



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 325 808**

51 Int. Cl.:  
**C12Q 1/66** (2006.01)  
**C12Q 1/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02724954 .9**  
96 Fecha de presentación : **15.02.2002**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1383914**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.01.2004**

54 Título: **Método mejorado para la detección de ATP.**

30 Prioridad: **16.02.2001 US 269526 P**  
**19.03.2001 US 813279 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**18.09.2009**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**18.09.2009**

73 Titular/es: **PROMEGA CORPORATION**  
**2800 Words Hollow Road**  
**Madison, Wisconsin 53711-5399, US**

72 Inventor/es: **Wood, Keith;**  
**Hannah, Rita y**  
**Moravec, Richard, A.**

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 325 808 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Método mejorado para detección de ATP.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere en general a los campos de biología celular y biología molecular. En particular, esta invención se refiere a métodos, composiciones y kits para mejorar la detección y cuantificación de ATP.

10 **Antecedentes de la invención**

15 Los avances en las ciencias biológicas, biomédicas y farmacéuticas han acelerado el ritmo de la investigación y el diagnóstico sin precedentes en el pasado. Con secuencias genómicas completas volviéndose rápidamente y sucesivamente disponibles, el conjunto de bibliotecas grandes de moléculas pequeñas y la capacidad de mover el desarrollo farmacéutico, los ensayos de diagnóstico clínico y la investigación básica desde un enfoque reduccionista hasta un sistema global exige ensayos que faciliten análisis de alto rendimiento. Ya no se necesita analizar las moléculas de forma única para determinar sus efectos sobre un proceso solo; en lugar de ello, se pueden estudiar los efectos de muchas moléculas sobre varios sistemas biológicos de forma simultánea. Si son apropiados, están disponibles ensayos rápidos, fiables y precisos.

20 Los bioensayos preferidos que ayudan a evaluar la salud celular son los que detectan y cuantifican adenosin trifosfato (ATP). La hidrólisis de ATP impulsa muchos de los procesos bioquímicos de una célula. Las células sanas y viables son ricas en ATP; las células muertas o que están muriendo tienen poco ATP.

25 Se pueden usar ensayos eficaces, fiables y precisos para determinar viabilidad celular para descubrir rápidamente agentes citotóxicos o agentes de proliferación celular y determinar el efecto citotóxico o efecto de proliferación celular de agentes sobre las células. La investigación farmacéutica del cáncer con frecuencia se esfuerza en identificar compuestos que matan selectivamente células que se dividen rápidamente, una característica principal de las células cancerosas. Aunque se han identificado algunos compuestos citotóxicos anticancerosos eficaces, innumerables compuestos potencialmente más valiosos esperan ser identificados. Las exploraciones de alto rendimiento de bibliotecas de compuestos, acopladas con ensayos de viabilidad celular eficaces, pueden identificar rápidamente tales compuestos. En algunos sistemas del organismo, la muerte celular controlada es crucial para la función apropiada. Por ejemplo, el desarrollo del sistema inmune -un proceso continuo- depende de la apoptosis (muerte celular programada). El descubrimiento de fármacos para tratar disfunciones relacionadas con el sistema inmune con frecuencia depende de la determinación de viabilidad celular. La eficacia de un compuesto candidato sobre viabilidad celular se puede ensayar detectando ATP, ya que la producción de ATP sólo se realiza en células metabólicamente activas (vivas) y el ATP residual en una célula se degrada después de la muerte celular, de forma particularmente rápida en muerte celular no apoptótica (necrótica). Los sistemas de ensayo que no sólo facilitan la evaluación de una sustancia sobre la viabilidad celular, sino que también permiten exploraciones de alto rendimiento que pueden ensayar rápidamente miles de compuestos, modernizan el descubrimiento de fármacos nuevos.

35 En situaciones clínicas, los ensayos de diagnóstico en grandes cantidades de muestras se facilitan cuando se usan ensayos sencillos, precisos y seguros. Entonces, los tratamientos para enfermedades se pueden determinar e iniciar fácilmente.

45 Con la disponibilidad de secuencias genómicas completas, se ha hecho posible la identificación de productos génicos que influyen en la producción de ATP, indirectamente o directamente y se facilitan exploraciones de alto rendimiento para identificar tales proteínas mediante ensayos de ATP sencillos, rápidos, precisos y fiables.

50 Los ensayos de ATP son valiosos para innumerables tipos de mediciones para las que es importante determinar la presencia o ausencia de microbios o para determinar la cantidad de contaminación microbiana presente, por ejemplo, determinar la contaminación microbiana de productos finales, supervisión de higiene, eficacia de biocidas, éxito de procesos de tratamiento de residuos biológicos y similares.

55 Los ensayos de ATP dependen de moléculas informadoras o marcadores para supervisar cualitativamente o cuantitativamente los niveles de ATP. Las moléculas informadoras o marcadores en tales sistemas de ensayo incluyen isótopos radioactivos, agentes fluorescentes y enzimas, incluyendo enzimas generadoras de luz tales como luciferasa. Las características deseables de cualquier sistema de molécula informadora incluyen aplicación y detección segura, rápida y fiable. Los sistemas luminiscentes están entre los más deseables ya que los mismos son excepcionalmente seguros y sensibles.

60 Se han aislado enzimas generadoras de luz a partir de determinadas bacterias, protozoarios, celenterios, moluscos, peces, miriápodos, moscas, hongos, gusanos y crustáceos. Las enzimas aisladas a partir de escarabajos, particularmente las luciérnagas del género *Photinus*, *Photuris* y *Luciola* y a partir de escarabajos de resorte del género *Pyrophorus*, han encontrado uso generalizado en sistemas de informador. En muchos de estos organismos, las enzimas tales como luciferasas catalizan óxido reducciones en las que el cambio de energía libre excita una molécula de sustrato hasta un estado de alta energía. Cuando la molécula excitada vuelve al estado basal, se emite luz visible, es decir "bioluminiscencia" o "luminiscencia". Entre los sistemas de ensayo en los que se ha empleado bioluminiscencia para controlar o

medir ATP están aquellos en los que se aprovecha la actividad de una enzima bioluminiscente dependiente de ATP, por ejemplo, una luciferasa de escarabajo.

5 Cuando la luciferasa se combina con una muestra con el propósito de detectar ATP, es típicamente deseable inhibir ATPasas endógenas de la muestra así como enzimas que generan ATP, asegurando de ese modo que el ATP detectado corresponde a la cantidad real de ATP en una muestra en un momento deseado. Se conocen muchos inhibidores de ATPasa, que incluyen detergentes, especialmente detergentes que están cargados positivamente. Sin embargo, la mayoría de inhibidores de ATPasa son eficaces no sólo eliminando la función endógena de ATPasa de la muestra (por ejemplo, una célula o población celular), sino también ATPasas que se pueden usar como la molécula informadora, tal como luciferasa. Adicionalmente, para el recuento de la producción de ATP, se desean inhibidores de enzimas que fosforilan, tales como quinasas. Sin embargo, estos inhibidores, tales como fluoruro de sodio (NaF), también pueden influir en la función de luciferasa. Un desafío para mejorar la detección de ATP en una muestra usando luciferasa es que depende de métodos y composiciones que sustancialmente reducen o eliminan la actividad de ATPasa y actividad generadora de ATP endógena de la muestra, estabilizando de ese modo la cantidad de ATP presente en la muestra hasta la que está presente cuando se añade la composición, sin confundir la función de luciferasa.

Existen múltiples variaciones de métodos de detección de ATP celular usados actualmente, los cuales actúan de una manera progresiva. Algunos de tales métodos en primer lugar lisan las células e inactivan la actividad de ATPasa endógena de la muestra (por ejemplo, aumentando el pH de la muestra), después neutralizan el inhibidor de ATPasa, convirtiendo de ese modo el entorno de la muestra en uno favorable para la actividad de luciferasa antes de añadir la luciferasa y detectar la luminiscencia. Otros métodos de este tipo combinan la neutralización del inhibidor de ATPasa con la adición de luciferasa. No existen sistemas de detección de ATP que proporcionen una composición o método capaz de inactivar la actividad de ATPasa endógena y detectar actividad de luciferasa en el mismo entorno. Por lo tanto, los ensayos actuales que usan luminiscencia para detectar ATP tienen la desventaja de necesitar etapas sucesivas y que requieren mucho tiempo.

El documento EP 104151 describe una luciferasa que tiene resistencia a un tensioactivo y un método multi etapa para medir ATP intracelular que comprende, en primer lugar extraer ATP de las células en una muestra, en segundo lugar añadir un reactivo de luminiscencia que contenga luciferasa para que la solución de ATP extraída suscite la emisión de luz y en tercer lugar medir la emisión de luz.

La presente invención proporciona composiciones con propiedades de estabilidad mejorada que comprenden una luciferasa y uno o más inhibidores de ATPasa y además proporciona métodos que usan estas composiciones nuevas para detectar ATP en una muestra reduciendo las etapas de lisis celular, inhibición de ATPasa endógena y adición de sustrato y luciferasa a una etapa única que después se sigue mediante la detección de luminiscencia. Debido a que realizaciones de la invención reducen significativamente el tiempo y esfuerzo de detecciones mediadas por luciferasa de ATP eliminando la necesidad de neutralizar la actividad de inhibidor de ATPasa antes de añadir luciferasa, finalmente se pueden realizar eficazmente ensayos de alto rendimiento.

#### 40 **Sumario de la invención**

La invención se refiere a métodos, de acuerdo con las reivindicaciones 1-22, que se usan para detectar y cuantificar niveles de ATP en una muestra. El método comprende añadir a una muestra una composición (“composición de reactivo”) que comprende una enzima luciferasa y un inhibidor de ATPasa y detectar la luminiscencia producida en la muestra por la conversión de un sustrato en un compuesto luminiscente mediante la luciferasa. La composición de reactivo tiene propiedades de estabilidad mejorada, eliminando de ese modo la etapa tradicional de inhibir ATPasas endógenas a una muestra antes de añadir enzima luciferasa a la muestra. Por tanto, aunque la luciferasa funciona como una ATPasa, cuando está en la composición de reactivo es resistente a los efectos de un inhibidor de ATPasa también presente en la composición de reactivo. Tales composiciones de reactivo estables facilitan muchas detecciones de ATP en una muestra a lo largo de un período de tiempo largo así como la detección de ATP en muchas muestras a lo largo de un período de tiempo largo.

En general, los métodos comprenden añadir una composición (“composición de reactivo”) que comprende una luciferasa seleccionada entre el grupo que consiste en (SEC ID N°: 1-4) y uno o más inhibidores de ATPasa a una muestra y detectar luminiscencia, donde la actividad de la composición de reactivo tiene estabilidad mejorada [es decir, la composición de reactivo es capaz de mantener una actividad de al menos aproximadamente el 30%, más preferiblemente al menos aproximadamente el 60% (medido mediante luminiscencia cuando la composición de reactivo se combina con la muestra) durante al menos una hora, aún más preferiblemente una actividad de al menos el 70%, el 80%, el 90%, el 95%, el 99% o mayor durante al menos una hora, aún más preferiblemente durante al menos dos horas e incluso más preferiblemente durante al menos cuatro horas con relación a la actividad de la composición de reactivo cuando se crea, es decir, inmediatamente después (0 a 10 minutos) de que la enzima luciferasa se combina con un inhibidor de ATPasa] y donde el inhibidor de ATPasa está presente en la composición de reactivo en una concentración suficiente para reducir la actividad de ATPasa endógena de la muestra en al menos aproximadamente el 25%, más preferiblemente al menos aproximadamente el 30%, más preferiblemente al menos aproximadamente el 40%, incluso más preferiblemente el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 90%, el 95% o el 99% o mayor con relación a la actividad de ATPasa de la muestra en ausencia del inhibidor de ATPasa. La composición de reactivo se puede mezclar antes del uso añadiendo una solución que comprenda uno o más inhibidores de ATPasa a una luciferasa liofilizada.

## ES 2 325 808 T3

La pérdida de estabilidad se define como pérdida irreversible de actividad. La composición de reactivo pierde estabilidad a lo largo del tiempo y la cantidad de actividad perdida varía dependiendo de la luciferasa particular, el inhibidor de ATPasa y, cuando está presente, el agente estabilizante de enzima usado. Preferiblemente, la estabilidad de la composición de reactivo se puede demostrar en el intervalo de temperatura de aproximadamente 20°C a aproximadamente 37°C. Aunque los métodos de la invención se pueden usar con una muestra que contenga cualquier cantidad de ATP, es preferible usar una muestra que contenga una cantidad no saturada de ATP (es decir, un intervalo en el que la luminiscencia sea linealmente proporcional a la concentración de ATP).

La luminiscencia generada por una reacción de luciferasa típicamente se detecta con un luminómetro, aunque se pueden usar otros medios de detección. La presencia de luz mayor que el nivel de fondo indica la presencia de ATP en la muestra. El nivel de fondo de luminiscencia típicamente se mide en la misma matriz en la que está la muestra, pero en ausencia de la muestra. Un especialista en la técnica diseña fácilmente reacciones de control adecuadas. Las luciferasas preferidas usadas en las composiciones y métodos de la invención generan una señal estable, es decir, las mismas producen duración mejorada de luminiscencia en una reacción de luciferasa definida como menos del 50% de pérdida de luminiscencia por hora con relación a la luminiscencia en el momento en que se inició la reacción de luciferasa. Las luciferasas preferidas de la invención permiten análisis múltiple de una muestra a lo largo del tiempo o análisis de muchas muestras a lo largo del tiempo, una hora después de que la luciferasa se combina con el inhibidor de ATPasa, más preferiblemente dos horas y lo más preferible es que sea cuatro horas o más. Opcionalmente, las luciferasas usadas en las composiciones y métodos de la invención tienen propiedades de termoestabilidad mejorada.

Cuantificar la cantidad de luz emitida también cuantifica la cantidad de ATP en una muestra y, de ese modo, la cantidad de células vivas. Los valores cuantitativos de ATP se obtienen, por ejemplo, cuando la cantidad de luz emitida a partir de una muestra de ensayo se compara con la cantidad de luz emitida a partir de una muestra de control o con una curva normal determinada usando cantidades conocidas de ATP y las mismas condiciones de luciferasa, sustrato y reacción (es decir, temperatura, pH, etc.). Se entiende que la cuantificación implica sustracción de los valores de fondo. Los valores de ATP cualitativos se obtienen cuando la luminiscencia emitida a partir de una muestra se compara con la luminiscencia emitida a partir de otra muestra sin una necesidad de saber la cantidad absoluta de ATP presente en las muestras, por ejemplo, una comparación de muestras en presencia o ausencia de un compuesto de ensayo. Un especialista en la técnica puede diseñar fácilmente muchos de tales experimentos.

Los ejemplos de inhibidores de ATPasa incluyen detergentes, preferiblemente detergentes con grupos cargados tales como detergentes catiónicos [por ejemplo, DTAB (bromuro de dodeciltrimetilamonio), CTAB (cetiltrimetilamonio) y BDDABr (bromuro de bencildimetildodecilamonio)], detergentes aniónicos (por ejemplo, SDS y desoxicolato) y detergentes zwitteriónicos (por ejemplo, sulfobetaina 3-10). Para facilitar el método, se puede incluir en la composición de reactivo un sustrato para la luciferasa, tal como luciferina. Otras realizaciones de la composición de reactivo además comprenden un compuesto, tal como NaF, que evita un aumento en niveles de ATP en la muestra a lo largo del tiempo. Otros compuestos que evitan un aumento en los niveles de ATP en la muestra incluyen vanadato y par-nitrofenilfosfato. Otras realizaciones de la composición de reactivo comprenden además un tampón y magnesio. Un especialista en la técnica conoce que otros cationes, tales como manganeso y calcio, pueden ser sustitutos adecuados del magnesio.

La composición de reacción también puede comprender un agente estabilizante de enzima. El agente estabilizante de enzima puede ser cualquier compuesto que establezca la luciferasa de la degradación. Los agentes estabilizantes de enzima adecuados incluyen proteínas (tales como albúmina sérica bovina o gelatina) o detergentes (preferiblemente detergentes no iónicos, más preferiblemente THESIT).

Debido a que la presencia de ATP (o una proporción de ATP:ADP particular) es una propiedad de células vivas, la invención también se dirige a detectar y cuantificar células vivas en una muestra usando las composiciones descritas anteriormente. Entonces, la cantidad de luminiscencia se correlaciona con el número de células viables dentro de una población, medida habitualmente lisando una alícuota de una población de células de interés mientras se aplica la invención o extrayendo el ATP a partir de una célula o población de células.

Además, la presente invención es útil para determinar el efecto de moléculas pequeñas (que incluyen moléculas orgánicas e inorgánicas y moléculas sintéticas y de origen natural) sobre células vivas, lo cual a su vez permite la evaluación de si la molécula pequeña puede funcionar como un agente farmacéutico. Por tanto, la invención también se dirige a métodos que determinen el efecto de un compuesto sobre una primera población de células poniendo en contacto la primera población de células con una concentración del compuesto y después, en un momento posterior, poniendo en contacto la primera población de células con una composición de la invención, detectando y comparando la cantidad de luminiscencia en la primera población con una cantidad de luminiscencia en una segunda población de células. La segunda población de células se puede poner en contacto con una concentración del compuesto que sea menor que la concentración que se pone en contacto con la primera población de células o sin compuesto. Una cantidad menor de luminiscencia detectada a partir de la primera población en comparación con la segunda población puede indicar que el compuesto comprende un agente citotóxico. De esta manera, se pueden descubrir reactivos citotóxicos. De forma similar, la invención es útil para descubrir reactivos de proliferación celular, es decir, compuestos que estimulan el crecimiento celular. Usando el ejemplo anterior, una cantidad menor de luminiscencia detectada a partir de la segunda población en comparación con la primera población puede indicar que el compuesto comprende un agente de proliferación celular. La invención es útil para comparar los efectos de diferentes compuestos a la misma concentración sobre células. La invención también es útil para comparar el efecto de un compuesto sobre diferentes

tipos de células. Un especialista en la técnica puede desarrollar muchos ensayos diferentes para los que la invención es útil.

La invención también describe kits. Tales kits se diseñan para determinar la presencia de ATP en una muestra, por ejemplo, midiendo la viabilidad celular dentro de una población de células o determinando los efectos de compuestos sobre células. Los kits pueden ser polivalentes para que se pueda conseguir más de un propósito. En una realización, un kit que se usa para detectar ATP en una muestra puede comprender luciferasa liofilizada en un envase, mientras otro envase contiene tampón de reconstitución con uno o más inhibidores de ATPasa. Los inhibidores de ATPasa pueden ser detergentes, preferiblemente detergentes con grupos iónicos que incluyen detergentes catiónicos (preferiblemente DTAB o BDDABr), detergentes aniónicos (preferiblemente SDS o desoxicolato) o detergentes zwitteriónicos (preferiblemente sulfobetaina 3-10) o una combinación de los mismos.

El kit también puede suministrar un sustrato de luciferasa, tal como luciferina. El kit también puede suministrar magnesio u otros cationes tales como manganeso o calcio. Para facilitar el uso de experimentos de control con concentraciones conocidas de ATP, tal como en realizaciones de los kits que se usan para cuantificar ATP en una muestra, también se puede suministrar un envase que tenga ATP en tales kits. El kit también puede suministrar un compuesto que evite un aumento en la cantidad de ATP en la muestra a lo largo del tiempo (por ejemplo, NaF). El kit también puede suministrar un agente de lisis celular o un agente de extracción de ATP (por ejemplo, TCA, DMSA, CTAB, etanol y similares). El kit también puede suministrar un tampón. El kit también puede suministrar un agente estabilizante de enzima, por ejemplo, BSA o gelatina o THESIT.

Un kit contiene componentes que, cuando se combinan, generan una composición de reactivo que (i) mantiene una actividad de al menos aproximadamente el 30% (preferiblemente al menos aproximadamente el 60%, incluso más preferiblemente al menos el 70%, el 80%, el 90%, el 95% y el 99%) durante al menos aproximadamente una hora (preferiblemente al menos dos horas, más preferiblemente cuatro horas), detectada por la luminiscencia cuando la composición de reactivo se combina con una muestra y con relación a la actividad de la composición de reactivo inmediatamente después de su ensamblaje (es decir, de 0 a 10 minutos después de que el componente que comprende luciferasa se combine con el componente que comprende un inhibidor de ATPasa) y (ii) reduce la actividad de ATPasa en al menos aproximadamente el 25% o al menos aproximadamente el 30%, (preferiblemente al menos aproximadamente el 40%, aún más preferiblemente al menos aproximadamente el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 90%, el 95%, el 99% o cualquier aumento en el mismo) que es endógena a la muestra en relación con la actividad de ATPasa de la muestra en ausencia del inhibidor de ATPasa.

El componente que comprende un inhibidor de ATPasa puede comprender más de un inhibidor de ATPasa donde los mismos están presentes en la composición de reactivo en una concentración de manera que su efecto combinado reduzca la actividad de ATPasa en al menos aproximadamente el 25% o al menos aproximadamente el 30%, (preferiblemente al menos aproximadamente el 40%, aún más preferiblemente al menos aproximadamente el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 90%, el 95%, el 99% o cualquier aumento en el mismo) que sea endógena a la muestra en relación con la actividad de ATPasa de la muestra en ausencia del inhibidor de ATPasa y cuando permita la composición de reactivo.

El kit puede comprender un envase que comprende una solución de detergente tamponada, dicha solución de detergente tamponada a un pH en el intervalo de aproximadamente pH 6,0 hasta aproximadamente pH 8,0 y dicha solución de detergente tamponada comprende DTAB, cuya concentración en la composición de reactivo está en el intervalo de aproximadamente el 0,05% a aproximadamente el 2% (p/v) y opcionalmente comprende NaF cuya concentración en la composición de reactivo está en el intervalo de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 20 mM y opcionalmente comprende THESIT cuya concentración en la composición de reactivo está en el intervalo de aproximadamente el 1% a aproximadamente el 5%. El kit comprende adicionalmente un envase separado que comprende luciferasa liofilizada, preferiblemente una luciferasa con la secuencia de SEC ID N°: 1, 2, 3 ó 4, más preferiblemente SEC ID N°: 2 ó 4. Preferiblemente la luciferasa, cuando se combina con la solución de detergente tamponada creando la composición de reactivo, está en una concentración de 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  o mayor, más preferiblemente en una concentración de 80  $\mu\text{g}/\text{ml}$  o mayor. Preferiblemente, el envase que comprende luciferasa liofilizada comprende además luciferina liofilizada. Opcionalmente, el kit comprende además instrucciones de uso del kit con el propósito de medir ATP.

### 55 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un gráfico que ilustra el efecto de concentraciones crecientes de diversos detergentes no iónicos y zwitteriónicos sobre actividad de ATPasa relativa en una muestra.

60 La Figura 2 es un gráfico que ilustra el efecto de concentraciones crecientes de diversos detergentes catiónicos o aniónicos sobre actividad de ATPasa relativa en una muestra.

### Descripción detallada de la invención

65 La presente invención describe composiciones con propiedades de estabilidad mejorada que comprenden una luciferasa y uno o más inhibidores de ATPasa. La invención describe además composiciones con propiedades de estabilidad mejorada que comprenden un agente de lisis celular, una luciferasa y uno o más inhibidores de ATPasa. La invención proporciona métodos que usan estas composiciones nuevas para detectar ATP en una muestra reduciendo las

etapas de lisis celular, inhibición de ATPasa endógena y adición de sustrato y luciferasa a una etapa única que después viene seguida de detección de la luminiscencia resultante. Alternativamente, la lisis celular se puede reemplazar por extracción de ATP a partir de una célula o una población de células. Preferiblemente, la luminiscencia resultante a partir de la combinación de una composición de la invención con una muestra tiene una duración prolongada, es decir, disminuida en menos de aproximadamente el 50% por hora con relación a la luminiscencia inmediatamente después de que la composición se combina con la muestra. El proceso de la invención reduce significativamente el tiempo y esfuerzo de la detección de ATP mediada por luciferasa en una muestra eliminando la necesidad de neutralizar la actividad de inhibidor de ATPasa antes de añadir luciferasa.

