentos de este estudio.

30 Ejemplo 2: análisis de secuencia entre rSFA y STA

35 Una vez que se confirmó la expresión de la proteína mediante electroforesis en gel y ensayo colorimétrico, el producto del gen rSFA se secuenció para identificar la secuencia de nucleótidos para comparar con la secuencia de referencia WP\_010921592.1 obtenida de la base de datos NCBI (figura 3A). Tal como puede observarse en la figura, el fragmento de oligonucleótido clonado de SFA que contiene Apirasa-6xHis (rSFA) y las secuencias de secuencia expresada (pBL21-Apirasa-6xHis) se situaron en el intervalo deseado (véase la figura 3A). Tal como puede observarse en la figura 3B, la rSFA difiere de la SFA de referencia solo en los extremos N-terminal y C-terminal.

40 Ejemplo 3: rSFA es más eficiente en la degradación de ATP en comparación con STA y es estable

45 Las mediciones de la desintegración de la emisión de luz de la reacción de luciferasa de luciérnaga (figura 4) describieron la actividad de degradación de ATP entre las dos apirasas, rSFA y STA. La rSFA revela una clara eliminación de ATP y sus análogos en ~10 min en comparación con la de STA. En el otro experimento, tal como puede observarse en la figura 5, la luminiscencia se aumentó con la adición de ATP en ambos casos, mientras que la adición de apirasa dio como resultado una disminución de la luz debido al agotamiento de ATP. La adición deliberada de ATP adicional durante la reacción reveló una tendencia de agotamiento de ATP similar. Sin embargo, la rSFA presentó una actividad de agotamiento de ATP más rápida que la STA comercialmente disponible. Cuando el ATP y las preparaciones de apirasa se diluyeron 10 veces, el agotamiento de ATP se redujo en consecuencia.

50 Las muestras de rSFA se mantuvieron a 4°C, luego se congelaron y se congelaron/descongelaron para verificar su estabilidad. Se hizo un esfuerzo para ver si la rSFA podría usarse para preparar un reactivo para el agotamiento de ATP extraño en muestras biológicas.

55 Tabla 1. Comparación de la actividad de degradación de ATP entre apirasa de *Shigella flexneri* recombinante y apirasa de patata comercialmente disponible obtenida de Sigma-Aldrich

Tipo de apirasa	Actividad inicial (unidades/mg proteína)	Actividad de ATP restante		
		después de 1 min	después de 17 min	después de 91 min
Apirasa de patata (STA)	4,12	1,1876%	0,0367%	0,0228%

Apirasa de <i>Shigella</i> recombinante (rSFA)*	3,39	2,6953%	0,0019%	0,0005%
Apirasa de <i>Shigella</i> recombinante (rSFA)**	3,58	2,1855%	0,0019%	0,0004%
* Almacenada en congelación antes del experimento				
** Almacenada en el refrigerador antes del experimento				

Además, el ATP restante fue mucho más bajo después de tiempos de incubación más largos tal como se muestra en la tabla 1. Esto indica que la SFA es más sensible y eficiente que la STA en el agotamiento del ATP, ya que el ADP se acumula en la mezcla de reacción y dificulta la eficiencia de reacción del último.

5

Ejemplo 4: demostración de ATP extracelular y sus análogos en suero

Teniendo en cuenta las ventajas de rSFA de los experimentos anteriores, se verificó su eficacia retirando ATP extracelular en muestras de suero. En el primer experimento (figura 6A), rSFA reveló la hidrólisis completa de ATP y sus análogos ~17 min, mientras que STA tardó ~45min, contra suero en bruto al 100%. La linealidad se reprodujo (figura 6B), incluso cuando el suero se diluyó al 10%. Por tanto, rSFA es superior a STA en la eliminación de ATP en muestras biológicas como suero.

10

Tabla 2: El efecto del suero sobre la tasa de agotamiento de ATP en suero en bruto y diluido

15

	Sin suero (control negativo)	Suero no diluido (suero en bruto al 100%)	Suero diluido al 10%
apirasa de patata	3,52	0,55355219	2,42904382
apirasa recombinante	3,98	1,81641444	1,77443406

Ejemplo 5: método mejorado para pirosecuenciación

Dado que las enzimas disponibles comercialmente muestran variaciones de lote a lote en su calidad y actividad e incapacidad para hidrolizar el exceso de ATP y sus análogos, disminuye la eficiencia y limita la aplicabilidad de la reacción de pirosecuenciación para leer secuencias largas. Esto puede abordarse usando rSFA porque muestra una mejor calidad y eficiencia en comparación con STA. Véase también el ejemplo 11.

20

Ejemplo 6: rSFA es superior a STA en un ensayo bioluminiscente de ATP, en tampón

25

El curso temporal de las actividades, incluyendo las actividades iniciales y finales de tres productos comerciales de la apirasa de patata denominados STA, A6535 y A6237, se compararon con rSFA en un ensayo de ATP bioluminiscente. Las enzimas se diluyeron en un tampón, por lo que no debe haber interferencia de la muestra y los resultados representan un escenario ideal. La medición fue salida de luz de una luciferasa, y el resultado deseado es la eliminación más rápida y completa posible de ATP por la apirasa.

30

Tal como se muestra en la figura 7, la variante de STA A6237 mostró una mejor actividad en comparación con otras fuentes comerciales de STA. Sin embargo, todas las variantes comerciales de STA se saturaron después de 120 s y permanecieron ineficaces para reducir aún más la concentración de ATP después de eso. Por el contrario, rSFA fue activa en la eliminación de los análogos de ATP y sus subproductos incluso después de 300 s y puede realizar una eliminación más completa de ATP. Hay que tener en cuenta la escala logarítmica en el gráfico, que indica una mejora de al menos 10 veces.

35

Ejemplo 7: rSFA es superior a STA en un ensayo bioluminiscente de ATP, en suero al 10%

40

Se realizó un experimento similar al ejemplo 8, pero con suero al 10% presente en la mezcla de ensayo para evaluar la utilidad de rSFA en muestras que contienen suero, tales como muestras de sangre.

Tal como se muestra en la figura 8, la actividad de las variantes comerciales de STA (STA, A6535 y A6237) no mostró una eliminación de ATP adicional después de 6 minutos, pero rSFA continuó escindiendo análogos de ATP y sus subproductos incluso después de 30 minutos. La presencia de ATP extracelular podría inhibir potencialmente la actividad de STA, mientras que rSFA permanece activa en la eliminación de ATP extracelular del suero al 10%. Por tanto, rSFA es superior a STA en el análisis de muestras de sangre.

45

Ejemplo 8: rSFA es superior a STA en un ensayo bioluminiscente de ATP, en orina

50

Considerando las complicaciones debidas a los contaminantes en la orina, los inventores sometieron a prueba las actividades de eliminación de ATP de STA y rSFA durante 60 minutos en una muestra de orina. Aunque ambas enzimas mostraron actividades iniciales similares, la tasa de acción de STA se vio obstaculizada después de 3 min, mientras que rSFA continuó con la eliminación de ATP. Incluso después de 4 inyecciones posteriores de 10  $\mu\text{l}$  de ATP 10  $\mu\text{mol/l}$ , la rSFA mostró una actividad de eliminación de ATP completa cada vez en menos de 3 minutos, pero STA no pudo digerir el ATP incluso después de 20 minutos (figura 9).

#### Ejemplo 9: efecto de los análogos de ATP sobre las actividades STA y rSFA

La hidrólisis de ATP, ADP y sus mezclas en orina se sometió a prueba con STA y rSFA. La figura 10 muestra que la actividad de STA disminuyó considerablemente o bien contra sólo ADP 10  $\mu\text{mol/l}$  o bien cuando se complementó una mezcla de ADP y ATP a concentraciones de 10  $\mu\text{mol/l}$ . En cambio, no hubo diferencia sustancial en la actividad con rSFA. En ambos casos, la actividad de retirada de fosfato de STA de los análogos de ATP fue significativamente menor en comparación con la de rSFA.

#### Ejemplo 10: optimización del sistema tampón para mejorar la actividad de rSFA

La selección y optimización de un sistema tampón correcto es un aspecto importante de la estabilidad enzimática. Los inventores han desarrollado tres sistemas tampón para optimizar la estabilidad de rSFA. Se almacenó la misma concentración de rSFA en el tampón 1, el tampón 2 y el tampón 3 durante aproximadamente 10 meses a +4°C y se realizaron los ensayos de eliminación de ATP bioluminiscentes. Se analizó la actividad de la enzima y se descubrió que la enzima utilizada con el tampón 3 mostró una actividad particularmente buena en comparación con otros dos tampones (figura 11).

#### Ejemplo 11: actividad de rSFA en ATP, dATP, dTTP, dGTP y dCTP

Para comparar la actividad de rSFA en los nucleótidos con la de STA, ATP, dATP, dTTP, dGTP y dCTP se incubaron con las enzimas (misma actividad inicial) durante 5 minutos y 35 minutos y los productos resultantes se detectaron mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

Como punto de partida, el análisis cromatográfico de ATP (figura 13A) reveló que solo se escinde parcialmente a ADP y AMP en 5 minutos por STA, y todo el ATP se convirtió completamente en ADP y AMP después de 35 minutos. Por el contrario, rSFA convirtió completamente todo el ATP en AMP en menos de 5 minutos sin que quedara ADP detectable.

La figura 13B muestra que quedaba más del 25% de dATP después de 35 minutos de incubación con STA (producto principalmente dADP y algo de dAMP), mientras que rSFA convirtió completamente el dATP en dAMP en menos de 5 minutos.

De manera similar, dTTP se convirtió en TDP y TMP en 35 min por STA, mientras que rSFA lo convirtió completamente en dTTP en TMP en menos de 5 min (figura 13C).

Se observaron resultados similares con dGTP (figura 13D).

Sin embargo, tal como puede observarse en la figura 13E, la STA podría convertir sólo la mitad del dCTP en CDP y CMP después de 35 min, mientras que rSFA convirtió completamente el dCTP en CMP en menos de 5 min. Por tanto, rSFA es al menos 7 veces más potente para eliminar dCTP que STA.

Los resultados anteriores indican que SFA es superior a STA para eliminar dNTP y dNDP, que es particularmente relevante para su uso en un método de secuenciación por síntesis (tal como pirosecuenciación), ya que la acumulación de dNTP y/o dNDP interfiere con los ciclos de secuenciación posteriores.

#### Ejemplo 12: rSFA puede inhibirse por ortovanadato sin interferir con la actividad de la luciferasa

La actividad de rSFA en algunos casos puede necesitar detenerse con el fin de medir la concentración intracelular de ATP. Entre los diferentes inhibidores sometidos a prueba, 100 mM de  $\text{MgSO}_4$  y 1 mM de ortovanadato en forma de  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , donde sólo el primero afectó a la actividad de la luciferasa (figura 12). El ortovanadato no afectó a la luciferasa y, al mismo tiempo, inhibió por completo la actividad de rSFA, por lo que es ideal para inhibir la apirasa en un ensayo que involucra luciferasa.

#### *Materiales y métodos*

#### Clonación, secuenciación y producción de apirasa de *Shigella*

El plásmido pRSETB que porta el gen 2a *apy* de *Shigella flexneri* en la cepa GJ1158 de *E. coli* (Bhandari y Gowrishankar J Bacteriol. Julio de 1997; 179 (13): 4403-6) se obtuvo de Sankaran, Centro de Biotecnología,

Universidad Anna, India. Dado que el constructo GJ1158 no era estable, el gen *apy* nativo se escindió y amplificó (usando los cebadores *apy 3* y *apy 4*; tabla 3), que se purificó adicionalmente mediante un kit de purificación en gel de PCR (Fermentas). El molde de ADN purificado se introdujo con sitios de restricción de dos endonucleasas para *NdeI* y *BsiWI* para reemplazar el codón de terminación natural por la región codificante de 6-histidina usando los cebadores *Apyr-6His-BsiWI* y *Apyr-5-NdeI* (tabla 2) y se transformó en *E. coli* TOP10 (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante con pequeñas modificaciones. Los transformantes se hicieron crecer en placas de agar y los clones positivos pBL-Apirasa-6His se seleccionaron por hidrólisis de *NheI* y verificación del tamaño de fragmentos de restricción en geles de agarosa, seguido de verificación de secuencia en la instalación de secuenciación del Instituto Karolinska, Estocolmo. Se compararon secuencias identificadas de constructos de pBL-Apirasa-6His con apirasa 2a de *Shigella flexneri* (registro de GeneBank: U04539) para descubrir la integridad de los sitios de clonación, la secuencia codificante de Apirasa-6His y el reemplazo del codón de terminación por la etiqueta 6-His. Después de la confirmación de la secuencia, el plásmido del clon pBL-Apirasa-6Su (SEQ ID NO: 3) se transformó en BL21-A1 de *E. coli* para la expresión de proteínas. La secuencia de aminoácidos codificada por el plásmido se muestra en SEQ ID NO: 4.

