



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e Comércio Exterior
Instituto Nacional de Propriedade Industrial

(11) PI 0213936-7 B1



(22) Data de Depósito: 06/11/2002

(45) Data da Concessão: 25/08/2015
(RPI 2329)

(54) Título: Métodos de ensaio de ciclização enzimática para homocisteína e cistationina e de teste de amostras contendo homocisteína, bem como kit de teste para quantificar homocisteína e ensaios de avaliação da quantidade de homocisteína

(51) Int.Cl.: C12Q1/32; C12Q1/26; C12Q1/00; G01N33/53

(30) Prioridade Unionista: 06/11/2001 US 10/012,762

(73) Titular(es): AXIS-SHIELD DIAGNOSTICS LIMITED, Catch, INC.

(72) Inventor(es): Doreen Forest, Glenn Kawasaki, Heather Kay Webb, Jeffrey Owens, Mark Legaz, Raymond Liedtke, Sobomabo Lawson

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"MÉTODOS DE ENSAIO DE CICLIZAÇÃO ENZIMÁTICA PARA HOMOCISTEÍNA E CISTATIONINA E DE TESTE DE AMOSTRAS CONTENDO HOMOCISTEÍNA, BEM COMO KIT DE TESTE PARA QUANTIFICAR HOMOCISTEÍNA E ENSAIOS DE AVALIAÇÃO DA QUANTIDADE DE HOMOCISTEÍNA".**

5 PEDIDOS RELACIONADOS

Este pedido é um pedido de continuação-em-parte do Pedido de Patente U.S. Nº de Série 09/704.036 depositado em 1 de novembro de 2000, o qual reivindica benefício dos Pedidos de Patente Provisórios Nº de Série 60/163.126 depositado em 2 de novembro de 1999 e Nº de Série 60/203.349 depositado em 10 de maio de 2000, cujos ensinamentos de cada um desses pedidos anteriores são aqui incorporados a título de referência.

LISTAGEM DE SEQÜÊNCIA

Uma listagem de seqüência contendo 21 seqüências na forma de um arquivo ASCII legível por computador em conexão com a presente invenção é incorporada aqui a título de referência e anexada a ela como dois (2) discos compactos de acordo com 37 CFR 1.821(c) e sua cópia idêntica de acordo com 37 CFR 1.821(e) e uma (1) cópia idêntica dela de acordo com 37 CFR 1.52(e).

20 ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Altos níveis de homocisteína no plasma humano estão relacionados a altos riscos de doença cardíaca coronária, derrame, arteriosclerose e outras doenças. Como resultado, é desejável avaliar a população geral quanto a quantidades elevadas deste aminoácido. Para fazer teste em larga escala para homocisteína praticáveis, ensaios novos e menos onerosos precisam ser desenvolvidos.

A homocisteína no plasma é rotineiramente medida através de cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) e cromatografia de gás/espectrometria de massa (GC/MS) de um custo de mais de \$ 100 por ensaio, tornando esses métodos de separação física muito onerosos para uma população de estudo grande. Por exemplo, amostras de urina ou sangue podem ser preparadas para cromatografia de aminoácido, e a L-homocisteína medi-

separação de e detecção de HPLC do derivado de L-homocisteína de vários outros compostos contendo enxofre. No entanto, tais métodos tipicamente levam muito tempo, são onerosos e não estão prontamente disponíveis para muitos laboratórios.

5 Imunoensaios indiretos para homocisteína foram também desenvolvidos, no entanto, esses métodos de anticorpo são ainda relativamente onerosos por volta de \$24 dólares por teste. Um imunoensaio indireto particular enzimaticamente converte homocisteína em adenosil homocisteína e a quantidade de adenosil homocisteína é determinada através de um ELISA
10 competitivo (imunoensaio ligado à enzima), usando um anticorpo antiadenosil homocisteína (por exemplo, vide Patente U.S. 5.827.645, cujo conteúdo é aqui incorporado a título de referência).

 Ensaio de enzima indiretos foram desenvolvidos para a quantificação de L-homocisteína. Por exemplo, a enzima S-adenosil-homocisteína
15 hidrolase e a adenosina são adicionadas a uma amostra de teste. A concentração resultante, ou mudança na concentração, de adenosina na mistura de reação é usada como um indicador para a concentração inicial de homocisteína na amostra.

 Ensaio de enzima diretos foram também descritos para medição de homocisteína. Tipicamente, esses protocolos irreversivelmente convertem homocisteína em outros compostos que são quantificáveis. Por exemplo, a enzima homocisteína desidratase foi usada para remover o grupo sulfidril da homocisteína. A concentração da porção sulfidril removida é então medida. Um inconveniente principal com esse e outros ensaios de en-
20 zima para homocisteína é que as enzimas empregadas reagem com outros aminoácidos contendo enxofre e compostos relacionados à homocisteína, levando a uma base alta e inconsistente e medições de homocisteína do plasma que são imprecisas.

 Ensaio de ciclização enzimática (ou enzimica) foram descritos
30 para um número muito pequeno de analitos. Em um ensaio de ciclização enzimática, duas ou mais atividades de enzima são usadas com substrato de reciclagem e não convertem irreversivelmente o composto medido. Ao

invés disso, o "composto" é usado cataliticamente para controlar a taxa de conversão do composto quantificado no ensaio. Como resultado, o analito de interesse permanece em uma concentração de estado fixo que é baixa o suficiente para criar uma pseudo taxa de primeira ordem da reação. A concentração de estado fixo do analito é então linearmente relacionada à taxa do ensaio geral. Através de medição das taxas de reação, a quantidade do analisado é facilmente determinada. Ensaio de ciclização enzimática são algumas vezes chamados ensaios de "amplificação", porque os métodos tipicamente aumentam a sensibilidade de medição para um analito em 100 a 1000 vezes. A amplificação na medida é um resultado direto de não-redução da concentração de estado fixo do composto. Nenhum ensaio de ciclização enzimática foi descrito para medição de homocisteína.

A presente invenção provê um ensaio de ciclização enzimática para homocisteína e/ou cistationina que é mais econômico e provê um resultado de amostra maior do que os ensaios de diagnóstico atualmente disponíveis. Ainda, a invenção provê métodos e vetores para a produção recombinante de enzimas que podem ser usadas na produção de reagentes de ensaio e kits de teste para avaliação da quantidade de homocisteína e cistationina na amostra.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção provê um método de ensaio de ciclização enzimática para avaliação da quantidade de homocisteína e/ou cistationina em uma solução. O ensaio leva vantagem da reação de homocisteína e L-serina para formar cistationina através da enzima cistationina β -sintase (CBS), ou um seu derivado, e a conversão enzimática pela cistationina β -liase (CBL) de cistationina em homocisteína, piruvato e amônia. O ensaio provê uma concentração de estado fixo da homocisteína e/ou cistationina que é linearmente relacionada à taxa da reação geral. A quantidade de homocisteína e/ou cistationina determinada em uma amostra é baseada na quantidade de piruvato e/ou amônia que é formada ou a quantidade de serina removida da mistura de reação. Soluções que podem ser testadas usando o ensaio da presente invenção podem incluir amostras laboratoriais de

sangue, de soro, plasma, urina e outras amostras biológicas. Adicionalmente, qualquer outra amostra líquida pode ser testada.

Em uma modalidade, a presente invenção provê um método para avaliação da quantidade de homocisteína e/ou cistationina em uma solução compreendendo a etapa de:

(a) contato da solução contendo homocisteína e/ou cistationina (ou antes e/ou após realização de uma etapa de redução dissulfeto) para formar uma mistura de reação, com CBS, ou um seu derivado, L-serina e CBL, ou um seu derivado, por um período de tempo suficiente para catalisar a conversão cíclica de homocisteína em cistationina, e reconversão de cistationina em homocisteína com a produção de piruvato e amônia;

(b) determinação da quantidade de piruvato e/ou amônia presente na mistura de reação; e

(c) avaliação da quantidade de homocisteína e/ou cistationina presente na solução com base na quantidade de piruvato e/ou amônia formada.

Mais particularmente, o método provê a avaliação da quantidade de homocisteína através da adição de aminoácido L-serina econômico. A quantidade de piruvato presente na mistura de reação pode ser medida de várias maneiras. Em uma modalidade particular da presente invenção lactato desidrogenase (LDH), ou um seu derivado, e NADH (co-fator de nicotinamida reduzida), ou um seu derivado, estão presentes na mistura de reação. LDH na presença de NADH converte piruvato em lactato com a oxidação de NADH em NAD⁺ (co-fator de nicotinamida oxidada).

A oxidação de NADH em NAD⁺ pode ser medida através de vários métodos conhecidos na técnica incluindo monitoramento da mistura de reação a 340 nm. Produção de NAD⁺ pode ser também monitorada através da oxidação de um corante para produzir uma mudança da cor observável. Corantes preferidos para uso na presente invenção incluem, mas não estão limitados a, 5,5'-ditiobis(ácido 2-nitrobenzóico), 2,6-diclorofenilindolifenol, compostos tetrazólio, metossulfato de fenazina, metil viologen, ou derivados de qualquer um desses corantes. A quantidade de homocisteína e/ou cistati-

onina presente na solução é baseada na intensidade da cor observada comparada com uma curva padrão construída para amostras de concentração conhecida de analito.

Em uma modalidade alternativa, piruvato oxidase, com peroxidase de rábano silvestre, na presença de peróxido de hidrogênio e um cromógeno são usadas para detectar a quantidade de piruvato presente na amostra. N-etil-N-(2-hidróxi-3-sulfopropil) m-toluidina de sódio (TOOS) e outros derivados de N-etil-N-(2-hidróxi-3-sulfopropil)-anilina são cromógenos preferidos para esta reação colorimétrica. Como acima, a quantidade de homocisteína e/ou cistationina presente na amostra é baseada na intensidade da cor observada comparada com uma curva padrão construída para amostras de concentrações conhecidas de analito.

A quantidade de homocisteína e/ou cistationina presente em uma solução pode ser também medida com base na quantidade de amônia presente na mistura de reação. Métodos para determinação da concentração de amônia em uma solução são em número grande. Em uma modalidade particular da presente invenção, a quantidade de amônia é medida usando um sensor de amônia padrão comumente disponível.

Em uma outra modalidade, a presente invenção refere-se a um método para avaliação da quantidade de homocisteína e/ou cistationina em uma amostra compreendendo as etapas de contato da solução com um agente de redução por um período de tempo suficiente para reduzir substancialmente toda homocisteína e outros dissulfetos que estiverem presentes na solução para homocisteína. Tratamento com um agente de redução pode também agir para liberar homocisteína que está ligada a uma proteína e/ou outras moléculas presentes em uma solução através de uma ligação dissulfeto. Após redução a solução é então contatada com CBS, ou um seu derivado, L-serina, e CBL, ou um seu derivado, por um período de tempo suficiente para catalisar a conversão cíclica de homocisteína em cistationina e a conversão de cistationina em homocisteína com a produção de piruvato e amônia. Para avaliar a quantidades de homocisteína e/ou cistationina presente na solução a quantidade de piruvato e/ou amônia presente na mistura

de reação pode ser determinada conforme acima descrito. Os agentes de redução preferidos para uso na presente invenção incluem sais de boro-
reto e agentes de redução de tiol. Agentes de redução de tiol típicos apro-
priados para uso na presente modalidade incluem ditioeritritol (DTE), ditio-
5 treitol (DTT), β -mercaptoetanol (β ME), cloridrato de tris-(carboxiletil)fosfina
(TCEP) ou ácido tioacético, ou quaisquer derivados deles, e similar.

Em ainda uma outra modalidade para avaliação da quantidade
de homocisteína e/ou cistationina presente em uma solução, a solução pode
ser pré-tratada com cistationina γ -liase (CGL), ou um seu derivado, por um
10 período de tempo suficiente para remover qualquer cistationina da mistura
de reação através da conversão da cistationina em α -cetoglutarato. Seguin-
do a remoção de cistationina a cistationina γ -liase é removida da mistura de
reação ou destruída. Em uma modalidade típica, a cistationina γ -liase é des-
truída através de aquecimento da solução por um período de tempo sufici-
15 ente para remover substancialmente sua atividade enzimática. A cistationina
 γ -liase pode ser também imobilizada em um substrato insolúvel ou superfí-
cie, tal como, por exemplo, uma micropartícula ou conta, que pode ser facil-
mente removida.

Em ainda uma outra modalidade da presente invenção é provido
20 um método para avaliação da quantidade de homocisteína e/ou cistationina
presente em uma solução compreendendo a reação da solução com L-
serina e CBS, ou um seu derivado, e CBL, ou um seu derivado, que foram
imobilizados em uma superfície sólida. A superfície sólida pode ser, por
exemplo, papel, filtro de papel, náilon, vidro, cerâmica, sílica, alumina, terra
25 diatomácea, celulose, polimetacrilato, polipropileno, poliestireno, polietileno,
cloreto de polivinila e seus derivados. A superfície sólida pode ser as laterais
e o fundo do recipiente de teste ou pode ser um material adicionado ao reci-
piente de teste. Em uma modalidade preferida, a superfície sólida compre-
ende uma conta que é adicionada ao recipiente de teste.

30 A CBS, ou seu derivado, CBL, ou seu derivado, e cistationina γ -
liase, ou seu derivado, úteis na presente invenção podem ser obtidas como
um extrato bruto de uma célula. Em uma modalidade da presente invenção,

a cistationina β -sintase (CBS), ou seu derivado, cistationina β -liase CBL e/ou cistationina γ -liase (CGL) são purificadas de células humanas, de levedura ou bacterianas. Em uma modalidade preferida particular da presente invenção, os genes que codificam as enzimas são isolados ou sintetizados e são

5 expressos como uma proteína recombinante em uma célula hospedeira. É particularmente preferido que uma seqüência de DNA que codifica um marcador de afinidade seja adicionada ao constructo do gene para auxiliar na purificação e/ou detecção das enzimas recombinantemente produzidas. Métodos recombinantes podem ser também usados para prover proteínas

10 de fusão que compreendem as atividades enzimáticas de CBS e CBL em uma proteína única. Um marcador de afinidade pode ser incluído como parte do constructo da proteína de fusão para auxiliar na purificação da proteína de fusão.

A presente invenção também provê um método para avaliação

15 da quantidade de homocisteína em uma amostra, um formato de ensaio que correlaciona a quantidade do complexo de homocisteína/fator de transcrição que está ligada a uma seqüência de ligação de polinucleotídeo de consenso. Em uma modalidade particular o método compreende contato da amostra com um agente de redução por um período de tempo suficiente para liberar

20 homocisteína de qualquer proteína associada; contato da homocisteína reduzida com um fator de transcrição de ligação de metabólito de homocisteína sob condições condutoras de formação de complexo, mistura da amostra com uma seqüência de polinucleotídeo de consenso especificamente reconhecida pelo complexo de homocisteína/fator de transcrição; e avaliação a

25 partir da quantidade de complexo de homocisteína/fator de transcrição ligada à seqüência de polinucleotídeo de consenso da quantidade de homocisteína presente na amostra. Agentes de redução que são aplicáveis para uso no método compreendem sal de boroidreto ou agentes de redução de tiol incluindo ditioeritritol (DTE), ditiotretol (DTT), β -mercaptoetanol, tris-(carboxetil)fosfina (TCEP), ou ácido tioacético, ou qualquer sal de cada um. Os

30 fatores de transcrição de ligação de metabólito de homocisteína incluem MetR de *E. coli* que reconhece uma seqüência de polinucleotídeo de con-

senso, por exemplo, a seqüência de polinucleotídeo é mostrada na SEQ ID NO:11 (Marconi e outros, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 175:1057-1063 (1991)) ou um seu derivado.

5 Ainda uma outra modalidade da presente invenção provê um kit de teste compreendendo um recipiente para manter a solução a ser avaliada quanto à quantidade de homocisteína e/ou cistationina, L-serina, CBS, ou um seu derivado, CBL, ou um seu derivado, e quaisquer tampões, substâncias auxiliares e solventes requeridos para prover condições condutoras de uma atividade de enzima alta. O kit de teste pode compreender ainda lactato
10 desidrogenase, ou um seu derivado, e NADH, ou um derivado dele. NADH pode ser medido diretamente a 340 nm ou, um corante capaz de prover uma mudança de cor quando oxidado por ser incluído. A quantidade de homocisteína e/ou cistationina é relacionada com a mudança na medição de absorbância com o tempo.

15 Em uma modalidade preferida, as enzimas são providas imobilizadas a um suporte sólido. O suporte sólido pode compreender a superfície do recipiente provido para manter a amostra de teste ou pode ser uma conta ou outro artigo adicionado ao recipiente. Em uma modalidade adicional da presente invenção, cistationina γ -liase pode ser provida como parte do kit de
20 teste para remover qualquer cistationina da solução de teste antes do ensaio de ciclização enzimática. Substancialmente toda atividade da cistationina γ -liase, ou seu derivado, pode ser removida da ou destruída na mistura de reação antes da adição dos componentes restantes para a ciclização enzimática de homocisteína.

25 Foi verificado que o ensaio preferido da invenção pode ser realizado em um período de tempo relativamente curto e com quantidades relativamente pequenas de enzima, dando um ensaio que tem vantagens comerciais substanciais. Por exemplo, o ensaio preferido envolve criação de uma mistura de reação incluindo uma amostra contendo homocisteína, serina,
30 CBS, CBL, lactato desidrogenase, NADH e redutor tal como DTE ou DTT, com a razão de CBS/CBL na mistura sendo de a partir de cerca de 1:1 a 25:1, com mais preferência de a partir de cerca de 1:10, e com mais prefe-

rência de a partir de cerca de 2:1 a 5:1. Vantajosamente, foi constatado que o redutor pode estar presente junto com o sistema de detecção (isto é, a lactato desidrogenase e NADH) sem afetar de modo prejudicial o ensaio. Desse modo, o ensaio da invenção pode ser realizado sem uma etapa de

5 redução separada de modo que tempos de ensaio totais são reduzidos. Desse modo, onde uma pluralidade de amostras a ser avaliada através de criação seqüencial de uma mistura de reação em um recipiente (por exemplo, um cadinho espectrofotométrico) formada de uma amostra, serina, CBS, CBL, lactato desidrogenase, NADH e o redutor, e avaliação da quantidade

10 de piruvato presente na mistura de reação através de monitoramento da produção de NAD⁺ com o tempo, o intervalo de tempo entre as respectivas etapas de reação-criação pode ser tão curto quanto 10-50 segundos com o tempo de reação total sendo de até cerca de 20 minutos para uma dada amostra. Com mais preferência, o tempo de reação total sendo de até cerca

15 de 20 minutos para uma dada amostra. Com mais preferência, o tempo de reação total para uma dada amostra é de até cerca de 15 minutos, e ainda com mais preferência até cerca de 13 minutos. O número total de amostras ensaiadas por hora pode ser cerca de 15-30 para instrumentos mais lentos, mas tão alto quanto 200-400 para instrumentos mais rápidos. Neste ensaio

20 preferido, uma primeira mistura de reação compreendendo a amostra, serina, lactato desidrogenase, NADH e o redutor é preferida, com um período de incubação adequado para permitir liberação de uma preponderância (e de preferência essencialmente toda) da homocisteína (homocisteína total) presente nos estados ligado, oxidado e/ou livre na amostra. Desse modo, CBS

25 e CBL são adicionadas para completar a mistura de reação e iniciar a ciclicização enzimática de homocisteína e/ou cistationina.

Em uma outra modalidade preferida, cistationina pode ser usada para fazer um calibrador(es) para o ensaio de enzima (uma vez que o ensaio de ciclicização enzimática interconverte homocisteína e cistationina). Em outras

30 palavras, níveis variantes conhecidos de cistationina podem ser usados no sistema de ensaio para "calibrar" ou "padronizar" o ensaio e/ou instrumento que permite a quantificação de resultados de amostra. Nesta modali-

dade, uma concentração conhecida de cistationina é adicionada a uma amostra biológica e então submetida ao ensaio usado para uma das outras modalidades. Os resultados serão usados para estabelecer uma linha de calibragem que será então usada para ajustar a linha da homocisteína, devido ao alto grau de correlação entre as duas linhas. Alternativamente, níveis conhecidos de cistationina podem ser usados como uma medição do controle de qualidade, para assegurar que o ensaio esteja funcionando apropriadamente. Nesta modalidade de controle de qualidade, esses níveis "conhecidos" de cistationina são avaliados como se eles fossem amostras desconhecidas, e os resultados são comparados com seus valores conhecidos (esperados), a fim de assegurar que o sistema de ensaio esteja funcionando apropriadamente.

Os ensaios preferidos são realizado usando enzimas CBL e CBS isoladas (purificadas) tendo pelo menos cerca de 80% (e de preferência pelo menos cerca de 90%) de identidade de seqüência com as enzimas selecionadas do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 19 e 20. Conforme aqui usado, "identidade de seqüência" como é conhecido na técnica refere-se a uma relação entre duas ou mais seqüências de proteína ou polipeptídeo ou duas ou mais seqüências de polinucleotídeo, a saber uma seqüência de referência e uma dada seqüência a ser comparada com a seqüência de referência. A identidade de seqüência é determinada comparando a seqüência dada com a seqüência de referência após as seqüências terem sido otimamente alinhadas para produzir o grau mais alto de similaridade de seqüência, conforme determinado através da combinação entre os filamentos de tais seqüências. Quando do tal alinhamento, a identidade de seqüência é verificada em uma base de posição-para-posição, por exemplo, as seqüências são "idênticas" em uma posição particular se nesta posição os resíduos de nucleotídeo ou aminoácido forem idênticos. O número total de tais identidades de posição é então dividido pelo número total de nucleotídeos ou resíduos na seqüência de referência para dar a % de identidade de seqüência. A identidade de seqüência pode ser prontamente calculada através de métodos conhecidos, incluindo, mas não limitados a, àqueles descritos no *Com-*

putational Molecular Biology, Lesk, A.N. ed. Oxford University Press, Nova York (1988), *Biocomputing: Informatics and Genome Projects*, Smith, D.W., ed., Academic Press, Nova York (1993); *Computer Analysis of Sequence Data*, Parte I, Griffin, A.M. e Griffin, H.G., eds., Humana Press, Nova Jérsei, 5 (1994); *Sequence Analysis in Molecular Biology*, Von Heinge, G., Academic Press (1987); *Sequence Analysis Iniciador*, Gribskov, M. e Devereux, J., eds., M. Stockton Press, Nova York (1991); e Carillo, H. e Lipman, D., SIAM J. *Applied Math*, 48:1073 (1988), cujos ensinamentos estão aqui incorpora-
 10 dos a título de referência. Os métodos preferidos para determinar a identidade de de seqüência são feitos para dar a maior combinação entre as seqüências testadas. Métodos para determinar a identidade de seqüência são codificados em programas de computador publicamente disponíveis que determinam a identidade de seqüência entre dadas seqüências. Exemplos de tais programas incluem, mas não estão limitados ao, o pacote de programa GCG
 15 (Devereux, J. e outros, *Nucleic Acids Research*, 12(1):387 (1984)), BLASTP, BLASTN e FASTA (Altschul, S.F. e outros, *J. Molec. Biol.*, 215:403-410 (1990). O programa BLASTX está publicamente disponível da NCBI e outras fontes (Manual BLAST, Altschul, S. e outros, NCVINLMNIH Bethesda, MD 20894, Altschul, S.F. e outros, *J. Molec. Biol.*, 215:403-410 (1990), cujos en-
 20 sinamentos são aqui incorporados a título de referência). Esses programas otimamente alinham seqüências usando pesos de marcador ausente a fim de produzir o nível mais alto de identidade de seqüência entre as seqüências dadas e as de referência. Como uma ilustração, através de um polinucleotídeo tendo a seqüência de nucleotídeo tendo pelo menos, por exemplo, 95%
 25 de "identidade de seqüência" para uma seqüência de nucleotídeo de referência, é pretendido que a seqüência de nucleotídeo do dado polinucleotídeo seja idêntica àquela da seqüência de referência exceto que a dada seqüência de polinucleotídeo pode incluir até 5 mutações por ponto por cada 100 nucleotídeos da seqüência de nucleotídeo de referência. Em outras pala-
 30 vras, em um polinucleotídeo tendo uma seqüência de nucleotídeo tendo pelo menos 95% de identidade relativa à seqüência de nucleotídeo de referência, até 5% dos nucleotídeos na seqüência de referência podem ser deletados

ou substituídos com um outro nucleotídeo, ou vários nucleotídeos até 5% nos nucleotídeos totais na seqüência de referência podem ser inseridos na seqüência de referência. Essas mutações da seqüência de referência podem acontecer nas posições terminais 5' ou 3' da seqüência de nucleotídeo de referência ou em qualquer lugar entre essas posições terminais, interespacadas ou individualmente entre nucleotídeos na seqüência de referência ou em um ou mais grupos contíguos dentro da seqüência de referência. Análogamente, através de um polipeptídeo tendo uma dada seqüência de aminoácido tendo pelo menos, por exemplo, 95% de identidade de seqüência com uma seqüência de aminoácido de referência, é pretendido que a dada seqüência de aminoácido do polipeptídeo seja idêntica à seqüência de referência exceto que a dada seqüência de polipeptídeo pode incluir até 5 alterações de aminoácido por cada 100 aminoácidos da seqüência de aminoácido de referência. Em outras palavras, para se obter uma dada seqüência de polipeptídeo tendo pelo menos 95% de identidade de seqüência com uma seqüência de aminoácido de referência, até 5% dos resíduos de aminoácido na seqüência de referência podem ser deletados ou substituídos com um outro aminoácido, ou vários aminoácidos até 5% do número total de resíduos de aminoácidos na seqüência de referência podem ser inseridos na seqüência de referência. Essas alterações da seqüência de referência podem acontecer nas posições amino ou carbóxi terminais da seqüência de aminoácido de referência ou em qualquer lugar entre essas posições terminais, inter-espacadas ou individualmente entre os resíduos na seqüência de referência ou em um ou mais grupos contíguos dentro da seqüência de referência. De preferência, as posições do resíduo que não são idênticas diferem pelas substituições de aminoácido conservadoras. No entanto, as substituições conservadoras não estão incluídas como uma combinação quando da determinação da identidade de seqüência.

Reagentes úteis na presente invenção incluem CBS, CBL, L-serina, LDH, NADH, DTE, β ME, DTT, TCEP, ácido tioacético, e CGL. Concentrações de enzima CBS úteis na presente invenção variam de a partir de cerca de 0,1 a cerca de 100 KU/l. Com mais preferência, a concentração de

CBS é de a partir de cerca de 0,5 a cerca de 75 KU/l, e com mais preferência ainda de a partir de cerca de 1 a cerca de 50 KU/l. Com mais preferência a concentração de CBS é de a partir de cerca de 30 KU/l. As concentrações de enzima CBL úteis na presente invenção variam de a partir de cerca de

5 0,01 a cerca de 100 KU/l. Com mais preferência, a concentração de CBS é de a partir de cerca de 0,05 a cerca de 50 KU/l, e com mais preferência ainda, de a partir de cerca de 0,1 a cerca de 30 KU/l. Com mais preferência, a concentração de CBS é de a partir de cerca de 0,1 a cerca de 15 KU/l. L-serina pode também estar presente em uma concentração final de a partir de

10 cerca de 1 μ M a cerca de 50 mM. Com mais preferência, a L-serina é adicionada em uma concentração final de a partir de cerca de 10 μ M a cerca de 40 mM, e com mais preferência ainda em uma concentração final de a partir de cerca de 100 μ M a cerca de 20 mM. Com mais preferência, a concentração final de L-serina adicionada é de a partir de cerca de 0,2 mM a cerca de 10

15 mM. Quando usada em qualquer modalidade, LDH está presente na mistura de reação em uma concentração final de a partir de cerca de 30 a cerca de 5000 U/L. Com mais preferência, a concentração final de LDH presente na mistura de reação é de a partir de cerca de 30 a cerca de 3000 U/L, e com mais preferência ainda de a partir de 50 a cerca de 2500 U/L. Com mais

20 preferência, LDH está presente na mistura de reação em uma concentração final de a partir de cerca de 100 a cerca de 2000 U/L. Adicionalmente, quando NADH é usado em qualquer modalidade, a quantidade de NADH presente na mistura de reação pode variar entre cerca de 0,1 mM a cerca de 2 mM. Com mais preferência, NADH está presente na mistura de reação em

25 uma concentração final de a partir de cerca de 0,1 mM a cerca de 1,5 mM, e com mais preferência ainda entre cerca de 0,1 a cerca de 1 mM. Com mais preferência, NADH está presente na mistura de reação em uma concentração final de a partir de cerca de 0,2 a cerca de 0,8 mM. Quando DTE é usado na presente invenção, ele pode variar na concentração final de a partir de

30 cerca de 0,01 mM a cerca de 100 mM. Com mais preferência, concentrações de DTE vão variar de a partir de cerca de 0,01 mM a cerca de 50 mM, e com mais preferência ainda de a partir de cerca de 0,1 mM a cerca de 25 mM.