Existen múltiples variaciones de los métodos de detección de ATP usados actualmente, de los cuales todos actúan de una manera gradual. Algunos de tales métodos en primer lugar lisan las células e inactivan la actividad de ATPasa endógena de una muestra (por ejemplo, aumentando el pH de la muestra) y después neutralizan el inhibidor de ATPasa, convirtiendo de ese modo el entorno de la muestra de uno que favorece la inhibición de ATPasa y desfavorable para la actividad de luciferasa en uno favorable para la actividad de luciferasa antes de añadir luciferasa y medir la luminiscencia. Existen métodos similares en los que el entorno de la muestra se convierte en uno que favorece la actividad de luciferasa al mismo tiempo que se añade enzima luciferasa. No existen sistemas de detección de ATP que proporcionen una composición o método capaz de inactivar la actividad de ATPasa endógena y permitir la actividad de luciferasa en el mismo entorno. Y no existen sistemas de detección de ATP que proporcionen una composición o método capaz de lisar células o extraer ATP celular, inhibir la actividad de ATPasa endógena de una muestra y permitir la actividad de luciferasa en el mismo entorno. Por lo tanto, los ensayos actuales que usan luminiscencia para detectar ATP tienen la desventaja de necesitar etapas sucesivas y que requieren mucho tiempo.

En realizaciones preferidas, la presente invención reduce a una etapa única las manipulaciones necesarias para detección de ATP en una muestra, antes de la medición de luminiscencia. En el ensayo de ATP de etapa única de la invención, todos los componentes necesarios de la enzima dependiente de ATP (por ejemplo, luciferasa), tales como la enzima, sustratos e inhibidores de ATPasa están comprendidos dentro de una composición de reactivo y se añaden a una muestra al mismo tiempo. En algunas realizaciones, la composición de reactivo comprende además un agente de lisis celular o un agente para extracción de ATP de las células. En algunas realizaciones, un componente de la composición de reactivo es un compuesto (por ejemplo, NaF) que evita un aumento en los niveles de ATP en la muestra a lo largo del tiempo. El mecanismo mediante el cual los niveles de ATP aumentan a lo largo del tiempo en determinadas muestras, tales como un lisado celular preparado con células linfoides (por ejemplo, células de Jurkat), no se entiende bien, pero posiblemente se produce como resultado de la actividad de una enzima quinasa endógena a la muestra. En algunas realizaciones, un componente de la composición de reactivo es un agente estabilizante de enzima.

#### A. Definiciones

A menos que se defina de otra manera, todas las expresiones técnicas y científicas tienen el mismo significado que entiende comúnmente un especialista en la técnica al que pertenece esta invención. Todas las patentes y publicaciones citadas se incorporan como referencia en su totalidad a menos que se indique de otro modo.

Las recomendaciones de nomenclatura de Demerec *et al.*, 1966, donde las mismas son pertinentes a genética, se adaptan en este documento. Para distinguir entre genes (y ácidos nucleicos relacionados) y las proteínas que los mismos codifican, las abreviaturas para genes se indican mediante texto *en cursivas* (o subrayado), mientras que las abreviaturas de las proteínas comienzan con una letra mayúscula y no se ponen en cursivas. Por tanto, *luc* o Luc se refiere a la secuencia de nucleótidos de *luciferasa* que codifica el polipéptido de luciferasa o Luc.

Una luciferasa “aislada” o “purificada” es aquella que se ha identificado y separado y/o recuperado a partir de un componente de su entorno natural.

El término “muestra” como se usa en este documento, se usa en su sentido más amplio. Una muestra es una composición que se sospecha que contiene ATP que se analiza usando la invención. Mientras que con frecuencia se conoce que una muestra contiene o se sospecha que contiene una célula o una población de células, opcionalmente en un medio de cultivo o un lisado celular, una muestra también puede ser una superficie sólida (por ejemplo, un hisopo, membrana, filtro o partícula), que se sospecha que contiene una célula o población de células unida. Se contempla que para una muestra sólida de este tipo, se prepara una muestra acuosa añadiendo el sólido a la composición de reactivo de la invención o a otra solución acuosa a la que se añade la composición de reactivo de la invención. En algunos casos es deseable la filtración para generar una muestra, por ejemplo, para ensayar un líquido o muestra gaseosa mediante un proceso de la invención. La filtración se prefiere cuando una muestra se toma a partir de un volumen grande de un gas o líquido diluido.

El término “detección”, como se usa en este documento, se refiere a determinar cuantitativamente o cualitativamente la presencia o ausencia de un componente dentro de la muestra.

“Porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos” se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia que son idénticos a, con o frente a residuos de aminoácidos de una segunda secuencia en la región de superposición cuando las dos secuencias están alineadas de forma óptima. Para determinar el porcentaje de identidad de aminoácidos, las secuencias se alinean localmente y, si es necesario, se introducen huecos para

conseguir el porcentaje máximo de identidad de secuencia; las sustituciones conservativas no se recuentan cuando se calcula la identidad de secuencia. Los especialistas en la técnica conocen los procedimientos de alineamiento de secuencias de aminoácidos para determinar el porcentaje de identidad. Se puede usar software informático disponible al Público tal como software BLAST (NCBI en [www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)) para alinear secuencias peptídicas.

- 5 Los especialistas en la técnica pueden determinar algoritmos y parámetros apropiados para medir alineamiento, que incluyen cualquiera de los algoritmos y parámetros necesarios para conseguir alineamiento óptimo de dos secuencias de aminoácidos.

10 Cuando las secuencias de aminoácidos están alineadas, el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos determinada A para, con o frente a una secuencia de aminoácidos determinada B (que se puede expresar alternativamente como una secuencia de aminoácidos determinada A que tiene o comprende un porcentaje determinado de identidad de secuencia de aminoácidos para, con o frente a una secuencia de aminoácidos determinada B) se puede calcular como:

15 
$$\% \text{ de identidad de secuencia de aminoácidos} = (X/Y) \cdot 100$$

20 donde X es el número de residuos de aminoácidos valorados como coincidencias idénticas en el alineamiento óptimo de A y B mediante el programa o algoritmo de alineamiento de secuencias e Y es el número total de posiciones de aminoácidos alineadas.

### B. Composición de reactivo

25 La composición de reactivo descrita por la presente invención comprende uno o más inhibidores de ATPasa, preferiblemente un detergente y una enzima dependiente de ATP no endógena, donde la composición es capaz de mantener una actividad enzimática de al menos aproximadamente el 30% durante al menos aproximadamente una hora, preferiblemente al menos aproximadamente 2 horas, más preferiblemente al menos aproximadamente 4 horas, en comparación con su actividad inmediatamente después (de 0 a 10 minutos) de que la enzima se combine con el inhibidor de ATPasa y donde el uno o más inhibidores de ATPasa están presentes en la composición en una concentración suficiente para reducir colectivamente la actividad de ATPasa endógena de la muestra en al menos aproximadamente el 25% más preferiblemente al menos aproximadamente el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 90%, el 95% o el 99% o cualquier aumento en los mismos con relación a la actividad de ATPasa endógena de la muestra en ausencia del inhibidor de ATPasa. En realizaciones preferidas de la invención, las enzimas dependientes de ATP no endógenas son luciferasas.

#### 35 1. Luciferasas

40 Las enzimas luciferasa cuyos productos catalíticos incluyen luz, ofrecen sensibilidad, un producto detectable y posibilitan la medición sencilla de ATP. Sin embargo, se puede usar cualquier enzima productora de luminiscencia que sea dependiente de ATP en los métodos y composiciones de la presente invención.

45 En su nivel más básico, las luciferasas se definen por su capacidad de producir luminiscencia. Más específicamente, una luciferasa es una enzima que cataliza la oxidación de un sustrato, luciferina, produciendo de ese modo oxiluciferina y fotones.

50 Hasta la fecha, se han identificado cinco clases de luciferasas (Jones *et al.*, 1999; Thomson *et al.*, 1997). De éstas, las luciferasas de escarabajo tales como las de la luciérnaga común (familia *Lampyridae*), forman una clase diferente con orígenes evolutivos únicos (McElroy *et al.*, 1969; White *et al.*, 1969; White *et al.*, 1975). Las luciferasas de escarabajo con frecuencia se denominan luciferasas de luciérnaga en la bibliografía; sin embargo, las luciferasas de luciérnaga son en realidad un subgrupo de la clase de luciferasa de escarabajo. Las luciferasas de escarabajo se pueden purificar a partir de las linternas de los mismos escarabajos o a partir de sistemas de expresión de proteína conocidos en la técnica (Baldwin y Green, 200; Beny y Dolivo, 1976; Branchini *et al.*, 1980; Filippova *et al.*, 1989).

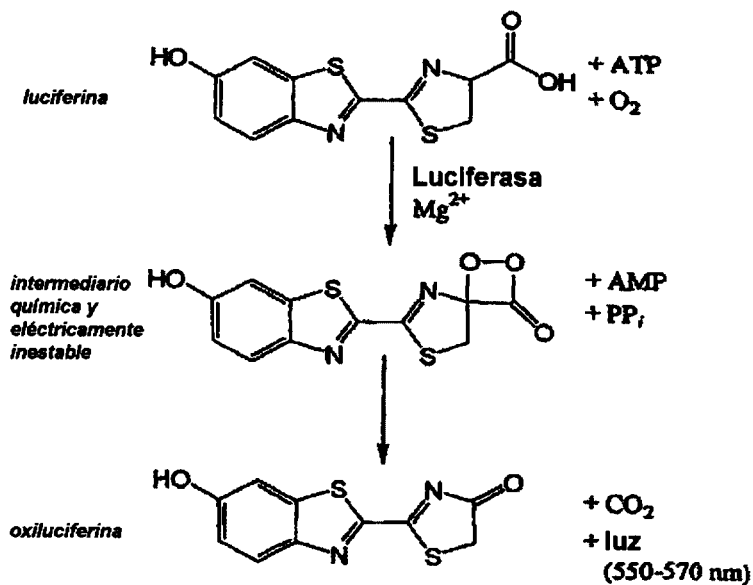
55 Las luciferasas de escarabajo, particularmente luciferasa de luciérnaga de la luciérnaga Norteamericana *Photinus pyralis*, se conocen en la técnica. La luciferasa de *P. Pyralis* (LucPpy) consiste en aproximadamente 550 aminoácidos de M, 61 kDa calculado mediante la proteína codificada por la secuencia de nucleótidos del gen. Sin embargo, son deseables otras luciferasas de luciérnaga, tales como luciferasa de luciérnaga *Photuris pennsylvanica* (LucPpe2; 545 residuos de aminoácidos; GenBank 2190534, (Ye *et al.*, 1997)). Se prefieren las luciferasas mutantes obtenidas a partir de LucPpe2 (por ejemplo, LucPpe2m78 (también conocida como 78-0B10), SEC ID N°: 1; LucPpe2m90 (también conocida como 90-1B5), SEC ID N°: 2; LucPpe2m133 (también conocida como 133-1B2), SEC ID N°: 3, LucPpe2m146 (también conocida como 146-1H2), SEC ID N°: 4. El método para preparar LucPpe2m78, LucPpe2m90, LucPpe2m133 y LucPpe2m146 se describe en el documento WO 01/20002.

65 Las luciferasas aisladas y/o purificadas se usan típicamente en la presente invención. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían típicamente con los usos de diagnóstico o terapéuticos de la luciferasa y pueden incluir enzimas, hormonas y otros materiales proteináceos o no proteináceos. Una técnica para evaluar la pureza es aplicar análisis de SDS-PAGE en condiciones no reductoras o reductoras usando tinción de azul de Coomassie o de plata. Las luciferasas aisladas incluyen luciferasa *in situ* dentro de células recombinantes, ya

que no estará presente al menos un componente del entorno natural de luciferasa. Las luciferasas se pueden aislar a partir de muestras de ensayo biológicas que producen luciferasa o a partir de una célula que exprese un polinucleótido exógeno que codifica una luciferasa deseada (por ejemplo, un nucleótido que codifica 78-0B10, 90-1B5, 133-1B2 ó 146-1H2 (SEC ID N°: 5-8, respectivamente)). Los especialistas en la técnica conocen tales técnicas.

El sustrato de origen natural para luciferasas de escarabajo es luciferina de luciérnaga, un ácido orgánico poliheterocíclico, un ácido orgánico poliheterocíclico, ácido D-(-)-2-(6'-hidroxi-2'-benzotiazolil)- $\Delta^2$ -tiazolin-4-carboxílico (luciferina). La luciferina se puede aislar a partir de la naturaleza (por ejemplo, a partir de luciérnagas) o se puede sintetizar. La luciferina sintética puede tener la misma estructura que la luciferina de origen natural o se puede derivatizar, mientras funcione de forma análoga (Bowie *et al.*, 1973; Branchini, 2000; Craig *et al.*, 1991; Miska y Geiger, 1987; Yang y Thomason, 1993). Los ejemplos de derivados de luciferina incluyen éster metílico de D-luciferina, D-luciferil-L-fenilalanina, D-luciferil-L-N- $\alpha$ -arginina, D-luciferina-O-sulfato y D-luciferina-O-fosfato (Miska y Geiger, 1987), ésteres de luciferasas que se hidrolizan o sobre los que actúan esterasas para luciferina mediante componentes en una muestra (Craig *et al.*, 1991; Yang y Thomason, 1993). Otros ejemplos de análogos de luciferina útiles incluyen naftil- y quinolilluciferina, que emiten luz en los espectros de luz verde y roja respectivamente (Branchini *et al.*, 1989). Existen múltiples fuentes comerciales de luciferina (por ejemplo, Promega Corp. Madison, WI; Molecular Probes, Eugene, OR).

La reacción catalizada por luciferasa de escarabajo que produce luminiscencia (la reacción de luciferasa-luciferina) implica luciferina de luciérnaga, adenosin trifosfato (ATP), magnesio y oxígeno molecular. En la reacción inicial, la luciferina de luciérnaga y el ATP reaccionan para formar luciferil adenilato con la eliminación de pirofosfato inorgánico. El luciferil adenilato permanece unido firmemente al sitio catalítico de luciferasa. Cuando esta forma de la enzima se expone a oxígeno molecular, el luciferil adenilato unido a enzima se oxida para producir oxiluciferina en un estado electrónicamente excitado. La luciferina oxidada excitada emite luz al volver al estado basal:



Se contempla que la función de ATP de la reacción se pueda realizar mediante un análogo de ATP (por ejemplo, ATPd). También se contempla que otros iones puedan servir como sustitutos de iones de magnesio (por ejemplo, MN<sup>2+</sup> o Ca<sup>2+</sup>). Adicionalmente, el oxígeno es un reactivo de la reacción. Por lo tanto, la reacción no se debe conducir en condiciones anaeróbicas. Sin embargo, generalmente no es necesario para practicar la invención proporcionar más oxígeno del que está presente en el aire. Las reacciones pueden tener lugar en envases cerrados, con tal de que exista suficiente oxígeno en la solución de reacción.

La mayoría de las reacciones luciferasa-luciferina generan un destello de luz que es efímero. Sin embargo, algunas de las luciferasas preferidas para uso con la invención, por ejemplo, luciferasas LucPpe2m146 y LucPpe2m90, en las condiciones de la invención generan una señal luminiscente de "tipo brillante" con menos del 50% de pérdida de luminiscencia por hora después de que la composición de reactivo se combina con la muestra.

Una variante de luciferasa de longitud completa tendrá una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente el 80%, preferiblemente una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente el 81%, más preferiblemente una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente el 82%, el 83%, el 84%, el 85%, el 86%, el 87%, el 88%, el 89%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97% y el 98% y lo más preferiblemente una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente



## ES 2 325 808 T3

el 99% con una secuencia de luciferasa nativa de longitud completa y conservará la capacidad de generar luminiscencia. Generalmente, los fragmentos de luciferasa variante tienen una longitud de al menos aproximadamente 50 aminoácidos, con frecuencia al menos aproximadamente 60 aminoácidos, con más frecuencia una longitud de al menos aproximadamente 70, 80, 90, 100, 150, 200, 300, 400, 500 ó 550 o más aminoácidos y conservan la capacidad de generar luminiscencia. Una luciferasa, fragmento de luciferasa, variante de luciferasa o fragmento de luciferasa variante se puede fusionar con otras secuencias de aminoácidos no luciferasa y aún ser funcional.

Se puede purificar luciferasa de escarabajo de longitud completa, fragmentos de luciferasa de escarabajo, variantes de luciferasa de escarabajo y fragmentos variantes de enzima luciferasa de escarabajo a partir de una fuente nativa o prepararse mediante varias técnicas, que incluyen (1) síntesis química, (2) digestión enzimática (proteasa) de luciferasa y (3) métodos de ADN recombinante. Los métodos de síntesis química se conocen en la técnica, como lo son métodos que emplean proteasas para escindir sitios específicos. Para producir segmentos de proteína de luciferasa, se pueden preparar segmentos de *luciferasa* o variantes de *luciferasa* y después expresarse en un organismo hospedador, tal como *E. coli*. Los métodos tales como digestión con endonucleasa o reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permiten a un especialista en la técnica generar un suministro ilimitado de fragmentos bien definidos. Preferiblemente, los fragmentos de luciferasa comparten al menos una actividad biológica con luciferasa nativa, así como actividad catalítica aunque el nivel de actividad puede variar del de la luciferasa nativa.

Se puede usar cualquier tipo de sustitución, inserción o supresión de aminoácidos o combinación de los mismos para generar una luciferasa variante. Sin embargo, una luciferasa con una sustitución de aminoácido conservativa es más probable que conserve actividad. Las sustituciones conservativas útiles se muestran en la Tabla A "Sustituciones preferidas".

TABLA A

*Sustituciones preferidas*

<b>Residuo original</b>	<b>Sustituciones ilustrativas</b>	<b>Sustitución preferida</b>
Ala (A)	Val, Leu, Ile	Val
Arg (R)	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn (N)	Gln, His, Lys, Arg	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro, Ala	Ala
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile (I)	Eu, Val, Met, Ala, Phe, Norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys (K)	Arg, Gln, Asn	Arg
Met (M)	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr, Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val (V)	Ile, Leu, Met, Phe, Ala, Norleucina	Leu

Las sustituciones no conservativas que logran (1) la estructura de la cadena principal del polipéptido, tal como una conformación de lámina  $\beta$  o helicoidal  $\alpha$ , (2) la carga o (3) la hidrofobicidad o (4) la masa de la cadena lateral del sitio diana pueden modificar la función de luciferasa. Los residuos se dividen en grupos basándose en propiedades de cadena lateral comunes como se indica en la Tabla B. Las sustituciones no conservativas suponen intercambiar un elemento de una de estas clases por otra clase.

TABLA B

*Clases de aminoácidos*

Clase	Aminoácidos
Hidrófobo	Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile
Hidrófilo neutro	Cys, Ser, Thr
Ácido	Asp, Glu
Básico	Asn, Gln, His, Lys, Arg
Conformación de cadena interrumpida	Gly, Pro
Aromático	Trp, Tyr, Phe

Los genes de *luciferasa* variante o fragmentos génicos se pueden preparar usando métodos conocidos en la técnica tales como mutagénesis mediada por oligonucleótidos (dirigida a sitio), exploración de alanina y mutagénesis por PCR. Se puede realizar mutagénesis dirigida a sitio (Carter, 1986; Zoller y Smith, 1987), mutagénesis de cassette, mutagénesis de selección de restricción (Wells *et al.*, 1985) u otras técnicas conocidas en el ADN clonado para producir el ADN de variante de luciferasa (Ausubel *et al.*, 1987; Sambrook, 1989).

*2. Luciferasas preferidas*

Las luciferasas preferidas de la invención poseen actividad catalítica que depende del ATP y emite fotones. Las luciferasas preferidas de la invención tienen quimioestabilidad mejorada en presencia de inhibidores de ATPasa con relación al nivel de quimioestabilidad de luciferasa de *P. pyralis* (LucPpy) en las mismas condiciones de reacción. Las luciferasas preferidas usadas en las composiciones y métodos de la invención generan una señal estable, es decir, las mismas producen duración mejorada de luminiscencia en una reacción de luciferasa definida como una pérdida de luminiscencia de menos del 50% por hora con relación a la luminiscencia en el momento en el que se inició la reacción de luciferasa. Las luciferasas preferidas de la invención permiten análisis múltiples de una muestra a lo largo del tiempo o análisis de muchas muestras a lo largo del tiempo, una hora después de que la luciferasa se combine con el inhibidor de ATPasa, más preferiblemente dos horas y más preferiblemente cuatro horas o más. Opcionalmente, las luciferasas usadas en las composiciones y métodos de la invención tienen propiedades de termoestabilidad mejoradas. Una luciferasa preferida ilustrativa es LucPpe2m146 (SEC ID N°: 4). Las enzimas adicionales útiles en la invención son LucPpe2m78 (SEC ID N°: 1), LucPpe2m90 (SEC ID N°: 2) y LucPpe2m133 (SEC ID N°: 3).

Las luciferasas ilustrativas, LucPpe2m78 (SEC ID N°: 1), LucPpe2m90 (SEC ID N°: 2) y LucPpe2m133 (SEC ID N°: 3) y LucPpe2m146 (SEC ID N°: 4) se generaron a partir de un mutante de *P. pennsylvanica* (T249M). La secuencia de ácidos nucleicos que codifica esta proteína se sometió a métodos mutagénicos que incluyen mutagénesis recursiva seguida de exploraciones para determinar termoestabilidad, estabilidad de señal y unión de sustrato y se describe en su totalidad por Wood y Hall (documento WO 9914336, 1999).

*Quimioestabilidad*

“Luciferasas quimioestables” como se usa en este documento, define luciferasas que conservan actividad en presencia de compuestos o condiciones cuando esos compuestos o condiciones inhiben típicamente ATPasas y alteran la función de luciferasas no quimioestables tales como LucPpy. En este documento se observó que las luciferasas ilustrativas identificadas anteriormente [(LucPpe2m78 (SEC ID N°: 1), LucPpe2m90 (SEC ID N°: 2) y LucPpe2m133 (SEC ID N°: 3) y LucPpe2m146 (SEC ID N°: 4)] tenían quimioestabilidad mejorada para inhibidores de ATPasa.

Por tanto, las luciferasas preferidas incluyen aquellas que mantienen al menos aproximadamente el 30% (preferiblemente al menos aproximadamente el 60%, el 70%, el 80%, el 90%, el 95% y el 99%) de actividad enzimática medida

## ES 2 325 808 T3

mediante luminiscencia al menos una hora (preferiblemente al menos dos horas y más preferiblemente al menos cuatro horas) después del contacto con una cantidad de inhibidor de ATPasa, preferiblemente un detergente, por ejemplo, detergente catiónico (preferiblemente DTAB o BDDABr), detergente aniónico (preferiblemente desoxicolato o SDS) o detergente zwitteriónico (preferiblemente sulfobetaina 3-10) o combinación de los mismos, suficiente para reducir colectivamente la actividad de ATPasa endógena a una muestra en al menos aproximadamente el 25% (preferiblemente al menos aproximadamente el 30%, aún más preferiblemente al menos aproximadamente el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 90%, el 95% y el 99% o cualquier aumento en los mismos) con relación a la actividad de ATPasa de la muestra en ausencia del inhibidor de ATPasa.

La quimioestabilidad de una enzima también se puede indicar mediante la velocidad de descenso de su actividad a lo largo del tiempo. Por ejemplo, poco después (0 a 10 minutos) de mezclar el inhibidor de ATPasa y la luciferasa, creando de ese modo la composición de reactivo, en varios puntos de tiempo posteriores se añade una alícuota de la composición de reactivo a una muestra y poco después a partir de entonces se obtienen mediciones de unidades relativas de luz (url). Estas mediciones se pueden graficar para determinar una tendencia o descenso en la actividad enzimática en la composición de reactivo a lo largo del tiempo.

Las luciferasas quimioestables preferidas (por ejemplo, Ppe2m78, Ppe2m90, Ppe2m133 y Ppe2m146) también conservan actividad en soluciones con múltiples detergentes. Específicamente, soluciones que contienen el 0,01%, preferiblemente el 0,05%, el 0,1%, el 0,2%, el 0,3%, el 0,4%, el 0,5%, el 0,6%, el 0,7%, el 0,8%, el 0,9%, más preferiblemente el 0,25% de CHAPS (3-([3-colamidopropil]dimetilamonio)-1-propanosulfonato) con al menos el 0,01%, preferiblemente el 0,05%, el 0,1%, el 0,2% y más preferiblemente el 0,3% o el 1,0% de BDDABr, ácidos taurocólico o taurolitocólico o DTAB o el 0,01%, preferiblemente el 0,05%, el 0,1%, el 0,2%, el 0,3%, el 0,4%, el 0,5%, el 0,6%, el 0,7%, el 0,8%, el 0,9%, más preferiblemente el 1,0% de ácidos taurocólico o taurolitocólico con al menos el 0,01%, preferiblemente el 0,05%, el 0,1%, el 0,2% y lo más preferible el 0,3% o 1,0% de BDDABr, DTAB o CHAPS. Otras soluciones de detergentes múltiples en las que Ppe2m78, Ppe2m90, Ppe2m133 y Ppe2m146 conservan actividad incluyen el 0,01%, preferiblemente el 0,05%, más preferiblemente el 0,1% de TRITON X-100 con al menos el 0,01%, preferiblemente el 0,05%, el 0,1%, el 0,2%, el 0,5%, más preferiblemente el 1,0% de BDDABr, DTAB o CHAPS o el 0,01%, preferiblemente el 0,05%, el 0,1%, el 0,2%, el 0,3%, el 0,4%, el 0,5%, el 0,6%, el 0,7%, el 0,8%, el 0,9%, más preferiblemente el 1,0% de ácidos taurocólico o taurolitocólico con al menos el 0,01%, preferiblemente el 0,05%, el 0,1%, el 0,2% y más preferiblemente el 0,3% o el 1,0% de BDDABr, DTAB o CHAPS o el 0,05%, el 1,0%, el 2,0%, el 4,0% preferiblemente el 2% de dodecil éter de polietilenglicol 400 (THESIT), con al menos el 0,05%, preferiblemente el 0,1%, el 0,2% y lo más preferiblemente el 0,3% o el 1,0% de BDDABr, DTAB o CHAPS.