Tabla 3. Lista de oligonucleótidos usados

Nombre	Secuencia de oligonucleótidos (5' → 3')	SEQ ID NO
Cebador1 de apirasa nativa	CGCGGATCCCTGAAGGCAGAAGGTTTTC	SEQ ID NO: 5
Cebador2 de apirasa nativa	CCCAAGCTTTTATGGGGTCAGTTCATT	SEQ ID NO: 6
Apyr-6His-BsiWI	GAACATCGTACGTTAGTGGTGATGGTGATGATG TGGGGTCAGTTCATTGGTAG	SEQ ID NO: 7
Apyr-5-NdeI	GATATACATATGAAAACCAAAAACCTTTC	SEQ ID NO: 8

#### Producción a gran escala de apirasa de *Shigella* pura

Evaluación preliminar usando perlas magnéticas de Ni-NTA: se sedimentaron aproximadamente 1,3 ml de cultivo bacteriano a 13.000 rpm y 300 µl de tampón de extracción (PMSF 1 mM, lisozima 1 mg/ml y Triton X-100 al 0,05% en Tris-HCl 20 mM, pH 8,0) para preparar lisados celulares. Después de 30 minutos, se añadieron 30 µl de perlas magnéticas de Ni-NTA equilibradas y se mantuvieron en agitación suave para facilitar la unión de la proteína marcada con His a las perlas. Se tomaron muestras del sobrenadante que contenía las proteínas solubles y se lavaron las perlas con 300 µl de tampón de lavado (NaCl 300 mM, imidazol 20 mM, glicerol al 8% y Triton X-100 al 0,2% en KP 10 mM, pH 7,8). Después de enjuagar las perlas con PBS durante 10 minutos, se hirieron durante 3 minutos con 12 µl de SDS para eluir la proteína recombinante pura. Los perfiles de proteínas de los lisados celulares, las proteínas solubles y las fracciones de proteínas puras se resolvieron en geles de SDS-PA al 12% a 30 mA usando Tris-glicina (Tris-HCl 25 mM, SDS al 0,1% p/v, pH 8,3). Después de la confirmación, la producción de apirasa se amplió a grandes escalas de hasta 2 l.

Purificación a gran escala por cromatografía de afinidad metálica: el gen *apy* (SFA) que porta la cepa BL21-A1 de *E. coli* que contiene pBL-Apirasa-6His se cultivó en 2 l de medio LB y se indujo a DO 0,7. Las células se recogieron mediante centrifugación a 4000 rpm después de 4 h de crecimiento y después de un lavado con solución salina se lisaron con prensa francesa. La SFA marcada con 6-histidina se purificó por afinidad metálica (IMAC) (HisTrap FF, GE-Healthcare, Suecia) usando un tampón (Hepes 20 mM, NaCl 500 mM, glicerol al 10%, imidazol 20 mM, pH 7,5) y después lavando con un tampón de lavado que contenía imidazol 50 mM, la enzima se eluyó con tampón de elución que contenía imidazol 350 mM. El tampón se intercambió con tampón que contenía MgSO<sub>4</sub> 25 mM, BSA al 5% y la muestra de proteína se concentró usando un dispositivo de ultrafiltración con una membrana semipermeable de corte de 10 kDa (Vivaspin Turbo, Sartorius).

#### Evaluación colorimétrica de la actividad de la apirasa

La actividad enzimática se evaluó por calorimetría, tal como describen Sankaran *et al.* (Diagn Microbiol Infect Dis. Marzo de 2009; 63 (3): 243-50) con pequeñas modificaciones. La reacción colorimétrica se realizó mezclando volúmenes iguales de reactivo de ensayo (pirofosfato de sodio 6 M y EDTA 40 mM; pH 7,5) y un reactivo de color (molibdato de amonio ácido al 5% p/v y sulfato de amonio ferroso al 1% p/v) en presencia de enzima apirasa (muestra de prueba) para producir señales colorimétricas, que son proporcionales a la concentración de enzima presente en la muestra de prueba. Principalmente, el ensayo usa pirofosfato inorgánico como sustrato para la enzima, mientras que EDTA actúa tanto como un tampón como un quelante de metales para suprimir las demás actividades fosfatasa y pirofosfatasa contaminantes. El fosfato liberado se mide en presencia de pirofosfato usando

molibdato de amonio ácido y el color se midió a 695 nm en un lector de microplacas multimodo (SpectraMax® M5, Molecular Devices, LLC, EE.UU.).

#### Pruebas de sensibilidad mediante experimentos luminiscentes

5 Las cubetas contenían 100 µl de muestra en un volumen total de 1 ml que contenía reactivo ATP SL (BioThema AB, Suecia) en tampón Tris-EDTA 0,07 mol/l y la reacción se inició mediante la inyección de 10 µl de patrón de ATP 10 µmol/l. La actividad inicial de la apirasa se determinó según lo descrito por Lundin y colaboradores (Analytical Biochemistry 75, 611-620 (1976) y Methods in Enzymology vol. 305, 346-370 (2000)) con algunas modificaciones. 10 La bioluminiscencia se midió cada 10 s durante 1 minuto, en el luminómetro 1251 completamente automático (LKB-Wallac, Turku, Finlandia). A esto, se añadieron 10 µl de ATP 10 µmol/l para determinar la luminiscencia de fondo. El control de temperatura se ajustó hasta 25°C y se midió la bioluminiscencia de varias cubetas en paralelo durante 30 ó 60 minutos y se comparó con ATP residual después de diversos tiempos de incubación usando rSFA y STA. Esto se repitió con rSFA y STA y se trazó un gráfico manteniendo la tasa de degradación de ATP como control interno 15 para determinar la eficiencia de degradación de ATP de ambas fuentes de enzimas.

#### Análisis bioinformático de diferentes apirasas (ATP-difosfohidrolasa)

20 La secuencia de ADN de apirasa 2a de *Shigella flexneri* (GI 532975) (SEQ ID NO: 2) y de las secuencias de apirasa de patata traducidas (ID de gen traducido 1025774 de ATP de *Solanum tuberosum*-difosfohidrolasa NM\_008XM\_004845) (SEQ ID NO: 1) se obtuvieron de la base de datos de nucleótidos NCBI. Estos nucleótidos se analizaron usando las herramientas en línea indicadas anteriormente para la búsqueda de homología, múltiples alineamientos de genes y sus traducciones a secuencias de proteínas.

#### Optimización del sistema tampón

25 La concentración igual de rSFA se almacenó en el tampón 1 (Tris 20 mM, EDTA 1 mM, BSA al 1%, MgSO<sub>4</sub> 25 mM, pH 7,5), tampón 2 (Tris 20 mM, MgSO<sub>4</sub> 25 mM, BSA al 2,5%, pH 7,5) y tampón 3 (HEPES 20 mM, NaCl 500 mM, MgSO<sub>4</sub> 25 mM, pH 7,5) durante aproximadamente 10 meses a 4°C. El ensayo de actividad de bioluminiscencia se realizó tal como se describe a continuación para detectar la actividad de rSFA después del almacenamiento. 30

#### Desarrollo de inhibidores

35 Después de verificar la actividad inhibidora de rSFA en el tampón, se verificó con orina, donde se añadieron 10 µl con 80 µl de reactivo de lisado celular y ATP 10 µmol/l. Aproximadamente 100 mM de MgSO<sub>4</sub> y 1 mM de Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> se añadieron en tubos separados y se incubaron durante 10 minutos antes de medir la emisión de luz usando luciferasa de luciérnaga.

#### Ensayo de bioluminiscencia

40 La emisión de luz de la reacción de luciferasa de luciérnaga se midió a 25°C en un luminómetro 1251 (LKB-Wallac; Finlandia) usando el kit ATP SL (BioThema AB, Suecia) según las instrucciones del fabricante (en un experimento de tampón) o añadiendo luciferasa concentrada (en experimentos de suero/orina). Inicialmente, la reacción de luciferasa sigue una cinética de primer orden y el reactivo ATP SL en este kit produce una intensidad de luz 45 proporcional a la concentración de ATP. Una gráfica del logaritmo natural de la intensidad de la luz frente al tiempo produce una línea recta con la pendiente que representa la constante de velocidad de la reacción. La concentración de partida de STA, A6535, A6237 (Sigma-Aldrich) se ajustó de manera similar a rSFA. La reacción BL se inició automáticamente tras la adición de ATP 0,2 µmol/l, y la intensidad de la luz se midió cada 10 segundos durante 10 minutos (en el experimento de tampón) o 30 minutos (en experimentos de suero y orina), en el volumen de reacción 50 de 0,5 ml.

#### Análisis de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) de nucleósidos/nucleótidos

55 La preparación de patrón de dNTP se preparó para contener la concentración final de enzima 0,1 mM. Los nucleósidos ATP/dATP/dCTP/dGTP/dTTP se suspendieron en tampón Tris-EDTA y se diluyeron 10 veces con la fase móvil (acetonitrilo al 70%, acetato de amonio al 30%, pH 5,35). Los nucleósidos preparados anteriormente se incubaron individualmente con cantidades iguales de rSFA y STA durante 35 minutos a pH 7,75 y se inyectaron 5 µl de la mezcla en el instrumento de HPLC (columna SeQuant ZIC®-pHILIC, Merck Millipore) a una velocidad de flujo de 0,7 ml/min usando una bomba (Jasco PU-2089 Plus). Los picos se detectaron a 254 nm mediante el detector UV- 60 2075 Plus y la separación cromatográfica se logró mediante elución isocrática. El análisis se realizó usando el software Chrompass, donde se identificó cada nucleótido/nucleósido en comparación con el tiempo de retención de los patrones respectivos.

**Lista de secuencias**

<110> ApiRays AB

<120> MÉTODOS ANALÍTICOS Y DE DIAGNÓSTICO QUE UTILIZAN APIRASA DE *SHIGELLA FLEXNERI*

5 <130> NP0155WO

<150> SE 1451332-9

<151> 07-11-2014

10 <160> 10

<170> PatentIn versión 3.5

15 <210> 1

<211> 1365

<212> ADN

<213> *Solanum tuberosum*

<400> 1

atggttgaacc	aaaatagtca	ttttgttttc	acaattttgg	caatattttt	ggttttgccc	60
ctaagtttat	tatccaaaa	tgtggatgct	caaattccat	taagaagaca	tttattaagt	120
catgaatcag	aacattatgc	agtaatattt	gatgctggaa	gtactggaag	tagagttcat	180
gtttttcgat	ttgatgaaaa	attaggactt	cttcctattg	gcaacaatat	tgagtatttt	240
atggcgacag	agccaggttt	aagttcatat	gcagaagatc	caaaggctgc	agccaattca	300
cttgagccac	ttttagatgg	agctgaagga	gttgttcctc	aagaattgca	atctgaaaca	360
cctttagaac	ttggggcaac	agcaggtcct	aggatgttaa	aaggggatgc	agctgaaaa	420
attctacaag	cagtgagaaa	tttagtgaag	aatcaaagca	ctttccatag	caaagatcaa	480
tgggtcacta	ttcttgatgg	aactcaagaa	ggctcttata	tgtgggctgc	aataaattat	540
ttattgggaa	atttgggcaa	agattataaa	agtacaacag	caacaattga	tcttggtggg	600
ggttcagtcc	aaatggcata	tgctatatca	aatgaacaat	tgcaaaaagc	tcctaataat	660
gaggatggag	aaccttatgt	acaacaaaa	catcttatgt	caaaagatta	taatctctat	720
gtacatagtt	atttaaacta	tgggcaatta	gcaggtcgag	ctgagatttt	caaggcttca	780
agaaatgaaa	gtaatccttg	tgctctggaa	ggatatgatg	ggtattactc	atatggagga	840
gtggactaca	aagtaaaagc	accaaaagaa	ggtagtagtt	ggaagagatg	caggaggtta	900
actagacatg	cacttaaaat	aaatgcaaaa	tgcaagattg	aagaatgcac	cttcaatgga	960
gtgtggaatg	gtggtggtgg	tgatggacaa	aaaaatattc	atgcttcatc	atTTTTTTat	1020
gatattggtg	ctcaggttgg	cattgttgac	accaaatttc	catctgctct	agcaaagcca	1080
attcaatact	taaatgcagc	taaagttgct	tgccaaacaa	atgtggcaga	tataaaatcc	1140
atattcccaa	aaactcaaga	tagaaatata	ccatacttat	gtatggactt	gatatatgag	1200
20 tacactttgc	ttgttgatgg	atTTggacta	aatccacaca	aagaaataac	agtgatacat	1260
gatgtgcaat	acaaaaacta	tctagttgga	gcagcatggc	cattgggatg	tgccattgac	1320
ttggtttcct	caactacaaa	caaaattaga	gttgcacatc	cttaa		1365

<210> 2

<211> 1134

25 <212> ADN

<213> *Shigella flexneri*

ES 2 791 302 T3

<400> 2  
tcacaaatca tcataatcaa gagacaaaac gatacgaaaa aataagataa aaaacatcgt 60  
tcttttacca cattatthtc cgtgaatatg aaaaataatg ttattacttt aatataagac 120  
tattttttgt ttttccatca ctctgttcaa atttttccgc atgacttgtg ttttttghtaa 180  
tacagctcgt tttttacagc tgaccacaaat catcaattaa ttatgctaag gaaataaatt 240  
atgaaaacca aaaactttct tcttttttgt attgctacaa atatgatttt tatcccctca 300  
gcaaatgctc tgaaggcaga aggttttctc actcaacaaa cttcaccaga cagtttghtca 360  
atacttccgc cgcctccggc agagaattca gtagtatttc aggctgacaa agctcattat 420  
gaattcggcc gctcgtcctg ggatgctaag cgtgtacgtc tcgctagcga agatgcatac 480  
tacgagaatt ttggtcctgc attttcagat gcttatggca tggatatttc aagggaataa 540  
accccaatct tatatcagtt gttaacacaa gtactacagg atagccatga ttacgccgtg 600  
cgtaacgcc aagaatatta taaaagagtt cgtccattcg ttatttataa agacgcaacc 660  
tgtacacctg ataaagatga gaaaatggct atcactggct cttatccctc tggatcatgca 720  
tcctttggtt gggcagtagc actgatactt gcggagatta atcctcaacg taaagcggaa 780  
atacttcgac gtggatatga gtttgagaaa agtcgggtca tctgagggtc gcattggcaa 840  
agcagatgtag aggctgggag tttaatggga gcatcgggtt ttgcagtact tcataatata 900  
cctgaattta ccaaaagcct tagcgaagcc aaaaaagagt ttgaagaatt aaatactcct 960  
accaatgaac tgaccccata aagctggaca gcctgtatca ggctatggag ggcccataga 1020  
caaatctacc ctatatgagc ataggaggag tctatgggca caccacgttt taccctgaa 1080  
ttaaagggat tactggaaag gctgggacat atcctccggc agaagcagaa aaag 1134