Com mais preferência, concentrações finais de DTE vão variar de a partir de cerca de 0,1 mM a cerca de 10 mM. Similarmente, quando DTT é usado na presente invenção, ele pode variar em uma concentração final de a partir de cerca de 0,01 mM a cerca de 100 mM. Com mais preferência, concentrações de DTT vão variar de a partir de cerca de 0,01 mM a cerca de 50 mM, e com mais preferência ainda de a partir de cerca de 0,1 mM a cerca de 25 mM. Com mais preferência, concentrações finais de DTT vão variar de a partir de cerca de 0,1 mM a cerca de 10 mM. Finalmente, quando CGL é usada na presente invenção, ela pode variar na concentração final de a partir de cerca de 0,1 KU/l a cerca de 100 KU/l. Com mais preferência, CGL vai variar de a partir de cerca de 0,5 KU/l a cerca de 75 KU/l, e com mais preferência ainda de a partir de cerca de 1 KU/l a cerca de 50 KU/l. Com mais preferência, concentrações finais de CGL vão variar de a partir de cerca de 1 KU/l a cerca de 30 KU/l.

Em algumas modalidades preferidas, o tampão do Reagente 1 é TRIS, 250 mM em pH 8,4. No entanto, quando TRIS é usado como o tampão, o pH pode variar de 7,0-9,0. Com mais preferência, o pH varia de 7,5-8,5 e com mais preferência ainda de a partir de cerca de 8,1-8,5. O uso de altas concentrações de TRIS melhora a consistência do ensaio ajudando a manter um pH mais constante uma vez que ele é um tampão mais concentrado. Adicionalmente, CBS e CBL são substancialmente mais ativas nesta faixa de pH preferida, e especialmente a partir de pH de cerca de 8,1-8,5.

A presente invenção também provê um ensaio que funciona igualmente bem com amostras turvas. Problemas com turvação são reduzidos através da adição de lipase e α -ciclodextrina a R1. Isso ajuda a diminuir a turvação através de hidrólise de triglicerídeos em glicerol e ácidos graxos livres através de lipase e através da formação de complexos com os ácidos graxos livres através da α -ciclodextrina. A adição desses dois componentes ajudou a clarear a mistura de reação antes da adição do Reagente 3. Substituição de lipase e α -ciclodextrina com EDTA provê um outro meio de analisar precisamente as amostras turvas.

Uma outra variação da presente invenção testou os efeitos de

volumes variáveis de reagente. Tais variações não tiveram um efeito substancial sobre a precisão do ensaio.

A presente invenção também testou os efeitos de detergentes diferentes e suas concentrações. Por exemplo, Genapol X-80 pode estar
5 presente no Reagente 1 em uma concentração entre cerca de 0,05-0,5%. Com mais preferência, a concentração está entre 0,1-0,5%, e com mais preferência ainda entre cerca de 0,2-0,4%. Dessas, três concentrações (0,1%, 0,3% e 0,5%) foram testadas com a concentração de 0,3% provendo os resultados mais precisos. Brij-35 também foi variado em concentração no
10 Reagente 1. Brij-35 pode ser usado com a presente invenção em R1 em uma concentração entre cerca de 0,01-0,5%. Com mais preferência, esta concentração varia de a partir de cerca de 0,015-0,1%, e com mais preferência ainda de a partir de cerca de 0,020-0,030%. Das concentrações testadas (0,025%, 0,05%, 0,1% e 0,5%), os resultados mais precisos e consis-
15 tentes foram obtidos usando uma concentração de 0,025%.

A presente invenção também testou a substituição do agente de redução DTE com cloridrato de Tris (2-carboxietilfosfina) (TCEP) que é estável em água purificada por um período de tempo prolongado. Tal substituição reduziu a reação com ausência de reagente de a partir de cerca de 12-
20 15 mA/min para cerca de 4-5 mA/min que permite um grau maior de precisão para este ensaio. Quando TCEP é usado na presente invenção, ele pode variar na concentração de a partir de cerca de 6-53 mM. Com mais preferência, esta concentração varia de a partir de cerca de 10-45 mM e com mais preferência ainda de a partir de cerca de 20-30 mM. Nas concentra-
25 ções testadas neste pedido, 26,44 mM proveram os resultados de ensaio mais precisos.

A mistura compreendendo o Reagente 3 foi também variada na composição. Por exemplo, o tampão Tris foi substituído com um tampão de fosfato e glicerol foi adicionado ao tampão. O fosfato era eficaz nas concen-
30 trações variando de a partir de cerca de 50 mM a cerca de 500 mM em pH 7,6. As concentrações de glicerol variaram de a partir de cerca de 0,5% a 15% (v/v). Fosfato e glicerol foram usados para prover vida de prateleira

mais longa para as enzimas, o que não foi possível com o tampão TRIS.

Uma das vantagens da presente invenção é que ela pode ser usada com qualquer número de instrumentos. Por exemplo, o ensaio foi adaptado para teste em dois instrumentos diferentes, o Hitachi 911 e o Beckman CX5. De forma notável, resultados precisos e consistentes foram ob-
5 tidos com qualquer máquina. Adicionalmente, o ensaio pode ser realizado usando apenas 2 reagentes misturando os componentes de R1 e R2 juntos na razão correta com base nos requerimentos dos instrumentos.

Finalmente, a presente invenção pode ser adaptada para uso
10 com um ponto de calibragem único. Importante, os resultados de calibração de ponto único era uma curva de calibragem precisa bem como multiponto.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Figura 1 mostra gráficos de absorbâncias versus tempo obti-
dos usando soluções aquosas de piruvato (5-100 μ M) demonstrando a
15 quantificação de piruvato. Os componentes reagentes eram aqueles descritos na Tabela 1 e ajustes de instrumentos aqueles descritos na Tabela 2.

A Figura 2 mostra uma curva padrão de valores de absorbância em gráfico versus quantidades conhecidas de piruvato (0-100 μ M). O tempo de ensaio era 5 minutos;

20 A Figura 3 mostra gráficos de absorbância versus tempo obtidos usando soluções aquosas de cistationina em homocisteína, piruvato e amônia através de CBL;

A Figura 4 mostra as curvas padrão do ensaio de cistationina obtidas usando soluções aquosas de cistationina (0 a 100 μ M). O tempo de
25 reação era 5 ou 20 minutos;

A Figura 5 mostra gráficos de absorbância versus tempo demonstrando o sistema de ciclização e sinalização de CBS/CBL/piruvato oxidase/peroxidase. A cistationina foi dissolvida em água para preparar padrões em concentrações entre 1 e 100 μ M;

30 A Figura 6 mostra gráficos de absorbância versus tempo demonstrando o sistema de ciclização e sinalização de CBS/CBL/piruvato oxidase/ peroxidase. A homocisteína foi dissolvida em água para preparar pa-

drões em concentrações entre 0 e 100 μM ;

A Figura 7 mostra uma curva de calibragem típica obtida usando soluções aquosas de homocisteína (0-100 μM) usando o sistema de ciclização e detecção de CBS/CBL/PO/HPR;

5 A Figura 8 mostra gráficos de absorção versus tempo típicos obtidos usando homocisteína (0-100 μM) em solução aquosa usando o sistema de CBS/CBL/LDH sem ditioneitol;

A Figura 9 mostra gráficos de absorção versus tempo típicos obtidos usando homocisteína (0-100 μM) em solução aquosa usando o sistema de ciclização de CBS/CBL/LDH com ditioneitol;

10 A Figura 10 mostra um gráfico de calibragem de concentração de cisteína (0 a 100 μM) versus absorbância com e sem ditioneitol. O tempo de reação era 5 minutos;

A Figura 11 mostra uma correlação entre os resultados de quantificação obtidos usando o sistema de ciclização de enzima de CBS/CBL/LDH para medir a homocisteína em amostras de plasma humano usando DTT como o agente de redução comparado com os resultados de quantificação obtidos através do método de homocisteína Abbott IMx;

15 A Figura 12 mostra um gráfico de relação ilustrando a correlação entre o ensaio da presente invenção (y) versus o ensaio de IMx comercialmente disponível (x), conforme descrito no Exemplo 7;

A Figura 13 mostra um gráfico de relação ilustrando uma relação entre o ensaio da presente invenção (y) versus um ensaio de HPLC convencional (x), conforme descrito no Exemplo 7;

25 A Figura 14 mostra um gráfico de relação ilustrando a relação entre o ensaio de IMx (x) e o ensaio de HPLC (y), conforme descrito no Exemplo 7;

A Figura 15 mostra um gráfico de absorbância versus tempo para o ensaio de piruvato não-DTT descrito no Exemplo 9; e

30 A Figura 16 mostra um gráfico de absorbância versus tempo para o ensaio de piruvato contendo DTT descrito no Exemplo 9.

DESCRIÇÃO DAS MODALIDADES ESPECÍFICAS

A presente invenção provê um ensaio de ciclização enzimática homogêneo para avaliação da quantidade de homocisteína em uma amostra. A ciclização enzimática mantém um nível de estado fixo de homocisteína e ainda provê um aumento na sensibilidade da homocisteína do ensaio. Ainda, a presente invenção provê genes e vetores de expressão para a produção recombinante de enzimas que são úteis na presente invenção. Kits de teste para avaliação da quantidade de homocisteína e/ou cistationina em uma solução são também providos.

A homocisteína está presente em células como um aminoácido intermediário produzido quando metionina é metabolizada em cisteína. Em geral, a homocisteína produzida no corpo é rapidamente metabolizada por uma de duas vias: (1) condensação com serina para formar cistationina ou (2) conversão em metionina, e sua concentração (e aquela de sua forma oxidada, homocisteína) no corpo sob condições normais é baixa. O nível de homocisteína no plasma médio para um adulto humano é cerca de 12 μM para homens variando de cerca de 8,6 a cerca de 17,1 μM e 10 μM para mulheres variando de a partir de cerca de 3,9 a 16,8 μM (Vester e outros, *Eur. J. Clin. Chem. Biochem.*, 29:549-554 (1991); Jacobsen e outros, *Clin. Chem.*, 40:873-881 (1994)).

Recentemente, foi determinado que a quantidade de níveis de homocisteína em uma amostra biológica é de significância clínica em várias condições. Quantidades elevadas de homocisteína no sangue foram relacionadas ao desenvolvimento de aterosclerose (Clarke e outros, *New Eng. J. Med.*, 324:1149-1155 (1991)). Também, homocisteinemia moderada é agora considerada como um fator de risco para doença cardíaca e vascular. Precisão na faixa normal de homocisteína encontrada em adultos normais é muito importante uma vez que o risco para a doença cardíaca foi determinado aumentar acentuadamente com menos de 30% sobre a concentração normal aumentando o fator de risco associado em 3,4 vezes (Stampfer e outros, *JAMA* 268:877-881 (1992)).

Conforme aqui usado o termo "avaliação" pretende incluir ambas determinação quantitativa e qualitativa da quantidade de homocisteína e/ou

cistationina presentes em uma solução de teste. Uma "solução" ou "solução de teste" conforme aqui usado refere-se a uma amostra de fluido clínico ou biológico ou extrato de tecido e pode incluir, por exemplo, sangue, derivados de sangue, tal como plasma, ou urina, e similar.

- 5 Uma amostra contendo homocisteína reage com L-serina para formar cistationina na presença da enzima CBS. A cistationina pode ser então convertida em homocisteína, piruvato, e amônia com uma segunda enzima, CBL. O resultado de uso dessas enzimas anabólicas e catabólicas operando simultaneamente é um "ciclo fútil" com o que (1) a cistationina e a
- 10 homocisteína são continuamente interconvertidas, (2) serina é degradada e (3) piruvato e amônia são criados.

- O uso de concentrações relativamente altas de serina comparado com homocisteína provê condições que conduzem a uma taxa de reação geral que segue a pseudocinética de primeira ordem dependente diretamente da quantidade de homocisteína e cistationina na reação. Se a concentração de cistationina é muito baixa comparada com a concentração de homocisteína, a taxa de reação geral vai variar linearmente com a quantidade de homocisteína. Através da medição da redução em serina ou o aumento ou no piruvato ou na amônia, a quantidade de homocisteína em uma
- 15 solução ou amostra desconhecida pode ser determinada através de uma comparação com reações de controle compreendendo concentrações conhecidas de homocisteína que sofre reações de enzima idênticas. O método de ciclização enzimática da presente invenção provê um processo de amplificação que produz quantidades muito maiores de produtos finais do que a
- 20 quantidade de homocisteína provável de estar em uma solução de teste, isto é, sangue. Desse modo, os ensaios para determinar a quantidade de piruvato ou amônia produzida pela reação não têm que ser extremamente sensíveis e podem ser medidos através de processos existentes conhecidos daqueles versados na técnica.

- 30 Piruvato é tipicamente medido através da conversão enzimática em lactato com lactato desidrogenase, ou um seu derivado. Esta reação de conversão enzimática requer o co-fator NADH (co-fator de nicotinamida re-

duzida), ou um seu derivado, que é convertido em NAD⁺ (co-fator de nicotinamida oxidada). A reação pode ser monitorada medindo a absorbância a 340 nm. Conforme aqui usado, o termo "derivados", com relação a co-fatores, refere-se a sais, solvatos e outras formas quimicamente modificadas que retêm a atividade de co-fator geral, mas podem ter estabilidade prolongada em soluções aquosas. Derivados podem incluir, mas não estão limitados a derivados de acetila de NADH, incluindo 3-piridinoaldeído-NADH, 3-acetilpiridina-NADH, 3-tioicotinamida-NADH e similar (vide, por exemplo, Patente U.S. 5.801.006).

Outros ensaios convenientes para determinar a oxidação de NADH, ou um seu derivado, incluem, por exemplo, a medição de fluorescência, conforme descrito por Passoneau e outros, em *Enzymatic Analysis, A Practical Guide*, páginas 219-222 (1993), (incorporado aqui a título de referência). Em uma outra modalidade, NADH, ou um seu derivado, reage com piruvato na presença de lactato desidrogenase para formar NAD⁺, que reage ainda com um corante capaz de produzir uma mudança de cor, de preferência na faixa visível, quando oxidado. A mudança de cor do corante pode ser usada para determinar a quantidade total de oxidação de NADH em NAD⁺ que corresponde à quantidade de piruvato formada a partir da reação de ciclização enzimática. Exemplos de corantes que podem ser usados na presente invenção incluem, mas não estão limitados a, 5,5'-ditiobis(ácido 2-nitrobenzóico), 2,6-diclorofenolindofenol, compostos tetrazólio, metossulfato de fenazina, metil viologen e derivados de cada um.

Piruvato pode ser também medido em uma reação com piruvato oxidase, ou um seu derivado, na presença de uma peroxidase, isto é, peroxidase de rábano silvestre, e similar. A quantidade de piruvato convertida em peróxido de hidrogênio é determinada pela condensação oxidativa de, por exemplo, um doador de hidrogênio solúvel em água que provê um composto colorido para determinação fotométrica da concentração de peróxido. Os doadores de hidrogênio particularmente preferidos que provêm um produto de reação de cor estável incluem derivados solúveis em água de N-alkil-N-sulfopropilanilina, isto é, o sal de sódio de N-etil-N-(2-hidróxi-3-sulfopropil)-

m-toluidina (TOOS) (Tamaoku e outros, *Chem. Pharm. Bull.* 30:2492-2497 (1982)). A quantidade de H_2O_2 pode ser também medida eletrometricamente. Isto inclui medições amperométrica e potenciométrica. A determinação da quantidade de homocisteína e/ou cistationina é determinada a partir da correlação da quantidade de peróxido produzido a partir da conversão de piruvato pela piruvato oxidase durante um período de tempo definido.

Amônia pode ser também medida através de métodos diferentes, incluindo através do uso de um sensor de amônia (Willems e outros, *Clin. Chem.* 34:2372 (1988)). A amônia pode ser também imediatamente detectada usando técnicas colorimétricas conhecidas. Por exemplo, amônia gerada na amostra pode ser reagida para formar um produto colorido, cuja formação pode ser detectada espectrofotometricamente. Um tal método, descrito em *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer) 1:1049-1056 (1970) incorporado aqui a título de referência, baseia-se na reação de amônio com fenol na presença de hipoclorito em condições alcalinas para formar o corante indofenol colorido. Nitroprussida de sódio pode ser usada como um catalisador. Modificações do método usando, por exemplo, vários derivados podem ser também usadas. O produto final colorido é formado em quantidades diretamente proporcionais à concentração de amônia, e então homocisteína. Outros métodos podem incluir, por exemplo, análise de microdifusão (Seligson e outros, *J. Lab. Clin. Med.*, 49:962-974 (1957)), uma técnica de troca de íon (Forman, *Clin. Chem.*, 10:497-508 (1964)) e vários métodos enzimáticos (vide, por exemplo, Mondzac e outros, *J. Lab. Clin. Med.*, 66:526-531 (1979)).

O método de ciclização enzimática para avaliação da quantidade de homocisteína e/ou cistationina reduz as dificuldades vistas em outros ensaios anteriores onde os compostos anteriores e reações anteriores produziam "interferência". No ensaio da presente invenção, grandes quantidades de um aminoácido econômico, por exemplo, L-serina, podem ser adicionadas para prover a conversão geral de L-serina em piruvato e amônia. Em uma modalidade preferida, uma concentração de serina de 250 μM ou mais pode ser usada, e subseqüentemente convertida em piruvato e amônia. Plasma

tipicamente contém cerca de 100 μM de serina. Esta quantidade de serina endógena é insignificante para o presente ensaio uma vez que o ensaio mede uma taxa de conversão que é limitada pela quantidade de homocisteína e não pela quantidade de serina. Concentrações de L-serina de cerca de 0,1 mM a 10 mM não seriam esperadas afetar a sensibilidade ou precisão do ensaio descrito.

Ainda, a reação de ciclização enzimática da presente invenção provê uma taxa de conversão de L-serina que é dependendo da concentração de homocisteína em uma pseudo-reação de primeira ordem. Níveis de piruvato no sangue normais estão tipicamente entre cerca de 0,4 e 2,5 mg/100 ml (Lehninger, A.L., *Principles of Biochemistry*, 1982. Worthington Publishers, Inc., p. 707, incorporado aqui a título de referência), que corresponde a cerca de 45-284 μM . Esta concentração de piruvato poderia prover uma medição de base menor, mas o presente ensaio mede uma mudança com o tempo e pode ser facilmente ajustado para o nível de partida de piruvato em uma solução. Em adição, piruvato pode ser removido antes da incubação com lactato desidrogenase ou outras enzimas. Mais importante, cisteína e outros compostos carregando enxofre em, por exemplo, sangue, não contribuem significativamente para a reação de ciclização enzimática e, desse modo, são considerados interferências insignificantes no sistema.

Em uma modalidade alternativa da presente invenção, a amostra pode ser tratada para remover cistationina para aumentar a precisão da medição de homocisteína. Como um exemplo particular, o tratamento compreende contato da cistationina γ -liase com a solução para converter cistationina em α -cetoglutarato (um composto que não pode participar na ciclização enzimática descrita acima). Antes de prosseguir com o ensaio de ciclização de enzima para avaliar a quantidade de homocisteína, a atividade da cistationina γ -liase deve ser removida da amostra ou destruída, isto é, através de calor, ou similar.

Esta modalidade particular da invenção pode ser também usada para a avaliação da quantidade de cistationina através de comparação das diferenças na taxa de produção de piruvato e/ou amônia em uma amostra

tratada e não-tratada com cistationina γ -liase antes de sofrer o ensaio de ciclização enzimática. Desse modo, a presente invenção pode ser usada para determinar a quantidade de cistationina em uma amostra desconhecida, mesmo se a amostra contiver homocisteína.

5 Em certas amostras biológicas, tal como sangue, homocisteína é muitas vezes ligada através de uma ligação dissulfeto a proteínas, tióis e outros componentes celulares. Tipicamente, a amostra pode ser tratada com um agente de redução, tal como boroidreto de sódio ou potássio; um tiol, tal como ditioeritritol, β -mercaptoetanol, ditiotreitól, ácido tioglicólico ou glutatio-
10 na; ou uma fosfina ou uma trialquilfosfina, tal como tributilfosfina e tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), e similar, para liberar ligação e homocisteína ligada a dissulfeto. Ensaio anteriores que requerem anticorpos para a etapa de detecção devem mudar as condições redox da mistura de reação (a maioria dos anticorpos são mantidos juntos com uma ligação dissulfeto). No entanto,
15 no presente método não é necessário lavar ou alterar as condições redox porque as CBS e CBL usadas são ativas sob condições de redução. Desse modo, menos etapas são requeridas para os ensaios da presente invenção do que para muitos imunoensaios da técnica anterior.

 Em uma modalidade típica, uma amostra compreendendo san-
20 gue, frações de sangue, soro, plasma ou urina será tratada com um agente de redução e diretamente ensaiada para homocisteína. Aquecimento da amostra antes do ensaio para acelerar a liberação de homocisteína e para inativar as enzimas de degradação e outros fatores que podem interferir com o ensaio pode ser também preferido. O manuseamento geral de amostras de
25 sangue para ensaios de homocisteína é também conhecido daqueles versados na técnica para outros métodos tal como testes de HPLC.

 CBS e CBL são enzimas comumente encontradas na natureza. Humanos e levedura usam CBS para a síntese de metionina; e o cDNA humano para CBS pode ser substituído pelo gene de CBS em levedura fermentadora (Kruger e outros, *Hum. Mol. Genet.*, 4:1155-1161 (1995)). CBL é
30 encontrada em muitas bactérias, incluindo *E. coli* (Laber e outros, *FEBS Lett.*, 379:94-96 (1996)). As seqüências de DNA totais para os genes de CBS

e CBL são conhecidas nesses organismos e em outras espécies, provendo um biólogo molecular especializado com uma fonte para facilmente clonar ou sintetizar esses genes, ou seus derivados.

Conforme aqui usado, "derivado" com relação a enzimas refere-se a mutantes produzidos através da adição, deleção, substituição e/ou modificação de aminoácido; mutantes produzidos através de mistura de DNA e/ou recombinante; e sais, solvatos, e outras formas quimicamente modificadas da enzima que retêm a atividade enzimática da enzima nativa isolada. Um método para criação de uma enzima derivada pela mistura de DNA útil na presente invenção é descrito na Patente U.S. 5.605.793 (incorporada aqui a título de referência). Mesmo sem clonagem, as duas enzimas foram purificadas de vários organismos diferentes. Vide, por exemplo, Ono e outros, *Yeast* 10:333-339 (1994); Dwivedi e outros, *Biochemistry* 21:3064-3069 (1982), incorporados aqui a título de referência. Em uma modalidade preferida da presente invenção organismos geneticamente modificados são providos para produzir uma CBS, ou um seu derivado, e para produzir CBL, ou um seu derivado, que podem ser usadas no ensaio de ciclização enzimática para prover reagentes em custo reduzido e para aumentar a facilidade de purificação das enzimas.

Similarmente, o termo "derivado" com relação a seqüências de nucleotídeo refere-se a variantes e mutantes produzidos através de adição, deleção, substituição e/ou modificação de nucleotídeo, e/ou química combinatoria; mutantes produzidos através de mistura de DNA e/ou recombinante; e sais, solvatos, e outras formas quimicamente modificadas da seqüência que retêm a atividade desejada da seqüência tal como as características de ligação de MetR. De preferência, quando seqüências derivadas modificadas são usadas, as seqüências têm pelo menos cerca de 60% de identidade de seqüência com a seqüência original. Com mais preferência, a identidade é pelo menos cerca de 70% e com mais preferência pelo menos cerca de 85%. Com mais preferência, tais seqüências têm pelo menos cerca de 95% de identidade de seqüência com a seqüência original.

O gene de CBS e o genoma integral de *Saccharomyces cerevi-*

siae foram seqüenciados. Da mesma maneira, o gene de CBL e os genes restantes de *E. coli* são também conhecidos. Desse modo, usando técnicas comuns na técnica de biologia molecular, os genes codificando CBS e CBL podem ser clonados e expressos em ambos organismos. Métodos publica-

5 dos para purificação das duas enzimas são conhecidos, os quais usam métodos de purificação de proteína padrão. No entanto, cada uma das enzimas pode ser construída como proteínas de fusão incluindo, por exemplo, uma porção de uma outra proteína que auxilia na solubilização e/ou redobra da enzima ativa ou seqüências de aminoácido que podem ser adicionadas para

10 auxiliar na purificação. Um exemplo de seqüências de aminoácido adicionadas para purificação incluem marcadores de afinidade, tal como polihis, ou glutathione-S-transferase (GST) pode ser adicionada para permitir a purificação mais rápida das proteínas em uma coluna de afinidade única. Embora as enzimas não requeiram purificação até homogeneidade para um teste de

15 diagnóstico da presente invenção, proteases e outras atividades que convertem serina em piruvato podem ser reduzidas para níveis insignificantes através de purificação.

Em adição, concentração das enzimas geralmente leva a uma estabilidade maior da atividade da enzima durante a reação e quando do

20 armazenamento a longo prazo. CBS e CBL de outros organismos que não *S. cerevisiae* e *E. coli*, especialmente termófilos, são esperadas ser fontes de enzimas tendo uma estabilidade ainda maior. As enzimas isoladas podem ser também selecionadas para uma afinidade maior para homocisteína. Em adição, a construção de proteína da CBS de levedura e CBL bacteriana

25 pode levar a enzimas com propriedades comerciais aperfeiçoadas, incluindo afinidades mais altas, taxas de reação mais rápidas, purificação mais fácil e uma meia-vida mais longa quando do armazenamento.

Similarmente, cistationina γ -liase (CGL) foi descrita em detalhes em muitas espécies (vide, por exemplo, Yamagata e outros, *J. Bacteriol*,

30 175:4800-4808 (1993) incorporado aqui a título de referência). Manipulação dos genes que codificam CGL pode ser ainda modificada geneticamente através de métodos recombinantes padrão e inserida em uma célula hospedeira.

deira para desenvolver cepas de produção de nível mais alto.

A expressão recombinante dos genes para CBS, CBL e CGL é típica. Esses métodos podem prover quantidades maiores de enzima purificada e os genes podem ser modificados, por exemplo, para auxiliar em uma
5 sequência de peptídeo definida (um marcador de afinidade) para as enzimas expressas que podem ser usadas para purificação de afinidade. Através do uso de marcadores de afinidade na expressão das enzimas recombinantes, a purificação e imobilização dessas enzimas podem ser bastante simplificadas, levando a custos menores. Os marcadores de afinidade são conhecidos
10 na técnica e incluem, por exemplo, mas não limitados a, polihistidina, GST (glutathione-S-transferase), marcador strep, "flag", seqüências c-myc e similar. Os marcadores são amplamente usados para purificação de afinidade de proteínas recombinantemente expressas, e muitos estão comercialmente disponíveis.

15 Em uma modalidade preferida, CBS e CBL são imobilizadas em uma superfície sólida de uma maneira que mantém as atividades das enzimas e de uma maneira que mantém a homocisteína livre de interagir diretamente com as proteínas. Através de imobilização das enzimas em altas densidades, as distâncias de difusão entre as proteínas diferentes são reduzidas
20 com relação às enzimas em solução. Como resultado, a taxa geral de reação do ensaio aumenta muito, uma vez que o produto de uma enzima pode ser reagido pela outra enzima e vice-versa. A aceleração das taxas de reação é devido a um aumento local nas concentrações dos intermediários, que estão em proximidade maior com a enzima seguinte como um resultado de
25 imobilização. O aumento da taxa do ensaio de homocisteína pode ser um fator importante para a comerciabilidade do produto de diagnóstico porque o K_m da CBS ou CBL está em uma faixa milimolar mas as concentrações sanguíneas de homocisteína são aproximadamente 10 μM . Reações limitadas por difusão são conhecidas requerer uma alta concentração das enzimas
30 para prover uma taxa de reação rápida. Imobilização das enzimas no ensaio de ciclização supera as dificuldades que poderiam se apresentar pelas baixas afinidades dessas duas enzimas para seus respectivos substratos.

Em uma outra modalidade preferida, CBS e CBL são imobilizadas como uma proteína de fusão. A distância e orientação das duas proteínas diferentes relativas uma a outra podem ser controladas durante a construção do vetor de expressão do gene de fusão. Através de posicionamento
 5 apropriado as duas atividades em uma proteína de fusão, interconversão de homocisteína e cistationina pode acontecer extremamente e virtualmente rápida dentro da proteína, uma vez que distâncias de difusão podem ser minimizadas entre os dois centros ativos. A homocisteína, então, comporta-se como um co-fator na reação de ciclização enzimática geral, o que faz piruvato e amônia a partir de L-serina.
 10

O ensaio de ciclização enzimática da presente invenção pode ser provido em vários formatos de ensaio. O formato mais simples do ensaio provê uma solução reagente compreendendo L-serina, CBS, ou um seu derivado, CBL, ou um seu derivado, e vários tampões e substâncias auxiliares
 15 necessárias para otimização das reações de enzima. Em uma modalidade particularmente preferida da presente invenção, CBS, ou um seu derivado, e CBL, ou um seu derivado, são providas imobilizadas em uma superfície sólida.