### 35 *Termoestabilidad*

En algunas realizaciones, es deseable una luciferasa termoestable que produzca luminiscencia u otra enzima dependiente de ATP termoestable que produzca una señal detectable, especialmente en muestras que se tratan con calor inmediatamente antes de la detección de ATP. Un polipéptido termoestable permanece activo a temperaturas que inactivan o desnaturalizan otras proteínas. Las enzimas LucPpe2m78, LucPpe2m90, LucPpe2m133 y LucPpe2m146 presentan termoestabilidad aumentada en comparación con luciferasas encontradas en la naturaleza o codificadas a partir de polinucleótidos aislados a partir de la naturaleza.

### 45 *Estabilidad de señal*

Las luciferasas preferidas usadas en las composiciones y métodos de la invención generan una señal estable, es decir, tales luciferasas, cuando se usan en una reacción de luciferasa, producen luminiscencia con duración mejorada definida como menos del 50% de pérdida de luminiscencia por hora con relación a la luminiscencia en el momento en el que se inició la reacción de luciferasa. Esta propiedad se denomina estabilidad de señal. Las luciferasas preferidas de la invención permiten análisis múltiples de una muestra a lo largo del tiempo o análisis de muchas muestras a lo largo del tiempo, al menos una hora después de que la luciferasa se combine con el inhibidor de ATPasa, más preferiblemente al menos dos horas y lo más preferiblemente al menos cuatro horas o más. La combinación de una luciferasa y un inhibidor de ATPasa en la composición de reactivo, donde la luciferasa es capaz de producir luminiscencia con duración mejorada aunque esté en presencia de un inhibidor de ATPasa (y, opcionalmente, inhibidores de quinasa) que estabiliza la cantidad de ATP presente en la muestra da como resultado un método fiable y eficaz para detectar y cuantificar ATP celular durante períodos de tiempo prolongados.

### 60 *Inhibidor de ATPasa*

La invención también describe un inhibidor de ATPasa, preferiblemente un detergente que inhibe ATPasas, más preferiblemente un detergente con un grupo cargado, por ejemplo, detergente catiónico (preferiblemente DTAB o BDDABr), detergente aniónico (preferiblemente desoxicolato o SDS) o detergente zwitteriónico (preferiblemente sulfobetaina 3-10). Tales inhibidores evitan que las ATPasas endógenas de la muestra procesen ATP a adenosin difosfato (ADP) y adenosin monofosfato (AMP) antes de que se permita a la luciferasa utilizar el ATP en la muestra para la reacción de luciferasa-luciferina. Los inhibidores de ATPasa pueden inactivar ATPasas directamente o indirectamente. Se pueden unir a la ATPasas, en los sitios activos, evitando de ese modo la unión de sustrato o desnaturalizar ATPasas,

## ES 2 325 808 T3

tal como mediante detergentes de desnaturalización o los mismos pueden secuestrar selectivamente ATPasas de sus sustratos.

Una realización de la presente invención usa detergentes catiónicos tales como detergentes DTAB o BDDABr que actúan como inhibidores de ATPasa. Sin embargo, se contemplan otros inhibidores de ATPasa, tales como otros detergentes catiónicos, detergentes aniónicos (por ejemplo, SDS y desoxicolato) y detergentes zwitteriónicos (por ejemplo, sulfobetaina 3-10).

Para DTAB o BDDABr la concentración en la composición de reactivo está preferiblemente en el intervalo de aproximadamente el 0,02% a aproximadamente el 5,0%, preferiblemente aproximadamente el 0,05%, aún más preferiblemente aproximadamente el 0,1%, el 0,2%, el 0,3%, el 0,4%, el 0,5%, el 0,6%, el 0,7%, el 0,8%, el 0,9%, el 1,0%, el 1,1%, el 1,2%, el 1,3%, el 1,4% y el 1,5% y lo más preferiblemente hasta una concentración final de aproximadamente el 1,0% en la composición de reactivo.

Se contemplan otros inhibidores de ATPasa de detergente no catiónico para inclusión en la composición de reactivo; sus requerimientos son que los mismos, como DTAB, preferiblemente inhiban al menos aproximadamente el 25%, más preferiblemente al menos aproximadamente el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 81%, el 82%, el 83%, el 84%, el 85%, el 86%, el 87%, el 88%, el 89%, el 90%, más preferiblemente al menos aproximadamente el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% y lo más preferiblemente aproximadamente el 100% de actividad de ATPasa endógena en una muestra cuando estén presentes en una composición de reactivo donde la composición de reactivo sea capaz de mantener al menos el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 81%, el 82%, el 83%, el 84%, el 85%, el 86%, el 87%, el 88%, el 89%, el 90%, más preferiblemente al menos aproximadamente el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% y lo más preferiblemente aproximadamente el 100% de actividad, medida mediante luminiscencia después de que la composición de reactivo se combine con la muestra, durante al menos una hora, más preferiblemente al menos 2 horas en comparación con la actividad de la composición de reactivo inmediatamente después de que la luciferasa se combine con el inhibidor de ATPasa. Los detergentes no catiónicos potencialmente adecuados que funcionan como inhibidores de ATPasa incluyen detergentes aniónicos (preferiblemente SDS y desoxicolato) y detergentes zwitteriónicos (preferiblemente, sulfobetaina 3-10). La concentración de un inhibidor de ATPasa particular variará dependiendo del inhibidor usado y, hasta cierto alcance, de la muestra que se esté analizando. Un especialista en la técnica está familiarizado con métodos para determinar la concentración apropiada de un inhibidor de ATPasa para inclusión en la composición de reactivo; por ejemplo, los mismos pueden examinar señales obtenidas de luciferina-luciferasa a lo largo del tiempo, comparar esas muestras que tienen concentraciones variables de un inhibidor de ATPasa candidato con las de muestras que no contienen inhibidores de ATPasa conocidos.

Se espera que la concentración más preferida e incluso el intervalo de concentración funcional en los métodos de la invención varíen para detergentes diferentes. Por ejemplo, las concentraciones de SDS funcionales en los métodos de la invención son aproximadamente el 0,002% (Ejemplos 2 y 3). El intervalo de concentración funcional de un detergente usado en la presente invención se puede determinar fácilmente por un especialista en la técnica usando los métodos descritos en este documento.

Se contempla que algunos inhibidores de ATPasa, en algunas de las concentraciones útiles en la invención, puedan ser insolubles o tener solubilidad baja en soluciones acuosas. Estos compuestos se pueden disolver en primer lugar en una solución orgánica (por ejemplo, sulfóxido de dimetilo o dimetilformamida) y después diluirse en la composición de reactivo para uso en la composición y métodos de la invención.

### *Inhibidores de enzimas generadoras de ATP*

En algunas muestras, pueden estar activas enzimas tales como quinasas, permitiendo la producción continua de ATP. Debido a que la concentración de ATP se determina en un momento específico, si tal actividad enzimática se deja sin comprobar, entonces se realizará una estimación excesiva de la concentración de ATP. Para detener tal actividad generadora de ATP, se pueden usar inhibidores de la producción de ATP. Aunque la acción de un inhibidor específico puede no comprenderse completamente, su utilidad no se obvia. Los ejemplos de compuestos útiles incluyen NaF, que es útil en concentraciones de al menos 1 mM, preferiblemente 2 mM a 100 mM o cualquier aumento a partir de la misma; 2 mM es la más preferida. Sin embargo, se puede usar cualquier inhibidor de este tipo, si no influye negativamente en la luciferasa como para excluirla de la utilidad de la invención. Un especialista en la técnica sabrá cómo determinar la concentración apropiada de un inhibidor de este tipo, independientemente de si el inhibidor es nuevo o bien conocido. Otros inhibidores de enzimas generadoras de ATP incluyen, pero no están limitados a, vanadato, paranitrofenilfosfato y ácido dicloroacético (Kiechle *et al.*, 1980).

### *Tampones*

Se contempla cualquier tampón que mantenga el pH adecuado para la solución de trabajo y no interfiera con la reacción de luciferasa-luciferina. El intervalo de pH preferido está entre aproximadamente pH 4,5 y aproximadamente pH 9,0, más preferiblemente entre aproximadamente pH 6,0 y aproximadamente pH 8,0. Además de MES y tampones de citrato, pueden ser adecuados otros tampones, tales como solución salina tamponada con fosfato (PBS), Tris, áci-

## ES 2 325 808 T3

do N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(2-etanosulfónico) (HEPES), piperazina-1,4-bis(ácido 2-etanosulfónico) (PIPES), borato y cualquier otro tampón conocido por los especialistas en la técnica. La selección de tampones apropiados depende de la capacidad de amortiguación del pH e interacción con la reacción de luciferasa-luciferina.

5

### *Desespumantes*

Los agentes desespumantes son deseables para evitar que la espuma interfiera con la detección de bioluminiscencia, especialmente en aplicaciones que cuantifican la luminiscencia. Agentes tales como MAZU pueden ser orgánicos o  
10 basados en silicona. La selección de desespumantes depende de su capacidad de eliminar espuma sin interferir con la reacción de luciferasa-luciferina.

### *Magnesio*

15

La reacción de luciferasa de escarabajo-luciferina depende no sólo de ATP, sino también de iones magnesio. Para asegurar la actividad de luciferasa, se suministra magnesio exógenamente. Además de sulfato de magnesio, se contemplan otras sales de magnesio, tales como cloruro de magnesio, gluconato de magnesio, acetato de magnesio, bromuro de magnesio, carbonato de magnesio, etc. En cualquier caso, el complejo de magnesio se tiene que disociar para hacer  
20 que los iones  $Mg^{2+}$  estén disponibles para la luciferasa y no interfieran con la reacción de luciferasa-luciferina. Un especialista en la técnica sabrá que pueden ser funcionales otros cationes en lugar de magnesio. Estos incluyen calcio y manganeso.

En algunas aplicaciones, el magnesio endógeno debería ser suficiente en cuyo caso se podría eliminar el magnesio exógeno.  
25

### *Agentes de lisis celular y agentes de extracción de ATP*

Para liberar cualquier ATP secuestrado dentro de una célula y para lisar células en una muestra, se pueden incluir agentes de lisis celular, tales como detergentes no iónicos. Se contempla cualquier agente de lisis celular que incluye otros detergentes no iónicos, (tales como de la serie Triton) detergentes catiónicos, aniónicos y zwitteriónicos, sales biliares, caótrofos y cualquier otro agente que altere las membranas celulares, incluyendo toxinas bacterianas tales como oxilisinas. Alternativamente, se contempla cualquier agente que permita la extracción de ATP a partir de las  
30 células (tal como CTAB). Los agentes que permiten la extracción de ATP a partir de una célula incluyen detergentes presentes en una concentración que pone orificios en la membrana celular, permitiendo que el ATP dentro de la célula se lixivie en el medio circundante, pero no está presente en una concentración tal que produzca un lisado celular.  
35

40

### *Agentes estabilizantes*

Aunque es resistente a la acción de detergentes no iónicos y concentraciones bajas de detergentes zwitteriónicos (Simpson y Hammond, 1991), la luciferasa de luciérnaga nativa se inactiva mediante detergentes catiónicos, tales como cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, CTAB (cetiltrimetilamonio), DTAB (bromuro de dodeciltrimetilamonio) y cloruro de metilbencetonio (Simpson y Hammond, 1991).  
45

El agente estabilizante puede ser cualquier compuesto que estabilice la luciferasa de la degradación. Los agentes estabilizantes adecuados incluyen proteínas (tales como albúmina sérica bovina o gelatina) o detergentes (preferiblemente detergentes no iónicos, más preferiblemente THESIT).  
50

### *Otros agentes*

Otros agentes que pueden estar incluidos en un kit incluyen sustancias que se conoce que mejoran la duración de luminiscencia resultante a partir de una reacción de luciferasa, tales como coenzima A (CoA), reactivos tiol, tales como ditiotreitil y  $\beta$  mercaptoetanol (Wood, documento US 5.283.179, 1994; Wood, documento US 5.650.289, 1997), quelantes de iones metálicos tales como EDTA para prolongar la señal e inhibidores de proteasa (Scheirer, documento US 5.618.682, 1997; Scheirer, documento US 5.866.348, 1999) o concentraciones elevadas de sales (Van Lune y Trer  
60 Wiel, documento WO 00/18953, 2000).

### *Otros contenidos del kit*

Los kits también pueden incluir reactivos en envases separados que faciliten la ejecución de un ensayo específico, tal como viabilidad celular, citotoxicidad, proliferación celular o determinación de concentración de ATP. Por ejemplo, se puede suministrar ATP para que se puedan determinar curvas normales o para usarse como controles internos. Las sustancias que se conoce que son citotóxicas para la célula se pueden incluir para uso como control positivo en ensayos  
65

## ES 2 325 808 T3

de viabilidad celular o para los efectos de compuestos sobre las células. El kit puede suministrar un componente de recolección de muestra tal como una membrana, filtro o hisopo.

### 5 4. Envases o recipientes

Los reactivos incluidos en los kits se pueden suministrar en envases de cualquier tipo de manera que se conserve la vida de los diferentes componentes y no se adsorban o se alteren por los materiales del envase. Por ejemplo, ampollas de vidrio selladas pueden contener luciferasa liofilizada o tampón que se ha envasado en una atmósfera de gas neutro no reactivo, tal como nitrógeno. Las ampollas pueden consistir en cualquier material adecuado, tal como vidrio, polímeros orgánicos, tales como policarbonato, poliestireno, etc, cerámica, metal o cualquier otro material empleado típicamente para contener reactivos. Otros ejemplos de envases adecuados incluyen botellas sencillas que se pueden fabricar de sustancias similares como ampollas y sobres, que pueden consistir en interiores revestidos de papel metalizado, tal como aluminio o una aleación. Otros envases incluyen tubos de ensayo, viales, matraces, botellas, jeringas o similares. Los envases pueden tener un orificio de acceso estéril, tal como una botella que tiene un obturador que se puede perforar mediante una aguja de inyección hipodérmica. Otros envases pueden tener dos compartimientos que estén separados por una membrana fácilmente amovible que, después de retirarse, permita que los componentes se mezclen. Las membranas amovibles pueden ser de vidrio, plástico, goma, etc.

### 20 5. Materiales de instrucción

Los kits también se pueden suministrar con materiales de instrucción. Las instrucciones pueden estar impresas en papel u otro sustrato y/o se pueden suministrar como un medio de lectura electrónica, tal como un disquete, CD-ROM, DVD-ROM, disco Zip, cinta de video, cinta de audio, etc. Las instrucciones detalladas pueden no estar asociadas físicamente con el kit; en lugar de ello, se puede dirigir al usuario a un sitio web de Internet especificado por el fabricante o distribuidor del kit o suministrarse como correo electrónico. En una realización preferida, las instrucciones instruyen al usuario a combinar la luciferasa con el inhibidor de ATPasa antes de añadir la composición de reactivo a una muestra.

### 30 D. Actividad de Composición de Reactivo

Para medir la luminiscencia y de ese modo determinar la actividad de composición de reactivo, se puede medir el valor de unidad relativa de luz (url) generado por la reacción de luciferasa en un punto de tiempo de interés después de que la composición de reactivo se combina con una muestra. Por ejemplo, se puede obtener un valor de url midiendo la luminiscencia resultante a partir de una muestra con una concentración conocida de ATP combinada con la composición de reactivo inmediatamente después (0-10 min) de que se ha añadido el componente que comprende el inhibidor de ATPasa al componente que comprende la luciferasa creando de ese modo la composición de reactivo. Esto se considera el 100% de actividad (tiempo cero) en esas condiciones. Si, después de combinar el componente que comprende el inhibidor de ATPasa con el componente que comprende la luciferasa y generar de ese modo la composición de reactivo, la composición de reactivo se deja durante dos horas, preferiblemente en el intervalo de temperatura de temperatura ambiente (aproximadamente 20°C - aproximadamente 25°C) a aproximadamente 37°C, antes de medir la luminiscencia en condiciones idénticas a las del ensayo de tiempo 0 y el valor de url obtenido es mayor del 60% al del obtenido en tiempo 0, entonces la composición de reactivo conservó al menos el 60% de su actividad durante dos horas.

Una composición de reactivo conserva el 30%, el 40%, el 50%, el 55%, el 60%, el 65%, el 70%, el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o cualquier aumento a partir del mismo y más preferiblemente el 100% de su actividad, medido por luminiscencia después de que la composición de reactivo se combina con la muestra durante al menos una hora, preferiblemente durante al menos dos horas, con relación a su actividad cuando se formuló (tiempo cero) es decir, desde el momento en el que se añadió el componente que comprendía el inhibidor de ATPasa al componente que comprendía luciferasa o poco después a partir de entonces (0-10 minutos).

En una realización preferida, la reserva de trabajo de la composición de reactivo comprende DTAB o BDDBr en concentraciones de aproximadamente el 0,02% (preferiblemente aproximadamente el 0,05%, el 0,1%, el 0,2%, el 0,3%, el 0,4%, el 0,5%, el 0,6%, el 0,7%, el 0,8%, el 0,9%, el 1%, el 1,1%, el 1,2%, el 1,3%, el 1,4%, el 1,5%, el 1,6%, el 1,7%, el 1,8%, el 1,9%, el 2%, el 2,5%, el 3%, el 3,5%, el 4%, el 4,5%, el 5%, el 5,5%, el 6%, el 6,5%, el 7%, el 7,5%, el 8%, el 8,5%, el 9%, el 9,5%, el 10% y cualquier aumento a partir de entonces, más preferiblemente aproximadamente el 1%) y conserva al menos aproximadamente el 30% (preferiblemente al menos aproximadamente el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 90%, el 95%, el 99%) de la actividad al menos una hora (preferiblemente al menos dos horas) después de la formulación.

En otra realización preferida las composiciones de reactivo comprenden sulfobetaina en una concentración del 0,6%, 0,7%, el 0,8%, el 0,9% o el 1,0% o cualquier aumento a partir del mismo, SDS en una concentración del 0,001%, el 0,002%, el 0,003%, el 0,004% o el 0,005% o cualquier aumento a partir del mismo o desoxicolato en una concentración del 0,1%, el 0,2%, el 0,3%, el 0,4%, el 0,5%, el 0,6% o cualquier aumento a partir del mismo y conserva al menos aproximadamente el 30% (preferiblemente al menos aproximadamente el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el

80%, el 90%, el 95%, el 99%) de actividad al menos una hora (preferiblemente al menos dos horas) después de la formulación.

#### 5 E. *Detección y cuantificación de los productos de la reacción de luciferasa-luciferina*

Una reacción de luciferasa de escarabajo-luciferina da como resultado la generación de luz (“luminiscencia”). La invención proporciona ensayos para medición de ATP midiendo la luminiscencia. Los usuarios pueden simplemente inspeccionar visualmente reacciones de muestra para determinar la producción de luz. Sin embargo, instrumentos más sensibles permiten no sólo la detección de señales débiles, sino también la cuantificación de la señal de luz. También se contemplan reacciones en las que se miden productos diferentes a la luz, de acuerdo con la naturaleza de los productos. Cualquier ensayo para la medición de ATP que dé como resultado una señal se puede beneficiar de la presente invención. Los instrumentos y métodos apropiados para tales productos serán aparentes para los especialistas en la técnica.

En todos los casos en los que se detecta luz, instrumentos especializados, tales como luminómetros, pueden leer el producto de luz de una reacción de luciferasa-luciferina. Se puede usar cualquier instrumento que pueda detectar luz de las longitudes de onda emitidas por la reacción de luciferasa-luciferina. Tales instrumentos pueden leer muestras extraordinariamente o en exploraciones de alto rendimiento, pueden leer muchas muestras alojadas en los pocillos de unas placas de micropocillos (formatos de 6, 24, 48, 96, 384, 1536 y así sucesivamente pocillos). Claramente, los dispositivos usados para medir la luz emitida no limitan la invención. Otros dispositivos que se pueden usar incluyen contadores de centelleo (Nguyen *et al.*, 1988) o instrumentos inventados o adaptados para ser sensibles a luminiscencia, tales como fotómetros (Picciolo *et al.*, 1977). También se puede usar película Fotográfica o película de rayos X para detectar luminiscencia. Además, un usuario puede inspeccionar visualmente una muestra para evaluar cualitativamente la luminiscencia.

#### F. *Usos de reacciones de luciferasa-luciferina dependientes de ATP*

Debido a que la reacción de luciferasa de escarabajo-luciferina es dependiente de ATP, se puede usar luciferasa con ensayo para determinar ATP. La reacción es extraordinariamente sensible, permitiendo detectar el ATP en una muestra que contenga tan poco como  $10^{-16}$  moles de ATP o menos. Esta sensibilidad se puede aprovechar para entender la viabilidad celular y los efectos que puedan ejercer sustancias exógenas sobre el metabolismo y viabilidad celular. En un contexto celular, el ATP impulsa el metabolismo celular, la presencia de ATP se correlaciona con una célula activamente metabolizante, la célula es “viable”.

La invención se refiere a métodos que se usan para detectar eficazmente y con precisión y cuantificar niveles de ATP celular, aprovechando la dependencia de ATP de la luciferasa de escarabajo para oxidar luciferina.

La invención comprende la adición de una composición única (composición de reactivo) que comprende una luciferasa y al menos un inhibidor de ATPasa a una muestra y después detectar la luminiscencia. Opcionalmente, también puede estar presente un inhibidor de quinasa o un compuesto que evite la acumulación de ATP en la composición de reactivo. Adicionalmente, puede estar presente en la composición un agente de lisis celular (por ejemplo, un polioxietileno tal como THESIT) o un agente de extracción de ATP. Esta etapa única que comprende añadir la composición de reactivo seguida de lectura de la luminiscencia representa un avance significativo en ensayos para determinar ATP.

##### 1. *Detección de ATP*

Los métodos de la invención proporcionan la detección sencilla cualitativa o cuantitativa de ATP (o análogo de ATP que pueda funcionar como un sustrato de luciferasa) en una muestra. En realizaciones preferidas, un experimento cualitativo sencillo en el que se genera luminiscencia en una muestra usando la invención, indica la presencia de ATP. La luminiscencia se genera usando una composición de reactivo que comprende luciferasa tal como LucPpe2m78, LucPpe2m90, LucPpe2m133 o LucPpe2m146 y uno o más inhibidores de ATPasa. Además, la composición de reactivo puede comprender adicionalmente uno o más de los siguientes componentes: luciferina, que se puede reconstituir a partir de una preparación liofilizada, (alternativamente, un sustrato análogo de luciferina apropiado), inhibidor o inhibidores de ATPasa, inhibidor o inhibidores de enzimas generadoras de ATP tales como quinasas, catión divalente (por ejemplo, magnesio), agentes estabilizantes de enzima, tampón, agente de lisis celular y agente de extracción de ATP celular.

Una muestra puede ser cualquiera que se sospeche que contiene ATP o análogo de ATP, tal como lisados celulares, células intactas, biopsias, alimentos, bebidas, hisopos pasados sobre superficies tales como las de animales, plantas u objetos inanimados y similares. Otros ejemplos de muestras incluyen composiciones de una concentración de ATP conocida. Las células o lisados celulares pueden ser de cualquier organismo, procarionta o eucariota. Los ejemplos de células procariontas incluyen *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis* y *S. typhimurium*. Las células eucariotas pueden ser de plantas, animales, hongos, insectos, etc o células cultivadas a partir de tales organismos. Los ejemplos incluyen *A. thaliana* y *Brassica sp.*, *Chlamydomonas sp.* y *Volvox sp.* (plantas), *H. sapiens* y *Mus sp.* (animales), *Saccharomyces*

5 *sp.* (esp. *Cerevisiae* y *pombe*) y *Neurospora sp.* (hongos), *D. melanogaster* y *C. elegans* (insectos), células de callo cultivadas *in vitro* de cualquier planta, células primarias cultivadas *in vitro* de cualquier organismo (tales como explantes de órganos de, por ejemplo, roedores), líneas celulares de mamífero tales como células de riñón canino Madin-Darby (MDCK) y de ovario de hámster chino (CHO) y líneas celulares de insectos tales como células Z. Estos ejemplos se proporcionan sólo como ejemplos y no tienen por objeto ser limitantes.