5 <210> 3  
<211> 780  
<212> ADN  
<213> *Shigella flexneri*

10 <400> 3  
gatatacata tgaaaaccaa aaactttctt cttttttgta ttgctacaaa tatgattttt 60  
atcccctcag caaatgctct gaaggcagaa ggttttctca ctcaacaaac ttcaccagac 120  
agtttghtca tacttccgcc gcctccggca gagaattcag tagtatttca ggctgacaaa 180  
gctcattatg aattcggcgg ctcgctccgg gatgctaatac gtgtacgtct cgctagcga 240  
gatgcatact acgagaatth ttggtcctgca ttttcagatg cttatggcat ggatatttca 300  
agggaaaata cccaatctt atatcagttg ttaacacaag tactacagga tagccatgat 360  
tacgccgtgc gtaacgcaa agaataatata aaaagagttc gtccattcgt tatttataaa 420  
gacgcaacct gtacacctga taaagatgag aaaatggcta tcaactggctc ttatccctct 480  
ggatcatgat cctttgggtt ggcagtagca ctgatacttg cggagattaa tcctcaacgt 540  
aaagcggaaa tacttcgacg tggatatgag tttggagaaa gtcgggtcat ctgagggtcg 600  
cattggcaaa gcgatgtaga ggctgggctt ttaatgggag catcgggttgt tgcagtactt 660  
cataatacac ctgaatthac caaaagcctt agcgaagcca aaaaagagtt tgaagaatta 720  
aatactccta ccaatgaact gacccacat catcaccatc accactaacg tacgatgttc 780

ES 2 791 302 T3

<210> 4  
 <211> 259  
 <212> PRT  
 <213> *Shigella flexneri*

5

<400> 4

Asp Ile His Met Lys Thr Lys Asn Phe Leu Leu Phe Cys Ile Ala Thr  
 1 5 10 15

Asn Met Ile Phe Ile Pro Ser Ala Asn Ala Leu Lys Ala Glu Gly Phe  
 20 25 30

Leu Thr Gln Gln Thr Ser Pro Asp Ser Leu Ser Ile Leu Pro Pro Pro  
 35 40 45

Pro Ala Glu Asn Ser Val Val Phe Gln Ala Asp Lys Ala His Tyr Glu  
 50 55 60

Phe Gly Arg Ser Leu Arg Asp Ala Asn Arg Val Arg Leu Ala Ser Glu  
 65 70 75 80

Asp Ala Tyr Tyr Glu Asn Phe Gly Leu Ala Phe Ser Asp Ala Tyr Gly  
 85 90 95

Met Asp Ile Ser Arg Glu Asn Thr Pro Ile Leu Tyr Gln Leu Leu Thr  
 100 105 110

Gln Val Leu Gln Asp Ser His Asp Tyr Ala Val Arg Asn Ala Lys Glu  
 115 120 125

Tyr Tyr Lys Arg Val Arg Pro Phe Val Ile Tyr Lys Asp Ala Thr Cys  
 130 135 140  
 Thr Pro Asp Lys Asp Glu Lys Met Ala Ile Thr Gly Ser Tyr Pro Ser  
 145 150 155 160

Gly His Ala Ser Phe Gly Trp Ala Val Ala Leu Ile Leu Ala Glu Ile  
 165 170 175

Asn Pro Gln Arg Lys Ala Glu Ile Leu Arg Arg Gly Tyr Glu Phe Gly  
 180 185 190

Glu Ser Arg Val Ile Cys Gly Ala His Trp Gln Ser Asp Val Glu Ala  
 195 200 205

Gly Arg Leu Met Gly Ala Ser Val Val Ala Val Leu His Asn Thr Pro  
 210 215 220

Glu Phe Thr Lys Ser Leu Ser Glu Ala Lys Lys Glu Phe Glu Glu Leu  
 225 230 235 240

Asn Thr Pro Thr Asn Glu Leu Thr Pro His His His His His His Arg  
 245 250 255

Thr Met Phe

10

# ES 2 791 302 T3

5	<210> 5 <211> 28 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Cebador	
	<400> 5	
10	cgcgatccc tgaaggcaga aggtttc	28
	<210> 6 <211> 27 <212> ADN <213> Artificial	
15	<220> <223> Cebador	
	<400> 6	
20	ccaagctt tatgggtca gttcatt	27
	<210> 7 <211> 53 <212> ADN <213> Artificial	
25	<220> <223> Cebador	
	<400> 7	
30	gaacatcgta cgtagtggt gatggtgatg atgtggggtc agttcattgg tag	53
	<210> 8 <211> 28 <212> ADN <213> Artificial	
35	<220> <223> Cebador	
	<400> 8	
40	gatatacata tgaaaaccaa aaacttcc	28
	<210> 9 <211> 454 <212> PRT <213> <i>Solanum tuberosum</i>	
45	<400> 9	
50		

ES 2 791 302 T3

Met Leu Asn Gln Asn Ser His Phe Ile Phe Ile Ile Leu Ala Ile Phe  
 1 5 10 15

Leu Val Leu Pro Leu Ser Leu Leu Ser Lys Asn Val Asn Ala Gln Ile  
 20 25 30

Pro Leu Arg Arg His Leu Leu Ser His Glu Ser Glu His Tyr Ala Val  
 35 40 45

Ile Phe Asp Ala Gly Ser Thr Gly Ser Arg Val His Val Phe Arg Phe  
 50 55 60

Asp Glu Lys Leu Gly Leu Leu Pro Ile Gly Asn Asn Ile Glu Tyr Phe  
 65 70 75 80

Met Ala Thr Glu Pro Gly Leu Ser Ser Tyr Ala Glu Asp Pro Lys Ala  
 85 90 95

Ala Ala Asn Ser Leu Glu Pro Leu Leu Asp Gly Ala Glu Gly Val Val  
 100 105 110

Pro Gln Glu Leu Gln Ser Glu Thr Pro Leu Glu Leu Gly Ala Thr Ala  
 115 120 125

Gly Leu Arg Met Leu Lys Gly Asp Ala Ala Glu Lys Ile Leu Gln Ala  
 130 135 140

Val Arg Asn Leu Val Lys Asn Gln Ser Thr Phe His Ser Lys Asp Gln  
 145 150 155 160

ES 2 791 302 T3

Trp Val Thr Ile Leu Asp Gly Thr Gln Glu Gly Ser Tyr Met Trp Ala  
165 170 175

Ala Ile Asn Tyr Leu Leu Gly Asn Leu Gly Lys Asp Tyr Lys Ser Thr  
180 185 190

Thr Ala Thr Ile Asp Leu Gly Gly Gly Ser Val Gln Met Ala Tyr Ala  
195 200 205

Ile Ser Asn Glu Gln Phe Ala Lys Ala Pro Gln Asn Glu Asp Gly Glu  
210 215 220

Pro Tyr Val Gln Gln Lys His Leu Met Ser Lys Asp Tyr Asn Leu Tyr  
225 230 235 240

Val His Ser Tyr Leu Asn Tyr Gly Gln Leu Ala Gly Arg Ala Glu Ile  
245 250 255

Phe Lys Ala Ser Arg Asn Glu Ser Asn Pro Cys Ala Leu Glu Gly Cys  
260 265 270

Asp Gly Tyr Tyr Ser Tyr Gly Gly Val Asp Tyr Lys Val Lys Ala Pro  
275 280 285

Lys Lys Gly Ser Ser Trp Lys Arg Cys Arg Arg Leu Thr Arg His Ala  
290 295 300

Leu Lys Ile Asn Ala Lys Cys Asn Ile Glu Glu Cys Thr Phe Asn Gly  
305 310 315 320

Val Trp Asn Gly Gly Gly Gly Asp Gly Gln Lys Asn Ile His Ala Ser  
325 330 335

Ser Phe Phe Tyr Asp Ile Gly Ala Gln Val Gly Ile Val Asp Thr Lys  
340 345 350

Phe Pro Ser Ala Leu Ala Lys Pro Ile Gln Tyr Leu Asn Ala Ala Lys  
355 360 365

Val Ala Cys Gln Thr Asn Val Ala Asp Ile Lys Ser Ile Phe Pro Lys  
370 375 380

Thr Gln Asp Arg Asn Ile Pro Tyr Leu Cys Met Asp Leu Ile Tyr Glu  
385 390 395 400

Tyr Thr Leu Leu Val Asp Gly Phe Gly Leu Asn Pro His Lys Glu Ile

ES 2 791 302 T3

405

410

415

Thr Val Ile His Asp Val Gln Tyr Lys Asn Tyr Leu Val Gly Ala Ala  
 420 425 430

Trp Pro Leu Gly Cys Ala Ile Asp Leu Val Ser Ser Thr Thr Asn Lys  
 435 440 445

Ile Arg Val Ala Ser Ser  
 450

<210> 10

<211> 246

5 <212> PRT

<213> *Shigella flexneri*

<400> 10

Met Lys Thr Lys Asn Phe Leu Leu Phe Cys Ile Ala Thr Asn Met Ile  
 1 5 10 15

Phe Ile Pro Ser Ala Asn Ala Leu Lys Ala Glu Gly Phe Leu Thr Gln  
 20 25 30

Gln Thr Ser Pro Asp Ser Leu Ser Ile Leu Pro Pro Pro Pro Ala Glu  
 35 40 45

Asn Ser Val Val Phe Gln Ala Asp Lys Ala His Tyr Glu Phe Gly Arg  
 50 55 60

Ser Leu Arg Asp Ala Asn Arg Val Arg Leu Ala Ser Glu Asp Ala Tyr  
 65 70 75 80

Tyr Glu Asn Phe Gly Leu Ala Phe Ser Asp Ala Tyr Gly Met Asp Ile  
 85 90 95

Ser Arg Glu Asn Thr Pro Ile Leu Tyr Gln Leu Leu Thr Gln Val Leu  
 100 105 110

Gln Asp Ser His Asp Tyr Ala Val Arg Asn Ala Lys Glu Tyr Tyr Lys  
 115 120 125

Arg Val Arg Pro Phe Val Ile Tyr Lys Asp Ala Thr Cys Thr Pro Asp  
 130 135 140

Lys Asp Glu Lys Met Ala Ile Thr Gly Ser Tyr Pro Ser Gly His Ala  
 145 150 155 160

10 Ser Phe Gly Trp Ala Val Ala Leu Ile Leu Ala Glu Ile Asn Pro Gln

ES 2 791 302 T3

165 170 175

Arg Lys Ala Glu Ile Leu Arg Arg Gly Tyr Glu Phe Gly Glu Ser Arg  
180 185 190

Val Ile Cys Gly Ala His Trp Gln Ser Asp Val Glu Ala Gly Arg Leu  
195 200 205

Met Gly Ala Ser Val Val Ala Val Leu His Asn Thr Pro Glu Phe Thr  
210 215 220

Lys Ser Leu Ser Glu Ala Lys Lys Glu Phe Glu Glu Leu Asn Thr Pro  
225 230 235 240

Thr Asn Glu Leu Thr Pro  
245

**REIVINDICACIONES**

1. Método para reducir la cantidad de nucleósido difosfatos y/o nucleósido trifosfatos contaminantes, que comprende las etapas de
  - a. proporcionar una muestra que contiene nucleósido difosfatos y/o nucleósido trifosfatos contaminantes, tales como análogos de ATP y/o ATP incluyendo desoxirribonucleósido trifosfatos;
  - b. reducir la cantidad de los nucleósidos difosfatos y/o nucleósido trifosfatos contaminantes en la muestra con una enzima apirasa, en el que dicha enzima apirasa es una apirasa de *Shigella flexneri*; y
  - c. realizar un análisis de la muestra, en el que dicho análisis comprende un ensayo que podría haber sido afectado por los nucleósidos difosfatos y/o nucleósido trifosfatos contaminantes que no se habían reducido en la etapa b.
2. Método para determinar la cantidad de ATP en una muestra, que comprende las etapas de:
  - a. proporcionar una muestra que contiene análogos de ATP y/o ATP contaminantes incluyendo desoxirribonucleósido trifosfatos;
  - b. reducir la cantidad de análogos de ATP y/o ATP contaminantes en la muestra por degradación con una enzima apirasa;
  - c. hacer que el ATP que va a determinarse esté disponible para la determinación; y
  - d. determinar la cantidad de ATP que va a determinarse en la muestra, en el que la enzima apirasa es una apirasa de *Shigella flexneri*.
3. Método para determinar la cantidad de ATP presente en una primera población de células en una muestra, que comprende las etapas de:
  - a. proporcionar una muestra que contiene análogos de ATP y/o ATP contaminantes incluyendo desoxirribonucleósido trifosfatos;
  - b. reducir la cantidad de análogos de ATP y/o ATP contaminantes en la muestra por degradación con una enzima apirasa;
  - c. liberar el ATP que va a determinarse de la primera población de células; y
  - d. determinar la cantidad de ATP liberado; en el que la enzima apirasa en la etapa (b) es una apirasa de *Shigella flexneri*.
4. Método según la reivindicación 3, en el que la etapa de liberación (b) implica lisis de la primera población de células; la primera población de células comprende células bacterianas; y en el que la muestra es una muestra biológica de un animal o un ser humano.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que la muestra es una muestra de sangre, una muestra de plasma, una muestra de suero, una muestra de orina, una muestra fecal o un frotis de un paciente.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 2-5, en el que al menos una fracción del ATP contaminante está presente en una segunda población de células, y la etapa de reducción (b) está precedida por una etapa de liberación selectiva de ATP de la segunda población de células, en el que la segunda población de células son células huésped de un animal del que se deriva la muestra.
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el método comprende la etapa de añadir un inhibidor de apirasa después de la etapa de reducción.
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-3 ó 7, en el que la muestra es una muestra de medio de cultivo celular, muestra de alimentos, una muestra de bebida, una muestra farmacéutica, una muestra de aguas residuales, una muestra medioambiental tal como un frotis de una superficie o una muestra de agua potable.
9. Método según la reivindicación 1, en el que el método comprende un procedimiento de secuenciación por síntesis, los nucleótidos contaminantes comprenden dNTP en exceso o análogos de los mismos presentes después de un ciclo de secuenciación completado, y el análisis realizado en la muestra es una lectura de secuencia.
10. Método para realizar la pirosecuenciación que comprende las etapas de:
  - a. realizar una reacción de pirosecuenciación que comprende la adición de un nucleósido trifosfato;
  - b. convertir el pirofosfato liberado en la etapa (a) en ATP a través de una reacción enzimática;