A imobilização de enzimas para uma superfície sólida enquanto
 20 retendo substancialmente toda a atividade da enzima é bem-conhecida na técnica. Vários métodos foram usados para imobilização incluindo ligação covalente, absorção física, armadilha, e deposição eletroquímica. Como um exemplo glutaraldeído foi usado para imobilizar creatinina desaminase e glutamato oxidase para contas de vidro de poro controlado derivadas de propilamina (Rui e outros, *Ann. NY Acad. Sci.*, 672:264-271 (1992)). Outros
 25 exemplos incluem, mas não estão limitados a, o uso de carbodiimidas para ligar covalentemente enzimas a contas de vidro derivadas de succinato (Rui e outros, *supra*), e o uso de reagentes de reticulação hetero- ou homobifuncionais (por exemplo, SPDP, 3-(2-piridiltio)propionato de N-succinimidila; SMPT, succinimidiloxycarbonil- α -metil- α -(2-piridil-ditio)-tolueno; DSP; ditio-
 30 bis(succinimidilpropionato); DTSSP, 3,3'-ditiobis(sulfossuccinimidilpropionato); DSS, suberato de dissuccinimidila e outros) para covalentemente ligar

uma enzima através de, por exemplo, um grupo amina ou sulfidril para uma superfície sólida derivada (Wilson e outros, *Biosens. Bioelectro*, 11:805-810 (1996)).

5 A "superfície sólida" conforme aqui usada pode incluir um material insolúvel em água poroso ou não-poroso que pode ter qualquer um de vários números de formatos, tal como partícula em fita, bastão, incluindo uma conta ou similar. Os materiais adequados são bem-conhecidos na técnica e podem incluir, por exemplo, papel, filtro de papel, náilon, vidro, cerâmica, sílica, alumina, terra diatomácea, celulose, polimetacrilato, polipropileno, poliestireno, polietileno, cloreto de polivinila e derivados de cada um deles. A superfície sólida pode ser os lados e o fundo do recipiente de teste ou pode ser um material adicionado ao recipiente de teste. Em uma modalidade preferida, a superfície sólida compreende uma conta que é adicionada ao recipiente de teste.

15 Ambas levedura e bactérias têm enzimas que convertem L-serina em piruvato, atividades que são algumas vezes referidas como serina desaminase ou serina desidratase. Métodos mutagênicos bem-estabelecidos podem ser usados para reduzir bastante ou eliminar essas atividades, o que pode contribuir significativamente para a base no ensaio de ciclização de homocisteína. *Saccharomyces cerevisiae*, em particular, pode ser geneticamente manipulada para deletar as atividades de serina desaminase, que são necessárias para (1) síntese de isoleucina e (2) crescimento em serina como uma fonte de carbono ou nitrogênio, usando um método simples conhecido como "rompimento de gene". Ao deletar o gene *cha1* de levedura, uma atividade de serina desaminase principal é removida, desse modo eliminando um problema de base potencial para o ensaio de ciclização. Em adição, a deleção de *cha1* pode ser útil para seleção de proteínas de fusão CBS-CBL e para construir geneticamente essas proteínas de fusão. A cepa de deleção *cha1* é incapaz de crescer em serina como a fonte de carbono ou nitrogênio única. O gene de fusão de CBS-CBL é capaz de complementar a deleção, contanto que a homocisteína esteja disponível como um "co-fator", porque o sistema de ciclização produz o mesmo resultado líquido que a serina desa-

minase. Desse modo, a deleção de *cha1* pode ser usada para selecionar e manter fusões de CBS-CBL aperfeiçoadas, especialmente se uma população dos genes de fusão for mutada e posta em vetores de cópia única ou em cromossomas em levedura. As células que crescem mais rápido em meio de serina ou têm uma necessidade reduzida de homocisteína podem conter mutações que codificam enzimas ou proteínas mais rápido com afinidades mais altas para homocisteína e cistationina.

A presente invenção também provê, como um método alternativo para avaliação da quantidade de homocisteína em uma amostra, o uso de um fator de transcrição de ligação de metabólito. Quando um fator de transcrição de ligação de metabólito é ligado ao seu respectivo metabólito, o complexo de fator se liga a uma seqüência de polinucleotídeo de receptor específica. A ligação do complexo de fator de transcrição à sua seqüência de consenso de receptor pode ser monitorada e correlacionada à quantidade de metabólito presente na amostra.

Vários fatores de transcrição que se ligam a locais de ligação de DNA específicos quando da associação com uma molécula pequena ou metabólito são conhecidos na técnica. Por exemplo, *E. coli*. tem um elemento de regulação de operon, o fator de transcrição MetR que regula o operon Met em resposta à ligação à homocisteína (Cai e outros, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 163:79-83 (1989)). MetR ou seus derivados regulam genes tal como MetE (metionina sintase independente de cobolamina), MetH (metionina sintase dependente de cobolamina) e GlyA (serina hidrogenase). MetR e seus derivados de preferência se ligam à sua seqüência de DNA de consenso na presença de homocisteína e é livre no citoplasma da célula em sua ausência. A ligação de MetR na presença de homocisteína pode ser explorada para avaliar a quantidade de homocisteína em uma amostra suspeita de conter homocisteína.

Em uma modalidade particular da invenção, o ensaio compreende uma seqüência de polinucleotídeo codificando a seqüência de consenso para um polinucleotídeo receptor para MetR imobilizado em um suporte sólido de uma maneira que permite a acessibilidade da seqüência de receptor

de consenso para ligação a MetR. A sequência de nucleotídeo pode ser, por exemplo:

GTTAATGTTGAACAAATCTCATGTTGCGTG (SEQ ID NO:11)

Uma amostra, tal como plasma, sangue ou urina, é tratada para
 5 liberar qualquer proteína ligada à homocisteína antes de misturar a amostra com uma solução reagente compreendendo MetR em um agente de tamponeamento na presença da sequência de receptor de consenso imobilizada sob condições que conduzem à formação de complexo. Após um período de incubação o suporte sólido é lavado para remover reagentes não-ligados e a
 10 quantidade de MetR que permanece ligado ao suporte sólido é avaliada. A determinação da quantidade de MetR que permanece ligado à superfície sólida tipicamente pode ser uma ELISA, ressonância de plasmon de superfície, isto é, BIACORE, ou simplesmente um ensaio de proteína padrão, e esta quantidade está correlacionada com a quantidade de homocisteína presente na amostra.

Tratamento da amostra para liberar homocisteína pode ser realizado com um agente de redução. Conforme acima descrito, vários agentes são bem-conhecidos na técnica. Tipicamente uma amostra será misturada com uma solução tampão contendo uma quantidade suficiente de agente de
 20 redução para liberar substancialmente toda a homocisteína de quaisquer proteínas associadas presentes na amostra. Agentes de redução comumente usados incluem, mas não estão limitados a, boroidreto de sódio e potássio, β -mercaptoetanol, ditiotretol, ditioneritrol, ácido tioglicólico ou glutathione; ou uma fosfina ou trialkilfosfina, tal como tributilfosfina e tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) e similar.

A proteína de MetR pode ser também modificada para incorporar um marcador detectável, tal como um cromóforo, um fluoróforo, e similar, para melhorar a velocidade e sensibilidade do ensaio. A adição do marcador detectável pode reduzir o período de tempo requerido para realização do
 30 ensaio através da eliminação de certas etapas de manuseamento da amostra, por exemplo, etapas de lavagem adicionais. Incorporação de um fluoróforo que emite luz no comprimento de onda absorvido pelos oligonucleotídeos na

seqüência de ligação de consenso permite a medição de transferência de energia fluorescente para quantificar a ligação da proteína à seqüência de consenso. Métodos que podem ser usados para medir transferência de fluorescência incluem, por exemplo, transferência de energia de ressonância fluorescente (FRET) ou um ensaio de cintilação de proximidade. Modificação
5 adicional da seqüência de consenso de ligação de MetR através da adição de um marcador detectável adicional dentro do domínio de ligação pode também melhorar a especificidade do ensaio.

Adicionalmente, uma seqüência de peptídeo definida (um marcador de afinidade) pode ser adicionada à proteína de MetR para auxiliar na
10 purificação e detecção. Marcadores de afinidade são conhecidos na técnica e incluem, por exemplo, mas não estão limitados a, polihistidina, marcador strep, "flag", seqüências c-myc e similar. Os marcadores são amplamente usados para purificação de proteínas recombinantemente expressas e muitos
15 estão comercialmente disponíveis. Ainda, alterações mutacionais para melhorar a afinidade de ligação de um MetR recombinantemente expresso podem ser usadas para prover reagentes de ensaio adicionais.

Em uma modalidade separada da presente invenção, a quantidade de homocisteína em uma amostra pode ser determinada através da
20 utilização enzimática de homocisteína na amostra. A conversão de homocisteína em metabolismo celular tipicamente libera um próton do resíduo sulfidril de homocisteína. A liberação deste próton foi usada para medir a afinidade de ligação de homocisteína para metionina sintase dependendo de cobalamina de *E. coli* (Jerret e outros, *Biochemistry*, 36:15739-15748
25 (1997)). Reações de enzima catalisadas por proteínas, tal como metionina sintase, geralmente requerem co-fatores ou substratos adicionais para completar a reação. Se esses co-fatores e substratos não estiverem presentes, a homocisteína permanece ligada à enzima. No presente método, medição do
30 próton liberado remove o próton liberado através da reação enzimática levando a reação para consumo da homocisteína presente na amostra. A medição da mudança no pH associada aos prótons liberados provê uma determinação da quantidade de homocisteína na amostra. Em uma modalidade

preferida, por exemplo, metionina sintase independente de cobolamina pode ser usada no ensaio.

Como uma questão de conveniência, os reagentes para uso na presente invenção podem ser providos em um kit de teste para uso no método de ensaio. Um kit típico compreende uma combinação embalada de um
5 recipiente para manter a solução de teste, L-serina, CBS, ou um seu derivado, e CBL, ou um seu derivado, e tampões auxiliares e substâncias requeridas para condições de reação ótimas. Importante, uma variedade de conservantes e/ou agentes de estabilização pode ser também incluída com
10 qualquer um/todos os reagentes e/ou enzimas do kit para prolongar a vida de prateleira bem como vida "on-line" para teste da amostra. O kit pode ainda compreender agentes de redução ou CGL para pré-tratamento da amostra antes do ensaio de ciclização. Ainda, o kit pode incluir lactato desidrogenase, NADH e um corante capaz de uma mudança de cor observável quando da oxidação.
15

Sob circunstâncias apropriadas, um ou mais dos reagentes no kit podem ser providos em solução (com ou sem conservantes e/ou agentes de estabilização) ou como um pó seco, geralmente liofilizado, incluindo excipientes, conservantes e/ou agentes de estabilização, que na dissolução podem
20 prover uma solução reagente tendo as concentrações apropriadas para realização do ensaio de acordo com a presente invenção. Para aumentar a versatilidade da invenção objeto, os reagentes podem ser providos em combinação embalada, no mesmo recipiente ou em recipiente separado, de modo que a razão dos reagentes provê otimização substancial do método e
25 ensaio. Os reagentes podem estar cada um em recipientes separados ou vários reagentes podem ser combinados em um ou mais recipientes dependendo da estabilidade dos reagentes. Como uma questão de conveniência, os reagentes empregados no método de ensaio da presente invenção podem ser providos em quantidades predeterminadas. O kit de teste pode
30 também conter instruções escritas de como usar os reagentes e/ou de como realizar um ensaio particular, por exemplo, na forma de uma inserção na embalagem.

Os exemplos que seguem são dados a título de ilustração, não a título de limitação.

Exemplo 1

Clonagem e Expressão do Gene de Cistationina β -liase de *E. coli*

5 Neste exemplo, procedimentos de PCR padrão foram usados para clonar o gene de CBL de *E. coli*. O gene isolado foi inserido em um vetor de expressão com uma seqüência de marcador de afinidade (6HIS), e a proteína expressa foi purificada com uma coluna de afinidade. Uma quantidade substancial da atividade da enzima de CBL nas células hospedeiras transformadas com o constructo do vetor de expressão foi purificada dos lisatos de célula.

*Clonagem do Gene de Cistationina β -liase de *E. coli* (CBL, EC 4.4.1.8)*

Procedimentos de PCR padrão usando o sistema de PCR EXPAND HIGH FIDELITY (Roche Biochemicals) foram empregados para amplificar o gene CBL de *E. coli* usando células de *E. coli* competentes em ONE SHOT TOP10 (Invitrogen) como a fonte de DNA genômico. Seqüências de iniciador de PCR para clonagem de CBL foram como segue: (Iniciador N-terminal de CBL: 5'-CGACGGATCC GATGGCGGACAAAAAGCTTG-3'; SEQ ID NO:1) e (iniciador C terminal de CBL: 5'-CGCAGCAGCTGTTATACAATTCGCGCAAA-3'; SEQ ID NO:2). O produto de gene de CBL amplificado através de PCR foi então purificado através de eletroforese de gel de agarose, digerido com endonucleases de restrição BamHI e PvuII, e purificado novamente através de eletroforese de gel de agarose. O gene de CBL de *E. coli* purificado foi então ligado ao vetor de expressão de proteína pRSETB digerido com BamHI/PvuII, purificado com gel, (Invitrogen). O constructo resultante provido pelo gene de CBL sob controle do promotor de transcrição T7, clonado em estrutura com uma seqüência líder de resíduo de Histidina (6HIS) seis amino terminal (daqui em diante referida como 6HISCBL) que permite expressão, purificação de afinidade, e análise de imunottingimento convenientes de proteína de 6HISCBL recombinante de células de *E. coli*. A seqüência de DNA de Cistationina β -liase (CBL) de *E. Coli* está presente (SEQ ID NO:21). A seqüência de proteína da Cistationina β -liase (CBL) de *E. coli* tendo um mar-

cador de afinidade com 6Histidina (6His) amino-(NH₃)-terminal, resultante da clonagem do gene de CBL no plasmídeo de expressão bacteriana pRSETB (SEQ ID NO:19).

Expressão e Purificação da proteína Cistationina β -liase

5 O constructo do plasmídeo pRSETB(6HISCBL) foi transformado em cepa de *E. coli* BL21(DE3)pLysS (Invitrogen), espalhado em placas de LB/Ágar contendo (100 μ g/ml de ampicilina, 35 μ g/ml de cloranfenicol), e foi então incubado da noite para o dia a 37° C. Colônias bacterianas únicas fo-

10 ram então transferidas e cultivadas da noite para o dia em frascos contendo 100 ml de meio de crescimento de LB contendo ampicilina e cloranfenicol. Os 100 ml da cultura da noite para o dia foram então adicionados a frascos múltiplos contendo 1 L de meio de crescimento de LB fresco contendo ampicilina, e deixados crescer até atingirem um A₆₀₀ de 0,6 (aproximadamente 2,5 horas). A fim de induzir expressão da proteína CBL (direcionada pelo

15 promotor T7), isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) foi então adicionado ao meio de crescimento a 0,1 a 1 mM de concentração final. O co-fator de enzima de CBL 5'-fosfato de piridoxal (PLP) foi também adicionado para uma concentração final de 100 μ M no meio de crescimento durante indução. Após monitoramento do crescimento celular e expressão da proteína de

20 6HISCBL durante um período de 5 horas, as células de *E. coli* foram colhidas através de centrifugação, ressuspensas, e lisadas através da adição do Reagente de Extração de Proteína BUGBUSTER (Novagen Inc.) na presença do inibidor de protease completa sem EDTA (Roche Biochemicals) conforme descrito no protocolo do fabricante. O lisato de célula foi então tratado

25 com DNase I, clarificado através de centrifugação e carregado em uma coluna de afinidade contendo a Resina de Purificação de Proteína Poly-His (Roche Biochemicals). A coluna foi então lavada com 10 volumes de leito de tampão de equilíbrio (50 mM de KPi, pH 7,8, 0,5 M de NaCl), seguido por eluição com 5 volumes de leito de tampão de eluição 1 (50 mM de KPi, pH

30 7,8, 0,5 M de NaCl, 10 mM de imidazol; EB1), 5 volumes de leito de tampão de eluição 2 (50 mM de KPi, pH 7,8, 0,5 M de NaCl, 50 mM de imidazol; EB2) e 5 volumes de leito de tampão de eluição 3 (50 mM de KPi, pH 7,8,

0,5M de NaCl, 500 mM de imidazol; EB3). As amostras tomadas durante cada etapa do procedimento de purificação foram então analisadas através de eletroforese de gel de proteína de desnaturação (SDS-PAGE) e tingidas ou com Coomassie Brilliant Blue, ou submetidas à análise Western blot
5 usando uma imunoglobulina de camundongo conjugada com antipoliistidina monoclonal peroxidase para detecção conforme descrito pelo fabricante (Sigma).

A proteína de 6HISCBL purificada foi verificada eluir principalmente nos tampões de eluição 2 e 3 (EB2 e EB3). A CBL contendo o eluato
10 foi então concentrada usando câmaras de filtração centrífugas (Amicon) e dializadas da noite para o dia a 4° C contra tampão de armazenagem (50 mM de TrisHCl, pH 8, 100 mM de NaCl, 5 mM de PLP), separadas em alíquotas e congeladas a -80° C. A concentração da enzima de CBL homogênea purificada foi então calculada com base no coeficiente de extinção a 280
15 nM e um peso de subunidade de 43,312 Da. (Clausen e outros, *Biochem*, 36:12633-42 (1997)). Um rendimento típico de 6HISCBL purificada está na faixa de 20-30 mg de 6HISCBL por grama de pasta de célula de *E. coli*.

Ensaio da Atividade de CBL

A atividade de CBL da proteína de 6HisCBL recombinante purificada com afinidade expressa a partir do constructo do plasmídeo pRSETB(6HisCBL) foi realizada essencialmente conforme descrito anteriormente (Clausen e outros, *Biochem*, 36:12633-42 (1997) incorporada aqui a título de referência). Em resumo, misturas de ensaio continham 100 mM de Tris/HCl (pH 8,5), 5 mM de L-cistationina, 1 mM de 5,5'-ditiobis(ácido 2-
25 nitrobenzóico) (DTNB; reagente de Ellman) e enzima 6HisCBL em um volume de reação final de 1 mL. A reação foi seguida por registro do aumento na absorbância a 412 nm com o tempo. A mesma reação de enzima foi também realizada em amostras tendo concentrações conhecidas de substrato para produzir uma curva padrão. Substancialmente toda a atividade de CBL de-
30 tectada em todo o lisato de célula foi recuperada e verificada estar presente nas amostras experimentalmente purificadas de enzima de 6HisCBL recombinante produzida pelo constructo de plasmídeo pRSETB(6HisCBL).

Exemplo 2

Clonagem e Expressão do Gene de Cistationina β -Sintase (CBS) de Levedura em Levedura

Neste exemplo, métodos de PCR foram usados para clonar o gene de CBS de levedura. O fragmento de PCR compreendendo o gene de CBS foi inserido em um vetor de expressão ambos com e sem um marcador de afinidade que foi adicionado para auxiliar na purificação do produto de gene expresso.

Uma cepa de laboratório de *Saccharomyces cerevisiae* (5153-11-1 (his3 met2)) foi usada como a fonte de gene de CBS. As células foram cultivadas em YEPD a 32° C, giradas, lavadas com água e transferidas para 200 μ l de Tampão de Plasmídeo de Levedura (100 mM de NaCl, 10 mM de Tris (pH 8), 1 mM de EDTA, 0,2% de SDS). A suspensão celular foi misturada com um volume igual de 0,45 mm de contas de vidro e vortexada em alta velocidade por 3 x 30 segundos. O líquido foi removido através de operação em uma pipeta e centrifugado por dois minutos em um microfugo para remover restos de célula. O sobrenadante foi extraído com PCI (fenol:clorofórmio:álcoois isoamila (25:24:1) e clorofórmio). Cloreto de sódio (5 M) foi adicionado (cerca de 20 μ l) e o DNA foi precipitado com um volume igual de isopropanol.

Este DNA de levedura genômico foi amplificado através de PCR com iniciadores CI-001 (CGGGGATCCTGATGCATGCATGATAAGGA; SEQ ID NO:3) e seqüências de nucleotídeo CI-012 (CGGCATTACCGTTT CAC-TAATTTATTG; SEQ ID NO: 4), que flanqueiam o gene estrutural para CBS de levedura. O iniciador CI-001 (SEQ ID NO:3) contém um local de BamHI encontrado no lado 3' não-traduzido do gene de CBS. Para adicionar uma seqüência BamHI ao lado 5' do fragmento de PCR, o gene foi ainda amplificado através de PCR com CI-001 (SEQ ID NO:3) e CI-002 (GTTGGATCCGGCATTACCGTTTCAC; SEQ ID NO:5). O produto de PCR resultante foi uma seqüência de DNA de aproximadamente 1937 pares de base, incluindo 1521 pares de base que codificam a proteína de CBS. O DNA adicional que flanqueia a seqüência de codificação compreende o promotor natural e as seqüências de

terminação de transcrição do gene de CBS de levedura.

Um promotor mais forte foi inserido a montante do gene de CBS para promover níveis mais altos de expressão de proteína. O promotor TPI1 de levedura foi clonado a partir do mesmo DNA de levedura genômico usando os iniciadores CI-009 (GGTGGATCCATCAATAGATACGTA CGTCCT; SEQ ID NO:6) e CI-010 (TTTtagTTTATGTATGTGTTTTTTG; SEQ ID NO:7) em uma reação de PCR padrão. Para ligar a região de codificação de CBS ao promotor TPI1, um iniciador de adaptação é usado: CI-011 (AACACATACATAAACTAAAAATGACT AAATCTGAGCAGCAA; SEQ ID NO:8), que contém 20 bases do promotor TPI1 e as 21 primeiras bases do gene de CBS. A sequência de CBS obtida acima foi amplificada através de PCR com iniciadores CI-001 (SEQ ID NO:3) e CI-011 (SEQ ID NO:8). O produto de PCR resultante foi misturado com o produto de promotor TPI1 a partir do acima, e a mistura foi amplificada através de PCR com iniciadores CI-001 (SEQ ID NO:3) e CI-009 (SEQ ID NO:6) para produzir um gene de fusão chamado "TPICBS", que compreende o promotor TPI1, a sequência de codificação de CBS e o terminador de transcrição de CBS.

Os produtos de PCR de CBS e TPICBS compreendem cada um locais BamHI em ambos lados 5' e 3' da região de codificação. Esses produtos de PCR foram purificados com um PCR WIZARD PREP (Promega), de acordo com as recomendações do fabricante, e foram cortados com BamHI. Os fragmentos de nucleotídeo de BamHI resultantes foram passados em um Gel TBE de Agarose a 1% e purificados com papel NA45 (S&S). A levedura, vetor bifuncional de *E. coli* C1-1 foi um local BamHI único no gene para resistência de tetraciclina, foi usada para expressão de gene de CBS. O vetor C1-1 foi cortado com BamHI e tratado com alcalina fosfatase de camarão, de acordo com as instruções do fabricante (Roche Biochemicals). Os fragmentos de BamHI de CBS e TPICBS foram ligados ao vetor C1-1 linearizado. A reação de ligação foi transformada em célula TOP10 (Invitrogen), que foram postas em placa em placas de ampicilina LB. Transformantes resistentes a Amp foram transferidos para placas LB amp e LB tet para determinar os clones sensíveis à tetraciclina. Várias colônias sensíveis à tet foram

selecionadas a partir de placas de LB amp, cultivadas da noite para o dia em placas LB amp, e foram ainda processadas através do método de lise alcalina para DNA de plasmídeo. O DNA foi cortado com BamHI e separado em um gel de agarose a 1% para determinar quais plasmídeos contêm as inserções de CBS ou TPICBS.

Os plasmídeos de C1-1 que carregam inserções foram transformados na cepa de levedura, INVSc-1, uma cepa diplóide que está comercialmente disponível da Invitrogen. INVSc-1 tem uma mutação em ambas cópias do gene LEU2 e requer o gene LEU2 do plasmídeo de C1-1 para crescimento seletivo em meio sem leucina. INVSc-1 foi transformada com os plasmídeos relacionados a C1-1, usando o Kit de Transformação de Levedura da Invitrogen, de acordo com as instruções do fabricante. O kit envolvia fabricação de esferoplastos das células com Zimoliase, seguido por um tratamento com cálcio para transformação de DNA. Os transformantes foram postos em placa em um meio sintético contendo sorbitol 1M, base de nitrogênio de levedura e suplementos de levedura, excluindo leucina. Os transformantes foram visíveis no ágar de cobertura após três dias de incubação a 32° C.

Ligação de Polihistidina à Cistationina β -sintase para Expressão de Levedura

Seqüências de DNA que codificam seis histidinas foram adicionados à extremidade 3' da região de codificação de CBS, em ambos constructos de vetor de CBS e TPICBS. Seqüências de codificação de polihistidina foram adicionadas ao clone de CBS original através de amplificação do fragmento de PCR de CBS a partir de acima com o iniciador CI-017 (ATGATGATGATGATGACCTGCT AAGTAGCTCAGTAA; SEQ ID N:9) e iniciador CI-002 (SEQ ID NO:5). O produto de PCR resultante compreende a região promotora de CBS natural, a região de codificação de CBS, e ainda seqüência de codificação para resíduos de glicina e seis de histidina. O resíduo de glicina foi adicionado para aumentar a flexibilidade espacial do peptídeo de polihis após tradução. O produto de PCR de polihisCBS foi purificado com gel para fora do DNA de CBS original e foi amplificado através de PCR

seqüencialmente duas vezes em seguida com iniciadores, CI-002 (SEQ ID NO:5) e CI-017 (SEQ ID NO:9) para virtualmente eliminar o DNA de CBS original.

5 Similarmente, o produto de PCR de TPICBSBS acima foi amplificado com iniciadores, CI-009 (SEQ ID NO:6) e CI-017 (SEQ ID NO:9). O produto de PCR foi purificado com gel e reamplificado duas vezes com CI-009 (SEQ ID NO:6) e CI-017 (SEQ ID NO:9) para reduzir bastante a seqüência de DNA de TPICBS inicial.

10 O gene de CBS foi também clonado através de PCR com iniciadores CI-001 (SEQ ID NO:3) e CI-018 (CATCATCATCATCATTAATAAGAACCCACGCT; SEQ ID NO:10) para produzir uma seqüência de polihistidina com um códon de parada de TAA, seguido pela seqüência de terminador de transcrição. Este produto de PCR curto ("terminador") de cerca de 190 pb foi também purificado com gel e clonado através de PCR com os
15 mesmos iniciadores. Os fragmentos de CBS de polihis e "terminador" foram combinados em uma reação de PCR com os iniciadores, CI-001 (SEQ ID NO:3) e CI-002 (SEQ ID NO:5). A amplificação resultante produziu uma molécula de ácido nucléico chamada "CBSH", compreendendo o promotor de CBS natural, a região de codificação de CBS completa, um resíduo de glicina adicional, seis resíduos de histadila com um códon de parada e o terminador de transcrição de CBS.
20

Da mesma maneira, o TPICBS de polihis e fragmentos de terminador foram combinados em uma reação de PCR com os iniciadores, CI-001 (SEQ ID NO:3) e CI-009 (SEQ ID NO:6). O produto de ácido nucléico resultante, chamado "TPICBSH" foi o mesmo que a seqüência de CBSH, exceto
25 que o promotor TPI1 substituíu o promotor de CBS natural. Os CBSH e TPICBSH (cada um contendo uma seqüência de marcador de afinidade de polihistidina) foram cortados com BamHI e ligados a C1-1, conforme feito acima para seqüências de CBS e TPICBS. As misturas de ligação foram transformadas em INVSc-1. Colônias sensíveis à tet foram examinadas
30 quanto à inserção dos genes clonados apropriados em C1-1 através de análise de enzima de restrição.

Exemplo 3

Clonagem, Expressão e Purificação do Gene de Cistationina β -Sintase (CBS) de Levedura em *E. coli*

- Neste exemplo, técnicas de biologia molecular e PCR padrão
- 5 foram usadas para clonar o gene de Cistationina β -Sintase (CBS) de *Saccharomyces cerevisiae* (INVSc1) como uma proteína de fusão com um amino-terminal glutathiona S-transferase (GST). Adição desta região de glutathiona S-transferase permite a purificação de afinidade de etapa única da proteína de CBS do meio de cultura de *E. coli* e pode também auxiliar na solubi-
- 10 lização e/ou promover redobra apropriada da enzima em uma forma ativa.