10 Un lisado celular comprende componentes celulares que ya no están organizados en una arquitectura celular intacta reconocible. Los lisados celulares pueden tener componentes solubles e insolubles, cualquiera de los cuales se puede retirar antes de usar el lisado. Los lisados se pueden preparar por cualquier medio, que incluye alteración física usando sonicación, un homogeneizador, mortero y mano, ciclo de congelación-descongelación o cualquier otro dispositivo o proceso que destruya la integridad física de las células o lisis mediante detergentes, tales como aquellos en los que LucPpe2m146 conserva actividad, tales como detergentes zwitteriónicos y no iónicos o detergentes catiónicos DTA o CTAB. Preferiblemente, el lisado celular se produce de una manera tal que la integridad de la concentración de ATP se conserva en el momento en que las células se recogen. Para detectar con precisión ATP en una muestra, preferiblemente se inhiben las enzimas que degradarían el ATP celular o las que generarían ATP. En ausencia de tales inhibidores, existe el riesgo de una determinación poco precisa de la concentración de ATP. Los inhibidores tales como DTAB inactivan ATPasas, mientras que otras moléculas tales como NaF inactivan la actividad enzimática generadora de ATP. Se tiene la hipótesis, todavía no entendida en su totalidad, que para esos tipos celulares en los que es eficaz NaF (por ejemplo, células linfoides), NaF está actuando potencialmente para inhibir una o varias quinasas.

15 Se pueden incorporar inhibidores de enzimas generadoras de ATP, esas enzimas que tienen como un producto o subproducto ATP, tales como la actividad de quinasa, en la composición de reactivo. Un ejemplo de un inhibidor eficaz es NaF (Bostick *et al.*, 1982). Tales composiciones comprenden NaF en concentraciones de al menos 0,5 mM, preferiblemente al menos 1 mM, más preferiblemente al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 mM o cualquier aumento a partir de los mismos; la más preferida es 2 mM. Otros inhibidores de enzimas generadoras de ATP incluyen otros inhibidores de quinasa, tales como vanadato, AMP, DAPP (Bostick *et al.*, 1982) y ácido dicloroacético (Kiechle *et al.*, 1980).

## 2. Cuantificación de ATP

25 Los métodos de la invención permiten que un usuario cuantifique la cantidad de ATP en una muestra cuantificando la cantidad de luminiscencia. La invención se aplica a una muestra de interés y también a muestras que contienen cantidades conocidas de ATP (controles). La señal generada a partir de aplicar la invención a una muestra de concentración de ATP desconocida se correlaciona con las señales generadas por controles internos (la adición de una cantidad conocida de ATP a una muestra y medición de la luminiscencia posterior) o curvas normales externas, generadas midiendo la luminiscencia de varias muestras de concentraciones de ATP conocidas y representándolas gráficamente. Los especialistas en la técnica conocen tales métodos (Moyer y Henderson, 1983; Ronner *et al.*, 1999; Stanley, 1989; Wood *et al.*, 1989).

## 3. Viabilidad celular

35 La presencia de ATP en una célula, eucariota o procarionta, indica procesos metabólicos activos, que indican una célula viable. Las composiciones, métodos y kits de la presente invención se pueden usar para ensayar la viabilidad celular (Cree, 1998; Jassim *et al.*, 1990; Petty *et al.*, 1995). Una medición precisa de la viabilidad celular permite la evaluación precisa de los efectos de sustancias sobre las células; los especialistas en la técnica conocen otros propósitos para determinar la viabilidad celular.

40 Determinar la viabilidad celular es útil, por ejemplo, para determinar citotoxicidad, proliferación celular, fenómenos biológicos, necrosis o alteraciones en el metabolismo celular. Los ensayos de viabilidad celular también pueden determinar la viabilidad global de una población celular.

45 La muestra en la que se mide el ATP para determinar la viabilidad celular pueden ser células viables, un lisado celular o cualquier otra muestra que se sospeche que contiene células. Cuando se usan células, se pueden usar luciferasas de escarabajo modificadas que tienen membrana permeable (por ejemplo, véase (Craig *et al.*, 1991)). Sin embargo, en muchos casos, se prefiere un lisado celular.

## 4. Efectos de compuestos sobre las células

50 Los métodos de la presente invención se pueden aplicar para medir los efectos de compuestos, tales como inorgánicos, orgánicos pequeños, péptidos, proteínas y polipéptidos, sobre el metabolismo celular cuando se ponen en contacto con una muestra (Aiginger *et al.*, 1980; Andreotti *et al.*, 1995; Bradbury *et al.*, 2000; Cree y Andreotti, 1997; Crouch *et al.*, 1993; Kangas *et al.*, 1984). Al determinar los efectos de compuestos sobre las células se puede evaluar la medición de la eficacia de una composición farmacéutica potencial. Los compuestos citotóxicos -aquellos que matan



células- pueden ser útiles en el tratamiento de células cancerosas, especialmente si matan selectivamente células que se dividen rápidamente. En otros casos, se puede invalidar un compuesto con alguna utilidad diferente si no se desea un efecto citotóxico. Debido a que ATP es una medición de la salud “metabólica” de una célula, una subida o depresión anormal de la reducción de ATP indica un cambio en la homeostasis celular. Los compuestos que contactan las células pueden influenciar la producción de ATP a través de un gran número de mecanismos, más particularmente muerte celular y proliferación celular. Estos compuestos se pueden catalogar en bibliotecas de compuestos o ensayarse de forma única. Tales aplicaciones de la invención aplican controles en los que se ponen en contacto muestras con sustancias de control cuyos efectos sobre el metabolismo del ATP se conocen. También preferiblemente, los controles incluyen muestras en las que están presentes luciferasa y el compuesto juntos para asegurar que el compuesto en sí mismo no esté influyendo directamente sobre la actividad de luciferasa.

Los siguientes ejemplos tienen por objeto ilustrar la presente invención sin limitación.

## 15 Ejemplos

### Ejemplo 1

#### 20 I. Detergentes que Inhiben ATPasas

Este ejemplo se ha diseñado para ensayar la capacidad de detergentes diferentes de inhibir la actividad de ATPasa endógena de células y demostrar el nivel de tal inhibición. Se ensayaron tres detergentes separados en cada una de cuatro clases de detergentes: aniónico [SDS (dodecilsulfato de sodio), Bioterge (un sulfato de  $\alpha$  olefina) y desoxicolato de sodio], no iónico [TRITON X-100, BigCHAP (N,N-bis(3-D-Gluconamidopropil)colamida) y THESIT (dodecil éter de polietilenglicol 400, Fluka, N° 88315)], catiónico [BDDABr (Bromuro de bencildimetildodecilamonio), CTAB (Bromuro de cetiltrimetilamonio) y DTAB (bromuro de dodeciltrimetilamonio)] y zwitteriónico [CHAPS (3[(3-Colamidopropil)dimetilamonio] ácido propanosulfónico), CHAPSO (3-[(3-Colamidopropil)dimetilamonio]-2-hidroxi-2-propanosulfonato) y Sulfobetaina 3-10 (N-Dodecil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato)]. Los detergentes se obtuvieron en Sigma, Fluka y Aldrich.

Células L929 (ATCC CCL-1;  $1,5 \times 10^5$  células/ml) en F12/DMEM (Hyclone, SH30023) que contenía suero de caballo al 10% (Hyclone, SH30074) se congelaron y se descongelaron durante cuatro ciclos para crear un lisado celular. Después se añadieron por separado  $50 \mu\text{l}$  de soluciones de detergente de reserva [al 10%, al 5,0%, al 1,0% y al 0,5% (p/v)] a  $450 \mu\text{l}$  de lisado celular, creando una concentración final de detergente en la muestra de lisado celular del 1,0%, el 0,5%, el 0,1% y el 0,05%, respectivamente (estos valores de porcentaje son los que se usan en la Tablas D y E en este documento más adelante). Las muestras de control contenían sólo lisado o ATP  $1,0 \mu\text{M}$  en tampón HEPES 15 mM (pH 7,5). Todas las muestras se incubaron a  $22^\circ\text{C}$  (temperatura ambiente) por la duración del experimento.

En diversos puntos de tiempo, se añadieron  $20 \mu\text{l}$  de cada mezcla de muestra/detergente a una placa de luminómetro de 96 pocillos por triplicado y después se añadieron  $100 \mu\text{l}$  de una solución (“luciferasa-luciferina” o “reactivo L/L”) que contenía tampón HEPES 25 mM (pH 7,5),  $40 \mu\text{g}$  de enzima luciferasa LucPpe2m146 (Promega, E140), luciferina (Promega)  $100 \mu\text{M}$  y  $\text{MgSO}_4$  10 mM a cada pocillo. El reactivo L/L se almacenó a  $4^\circ\text{C}$  durante el transcurso del experimento y después se dejó que alcanzara temperatura ambiente inmediatamente antes del ensayo. Después de mezclar los contenidos de la placa, se midió la producción de luz con un luminómetro de placa de microtitulación Dynex MLX (Chantilly, VA), lecturas de 0,5 segundos por pocillo tomando la primera medición cinco minutos después de que la solución de detergente se combinó con la muestra. Se indican las unidades relativas de luz promedio y el punto de tiempo en el que se midieron (url; Tabla D) y el porcentaje de actividad de luciferasa restante en el punto de tiempo (Tabla E); se desarrollaron controles con cada conjunto de condiciones experimentales como se ha indicado. Los detergentes catiónicos y aniónicos se ensayaron en un día con un conjunto de controles. Los detergentes zwitteriónicos y no iónicos se ensayaron en un día separado con un conjunto separado de controles. El DTAB al 0,5% se ensayó en ambos días (1 y 2). Si las url promedio originales indicadas en la Tabla D fueron inferiores a 5,0, el porcentaje de valores de actividad original no se registró en la Tabla E ya que se determinó que el detergente estaba presente en una concentración que destruía significativamente la actividad de luciferasa.

60

65

ES 2 325 808 T3

TABLA D

Valores de Unidad relativa de luz Promedio

	5 min	75 min	169 min	222 min	260 min
<b>Controles</b>					
Lisado celular (catiónico y aniónico)	6713,33	1844,71	953,35	384,77	200,78
Lisado celular (no iónico y zwitteriónico)	6748,77	2297,65	1212,43	508,38	246,19
Control de ATP (catiónico y aniónico)	19986,2	16628,6	17439,9	20174,3	15668,7
Control de ATP (no iónico y zwitteriónico)	17779,6	18218,8	16639,6	18886,2	17952,2
	<b>5 min</b>	<b>75 min</b>	<b>169 min</b>	<b>222 min</b>	<b>260 min</b>
<b>Detergentes Aniónicos</b>					
<b>SDS</b>					
1,0%	0,01	0,00	0,01	0,00	0,01
0,5%	0,00	0,00	0,02	0,00	0,00
0,1%	0,31	0,18	0,21	0,26	0,34
0,05%	1181,17	1060,03	949,7	921,86	803,0
<b>Bioterge</b>					
1,0%	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02
0,5%	0,1	0,04	0,05	0,05	0,05
0,1%	4788,81	1445,91	167,09	96,43	64,83
0,05%	5343,62	1004,34	435,52	196,51	107,54
<b>Desoxicolato</b>					
1,0%	3,98	3,63	3,63	3,15	3,24
0,5%	3189,56	2715,45	2268,77	2105,38	1845,36
0,1%	6422,34	3730,44	1627,81	1028,42	669,31
0,05%	5810,85	1729,95	738,1	375,74	188,59
<b>Detergentes no iónicos</b>					

ES 2 325 808 T3

<b>TRITON X-100</b>					
1,0%	6073,78	1774,10	839,14	331,95	174,89
0,5%	6106,61	1880,98	871,01	378,58	195,42
0,1%	6837,20	3004,57	1643,05	801,38	448,93
0,05%	6160,71	1964,17	822,48	303,73	147,48
<b>BIGCHAP</b>					
1,0%	7576,05	4043,35	2474,59	1374,29	822,65
0,5%	7438,53	3618,22	2092,69	1144,80	677,61
0,1%	6607,01	2087,01	1363,07	634,92	301,55
0,05%	6410,42	2260,45	1036,69	487,72	238,44
<b>THESIT</b>					
1,0%	6204,02	1979,43	968,14	416,45	210,78
0,5%	6392,75	2304,48	1122,24	487,28	240,72
0,1%	6022,32	2654,97	1509,07	755,94	447,44
0,05%	5632,96	1601,09	623,38	211,67	110,15
<b>Detergentes Catiónicos</b>					
<b>BDDABr</b>					
	5 min	75 min	169 min	222 min	260 min
1,0%	0,49	0,51	0,44	0,42	0,43
0,5%	122,47	107,39	93,92	96,68	101,11
0,1%	7069,08	5136,92	3260,59	2366,49	1767,58
0,05%	7077,46	4539,97	2465,57	1680,16	1233,82
<b>CTAB</b>					
1,0%	0,09	0,08	0,07	0,06	0,07
0,5%	0,34	0,28	0,23	0,27	0,18
0,1%	5104,82	3607,65	1889,29	1248,51	no realizado
0,05%	6525,51	4029,32	2093,80	1437,67	1002,72
<b>DTAB</b>					
1,0%	800,61	693,13	649,41	671,03	645,40
0,5%(día 1)	5630,61	5100,09	4957,48	4916,46	4515,20
0,5%(día 2)	6617,08	6341,09	5977,33	5824,18	5622,12
0,1%	6991,01	4753,46	2737,36	1950,95	1408,18

ES 2 325 808 T3

	0,05%	6487,93	3138,81	1496,01	943,40	638,30
5	<b>Detergentes Zwitteriónicos</b>					
	<b>CHAPS</b>					
10	1,0%	7241,33	3816,06	2348,28	1322,30	809,22
	0,5%	7368,91	4048,24	2548,39	1438,57	909,15
	0,1%	6515,77	2583,65	1236,53	448,96	284,18
15	0,05%	6356,62	2305,56	1143,02	500,80	240,81
	<b>CHAPSO</b>					
20	1,0%	7160,63	3803,84	2376,31	1332,97	840,57
	0,5%	7422,26	4089,32	2581,01	1460,54	923,81
	0,1%	6549,85	2584,56	1210,14	558,69	280,84
25	0,05%	6396,53	2424,54	1124,83	480,09	238,80
	<b>Sulfobetaina 3-10</b>					
30	1,0%	7861,36	5703,51	4318,46	3075,12	2193,02
	0,5%	6565,98	2405,95	1211,13	609,75	391,64
	0,1%	6506,61	2367,27	1100,37	446,29	222,22
35	0,05%	6247,31	2270,13	1053,56	465,03	233,19

TABLA E

*Porcentaje de ATP Restante*

Condición	5 min	75 min	169 min	222 min	260 min
45 Lisado celular (catiónico y aniónico)	100	27,5	14,2	5,7	3,0
50 Lisado celular (no iónico y zwitteriónico)	100	34,0	18,0	7,5	3,6
55 Control de ATP (catiónico y aniónico)	100	83,2	87,3	100,9	78,4
60 Control de ATP (no iónico y zwitteriónico)	100	102,5	93,6	106,2	101,0
<b>Detergentes aniónicos</b>					
<b>SDS</b>					
65 0,05%	100	89,7	80,4	78,0	68,0
<b>Bioterge</b>					

ES 2 325 808 T3

	0,1%	100	30,2	3,5	2,0	1,4
5	0,05%	100	18,8	8,2	3,7	2,0
	<b>Desoxicolato</b>					
	0,5%	100	85,1	71,1	66,0	57,9
10	0,1%	100	57,9	25,3	16,0	10,4
	0,05%	100	29,8	12,7	6,5	3,2
	<b>Detergentes no iónicos</b>					
15	<b>TRITON X-100</b>					
	1,0%	100	29,2	13,8	5,5	2,9
20	0,5%	100	30,8	14,3	6,2	3,2
	0,1%	100	43,9	24,0	11,7	6,6
25	0,05%	100	31,9	13,4	4,9	2,4
	<b>BIGCHAP</b>					
	1,0%	100	53,4	32,7	18,1	10,9
30	0,5%	100	48,6	28,1	15,4	9,1
	0,1%	100	31,6	20,6	9,6	4,6
	0,05%	100	35,3	16,2	7,6	3,7
35	<b>THESIT</b>					
	1,0%	100	31,9	15,6	6,7	3,4
	0,5%	100	36,0	17,6	7,6	3,8
40	0,1%	100	44,1	25,1	12,6	7,4
	0,05%	100	28,4	11,1	3,8	2,0
45	<b>Detergentes Catiónicos</b>					
	<b>BDDABr</b>					
	0,5%	100	87,7	76,2	78,9	82,6
50	0,1%	100	72,7	46,1	33,5	25,0
	0,05%	100	64,1	34,8	23,7	17,4
55	<b>CTAB</b>					
	0,1%	100	70,7	37,0	24,5	no realizado
60	0,05%	100	61,7	32,1	22,0	15,4
	<b>DTAB</b>					
65	1,0%	100	86,6	81,1	83,8	80,6

ES 2 325 808 T3

	0,5% (1)	100	90,6	88,0	87,3	80,2
5	0,5% (2)	100	95,8	90,3	88,0	85,0
	0,1%	100	68,0	39,2	27,9	20,1
	0,05%	100	48,4	23,1	14,5	9,8
10	<b>Detergentes Zwitteriónicos</b>					
	<b>CHAPS</b>					
15	1,0%	100	52,7	32,4	18,3	11,2
	0,5%	100	54,9	34,6	19,5	12,3
20	0,1%	100	39,7	19,0	8,6	4,4
	0,05%	100	36,3	18,0	7,9	3,8
	<b>CHAPSO</b>					
25	1,0%	100	53,1	33,2	18,6	11,7
	0,5%	100	55,1	34,8	19,7	12,4
30	0,1%	100	39,5	18,5	8,5	4,3
	0,05%	100	37,9	17,6	7,5	3,7
	<b>Sulfobetaina 3-10</b>					
35	1,0%	100	72,6	54,9	39,1	27,9
	0,5%	100	36,6	18,4	9,3	6,0
40	0,1%	100	36,4	16,9	6,9	3,4
	0,05%	100	36,3	16,9	7,4	3,7

Los datos demuestran que para los detergentes aniónicos ensayados, SDS en una concentración del 0,05% y desoxicolato en concentraciones del 0,55 y del 0,1% ralentizan la degradación de ATP endógeno en el lisado celular dando como resultado de aproximadamente tres a aproximadamente veinte veces más ATP presente en la muestra después de cuatro horas cuando el detergente estuvo presente que cuando estuvo ausente, indicando inhibición de ATPasa endógena de la muestra. Los detergentes no iónicos tuvieron muy poco, si acaso algún, ATP adicional presente en la muestra después de cuatro horas en presencia del detergente que en ausencia del detergente, indicando que estos detergentes no inhibieron la ATPasa endógena. Los detergentes zwitteriónicos ensayados tuvieron de tres a cuatro veces más ATP presente en la muestra después de cuatro horas cuando el detergente estuvo presente que cuando estuvo ausente. Los resultados más significativos se observaron cuando se incubaron detergentes catiónicos con el lisado celular. BDDABr en una concentración del 0,5% y DTAB en concentraciones del 0,5% y el 1,0%, cada uno tuvo al menos 25 veces más ATP presente en la muestra después de cuatro horas que las muestras sin estos detergentes. CTAB en una concentración del 0,05% tuvo aproximadamente cuatro veces más ATP presente en la muestra después de cuatro horas cuando el detergente estuvo presente que cuando estuvo ausente.

Ejemplo 2

60 II. Detergentes que Inhiben ATPasas

Este ejemplo ensayó los siete detergentes que demostraron inhibición de actividad de ATPasa en el Ejemplo 1 en este documento anteriormente en un porcentaje menor del que se ensayó previamente. El experimento se realizó como se ha detallado en el Ejemplo 1. Los valores de unidad relativa de luz promedio y los valores de porcentaje de ATP restante se enumeran más adelante en las Tablas F y G respectivamente.

ES 2 325 808 T3

TABLA F

Valores de Unidad relativa de luz Promedio

5

	5 min	75 min	169 min	222 min	260 min
<b>Controles</b>					
Lisado Celular	5296,25	1613,68	334,28	225,95	123,08
ATP + Hepes	22565,95	16238,00	20241,55	19302,50	18528,1
<b>Muestras</b>					
DTAB al 0,5%	5189,8	4564,65	4111,89	4230,51	4267,32
DTAB al 0,02%	5870,43	1997,09	435,05	329,83	227,72
BDDABr al 0,02%	6215,32	2686,49	962,85	604,47	429,86
Sulfobetaina al 0,02%	6120,5	1622,61	291,09	245,55	136,43
Desoxicolato al 0,02%	5962,61	1694,47	368,11	241,05	135,25
SDS al 0,01%	13116,20	10753,03	12051,63	11822,03	11900,73
SDS al 0,002%	5773,39	1574,34	278,67	236,28	128,58

10

15

20

25

30

TABLA G

Porcentaje de ATP Restante

35

	5 min	75 min	169 min	222 min	260 min
<b>Condición</b>					
Control de Lisado	100,00	30,47	6,31	4,27	2,32
Control de ATP	100,00	71,96	89,70	85,54	82,11
DTAB al 0,5%	100,00	87,95	79,23	81,52	82,23
DTAB al 0,02%	100,00	34,02	7,41	5,62	3,88
CTAB al 0,02%	100,00	43,22	15,49	9,73	6,92
BDDABr al 0,02%	100,00	48,53	21,51	13,18	9,74
Sulfobetaina al 0,02%	100,00	26,51	4,76	4,01	2,23
Desoxicolato al 0,02%	100,00	28,42	6,17	4,04	2,27
SDS al 0,01%	100,00	48,62	25,80	14,20	8,79
0,002% SDS	100,00	27,27	4,83	4,09	2,23

40

45

50

55

60

65

## ES 2 325 808 T3

El logaritmo del porcentaje de ATP restante después de valores de puntos de tiempo originales a partir de la Tabla E y la Tabla G se representaron en el eje y frente a tiempo (en minutos) en el eje x. La pendiente de la línea generada por estos valores en presencia de detergentes se dividió entre la pendiente de la línea generada por los valores en la ausencia de detergente (control de lisado) dando como resultado los valores de Actividad de ATPasa Relativa enumerados más adelante en la Tabla H.

TABLA H

*Actividad de ATPasa relativa*

Actividad de ATPasa Relativa		Pendiente	pendiente de det / pendiente de lisado
<b>Controles:</b>			
Lisado celular (cat y an)		-0,0056	1,000
Lisado celular (zwit y no ion)		-0,0053	1,000
Control de ATP (cat y an)		-0,0002	0,030
Control de ATP (zwit y no ion)		0,00002	-0,005
Control de ATP para detergentes inferior al 0,05%		-0,00013	0,02
<b>Aniónico:</b>			
SDS	Porcentaje de detergente		
	1,00	-----	-----
	0,50	-----	-----



ES 2 325 808 T3

Actividad de ATPasa Relativa	Pendiente	pendiente de det / pendiente de lisado
	0,10	-----
	0,05	-0,0006
	0,01	-0,00385
	0,002	-0,0064
<b>Bioterge</b>		
	1,00	-----
	0,50	-----
	0,10	-0,0076
	0,05	-0,0062
<b>Desoxicolato</b>		
	1,00	-----
	0,50	-0,0009
	0,10	-0,0038
	0,05	-0,0055
	0,02	-0,0064
<b>No-iónico:</b>		
<b>Triton X-100</b>		
	1,00	-0,0061
	0,50	-0,0059
	0,10	-0,0047
	0,05	-0,0065
<b>BIGCHAP</b>		
	1,00	-0,0038
	0,50	-0,0041
	0,10	-0,0051
	0,05	-0,0056
<b>Thesit</b>		
	1,00	-0,0058
	0,50	-0,0056
	0,10	-0,0045
	0,05	-0,0068

ES 2 325 808 T3

Actividad de ATPasa Relativa	Pendiente	pendiente de det / pendiente de lisado
<b>Catiónico:</b>		
<b>BDDABr</b>		
	1,00	-----
	0,50	-0,0004
	0,10	-0,0023
	0,05	-0,0030
	0,02	-0,0039
<b>CTAB</b>		
	1,00	-----
	0,50	-----
	0,10	-0,0028
	0,05	-0,0031
	0,02	-0,0046
<b>DTAB</b>		
	1,00	-0,0003
	0,50	-0,0003
	0,50	-0,0003
	0,10	-0,0027
	0,05	-0,0039
	0,02	-0,0056
<b>Zwitteriónico:</b>		
<b>CHAPS</b>		
	1,00	-0,0038
	0,50	-0,0036
	0,10	-0,0054
	0,05	-0,0056
<b>CHAPSO</b>		
	1,00	-0,0037
	0,50	-0,0036
	0,10	-0,0054
	0,05	-0,0057

## ES 2 325 808 T3

	<b>Actividad de ATPasa Relativa</b>	<b>Pendiente</b>	<b>pendiente de det / pendiente de lisado</b>
	<b>Sulfobetaina 3-10</b>		
	1,00	-0,0022	0,417
	0,50	-0,0049	0,921
	0,10	-0,0058	1,109
	0,05	-0,0057	1,077
	0,02	-0,0064	1,009

Un valor de actividad relativa de 1,0 o mayor indica el 100% de actividad de ATPasa celular en la concentración de detergente ensayada. Un valor de actividad relativa de 0,5 indica una disminución de dos veces (o el 50%) en el nivel de actividad de ATPasa celular en la concentración de detergente ensayada cuando se compara con el nivel de actividad de ATPasa en ausencia del detergente. Un valor de actividad relativa de 0,2 indica una disminución de cinco veces (o el 80%) en el nivel de actividad de ATPasa celular en la concentración de detergente ensayada cuando se comparó con el nivel de actividad de ATPasa en ausencia del detergente.