- c. determinar la cantidad de ATP formado en la etapa (b);
- d. degradar el nucleósido trifosfato no incorporado de la etapa (a) y el ATP formado en la etapa (b) con una enzima apirasa;
- e. repetir las etapas a-d al menos una vez;

5

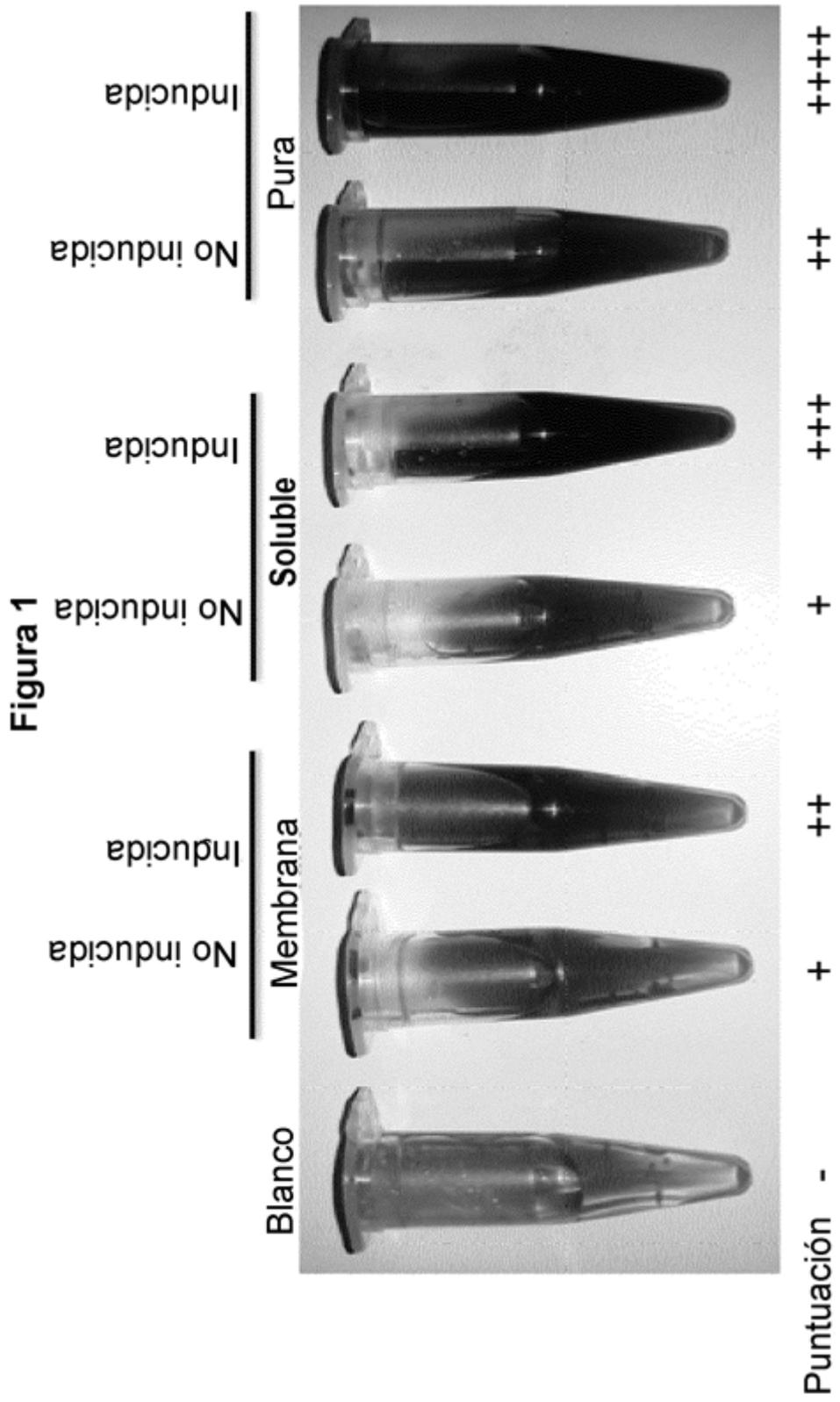
en el que la enzima apirasa es una apirasa de *Shigella flexneri*.

- 11. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la apirasa de *Shigella flexneri* comprende una secuencia de aminoácidos con al menos una identidad de secuencia del 80% con SEQ ID NO: 10.
- 12. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se proporciona apirasa de *Shigella flexneri* en un tampón que tiene un pH en el intervalo de 6-9, y una fuerza iónica de al menos 300 mM.
- 13. Uso de una apirasa de *Shigella flexneri* para degradar nucleósido trifosfatos o nucleósido difosfatos contaminantes en un método analítico.
- 14. Uso según la reivindicación 13, en el que los nucleósidos contaminantes comprenden análogos de ATP y/o ATP contaminantes, y el método analítico comprende un ensayo para medir ATP.
- 15. Uso de una apirasa de *Shigella flexneri* en un ensayo de secuenciación por síntesis, preferiblemente un ensayo de pirosecuenciación.