Clonagem

- A cepa de laboratório de *Saccharomyces cerevisiae* (INVSc1) (Invitrogen) foi usada como a fonte de gene de CBS. Uma colônia única de levedura INVSc1 foi fervida em 100 μ l de água desionizada por 5 minutos e vortexada rapidamente na presença de um volume igual de contas de vidro de 0,45
- 15 mm por 2 minutos. Um microlitro deste lisato de célula foi então usado como a fonte de DNA para amplificação de PCR de gene de CBS de levedura usando iniciadores CI-024 (GCGGGTCGACTATGACTAAATCTGAGCAGCAAGCC; SEQ ID NO:12) e CI-025 (GCGTGCGGCCGCGTTATGCTAAGTAGCTCAG; SEQ ID NO:13) que contém seqüências de flanqueamento para o gene de
- 20 CBS de levedura publicado e locais de restrição para clonagem no vetor de expressão pGEX-6P-2 (Amersham Pharmacia). O produto de PCR resultante (aproximadamente 1548 pb) foi então isolado e purificado através de extração de DNA de gel de agarose usando um kit comercial (Roche). O
- 25 produto de PCR purificado contendo o gene de CBS flanqueado pelos locais de enzima de restrição Sall (extremidade 5') e NotI (extremidade 3') foi então digerido (por Sall e NotI), purificado com gel e ligado ao vetor de expressão pGEX6P-2 (Amersham Pharmacia). Mapeamento da enzima de restrição foi usado para confirmar a identidade do DNA amplificado com PCR como o
- 30 gene de CBS de levedura. A seqüência de DNA para o gene de Cistationina β -Sintase (CBS) de *Saccharomyces cerevisiae* clonado é mostrada (SEQ ID NO:14). A seqüência de proteína da CBS de *Saccharomyces cerevisiae* clo-

nada tendo uma proteína de fusão de GST amino-(NH₃)-terminal ligada como um resultado de clonagem no vetor de expressão bacteriana pGEX6P-2 é também apresentada (SEQ ID NO:20).

Expressão e Purificação

5 O vetor de expressão pGEX6P-2 contendo o gene de levedura clonado CBS (descrito acima) foi transformado em células de *E. coli* TOP10 (Invitrogen). Colônias únicas foram pegas e culturas celulares foram cultivadas em meio LB contendo 100 µg/ml de ampicilina a 30° C até atingir uma absorbância a 600 nm de aproximadamente 0,5 OD. A fim de induzir a expressão da proteína de fusão GST-CBS (dirigida pelo promotor tac), isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) foi adicionado ao meio de crescimento para uma concentração final de 0,1 mM. O co-fator de CBS, 5'-fosfato de piridoxal, foi também adicionado ao meio de crescimento a 100 µM de concentração final durante indução. As células induzidas foram então deixadas crescer a 30° C por mais 21 horas antes da coleta através de centrifugação.

Purificação por afinidade de proteína GST-CBS usando a resina de afinidade Glutathione Sefarose 4B foi então realizada essencialmente conforme descrito no protocolo do fabricante (Amersham Pharmacia). Em resumo, as células foram suspensas em solução salina tamponada com fosfato (PBS) e rompidas através de sonificação em gelo. Triton X-100 foi então adicionado para uma concentração final de 0,1% (v/v), e o sonificado foi agitado em temperatura ambiente de 30-45 minutos. O lisato de célula foi então limpo de restos insolúveis através de centrifugação, tratado com DNase I, e carregado em uma coluna de resina de afinidade Glutathione Sefarose 4B. Proteínas não-especificamente ligadas foram retiradas com lavagem com 10 volumes de coluna de PBS, e a proteína de GST-CBS desejada foi então eluída a partir da resina de afinidade através da adição de 5 volumes de coluna de tampão de eluição (50 mM de Tris, pH 8, 1,4 mM de β-mercaptoetanol (BME), 100 mM de NaCl, 0,1% (v/v) de Triton X-100, 50 mM de glutathione reduzida). Purificação da proteína de fusão GST-CBS foi então confirmada através de SDS-PAGE tingida com Coomassie Blue (dodecilsulfato de sódio, eletroforese de gel de poliacrilamida). A GST-CBS eluída foi então dializada para o tampão de armazenamento

(50 mM de TrisHCl, pH 8, 100 mM de NaCl, 5 μ M de PLP), separada em alí-
 quota e armazenada a -80° C. A concentração de GST-CBS purificada foi então
 determinada usando o Kit de Ensaio de Proteína MICRO BCA (Pierce Chemi-
 cal). Um rendimento típico de GST-CBS purificada na faixa de 5-10 mg de
 5 GST-CBS por grama de pasta de E. coli.

Ensaio de Atividade para CBS

A atividade de CBS da proteína de fusão GST-CBS de levedura
 purificada foi realizada conforme descrito por Kashiwamata e Greenberg (*Bi-
 ochim. Biophys. Acta*, 212:488-500 (1970)). Este ensaio é baseado na habi-
 10 lidade da CBS em sintetizar cistationina a partir de serina e homocisteína. A
 quantidade de cistationina formada pela CBS foi então determinada espec-
 trofotometricamente através de detecção do cromagen de reação de ninidri-
 na a 455 nm e comparada com uma curva padrão gerada usando amostras
 de concentrações de cistationina conhecidas. A atividade de CBS foi tam-
 15 bém determinada através de ensaios enzimáticos descritos infra, ou através
 de outros ensaios bem-conhecidos daqueles versados na técnica.

Exemplo 4

Construção do Constructo de Fusão ADH2CYS4

Expressão e Purificação de Cistationina β -Sintase de Levedura em Levedura

20 Neste exemplo, um promotor forte, ADH2, foi inserido a mon-
 tante do gene CYS4 e construído como uma fusão com o gene de CBS de
 levedura para promover expressão de proteína maior. O promotor ADH2 é
 regulado por Adr1p, e é reprimido quando as células de levedura são culti-
 vadas em meio contendo glicose e suprimido quando as células são cultiva-
 25 das em uma fonte de carbono não-fermentável. Isso permite expressão re-
 gulada, se superprodução de uma proteína for letal para a célula.

Construção do gene ADH2CYS4

DNA genômico de levedura foi amplificado com os iniciadores
 CI-029 (CTATATCGTAATAATGACTAAATCTGAGCAGCAAGCCGATTCA;
 30 SEQ ID NO:15) e CI-017 (ATGATGATGATGATGATGACCTCGTAAGTAG
 CTCAGTAA; SEQ ID NO:9) para produzir todo o gene CYS4 sem um códon
 de parada e terminador de transcrição. O iniciador CI-029 (SEQ ID NO:15)

contém as últimas 13 bases da região do promotor ADH2 clonada em adição aos primeiros dez códons do gene CYS4. O iniciador CI-017 (SEQ ID NO:9) tem a sequência para os últimos seis códons do gene CYS4, exceto pelo códon de parada mais um resíduo de glicila e seis resíduos de histadila. O produto de PCR resultante compreende a região de codificação de CYS4, e uma sequência de codificação adicional para glicina e seis resíduos de histidina. A glicina foi adicionada para aumentar a flexibilidade espacial do peptídeo de polihis após tradução. O "fragmento" de terminador foi produzido através de amplificação do mesmo DNA genômico com os iniciadores CI-018 (CATCATCATCATCATCATTAAATAAG AACCCACGCT; SEQ ID NO:10) e CI-040 (AGGGCTCGAGGATCCCGGGGGTGCTATTATGAATGCACGG; SEQ ID NO:16) para produzir uma sequência de polihistidina com um códon de parada TAA, seguido pelo terminador de transcrição. A reação de PCR CI-029/CI-017 produziu um fragmento de aproximadamente 1530 pb enquanto a reação de CI-018/CI-040 produziu um fragmento de aproximadamente 331 pb. Esses dois fragmentos foram unidos misturando seus produtos de PCR e amplificação com iniciadores CI-029/CI-040. O produto resultante foi chamado CYS4H e foi de aproximadamente 1861 pb de comprimento.

Para unir o promotor ADH2 ao fragmento do gene CYS4H, um produto de PCR foi primeiro gerado com o iniciador CI-027 (CGGGGATCCGACGTTTTGCCCGCAGGCGGGAAACC; SEQ ID NO:17) e iniciador CI-028 (AGATTTAGTCATTATTACGATAT AGTTAATAGTTGATAG; SEQ ID NO:18) do mesmo DNA genômico de levedura para produzir a sequência de promotor ADH2. O iniciador CI-028 (SEQ ID NO:18) contém os 12 primeiros nucleotídeos da região de codificação do gene CYS4. Desse modo, entre os iniciadores CI-028 (SEQ ID NO:18) e CI-029 (SEQ ID NO:15) existem 25 nucleotídeos de DNA de complementariedade em seus respectivos produtos. O produto de PCR de ADH2 foi misturado com fragmento de CYS4H e amplificado com os iniciadores CI-27 (SEQ ID NO:17) e CI-040 (SEQ ID NO:16), para produzir um fragmento de produto de aproximadamente 2201 pb chamado ADH2CYS4H. Cada um desses produtos de PCR foi confirmado através de análise de endonuclease de restrição.

O produto ADH2CYS4H foi clonado em YEp24 cortando ambos DNA com BamHI e ligando usando T4 DNA ligase. Os produtos ligados foram transformados em células de *E. coli* (TOP10; Invitrogen) e postos em placa em placas de LB-ágar mais ampicilina. Os plasmídeos, preparados usando o Kit de Preparação de Plasmídeo (Roche) de acordo com a recomendação do fabricante a partir de recombinantes putativos, foram analisados através de endonuclease de restrição. Os plasmídeos de clones verificados ter a inserção correta foram transformados em *S. cerevisiae* (BJ5460) e postos em placa em meio completo sintético menos uracila (SC-ura), suplementado com glicose a 2%. Após dois dias recombinantes putativos foram novamente postos no mesmo tipo de placa para isolar colônias. As células são induzidas através de crescimento em SC-ura mais etanol a 2% e peptona a 1%, geralmente suplementado com 0,1% de glicose para permitir que as células cresçam dentro de 24 horas. Seguindo crescimento da noite para o dia, as células foram coletadas através de centrifugação e o pélete de célula foi mantido a -70° C até a lise. As células foram lisadas suspendendo novamente o pélete de célula em 0,05 volume do volume original em tampão de lise. As contas de vidro foram então adicionadas ao menisco do tampão.

A suspensão toda foi vortexada por 1 minuto cada por quatro vezes. As células foram resfriadas em gelo por 1 minuto entre o vórtex. O lisato foi transferido para tubo fresco e centrifugado por 10 minutos a 10.000 x g. O lisato limpo foi posto em camada em uma coluna de Resina de His (Roche) e a proteína foi purificada de acordo com a recomendação do fabricante. Uma proteína parcialmente purificada foi recuperada em três eluições.

25 Exemplo 5

Exemplos de Porção de Não-ciclização de Formatos de Ensaio para Homocisteína

Neste exemplo, a porção de não-ciclização do ensaio para piruvato e cistationina é mostrada.

30 *Ensaio de Piruvato:*

Piruvato: A presente invenção provê a medição de homocisteína com base no uso das enzimas CBS e CBL para ciclizar a homocisteína com

a produção de piruvato e amônia. A taxa de produção de piruvato e amônia foi prevista ser proporcional à concentração de homocisteína original na amostra. Medição desta faixa usando enzima(s) apropriada(s) apresenta uma oportunidade de um método de homocisteína homogêneo.

- 5 Em um aspecto da presente invenção, um método altamente sensível para quantificação de piruvato foi desenvolvido. No método, a piruvato oxidase converte piruvato em fosfato de acetila, dióxido e peróxido de carbono. A peroxidase subsequente converte o peróxido, TOOS e 4-aminoantipirina em um cromogen, o qual exibe um máximo de absorção próximo de 550 nm. A capacidade de absorção molar deste cromogen é muito alta, cerca de 36 L mol⁻¹cm⁻¹.

- 10 Usando os componentes de reagente mostrados na Tabela 1 e os parâmetros do instrumento Cobas FARA (Roche, Basel, Suíça) listados na Tabela 2, piruvato foi facilmente medido na faixa de μ M por uma ausência de leitura precoce e reação final em cerca de 5-10 minutos. Gráficos de absorbância versus tempo para calibradores aquosos são mostrados na Figura 1. Uma curva de calibragem real é mostrada na Figura 2.

Tabela 1: Método de Piruvato: Componentes do Reagente	
Agente Químico	Concentração
Reagente 1	
HEPES, sal de hemi-sódio	21,5 mM
HEPES, Ácido	28,6 mM
EDTA (4Na)	5,0 mM
Mg SO ₄ .7H ₂ O	49,8 mM
K ₂ HPO ₄ , dibásico	7,5 mM
TOOS	1,4 mM
TTHA	0,8 mM
TPP	0,2 mM
4-aminoantipirina	1,0 mM
BSA	1,9 g/L
Ferrocianida de Potássio	0,07 mM
Peroxidase, de rábano silvestre	3,0 KU/L
Piruvato Oxidase	3,0 KU/L
pH=7,0	

Tabela 2: Método de Piruvato: Parâmetros Cobas FARA	
Parâmetro	Ajuste
GERAL	
Modo de medição	ABS
Modo de reação	P-A
Modo de calibragem	SLOPE AVG
Ausência de reagente	REAG/DIL
Comprimento de onda	550 nm
Temperatura	37° C
ANÁLISE	
Volume da amostra	40 µL
Volume do diluente	10 µL
Nome do diluente	H ₂ O
Volume do reagente	250 µL
Tempo de incubação	60 s
Volume do reagente inicial	na
Nome do diluente	H ₂ O
Volume do diluente	na
Tempo de incubação	na
Volume 2 do reagente inicial	na
Nome do diluente	H ₂ O
Volume do diluente	na
Atraso da temperatura	na
LEITURAS DE ABSORBÂNCIA	
Primeira	0,5 seg
Número	14
Intervalo	30 seg
CÁLCULO	
Número de etapas	1
Etapas A de cálculo	CINÉTICA
Primeira	1
Última	14

CALIBRAGEM	
Número de stds	1
STDI	50 μ M
Réplica	2

Ensaio de Cistationina:

- Cistationina foi medida adicionando CBL ao reagente de piruvato descrito acima. CBL converte a cistationina em homocisteína, piruvato e amônia. O piruvato foi então medido conforme acima descrito. A composição do reagente usado para medir a cistationina é mostrada na Tabela 3. A medição pode ser feita usando qualquer instrumento adequado. No presente exemplo, um Cobas FARA (Roche, Basel, Suíça) foi usado. Parâmetros de reação típicos são mostrados na Tabela 4. A Figura 3 mostra gráficos de absorbância versus tempo obtidos usando soluções aquosas de cistationina.
- 10 A reação atinge o ponto final em menos de dez minutos.

Tabela 3: Método de Cistationina: Componentes do Reagente	
Agente Químico	Concentração
Reagente 1	
HEPES, sal de hemi-sódio	20,3 mM
HEPES, Ácido	27,0 mM
EDTA (4Na)	4,7 mM
Mg SO ₄ .7H ₂ O	47,1 mM
K ₂ HPO ₄ , dibásico	7,1 mM
TOOS	1,3 mM
TTHA	0,8 mM
TPP	0,2 mM
4-aminoantipirina	0,9 mM
BSA	1,8 g/L
Ferrocianida de Potássio	0,07 mM
Peroxidase, de rábano silvestre	2,8 KU/L
Piruvato Oxidase	2,8 KU/L
CBL	1,9/L
pH=7,0	

Tabela 4: Método de Cistationina: Parâmetros Cobas FARA	
Parâmetro	Ajuste
GERAL	
Modo de medição	ABS
Modo de reação	P-A
Modo de calibragem	LIN INTER
Ausência de reagente	REAG/DIL
Comprimento de onda	550 nm
Temperatura	37°C
ANÁLISE	
Volume da amostra	30 µl
Volume do diluente	10 µl
Nome do diluente	H ₂ O
Volume do reagente	260 µl
Tempo de incubação	60 seg
Volume do reagente inicial	Na
Nome do diluente	H ₂ O
Volume do diluente	na
Tempo de incubação	na
Volume 2 do reagente de início	na
Nome do diluente	H ₂ O
Volume do diluente	na
Atraso da temperatura	na
LEITURAS DE ABSORBÂNCIA	
Primeira	5 seg
Número	21
Intervalo	60 seg
CÁLCULO	
Número de etapas	1
Etapa A de cálculo	PONTO FINAL
Primeira	1
Última	10
CALIBRAGEM	
Número de stds	1
STDI	50 µm
Réplica	2

A Figura 4 mostra curvas padrão obtidas usando soluções aquo-

5 sas de cistationina. Essas curvas são lineares pelo menos na faixa de concentração de cistationina de 0-100 μ M. O cromóforo formado foi estável por aproximadamente 15-20 minutos. No entanto, se amostras contendo 10-20 vezes mais de concentrações de cistationina fossem avaliadas, um pouco de instabilidade do cromóforo seria evidente.

Em alguns experimentos, serina foi incluída na mistura de reação. Serina em um nível de 250 μ M não exibiu nenhum efeito significativo. Níveis mais altos de serina foram também tolerados por este ensaio. A não-interferência de serina é uma observação importante porque a presença de serina é necessária para o ensaio de homocisteína.

Exemplo 6

Ensaio de Ciclização de Enzima para Homocisteína

15 Neste exemplo, os sistemas de ciclização de enzima para determinação da concentração de homocisteína são providos usando ou sistema de sinalização de piruvato oxidase/peroxidase ou o sistema de sinalização de lactato desidrogenase.

Demonstração de Ciclização: Sistema de Ciclização de Enzima de CBS/CBL/PO/HRP

20 O sistema de ciclização foi demonstrado, onde a reação foi iniciada usando ou homocisteína ou cistationina. Os componentes do reagente usado nesses experimentos são mostrados na Tabela 5. CBS e serina foram adicionadas separadamente seguindo mistura da amostra com o reagente 1 que contém todos os outros componentes. Parâmetros de Cobas FARA pertinentes são mostrados na Tabela 6. Cistationina ou homocisteína foi dissolvida em água para preparar padrões em concentrações apropriadas. Gráficos tempo versus absorbância são mostrados nas Figuras 5 e 6. Após um tempo de atraso de três a seis minutos os gráficos são lineares. Uma curva de calibragem de homocisteína típica (Figura 7) que, embora não completamente linear, pode ser usada para quantificar concentrações de homocisteína em espécimes adequados usando uma técnica de ajuste de curva apropriada.

Tabela 5: Ciclização de CBS/CBL, Método de PO/HPR	
Componentes do Reagente	
Agente Químico	Concentração
Reagente 1	
HEPES, sal de hemi-sódio	20,3 mM
HEPES, Ácido	27,0 mM
EDTA (4Na)	4,7 mM
Mg SO ₄ .7H ₂ O	47,1 mM
K ₂ HPO ₄ , dibásico	7,1 mM
TOOS	1,3 mM
TTHA	0,8 mM
TPP	0,2 mM
4-aminoantipirina	0,9 mM
BSA	1,8 g/L
Ferrocianida de Potássio	0,07 mM
Peroxidase, de rábano silvestre	3,0 KU/L
Piruvato Oxidase	3,0 KU/L
CBL	
pH=7,0	
Reagente SR1	
Serina	3,1 mM
Reagente SR2	
CBS	1,23 g/L

Tabela 6: Sistema de Ciclização de CBS/CBL/PO/HPR: parâmetros de Co-bas FARA	
Parâmetro	Ajuste
GERAL	
Modo de medição	ABS
Modo de reação	P-I-SR1-I-SR2-A

Modo de calibragem	LIN INTER
Ausência de reagente	REAG/DIL
Comprimento de onda	550 nm
Temperatura	37°C
ANÁLISE	
Volume da amostra	30 µl
Volume do diluente	10 µl
Nome do diluente	H ₂ O
Volume do reagente	260 µl
Tempo de incubação	60 seg
Volume do reagente inicial	30 µl (serina)
Nome do diluente	H ₂ O
Volume do diluente	5 µl
Tempo de incubação	10 seg
Volume 2 do reagente de início	30 µl (CBS)
Nome do diluente	H ₂ O
Volume do diluente	5 µl
Atraso da temperatura	Na
LEITURAS DE ABSORBÂNCIA	
Primeira	0,5 seg
Número	14
Intervalo	30 seg
CÁLCULO	
Número de etapas	1
Etapa A de cálculo	PONTO FINAL ou CINÉTICA
Primeira	1
Última	14
CALIBRAGEM	
Número de stds	1
STDI	50 µm
Réplica	2

Redução de Ligações Dissulfeto:

Muito pouca homocisteína está presente no estado ligado redu-

zido, não-dissulfeto, no plasma humano. A maior parte da homocisteína está acoplada a proteínas ou moléculas pequenas através de ligações dissulfeto. A redução dissulfeto desses compostos é necessária para liberar homocisteína para medição através de qualquer método para determinação de homocisteína total. Este exemplo demonstra que o uso de um agente de redução é compatível com um sistema usando lactato desidrogenase e NADH. Agentes de redução candidatos potenciais incluem DTE, DTT, n-acetilcisteína, ácido tioglicólico, TCEP e similar. Para uso desses compostos no método da presente invenção, ajuste preciso da concentração do agente de redução e parâmetros de instrumento são necessários. Primeiras indicações de que certos agentes de redução poderiam impedir a ação de piruvato oxidase e ou peroxidase de rábano silvestre levaram à investigação do sistema de detecção de piruvato alternativo descrito abaixo.

Demonstração de Ciclização: Sistema de CBS/CBL/LDH:

O piruvato reage com NADH na presença de enzima lactato desidrogenase para produzir ácido láctico e NAD. Piruvato pode ser quantificado medindo a diminuição de absorbância a 340 nm. A capacidade de absorção molar de NADH é cerca de seis vezes menos do que aquela do cromógeno gerado por peroxidase. No entanto, isso não afeta o sistema da presente invenção porque a ciclização de homocisteína de CBL/CBS é capaz de gerar quantidades relativamente grandes de piruvato.

O sistema de reagente usado para gerar os dados apresentados nas Figuras 8, 9, 10 e 11 compreende serina, CBL e lactato desidrogenase em tampão HEPES (pH 7,2) como o primeiro reagente. NADH em tampão TRIS (pH 8,5) e CBS são adicionados em seqüência. Todos os componentes podem, no entanto, ser combinados diferentemente para formar um sistema de medição de homocisteína de dois ou três reagentes. As concentrações de reagente são mostradas na Tabela 7, e parâmetros de Cobas FARA são mostrados na Tabela 8. A concentração de NADH foi ajustada para prover linearidade suficiente enquanto permitindo absorção da amostra de plasma a 340 nm.

Tabela 7: Sistema de Ciclização de CBS/CBL/LDH: Componentes do Reagente	
Agente Químico	Concentração
Reagente 1	
HEPES, sal de hemi-sódio	39,4 mM
HEPES, Ácido	12,6 mM
Serina	0,72 mM
Lactato Desidrogenase	33.000 U/L
CBL	6,05 ug/L
pH=7,2	
Reagente SR1	
NADH	4,16 mM
TRIS	50 mM
pH=8,5	
Reagente SR2	
CBS	996 mg/L
TRIS	50 mM
Cloreto de Sódio	100 mM
Fosfato de piridoxal	5 uM
Diluente da amostra	
DTT	13 mM
HEPES, sal de hemi-sódio	56,7 mM
HEPES, ácido	18,1 mM
pH=7,2	

Tabela 8: Sistema de Ciclização de CBS/CBL/LDH: parâmetros de Cobas FARA	
Parâmetro	Ajuste
GERAL	
Modo de medição	ABS

Modo de reação	P-T-I-SR1-I-SR2-A
Modo de calibragem	LIN INTER
Ausência de reagente	REAG/DIL
Comprimento de onda	340 nm
Temperatura	37°C
ANÁLISE	
Volume da amostra	30 µl
Volume do diluente	10 µl
Nome do diluente	H ₂ O (ou agente de redução)
Volume do reagente	250 µl
Tempo de incubação	60 seg
Volume do reagente inicial	15 µl (NADH)
Nome do diluente	H ₂ O
Volume do diluente	5 µl
Tempo de incubação	10 seg
Volume 2 do reagente de início	30 µl (CBS)
Nome do diluente	H ₂ O
Volume do diluente	10 µl
Atraso da temperatura	Na
LEITURAS DE ABSORBÂNCIA	
Primeiro	5 seg
Número	16
Intervalo	30 seg
CÁLCULO	
Número de etapas	1
Etapa A de cálculo	PONTO FINAL ou CINÉTICA
Primeira	6
Última	20
CALIBRAGEM	
Número de stds	1
STDI	25 ou 50 µm
Réplica	2

Análise de Soluções Aquosas:

O sistema teve bom desempenho para detecção de homocisteína em solução aquosa. Gráficos de absorção versus tempo típicos são mostrados nas Figuras 8 e 9. Esses gráficos foram lineares com pouca ou nenhuma fase de retardo aparente. Taxas de desaparecimento de NADH foram relativamente altas. Além disso, o gráfico de calibragem de concentração de homocisteína versus absorbância foi linear na faixa de 0-100 μM na amostra (Figura 10). Desse modo, apenas um calibrador, por exemplo, 25 μM , junto com uma ausência de reagente foi necessário para calibragem.

Soluções de homocisteína foram preparadas em várias concentrações para demonstrar desempenho do método sobre uma faixa de concentração de cisteína de 2-20 μM . Os resultados são mostrados na Tabela 9, ambos na presença e ausência de DTT. Conforme acima mencionado, DTT serve para reduzir as ligações dissulfeto em amostras (por exemplo, soro, plasma, etc). DTT não interfere significativamente com a reação catalisada por lactato desidrogenase.

Tabela 9. Demonstração de Linearidade: Sistema de ciclização de CBS/CBL/LDH		
Tempo de Reação = 3 minutos		
Concentração de homocisteína (μM)	Valor observado (μM)	
	(-) DTT	(+) DTT
2	2	1,2
5	5,2	4,3
8	8,2	7,4
10	10,4	9,9
12,5	12,7	12,5
16,7	16,8	16,3
20	20,5	20

Análise de Produtos de Controle à Base de Plasma Humano:

Desempenho preciso do sistema de ciclização de CBS/CBL/LDH foi demonstrado aqui usando produtos de controle de homocisteína baseados em plasma humano fabricado pela Bio-Rad Co. Várias concentrações de DTT foram usadas, e tempos de incubação foram variados a fim de atingir recuperação de homocisteína ótima. Tempos de incubação de 5-15 minutos

com concentrações de DTT de 1,6-3,2 mM deram medições de tempo de homocisteína bem dentro das faixas especificadas para vários outros métodos.

Amostras de Plasma Humano:

- 5 O ensaio de ciclização de homocisteína demonstrou bom desempenho usando amostras de plasma humano com DTT como o agente de redução. Os resultados combinam bem com aqueles obtidos por um laboratório independente usando o método de homocisteína Abbott IMx (Figura 11). Parâmetros Cobas FARA usados neste experimento são mostrados na
- 10 Tabela 10 e componentes dos reagentes são mostrados na Tabela 7. Neste ensaio um calibrador de homocisteína aquoso (25 μ M) foi usado. Gráficos de absorbância versus tempo para amostras de base aquosa foram lineares na ausência de DTT e quase lineares na presença de DTT. No entanto, gráficos obtidos usando amostras de plasma foram diferentes, isto é, não-lineares
- 15 após os três primeiros minutos. Sob as condições mostradas na Tabela 7 e Tabela 10, a ciclização parece ser gradualmente diminuída com o tempo. Não obstante, o estudo de relação apresentado na Figura 11 demonstra concordância relativamente próxima entre o método apresentado (descrito na Tabela 7 e na Tabela 10) com aqueles obtidos pelo IMx quando testando
- 20 amostras de soro humano.

Tabela 10: Sistema de Ciclização de CBS/CBL/LDH: parâmetros de Cobas FARA para estudo de correlação de plasma humano	
Parâmetro	Ajuste
GERAL	
Modo de medição	ABS
Modo de reação	P-T-I-SR1-I-SR2-A
Modo de calibragem	LIN INTER
Ausência de reagente	REAG/DIL
Comprimento de onda	340 nm
Temperatura	37°C
ANÁLISE	
Volume da amostra	30 μ l
Volume do diluente	10 μ l

Nome do diluente	H ₂ O (ou agente de redução)
Atraso da temperatura	900 seg
Volume do reagente	250 µl
Tempo de incubação	60 seg
Volume do reagente inicial	15 µl (NADH)
Nome do diluente	H ₂ O
Volume do diluente	5 µl
Tempo de incubação	10 seg
Volume 2 do reagente de início	30 µl (CBS)
Nome do diluente	H ₂ O
Volume do diluente	10 µl
Atraso da temperatura	Na
LEITURAS DE ABSORBÂNCIA	
Primeira	5 seg
Número	24
Intervalo	30 seg
CÁLCULO	
Número de etapas	1
Etapas A de cálculo	PONTO FINAL ou CINÉTICA
Primeira	1
Última	6
CALIBRAGEM	
Número de stds	1
STDI	25 ou 50 µm
Réplica	2

- Em uma modalidade preferida, as taxas foram medidas nos primeiros três minutos após o início da reação. Otimização adicional do sistema, incluindo variação nas concentrações de sal e detergente, provavelmente resultará em desempenho mais consistente com amostras aquosas e de plasma. O ensaio foi igualmente preciso quando componentes foram combinados em duas ou três misturas de reagentes.