Para los detergentes catiónicos ensayados, las condiciones de reacción que dieron como resultado una disminución del 25% o mayor en la actividad de ATPasa relativa fueron DTAB en concentraciones del 0,05% y mayores; CTAB en concentraciones del 0,02% y mayores y BDDABr en concentraciones del 0,02% y mayores. Por lo tanto, todos los detergentes catiónicos ensayados en este ensayo en una concentración del 0,05% o mayor disminuyeron la actividad de ATPasa celular en el 25% o más. Para los detergentes aniónicos ensayados, las condiciones de reacción que dieron como resultado una disminución del 25% o mayor en la actividad de ATPasa relativa en comparación con reacciones en ausencia del detergente fueron SDS en concentraciones del 0,01% y mayores y desoxicolato en concentraciones del 0,1% y mayores. Ninguno de los detergentes no iónicos ensayados dio como resultado una disminución del 25% o mayor en el nivel de actividad de ATPasa celular. Para los detergentes zwitteriónicos ensayados, sólo sulfobetaina en una concentración del 1% o mayor fue capaz de disminuir la actividad de ATPasa relativa en el 25% o más en comparación con reacciones en ausencia de detergente.

Estos valores se grafican en la Figura 1 (detergentes no iónicos y zwitteriónicos) y Figura 2 (detergentes catiónicos y aniónicos).

### Ejemplo 3

#### *Estabilidad de Composición de la composición del Reactivo (temperatura ambiente)*

Los detergentes usados para inhibición de actividad de ATPasa endógena en una muestra también influyen en la actividad de luciferasa. Este ejemplo se diseñó para ensayar la estabilidad y funcionalidad de composición de la composición de reactivo ("composición de reactivo") a lo largo del tiempo cuando comprendió diferentes enzimas luciferasa y cuando el inhibidor de ATPasa estuvo presente en una concentración que inhibió significativamente la actividad de ATPasa endógena a la muestra como se ha demostrado en el Ejemplo 1 y el Ejemplo 2 en este documento anteriormente. Es, en última instancia, la estabilidad prolongada de una composición de reactivo, que comprende un inhibidor de ATPasa y una enzima luciferasa, la que proporciona una composición útil para medir ATP, en una muestra o muestras, a lo largo de un período de tiempo prolongado. La luciferasa más preferida para uso en una composición de reactivo de este tipo sería una cuya estabilidad se reduzca de forma mínima en presencia de un inhibidor de ATPasa cuando ese inhibidor de ATPasa esté presente en la composición de reactivo en una concentración capaz de inhibir al menos el 30% de la actividad de ATPasa endógena a la muestra.

En este experimento, la estabilidad de una composición de reactivo que comprende LucPpy de tipo silvestre se comparó con la estabilidad de una composición de reactivo que comprende LucPpe2m146 a aproximadamente 23°C (temperatura ambiente). Las diversas composiciones de reactivo tenían concentraciones de detergente variables. Los diversos detergentes ensayados fueron los que se demostró, en los Ejemplos 1 y 2 anteriormente, que tenían actividad de inhibición de ATPasa significativa.

Se crearon dos soluciones como se enumera más adelante. Una contenía la luciferasa, luciferina, MgSO<sub>4</sub> y tampón (composición de reactivo). La otra solución contenía medio más ATP (solución de medio).

## ES 2 325 808 T3

### *Composición de reactivo:*

50  $\mu\text{g/ml}$  de enzima (LucPpy es Promega N° de catálogo E170A)

5 Tampón Hepes 50 mM (pH 7,0)

NaCl 100 mM

EDTA 1,0 mM

10 gelatina al 0,1%

MgSO<sub>4</sub> 10 mM

15 Luciferina 1,0 mM

Detergente (a diversas concentraciones, véase la tabla más adelante).

20 Se añadió agua nanopura hasta un volumen final de 2,5 ml.

### *Solución de Medios:*

25 Volumen final de medios F12/DME (Sigma D-6905) 15 ml

ATP 1,0  $\mu\text{M}$ .

30 Para cada composición de reactivo, se ensamblaron todos los ingredientes excepto la enzima luciferasa; después se añadió la enzima inmediatamente antes de tomar la primera lectura de luminiscencia. Inmediatamente después de la adición de enzima a cada composición de reactivo y durante diversos puntos de tiempo a partir de entonces, se añadieron alícuotas de 100  $\mu\text{l}$  de la composición de reactivo a pocillos de una placa de luminómetro de microtitulación de 96 pocillos por triplicado. A las mismas se añadieron 100  $\mu\text{l}$  de Solución de Medios que contenía el ATP. Después, la luminiscencia se leyó inmediatamente en un luminómetro de placa de microtitulación Dynex MLX, lecturas de 0,5 segundos por pocillo. Los valores de unidad relativa de luz promedio así como las semividas de la reacción se enumeran más adelante en la Tabla I y el porcentaje de luminiscencia original restante en cada punto de tiempo se enumera en la Tabla J más adelante. El punto de tiempo en la parte superior de la columna indica el momento en el que se leyó la primera medición de url para las muestras en esa columna. Se proporcionan los tiempos para algunas muestras cuando su tiempo de medición varió significativamente del tiempo en la parte superior de la columna. Los tiempos enumerados en la Tabla I son los mismos que para la Tabla J. Los valores de sulfobetaina y de CTAB se generaron en días diferentes y los mismos se presentan con los valores de control generados en el mismo experimento. Existió precipitación sustancial en las muestras que contenían desoxicolato al 0,5% y precipitación ligera en las muestras que contenían desoxicolato al 0,1%. Esto dio como resultado mediciones no fiables para esas muestras.

45

(Tabla pasa a página siguiente)

50

55

60

65

# ES 2 325 808 T3

TABLA I

*Unidades relativas de luz Promedio*

5	<b>LucPpy</b>		<i>(a TA, pH 7,0)</i>					
			<b>0,75 min</b>	<b>21 min</b>	<b>39 min</b>	<b>64 min</b>	<b>92 min</b>	
	<b>Control</b>	<b>(sin det)</b>	3620,263	3610,837	3530,333	3421,743	3442,863	
10		<b>DTAB al 0,5%</b>	0,018					
15		<b>BDDABr al 0,5%</b>	0,001					
20		<b>*Desoxicolato al 0,5%</b>	4,801	0,012	0,007			
		<b>SDS al 0,05%</b>	0,007					
	<b>LucPpy</b>		<i>(a TA, pH 7,0)</i>					
25			<b>0,75 min</b>	<b>7,5 min</b>	<b>20,5 min</b>	<b>59 min</b>	<b>90 min</b>	
	<b>Control</b>	<b>(sin det)</b>	3238,01	3147,54	3192,85	3155,05	3203,21	
30		<b>Sulfobet. 1,0%</b>	0,024	0,000				
35		<b>Sulfobet. 0,5%</b>	737,788	0,084	0,037			
40		<b>Sulfobet. 0,1%</b>	3291,41	3178,07	3262,17	3074,49	3066,29	
			<b>0,75 min</b>	<b>10 min</b>	<b>36 min</b>	<b>60 min</b>	<b>95 min</b>	
45	<b>Control</b>	<b>(sin det)</b>	2311,293	-----	2294,607	2254,490	2196,130	
50		<b>DTAB al 0,1%</b>	0,307	0,009	0,005			
55		<b>BDDABr al 0,1%</b>	0,007					
		<b>SDS al 0,01%</b>	0,175	0,016				
		<b>*Desoxicolato al 0,1%</b>	19,771	0,180	0,026			
60			<b>0,75 min</b>	<b>6 min</b>	<b>20 min</b>	<b>40 min</b>	<b>62 min</b>	<b>88 min</b>
	<b>Control</b>	<b>(sin det)</b>	2844,21	-----	2672,94	2817,67	2869,35	2852,75
65								

# ES 2 325 808 T3

TABLA I (continuación)

5	<b>det)</b>						
	<b>*CTAB al 0,1%</b>	94,603	0,020				
	<b>*CTAB al 0,05%</b>	1134,53	0,563		0,015		
10					0,099		
	<b>*CTAB al 0,02%</b>	1869,80	79,719		(16 min)		
15		<b>0,75 min</b>	<b>38 min</b>	<b>70 min</b>	<b>94 min</b>	<b>122 min</b>	
	<b>Control (sin</b>	3379,970	3194,540	3085,880	3015,030	2820,330	
	<b>det)</b>						
20	<b>DTAB al 0,02%</b>	4513,320	3791,940	3363,410	3229,340	3082,030	
25	<b>LucPpy</b>	<i>(a TA, pH 7,0)</i>					
	<b>BDDABr al</b>	2894,700	0,035	0,015	0,016	0,011	
	<b>0,02%</b>						
30	<b>Desoxicolato al</b>	3199,250	2844,010	2626,260	2496,570	2314,910	
	<b>0,02%</b>						
	<b>SDS al 0,01</b>	17,584	0,001				
35	<b>SDS al 0,002%</b>	640,290	190,860	84,210	47,210	25,630	
	<b>LucPpe2m146</b>	<i>(a TA, pH 7,0)</i>					
40		<b>15 min</b>	<b>72 min</b>	<b>124 min</b>	<b>190 min</b>	<b>251 min</b>	
	<b>Control (sin</b>	27668,0	25171,53	24023,967	23200,600	20771,450	
	<b>det)</b>						
	<b>DTAB al 0,5%</b>	5,496	3,141	2,769	2,563	2,766	
45	<b>BDDABr al</b>	2,040	1,140	0,998	0,899	1,042	
	<b>0,5%</b>						
50	<b>*Desoxicolato</b>	45,977	229,874	2059,397	1414,397	1342,963	
	<b>al 0,5%</b>						
	<b>SDS al 0,05%</b>	0,018	0,012	0,001	0,006	0,016	
55		<b>0,75 min</b>	<b>30 min</b>	<b>66 min</b>	<b>123 min</b>	<b>180 min</b>	<b>238 min</b>
	<b>Control (sin</b>	16897,5	16754,97	17594,7	16842,8	16935,5	17598,6
	<b>det)</b>						
60	<b>Sulfobet. al</b>	16897,5	16754,97	7036,0	6653,67	7358,44	6948,05
	<b>1,0%</b>						

65

# ES 2 325 808 T3

TABLA I (continuación)

5	<b>Sulfobet. 0,5%</b>	<b>al</b>	13447,0	13597,97	14186,93	12982,20	14348,90	13958,2
10	<b>Sulfobet. 0,1%</b>	<b>al</b>	16648,3	17003,0	17849,8	16610,13	17115,63	18131,37
			<b>1,0 min</b>	<b>34 min</b>	<b>65 min</b>	<b>115 min</b>	<b>175 min</b>	<b>238 min</b>
15	<b>Control (sin det)</b>	<b>(sin det)</b>	27811,33	28665,87	28814,47	26614,43	27752,97	28249,6
20	<b>DTAB al 0,1%</b>		20132,47	20574,63	20800,80	19908,30	20760,93	19758,4
	<b>BDDABr al 0,1%</b>	<b>al</b>	29,71	66,09	62,19	45,18	33,89	34,46
25	<b>LucPpe2m146</b>	<i>(a TA, pH 7,0)</i>						
	<b>*Desoxicolato al 0,1%</b>		5150,43	5031,12	6855,67	6340,45	7347,09	6801,23
30	<b>SDS al 0,01%</b>		24,46	27,85	10,77	6,45	2,02	2,44
			<b>1,0 min</b>	<b>37 min</b>	<b>67 min</b>	<b>116 min</b>	<b>177 min</b>	<b>243 min</b>
35	<b>Control (sin det)</b>	<b>(sin det)</b>	16578,6	15270,1	15710,6	16272,3	17085,8	17163,7
40	<b>*CTAB al 0,1%</b>		1047,8	5,3	5,2	6,2	6,0	5,7
	<b>*CTAB al 0,05%</b>		11992,5	301,5	131,7	4219,7	16910,8	17340,0
	<b>*CTAB al 0,02%</b>		11019,8	2051,7	1087,4	6117,8	16020,8	16368,5
45			<b>1,0 min</b>	<b>34 min</b>	<b>65 min</b>	<b>115 min</b>	<b>175 min</b>	<b>238 min</b>
50	<b>Control (sin det)</b>	<b>(sin det)</b>	27811,33	28665,87	28814,47	26614,43	27752,97	28249,6
	<b>DTAB al 0,02%</b>		28730,17	28596,30	28651,97	26062,30	27941,73	27677,9
55	<b>BDDABr al 0,02%</b>	<b>al</b>	26548,60	26272,87	25766,43	24155,00	25891,70	24959,1
	<b>Desoxicolato al 0,02%</b>	<b>al</b>	24307,30	24639,00	24717,97	23158,37	24655,43	24320,6
60	<b>SDS al 0,002%</b>		24265,83	24213,97	24725,73	22654,87	23856,73	23425,5

65 \*ppt indica que el detergente precipitó en la muestra

# ES 2 325 808 T3

TABLA J

*Porcentaje de Luminiscencia Restante*

5	<b>LucPpy</b>		<i>(a TA, pH 7,0)</i>				
	<b>Control (sin det)</b>		100,00	99,74	97,52	94,52	95,1
10	<b>DTAB al 0,5%</b>		100,00				
	<b>BDDABr al 0,5%</b>		100,00				
15	<b>*Desoxicolato</b>	<b>al</b>	100,00	0,25	0,15		(ppt)
	<b>0,5%</b>						
	<b>SDS al 0,05%</b>		100,00				
20	<b>LucPpy</b>		<i>(a TA, pH 7,0)</i>				
	<b>Control (sin det)</b>		100,00	97,2	98,6	108,5	97, 98,9
	<b>Sulfobet. al 0,5%</b>		100,00				
25	<b>Sulfobet. al 0,1%</b>		100,00	95,8	99,1	93,4	93,
	<b>Control (sin det)</b>		100,00	nd	99,28	97,54	95,0
30	<b>DTAB al 0,1%</b>		100,00	2,93	1,55		
	<b>BDDABr al 0,1%</b>		100,00				
35	<b>SDS al 0,01%</b>		100,00	9,14			
	<b>Desoxicolato al 0,1%</b>		100,00	0,91	0,13		
40	<b>Control (sin det)</b>		100,00	---	94,0	99,1	100,
	<b>CTAB al 0,1%</b>		100,00	0,02			Ppt.
	<b>CTAB al 0,05%</b>		100,00	0,05	0,00		Ppt.
45	<b>CTAB al 0,02%</b>		100,00	0,09	0,03		Ppt.
	<b>Control (sin det)</b>		100,00	94,51	91,30	89,20	83,4
50	<b>DTAB al 0,02%</b>		100,00	99,53	74,52	71,55	68,2
	<b>BDDABr al 0,02%</b>		100,00	0,00	0,00		
55	<b>Desoxicolato</b>	<b>al</b>	100,00	88,90	82,09	78,04	72,3
	<b>0,02%</b>						
60	<b>SDS al 0,002%</b>		100,00	29,81	13,15	7,37	4,0

65



ES 2 325 808 T3

TABLA J (continuación)

<b>LucPpe2m146</b> (a TA, pH 7,0)							
5	<b>Control (sin det)</b>	100,00	90,98	86,83	83,85	75,07	
10	<b>DTAB al 0,5%</b>	100,00	57,16	50,39	46,64	50,32	
	<b>BDDABr al 0,5%</b>	100,00	55,90	48,93	44,07	51,10	
15	<b>*Desoxicolato al 0,5%</b>	100,00	499,98	4479,22	3076,34	2920,97	Precipitación sustancial
20	<b>SDS al 0,05%</b>	100,00	65,68	6,09	35,06	87,64	
25	<b>Control (sin det)</b>	100,00	99,2	104,1	99,7	100,2	104,1
	<b>Sulfobet. al 1,0%</b>	100,00	102,0	106,0	100,3	110,9	104,7
30	<b>Sulfobet. al 0,5%</b>	100,00	101,1	105,5	96,5	106,7	103,8
35	<b>Sulfobet. al 0,1%</b>	100,00	102,1	107,2	99,8	102,8	108,9
40	<b>Control (sin det)</b>	100,00	103,07	103,61	95,70	99,79	101,58 97,48
	<b>DTAB al 0,1%</b>	100,00	102,20	103,32	98,89	103,12	98,14 97,65
45	<b>BDDABr al 0,1%</b>	100,00	222,47	209,32	152,09	114,06	115,98 427,13
50	<b>Desoxicolato al 0,1%</b>	100,00	97,68	133,11	123,11	142,65	132,05 145,09 Precip.
	<b>SDS al 0,01%</b>	100,00	113,85	44,02	26,38	8,25	9,97 2,53
55	<b>Control (sin det)</b>	100,00	92,11	94,76	98,15	103,06	103,53
	<b>CTAB al 0,1%</b>	100,00	0,51	0,50	0,59	0,58	0,55 ppt
60	<b>CTAB al 0,05%</b>	100,00	2,51	1,10	35,19	141,01	144,5 Ppt

65

## ES 2 325 808 T3

TABLA J (continuación)

5	<b><u>LucPpe2m146</u></b> (a TA, pH 7,0)						
	<b>CTAB al</b>	100,00	18,62	9,87	55,52	145,38	148,54
	<b>0,02%</b>						Ppt
10	<b>Control (sin</b>	100,00	103,07	103,61	95,70	99,79	101,58
	<b>det)</b>						97,48
15	<b>DTAB al</b>	100,00	99,53	99,73	90,71	97,26	96,34
	<b>0,02%</b>						96,79
20	<b>BDDABr al</b>	100,00	98,96	97,05	90,98	97,53	94,01
	<b>0,02%</b>						92,32
25	<b>Desoxicolato</b>	100,00	101,36	101,69	95,27	101,43	100,05
	<b>al 0,02%</b>						99,99
30	<b>SDS al</b>	100,00	99,79	101,90	93,36	98,31	96,54
	<b>0,002%</b>						95,92

30

35

40

45

50

55

60

65

TABLA K

*Semivida de actividad de luminiscencia (medida en minutos)*

5 Para cada concentración de detergente que usa cualquier luciferasa, la estabilidad de la composición de reactivo se puede describir como que tiene una semivida de actividad usando los datos de la Tabla J. La semivida se determina aplicando regresión lineal a los datos, con el logaritmo de los valores de luminiscencia relativa en la Tabla J como la variable dependiente y el tiempo de cada medición como la variable independiente. Después, la semivida se calcula a partir de la regresión lineal como  $\ln(0,5)/(\text{pendiente})$ . Usando este método, las estabilidades de la composición de reactivo se enumeran en la Tabla K; la concentración de detergente mostrada como porcentaje (p/v) y los valores de semivida de actividad se muestran en minutos. Cuando la actividad de luminiscencia fue menor que lo que se pudo medir de forma fiable, la semivida se muestra como "sin actividad". Algunas composiciones de reactivo fueron muy inestables, teniendo semividas de actividad inferiores a 10 minutos. Debido a que las mismas son difíciles de cuantificar con precisión, se enumeran sólo como "<10". Por el contrario, algunas composiciones de reactivo mostraron gran estabilidad, teniendo semividas de actividad mayores que 1000 minutos (es decir, mayores que 16 horas). Debido a que las muestras se midieron durante menos de 5 horas, las determinaciones precisas de semivida son difíciles y se enumeran sólo como ">1000".

20 En la Tabla K, los valores por debajo de la línea horizontal (en negrita) indican las concentraciones de cada detergente que inhibieron la actividad de ATPasa endógena en los Ejemplos 1 y 2 en al menos el 25%. Está claro que la composición de reactivo es muy inestable cuando comprende LucPpy y tiene una concentración de detergente capaz de inhibir al menos el 25% de la actividad de ATPasa endógena. Por el contrario, un reactivo que comprende LucPpe2m146 y la misma concentración de detergente en general tiene estabilidad moderada a sustancial. En algunos casos, la actividad de luciferasa se inhibió por la presencia del detergente, pero aún así produjo una composición estable. Dos detergentes, CTAB y desoxicolato, precipitaron de la solución durante el transcurso de las mediciones. Esto fue más importante para CTAB, donde LucPpe2m146 se inactivó de forma marcada por el detergente, pero recuperó lentamente la actividad a medida que el detergente precipitó a partir de la solución. Este comportamiento hizo imposible estimar la semivida de la composición de reactivo que contenía CTAB. El efecto se observó en un menor alcance con el desoxicolato.

**Luciferasa de luciérnaga común****(*P. pyralis*)**

conc.	DTAB	CTAB	BDDABr	Desoxicol	SDS	Sulfobetaina
0,000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
0,002					25	
0,010					<10	
0,020	193	<10*	<10	235		
0,050		<10*			sin actividad	
0,100	<10	<10*	sin actividad	<10*		877
0,200						
0,500	sin actividad	sin actividad		<10*		sin actividad
1,000						



## ES 2 325 808 T3

TABLA L

*Valores de Unidad relativa de luz Promedio*

	<u>Temp.</u>		<u>Tiempo (minutos)</u>				
	10 min	60 min	110 min	180 min	240 min	300 min	
5	<b>37°C</b>						
10	<b>Muestra 1</b>	12371,2	3141,2	930,0	270,7	127,4	55,1
	<b>Muestra 2</b>	781,3	792,3	777,5	748,9	728,2	713,4
	<b>Muestra 3</b>	2937,2	2815,0	2869,2	2592,3	2046	1953,4
15							
20	<b>22°C</b>						
	<b>Muestra 1</b>	13073,4	5551,8	2766,29	1121,5	541,8	273,7
	<b>Muestra 2</b>	606,6	615,5	630,0	615,7	616,4	626,0
25	<b>Muestra 3</b>	2603,4	2527,0	2533,0	2321,9	2052,8	1917,3

TABLA M

*Porcentaje de ATP Restante*

	<u>Temp</u>		<u>Unidades relativas de luz</u>				
	10 min	60 min	110 min	180 min	240 min	300 min	
35	<b>37°C</b>						
40	<b>Muestra 1</b>	100	25,39	7,52	2,19	1,03	0,44
	<b>Muestra 2</b>	100	101,41	99,51	95,86	93,20	91,31
	<b>Muestra 3</b>	100	95,84	97,69	88,26	69,68	66,51
45	<b>22°C</b>						
	<b>Muestra 1</b>	100	42,47	21,16	8,58	4,14	2,09
50	<b>Muestra 2</b>	100	101,46	103,86	101,5	101,62	103,21
	<b>Muestra 3</b>	100	97,07	97,30	89,19	78,85	73,65

En las condiciones de este ensayo, el DTAB al 1% no produjo pérdida de ATP (es decir, inhibición completa de ATPasa endógena a la muestra) a 22°C y pérdida mínima a 37°C, aún cuando la solución se incubó a la temperatura de interés durante hasta cinco horas. Estos datos demuestran condiciones de reacción para las que existe inhibición de ATPasa endógena casi completa y en las que el ATP es estable hasta al menos cinco horas.