10

15

20



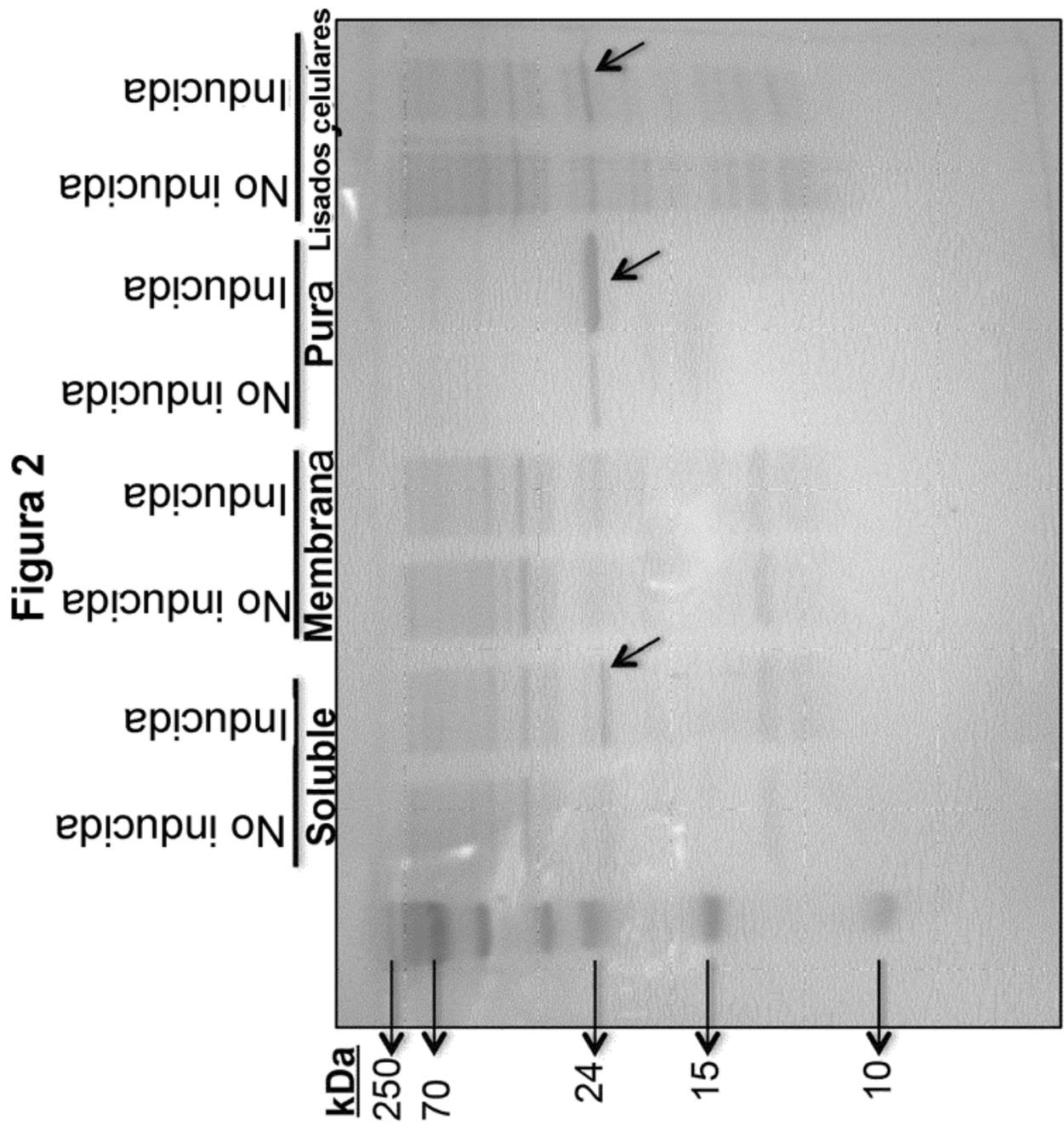


Figura 3A

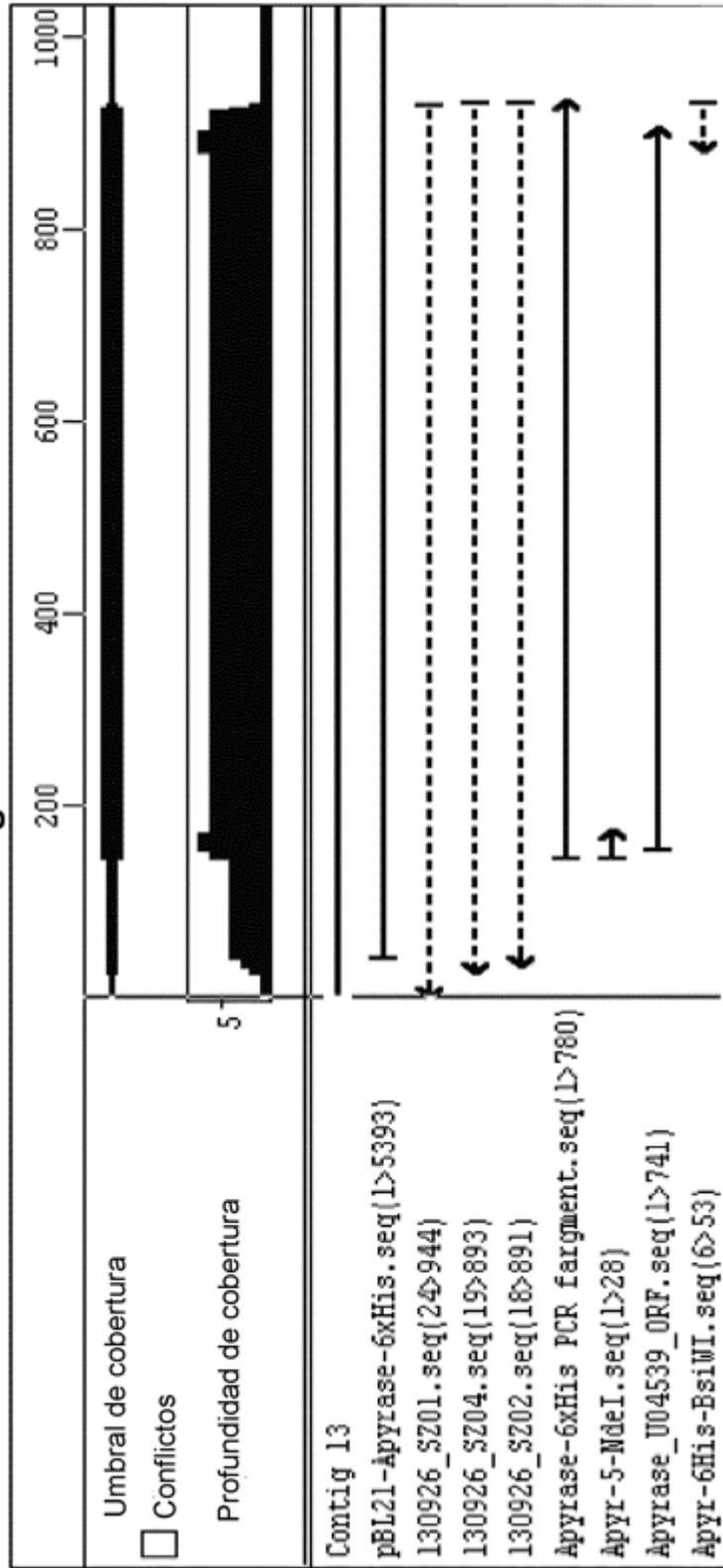




Figura 4

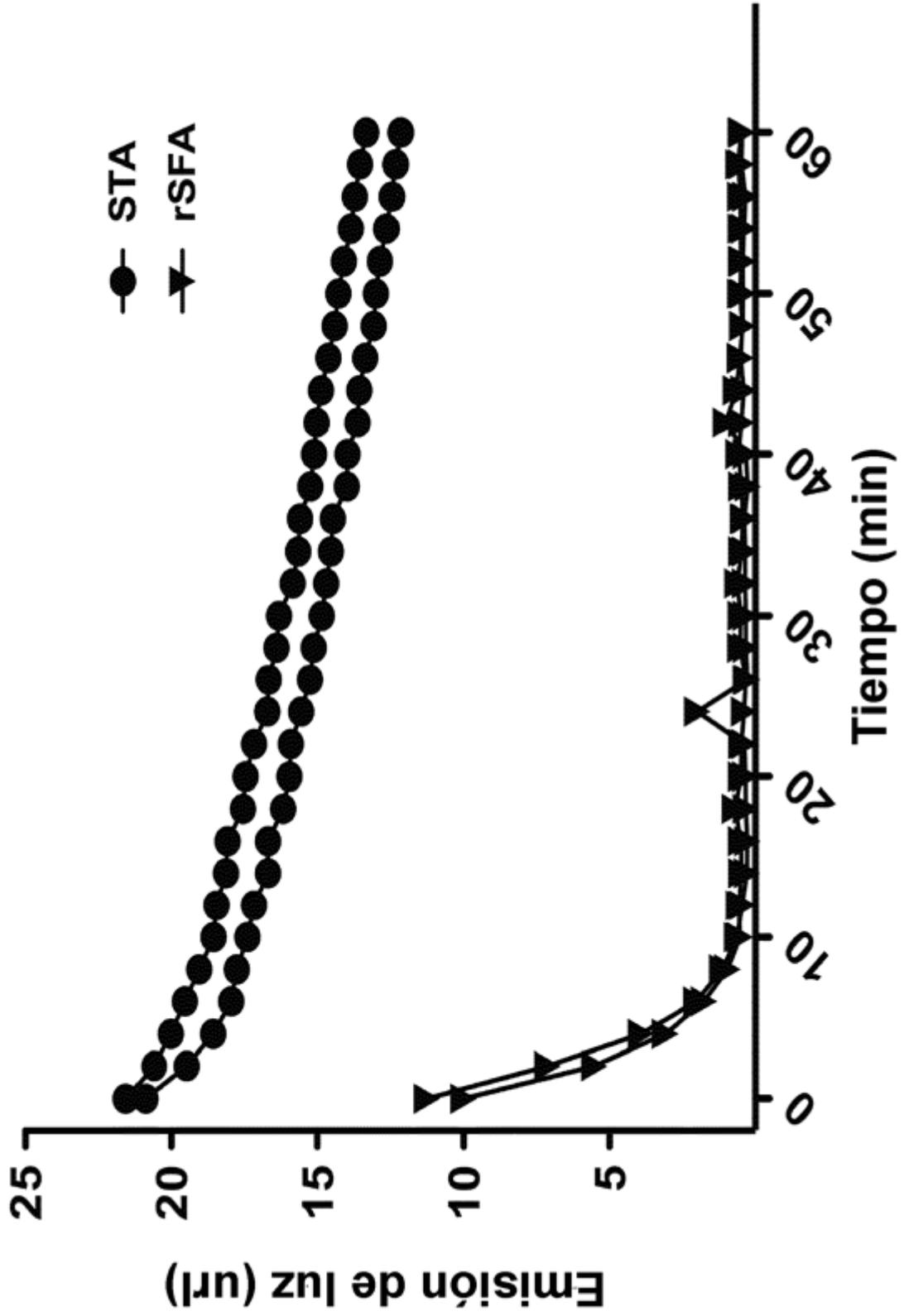


Figura 5