Exemplo 7

Comparação de Ensaio de Homocisteína

Neste exemplo, um ensaio de homocisteína preferido de acordo com a invenção foi testado e comparado com dois ensaios existentes, a saber uma técnica de HPLC convencional e o ensaio IMx comercialmente disponível.

- O ensaio da invenção foi realizado usando três reagentes conforme mostrado na Tabela 11. O primeiro reagente R1 estava inicialmente na forma de pó e foi reconstituído para um nível de 1,5 g de pó por 100 mL de água. O kit de ensaio completo também incluía calibradores contendo L-cistationina em pico em vários níveis em uma matriz de plasma humano, bem como duas amostras de controle feitas em uma matriz de plasma humano processado.

Tabela 11: SISTEMA de CICLIZAÇÃO DE CBS/CBL/LDH: Componentes do Reagente	
Agente Químico	Concentração
Reagente 1	
HEPES, sal de hemi-sódio	43,3 mM
Hepes, ácido	12,7mM
Serina	1.295 mM
Lactato desidrogenase	>800 UIL
NADH	1,06 mM
Triton X-I 00	0,05% v/v
Azida de sódio	7,7 mM
pH = 8,0	
Reagente SR1	
DTE	6,75 mM
Ácido cítrico	20mM
pH = 2,0	
Reagente SR2	
CBS	18,7 KU/L
CBL	8,9 KU/L
Sorbitol	1,65 M
Cloreto de sódio	100 mM
Fosfato de pirlodoxal	5 uM
Azida de sódio	7,7 mM
TRIS/HCl	50 mM
pH = 8,0	

Tabela 12: Sistema de Ciclização de CBS/CBL/LDH: Parâmetros Cobas MIRA			
Parâmetro	Ajuste	Parâmetro	Ajuste
GERAL			
Modo de medição	Absorção	Fator de conversão	1,00
Modo de reação	R-S-SR1-SR2	Compensação	0,00
Modo de calibragem	Lin Regre		
Ausência de reagente	Reage/Dil	Faixa de teste Baixa	operante
Limpador	Nenhum	Alta	operante
Comprimento de onda	340 nm	Faixa normal Baixa	não
Posição decimal	2	Alta	não
Unidade	umol/L		
ANÁLISE			
Fatos de Pós-dil.	não	Número de etapas	1
Fator de conc.	não	Etapa A de cálculo	cinética
		Leituras Primeira	18
		Última	32
Ciclo da amostra	1	Limite de reação	não
Volume	30,0 uL		
Nome do diluente	H ₂ O	CALIBRAGEM	
Volume	25,0 uL	Intervalo de calibragem	cada realização
Ciclo do reagente	1	Ausência	
Volume	90 uL	Faixa de reagente Baixa	não
		Alta	não
Ciclo de R1 inicial	2	Faixa de ausência Baixa	não
Volume	25 uL	Alta	não
Nome do diluente	H ₂ O		
Volume	25 uL	Posição padrão	1
		1	3,5 umol/L
Ciclo R2 de início	17	2	7,0 umol/L
Volume	35 uL	3	17 umol/L
Nome do diluente	H ₂ O	4	27 umol/L
Volume	15 uL	5	47 umol/L
		6	não
		7	não
Cálculo			
Limite da amostra	não	Réplica	única
Direção de reação	diminuição	Desvio	
Checagem	fora		
Excesso de antígeno	não	Padrão de correção	não
		Controle	
		Posição CS1	não
		Posição CS2	não
		Posição CS3	não

Ao realizar este ensaio, o instrumento Cobas MIRA comercialmente disponível foi usado. O software Cobas MIRA permite 50 ciclos programáveis, de 25 segundos. Em particular, o instrumento foi programado de acordo com os parâmetros na Tabela 12. No ciclo 1, 30 μ L da amostra foram adicionados a um cadinho, seguido por 25 μ L de água fluida e 90 μ L de reagente líquido R1. No início do ciclo 2, 25 μ L de reagente SR1 foram adicionados com mais 25 μ L de água fluida. Com isso, a mistura foi deixada incubar por 15 ciclos (6,25 minutos) para permitir o redutor liberar qualquer homocisteína ligada e destruir qualquer piruvato endógeno presente. Neste ponto, 35 μ L do reagente de enzima CBS/CBL foram adicionados com mais 15 μ L de água fluida. A diminuição na absorbância a 340 nm foi medida entre os ciclos 18 e 32 como uma medida de homocisteína na amostra. O tempo de ensaio total entre a adição e a leitura de absorbância final foi 32 ciclos, ou 13 minutos e 20 segundos. Uma vez que amostras múltiplas são realizadas em paralelo, resultados de amostra adicionais são produzidos pelo MIRA em uma taxa de aproximadamente um a cada 30-90 segundos dependendo do comprimento da realização do teste e o número de instrumentos calibradores usados. Usando parâmetros de programação similares, este ensaio pode ser adaptado para instrumentos ainda mais rápidos (por exemplo, Roche INTEGRA, Hitachi, ACE, etc) que poderiam dar taxas resultantes ainda maiores.

Um total de 24 amostras foi testado usando o ensaio da invenção e os ensaios comparativos conhecidos. A Tabela 13 abaixo descreve as concentrações de homocisteína obtidas usando esses três métodos. As Figuras 12-14 são gráficos de relação respectivos mostrando graficamente os resultados da Tabela 13. Como pode ser visto, o método da invenção relaciona-se intimamente com ambos IMx e HPLC; com concordância mais próxima tipicamente vista com IMx. No entanto, o presente método é substancialmente mais econômico, pode ser realizado mais rápido e pode ser realizado usando analisadores químicos geralmente disponíveis.

A invenção exibe precisão entre as boas realizações do teste conforme mostrado na Tabela 14. As VCs das realizações do teste típico

foram verificadas serem menos do que 4% nas concentrações de homocisteína de cerca de 7-20 $\mu\text{mol/L}$.

Tabela 13: Comparação de Ensaios de Homocisteína			
Nº da amostra	Concentração de Homocisteína [μM]		
	HPLC	Invenção	IMx
1	9,5	11,5	11,7
2	14,3	13,1	12,1
3	8,8	7,8	7,5
4	10,6	10,1	9,4
5	10,5	10,1	9,9
6	8,6	9,2	7,2
7	7,6	5,8	6,2
8	5,2	3,5	3,1
9	9,6	9,3	9,7
10	7,7	8,7	7,5
11	11,2	11,1	9,4
12	10,5	8,3	8,1
13	11,9	8,4	8,3
14	10,8	9,2	8,9
15	14,1	12,3	12,5
16	24,3	16,3	17,9
17	20,9	17,7	17,8
18	24,2	22,7	22,1
19	33,6	26,4	26,4
20	21,0	20,7	18,9
21	22,7	19,6	18,1
22	20,5	17,3	16,6
23	25,6	23,3	22,0
24	20,5	17,0	15,8
Média	15,2	13,3	12,8
Parada [HPLC]		1,4	0,9

Inclinação [HPLC]		1,2	1,2
R [HPLC]		0,957	0,974
Parada [IMx]	-0,3	0,5	
Inclinação [1Mx]	0,8	1,0	
r [IMx]	0,976	0,990	

Tabela 14: Precisão entre as realizações do teste				
	Homocisteína ($\mu\text{mol/L}$)			
Amostra	Realização 1	Realização 2	Média	% de VC
1	16,35	16,46	16,41	0,47
2	12,13	12,58	12,36	2,58
3	19,45	21,6	20,53	7,41
4	16,29	16,79	16,54	2,14
5	11,13	10,01	10,57	7,49
6	7,33	7,56	7,45	2,18
7	6,31	7,24	6,78	9,71
8	7,13	5,54	6,34	17,75
9	14,87	14,5	14,69	1,78
10	13,81	13,41	13,61	2,08
11	26,86	28,66	27,76	4,58
12	12,45	13,05	12,75	3,33
13	10,15	10,74	10,45	3,99
14	9,6	10,39	10,00	5,59
15	12,53	13,67	13,10	6,15
16	14,60	15,20	14,90	2,85
17	25,03	25,65	25,34	1,73
18	20,77	20,03	20,40	2,56
19	31,83	32,10	31,97	0,60
20	36,86	36,43	36,65	0,83
21	11,65	11,48	11,57	1,04
22	40,22	38,25	39,24	3,55
23	31,68	32,62	32,15	2,07
24	7,68	6,38	7,03	13,08
VC média (%) = 4,22				

Exemplo 8Efeito das Variações de Concentração do Reagente

Neste exemplo, o ensaio preferido da invenção descrito no Exemplo 7 foi realizado com variações em alguns dos componentes do reagente, a saber LDH, NADH e serina. Isso foi feito a fim de determinar as quantidades ótimas para esses componentes do reagente. Os ensaios foram realizados conforme acima descrito, com os respectivos componentes variados na concentração. A Tabela 15 descreve os resultados desses testes.

Tabela 15: Efeito das Variações da Concentração do Componente do Reagente				
[LDH] (U/L) Mistura de Reação Final	INCLINAÇÃO (mA/min/uM)	PARADA mA/min	AUSÊNCIA mA/min	Faixa da homocisteína alvo da amostra de controle: 25 - 35 μ M
114,5	1,21	-0,14	-10,2	25,8
229,3	1,14	0,12	-11,2	28,1
458,7	1,17	0,14	-11,3	26,6
917,5	0,88	1,89	-11,3	27,2
[NADH] (mM)				
0,130	0,77	4,23	-10,7	32,9
0,259	1,12	0,05	-11	25,2
0,389	1,09	0,45	-10,7	26,8
0,519	1,13	0,49	-11,1	26,0
[SERINA] (mM)				
0,125	0,64	2,23	-6,7	30,9
0,25	0,92	1,26	-9,0	28,1
0,5	1,13	0,63	-10,8	27,1
1	1,16	0,15	-13,6	28,3
2	1,23	0,33	-15,4	28,2

Os resultados mostrados na Tabela 15 permitem a seleção dos níveis do componente do reagente final que provêm sensibilidade adequada com uma taxa de ausência mínima enquanto também tentando minimizar

custos do reagente.

Exemplo 9

Efeito da Mudança da Formulação de R1 sobre o Ensaio de Ciclização

- 5 Este exemplo determinou o efeito de alteração do pH ao mudar o tampão para TRIS, 250 mM em um pH de 8,4 e adicionando lipase e α -ciclodextrina ao Reagente 1. O desempenho do ensaio foi então testado após fazer essas mudanças na formulação. A Tabela 16 detalha os componentes do reagente usado para esses experimentos.

10 Tabela 16. SISTEMA DE CICLIZAÇÃO DE CBS/CBL/LDH: Componentes do Reagente

Agente Químico	Concentração
Reagente 1	
TRIS	250 mM
α -ciclodextrina	0,1 %
Lipase	200 kU/L
Serina	1.295 mM
Lactato desidrogenase	>800 U/L
NADH	1,06 mM
Triton X-100	0,05% v/v
Azida de sódio	7,7mM
pH = 8,2	
Reagente SRI	
TCEP	26,3 mM
Reagente SR2	
CBS	28,5 KU/L
CBL	9,4 KU/L
Glicerol	10%
Sorbitol	1%
Fosfato de piridoxal	5/ μ M
Azida de sódio	7,7mM
Fosfato de potássio	100 mM
pH = 7,6	

Ao mudar o tampão do Reagente 1 para TRIS, 250 mM em pH 8,4, melhorou a consistência do ensaio. Isso foi feito porque CBS e CBL são substancialmente mais ativas em pH 8,4 e a taxa de ciclização é aumentada

por volta de um fator de três.

Lipase e α -ciclodextrina foram adicionadas para combater os problemas associados com amostras turvas (lipêmicas) que são algumas vezes encontradas no laboratório clínico. Tais amostras podem surgir quando o paciente a partir do qual a amostra é retirada comeu um pouco antes da amostra de sangue ter sido tirada ou quando o paciente tem certos processos de doença em andamento. A turvação pode interferir com resultados deste teste ao produzir absorvância alta a 340 nm que o instrumento não pode medir com precisão as pequenas mudanças na absorvância produzidas pela conversão de NADH e NAD. A turvação pode também interferir com os resultados deste teste dinamicamente ao mudar com o tempo durante o tempo que a conversão de NADH em NAD é medida. Por exemplo, se a quantidade de turvação estiver diminuindo, a absorvância a 340 nm também diminui porque a difração de luz é menor. Este efeito adiciona à diminuição da absorvância causada pela redução de piruvato e a determinação de homocisteína resultante pode ser substancialmente muito alta. A adição de lipase e α -ciclodextrina a R1 realmente diminuiu a turvação das amostras, presumivelmente através da hidrólise de triglicerídeos em glicerol e ácidos graxos livres através de lipase e através dos ácidos graxos livres formando complexos com a α -ciclodextrina. Desse modo, as misturas de reação turvas clareiam no momento que SR2 (R3) é adicionado permitindo medição precisa da taxa de produção de piruvato. Absorvâncias a 340 nm de muitas misturas de reação turvas realmente diminuíram rapidamente e igualaram (level off) em vários minutos. Os resultados de homocisteína foram precisos. No entanto, o clareamento de algumas amostras turvas não foi completo antes da adição de SR2 (R3) e desse modo, os resultados de algumas amostras foram um pouco imprecisos. Não obstante, o uso de lipase e alfa-ciclodextrina parece ser uma abordagem muito promissora para atingir resultados precisos para amostras turvas.

Em adição as mudanças feitas nos constituintes do reagente, os volumes foram também variados a fim de avaliar seus efeitos sobre o desempenho do ensaio. Essas mudanças são refletidas na Tabela 17, que mostra um parâmetro de ciclização típico no Cobas MIRA. Seguindo essas

mudanças, um estudo de reação foi realizado em 86 amostras humanas com os resultados mostrados na Tabela 18.

Tabela 17: Sistema de Ciclização de CBS/CBL/LDH: Parâmetros Cobas MIRA			
Parâmetro	Ajuste	Parâmetro	Ajuste
GERAL			
Modo de medição	Absorção	Fator de conversão	1,00
Modo de reação	R-S-SR1-SR2	Compensação	0,00
Modo de calibragem	Regressão Linear		
Ausência de reagente	Reag/Sol	Faixa de teste Baixa	operante
Limpador	Nenhum	Alta	operante
Comprimento de onda	340 nm	Faixa normal Baixa	não
Posição decimal	2	Alta	não
Unidade	umol/L		
		Número de etapas	1
ANÁLISE			
Fatos de Pós-dil.	não	Etapa A de cálculo	cinética
Fator de conc.	não	Leituras Primeira	20
		Última	31
Ciclo da amostra	1	Limite de reação	não
Volume	20,0 uL		
Nome do diluente	H ₂ O		
		CALIBRAGEM	
Volume	45,0 µL	Intervalo de calibragem	cada realização
Ciclo do reagente	1	Ausência	
Volume	90 µL	Faixa de reagente Baixa	não
		Alta	não
Ciclo de R1 inicial	2	Faixa de ausência Baixa	não
Volume	21 µL	Alta	não
Nome do diluente	H ₂ O		
Volume	26 µL	Posição padrão	1
		1	0,0 µmol/L
Ciclo de R2 de início	17	2	8,5 µmol/L
Volume	13 µL	3	17,2 µmol/L
Nome do diluente	H ₂ O	4	25,2 µmol/L
Volume	10 µL	5	43,0 µmol/L
		6	não
		7	não
CÁLCULO			
Limite da amostra	Não	Réplica	não
Direção de reação	Diminuição	Desvio	duplicata
Checagem	Inoperante		
Excesso de antígeno	Não	Padrão de correção	não
		Controle	
		Posição CS1	não
		Posição CS2	não
		Posição CS3	não

Tabela 18. Dados de correlação com Aperfeiçoamento Listado nas Tabelas 16 e 17.

Amostra	IMx ($\mu\text{mol/L}$)	Catch ($\mu\text{mol/L}$)
2-01	11,0	12,0
2-02	17,7	17,3
2-03	18,6	18,4
2-04	22,1	21,2
2-05	12,2	13,8
2-06	15,2	14,9
2-07	17,6	20,4
2-09	51,8	49,9
2-11	29,1	28,2
2-13	19,6	19,2
2-15	25,0	24,7
2-16	22,9	23,7
2-17	21,9	21,3
2-18	25,0	23,80
2-19	22,2	22,10
2-21	23,6	20,80
2-22	13,0	13,60
2-23	23,1	21,80
2-24	17,0	17,60
2-26	15,9	14,80
2-27	8,8	9,30
2-28	9,1	9,40
2-29	5,2	5,40
2-30	8,2	8,10
2-31	4,7	5,40
2-32	6,6	6,80
2-33	7,8	8,10
2-34	7,0	7,0
2-35	6,9	7,3
2-36	4,8	5,7
4-01	7,2	7,3

Amostra	IMx ($\mu\text{mol/L}$)	Catch ($\mu\text{mol/L}$)
4-02	7,3	9,1
4-03	6,2	5,8
4-04	9,5	9,5
4-05	6,2	7,4
4-06	8,2	8,0
4-07	6,8	6,7
4-08	8,1	7,4
4-09	6,5	7,9
4-10	7,5	8,5
4-11	8,1	8,6
4-12	6,1	5,7
4-13	6,19	6,20
4-14	5,31	5,90
4-15	7,17	6,80
4-16	5,05	7,00
4-17	5,93	7,80
4-18	8,57	8,10
4-19	4,87	5,70
4-21	19,37	19,50
4-22	8,61	9,30
4-23	11,02	12,50
4-24	12,75	13,30
4-25	12,28	12,00
4-26	14,63	14,30
4-27	9,33	11,30
4-29	18,3	19,60
4-30	14,13	14,20
4-31	8,63	8,60
4-32	9,95	9,80
4-33	8,08	10,20
4-34	12,34	12,00
4-35	12,16	13,10

Amostra	IMx ($\mu\text{mol/L}$)	Catch ($\mu\text{mol/L}$)
4-36	15,75	16,30
4-37	14,37	14,30
4-38	14,72	15,20
4-39	10,26	14,20
4-40	12,26	14,00
4-41	24,62	25,00
4-43	27,25	29,60
4-46	21,26	19,60
4-47	22,08	23,30
4-50	15,14	15,50
E1	4,74	4,90
E2	8,24	8,00
E3	5,10	5,30
E6	13,79	14,50
E8	8,79	10,00
E9	10,57	11,50
E11	7,10	7,40
E13	7,65	7,30
E14	12,19	12,30
E15	6,47	6,14
E16	5,28	4,70
E20	7,93	7,80
Média	12,6	12,9
Inclinação		0,957
Parada		0,8135
R		0,9927

Conforme mostrado por esta tabela de comparação, os resultados deste ensaio com a formulação modificada foram muito precisos quando comparados com o ensaio IMx comercialmente disponível.

5 Exemplo 10

Uso de Outros Detergentes e Sua Variação de Concentração

Neste exemplo, detergentes diferentes foram usados em combinação com EDTA como componente de R1. EDTA é conhecido por estabilizar partículas de lipídeo. Novamente o objetivo foi atingir resultados precisos quando as amostras são turvas. Em particular, os detergentes Brij-35 e Genapol X-80 foram estudados. Foi constatado que EDTA foi particularmente eficaz na concentração de 2,5 mM para ajudar a minimizar a diminuição não-específica na absorbância devido a mudanças de turvação quando amostras lipêmicas são analisadas. As concentrações de detergente foram também variadas conforme mostrado nas Tabelas 19 e 20. Uma composição preferida para o reagente R1 é mostrada na Tabela 21. Brij 35 estava presente no nível de 0,025% v/v e EDTA estava presente a 2,5 mM. Lipase e alfa-ciclodextrina não estavam presentes porque elas não parecem ser necessárias para atingir precisão com amostras turvas quando EDTA está presente. Brij 35 (0,025%) foi também posto em SR2 (R3) no lugar de Triton X-100. Essa pode ser uma substituição promissora porque o Triton X-100 é considerado ser uma ameaça ambiental em alguns países. A Tabela 22 mostra os resultados do estudo de reação realizado com os componentes de reagente preferidos.

Tabela 19. Variação na Concentração de Genapol X-80

Amostras	IMx ($\mu\text{mol/L}$)	Resultados ($\mu\text{mol/L}$) da mudança das concentrações de Genapol X-80 em R1		
		<u>0,1 %</u>	<u>0,3 %</u>	<u>0,5%</u>
Baixa	7,00	6,31	6,19	5,64
Média	12,50	11,96	11,48	10,37
Alta	25,00	23,08	22,96	22,86
D910	14,30	14,38	14,50	14,11
D912	9,40	9,41	10,60	9,50
D913	5,00	5,58	6,47	4,53
D915	21,20	23,85	21,93	20,92
PBI27	7,40	7,69	7,70	6,82
PBI28	6,80	7,33	7,19	5,96
PBI29	7,10	7,83	7,50	6,85

PBI 10	8,90	9,61	9,07	7,67
MAS 1	5,90	4,63	4,45	4,15
MAS 2	14,50	14,46	15,33	14,47
MAS 3	23,10	22,60	23,07	23,65
D913X2	2,50	2,45	2,46	2,17
Média	11,37	11,41	11,39	10,64

Tabela 20. Concentração Variável de Brij-35 em R1

Amostras	IMx ($\mu\text{mol/L}$)	Resultados de Catch ($\mu\text{mol/L}$) como uma função da concentração de Brij-35 em R1			
		0,025 %	0,05%	0,1 %	0,5%
1	5,88	5,03	5,35	5,26	5,09
2	14,57	15,46	16,20	15,92	15,60
3	23,52	24,66	24,89	23,67	24,02
2	6,49	6,80	7,04	8,44	10,74
18	10,15	10,72	11,29	9,95	10,42
21	4,62	4,86	5,84	5,73	4,96
32	8,90	8,17	8,38	8,67	8,43
Média	10,59	10,81	11,28	11,09	11,32

Tabela 21. SISTEMA DE CBS/CBL/LDH: Componentes do Reagente	
Agente químico	Concentração
Reagente 1	
TRIS	250 mM
EDTA	2,5 mM
Serina	1,295 mM
Lactato desidrogenase	>800 U/L
NADH	1,06 mM
Brij 35	0,025% w/v
Azida de sódio	7,7mM
pH = 8,2	
Reagente SR1	

TCEP	26,3 mM
Reagente SR2	
CBS	28,5 KU/L
CBL	9,4 KU/L
Glicerol	10%
Sorbitol	1%
Fosfato de piridoxal	5 μ M
Azida de sódio	7,7mM
Fosfato de potássio	100 mM
pH = 7,6	

Tabela 22. Dados de correlação com o melhor aperfeiçoamento

Amostra	IMx (μ mol/L)L)	Catch (μ mol)
1	5,90	5,15
2	14,57	15,36
3	23,52	23,52
701	17,95	17,03
702	11,51	11,55
703	11,81	12,97
704	10,13	10,64
705	22,37	21,87
706	16,97	16,79
707	7,76	7,76
708	9,35	9,90
709	7,33	6,60
710	7,24	6,90
711	8,50	8,54
712	19,93	19,00
713	6,82	6,04
715	6,91	6,93
716	7,35	7,05
717	9,44	9,26
718	14,16	15,61

719	5,73	5,25
720	6,32	6,00
721	11,30	12,75
722	16,23	17,55
723	11,77	12,11
724	8,39	9,72
725	10,17	11,48
726	6,69	6,14
727	8,01	7,50
728	10,45	10,64
729	11,73	11,27
730	14,39	14,87
731	8,61	8,76
732	7,56	7,67
733	7,35	7,56
734	6,54	8,34
735	8,39	7,91
Média	10,79	10,92
Inclinação		1,0035
Parada		0,0195
R		0,9873

Quando Brij-35 e EDTA substituíram Triton X-100 e lipase mais α -ciclodextrina, houve um pouco de clareamento das misturas de reação turvas. No entanto, talvez não muito quanto no caso quando lipase e alfa-ciclodextrina foram também usadas. Importante, as absorbâncias a 340 nm rapidamente estabilizaram com taxas zero de mudança. Desse modo, quanto SR2 (R3) foi adicionado, a taxa de produção de piruvato é precisamente medida e resultados precisos são obtidos mesmo em casos de amostras que parecem leite. Esse é até mesmo o caso quando o tempo entre a adição de R1 e SR2 (R3) é diminuído em 2-4 minutos, o que pode ser necessário para aplicar o ensaio de homocisteína da presente invenção a outros instrumentos automatizados.

Exemplo 11

Resultados da Mudança do Agente de Redução para TCEP e Alterações na concentração de TCEP

Para este exemplo, o agente de redução DTE foi substituído com cloridrato de Tris (2-carboxietilfosfina) (TCEP). TCEP tem a vantagem de ser estável em água purificada por um período prolongado de tempo. A substituição de DTE com TCEP reduziu a reação de ausência de reagente de a partir de cerca de 12 a 15 mA/min para cerca de 4 a 5 mA/min. A ausência de reagente menor permite melhor precisão do ensaio de homocisteína. Para encontrar a concentração ótima de TCEP para o ensaio de homocisteína, uma faixa de concentração foi testada. Os resultados desses experimentos são dados na Tabela 23.

Tabela 23. Concentrações de TCEP Variáveis em SR1

Resultados de Homocisteína ($\mu\text{mol/L}$)

	IMx	Ensaio de Catch					
SR1 Formulação		A	B	C	D	E	F
MAS 1	5,88	6,37	6,18	5,48	5,51	4,42	4,17
MAS 2	14,57	16,49	15,67	15,95	16,03	15,80	14,77
MAS 3	23,52	23,19	21,98	23,33	25,11	24,02	23,09
PBI20	7,2	5,81	6,24	7,81	8,00	6,95	8,33
PBI22	7,8	7,61	7,66	8,28	8,69	8,44	8,23
PBI36	5,1	4,16	4,61	4,71	5,05	5,18	4,71
PBI39	4,6	3,11	4,25	4,38	4,47	3,68	4,09
Doreen 709	7,33	6,68	6,64	6,71	7,28	6,23	6,43
Média	9,50	9,17	9,15	9,58	10,02	9,34	9,22

Concentrações de TCEP: A=6,3 mM; B=13,85 mM; C=26,44mM; D=32,74mM; E=39,03mM; F=52,88mM.

Exemplo 12

Determinação do Efeito de Mudança do Tampão R3 para Fosfato e a Adição de Glicerol ao Tampão

A fim de se ter misturas de enzima que tivessem estabilidade mais longa e compatibilidade de ensaio, a formulação de enzima foi mudada

para uma mistura que provê vida de prateleira significativamente mais longa do que a formulação anterior. As mudanças significantes envolviam substituição do tampão Tris com um fosfato e adição de glicerol ao tampão. Fosfato de potássio em concentrações variando de 50 mM a 500 mM em pH 7,6
5 foi usado e concentrações de glicerol variando de 0,5% a 15,0% (v/v) foram usadas. Como um resultado dessas mudanças, a vida de prateleira foi aumentada significativamente de semanas a mais de um ano a 4° C. Em formas preferidas, fosfato de potássio pode variar a partir de cerca de 50 mM a cerca de 250 mM. Com mais preferência, fosfato de potássio pode variar a
10 partir de cerca de 75 mM a cerca de 150 mM. Uma concentração particularmente eficaz de fosfato de potássio neste experimento foi 100 mM. Glicerol pode variar a partir de cerca de 1-15%. Com mais preferência, esta faixa é a partir de cerca de 5-13%. Uma concentração particularmente eficaz de glicerol neste experimento foi 10%.

15 Exemplo 13

Resultados Obtidos Usando Instrumentos Diferentes

Para determinar o aperfeiçoamento global resultante de todas as mudanças no ensaio, avaliações de precisão foram feitas em vários instrumentos através de protocolo escrito que é específico para tal instrumento. A
20 Tabela 24 descreve os parâmetros e ajustes usados de acordo com a presente invenção com Roche Hitachi 911 e a Tabela 25 descreve os mesmos parâmetros e ajustes quando Beckman CX-5 é usado. Abaixo estão as tabelas mostrando os resultados desses testes de precisão. Esses resultados são significativamente melhores do que os que foram obtidos com as formu-
25 lações anteriores do ensaio. Nos instrumentos Hitachi 911 (Tabela 26) e Beckman CX5 (Tabela 27) cada amostra mostrada foi realizada 20X e a precisão de realização foi determinada. A V.C. percentual para amostras tão baixas quanto 5,92 $\mu\text{mol/L}$ foi 3,31% e as amostras na faixa de 23,01 $\mu\text{mol/L}$ a 25,4 $\mu\text{mol/L}$ foi 1,9% a 2,03%. Uma precisão total (Tabela 28) entre 7,3% e
30 2,6% foi obtida em amostras com valores de homocisteína de 4,6 $\mu\text{mol/L}$ e 27,0 $\mu\text{mol/L}$ no Cobas MIRA Plus. Cada amostra foi realizada em duplicata, 2x por dia por um total de 20 dias.