### Ejemplo 5

#### III. Estabilidad de Composición de Reactivo

Usando los resultados del Ejemplo 4, este experimento se diseñó para demostrar la estabilidad de la composición de reactivo completa a 22°C en comparación con su estabilidad a 37°C medido por luminiscencia a lo largo del tiempo. Para generar la composición de reactivo completa, se añadieron 10 ml de detergente tamponado (Citrato de Sodio 36 mM, EDTA 2 mM, MgSO<sub>4</sub> 20 mM, NaF 2 mM, DTAB al 1%, THESIT al 2%, Mazu al 0,2%, tamponado hasta un pH

## ES 2 325 808 T3

final de 6,0) a LucPpe2m146 liofilizado, D-luciferina, MgSO<sub>4</sub> y CDTA para que la composición de reactivo tuviera una concentración de luciferasa final de 80 µg/ml y una concentración de luciferina final de 5 mM.

La composición de reactivo se dividió por la mitad con una mitad incubada a 22°C y la otra mitad incubada en un baño de agua a 37°C. En diversos puntos de tiempo, se retiraron muestras de 100 µl de las composiciones de reactivo (por cuadruplicado) y se transfirieron a una placa de luminómetro de 96 pocillos. Después, a cada muestra de 100 µl se añadieron 100 µl de ATP 1,0 µM en DPBS (Solución Salina Tamponada con Fosfato de Dulbecco, Sigma Corp., St. Louis, MO). La placa se agitó durante 30 segundos a 700 rpm en un agitador orbital y después se leyó la luminiscencia en un luminómetro de placa de microtitulación Dynex MLX, lecturas de 0,5 segundos por pocillo. Los valores de unidad relativa de luz promedio se enumeran más adelante en la Tabla N y los valores de porcentaje de ATP restante y semivida en la Tabla O.

TABLA N

*Unidades relativas de luz Promedio*

Tiempo (min.):	0	23	60	120	185	240	300
22°C	695,4	763,0	741,8	683,8	675,9	664,4	681,4
37°C	----	757,7	722,3	614,4	575,0	544,2	526,1

TABLA O

*Porcentaje de ATP Restante*

Tiempo (min.):	0	23	60	120	185	240	300	semivida
22°C	100	109,7	106,7	98,3	97,2	95,5	98,0	>1000 min
37°C	100	108,9	103,9	88,4	82,7	78,2	75,7	573 min

### Ejemplo 6

*Efecto de DTAB sobre Estabilidad de Composiciones de Reactivo que Comprenden Diversas Luciferasas (37°C)*

La estabilidad de una composición de reactivo que comprendía luciferasa LucPpe2 se comparó con una composición de reactivo que comprendía LucPpe2m90 y una composición de reactivo que comprendía LucPpe2m146, en presencia y ausencia de DTAB al 0,1%. Estas luciferasas mutantes son termoestables; las mismas se describen con detalle en la solicitud de PCT PCT/US99/30925, presentada el 22 de diciembre de 1999.

Cada enzima se diluyó a 0,05 mg/ml hasta un volumen final de 1,0 ml en cualquiera de HEPES 25 mM, pH 8,0 o citrato 20 mM, pH 6,0; ambos con NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, gelatina al 0,1% y glicerol al 5%. En la mitad de las muestras, se añadió DTAB al 0,1%. Las soluciones de enzima ("composiciones de reactivo") se incubaron a 37°C.

En diversos puntos de tiempo, se transfirieron 10 µl de solución de enzima a una placa de luminómetro de 96 pocillos por triplicado. Después, por triplicado, se añadieron 100 µl de reactivo de ensayo de luciferasa a temperatura ambiente (luciferina 1 mM, ATP 0,2 mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM en HEPES 50 mM, pH 8,0) a cada alícuota de solución de enzima de 10 µl, se mezcló y se leyó inmediatamente en un luminómetro de placa de microtitulación Dynex MLX. El ATP en el reactivo de ensayo de luciferasa está en una concentración de saturación. Se indican los valores de url promedio, así como las semividas de la actividad de la composición de reactivo medidas por luminiscencia (Tabla P). La semivida se calculó usando la fórmula log (0,5)/pendiente de los datos representados como tiempo (eje x) frente a valor de log de url. El tiempo cero es en realidad aproximadamente 2-3 minutos después de la mezcla de enzima y sustrato; esto podría explicar los números más bajos en presencia de DTAB en el momento 0 que en ausencia de DTAB.

ES 2 325 808 T3

TABLA P

*Efecto de DTAB sobre actividad de diversas luciferasas*

	<b>url Promedio a lo largo del tiempo (min)</b>			
<b>Enzima/tiempo (min)</b>	<b>pH 6,0</b>	<b>pH 6,0 + DTAB</b>	<b>pH 8,0</b>	<b>pH 8,0 + DTAB</b>
<b>LucPpe2</b>				
0	18655,25	2372,31	22134,0	7048,95
29	1854,83	0,099	11773,67	0,161
59	206,69	0,08	5070,62	0,034
<b>Semivida (min)</b>	<b>9,1</b>	<b>4,0</b>	<b>27,7</b>	<b>3,4</b>
<b>LucPpe2m90</b>				
0	20031,03	16263,53	15795,17	22401,4
59	18453	15535,4	15510,77	15332,67
123	15966,03	13421,5	13735,67	12383,75
183	15546,4	14061,8	13271,05	11271,25
239	14519,63	11924,03	11115,13	9551,65
<b>Semivida (min)</b>	<b>510,5</b>	<b>580,1</b>	<b>487,5</b>	<b>207,1</b>
<b>LucPpe2m146</b>				
0	7685,01	5945,34	6652,84	6445,57
61	7077,29	5989,65	6577,91	6214,56
125	5507,01	3754,71	5192,73	4018,92
183	6144,94	4839,58	5476,86	4020,56
237	6471,76	4951,0	5174,22	3734,59
<b>Semivida (min)</b>	<b>820,8</b>	<b>682,6</b>	<b>595,5</b>	<b>268,0</b>

\*tiempo cero es aproximadamente 2-3 minutos después de la mezcla de enzima y sustrato

Ejemplo 7

*Duración Mejorada de Luminiscencia y Efectos de Diversos Medios y Sueros sobre la Medición de ATP*

En algunas realizaciones, las composiciones de la invención se añadieron a células intactas para lisarlas y después detectar ATP. En otras realizaciones, los mismos medios de cultivo condicionados se ensayaron para determinar ATP. Sin embargo, los componentes diversos de los medios, tales como tampones, azúcares, aminoácidos, indicadores de pH, sales, etc, así como los diversos factores observados en el suero (equino, bovino, etc) pueden inhibir la actividad de luciferasa. Este ejemplo demuestra el efecto de los medios de cultivo celular y sueros en presencia del inhibidor de ATPasa DTAB sobre la composición de reactivo y sobre la duración de luminiscencia (denominada en este documento "estabilidad de señal") cuando la composición de reactivo se combina con una muestra que suministra ATP.

Se preparó la siguiente composición de reactivo: tampón Citrato 40 mM (pH 6,0), tampón MES 110 mM (pH 6,0), EDTA 0,2 mM, 100 µg/ml de Luciferasa (LucPpe2m146), diluida a partir de 37,8 mg/ml de solución madre), luciferina 5 mM, NaCl 300 mM, MgSO<sub>4</sub> 20 mM, Mazu DF-204 al 0,05% y concentraciones variables de DTAB como se enumera en la Tabla Q más adelante. La reacción de luciferasa-luciferina se inició combinando 100 µl de composición de reactivo con 100 µl de medio celular con suero, se añadieron concentraciones finales variables de DTAB (como se indica más adelante en la Tabla Q) y ATP 1,0 µM a cada reacción más o menos pirofosfato de sodio 10 µM en pocillos de una placa de luminómetro de microtitulación de 96 pocillos; cada condición experimental se preparó por triplicado. En diversos momentos después de iniciar la reacción, se registraron los valores de url usando un luminómetro de microplaca Orion (Berthold Detection Systems; Pforzheim, Alemania). Las url promedio y la

## ES 2 325 808 T3

estabilidad de señal (medidas en términos de su semivida) se indican en la Tabla Q. En todos los medios ensayados, el DTAB en presencia de Ppi dio como resultado una semivida mayor que el DTAB en ausencia de Ppi. El tipo de medios usados en el ensayo no contribuyó significativamente a la variación de estabilidad de señal. La semivida de estabilidad de señal se calculó desde el tiempo 0 (A) y desde el tiempo 10 min como el valor original (B). El Ppi disminuyó la luminiscencia aproximadamente diez veces o más.

TABLA Q

*Efectos de medios y sueros sobre reacción de luciferasa-luciferina*

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Unidades relativas de luz promedio a lo largo del tiempo (min)								Estabilidad de señal $t_{1/2}$ (h)	
Condiciones <sup>1</sup>	0	10	30	65	120	180	325	A	B
<b>DMEM + FBS al 10% + ATP +</b>									
DTAB al 0,50%	204771	223493	187757	146766	104150	72609	32307	1,9	1,9
DTAB al 0,55%	52107	59799	51285	42155	32891	24137	12031	2,4	2,3
DTAB/Ppi al 0,45%	4989	4723	4053	3743	3611	3514	3188	9,6	11,4
<b>F12/DME + FBS al 10% + ATP +</b>									
DTAB al 0,50%	13467	13311	11348	9953	8127	6538	3793	3,0	3,0
DTAB al 0,55%	6847	6952	6013	5581	4891	4329	3207	4,9	5,0
DTAB/Ppi al 0,45%	1467	1342	1107	1047	1017	1036	937	10,6	14,2
<b>F12/DME + HS al 10% + ATP +</b>									
DTAB al 0,50%	88405	82645	70746	58749	44677	33353	17414	2,3	2,4
DTAB al 0,55%	36615	36669	31348	27979	23778	19955	13539	3,8	3,8
DTAB/Ppi al 0,45%	6124	5611	4981	4398	4163	3961	3553	7,7	9,0
<b>RPMI + FBS al 10% + ATP</b>									
DTAB al 0,50%	44179	43664	35909	26501	16951	10153	3268	1,4	1,4
DTAB al 0,55%	21388	22863	19631	16848	12968	9661	5080	2,5	2,5
DTAB/Ppi al 0,45%	3284	2879	2599	2381	2285	2243	2099	10,4	13,6



## ES 2 325 808 T3

### Ejemplo 8

#### *Número de Células se Correlaciona con Producción de Luz*

5 Este experimento demuestra que la luminiscencia generada mediante el uso de la composición de reactivo en el método de la invención se correlaciona directamente con el número de células viables. Se estableció una correlación sencilla entre los números de células vivas conocidos y la luminiscencia determinada experimentalmente.

10 Se cultivaron células Jurkat (ATCC, CRL-1990) en CO<sub>2</sub> al 5%/aire al 95%, el 100% de humedad a 37°C y se mantuvieron en medio RPMI (Sigma, R-8005) que contenía FBS al 10% (Hyclone N°SH30070), aminoácidos no esenciales 1X (Hyclone SH30238) y piruvato de sodio 1 mM (Hyclone N°SH30239). Las células se suspendieron a 5 x 10<sup>5</sup>/ml en medio completo fresco y se prepararon diluciones seriadas 1:2. Después, se añadieron 100 µl de las diluciones celulares a pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos, dando como resultado 0-50.000 células/pocillo. Se prepararon réplicas por cuadruplicado. Después la placa se incubó a 37°C, CO<sub>2</sub> al 5% durante 45 minutos. Después la placa se equilibró a 22°C durante 30 minutos. Después se añadieron 100 µl de composición de reactivo (tampón Citrato 40 mM (pH 6,0), tampón MES 110 mM (pH 6,0), EDTA 2 mM, KPO<sub>4</sub> 450 mM, Prionex al 0,4%, 80 µg/ml de Luciferasa (LucPpe2m146, diluida a partir de 37,8 mg/ml de solución madre), luciferina 5 mM, THESIT al 2%, NaF 20 mM, MgSO<sub>4</sub> 20 mM, Mazu DF-204 al 0,02% y DTAB al 1,0%), a cada pocillo, la placa se agitó suavemente durante 2 minutos y se incubó durante 10 minutos en un luminómetro de placa Dynex MLX. Después se leyó la producción de luz en interrogaciones acumuladas de 0,5 segundos. Las url promedio resultantes se indican en este documento más adelante en la Tabla R.

TABLA R

*Correlación de luminiscencia con número de células*

<b>Células/pocillo</b>	<b>Luminiscencia (url)</b>	<b>desviación típica</b>
0	0,07	0,015
49	1,96	0,233
98	3,27	0,460
195	6,71	0,307
390	12,34	0,356
781	23,53	0,367
1562	47,12	1,583
3125	91,77	1,156
6250	171,93	0,812
12500	346,26	10,739
25000	672,79	7,322
50000	1279,75	14,683

### Ejemplo 9

#### *Células linfoides ensayadas con NaF*

65 En algunas células, tales como células linfoides (por ejemplo, Jurkat), se observa un aumento de luminiscencia a lo largo del tiempo en presencia de la solución de composición de reactivo. Aunque el mecanismo subyacente de

## ES 2 325 808 T3

este aumento de luminiscencia no se conoce, se postula que se produce como resultado del funcionamiento de enzimas generadoras de ATP en este tipo de célula. La actividad de tales enzimas, si se deja sin comprobar, dará como resultado una estimación excesiva de ATP en una muestra en el momento del ensayo. Este experimento se diseñó para ensayar los efectos de fluoruro de sodio sobre la luminiscencia cuando se usan células linfoides. El experimento también demuestra la duración mejorada de luminiscencia producida por la LucPpe2m146 en la composición y métodos de la invención.

Se cultivaron células Jurkat (ATCC, CRL-1990) en CO<sub>2</sub> al 5%/aire al 95%, el 100% de humedad a 37°C y se mantuvieron en medio RPMI (Sigma, R-8005) que contenía FBS al 10% (Hyclone N°SH30070), aminoácidos no esenciales 1X (Hyclone SH30238) y piruvato de sodio 1 mM (Hyclone N°SH30239). Las células se sembraron a 0, 12500, 25000 y 50000 células/pocillo en 100 µl de medio en una placa de luminómetro de microtitulación de 96 pocillos. Se prepararon réplicas por cuadruplicado. A cada uno de estos pocillos se añadió composición de reactivo (composición de reactivo = tampón Citrato 40 mM (pH 6,0), tampón MES 110 mM (pH 6,0), EDTA 0,2 mM, Gelatina al 0,2%, 100 µg/ml de Luciferasa (LucPpe2m146, diluida a partir de 37,8 mg/ml de solución madre), luciferina 100 µM, NaCl 300 mM, MgSO<sub>4</sub> 20 mM, Mazu DF-204 al 0,05% y DTAB al 0,6%). Además, todas excepto la muestra de control "sin KPO<sub>4</sub>" contenían tampón KPO<sub>4</sub> 60 mM (pH 6,0). Después se añadieron diversas concentraciones de NaF a la solución anterior hasta concentraciones finales de 0, 1,0, 2,0, 4,0, 10,0 mM; una condición tenía NaF 10,0 mM pero sin KPO<sub>4</sub>.

El volumen de reacción total por pocillo fue 200 µl, que consistían en 100 µl de células más medio y 100 µl de composición de reactivo que contenía KPO<sub>4</sub> y/o NaF. La producción de luz se tomó en diversos momentos en un luminómetro de placa de microtitulación Dynex en un tiempo de lectura de 0,5 segundos. Las url promedio resultantes a partir de pocillos cuadruplicados y estabildades de señal calculadas medidas por sus valores de semivida se indican en la Tabla S.

Los datos demuestran que la adición de NaF puede inhibir el aumento de luminiscencia visto cuando se usan células de Jurkat en un método de la presente invención.

ES 2 325 808 T3

TABLA S

*Efecto de NaF sobre luminiscencia de células Jurkat*

url Promedio a lo largo del tiempo (min)								$t_{1/2}$ (h)
Células/ Pocillo	0	30	85	130	220	255	285	
<b>Control</b>								
0	2,84	2,77	3,28	4,30	3,98	4,00	3,97	-
12500	355,70	370,90	420,87	470,88	508,06	523,80	536,11	nc*
25000	761,86	857,57	1174,30	1599,85	2709,75	3099,69	3276,71	nc
50000	1409,87	1946,82	5067,54	12596,83	4991,96	3583,77	2978,22	nc
<b>NaF 1,0 mM (en la composición de reactivo)</b>								
0	2,87	2,72	2,76	2,91	2,42	2,37	2,27	-
12500	358,61	341,31	331,08	323,54	271,89	257,06	247,61	8,8
25000	691,68	640,53	611,45	596,87	495,89	463,32	446,32	7,6
50000	1380,16	1268,49	1185,73	1147,33	936,82	862,31	832,15	6,6
<b>NaF 2,0 mM</b>								

ES 2 325 808 T3

url Promedio a lo largo del tiempo (min)								t <sub>1/2</sub> (h)
Células/ Pocillo	0	30	85	130	220	255	285	
0	2,80	2,59	2,58	2,57	2,07	2,06	1,95	-
12500	348,16	333,48	323,75	317,48	258,43	251,90	239,40	8,6
25000	679,02	631,69	603,07	589,08	472,37	455,25	433,54	7,3
50000	1340,22	1239,83	1156,03	1111,04	873,26	829,87	781,80	6,1
<b>NaF 4,0 mM</b>								
0	6,55	7,65	15,30	33,49	15,12	11,87	10,43	-
12500	367,69	346,05	335,27	331,07	275,13	259,58	251,79	8,6
25000	691,41	634,08	604,37	587,41	476,36	453,66	436,38	7,2
50000	1378,13	1277,41	1195,56	1139,99	883,49	853,43	813,31	6,1
<b>NaF 10,0 mM</b>								
0	6,55	6,20	6,47	7,87	5,52	5,27	5,13	-
12500	364,79	343,44	331,48	326,32	271,64	256,88	248,30	8,5
25000	753,29	677,94	635,67	617,77	496,08	471,66	450,76	6,6
50000	1442,08	1324,67	1235,80	1181,84	903,44	870,95	826,48	5,8
<b>NaF 10,0 mM, sin KP0<sub>4</sub></b>								
0	5,95	5,65	5,43	5,34	4,19	4,16	3,91	-
12500	409,57	400,10	384,84	371,42	294,12	283,01	267,78	7,3
25000	806,87	785,16	734,44	692,57	516,69	498,99	468,90	5,7
50000	1514,80	1449,30	1340,91	1258,88	889,88	865,24	807,41	4,9

\*nc — no calculable debido a aumento de valores de url a lo largo del tiempo

**Referencias**

Aiginger, P., R. Kuzmits, H. Lang y M. M. Müller. 1980. Changes in the ATP content of leukaemic cells induced by cytotoxic substances. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 1: 216.

**Andreotti, P. E., I. A. Cree, C. M. Kurbacher, D. M. Hartmann, D. Under, G. Harel, I. Gleiberman, P. A. Caruso, S. H. Ricks, M. Untch et al.** 1995. Chemosensitivity testing of human tumors using a micro plate adenosine triphosphate luminescence assay; clinical correlation for cisplatin resistance of ovarian carcinoma *Cancer Res.* 55: 5276-82.

5

**Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith y K. Struhl.** 1987. Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, Nueva York.

10

**Baldwin, T. O. y V. A. Green.** 2000. Purification of firefly luciferase from recombinant sources. *Methods Enzymol.* 305: 180-8.

**Beny, M. y M. Dolivo.** 1976. Separation of firefly luciferase using an anion exchanger. *FEBS Lett.* 70: 167-70.

15

**Bostick, W. D., M. S. Denton y S. R. Dinsmore.** 1982. Liquid-chromatographic separation and bioluminescent detection of creatine kinase isoenzymes. en *Bioluminescence and Chemiluminescence: Instruments and Applications.* Vol. II. K. Van Dyke, editor. CRC Press, Boca Raton, Florida 227-246.

20

**Bowie, L. J., V. Horak y M. De Luca.** 1973. Synthesis of a new substrate analog of firefly luciferin. An active-site probe. *Biochemistry.* 12: 1845-52.

**Bradbury, D. A., T. D. Simmons, K. J. Slater y S. P. Crouch.** 2000. Measurement of the ADP:ATP ratio in human leukaemic cell lines can be used as an indicator of cell viability, necrosis and apoptosis. *J Immunol Methods.* 240: 79-92.

25

**Branchini B. R.,** 2000. Chemical synthesis of firefly luciferin analogs and inhibitors. *Methods Enzymol.* 305: 188-95.

30

**Branchini B. R., M. M. Hayward, S. Bamford, P. M. Brennan y E. J. Lajiness.** 1989. Naphthyl- and quinolylluciferin: green and red light emitting firefly luciferin analogues. *Photochem Photobiol.* 49: 689-95.

**Branchini B. R., T. M. Marschner y A. M. Montemurro.** 1980. A convenient affinity chromatography-based purification of firefly luciferase. *Anal Biochem.* 104: 386-96.

35

**Carter, P.** 1986. Site-directed mutagenesis. *Biochem J.* 237: 1-7.

**Craig, F. F., A. C. Simmonds, D. Watmore, F. McCapra y M. R. White.** 1991. Membrane-permeable luciferin esters for assay of firefly luciferase in live intact cells. *Biochem J.* 276: 637-41.

40

**Cree, I. A.** 1998. Luminescence-based cell viability testing. *Methods Mol Biol.* 102: 169-77.

**Cree, I. A. y P. E. Andreotti.** 1997. Measurement of Cytotoxicity by ATP-based Luminescence Assay in Primary Cell Cultures and Cell Lines. *Toxicology in Vitro.* 11: 553-556.

45

**Crouch, S.P., R. Kozlowski, K. J. Slater y J. Fletcher.** 1993. The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *J Immunol Methods.* 160: 81-8,

**Demerec, M., E. A. Adelberg, A. J. Clark y P. E., Hartman.** 1966. A proposal for a uniform nomenclature in bacterial genetics. *Genetics.* 54: 61-76.

50

**Ebadi, M. S.** 1972. Firefly luminescence in the assay of cyclic AMP. *Adv Cyclic Nucleotide Res.* 2: 89-109.

**Filippova, N. Y., A. F. Dukhovich y N. N., Ugarova.** 1989. New approaches to the preparation and application of firefly luciferase. *J Biolumin Chemilumin.* 4: 419-22.

55

**Hastings, J. W.** 1996. Chemistries and colors of bio luminescent reactions: a review. *Gene.* 173: 5-11.

**Hastings, J. W. y T. Wilson.** 1976. Bioluminescence and chemiluminescence. *Photochem Photobiol* 23: 461-73.

60

**Jassim, S. A., A. Ellison, S. P. Denver y G. S. Stewart** 1990. *In vivo* bioluminescence: a cellular reporter for research and industry. *J Biolumin Chemilumin.* 5: 115-22.

**Jones, K., F. Hibbert y M. Keenan.** 1999. Glowing jellyfish, luminescence and a molecule called coelenterazine. *Trends Biotechnol.* 17: 477-81.

65

**Kajiyama, N. y E. Nakano.** 1993. Thermostabilization of firefly luciferase by a single amino acid substitution at position 217. *Biochemistry.* 32: 13795-9.