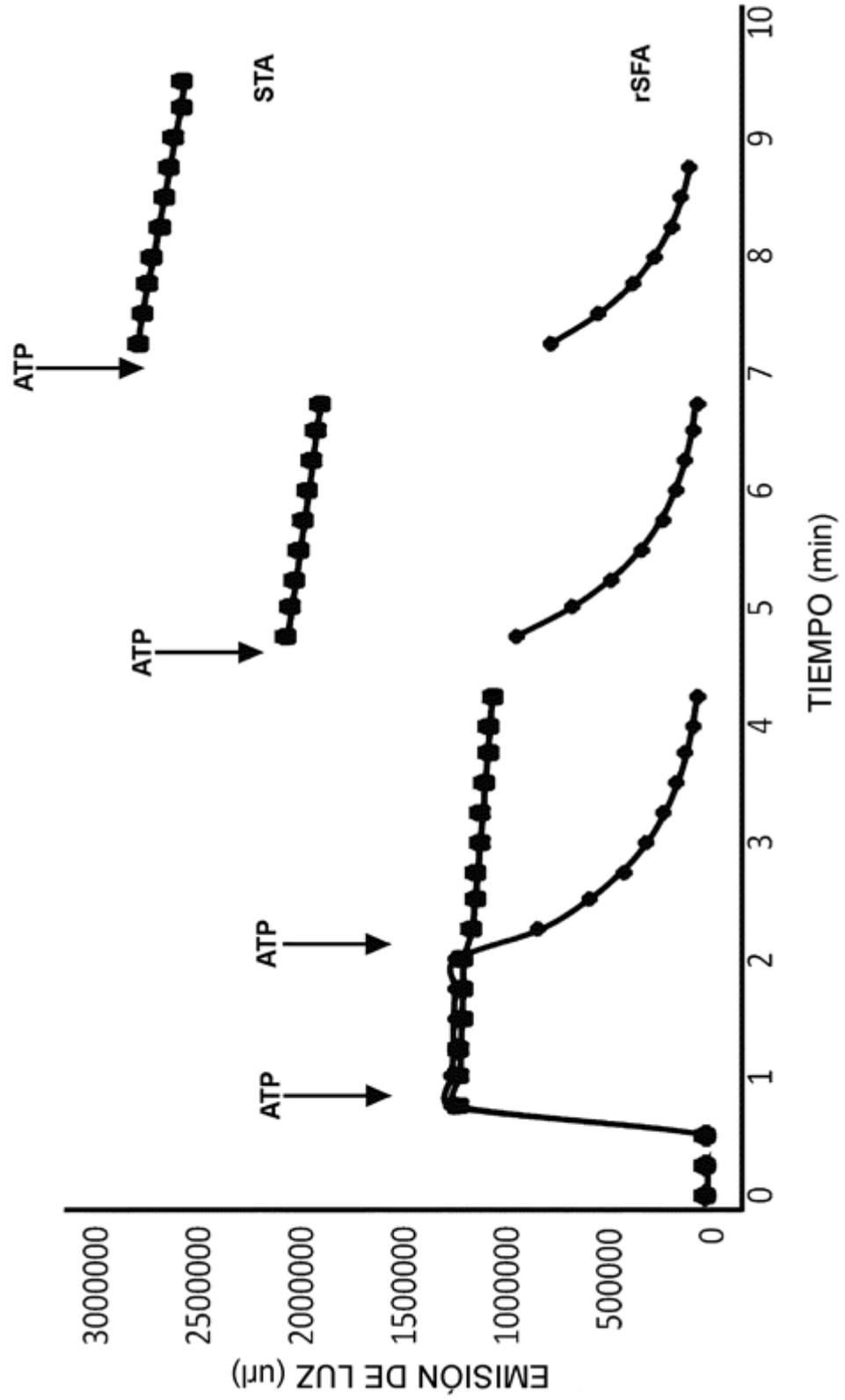


Figura 6A

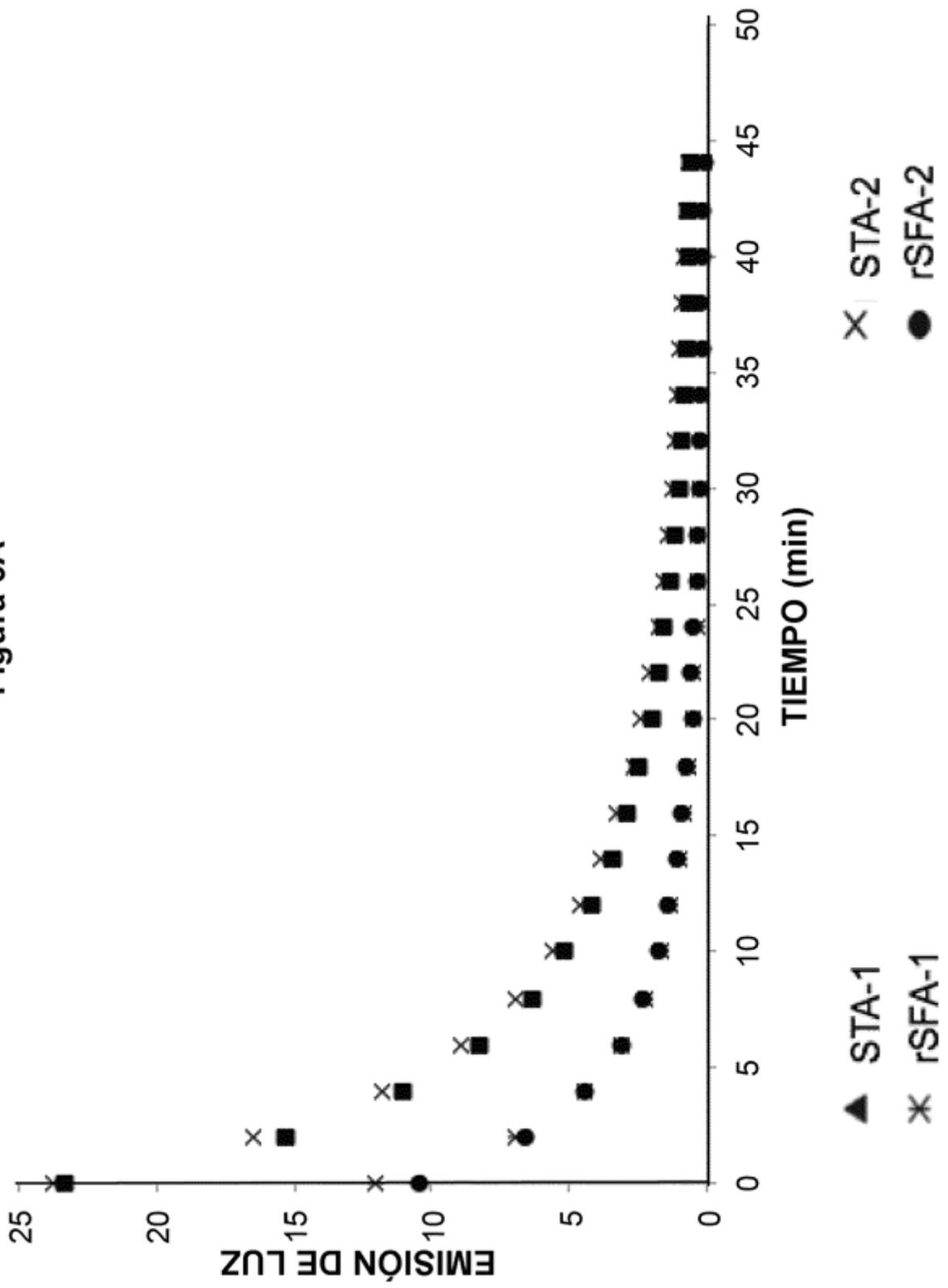


Figura 6B

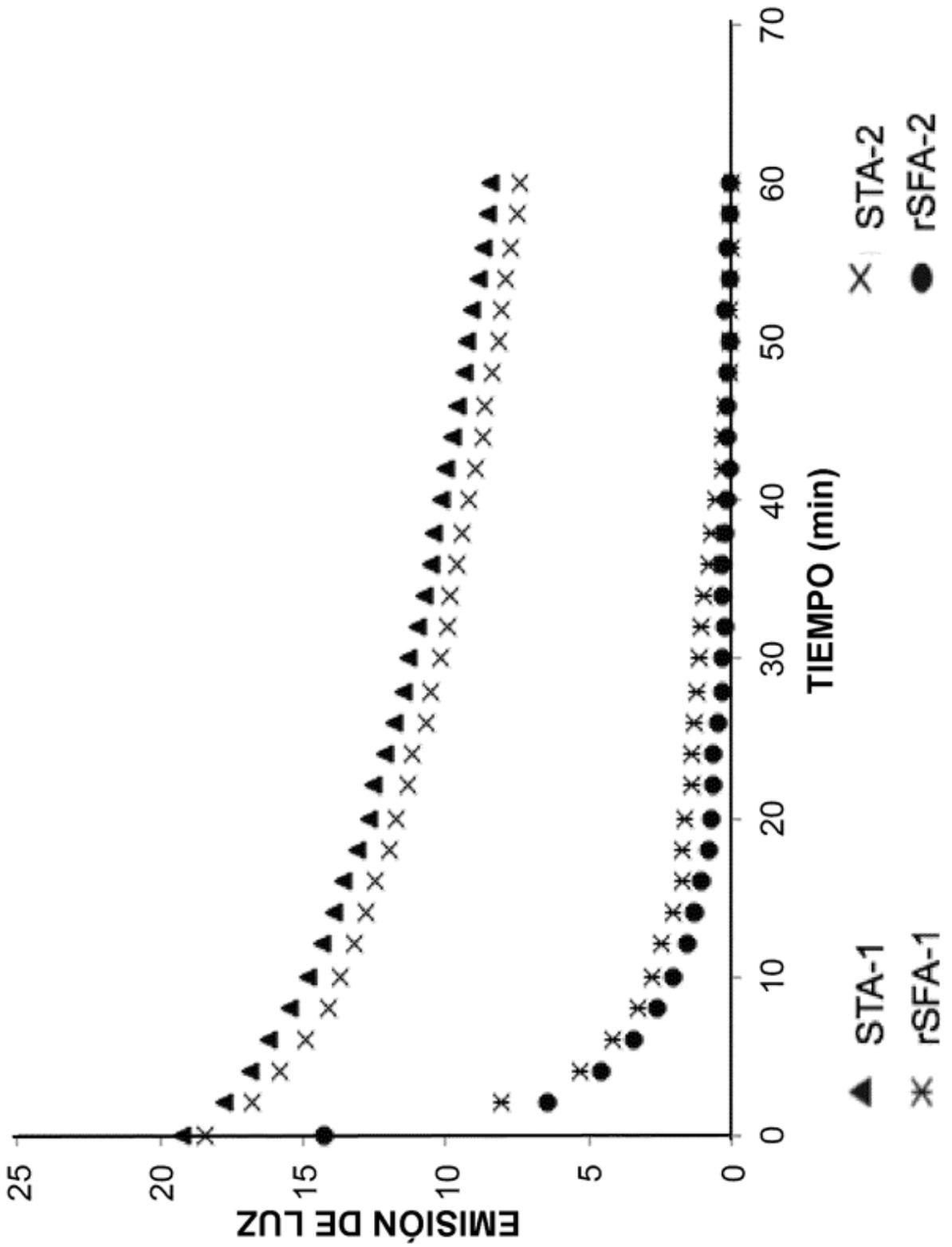


Figura 7

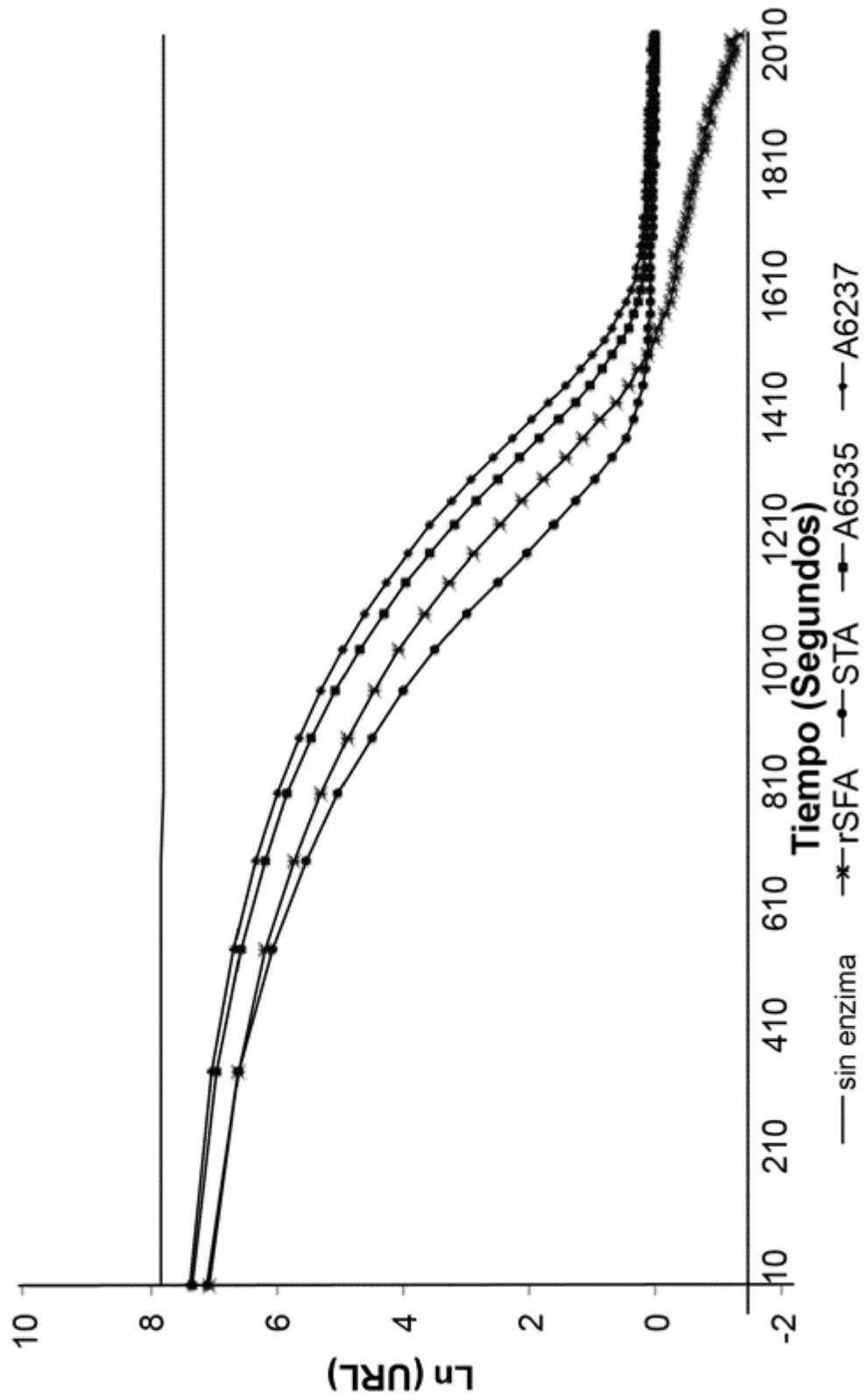


Figura 8