Tabela 24. Parâmetros do Método de Homocisteína Catch para o Roche Hitachi 911

Teste	THCY
Código de Ensaio	Taxa-A, 15
Comprimento de onda (2º/Primário)	376/340
Ponto de Ensaio	35-49-0-0
Soro	
Vol. da amostra (Normal)	28
Vol. da amostra (Diminuição)	20
Vol. da amostra (Aumento)	30
Urina	
Vol. da amostra (Normal)	10
Vol. da amostra (Diminuição)	10
Vol. da amostra (Aumento)	10
Limite ABS.	0-0-Diminuição
Limite pró-zona	0-0-Inferior
Reagente	
T1	200µL - 0-0-00322-0
T2	25µL - 0-0-00322-0
T3	0-0-0-00322-0
Tipo de Calibragem	Linear-2-2-0
Intervalo automático	
Ausência	0
Duração	0
Ponto 2	0

Completo	0
Mudança automática	
Muito	Cancelar
Garrafa	Cancelar
Selecionar testes através do teclado:	ENTER
Limite padrão	100
Limite de duplicata	1000
Limite de sensibilidade	0
Limite de ABS S1	(-32000) (32000)
Limite compensado	Ausência
PÁGINA 2 DO PARÂMETRO	
Teste	THCY - 00322
Nome do teste	Unidade de THCY: $\mu\text{mol/L}$
Modo dos dados	já programado (On board)
Nome da descrição	Homocisteína
Intervalo de controle	0
Fator do instrumento ($Y=aX+b$)	
A	1
B	0
Valores esperados	Definido pelo usuário
Limite técnico	
Soro	0-10000
Urina	(-99999) (999999)
STD	Conc.- Pos -Amostra- Pre.- Dil.-Calib.
1	0,0-18-28-0-0-501
2	25,2- 26-28-0-0-026
3	0

4	0
5	0
6	0

Para este experimento, T1 é preparado misturando R1 e água desionizada na razão de 9 para 8,1. Os reagentes T2 e T4 correspondem aos reagentes SR1 e SR2, respectivamente.

Tabela 25. Parâmetros do Método de Homocisteína Catch para o Beckman

5 CX-5

Nome do Agente Químico:	HOMOCISTEÍNA
Nome do teste	HOMO
Fator de cálculo:	0
Tipo de Reação:	TAXA 1
Modelo Matemático:	Linear
Limite do Tempo de Cal:	24 horas
Direção da Reação:	Diminuição
Nº de Calibradores:	2
Unidades:	µmol/L
Precisão Decimal	X.XX
Comprimento de Onda Primário:	340nm
Comprimento de Onda Secundário:	380nm
Volume da Amostra:	25 µL
Reagente de injeção primária:	
A	179 µL
B	22 µL
Reagente de Injeção Secundária:	
C	14 µL
Tempo de Adição:	592 segundos
CALIBRADORES	
Nº 1	0,00

Nº 2	24,8
Duração multiponto	
1-2:	-0,001
AUSÊNCIA DO REAGENTE	
Leitura inicial:	100 segundos
Leitura final:	200 segundos
Limite ABS Inferior:	-1,5
Limite ABS Superior:	1,5
FAIXA ÚTIL	
Limite Inferior:	0,00
Limite Superior:	99999,00
DEPLEÇÃO DO SUBSTRATO	
Taxa Inicial:	-99,999
ABS Delta	1,5

Para este exemplo, o Reagente A é preparado misturando R1 e água desionizada na razão de 9 para 8,1. Os reagentes B e C correspondendo aos reagentes SR1 e SR2 de MIRA.

Tabela 26. Precisão de Realização Interna em Hitachi 911

		Realização Interna
Baixa	Desvio padrão	0,224
Média = 8,3 $\mu\text{mol/L}$	% de V.C.	2,17
Média	Desvio padrão	0,324
Média = 11,9 $\mu\text{mol/L}$	% de V.C.	2,71
Alta	Desvio padrão	0,516
Média = 25,4 $\mu\text{mol/L}$	% de V.C.	2,03

Tabela 27. Precisão de Realização Interna em Beckman CX5

		Realização Interna
Baixa Média = 5,92 $\mu\text{mol/L}$	Desvio padrão	0,196
	% de V.C.	3,31
Média Média = 11,12 $\mu\text{mol/L}$	Desvio padrão	0,195
	% de V.C.	1,70
Alta Média = 23,01 $\mu\text{mol/L}$	Desvio padrão	0,437
	% de V.C.	1,90

Tabela 28. Precisão Total do Roche MIRA-Plus

		Dentro da Realização	Entre a Realização	Entre o Dia	Total
Baixa Média = 4,6 $\mu\text{mol/L}$	Desvio padrão	0,31	0,14	0,04	0,34
	% de V.C.	6,6	3,1	0,8	7,3
Média Média = 11,6 $\mu\text{mol/L}$	Desvio padrão	0,40	0,08	0,23	0,47
	% de V.C.	3,5	0,7	2,0	4,0
Alta Média = 27,0 $\mu\text{mol/L}$	Desvio padrão	0,44	0,39	0,39	0,71
	% de V.C.	1,6	1,5	1,4	2,6

Exemplo 14

Adaptabilidade do Ensaio a um Sistema de 2 Reagentes

5

A presente invenção pode ser também adaptada para sistema que usa apenas dois reagentes. Isso torna a invenção adaptável para uma faixa mais ampla de instrumentos incluindo aqueles que podem usar apenas

dois reagentes. A Tabela 29 mostra os conteúdos do reagente do sistema de dois reagentes e a Tabela 30 mostra os parâmetros de MIRA plus de como o ensaio foi realizado naquele analisador de agente químico. São mostrados na Tabela 31 os dados de comparação obtidos usando o sistema de 3 reagentes versus o sistema de 2 reagentes.

5

Tabela 29: SISTEMA DE CICLIZAÇÃO DE CBS/CBL/LDH: Componentes do Reagente para 2 Reagentes	
Agente Químico	Concentração
Reagente 1	
TRIS	250 mM
EDTA	2,5mM
Serina	1,295 mM
Lactato desidrogenase	>800 U/L
NADH	1,06 mM
Brij 35	0,025% v/v
Azida de sódio	7,7mM
TCEP	4,05 mM
pH = 8,2	
Reagente SR1	
CBS	28,5 KU/L
CBL	9,4 KU/L
Glicerol	10%
Sorbitol	1%
Fosfato de piridoxal	5 µM
Azida de sódio	7,7 mM
Fosfato de potássio	100 mM
pH = 7,6	

Tabela 30: Sistema de Ciclização de CBS/CBL/LDH: Parâmetros de Cobas MIRA			
Parâmetro	Ajuste	Parâmetro	Ajuste
GERAL			
Modo de medição	Absorção	Fator de conversão	1,00
Modo de reação	R-S-SR1	Compensação	0,00
Modo de calibragem	Regressão Linear		
Ausência de reagente	Reag/Sol	Faixa de teste Baixa	operante
Limpador	Nenhum	Alta	operante
Comprimento de onda	340 nm	Faixa normal Baixa	não
Posição decimal	2	Alta	não
Unidade	µmol/L		
		Número de etapas	1
ANÁLISE			
Fator de Pós-dil.	não	Etapa A de cálculo	cinética
Fator de conc.	não	Leituras Primeira	19
		Última	30
Ciclo da amostra	1	Limite de reação	não
Volume	20,0 uL		
Nome do diluente	H ₂ O		
		CALIBRAGEM	
Volume	45,0 µL	Intervalo de calibragem	cada realização
Ciclo do reagente	1	Ausência Sol-pos	1
Volume	137 µL	Faixa de reagente Baixa	não
		Alta	não
Ciclo de R1 inicial	16	Faixa de ausência Baixa	não
Volume	13 µL	Alta	não
Nome do diluente	H ₂ O		
Volume	10 µL	Posição padrão	1
CÁLCULO		1	0,0 µmol/L
Limite da amostra	Não	2	8,5 µmol/L
Direção de reação	Diminuição	3	17,2 µmol/L
Checagem	Inoperante	4	25,2 µmol/L
Excesso de antígeno	Não	5	43,0 µmol/L
		6	não
		7	não
		Réplica	duplicata
		Desvio	
		Padrão de correção	não
		Controle	
		Posição CS1	não
		Posição CS2	não
		Posição CS3	não

Tabela 31. Comparação do Sistema de 2 Reagentes versus Sistema de 3 Reagentes

Amostras	IMx ($\mu\text{mol/L}$)	Ensaio de Hci da Catch Inc. ($\mu\text{mol/L}$)	
		Sistema de 2 Reagentes	Sistema de 3 Reagentes
MAS 1	5,88	5,55	5,17
MAS 2	14,57	16,14	15,70
MAS 3	23,52	23,99	23,47
P10	8,90	9,32	9,65
P11	7,60	7,45	7,27
P33	7,80	8,11	8,29
P34	5,93	5,21	5,69
754+848	16,00	15,68	16,15
Média	11,28	11,43	11,42

Exemplo 15

Adaptabilidade da Presente Invenção para Uso com Calibragem de Ponto

5 Único

O ensaio de homocisteína da presente invenção também foi adaptado usando um ponto de calibragem único, com o calibrador zero servindo como a ausência. A Tabela 32 abaixo mostra os parâmetros para realização de uma calibragem de ponto único no instrumento MIRA. Os dados abaixo (Tabela 33) mostram que uso de calibragem por ponto único no modo de média de inclinação gera resultados que são substancialmente equivalentes ao uso da curva de calibragem multiponto.

Tabela 32: Sistema de Ciclização de CBS/CBL/LDH: Parâmetros Cobas MIRA para Calibragem de Ponto Único			
Parâmetro	Ajuste	Parâmetro	Ajuste
GERAL			
Modo de medição	Absorção	Fator de conversão	1,00
Modo de reação	R-S-SR1	Compensação	0,00
Modo de calibragem	Regressão Linear		
Ausência de reagente	Reag/Sol	Faixa de teste Baixa	operante
Limpador	Nenhum	Alta	operante
Comprimento de onda	340 nm	Faixa normal Baixa	não
Posição decimal	2	Alta	não
Unidade	µmol/L		
		Número de etapas	1
ANÁLISE			
Fator de Pós-dil.	não	Etapa A de cálculo	cinética
Fator de conc.	não	Leituras Primeira	19
		Última	30
Ciclo da amostra	1	Limite de reação	não
Volume	20,0 uL		
Nome do diluente	H ₂ O		
		CALIBRAGEM	
Volume	45,0 µL	Intervalo de calibragem	cada realização
Ciclo do reagente	1	Ausência Sol-pos	1
Volume	137 µL	Faixa de reagente Baixa	não
		Alta	não
Ciclo de R1 inicial	16	Faixa de ausência Baixa	não
Volume	13 µL	Alta	não
Nome do diluente	H ₂ O		
Volume	10 µL	Posição padrão	4
		1	25,2 µmol/L
CÁLCULO			
Limite da amostra	Não	2	não
Direção de reação	Diminuição	3	não
Checagem	Inoperante	Réplica	duplicata
Excesso de antígeno	Não	Desvio	
		Padrão de correção	não
		Controle	
		Posição CS1	não
		Posição CS2	não
		Posição CS3	não

Tabela 33. Calibragem de Ponto Único Versus Multi-ponto

Amostras	IMx ($\mu\text{mol/L}$)	Ensaio Hci da Catch Inc. ($\mu\text{mol/L}$)	
		Calibragem de Ponto Único	Calibragem Multiponto
MAS 1	5,88	5,03	5,17
MAS 2	14,57	15,18	15,70
MAS 3	23,52	22,97	23,47
PBI 10	8,90	8,82	9,65
PBI 11	7,60	8,26	7,27
PBI 33	7,80	8,05	8,29
PBI 34	5,93	5,80	5,69
754+848	16,00	15,17	16,15
Média	11,28	11,16	11,42

Exemplo 16Estudo de Ensaios de Homocisteína Descritos no WO 0/28071

- A publicação PCT WO 00/28071 descreve em detalhes dois ensaios de homocisteína. Na "primeira modalidade", o ensaio é realizado sem uma etapa de redução. Para converter este método em um útil para medições de homocisteína de plasma humano, ou uma etapa de redução fora de serviço separada ou uma homogênea deve ser incorporada. A Publicação WO 00/28071 descreve uma etapa de redução fora de serviço separada talvez porque um sistema de ciclização de piruvato oxidase seja usado. A etapa confere uma incubação de 20 minutos antes que o espécime reduzido possa ser analito, o que aumenta bastante o tempo de ensaio total e custo de trabalho. Além disso, se a amostra tiver que se ensaiada por mais de um analisado no laboratório clínico, a amostra de soro ou plasma primária deve ser dividida em duas alíquotas, uma para o teste de homocisteína e uma para o outro teste de laboratório dirigido. Em contraste, a presente invenção permite redução homogênea uma vez que um sistema de ciclização de LDH é usado (Exemplo 7).

- Aqui, no Exemplo 16 (Tabela 34), é mostrado que DTT de fato interfere com o sistema de detecção de piruvato oxidase descrito na "segun-

da modalidade" do WO 00/28071. Em particular, as composições reagente e de DTT descritas na "segunda modalidade" foram usadas, e ensaios com e sem DTT foram realizados contra padrões de piruvato conhecidos (12,5, 25 e 50 $\mu\text{mol/L}$) usando um instrumento Cobas FARAS. No caso do teste de DTT, 40 μL de cada padrão foram misturados com 30 μL de solução de DTT, seguido por incubação por 100 segundos. Em seguida, 90 μL de reagente de piruvato oxidase foram adicionados e incubados por 30 segundos. As leituras de absorbância foram então tomadas em 30, 60, 90, 120, 150, 180 e 210 segundos. No "teste sem DTT", o mesmo procedimento foi seguido exceto que nenhum DTT foi adicionado. A Tabela 34 descreve os resultados deste experimento usando as leituras de 210 segundos. As Figuras 15 e 16 ilustram ainda os resultados deste teste.

Tabela 34. Efeito do DTT sobre o sistema de detecção de piruvato PO/HRP		
	SEM DTT	COM DTT
Ausência	0,0021	-0,0021
Fator	2212	-11765
Padrão 50 $\mu\text{mol/L}$	51,5	35,3
Padrão 25 $\mu\text{mol/L}$	24,1	0,0
Padrão 12,5 $\mu\text{mol/L}$	9,7	-21,2
Mudança delta a 30 segundos (padrão 50 μmol)	0,0643	-0,0062
Mudança delta a 90 segundos (padrão 50 μmol)	0,0890	-0,0103
Mudança delta a 120 segundos (padrão 50 μmol)	0,0903	-0,0113
Mudança delta a 210 segundos (padrão 50 μmol)	0,0906	-0,0113

Esses dados demonstram claramente a necessidade da etapa de redução separada descrita na "segunda modalidade" do WO 00/28071. A presença de redutor interfere com o sistema de detecção de piruvato oxidase usado para o ensaio de piruvato. Desse modo, os dados apresentados aqui confirmam que a etapa de redução fora de serviço separada que consome muito tempo é essencial na "segunda modalidade". Em adição, a etapa de redução fora de serviço descrita no WO 00/28071 vai provavelmente elevar significativamente a complexidade do ensaio e custo relativo à presente invenção.

Embora a invenção acima tenha descrito em alguns detalhes a título de ilustração e exemplo para propósitos de esclarecimento de compreensão, será óbvio que certas mudanças e modificações podem ser praticadas dentro do escopo das reivindicações apenas. O escopo da invenção

5 deve, então, ser determinado não com referência à descrição acima, mas pelo contrário, deve ser determinado com referência às reivindicações apenas junto com seu escopo completo de equivalentes.

Todas as publicações e documentos de patente citados neste pedido são incorporados aqui a título de referência em sua totalidade para

10 todos os propósitos até o mesmo ponto como se cada publicação individual ou documento de patente fosse individualmente indicado.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Axis-Shield Diagnostics Limited

<120> MÉTODOS DE ENSAIO DE CICLIZAÇÃO ENZIMÁTICA PARA HOMOCISTEÍNA E
CISTATIONINA
E DE TESTE DE AMOSTRAS CONTENDO HOMOCISTEÍNA, BEM COMO KIT DE TESTE
PARA
QUANTIFICAR HOMOCISTEÍNA E ENSAIOS DE AVALIAÇÃO DA QUANTIDADE DE
HOMOCISTEÍNA

<130> 30865

<140> PI0213936-7

<141> 06/11/2002

<150> US 10/012,762

<151> 06/11/2001

<160> 21

<170> PatentIn versão 3.1

<210> 1

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador PCR

<220>

<221> característica variada

<223> Descrição de Sequência Artificial: Iniciador PCR

<400> 1

cgacggatcc gatggcggac aaaaagcttg

30

<210> 2

<211> 29

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador PCR

<220>

<221> característica variada

<223> Descrição de Sequência Artificial: Iniciador PCR

<400> 2

cgcagcagct gttatacaat tcgcgcaaa

29

<210> 3

<211> 29

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador PCR

<220>

<221> característica variada

<223> Descrição de Sequência Artificial: Iniciador PCR

<400> 3

cggggatcct gatgcatgca tgataagga

29

<210> 4

<211> 27

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador PCR

<220>

<221> característica variada

<223> Descrição de Sequência Artificial: Iniciador PCR

<400> 4

cggcattacc gtttcactaa tttatttg

27

<210> 5

<211> 25

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador PCR

<220>

<221> característica variada

<223> Descrição de Sequência Artificial: Iniciador PCR

<400> 5

gttggatccg gcattaccgt ttcac

25

<210> 6

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador PCR

<220>

<221> característica variada

<223> Descrição de Sequência Artificial: Iniciador PCR

<400> 6

ggtggatcca tcaatagata cgtacgtcct

30

<210> 7

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador PCR

<220>

<221> característica variada

<223> Descrição de Sequência Artificial: Iniciador PCR

<400> 7

tttttagttta tgtatgtgtt ttttg

25

<210> 8

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador PCR

<220>

<221> característica variada

<223> Descrição de Sequência Artificial: Iniciador PCR

<400> 8

aacacatata taaactaaaa atgactaaat ctgagcagca a

41

<210> 9

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador PCR

<220>

<221> característica variada

<223> Descrição de Sequência Artificial: Iniciador PCR

<400> 9

atgatgatga tgatgatgac ctgctaagta gctcagtaa

39

<210> 10

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador PCR

<220>

<221> característica variada

<223> Descrição de Sequência Artificial: Iniciador PCR

<400> 10

catcatcatc atcatcatta aataagaacc cacgct

36

<210> 11

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Consensus MetR receptor Sequence

<220>

<221> característica variada

<223> Descrição de Sequência Artificial: Sequência de receptor MetR Consenso

<400> 11

gttaatgttg aacaaatctc atgttgcggtg

30

<210> 12

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador PCR

<220>

<221> característica variada

<223> Descrição de Sequência Artificial: Iniciador PCR

<400> 12

gcgggtcgac tatgactaaa tctgagcagc aagcc

35

<210> 13

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador PCR

<220>

<221> característica variada

<223> Descrição de Sequência Artificial: Iniciador PCR

<400> 13

gcgtgcggcc gcgttatgct aagtagctca g

31

<210> 14

<211> 1524

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 14

```

atgactaaat ctgagcagca agccgattca agacataacg ttatcgactt agttggtaac 60
accccattga tcgcactgaa aaaattgcct aaggctttgg gtatcaaacc acaaatttat 120
gctaagctgg aactatacaa tccaggtggg tccatcaaag acagaattgc caagtctatg 180
gtggaagaag ctgaagcttc cggtagaatt catccttcca gatctactct gatcgaacct 240
acttctggta acaccggtat cgggtctagct ttaatcggcg ccatcaaagg ttacagaact 300
atcatcacct tgccggaaaa aatgtctaac gagaaagttt ctgtcctaaa ggctctgggt 360
gctgaaatca tcagaactcc aactgctgct gcctgggatt ctccagaatc acatattggg 420
gttgctaaga agttggaaaa agagattcct ggtgctgtta tacttgacca atataacaat 480
atgatgaacc cagaagctca ttactttggg actggtcgcg aaatccaaag acagctagaa 540
gacttgaatt tatttgataa tctacgcgct gttgttgctg gtgctgggtac tgggtgggact 600
attagcggta tttccaagta cttgaaagaa cagaatgata agatccaaat cgttgggtgct 660
gagggattcg gttcaatttt agcccaacct gaaaacttga ataagactga tatcactgac 720
tacaaagttg agggatttgg ttatgatatt gttcctcagg ttttggacag aaaattaatt 780
gatgtttggg ataagacaga cgacaagcct tctttcaaat acgccagaca attgatttct 840
aacgaaggtg tcttgggtggg tggttcttcc ggttctacct tcaactgcgg tgtgaaatac 900
tgtgaagacc accctgaact gactgaagat gatgtcattg ttgccatatt cccagattcc 960
atcaggtcgt acctaacc aaattcgtgat gacgaatggt tgaaaaagaa caatttgtgg 1020
gatgatgacg tgttggcccg ttttgactct tcaaagctgg aggccttcgac gacaaaatac 1080
gctgatgtgt ttggtaacgc tactgtaaag gatcttcaact tgaaaccggg tgtttccggt 1140
aaggaaaccg ctaaggtcac tgatgttatc aagatattaa aagacaatgg ctttgaccaa 1200
ttgcctgtgt tgactgaaga cggcaagttg tctggttttag ttactctctc tgagcttcta 1260
agaaaactat caatcaataa ttcaaacaac gacaacacta taaagggtaa atacttggac 1320
ttcaagaaat taaacaattt caatgatgtt tcctcttaca acgaaaataa atccggtaag 1380
aagaagttta ttaaattcga tgaaaactca aagctatctg acttgaatcg tttctttgaa 1440
aaaaactcat ctgccgttat cactgatggc ttgaaaccaa tccatatcgt tactaagatg 1500
gatttactga gctacttagc ataa                                     1524

```

<210> 15

<211> 43

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador PCR

<220>

<221> característica variada

<223> Descrição de Sequência Artificial: Iniciador PCR

<400> 15

ctatatcgta ataatgacta aatctgagca gcaagccgat tca

43

<210> 16
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Iniciador PCR

<220>
 <221> característica variada
 <223> Descrição de Sequência Artificial: Iniciador PCR

<400> 16
 agggctcgag gatcccgggg gtgctattat gaatgcacgg 40

<210> 17
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Iniciador PCR

<220>
 <221> característica variada
 <223> Descrição de Sequência Artificial: Iniciador PCR

<400> 17
 cggggatccg acgttttgcc cgcaggcggg aaacc 35

<210> 18
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Iniciador PCR

<220>
 <221> característica variada
 <223> Descrição de Sequência Artificial: Iniciador PCR

<400> 18
 agatttagtc attattacga tatagttaat agttgatag 39

<210> 19

<211> 428

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 19

```

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

```

```

305              310              315              320
His Pro Ala Leu Pro Gly Ser Lys Gly His Glu Phe Trp Lys Arg Asp
              325              330              335
Phe Thr Gly Ser Ser Gly Leu Phe Ser Phe Val Leu Lys Lys Lys Leu
              340              345              350
Asn Asn Glu Glu Leu Ala Asn Tyr Leu Asp Asn Phe Ser Leu Phe Ser
              355              360              365
Met Ala Tyr Ser Trp Gly Gly Tyr Glu Ser Leu Ile Leu Ala Asn Gln
              370              375              380
Pro Glu His Ile Ala Ala Ile Arg Pro Gln Gly Glu Ile Asp Phe Ser
385              390              395              400
Gly Thr Leu Ile Arg Leu His Ile Gly Leu Glu Asp Val Asp Asp Leu
              405              410              415
Ile Ala Asp Leu Asp Ala Gly Phe Ala Arg Ile Val
              420              425

```

<210> 20

<211> 1252

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 20

```

Met Ser Pro Ile Leu Gly Tyr Trp Lys Ile Lys Gly Leu Val Gln Pro
  1              5              10              15
Thr Arg Leu Leu Leu Glu Tyr Leu Glu Lys Tyr Glu Glu His Leu
              20              25              30
Tyr Glu Arg Asp Glu Gly Asp Lys Trp Arg Asn Lys Lys Phe Glu Leu
              35              40              45
Gly Leu Glu Phe Pro Asn Leu Pro Tyr Tyr Ile Asp Gly Asp Val Lys
              50              55              60
Leu Thr Gln Ser Met Ala Ile Ile Arg Tyr Ile Ala Asp Lys His Asn
65              70              75              80
Met Leu Gly Gly Cys Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ile Ser Met Leu Glu
              85              90              95
Gly Ala Val Leu Asp Ile Arg Tyr Gly Val Ser Arg Ile Ala Tyr Ser
              100              105              110
Lys Asp Phe Glu Thr Leu Lys Val Asp Phe Leu Ser Lys Leu Pro Glu
              115              120              125
Met Leu Lys Met Phe Glu Asp Arg Leu Cys His Lys Thr Tyr Leu Asn
              130              135              140
Gly Asp His Val Thr His Pro Asp Phe Met Leu Tyr Asp Ala Leu Asp
145              150              155              160
Val Val Leu Tyr Met Asp Pro Met Cys Leu Asp Ala Phe Pro Lys Leu
              165              170              175
Val Cys Phe Lys Lys Arg Ile Glu Ala Ile Pro Gln Ile Asp Lys Tyr
              180              185              190

```

Leu	Lys	Ser	Ser	Lys	Tyr	Ile	Ala	Trp	Pro	Leu	Gln	Gly	Trp	Gln	Ala	195	200	205
Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Asp	His	Pro	Pro	Lys	Ser	Asp	Leu	Glu	Val	Leu	210	215	220
Phe	Gln	Gly	Pro	Leu	Gly	Ser	Pro	Gly	Ile	Pro	Gly	Ser	Thr	Met	Thr	225	230	235
Lys	Ser	Glu	Gln	Gln	Ala	Asp	Ser	Arg	His	Asn	Val	Ile	Asp	Leu	Val	245	250	255
Gly	Asn	Thr	Pro	Leu	Ile	Ala	Leu	Lys	Lys	Leu	Pro	Lys	Ala	Leu	Gly	260	265	270
Ile	Lys	Pro	Gln	Ile	Tyr	Ala	Lys	Leu	Glu	Leu	Tyr	Asn	Pro	Gly	Gly	275	280	285
Ser	Ile	Lys	Asp	Arg	Ile	Ala	Lys	Ser	Met	Val	Glu	Glu	Ala	Glu	Ala	290	295	300
Ser	Gly	Arg	Ile	His	Pro	Ser	Arg	Ser	Thr	Leu	Ile	Glu	Pro	Thr	Ser	305	310	315
Gly	Asn	Thr	Gly	Ile	Gly	Leu	Ala	Leu	Ile	Gly	Ala	Ile	Lys	Gly	Tyr	325	330	335
Arg	Thr	Ile	Ile	Thr	Leu	Pro	Glu	Lys	Met	Ser	Asn	Glu	Lys	Val	Ser	340	345	350
Val	Leu	Lys	Ala	Leu	Gly	Ala	Glu	Ile	Ile	Arg	Thr	Pro	Thr	Ala	Ala	355	360	365
Ala	Trp	Asp	Ser	Pro	Glu	Ser	His	Ile	Gly	Val	Ala	Lys	Lys	Leu	Glu	370	375	380
Lys	Glu	Ile	Pro	Gly	Ala	Val	Ile	Leu	Asp	Gln	Tyr	Asn	Asn	Met	Met	385	390	395
Asn	Pro	Glu	Ala	His	Tyr	Phe	Gly	Thr	Gly	Arg	Glu	Ile	Gln	Arg	Gln	405	410	415
Leu	Glu	Asp	Leu	Asn	Leu	Phe	Asp	Asn	Leu	Arg	Ala	Val	Val	Ala	Gly	420	425	430
Ala	Gly	Thr	Gly	Gly	Thr	Ile	Ser	Gly	Ile	Ser	Lys	Tyr	Leu	Lys	Glu	435	440	445
Gln	Asn	Asp	Lys	Ile	Gln	Ile	Val	Gly	Ala	Asp	Pro	Phe	Gly	Ser	Ile	450	455	460
Leu	Ala	Gln	Pro	Glu	Asn	Leu	Asn	Lys	Thr	Asp	Ile	Thr	Asp	Tyr	Lys	465	470	475
Val	Glu	Gly	Ile	Gly	Tyr	Asp	Phe	Val	Pro	Gln	Val	Leu	Asp	Arg	Lys	485	490	495
Leu	Ile	Asp	Val	Trp	Tyr	Lys	Thr	Asp	Asp	Lys	Pro	Ser	Phe	Lys	Tyr	500	505	510
Ala	Arg	Gln	Leu	Ile	Ser	Asn	Glu	Gly	Val	Leu	Val	Gly	Gly	Ser	Ser	515	520	525
Gly	Ser	Ala	Phe	Thr	Ala	Val	Val	Lys	Tyr	Cys	Glu	Asp	His	Pro	Glu	530	535	540
Leu	Thr	Glu	Asp	Asp	Val	Ile	Val	Ala	Ile	Phe	Pro	Asp	Ser	Ile	Arg	545	550	555
Ser	Tyr	Leu	Thr	Lys	Phe	Val	Asp	Asp	Glu	Trp	Leu	Lys	Lys	Asn	Asn			