## ES 2 325 808 T3

- Kajiyama, N.** y **E. Nakano.** 1994. Enhancement of thermostability of firefly luciferase from *Luciola lateralis* by a single amino acid substitution. *Biosci Biotechnol Biochem.* 58: 1170-1.
- Kangas, L., M. Gronroos** y **A.X. Nieminen.** 1984. Bioluminescence of cellular ATP: a new method for evaluating cytotoxic agents *in vitro.* *Med Biol.* 62: 338-43.
- Kiechle, F. L., L. Jarett, D. A. Popp** y **N. Kotagal.** 1980. Isolation from rat adipocytes of a chemical mediator for insulin activation of pyruvate dehydrogenase. *Diabetes.* 29: 852-5.
- Kricka, L. X.** y **M. De Luca.** 1982. Effect of solvents on the catalytic activity of firefly luciferase. *Arch Biochem Biophys.* 217: 674-81.
- Lundin, A., J. Anson** y **P. Kau.** 1994. ATP extractants neutralised by cyclodextrins. En Bioluminescence and Chemiluminescence; Fundamental and Applied Aspects. A.K. Campbell, L.J. Kricka y P.E. Stanley, editores. John Wiley & Sons, Nueva York. 399-402.
- McElroy, W. D., H. K. Seliger** y **E. H. White.** 1969. Mechanism of bioluminescence, chemiluminescence and enzyme function in the oxidation of firefly luciferin. *Photochem Photobiol.* 10: 153-70.
- Miska, W.** y **R. Geiger.** 1987. Synthesis and characterization of luciferin derivatives for use in bioluminescence enhanced enzyme immunoassays. New ultrasensitive detection systems for enzyme immunoassays, I. *J Clin Chem Clin Biochem.* 25: 23-30.
- Missiaen, L., F. Wuytack, H. De Smedt, M. Vrolix** y **R Casteels.** 1988. A1F4-reversibly inhibits "P"-type cation-transport ATPases, possibly by interacting with the phosphate-binding site of the ATPase. *Biochem J.* 253: 827-33.
- Morii, M.** y **N. Takeguchi.** 1993. Different biochemical modes of action of two irreversible H<sup>+</sup>,K<sup>(+)</sup>-ATPase inhibitors, omeprazole and E3810. *J Biol Chem.* 268: 21553-9.
- Moyer, J. D.** y **J. F. Henderson.** 1983. Nucleoside triphosphate specificity of firefly luciferase. *Anal Biochem.* 131: 187-9.
- Nguyen, V. T., M. Morange** y **O. Bensaude.** 1988. Firefly luciferase luminescence assays using scintillation counters for quantitation in transfected mammalian cells. *Anal Biochem.* 171: 404-8.
- Petty, R. D., L. A. Sutherland, E. M. Hunter** y **L. A. Cree.** 1995. Comparison of MTT and ATP-based assays for the measurement of viable cell number. *J Biolumin Chemilumin.* 10: 29-34.
- Picciolo, G. L., E. W. Chappelle, R. R. Thomas** y **M. A. McGarry.** 1977. Performance characteristics of a new photometer with a moving filter tape for luminescence assay. *Appl Environ Microbiol.* 34: 720-4.
- Ronner, P., E. Friel, K. Czerniawski** y **S. Frankle.** 1999. Luminometric assays of ATP, phosphocreatine, and creatine for estimation of free ADP and free AMP. *Anal Biochem.* 275: 208-16.
- Sambrook, J.** 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor. US 5.618.682. 1997. BIOLUMINESCENCE MEASUREMENT SYSTEM. US. US 5.866.348. 1999. BIOLUMINESCENCE MEASUREMENT SYSTEM. US.
- Simpson, W. J.** y **J. R. Hammond.** 1991. The effect of detergents on firefly luciferase reactions [aparece errata publicada en *J Biolumin Chemilumin* 1991 Jul-Sep;6(3): 146]. *J Biolumin Chemilumin.* 6: 97-106.
- Stanley, P. E.** 1989. A review of bioluminescent ATP techniques in rapid microbiology. *J Biolumin Chemilumin.* 4: 375-80.
- Thomson, CM., P. J. Herring** y **A. K. Campbell.** 1997. The widespread occurrence and tissue distribution of the imidazolopyrazine luciferins. *J Biolumin Chemilumin.* 12: 87-91.
- WO 00/18953. 2000. Method for detecting ATP. PCT.
- Vaskinn, S., E. Sundkvist, R. Jaeger** y **G. Sager.** 1999. The effect of Mg<sup>2+</sup>, nucleotides and ATPase inhibitors on the Uptake of [3H]-cGMP to inside-out vesicles from human erythrocytes. *Mol Membr Biol.* 16: 181-8.
- Wells, J.A., M. Vasser** y **D. B. Powers.** 1985. Cassette mutagenesis: an efficient method for generation of multiple mutations at defined sites. *Gene.* 34: 315-23.

## ES 2 325 808 T3

**White, E. H., E. Rapaport, T. A. Hopkins y H. E. Seliger. 1969.** Chemi- and bioluminescence of firefly luciferin. *J Am Chem Soc.* 91: 2178-80.

5 **White, R. E., J. D. Miano y M. Umbreit. 1975.** Letter: on the mechanism of firefly luciferin luminescence. *J Am Chem Soc.* 97: 198-200.

**White, P. J., D. J. Squirrell, P. Amaud, C. R. Lowe y J. A. Murray. 1996.** Improved thermostability of the North American firefly luciferase: saturation mutagenesis at position 354. *Biochem J.* 319: 343-50.

10 **Wilson, T. y J. W. Hastings. 1998.** Bioluminescence. *Annu Rev Ceil Dev Biol.* 14: 197-230.

US 5.283.179. 1994. LUCIFERASE ASSAY METHOD. US.

US 5.650.289. 1997. LUCIFERASE ASSAY COMPOSITIONS. US.

15 WO 9914336. 1999. Thermostable luciferases and methods of production. PCT.

**Wood, K. V., Y. A. Lam y W. D. McElroy. 1989.** Introduction to beetle luciferases and their applications. *J Biolumin Chemilumin.* 4: 289-301.

20 **Yang, J. y D. B. Thomason. 1993.** An easily synthesized, photolyzable luciferase substrate for *in vivo* luciferase activity measurement. *Biotechniques.* 15; 848-50.

**Ye, L., L. M. Buck, H. J. Schaeffer y F. R. Leach. 1997.** Cloning and sequencing of a cDNA for firefly luciferase from *Photuris pennsylvanica*. *Biochim Biophys Acta.* 1339: 39-52.

**Zoller, M. J. y M. Smith. 1987.** Oligonucleotide-directed mutagenesis: a simple method using two oligonucleotide primers and a single-stranded DNA template. *Methods Enzymol.* 154: 329-50.

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar ATP en una muestra que comprende:

5 (a) añadir a la muestra una composición de reactivo que comprende uno o más detergentes y una luciferasa que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID N°: 1, 2, 3 y 4

10 en el que la composición de reactivo es capaz de mantener al menos el 30% de actividad, medida mediante luminiscencia después de que la composición de reactivo se combina con la muestra, durante al menos una hora en comparación con la actividad de la composición de reactivo inmediatamente después de que la luciferasa se combina con el uno o más detergentes y en el que el uno o más detergentes presentes en la composición de reactivo se seleccionan entre detergentes catiónicos, detergentes aniónicos y/o detergentes zwitteriónicos y colectivamente son capaces de reducir la actividad de ATPasa endógena a la muestra en al menos el 25% con relación a la actividad de ATPasa en ausencia del uno o más detergentes y

15 (b) detectar luminiscencia.

2. Un método para detectar ATP en una muestra que comprende:

20 (a) añadir a la muestra una composición de reactivo que comprende uno o más detergentes y una luciferasa que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID N°: 1, 2, 3 y 4

25 en el que la composición de reactivo es capaz de mantener al menos el 30% de actividad, medida por luminiscencia después de que la composición de reactivo se combina con la muestra, durante al menos una hora en comparación con la actividad de la composición de reactivo inmediatamente después de que la luciferasa se combina con el uno o más detergentes y en el que el uno o más detergentes presentes en la composición de reactivo se seleccionan entre detergentes catiónicos, detergentes aniónicos y/o detergentes zwitteriónicos y colectivamente son capaces de reducir la actividad de ATPasa endógena a la muestra en al menos el 25% con relación a la actividad de ATPasa de la muestra en ausencia del uno o más detergentes y

30 (b) cuantificar luminiscencia.

3. Un método para medir viabilidad celular dentro de una población de células que comprende:

35 (a) poner en contacto la población de células con una composición de reactivo que comprende uno o más detergentes y una luciferasa que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID N°: 1, 2, 3 y 4, donde la composición de reactivo es capaz de mantener al menos el 30% de actividad, medida mediante luminiscencia después de que la composición de reactivo se combina con la población de células, durante al menos una hora en comparación con la actividad de la composición de reactivo inmediatamente después de que la luciferasa se combina con el uno o más detergentes y en el que el uno o más detergentes presentes en la composición de reactivo se seleccionan entre detergentes catiónicos, detergentes aniónicos y/o detergentes zwitteriónicos y colectivamente son capaces de reducir la actividad de ATPasa endógena a la población de células en al menos el 25% con relación a la actividad de ATPasa de la población de células en ausencia del uno o más detergentes y

45 (b) detectar luminiscencia, en el que la cantidad de luminiscencia detectada es proporcional a la viabilidad de las células dentro de la población.

4. Un método para determinar el efecto de un compuesto sobre una primera población de células que comprende:

50 (a) poner en contacto la primera población de células con una concentración del compuesto;

55 (b) posteriormente poner en contacto la primera población de células con una composición de reactivo que comprende uno o más detergentes y una luciferasa que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID N°: 1, 2, 3 y 4,

60 en el que la composición es capaz de mantener al menos el 30% de actividad, medida mediante luminiscencia después de que la composición de reactivo se combina con la muestra, durante al menos una hora en comparación con la actividad de la composición de reactivo inmediatamente después de que la luciferasa se combina con el uno o más detergentes y en el que el uno o más detergentes presentes en la composición de reactivo se seleccionan entre detergentes catiónicos, detergentes aniónicos y/o detergentes zwitteriónicos y colectivamente son capaces de reducir la actividad de ATPasa endógena a la muestra en al menos el 25% con relación a la actividad de ATPasa de la muestra en ausencia del uno o más detergentes y

65 (c) detectar una cantidad de luminiscencia y

(d) comparar la cantidad de luminiscencia en la primera población con una cantidad de luminiscencia en una segunda población de células.



## ES 2 325 808 T3

5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en el que la composición de reactivo comprende además cualquiera de los siguientes:

5 luciferina

un agente de lisis celular

un agente de extracción de ATP o

10 NaF o un agente estabilizador de enzima.

6. El método de la reivindicación 1, en el que la composición de reactivo es capaz de mantener al menos el 60% de actividad, medida mediante luminiscencia después de que la composición de reactivo se combina con la muestra, durante al menos una hora en comparación con la actividad de la composición de reactivo inmediatamente después de que la luciferasa se combina con el uno o más detergentes y en el que el uno o más detergentes presentes en la composición de reactivo colectivamente son capaces de reducir la actividad de ATPasa endógena a la muestra en al menos el 40% con relación a la actividad de ATPasa de la muestra en ausencia del uno o más detergentes.

7. El método de la reivindicación 1, en el que la composición de reactivo es capaz de mantener al menos el 30% de actividad, medida mediante luminiscencia después de que la composición de reactivo se combina con la muestra, durante al menos dos horas en comparación con la actividad de la composición de reactivo inmediatamente después de que la luciferasa se combina con el detergente y en el que el uno o más detergentes presentes en la composición de reactivo colectivamente son capaces de reducir la actividad de ATPasa endógena a la muestra en al menos el 40% con relación a la actividad de ATPasa de la muestra en ausencia del uno o más detergentes.

8. El método de la reivindicación 7, en el que la composición de reactivo es capaz de mantener al menos el 60% de actividad, medida mediante luminiscencia después de que la composición de reactivo se combina con la muestra, durante al menos dos horas en comparación con la actividad de la composición de reactivo inmediatamente después de que la luciferasa se combina con el detergente y en el que el uno o más detergentes presentes en la composición de reactivo colectivamente son capaces de reducir la actividad de ATPasa endógena a la muestra en al menos el 40% con relación a la actividad de ATPasa de la muestra en ausencia del uno o más detergentes.

9. El método de la reivindicación 1, en el que la composición de reactivo es capaz de mantener al menos el 60% de actividad, medida mediante luminiscencia después de que la composición de reactivo se combina con la muestra, durante al menos una hora en comparación con la actividad de la composición de reactivo inmediatamente después de que la luciferasa se combina con el uno o más detergentes y en el que el uno o más detergentes presentes en la composición de reactivo colectivamente son capaces de reducir la actividad de ATPasa endógena a la muestra en al menos el 60% con relación a la actividad de ATPasa de la muestra en ausencia del uno o más detergentes.

10. El método de la reivindicación 1, en el que cuando está presente un detergente catiónico, el detergente catiónico se selecciona entre el grupo que consiste en bromuro de dodeciltrimetilamonio y bromuro de bencildimetildodecilamonio.

11. El método de la reivindicación 1, en el que cuando está presente un detergente catiónico en la composición de reactivo, el detergente catiónico está presente en una concentración de al menos el 0,1% (p/v).

12. El método de la reivindicación 1, en el que la composición de reactivo comprende al menos un detergente catiónico y la luciferasa se prepara reconstituyendo luciferasa liofilizada en una solución que comprende el detergente catiónico.

13. El método de la reivindicación 1, en el que la composición de reactivo comprende al menos el 0,1% de bromuro de bencildimetildodecilamonio y mantiene al menos el 50% de la actividad de la composición de reactivo.

14. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la luciferasa produce una luminiscencia que tiene menos del 50% de pérdida de luminiscencia por hora.

15. El método de la reivindicación 2, comprendiendo además la etapa de comparar la luminiscencia cuantificada con una cuantificación separada determinada, cuantificando la luminiscencia producida por una muestra que comprende una concentración conocida de ATP.

16. El método de la reivindicación 2, comprendiendo además la etapa de añadir una concentración conocida de ATP a la muestra.

17. El método de la reivindicación 3, en el que la viabilidad de las células indica aproximadamente un número de células viables dentro de la población de células.

## ES 2 325 808 T3

18. El método de la reivindicación 4, en el que, antes de detectar la cantidad de luminiscencia en la segunda población de células, la segunda población de células se puso en contacto con una concentración del compuesto que difiere de la concentración que se pone en contacto con la primera población de células.

5 19. El método de la reivindicación 4, en el que la concentración del compuesto que se pone en contacto con la segunda población es menor que la concentración del compuesto que se pone en contacto con la primera población.

20. El método de la reivindicación 4, en el que se determina el efecto citotóxico del compuesto.

10 21. El método de la reivindicación 4, en el que se determina el efecto de proliferación celular del compuesto.

22. El método de la reivindicación 4, en el que las etapas (a) a (d) se repiten para uno o más compuestos en una biblioteca de moléculas pequeñas.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

FIG. 1

**Inhibición de ATPasa  
usando detergentes no iónicos y zwitteriónicos**

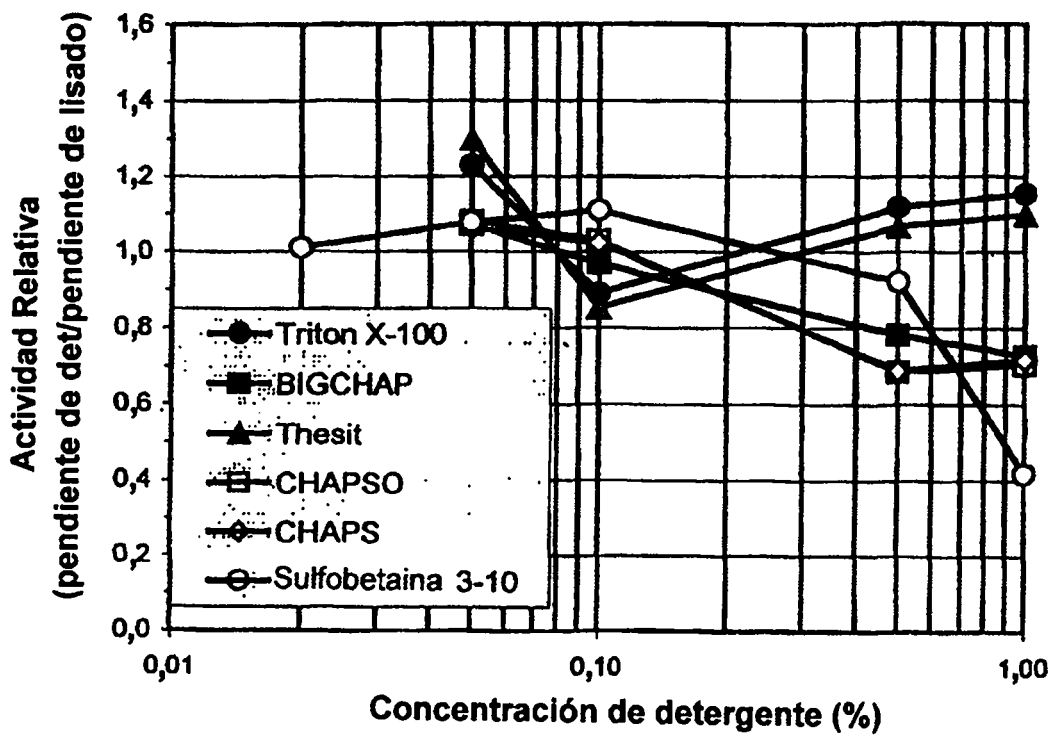
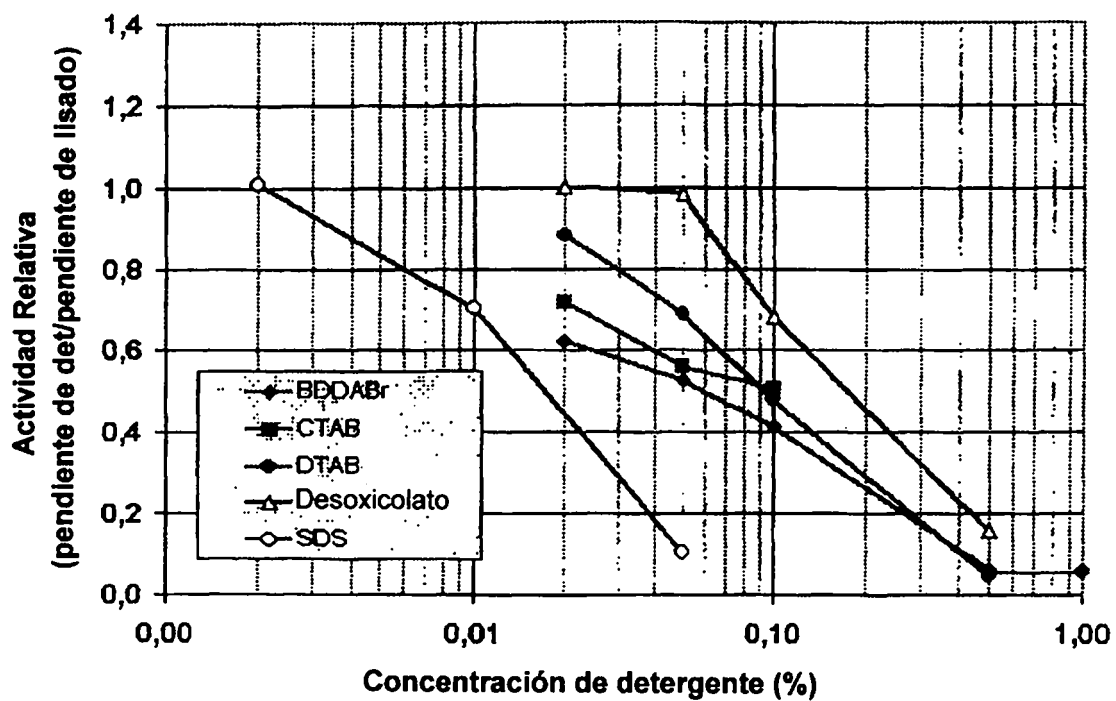


FIG. 2

Inhibición de ATPasa  
usando detergentes iónicos



# ES 2 325 808 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

Secuencia de aminoácidos 78-0B10 (SEC ID N°: 1)

5

	Met	Ala	Asp	Lys	Asn	Ile	Leu	Tyr	Gly	Pro	Glu	Pro	Phe	Tyr	Pro	Leu
	1				5					10					15	
	Ala	Asp	Gly	Thr	Ala	Gly	Glu	Gln	Met	Phe	Asp	Ala	Leu	Ser	Arg	Tyr
10				20					25					30		
	Ala	Asp	Ile	Ser	Gly	Cys	Ile	Ala	Leu	Thr	Asn	Ala	His	Thr	Lys	Glu
			35					40					45			
	Asn	Val	Leu	Tyr	Glu	Glu	Phe	Leu	Lys	Leu	Ser	Cys	Arg	Leu	Ala	Glu
	50						55					60				
15	Ser	Phe	Lys	Lys	Tyr	Gly	Leu	Lys	Gln	Asn	Asp	Thr	Ile	Ala	Val	Cys
	65					70					75					80
	Ser	Glu	Asn	Gly	Leu	Gln	Phe	Phe	Leu	Pro	Val	Ile	Ala	Ser	Leu	Tyr
					85					90					95	
	Leu	Gly	Ile	Ile	Ala	Ala	Pro	Val	Ser	Asp	Lys	Tyr	Ile	Glu	Arg	Glu
					100					105					110	
20	Leu	Ile	His	Ser	Leu	Gly	Ile	Val	Lys	Pro	Arg	Ile	Ile	Phe	Cys	Ser
			115					120						125		
	Lys	Asn	Thr	Phe	Gln	Lys	Val	Leu	Asn	Val	Lys	Ser	Lys	Leu	Lys	Ser
	130						135						140			
	Val	Glu	Thr	Ile	Ile	Ile	Leu	Asp	Leu	Asn	Glu	Asp	Leu	Gly	Gly	Tyr
25	145					150					155					160
	Gln	Cys	Leu	Asn	Asn	Phe	Ile	Ser	Gln	Asn	Ser	Asp	Ser	Asn	Leu	Asp
					165						170					175
	Val	Lys	Lys	Phe	Lys	Pro	Tyr	Ser	Phe	Asn	Arg	Asp	Asp	Gln	Val	Ala
				180						185					190	
30	Leu	Val	Met	Phe	Ser	Ser	Gly	Thr	Thr	Gly	Val	Pro	Lys	Gly	Val	Met
			195					200						205		
	Leu	Thr	His	Lys	Asn	Ile	Val	Ala	Arg	Phe	Ser	Leu	Ala	Lys	Asp	Pro
	210						215						220			
	Thr	Phe	Gly	Asn	Ala	Ile	Asn	Pro	Thr	Thr	Ala	Ile	Leu	Thr	Val	Ile
35	225					230					235					240
	Pro	Phe	His	His	Gly	Phe	Gly	Met	Met	Thr	Thr	Leu	Gly	Tyr	Phe	Thr
					245						250					255
	Cys	Gly	Phe	Arg	Val	Val	Leu	Met	His	Thr	Phe	Glu	Glu	Lys	Leu	Phe
				260					265					270		
40	Leu	Gln	Ser	Leu	Gln	Asp	Tyr	Lys	Val	Glu	Ser	Thr	Leu	Leu	Val	Pro
				275					280					285		
	Thr	Leu	Met	Ala	Phe	Leu	Ala	Lys	Ser	Ala	Leu	Val	Glu	Lys	Tyr	Asp
	290						295						300			
	Leu	Ser	His	Leu	Lys	Glu	Ile	Ala	Ser	Gly	Gly	Ala	Pro	Leu	Ser	Lys
	305					310					315					320
45	Glu	Ile	Gly	Glu	Met	Val	Lys	Lys	Arg	Phe	Lys	Leu	Asn	Phe	Val	Arg
					325						330					335
	Gln	Gly	Tyr	Gly	Leu	Thr	Glu	Thr	Thr	Ser	Ala	Val	Leu	Ile	Thr	Pro
					340					345					350	
	Lys	Gly	Asp	Ala	Arg	Pro	Gly	Ser	Thr	Gly	Lys	Ile	Val	Pro	Phe	His
50										360				365		
	Ala	Val	Lys	Val	Val	Asp	Pro	Thr	Thr	Gly	Lys	Ile	Leu	Gly	Pro	Asn
							375						380			
	Glu	Pro	Gly	Glu	Leu	Tyr	Phe	Lys	Gly	Ala	Met	Ile	Met	Lys	Gly	Tyr
	385					390					395					400
55	Tyr	Asn	Asn	Glu	Glu	Ala	Thr	Lys	Ala	Ile	Ile	Asp	Asn	Asp	Gly	Trp
					405						410					415

60

65

ES 2 325 808 T3

Leu Arg Ser Gly Asp Ile Ala Tyr Tyr Asp Asn Asp Gly His Phe Tyr  
 420 425 430  
 Ile Val Asp Arg Leu Lys Ser Leu Ile Lys Tyr Lys Gly Tyr Gln Val  
 435 440 445  
 Ala Pro Ala Glu Ile Glu Gly Ile Leu Leu Gln His Pro Tyr Ile Val  
 450 455 460  
 Asp Ala Gly Val Thr Gly Ile Pro Asp Glu Ala Ala Gly Glu Leu Pro  
 465 470 475 480  
 Ala Ala Gly Val Val Val Gln Thr Gly Lys Tyr Leu Asn Glu Gln Ile  
 485 490 495  
 Val Gln Asp Phe Val Ser Ser Gln Val Ser Thr Ala Lys Trp Leu Arg  
 500 505 510  
 Gly Gly Val Lys Phe Leu Asp Glu Ile Pro Lys Gly Ser Thr Gly Lys  
 515 520 525  
 Ile Asp Arg Lys Val Leu Arg Gln Met Phe Glu Lys His Thr Asn Gly  
 530 535 540