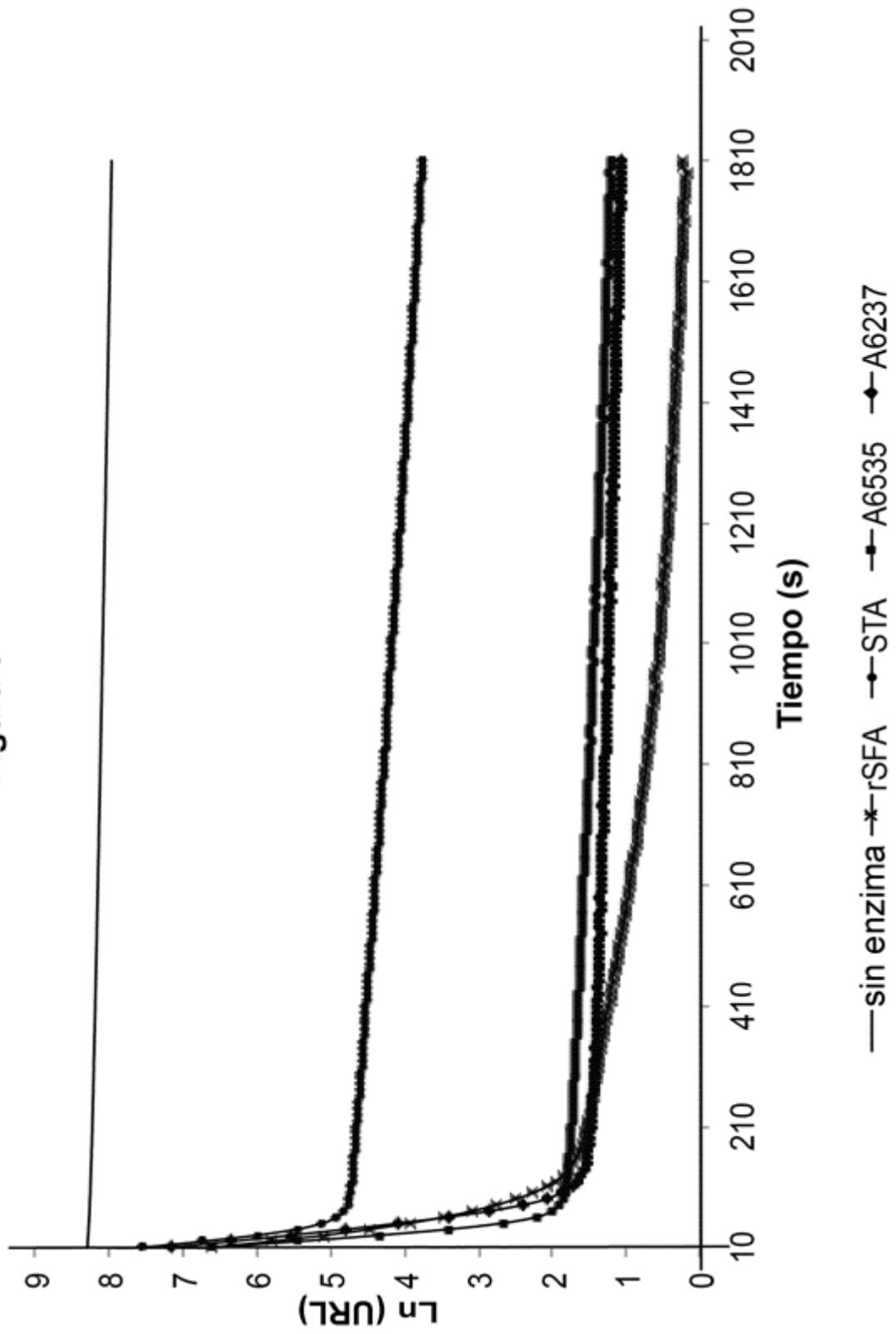


Figura 9

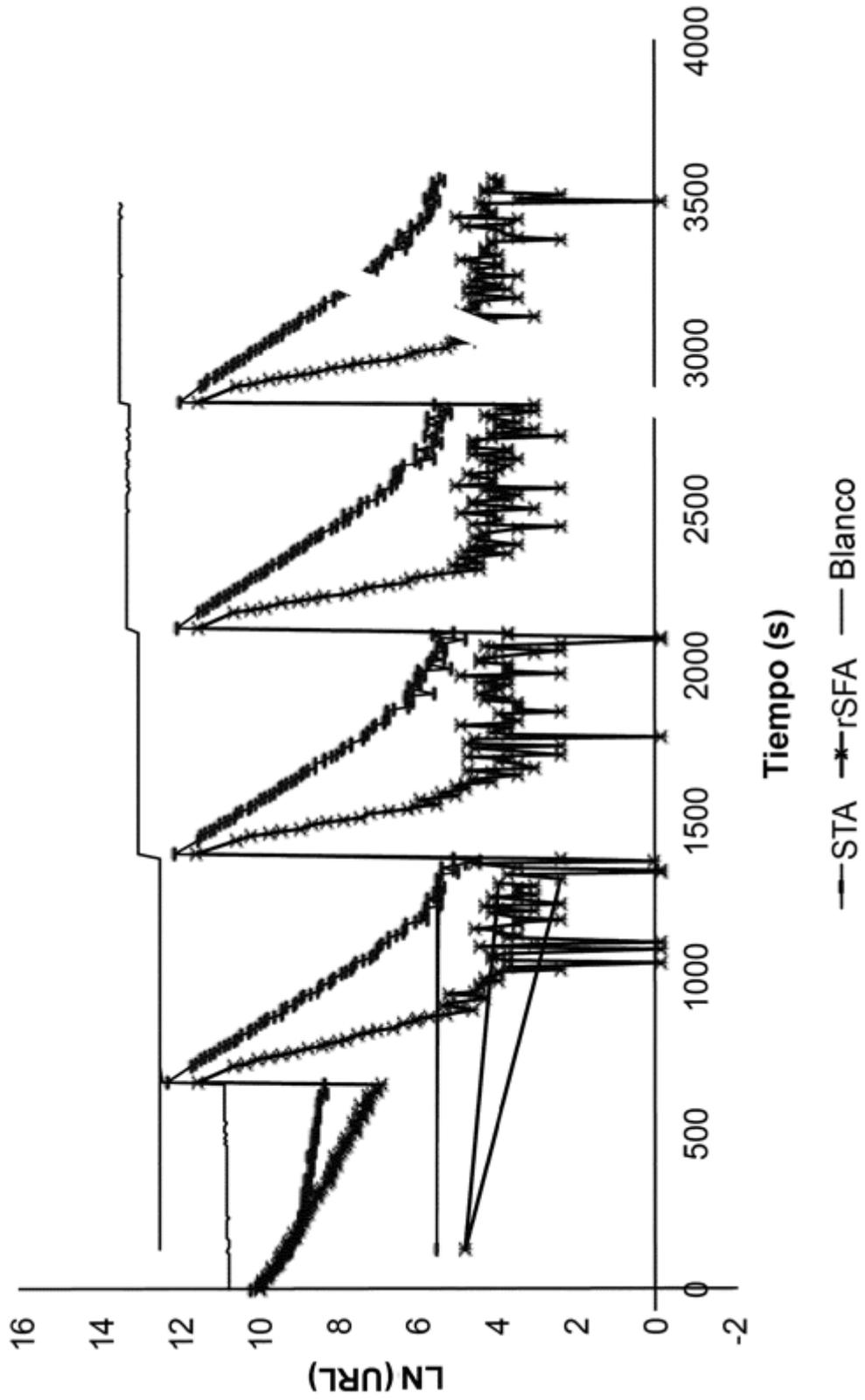


Figura 10

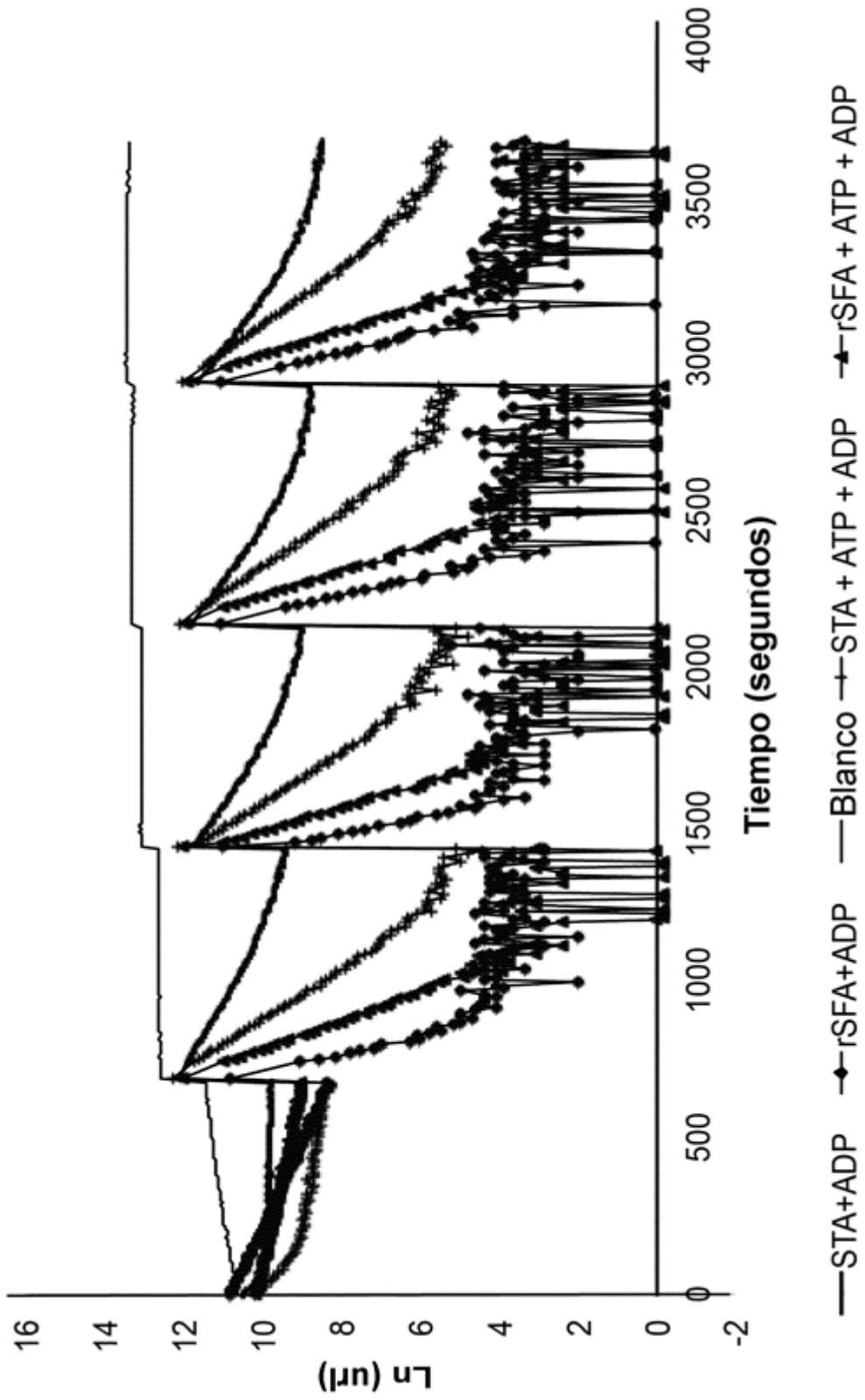
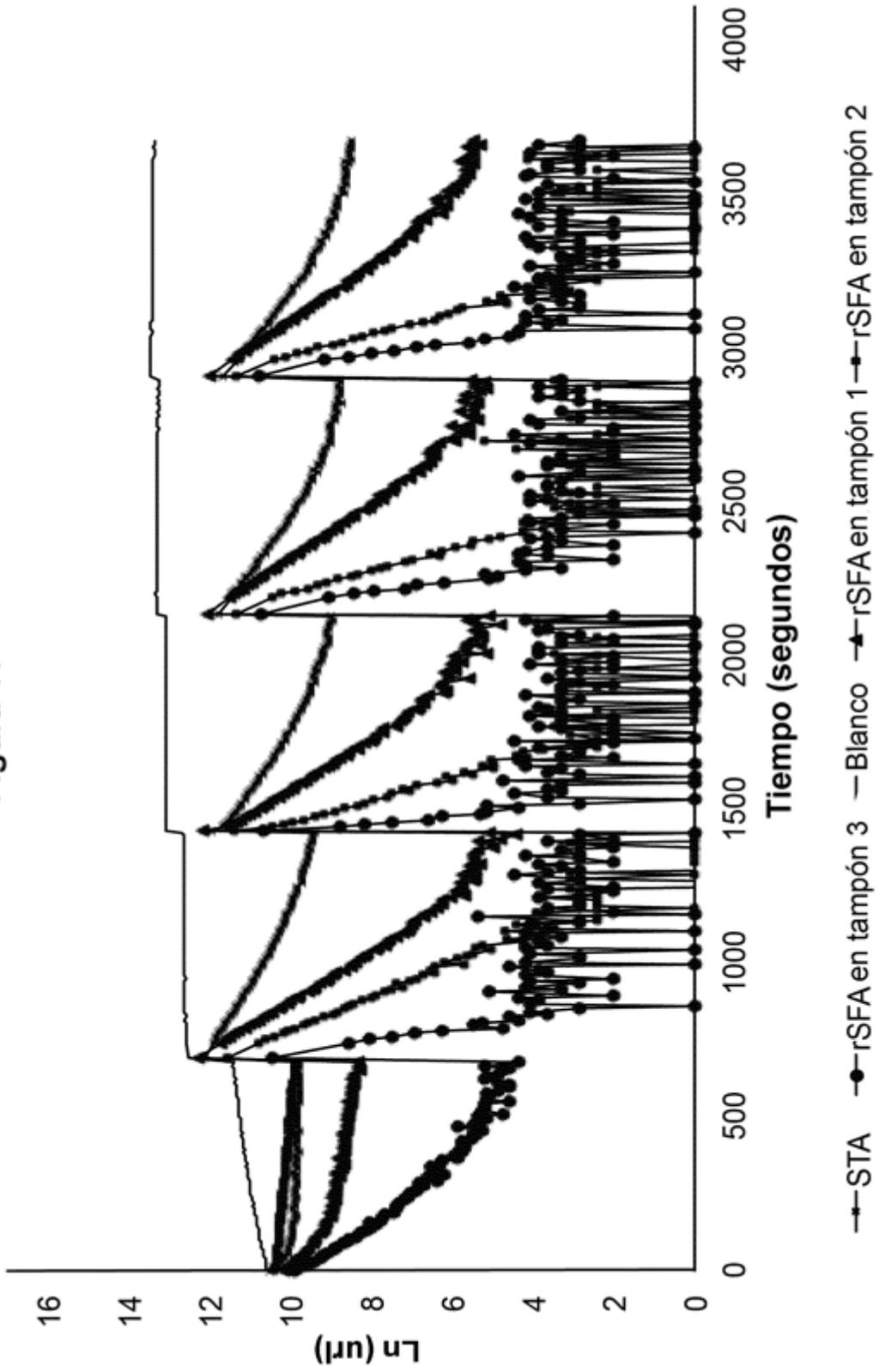