				565					570					575					
Leu	Trp	Asp	Asp	Asp	Val	Leu	Ala	Arg	Phe	Asp	Ser	Ser	Lys	Leu	Glu				
			580						585					590					
Ala	Ser	Thr	Thr	Lys	Tyr	Ala	Asp	Val	Phe	Gly	Asn	Ala	Thr	Val	Lys				
			595					600					605						
Asp	Leu	His	Leu	Lys	Pro	Val	Val	Ser	Val	Lys	Glu	Thr	Ala	Lys	Val				
			610				615					620							
Thr	Asp	Val	Ile	Lys	Ile	Leu	Lys	Asp	Asn	Gly	Phe	Asp	Gln	Leu	Pro				
625						630					635				640				
Val	Leu	Thr	Glu	Asp	Gly	Lys	Leu	Ser	Gly	Leu	Val	Thr	Leu	Ser	Glu				
				645						650					655				
Leu	Leu	Arg	Lys	Leu	Ser	Ile	Asn	Asn	Ser	Asn	Asn	Asp	Asn	Thr	Ile				
			660					665				670							
Lys	Gly	Lys	Tyr	Leu	Asp	Phe	Lys	Lys	Leu	Asn	Asn	Phe	Asn	Asp	Val				
			675					680				685							
Ser	Ser	Tyr	Asn	Glu	Asn	Lys	Ser	Gly	Lys	Lys	Lys	Phe	Ile	Lys	Phe				
			690				695					700							
Asp	Glu	Asn	Ser	Lys	Leu	Ser	Asp	Leu	Asn	Arg	Phe	Phe	Glu	Lys	Asn				
705						710				715					720				
Ser	Ser	Ala	Val	Ile	Thr	Asp	Gly	Leu	Lys	Pro	Ile	His	Ile	Val	Thr				
				725						730					735				
Lys	Met	Asp	Leu	Leu	Ser	Tyr	Leu	Ala	Met	Thr	Lys	Ser	Glu	Gln	Gln				
			740					745					750						
Ala	Asp	Ser	Arg	His	Asn	Val	Ile	Asp	Leu	Val	Gly	Asn	Thr	Pro	Leu				
			755					760					765						
Ile	Ala	Leu	Lys	Lys	Leu	Pro	Lys	Ala	Leu	Gly	Ile	Lys	Pro	Gln	Ile				
			770				775					780							
Tyr	Ala	Lys	Leu	Glu	Leu	Tyr	Asn	Pro	Gly	Gly	Ser	Ile	Lys	Asp	Arg				
785						790					795				800				
Ile	Ala	Lys	Ser	Met	Val	Glu	Glu	Ala	Glu	Ala	Ser	Gly	Arg	Ile	His				
				805						810					815				
Pro	Ser	Arg	Ser	Thr	Leu	Ile	Glu	Pro	Thr	Ser	Gly	Asn	Thr	Gly	Ile				
			820					825					830						
Gly	Leu	Ala	Leu	Ile	Gly	Ala	Ile	Lys	Gly	Tyr	Arg	Thr	Ile	Ile	Thr				
			835					840					845						
Leu	Pro	Glu	Lys	Met	Ser	Asn	Glu	Lys	Val	Ser	Val	Leu	Lys	Ala	Leu				
			850				855					860							
Gly	Ala	Glu	Ile	Ile	Arg	Thr	Pro	Thr	Ala	Ala	Ala	Trp	Asp	Ser	Pro				
865						870					875				880				
Glu	Ser	His	Ile	Gly	Val	Ala	Lys	Lys	Leu	Glu	Lys	Glu	Ile	Pro	Gly				
				885						890				895					
Ala	Val	Ile	Leu	Asp	Gln	Tyr	Asn	Asn	Met	Met	Asn	Pro	Glu	Ala	His				
			900					905					910						
Tyr	Phe	Gly	Thr	Gly	Arg	Glu	Ile	Gln	Arg	Gln	Leu	Glu	Asp	Leu	Asn				
			915				920						925						
Leu	Phe	Asp	Asn	Leu	Arg	Ala	Val	Val	Ala	Gly	Ala	Gly	Thr	Gly	Gly				
			930				935						940						

```

Thr Ile Ser Gly Ile Ser Lys Tyr Leu Lys Glu Gln Asn Asp Lys Ile
945                      950                      955                      960
Gln Ile Val Gly Ala Asp Pro Phe Gly Ser Ile Leu Ala Gln Pro Glu
                      965                      970                      975
Asn Leu Asn Lys Thr Asp Ile Thr Asp Tyr Lys Val Glu Gly Ile Gly
                      980                      985                      990
Tyr Asp Phe Val Pro Gln Val Leu Asp Arg Lys Leu Ile Asp Val Trp
                      995                      1000                      1005
Tyr Lys Thr Asp Asp Lys Pro Ser Phe Lys Tyr Ala Arg Gln Leu Ile
1010                      1015                      1020
Ser Asn Glu Gly Val Leu Val Gly Gly Ser Ser Gly Ser Ala Phe Thr
1025                      1030                      1035                      1040
Ala Val Val Lys Tyr Cys Glu Asp His Pro Glu Leu Thr Glu Asp Asp
                      1045                      1050                      1055
Val Ile Val Ala Ile Phe Pro Asp Ser Ile Arg Ser Tyr Leu Thr Lys
                      1060                      1065                      1070
Phe Val Asp Asp Glu Trp Leu Lys Lys Asn Asn Leu Trp Asp Asp Asp
1075                      1080                      1085
Val Leu Ala Arg Phe Asp Ser Ser Lys Leu Glu Ala Ser Thr Thr Lys
1090                      1095                      1100
Tyr Ala Asp Val Phe Gly Asn Ala Thr Val Lys Asp Leu His Leu Lys
1105                      1110                      1115                      1120
Pro Val Val Ser Val Lys Glu Thr Ala Lys Val Thr Asp Val Ile Lys
                      1125                      1130                      1135
Ile Leu Lys Asp Asn Gly Phe Asp Gln Leu Pro Val Leu Thr Glu Asp
                      1140                      1145                      1150
Gly Lys Leu Ser Gly Leu Val Thr Leu Ser Glu Leu Leu Arg Lys Leu
1155                      1160                      1165
Ser Ile Asn Asn Ser Asn Asn Asp Asn Thr Ile Lys Gly Lys Tyr Leu
1170                      1175                      1180
Asp Phe Lys Lys Leu Asn Asn Phe Asn Asp Val Ser Ser Tyr Asn Glu
1185                      1190                      1195                      1200
Asn Lys Ser Gly Lys Lys Lys Phe Ile Lys Phe Asp Glu Asn Ser Lys
                      1205                      1210                      1215
Leu Ser Asp Leu Asn Arg Phe Phe Glu Lys Asn Ser Ser Ala Val Ile
1220                      1225                      1230
Thr Asp Gly Leu Lys Pro Ile His Ile Val Thr Lys Met Asp Leu Leu
1235                      1240                      1245
Ser Tyr Leu Ala
1250

```

<210> 21

<211> 1188

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 21

```

atggcggaca aaaagcttga tactcaactg gtgaatgcag gacgcagcaa aaaatacact 60
ctcggcgcg g taaatagcgt gattcagcgc gcttcttcgc tggctcttga cagtgtagaa 120
gccaaaaaac acgcgacacg taatcgcgcc aatggagagt tgttctatgg acggcgcgga 180
acgttaaccc atttctcctt acaacaagcg atgtgtgaac tgggaagggtg cgcaggctgc 240
gtgctatttc cctgcggggc ggcagcgggt gctaattcca ttcttgcttt tatcgaacag 300
ggcgatcatg tgttgatgac caacaccgcc tatgaaccga gtcaggattt ctgtagcaaa 360
atcctcagca aactgggcgt aacgacatca tggtttgatc cgctgattgg tgccgatatc 420
gttaagcatc tgcagccaaa cactaaaatc gtgtttctgg aatcgccagg ctccatcacc 480
atggaagtcc acgacgttcc ggcgattgtt gccgcgtac gcagtgtggt gccggatgcc 540
atcattatga tcgacaacac ctgggcagcc ggtgtgctgt ttaaggcgct ggattttggc 600
atcgaatgtt ctattcaagc cgccaccaa tatctggttg ggcattcaga tgcgatgatt 660
ggcactgccg tgtgcaatgc ccgttgctgg gagcagctac gggaaaatgc ctatctgatg 720
ggccagatgg tcgatgccga taccgcctat ataaccagcc gtggcctgcg cacattaggt 780
gtgcgtttgc gtcaacatca tgaaagcagt ctgaaagtgg ctgaatggct ggcagaacat 840
ccgcaagttg cgcgagttaa ccaccctgct ctgcctggca gttaaaggta cgaattctgg 900
aaacgagact ttacaggcag cagcgggcta ttttcctttg tgcttaagaa aaaactcaat 960
aatgaagagc tggcgaacta tctggataac ttcagtttat tcagcatggc ctactcgtgg 1020
ggcgggtatg aatcgttgat cctggcaa at caaccagaac atatcgccgc cattcgccca 1080
caaggcgaga tcgatttttag cgggaccttg attcgctgc atattggtct ggaagatgtc 1140
gacgatctga ttgccgatct ggacgccggt tttgcgcgaa ttgtataa 1188

```

REIVINDICAÇÕES

1. Método de ensaio de ciclização enzimática para avaliação da quantidade de homocisteína e/ou cistationina em uma amostra, caracterizado pelo fato de que compreende:

5 (a) contato da amostra contendo homocisteína e/ou cistationina para formar uma mistura de reação, com um agente de redução e cistationina β -sintase, L-serina, e cistationina β -liase, por um período de tempo suficiente para catalisar a conversão cíclica de homocisteína em cistationina e a reconversão de cistationina em homocisteína com a produção de piruvato e amônia;

10 (b) determinação da quantidade de piruvato e/ou amônia presente na mistura de reação; e

 (c) avaliação da quantidade de homocisteína e/ou cistationina que está(estão) presente(s) na amostra com base na quantidade de piruvato e/ou amônia produzida,

15 em que o dito agente de redução é cloridrato de tris-(carboxiletil)fosfina (TCEP).

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a L-serina é adicionada à mistura de reação para uma concentração final de 1 μ M a 50 mM.

20 3. Método de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que a L-serina é adicionada à mistura de reação para uma concentração final de 10 μ M a 40 mM.

 4. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a quantidade de piruvato é determinada através de conversão enzimática de piruvato em lactato.

25 5. Método de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que a conversão de piruvato em lactato é através da adição de lactato desidrogenase e NADH.

30 6. Método de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que a dita lactato desidrogenase é adicionada à mistura de reação para uma concentração final de 30 U/l a 5000 U/l.

7. Método de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que a dita lactato desidrogenase é adicionada à mistura de reação para uma concentração final de 30 U/l a 3000 U/l.

5 8. Método de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que a dita NADH é adicionada à mistura de reação para uma concentração final de 0,1 mM a 2 mM.

9. Método de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que a dita NADH é adicionada à mistura de reação para uma concentração final de 0,1 mM a 1,5 mM.

10 10. Método de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que a quantidade total de oxidação de NADH para NAD⁺ é determinada reagindo a NAD⁺ com um corante capaz de sofrer uma mudança de cor quando oxidado.

15 11. Método de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que o dito corante é selecionado do grupo consistindo em 5,5'-ditiobis(ácido 2-nitrobenzóico), 2,6-diclorofenolindofenol, um composto tetrazólio, metossulfato de fenazina ou metil viologen.

20 12. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a quantidade de piruvato é determinada através de conversão enzimática de piruvato em peróxido de hidrogênio.

13. Método de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que a dita enzima é piruvato oxidase.

25 14. Método de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que o dito ensaio compreende ainda uma peroxidase e um doador de hidrogênio solúvel em água, que quando sob doação de um hidrogênio forma um produto colorido estável que pode ser detectado espectrofotometricamente.

30 15. Método de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que o doador de hidrogênio solúvel em água é um derivado de N-alquil-N-sulfopropilanilina, em que o derivado de N-alquil-N-sulfopropilanilina é um sal de sódio de N-etil-N-(2-hidróxi-3-sulfopropil)-m-toluidina.

16. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo

fato de que o dito TCEP está presente em uma quantidade de 6 mM a 53 mM.

17. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a quantidade de amônia é determinada através de um sensor de amônia, um ensaio de microdifusão, um ensaio colorimétrico ou um ensaio de enzima.

18. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende ainda a etapa de tratar a solução com um reagente compreendendo cistationina γ -liase, por um período de tempo suficiente para converter qualquer cistationina presente na solução em α -cetoglutarato.

19. Método de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que a dita etapa de tratamento é realizada antes das etapas (a)-(c).

20. Método de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que compreende ainda a etapa de eliminação substancialmente de toda a atividade de cistationina γ -liase após a dita etapa de tratamento e antes de realizar as etapas (a)-(c).

21. Método de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que a dita atividade de cistationina γ -liase é eliminada através de aquecimento.

22. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a dita cistationina β -sintase ou cistationina β -liase é provida como um extrato isolado de uma célula eucariótica ou procariótica.

23. Método de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que a dita célula eucariótica compreende células de levedura.

24. Método de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que as ditas células de levedura compreendem *Saccharomyces cerevisiae*.

25. Método de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que as ditas células procarióticas compreendem células bacterianas.

26. Método de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato de que as ditas células bacterianas são células de *Escherichia coli*.

27. Método de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo

fato de que a dita cistationina β -sintase ou cistationina β -liase é substancialmente isolada do dito extrato.

28. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a dita cistationina β -sintase ou cistationina β -liase é produzida através da expressão recombinante de um gene codificando cistationina β -sintase ou cistationina β -liase.

29. Método de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato de que as ditas cistationina β -sintase e cistationina β -liase são produzidas como uma proteína de fusão.

30. Método de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato de que a dita proteína de fusão é expressa de um gene recombinantemente produzido compreendendo uma região codificando cistationina β -sintase, operativamente associada a uma região compreendendo um gene codificando cistationina β -liase.

31. Método de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de que a dita proteína de fusão é imobilizada em um suporte sólido.

32. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a dita cistationina β -sintase é adicionada para uma concentração final de 0,1 KU/l a 100 KU/l.

33. Método de acordo com a reivindicação 32, caracterizado pelo fato de que a dita cistationina β -sintase é adicionada para uma concentração final de 0,5 KU/l a 75 KU/l.

34. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a dita cistationina β -liase é adicionada para uma concentração final de 0,01 KU/l a 100 KU/l.

35. Método de acordo com a reivindicação 34, caracterizado pelo fato de que a dita cistationina β -liase é adicionada para uma concentração final de 0,05 KU/l a 50 KU/l.

36. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a dita mistura de reação inclui um tampão.

37. Método de acordo com a reivindicação 36, caracterizado pelo fato de que o dito tampão é operável para manter a dita mistura de reação

em um pH entre 7 e 9.

38. Método de acordo com a reivindicação 36, caracterizado pelo fato de que o dito tampão é selecionado do grupo consistindo em HEPES, TRIS e fosfato.

5 39. Método de acordo com a reivindicação 38, caracterizado pelo fato de que o dito TRIS está em um pH de 8,4.

40. Método de acordo com a reivindicação 36, caracterizado pelo fato de que compreende ainda a etapa de adição de glicerol ao dito tampão.

10 41. Método de acordo com a reivindicação 40, caracterizado pelo fato de que o dito glicerol tem uma concentração de 0,5% a 15,0% v/v.

42. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende ainda a etapa de redução da turbidez da dita solução.

15 43. Método de acordo com a reivindicação 42, caracterizado pelo fato de que compreende ainda a etapa de contato da dita solução com um agente de eliminação de lipoproteína.

44. Método de acordo com a reivindicação 42, caracterizado pelo fato de que o dito agente compreende lipase e α -ciclodextrina.

20 45. Método de acordo com a reivindicação 43, caracterizado pelo fato de que o dito agente de eliminação de lipoproteína está na dita mistura de reação.

46. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a dita mistura de reação contém um detergente.

25 47. Método de acordo com a reivindicação 46, caracterizado pelo fato de que o dito detergente é operável para redução da turbidez da dita solução.

48. Método de acordo com a reivindicação 46, caracterizado pelo fato de que o dito detergente é selecionado do grupo consistindo em Triton X-100, Brij-35 e Genapol X-80.

30 49. Método de acordo com a reivindicação 48, caracterizado pelo fato de que o dito detergente é Genapol X-80.

50. Método de acordo com a reivindicação 49, caracterizado pelo

fato de que o dito Genapol X-80 está presente em uma concentração de 0,05% a 0,5%.

51. Método de acordo com a reivindicação 48, caracterizado pelo fato de que o dito detergente é Brij-35.

5 52. Método de acordo com a reivindicação 51, caracterizado pelo fato de que o dito Brij está presente em uma concentração de 0,01% a 0,5%.

53. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a dita mistura de reação compreende um fosfato.

54. Método de acordo com a reivindicação 53, caracterizado pelo
10 fato de que o dito fosfato está presente em uma concentração variando de 50 mM a 500 mM.

55. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a dita mistura de reação inclui EDTA.

56. Método de acordo com a reivindicação 55, caracterizado pelo
15 fato de que o dito EDTA está presente em uma concentração de 0,5 mM a 10 mM.

57. Método de acordo com a reivindicação 56, caracterizado pelo fato de que o dito EDTA está presente em uma concentração de 2 mM a 3 mM.

58. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo
20 fato de que a dita mistura de reação compreende pelo menos 2 composições reagentes.

59. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a dita solução tem um volume de 10 μ l a 40 μ l.

60. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo
25 fato de que o dito ensaio é realizado em um analisador químico clínico.

61. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o dito ensaio não necessita de nenhuma etapa sem instrumento.

62. Kit de teste, caracterizado pelo fato de que é para uso na
avaliação da quantidade de homocisteína em uma amostra e que compre-
30 ende um agente de redução e cistationina β -sintase, L-serina e cistationina β -liase, em que o dito agente de redução é cloridrato de tris-(carboxiletil)fosfina (TCEP).

63. Kit de teste de acordo com a reivindicação 62, caracterizado pelo fato de que compreende ainda um recipiente para manutenção da dita amostra.

5 64. Kit de teste de acordo com a reivindicação 62, caracterizado pelo fato de que a dita cistationina β -sintase está presente em uma concentração final de 0,1 a 100 KU/l.

65. Kit de teste de acordo com a reivindicação 64, caracterizado pelo fato de que a dita cistationina β -sintase está presente em uma concentração final de 0,5 a 75 KU/l.

10 66. Kit de teste de acordo com a reivindicação 62, caracterizado pelo fato de que a dita L-serina está presente em uma concentração final de 1 μ M a 50 mM.

15 67. Kit de teste de acordo com a reivindicação 66, caracterizado pelo fato de que a dita L-serina está presente em uma concentração final de 10 μ M a 40 mM.

68. Kit de teste de acordo com a reivindicação 62, caracterizado pelo fato de que a dita cistationina β -liase está presente em uma concentração final de 0,01 a 100 KU/l.

20 69. Kit de teste de acordo com a reivindicação 68, caracterizado pelo fato de que a dita cistationina β -liase está presente em uma concentração final de 0,05 a 50 KU/l.

70. Kit de teste de acordo com a reivindicação 62, caracterizado pelo fato de que compreende ainda lactato desidrogenase e NADH.

25 71. Kit de teste de acordo com a reivindicação 70, caracterizado pelo fato de que a dita lactato desidrogenase está presente em uma concentração final de 30 a 5000 U/l.

72. Kit de teste de acordo com a reivindicação 71, caracterizado pelo fato de que a dita lactato desidrogenase está presente em uma concentração final de 30 a 3000 U/l.

30 73. Kit de teste de acordo com a reivindicação 70, caracterizado pelo fato de que a dita NADH está presente em uma concentração final de 0,1 mM a 2 mM.

74. Kit de teste de acordo com a reivindicação 73, caracterizado pelo fato de que a dita NADH está presente em uma concentração final de 0,1 mM a 1,5 mM.

5 75. Kit de teste de acordo com a reivindicação 62, caracterizado pelo fato de que compreende ainda um corante capaz de sofrer uma mudança de cor quando oxidado.

76. Kit de teste de acordo com a reivindicação 75, caracterizado pelo fato de que o dito corante é selecionado do grupo consistindo em 5,5'-ditiobis(ácido 2-nitrobenzóico), 2,6-diclorofenolindofenol, um composto tetrazólio, metossulfato de fenazina ou metil viologen.

10

77. Kit de teste de acordo com a reivindicação 62, caracterizado pelo fato de que o dito TCEP está presente em uma quantidade de 6 mM a 53 mM.

78. Kit de teste de acordo com a reivindicação 62, caracterizado pelo fato de que compreende ainda cistationina γ -liase.

15

79. Kit de teste de acordo com a reivindicação 63, caracterizado pelo fato de que a dita cistationina β -sintase, cistationina β -liase, cistationina γ -liase, lactato desidrogenase são imobilizadas dentro do dito recipiente.

80. Ensaio para avaliação da quantidade de homocisteína em uma amostra, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

20

criação de uma mistura de reação incluindo a dita amostra, serina, lactato desidrogenase, NADH e um agente redutor capaz de liberar homocisteína ligada à proteína na amostra, em que o dito agente redutor é cloridrato de tris-(carboxiletil)fosfina (TCEP);

25 incubação da dita mistura de reação por um tempo suficiente para reduzir uma preponderância da dita homocisteína ligada à proteína;

adição de uma mistura de enzima incluindo cistationina β -sintase e cistationina β -liase, e ciclicamente conversão de homocisteína em cistationina e reconversão de cistationina em homocisteína com produção acompanhante de piruvato; e

30

medição da produção de NAD⁺ ou desaparecimento de NADH com o tempo como uma medição de homocisteína na amostra.

81. Ensaio de acordo com a reivindicação 80, caracterizado pelo fato de que a dita L-serina é adicionada à mistura de reação para uma concentração final de 1 μ M a 50 mM.

5 82. Ensaio de acordo com a reivindicação 81, caracterizado pelo fato de que a dita L-serina é adicionada à mistura de reação para uma concentração final de 10 μ M a 40 mM.

83. Ensaio de acordo com a reivindicação 80, caracterizado pelo fato de que a dita lactato desidrogenase é adicionada à mistura de reação para uma concentração final de 30 U/l a 5.000 U/l.

10 84. Ensaio de acordo com a reivindicação 80, caracterizado pelo fato de que a dita lactato desidrogenase é adicionada à mistura de reação para uma concentração final de 30 U/l a 3.000 U/l.

85. Ensaio de acordo com a reivindicação 80, caracterizado pelo fato de que a dita NADH é adicionada à mistura de reação para uma concentração final de 0,1 mM a 2 mM.

86. Ensaio de acordo com a reivindicação 85, caracterizado pelo fato de que a dita NADH é adicionada à mistura de reação para uma concentração final de 0,1 mM a 1,5 mM.

20 87. Ensaio de acordo com a reivindicação 80, caracterizado pelo fato de que a dita cistationina β -sintase está presente em uma concentração final de 0,1 a 100 KU/l.

88. Ensaio de acordo com a reivindicação 87, caracterizado pelo fato de que a dita cistationina β -sintase está presente em uma concentração final de 0,5 a 75 KU/l.

25 89. Ensaio de acordo com a reivindicação 80, caracterizado pelo fato de que a dita cistationina β -liase está presente em uma concentração final de 0,01 a 100 KU/l.

90. Ensaio de acordo com a reivindicação 89, caracterizado pelo fato de que a dita cistationina β -liase está presente em uma concentração final de 0,05 a 50 KU/l.

30 91. Ensaio de acordo com a reivindicação 80, caracterizado pelo fato de que o dito ensaio é completado em um período de até 15 minutos.

92. Ensaio de acordo com a reivindicação 91, caracterizado pelo fato de que o dito ensaio é completado em um período de 5-12 minutos.

93. Ensaio de acordo com a reivindicação 80, caracterizado pelo fato de que o dito ensaio é realizado em um analisador químico clínico.

5 94. Ensaio de acordo com a reivindicação 80, caracterizado pelo fato de que o dito ensaio é realizado em um instrumento único.

95. Ensaio para avaliação da quantidade de homocisteína em uma amostra, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

10 criação de uma mistura de reação incluindo a dita amostra, serina, cistationina β -sintase e cistationina β -liase, e ciclicamente conversão da homocisteína em cistationina e reconversão da cistationina em homocisteína com produção conjunta de piruvato, a razão de cistationina β -sintase para cistationina β -liase variando de 1:1 a 25:1;

15 avaliação da quantidade de piruvato presente na dita mistura de reação através da adição de lactato desidrogenase e NADH à dita mistura de reação e monitoramento da produção de NAD⁺ ou desaparecimento de NADH com o tempo na dita mistura de reação; e

20 adição de cloridrato de tris-(carboxiletil)fosfina (TCEP) à mistura de reação na presença da referida lactato desidrogenase e NADH com a finalidade de reduzir pelo menos uma porção de qualquer homocisteína ligada à proteína na amostra.

96. Ensaio de acordo com a reivindicação 95, caracterizado pelo fato de que o dito ensaio é realizado em um período de até 20 minutos.

25 97. Ensaio de acordo com a reivindicação 96, caracterizado pelo fato de que o dito ensaio é realizado em um período de até 15 minutos.

98. Ensaio de acordo com a reivindicação 95, caracterizado pelo fato de que o dito ensaio é realizado em um analisador químico clínico.

99. Ensaio de acordo com a reivindicação 95, caracterizado pelo fato de que o dito ensaio é realizado em um instrumento único.

30 100. Método de sequencialmente testar uma pluralidade de amostras contendo homocisteína, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

(a) criação de uma mistura de reação pondo em um recipiente uma das ditas amostras junto com serina, cistationina β -sintase, cistationina β -liase, lactato desidrogenase, NADH e um agente redutor capaz de liberar homocisteína ligada à proteína na amostra, em que o dito agente redutor é

5 cloridrato de tris-(carboxiletil)fosfina (TCEP);

(b) ciclicamente conversão da homocisteína em cistationina e re-conversão da cistationina em homocisteína na dita mistura de reação, com produção conjunta de piruvato;

(c) avaliação da quantidade de piruvato presente na mistura de

10 reação através de monitoramento da produção de NAD⁺ ou desaparecimento de NADH com o tempo nela; e

(d) repetição das etapas (a)-(c) para cada uma das ditas amostras, o intervalo de tempo entre as respectivas etapas de mistura de reação-criação para cada uma das ditas amostras sendo até 15 minutos.

15 101. Método de acordo com a reivindicação 100, caracterizado pelo fato de que o dito tempo de intervalo é de até 13 minutos.

102. Método de acordo com a reivindicação 100, caracterizado pelo fato de que inclui as etapas de primeiro criar uma primeira mistura de reação compreendendo a dita amostra, serina, lactato desidrogenase, NADH

20 e dito redutor, permitindo que a dita primeira mistura de reação fique incubada por um período de tempo para liberar uma preponderância da dita homocisteína ligada à proteína, e em seguida adição da dita cistationina β -sintase e dita cistationina β -liase.

103. Método de acordo com a reivindicação 100, caracterizado

25 pelo fato de que a razão de cistationina β -sintase para cistationina β -liase na dita mistura de reação é de a partir de 1:1 a 25:1.

104. Método de acordo com a reivindicação 103, caracterizado pelo fato de que a dita razão é de a partir de 1:1 a 10:1.

105. Método de acordo com a reivindicação 100, caracterizado

30 pelo fato de que o dito método é realizado em um analisador químico clínico.

106. Método de acordo com a reivindicação 100, caracterizado pelo fato de que o dito método é realizado em um único instrumento.