20 Secuencia de aminoácidos 90-1B5 (SEC ID N°: 2)

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

ES 2 325 808 T3

5 Leu Ser His Leu Lys Glu Ile Ala Ser Gly Gly Ala Pro Leu Ser Lys  
 305 310 315 320  
 Glu Ile Gly Glu Met Val Lys Lys Arg Phe Lys Leu Asn Phe Val Arg  
 325 330 335  
 10 Gln Gly Tyr Gly Leu Thr Glu Thr Thr Ser Ala Val Leu Ile Thr Pro  
 340 345 350  
 Lys Gly Asp Ala Lys Pro Gly Ser Thr Gly Lys Ile Val Pro Phe His  
 355 360 365  
 Ala Val Lys Val Val Asp Pro Thr Thr Gly Lys Ile Leu Gly Pro Asn  
 370 375 380  
 Glu Pro Gly Glu Leu Tyr Phe Lys Gly Pro Met Ile Met Lys Gly Tyr  
 385 390 395 400  
 Tyr Asn Asn Glu Glu Ala Thr Lys Ala Ile Ile Asp Asn Asp Gly Trp  
 405 410 415  
 15 Leu Arg Ser Gly Asp Ile Ala Tyr Tyr Asp Asn Asp Gly His Phe Tyr  
 420 425 430  
 Ile Val Asp Arg Leu Lys Ser Leu Ile Lys Tyr Lys Gly Tyr Gln Val  
 435 440 445  
 20 Ala Pro Ala Glu Ile Glu Gly Ile Leu Leu Gln His Pro Tyr Ile Val  
 450 455 460  
 Asp Ala Gly Val Thr Gly Ile Pro Asp Glu Ala Ala Gly Glu Leu Pro  
 465 470 475 480  
 Ala Ala Gly Val Val Val Gln Thr Gly Lys Tyr Leu Asn Glu Gln Ile  
 485 490 495  
 25 Val Gln Asp Tyr Val Ala Ser Gln Val Ser Thr Ala Lys Trp Leu Arg  
 500 505 510  
 Gly Gly Val Lys Phe Leu Asp Glu Ile Pro Lys Gly Ser Thr Gly Lys  
 515 520 525  
 30 Ile Asp Arg Lys Val Leu Arg Gln Met Phe Glu Lys His Thr Asn Gly  
 530 535 540

35 Secuencia de aminoácidos 133-1B2 (SEC ID N°: 3)

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

65

ES 2 325 808 T3

Leu Ile Met Phe Ser Ser Gly Thr Thr Gly Leu Pro Lys Gly Val Met  
 195 200 205  
 Leu Thr His Lys Asn Ile Val Ala Arg Phe Ser Ile Ala Lys Asp Pro  
 5 210 215 220  
 Thr Phe Gly Asn Ala Ile Asn Pro Thr Ser Ala Ile Leu Thr Val Ile  
 225 230 235 240  
 Pro Phe His His Gly Phe Gly Met Met Thr Thr Leu Gly Tyr Phe Thr  
 245 250 255  
 10 Cys Gly Phe Arg Val Val Leu Met His Thr Phe Glu Glu Lys Leu Phe  
 260 265 270  
 Leu Gln Ser Leu Gln Asp Tyr Lys Val Glu Ser Thr Leu Leu Val Pro  
 275 280 285  
 Thr Leu Met Ala Phe Leu Ala Lys Ser Ala Leu Val Glu Lys Tyr Asp  
 15 290 295 300  
 Leu Ser His Leu Lys Glu Ile Ala Ser Gly Gly Ala Pro Leu Ser Lys  
 305 310 315 320  
 Glu Ile Gly Glu Met Val Lys Lys Arg Phe Lys Leu Asn Phe Val Arg  
 325 330 335  
 20 Gln Gly Tyr Gly Leu Thr Glu Thr Thr Ser Ala Val Leu Ile Thr Pro  
 340 345 350  
 Lys Gly Asp Ala Lys Pro Gly Ser Thr Gly Lys Ile Val Pro Phe His  
 355 360 365  
 Ala Val Lys Val Val Asp Pro Thr Thr Gly Lys Ile Leu Gly Pro Asn  
 370 375 380  
 25 Glu Pro Gly Glu Leu Tyr Phe Lys Gly Pro Met Ile Met Lys Gly Tyr  
 385 390 395 400  
 Tyr Asn Asn Glu Glu Ala Thr Lys Ala Ile Ile Asp Asn Asp Gly Trp  
 405 410 415  
 Leu Arg Ser Gly Asp Ile Ala Tyr Tyr Asp Asn Asp Gly His Phe Tyr  
 30 420 425 430  
 Ile Val Asp Arg Leu Lys Ser Leu Ile Lys Tyr Lys Gly Tyr Gln Val  
 435 440 445  
 Ala Pro Ala Glu Ile Glu Gly Ile Leu Leu Gln His Pro Tyr Ile Val  
 450 455 460  
 35 Asp Ala Gly Val Thr Gly Ile Pro Asp Glu Ala Ala Gly Glu Leu Pro  
 465 470 475 480  
 Ala Ala Gly Val Val Val Gln Thr Gly Lys Tyr Leu Asn Glu Gln Ile  
 485 490 495  
 Val Gln Asp Tyr Val Ala Ser Gln Val Ser Thr Ala Lys Trp Leu Arg  
 500 505 510  
 40 Gly Gly Val Ile Phe Leu Asp Glu Ile Pro Lys Gly Ser Thr Gly Lys  
 515 520 525  
 Ile Asp Arg Lys Val Leu Arg Gln Met Leu Glu Lys His Thr Asn Gly  
 530 535 540

45

Secuencia de aminoácidos 146-1H2 (SEC ID N°: 4)

50 Met Ala Asp Lys Asn Ile Leu Tyr Gly Pro Glu Pro Phe Tyr Pro Leu  
 1 5 10 15  
 Glu Asp Gly Thr Ala Gly Glu Gln Met Phe Asp Ala Leu Ser Arg Tyr  
 20 25 30  
 55 Ala Ala Ile Pro Gly Cys Ile Ala Leu Thr Asn Ala His Thr Lys Glu  
 35 40 45  
 Asn Val Leu Tyr Glu Glu Phe Leu Lys Leu Ser Cys Arg Leu Ala Glu  
 50 55 60  
 Ser Phe Lys Lys Tyr Gly Leu Lys Gln Asn Asp Thr Ile Ala Val Cys  
 65 70 75 80

65



ES 2 325 808 T3

Ser Glu Asn Ser Leu Gln Phe Phe Leu Pro Val Ile Ala Ser Leu Tyr  
 85 90 95  
 Leu Gly Ile Ile Val Ala Pro Val Asn Asp Lys Tyr Ile Glu Arg Glu  
 100 105 110  
 5 Leu Ile His Ser Leu Gly Ile Val Lys Pro Arg Ile Val Phe Cys Ser  
 115 120 125  
 Lys Asn Thr Phe Gln Lys Val Leu Asn Val Lys Ser Lys Leu Lys Ser  
 130 135 140  
 10 Ile Glu Thr Ile Ile Ile Leu Asp Leu Asn Glu Asp Leu Gly Gly Tyr  
 145 150 155 160  
 Gln Cys Leu Asn Asn Phe Ile Ser Gln Asn Ser Asp Ser Asn Leu Asp  
 165 170 175  
 Val Lys Lys Phe Lys Pro Tyr Ser Phe Asn Arg Asp Asp Gln Val Ala  
 180 185 190  
 15 Ser Ile Met Phe Ser Ser Gly Thr Thr Gly Leu Pro Lys Gly Val Met  
 195 200 205  
 Leu Thr His Lys Asn Ile Val Ala Arg Phe Ser Ile Ala Lys Asp Pro  
 210 215 220  
 20 Thr Phe Gly Asn Ala Ile Asn Pro Thr Ser Ala Ile Leu Thr Val Ile  
 225 230 235 240  
 Pro Phe His His Gly Phe Gly Met Met Thr Thr Leu Gly Tyr Phe Thr  
 245 250 255  
 Cys Gly Phe Arg Val Val Leu Met His Thr Phe Glu Glu Lys Leu Phe  
 260 265 270  
 25 Leu Gln Ser Leu Gln Asp Tyr Lys Val Glu Ser Thr Leu Leu Val Pro  
 275 280 285  
 Thr Leu Met Ala Phe Leu Ala Lys Ser Ala Leu Val Glu Lys Tyr Asp  
 290 295 300  
 Leu Ser His Leu Lys Glu Ile Ala Ser Gly Gly Ala Pro Leu Ser Lys  
 305 310 315 320  
 30 Glu Ile Gly Glu Met Val Lys Lys Arg Phe Lys Leu Asn Phe Val Arg  
 325 330 335  
 Gln Gly Tyr Gly Leu Thr Glu Thr Thr Ser Ala Val Leu Ile Thr Pro  
 340 345 350  
 35 Lys Gly Asp Ala Lys Pro Gly Ser Thr Gly Lys Ile Val Pro Leu His  
 355 360 365  
 Ala Val Lys Val Val Asp Pro Thr Thr Gly Lys Ile Leu Gly Pro Asn  
 370 375 380  
 Glu Pro Gly Glu Leu Tyr Phe Lys Gly Pro Met Ile Met Lys Gly Tyr  
 385 390 395 400  
 40 Tyr Asn Asn Glu Glu Ala Thr Lys Ala Ile Ile Asp Asn Asp Gly Trp  
 405 410 415  
 Leu Arg Ser Gly Asp Ile Ala Tyr Tyr Asp Asn Asp Gly His Phe Tyr  
 420 425 430  
 Ile Val Asp Arg Leu Lys Ser Leu Ile Lys Tyr Lys Gly Tyr Gln Val  
 435 440 445  
 45 Ala Pro Ala Glu Ile Glu Gly Ile Leu Leu Gln His Pro Tyr Ile Val  
 450 455 460  
 Asp Ala Gly Val Thr Gly Ile Pro Asp Glu Ala Ala Gly Glu Leu Pro  
 465 470 475 480  
 Ala Ala Gly Val Val Val Gln Thr Gly Lys Tyr Leu Asn Glu Gln Ile  
 485 490 495  
 50 Val Gln Asp Tyr Val Ala Ser Gln Val Ser Thr Ala Lys Trp Leu Arg  
 500 505 510  
 Gly Gly Val Lys Phe Leu Asp Glu Ile Pro Lys Gly Ser Thr Gly Lys  
 515 520 525  
 55 Ile Asp Arg Lys Val Leu Arg Gln Met Leu Glu Lys His Thr Asn Gly  
 530 535 540

60

65

ES 2 325 808 T3

78-0B10 (SEC ID N°: 5)

GGATCCAATGGCAGATAAGAATATTTTATATGGGCCCGAACCATTTTATCCCTTGGCTG  
 ATGGGACGGCTGGAGAACAGATGTTTGACGCATTATCTCGTTATGCAGATATTTCCGGA  
 5 TGCATAGCATTGACAAATGCTCATACAAAGAAAATGTTTTATATGAAGAGTTTTTAAA  
 ATTGTGCGTGTCTGTTAGCGGAAAGTTTTAAAAAGTATGGATTAAAACAAAACGACACAA  
 TAGCGGTGTGTAGCGAAAATGGTTTGCAATTTTTCTTCTCCTGTAATTGCATCATTGTAT  
 CTTGGAATAATTGCAGCACCTGTAGTGATAAATACATTGAACGTGAATTAATACACAG  
 10 TCTTGGTATTGTAAAACCACGCATAATTTTTGCTCCAAGAATACTTTTCABAAAAGTAC  
 TGAATGTAAAATCTAAATTAATCTGTAGAACTATTATTATATTAGACTTAAATGAA  
 GACTTAGGAGGTTATCAATGCCTCAACAACCTTATTCTCAAATTCGGATAGTAATCT  
 GGACGTAAAAAATTTAAACCATATCTTTTAATCGAGACGATCAGGTTGCGTTGGTAA  
 TGTTCCTTCTGGTACAACCTGGTGTCCGAAGGGAGTCACTAATCTACAAGAATATT  
 15 GTTGCACGATTTTCTCTGCAAAAGATCCTACTTTTGGTAACGCAATTAATCCCACGAC  
 AGCAATTTAACGGTAATACCTTTCCACCATGGTTTGGTATGATGACCACATTAGGAT  
 ACTTACTTGTGGATTCCGAGTTGTTCTAATGCACACGTTTGAAGAAAACCTATTTCTA  
 CAATCATTACAAGATTATAAAGTGGAAAGTACTTTACTTGTACCAACATTAATGGCATT  
 20 TCTTGCAAAAGTGCATTAGTTGAAAAGTACGATTTATCGCACTTAAAAGAAAATGCAT  
 CTGGTGGCGCACCTTTATCAAAGAAAATGGGGAGATGGTGAAAAACGGTTTAAATTA  
 AACTTTGTGAGCAAGGGTATGGATTAAACAGAAACCCTTCGGCTGTTTTAATTACACC  
 GAAAGGTGACGCCAGACCGGGATCAACTGGTAAAATAGTACCATTTACGCTGTTAAAG  
 25 TTGTCGATCTACAACAGGAAAAATTTGGGGCCAAATGAACCTGGAGAATTGTATTTT  
 AAAGGCGCCATGATAATGAAGGGTTATTATAATAATGAAGAACTACTAAAGCAATTAT  
 TGATAATGACGGATGGTTGCGCTCTGGTATATTGCTTATTATGACAATGATGGCCATT  
 TTTATATTGTGGACAGGCTGAAGTCATTAAATTAATAATAAAGGTTATCAGGTTGCACCT  
 GCTGAAATTGAGGGAATACTCTTACAACATCCGTATATTGTTGATGCCGGCGTTACTGG  
 30 TATACCGGATGAAGCCGCGGGCGAGCTTCCAGCTGCAGGTGTTGTAGTACAGACTGGAA  
 AATATCTAAACGAACAAATCGTACAAGATTTTGTTCAGTCAAGTTTCAACAGCCAAA  
 TGGCTACGTGGTGGGGTGAATTTTGGATGAAATCCCAAAGGATCAACTGGAAAAT  
 TGACAGAAAAGTGTAAAGACAAATGTTTGA AAAACACACCAATGGG

90-1B5 (SEC ID N°: 6)

40	GGATCCAATGGCAGATAAGAATATTTTATATGGGCCCGAACCATTTTATCCCTTGGGAAGA	60
	TGGGACGGCTGGAGAACAGATGTTTGACGCATTATCTCGTTATGCAGATATTTCCGGGCTG	120
	CATAGCATTGACAAATGCTCATACAAAGAAAATGTTTTATATGAAGAGTTTCTGAAACT	180
	GTCGTGTCTGTTAGCGGAAAGTTTTAAAAAGTATGGATTAAAACAAAACGACACATAGC	240
	GGTGTAGCGAAAATGGTCTGCAATTTTTCTTCTGTAATTGCATCATTGTATCTTGG	300
45	AATAATTGTGGCACCTGTTAACGATAAATACATTGAACGTGAATTAATACACAGTCTTGG	360
	TATTGTAAAACCACGCATAGTTTTTTGCTCCAAGAATACTTTCAAAGTACTGAAATG	420
	AAAATCTAAATTAATCTATTGAACTATTATTATATTAGACTTAAATGAAGACTTAGG	480
	XGGTTATCAATGCCTCAACAACCTTATTCTCAAATTCGGATAGTAATCTGGACGTAAA	540
	AAAATTTAAACCATATCTTTTAATCGAGACGATCAGGTTGCGTTGATTATGTTTTCTTC	600
	TGGTACAACCTGGTCTGCCGAAGGGAGTCATGCTAATCAACAAGATATTGTTGCACGATT	660
50	TTCTCTTGCAAAAGATCCTACTTTTGGTAACGCAATTAATCCCACGACAGCAATTTAAC	720
	GGTAATACCTTTCCACCATGGTTTTGGTATGATGACCACATTAGGATACTTTACTTGTGG	780
	ATTCGGAGTTGTTCTAATGCACACGTTTGAAGAAAACCTATTCTACAATCATTACAAGA	840
	TTATAAAGTGGAAAGTACTTTACTTGTACCAACATTAATGGCATTCTTGCAAAAGTSC	900
	ATTAGTTGAAAAGTACGATTTATCGCACTTAAAAGAAATGCATCTGGTGGCCACCTTT	960
55	ATCAAAGAAATGGGGAGATGGTGA AAAACGGTTTTAAATTAACCTTGTGACGGCAGG	1020
	GTATGGATTAAACAGAAACCCTTCGGCTGTTTTAATTACACCGAAAGGTGACGCCAAACC	1080
	GGGATCAACTGGTAAAATAGTACCATTTCAGCTGTTAAAGTTGTGATCCTACAACAGG	1140
	AAAAATTTGGGGCCAAATGAACCTGGAGAATTGTATTTAAAGGCCGATGATAATGAA	1200
	GGGTTATTATAATAATGAAGAGCTACTAAGCAATTTTATGATAATGACGGATGGTTGCG	1260
60	CTCTGGTGATATTGTTTATATGACAATGATGGCCATTTTATATTGTGGACAGGCTGAA	1320
	GTCATGATTAATATAAAGGTTATCAGGTTGCACCTGCTGAATTTGAGGGAATACTCTT	1380
	ACAACATCCGTATATTGTTGATCCGGCTTACTGGTATACCGGATGAAGCCGCGGGCGA	1440
	GCTTCCAGCTGCAGGTTGTTAGTACAGACTGAAAAATCTTAAACGAACAAATCGTACA	1500
	AGATTATGTTGCCAGTCAAGTTTCAACAGCCAAATGGCTACGTGGTGGGGTGAATTTTT	1560
65	GGATGAAATCCCAAAGGATCAACTGAAAAATTGACAGAAAAGTGTAAAGACAAATGTT	1620
	TGAAAACACACCAATGGG	1639

ES 2 325 808 T3

133-1B2 (SEC ID N°: 7)

AGATCCAATGGCAGATAAGAATATTTTATATGGGCCCGAACCATTTTATCCCTTGGAAG  
ATGGGACGGCTGGAGAACAGATGTTTGACGCATTATCTCGTTATGCAGATATCCGGGC  
5 TGCATAGCATTGACAAATGCTCATACAAAAGAAAATGTTTTATATGAAGAGTTTCTGAA  
ACTGTCGTGTCGTTTAGCGGAAAGTTTTAAAAAGTATGGATTAAAACAAAACGACACAA  
TAGCGGTGTGTAGCGAAAATAGTCTGCAATTTTTCCTTCCTGTAATTGCATCATTGTAT  
10 CTTGGAATAATTGTGGCACCTGTTAACGATAAATACATTGAACGTGAATTAATACACAG  
TCTTGGTATTTGAAAACCACGCATAGTTTTTTGCTCCAAGAATACTTTTCAAAAAGTAC  
TGAATGTAAAATCTAAATTAATCTATTGAACTATTATTATATTAGACTTAAATGAT  
GACTTAGGAGGTTATCAATGCCTCAACAACCTTTATTTCTCAAATTCGGATAGTAATCT  
15 GGACGTAAAAAATTTAAACCATATTCTTTAATCGAGACGATCAGGTTGCGTGTGATTA  
TGTTTTCTTCTGGTACAACCTGGTCTGCCGAGGGAGTCATGCTAACTCACAAGAATATT  
GTFGCACGATTTTCTATTGCAAAGATCCTACTTTTGGTAACGCAATTAATCCCACGTC  
AGCAATTTTAAACGGTAATACCTTTCCACCATGGTTTTGGTATGATGACCACATTAGGAT  
ACTTTACTTGTGGATTCCGAGTTGTTCTAATGCACACGTTTGAAGAAAACTATTTCTA  
20 CAATCATTACAAGATTATAAAGTGGAAAGTACTTTACTTGTACCAACATTAATGGCATT  
TCTTGCAAAAAGTGCATTAGTTGAAAAGTACGATTTATCGCACTTAAAAGAAATTCAT  
CTGGTGGCGCACCTTTATCAAAGAAATGGGGAGATGGTGAACAAAACGGTTTAAATTA  
AACTTTGT CAGGCAAGGGTATGGATTAACAGAAACCACTTCGGCTGTTTTAATTACACC  
25 GAAAGGTGACGCCAAACC GGGATCAACTGGTAAAATAGTACCATTTACGCTGTAAAG  
TTGTCGATCCTACAACAGGAAAATTTGGGGCCAAATGAACCTGGAGAATTGTATTTT  
AAAGSCCGATGATAATGAAGGGTATTATAATTAATGAAGAAGCTACTAAAGCAATTAT  
TGATAATGACGGATGGTTGCGCTCTGGTGATATTGCTTATTATGACAATGATGGCCATT  
TTTATATTGTTGGACAGGCTGAAGTCACTGATTAATATAAAGGTTATCAGGTTGCACCT  
30 GCTGAAATGAGGCAATACTCTTACAACATCCGTATATTGTTGATGCCGGCTTACTGG  
TATACCGGATGAAGCCGCGGGGAGCTCCAGCTGCAGGTGTTGTAGTACAGACTGGAA  
AATATCTAAACGAACAATCTGACAAGATTATGTTGCCAGTCAAGTTCAACAGCCAAA  
TGGCTACGTGGTGGGTGATATTTTGGATGAAATTCCAAAGGATCAACTGGAAAAAT  
35 TGACAGAAAAGTGTAAAGACAAATGTTAGAAAACACACCAATGGG

146-1H2 (SEC ID N°: 8)

GGATCCAATGGCAGATAAGAATATTTTATATGGGCCCGAACCATTTTATCCCTTGGAAG  
ATGGGACGGCTGGAGAACAGATGTTTGACGCATTATCTCGTTATGCAGCTATCCGGGC  
45 TGCATAGCATTGACAAATGCTCATACAAAAGAAAATGTTTTATATGAAGAGTTTCTGAA  
ACTGTCGTGTCGTTTAGCGGAAAGTTTTAAAAAGTATGGATTAAAACAAAACGACACAA  
TAGCGGTGTGTAGCGAAAATAGTCTGCAATTTTTCCTTCCTGTAATTGCATCATTGTAT  
CTTGGAATAATTGTGGCACCTGTTAACGATAAATACATTGAACGTGAATTAATACACAG  
10 TCTTGGTATTGAAAACCACGCATAGTTTTTTGCTCCAAGAATACTTTTCAAAAAGTAC  
TGAATGTAAAATCTAAATTAATCTATTGAACTATTATTATATTAGACTTAAATGAA  
GACTTAGGAGGTTATCAATGCCTCAACAACCTTTATTTCTCAAATTCGGATAGTAATCT  
50 GGACGTAAAAAATTTAAACCCTATTCTTTAATCGAGACGATCAGGTTGCGTGTGATTA  
55  
60  
65

ES 2 325 808 T3

TGTTTTCTTCTGGTACAACCTGGTCTGCCGAAGGGAGTCATGCTAACTCACAAGAATATT  
GTTGCACGATTTTCTATTGCAAAAGATCCTACTTTTGGTAACGCAATTAATCCCACGTC  
AGCAATTTTAACGGTAATACCTTCCACCATGGTTTTGGTATGATGACCACATTAGGAT  
5 ACTTTACTTGTGGATTCCGAGTTgTTCTAATGCACACGTTTGAAGAAAACCTATTTCTA  
CAATCATTACAAGATTATAAAGTGAAAGTACTTTACTTGTACCAACATTAATGGCATT  
TCTTGCAAAAAGTGCATTAGTTGAAAAGTACGATTTATCGCACTTAAAAGAAATTGCAT  
10 CTGGTGGCGCACCTTTATCAAAAAGAAATTGGGGAGATGGTGAAAAACGGTTTAAATTA  
AACTTTGTCAGGCAAGGGTATGGATTAACAGAAACCACTTCGGCTGTTTTAATTACACC  
GAAAGGTGACGCCAAACCGGGATCAACTGGTAAAATAGTACCATTACACGCTGTTAAAG  
TTGTCGATCCTACAACAGGAAAAATTTGGGGCCAAATGAACCTGGAGAATTGTATTTT  
AAAGGCCCGATGATAATGAAGGGTTATTATAATAATGAAGAAGCTACTAAAGCAATTAT  
15 TGATAATGACGGATGGTTGCGCTCTGGTGATATTGCTTATTATGACAATGATGGCCATT  
TTTATATTGTGGACAGGCTGAAGTCACTGATTAATATAAAGGTTATCAGGTTGCACCT  
GCTGAAATTGAGGGAACTACTTTACAACATCCGTATATTGTTGATGCCGGCGTTACTGG  
TATACCGGATGAAGCCCGGGCGGAGCTTCCAGCTGCAGGTGTTGTAGTACAGACTGGAA  
20 AATATCTAAACGAACAAATCGTACAAGATTATGTTGCCAGTCAAGTTTCAACAGCCAA  
TGGCTACGTGGTGGGGTGAATTTTGGATGAATTCCAAAGGATCAACTGGAAAAAT  
TGACAGAAAAGTGTTAAGACAAATGTTAGAAAACACACCAATGGG

25

30

35

40

45

50

55

60

65