Figura 11



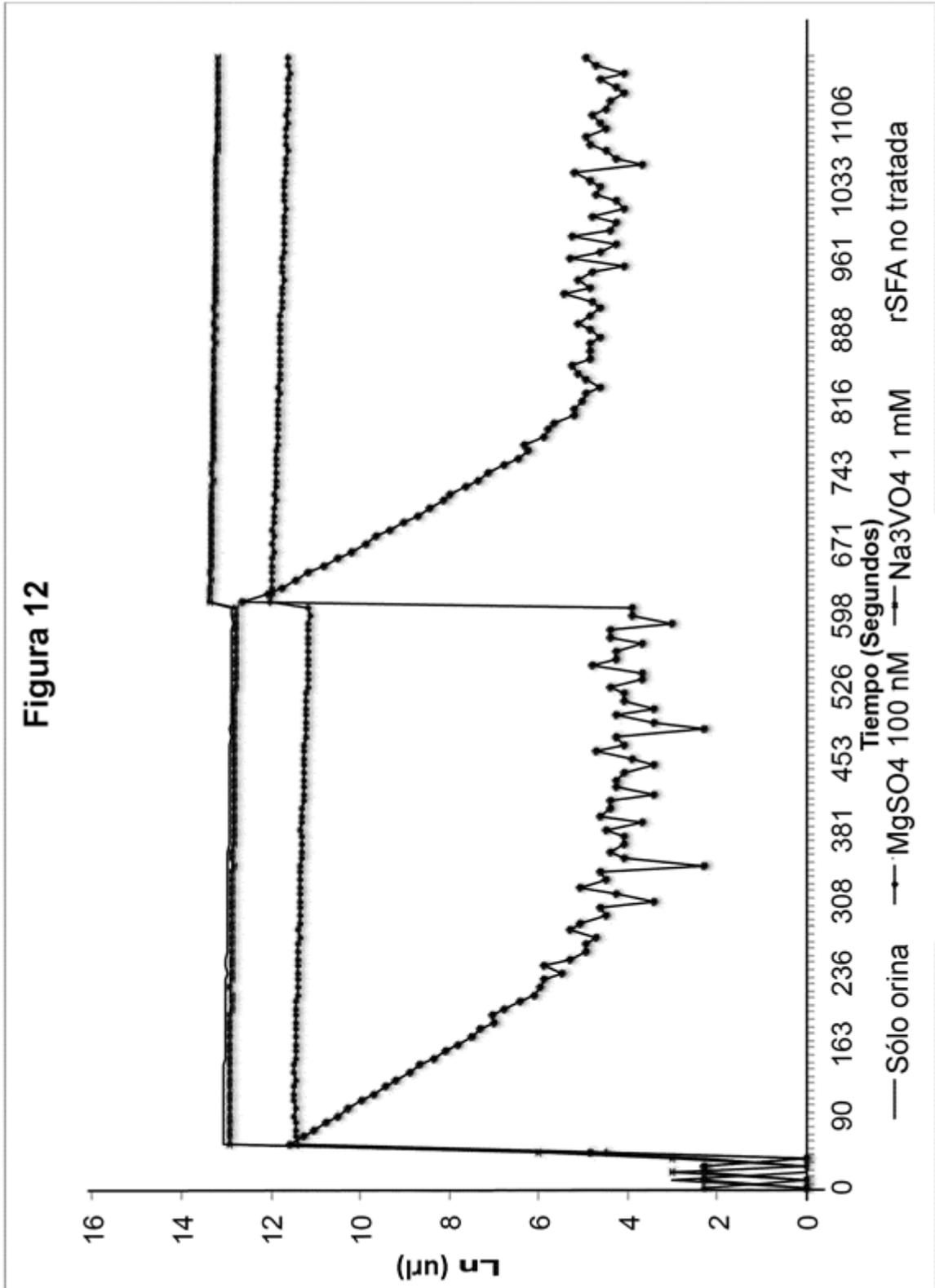


Figura 13A

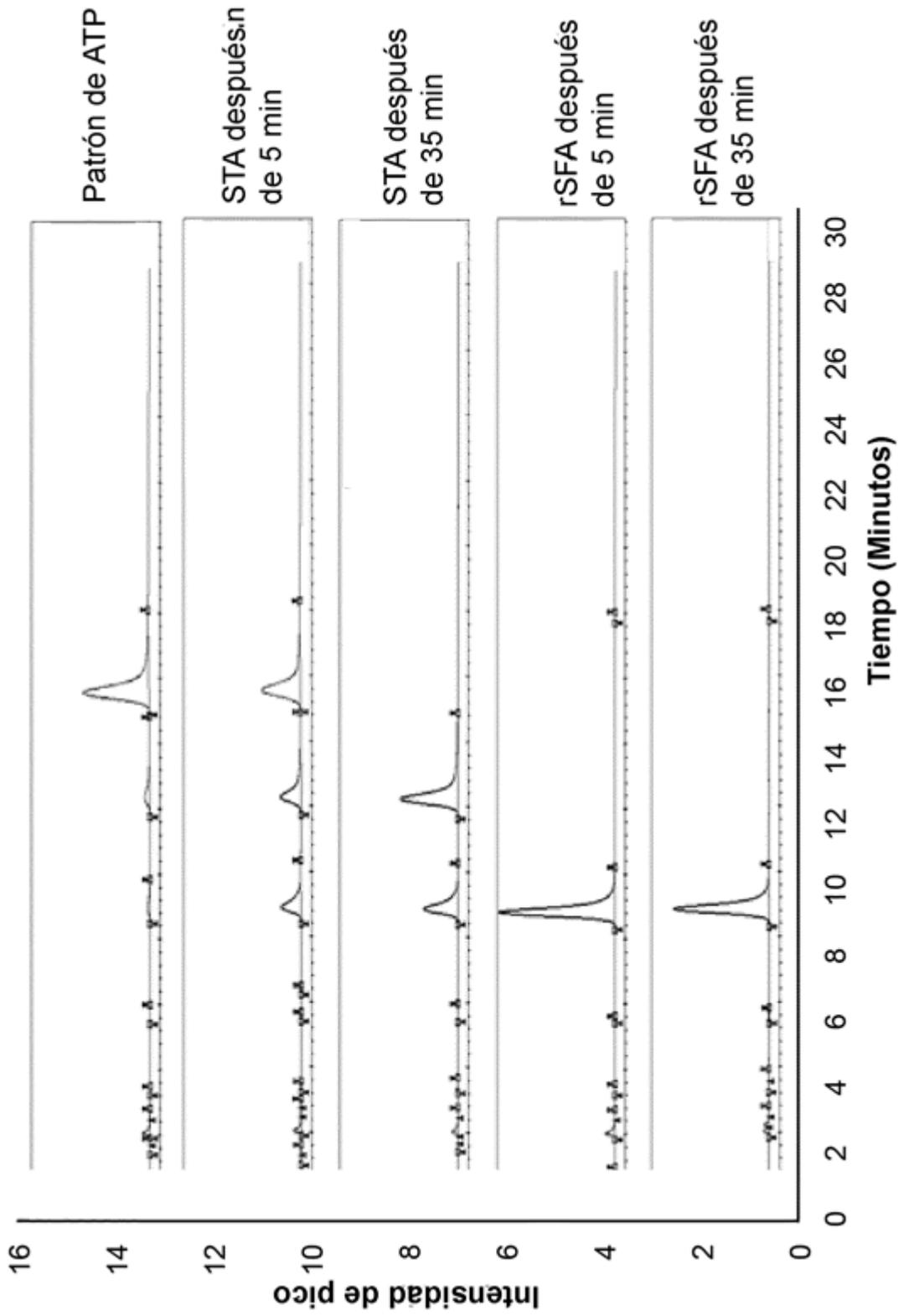


Figura 13B

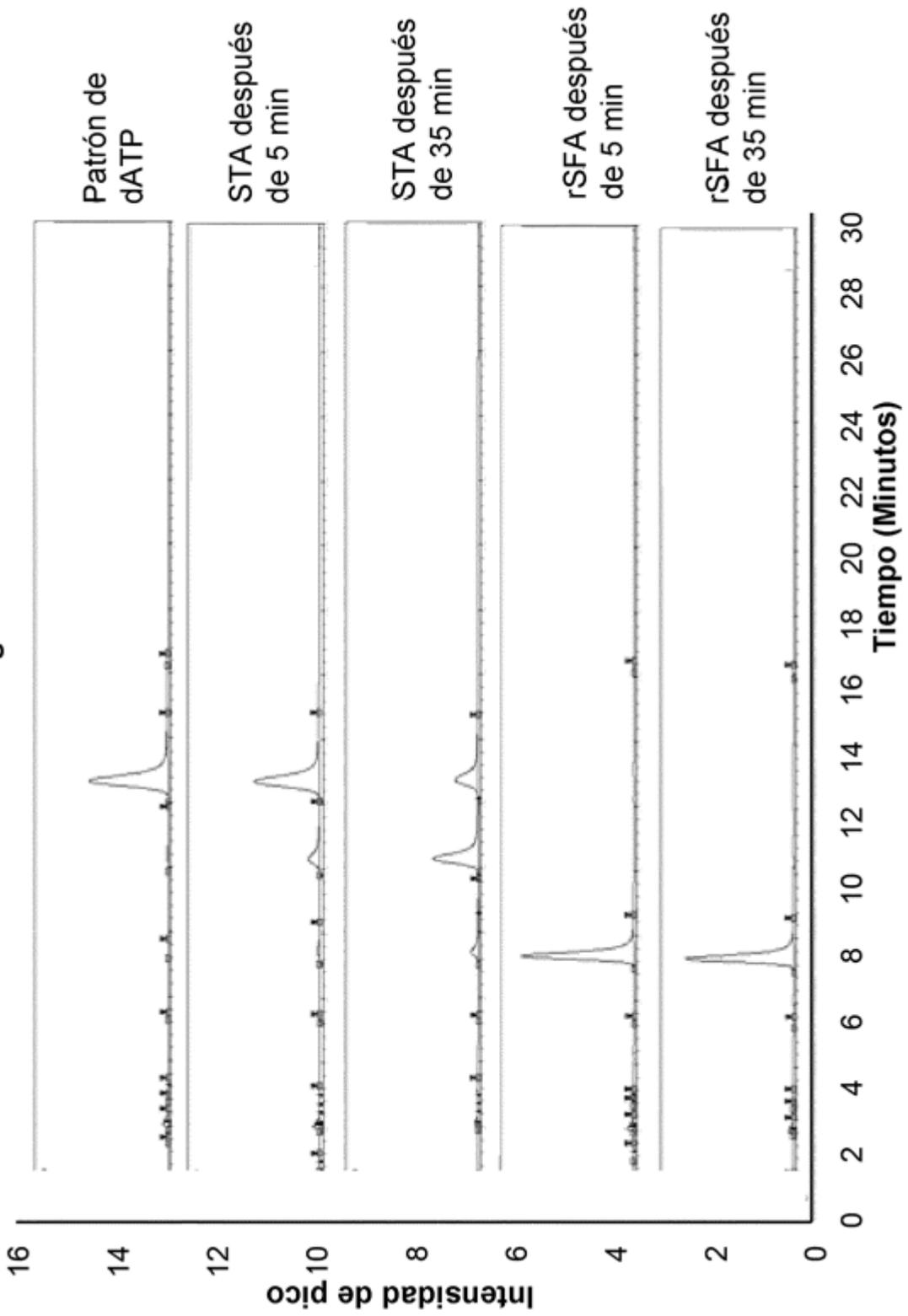


Figura 13C

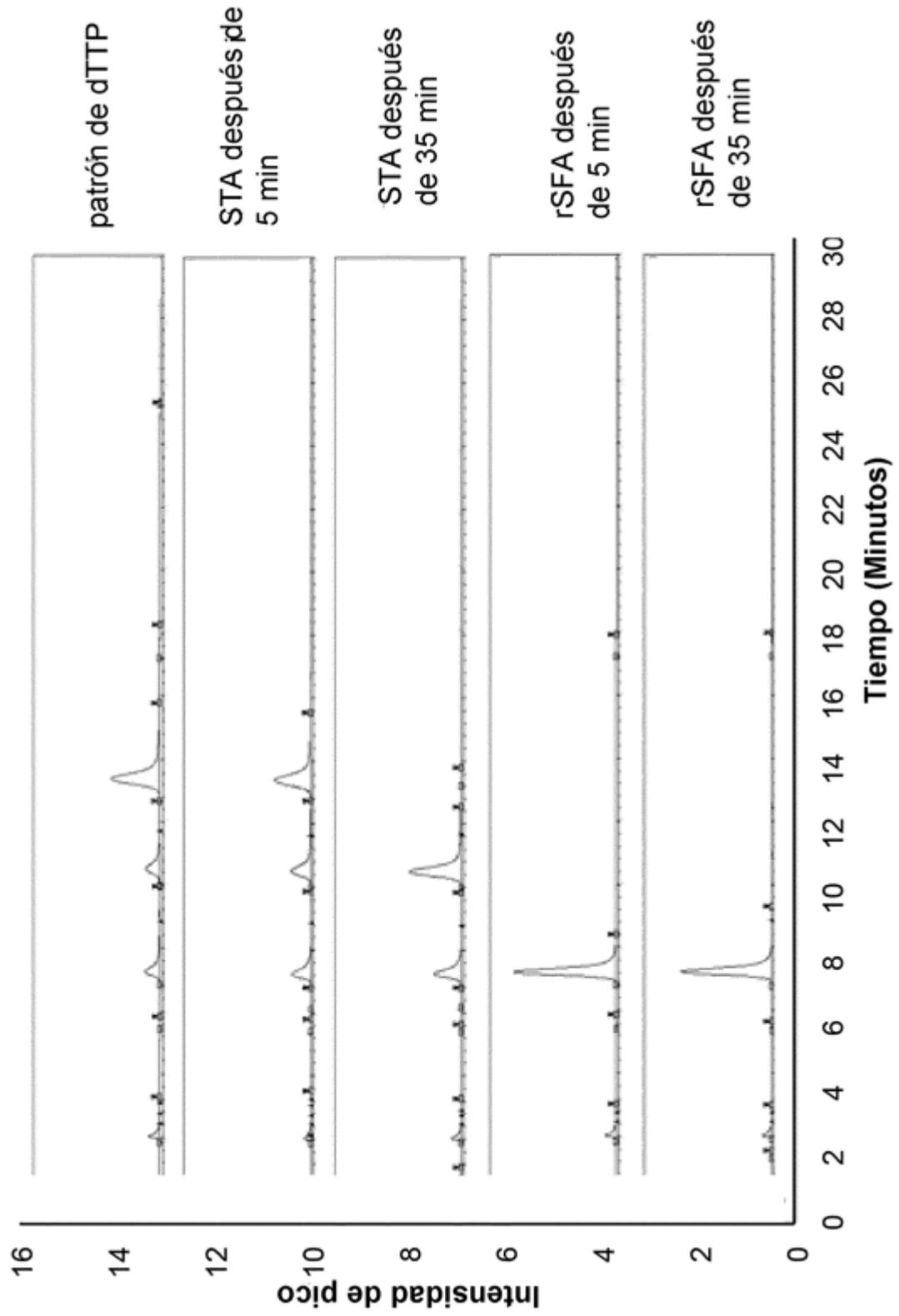


Figura 13D

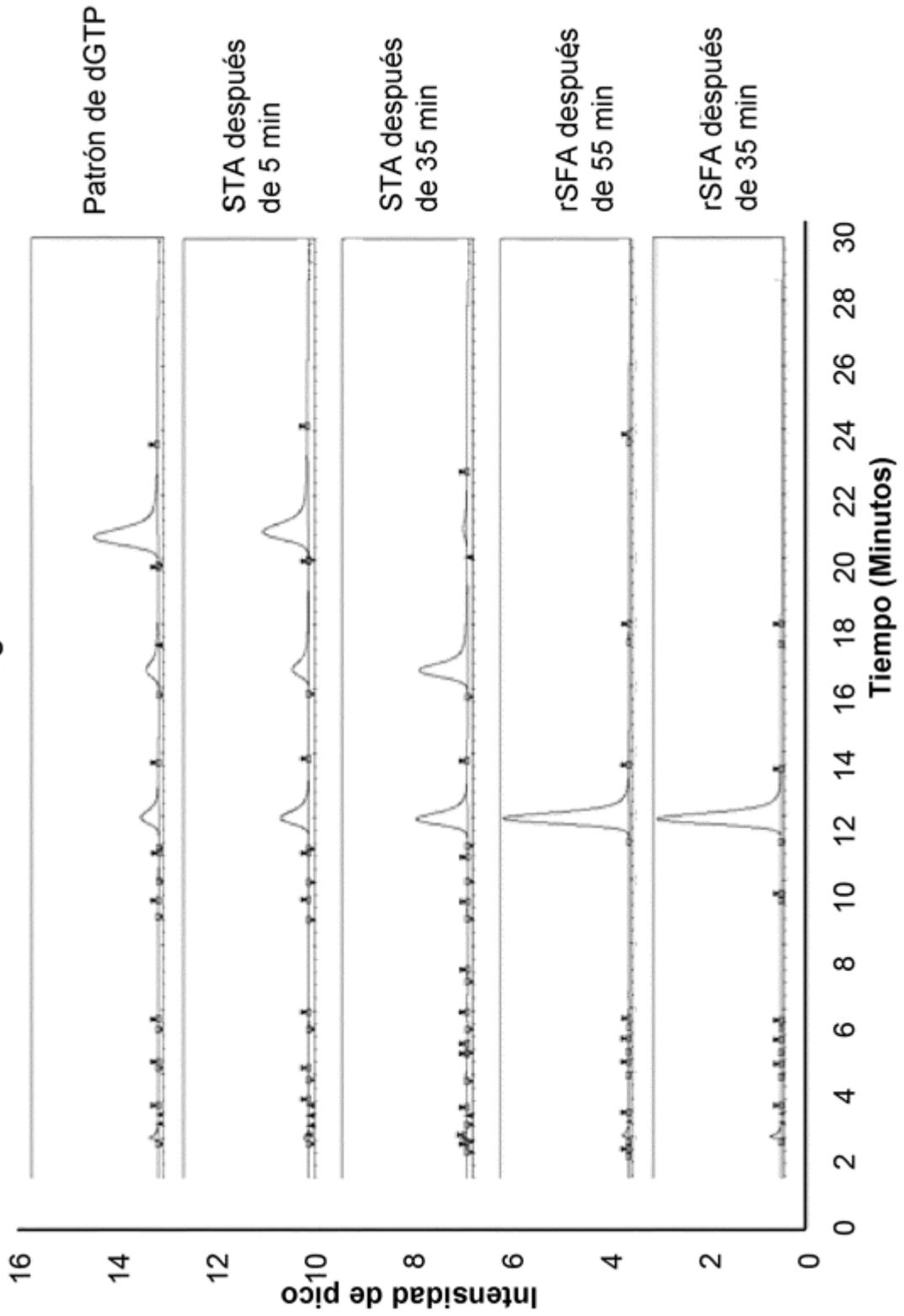


Figura 13E