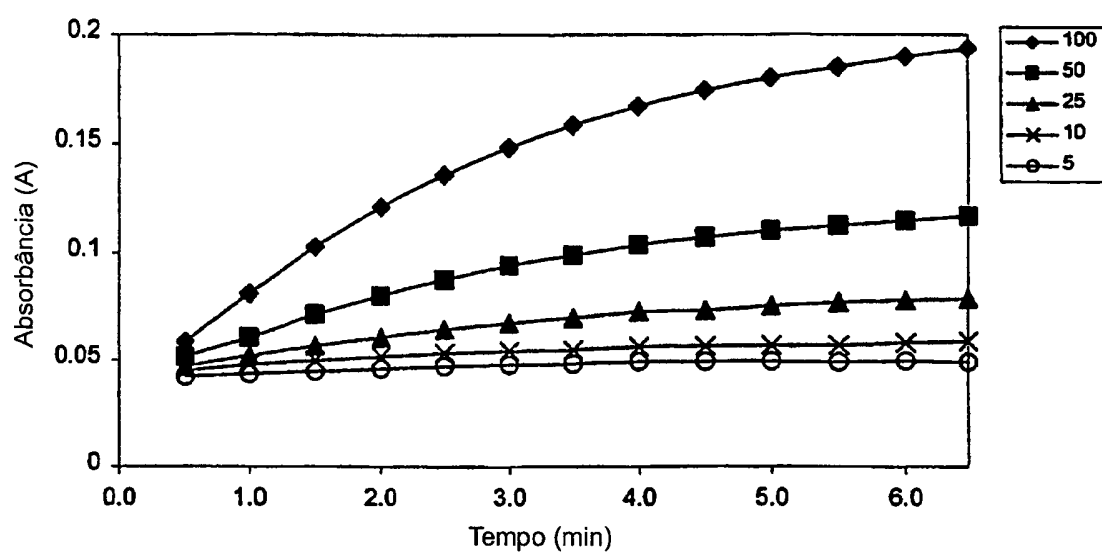


FIG. 1

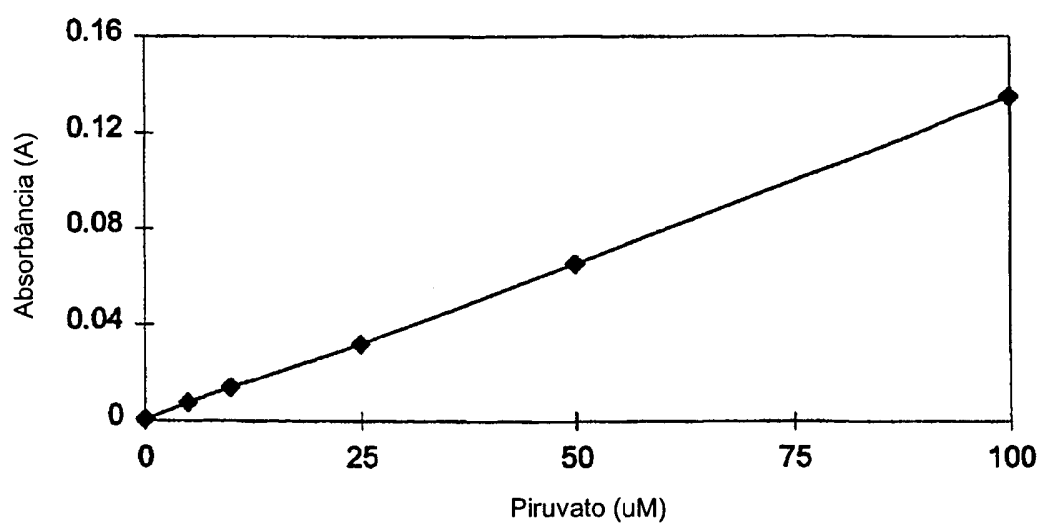


FIG. 2

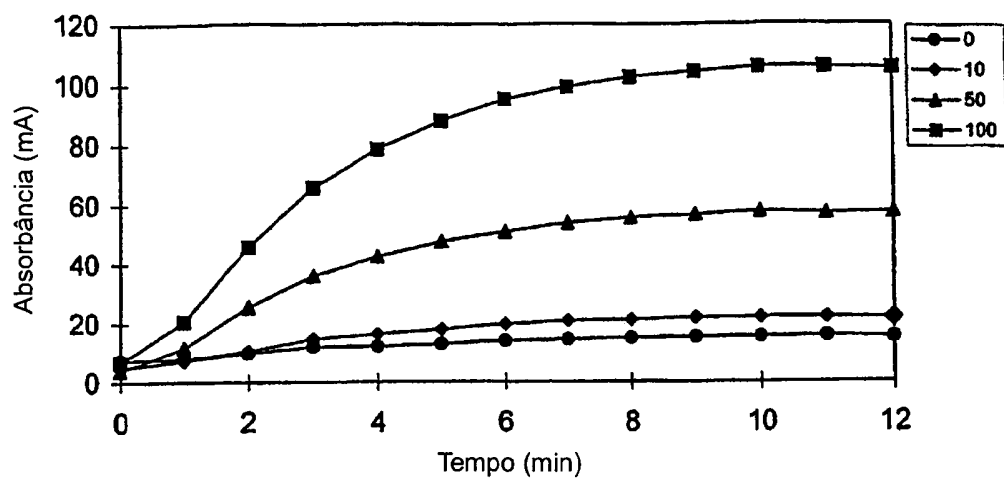


FIG. 3

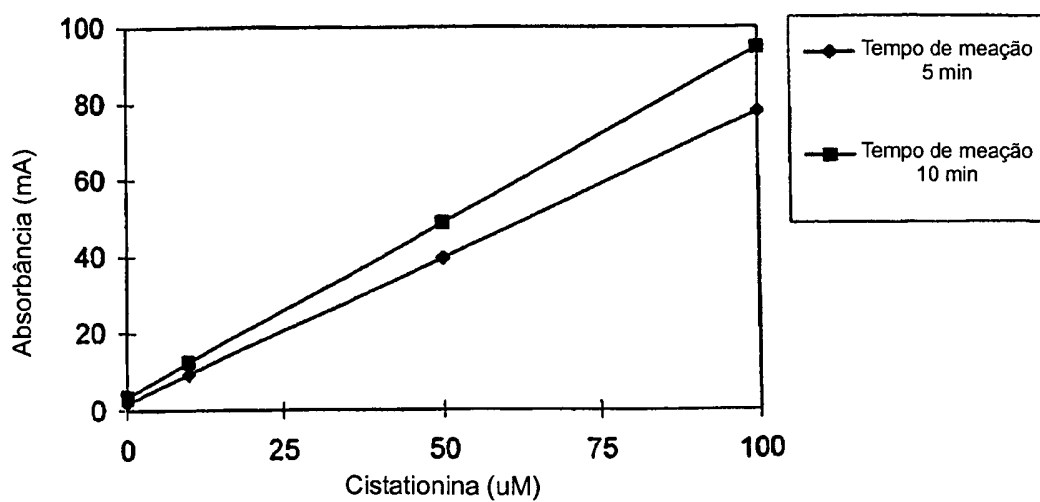


FIG. 4

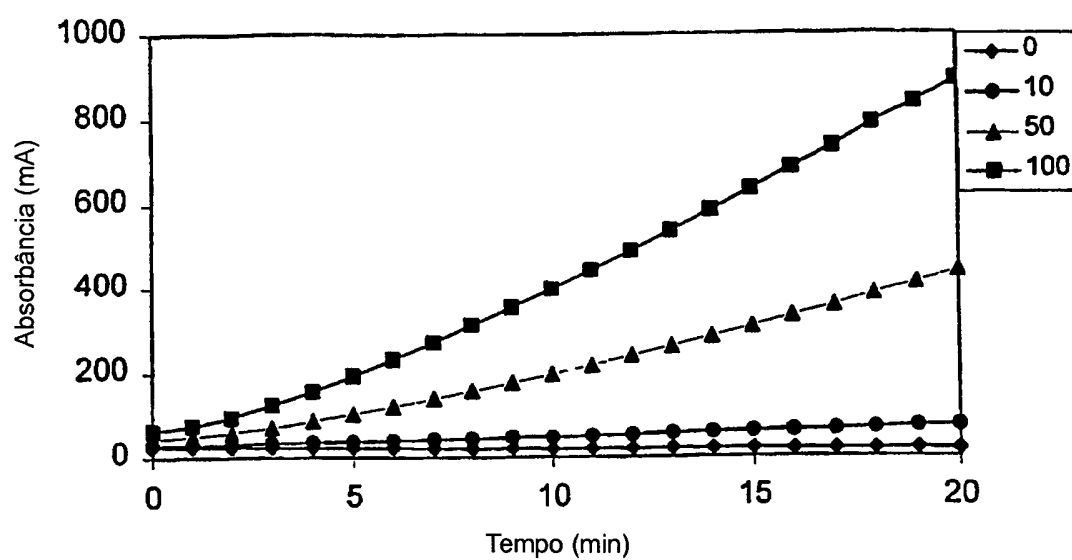


FIG. 5

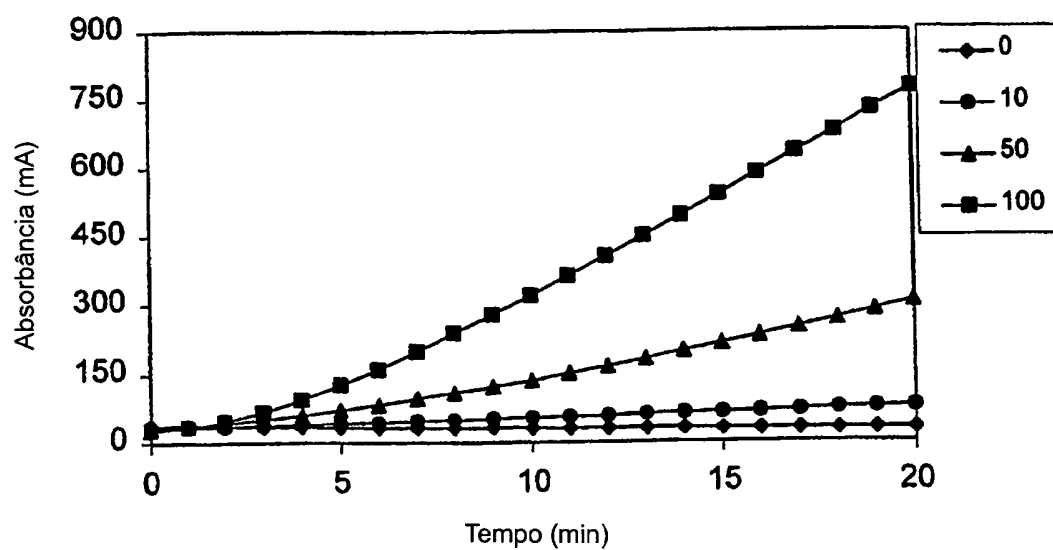


FIG. 6

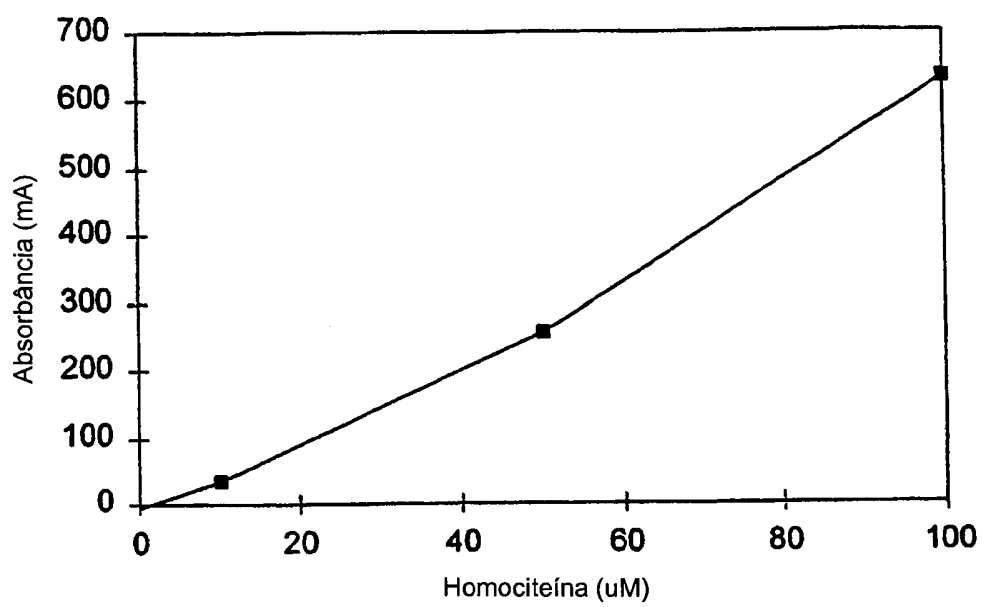


FIG. 7

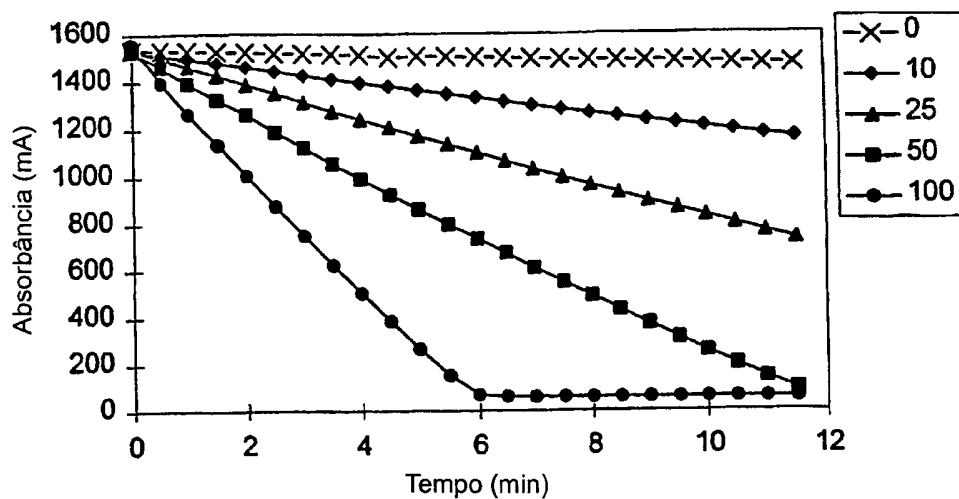


FIG. 8

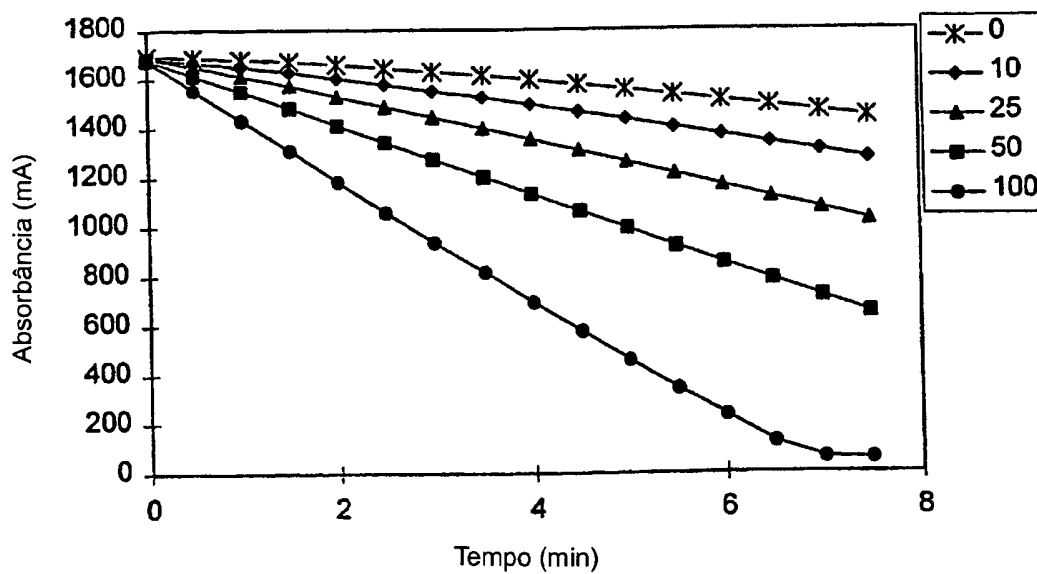


FIG. 9

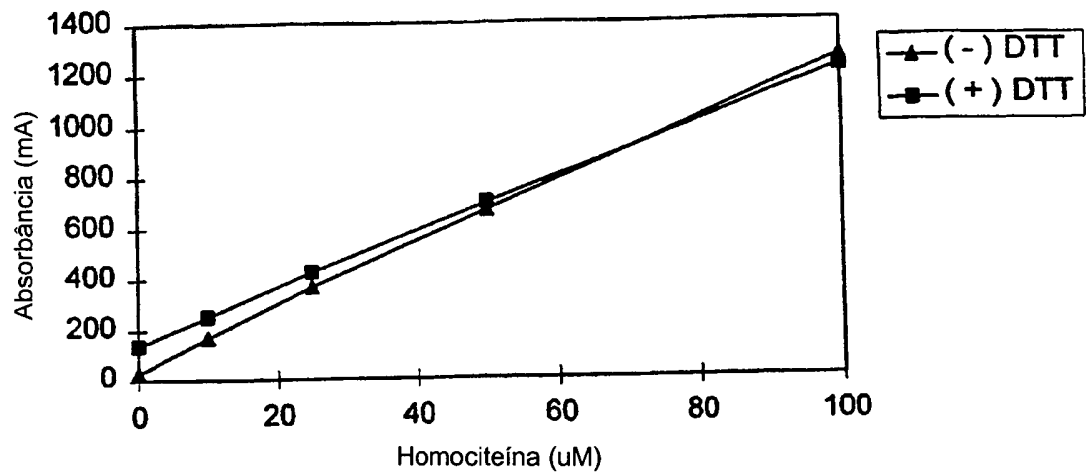


FIG. 10

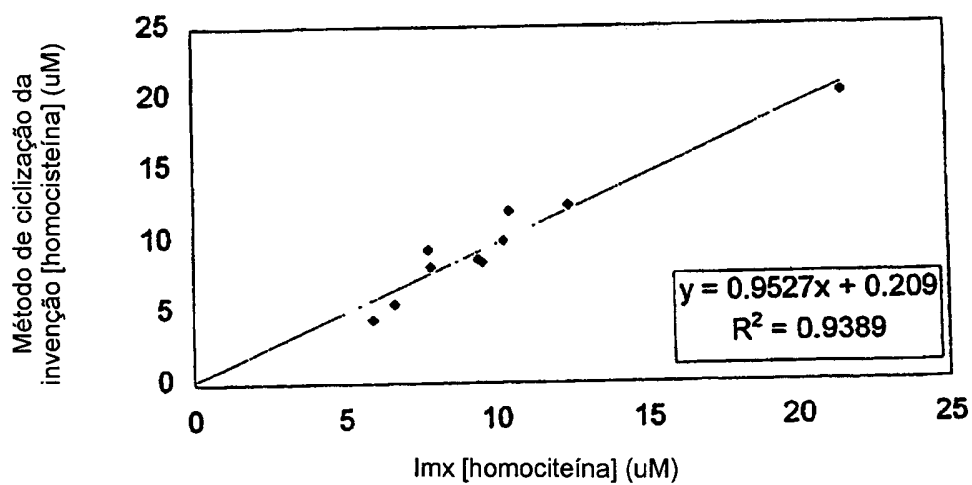


FIG. 11

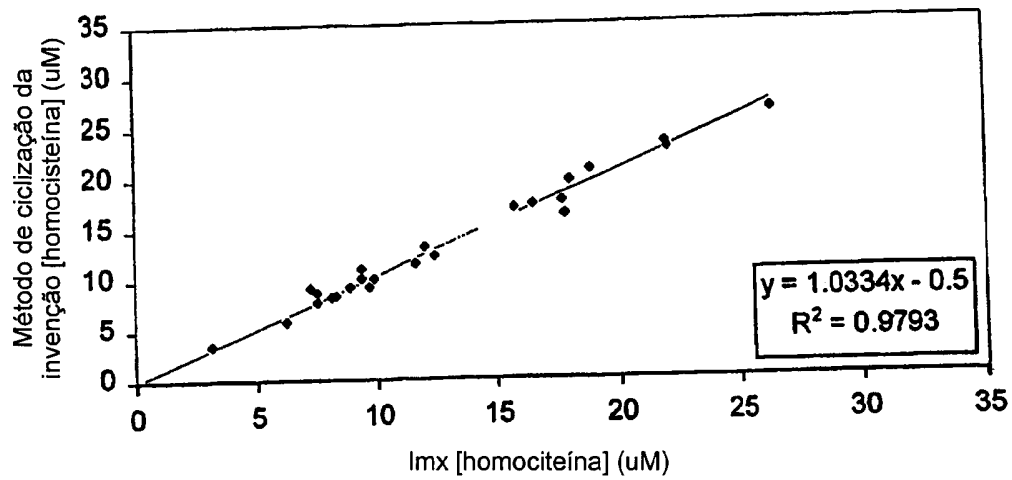


FIG. 12

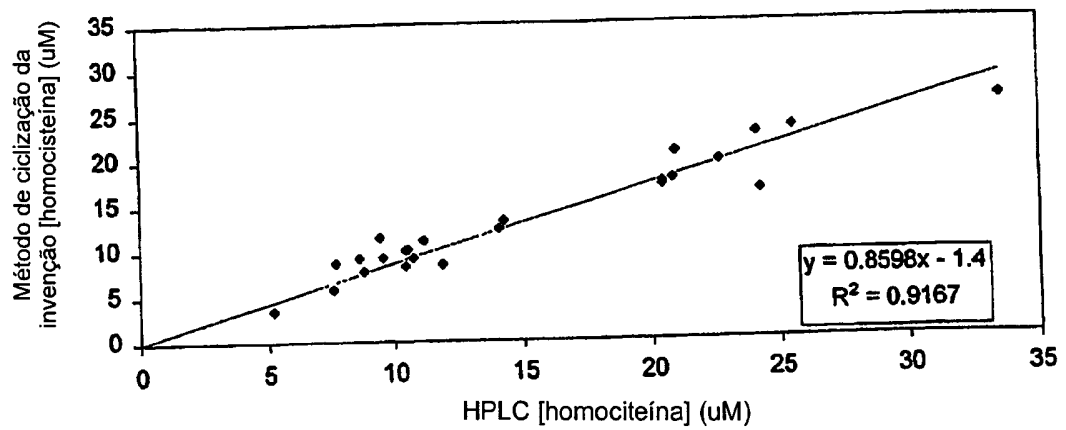


FIG. 13

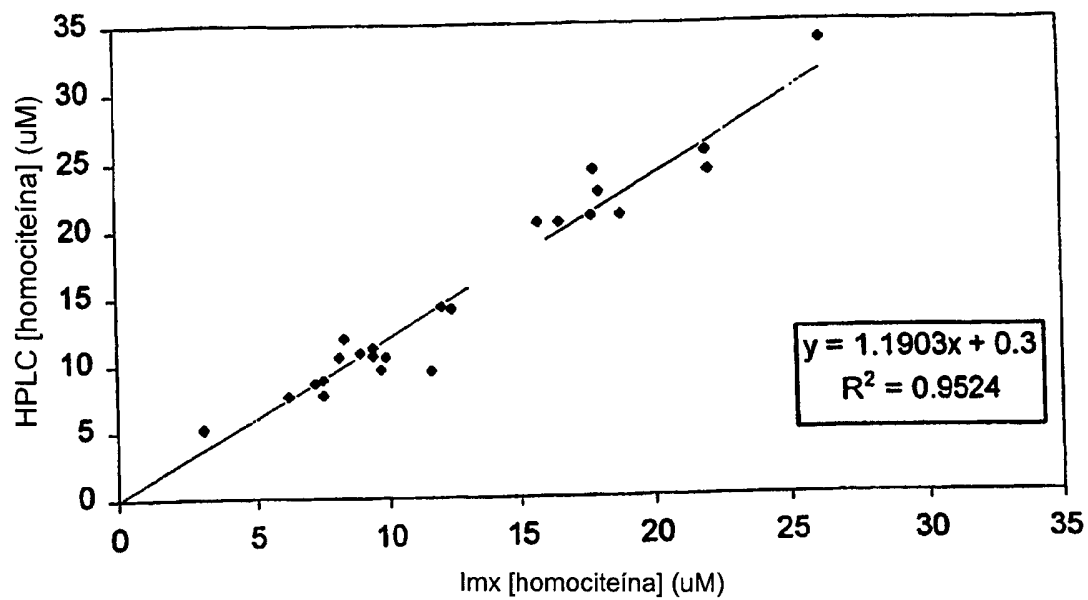


FIG. 14

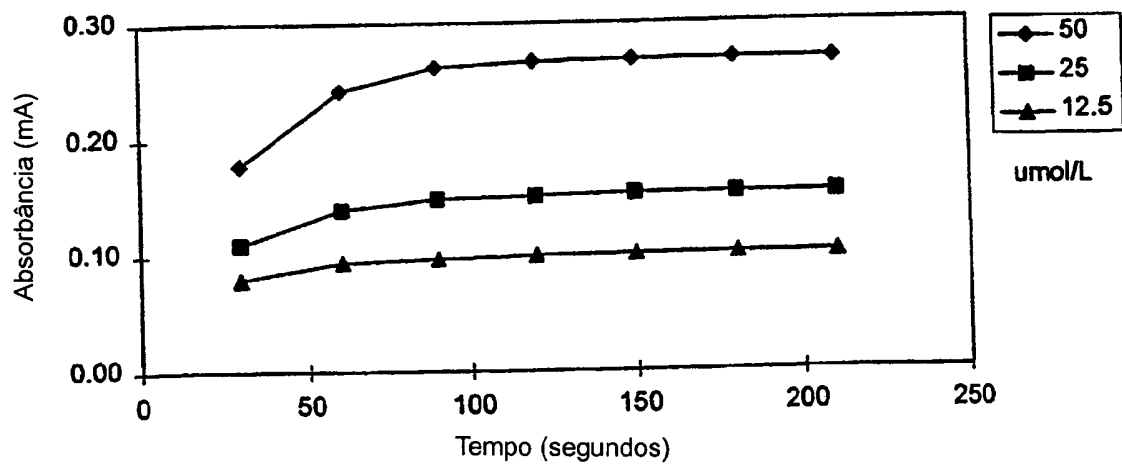


FIG. 15

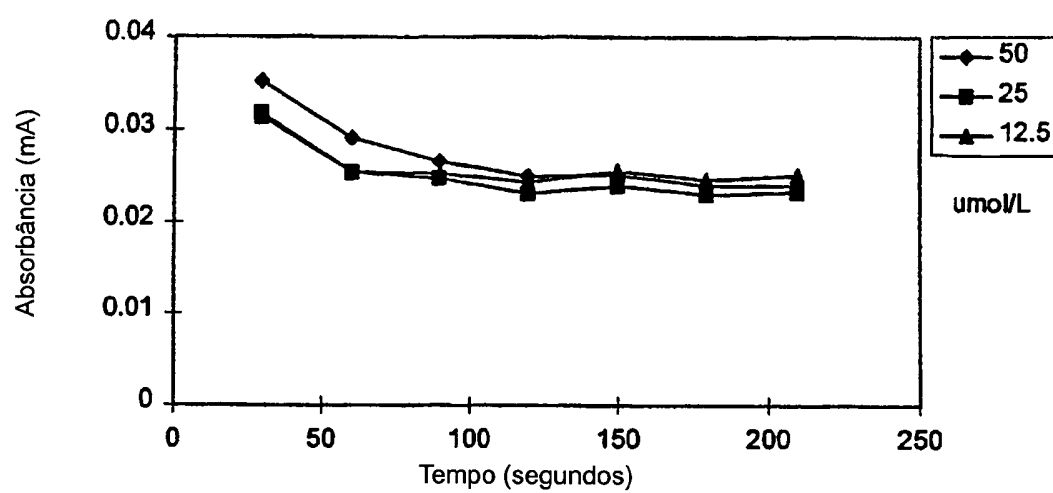


FIG. 16

RESUMO

Patente de Invenção: **"MÉTODOS DE ENSAIO DE CICLIZAÇÃO ENZIMÁTICA PARA HOMOCISTEÍNA E CISTATIONINA E DE TESTE DE AMOSTRAS CONTENDO HOMOCISTEÍNA, BEM COMO KIT DE TESTE PARA**
5 **QUANTIFICAR HOMOCISTEÍNA E ENSAIOS DE AVALIAÇÃO DA QUANTIDADE DE HOMOCISTEÍNA".**

A presente invenção refere-se a um ensaio de ciclização enzimática para avaliação da quantidade de homocisteína e/ou cistationina em uma solução tal como sangue, derivados de sangue ou urina. O ensaio
10 compreende as etapas de contato da solução contendo homocisteína e/ou cistationina para formar uma mistura de reação, com CBS, ou um seu derivado, L-serina, e CBL, ou um seu derivado, por um período de tempo suficiente para catalisar a conversão clínica da forma homocisteína em cistationina e a reconversão de cistationina em homocisteína com a produção de pi-
15 ruvato e amônia; determinação da quantidade de homocisteína e/ou amônia presente na mistura de reação; e determinação da quantidade de homocisteína e/ou cistationina presente na solução baseada na quantidade de piruvato e/ou amônia formada. Vetores de expressão e procedimentos de isolamento para CBS, ou seus derivados, e CBI, ou seus derivados, são também provi-
20 dos, bem como kits de teste para realizar o ensaio. Em modalidades preferidas, os ensaios podem ser realizados em 15 minutos ou menos, com um mínimo de uso de enzima.