



(19)

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 164 582**

(21) Número de solicitud: **200000271**

(51) Int. Cl.⁷: **C12N 9/16**

C12N 15/55

C12N 15/82

G01N 33/50

(12)

SOLICITUD DE PATENTE

A1

(22) Fecha de presentación: **02.02.2000**

(71) Solicitante/s: **Universidad Pública de Navarra
Campus Arrosadia s/n OTRI Edif. El Sario
31006 Pamplona, Navarra, ES**

(43) Fecha de publicación de la solicitud: **16.02.2002**

(72) Inventor/es: **Pozueta Romero, Javier;
Baroja Fernández, Edurne;
Zandueta Criado, Aitor y
Rodríguez López, Milagros**

(43) Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
16.02.2002

(74) Agente: **No consta**

(54) Título: **ADPglucosa pirofosfatasa vegetal alternativamente llamada ADPglucosa fosfodiesterasa, procedimiento de obtención y su uso en la fabricación de dispositivos de ensayo.**

(57) Resumen:

ADPglucosa pirofosfatasa vegetal alternativamente llamada ADPglucosa fosfodiesterasa, procedimiento de obtención y su uso en la fabricación de dispositivos de ensayo.

La AGPPasa es un enzima que cataliza la hidrólisis de una amplia gama de pequeñas moléculas con enlaces fosfodiéster, entre las que destaca la ADPG (Adenosina difosfato glucosa). El enzima obtenido a partir de extractos vegetales se utiliza en dispositivos de ensayo para determinar niveles de azúcares-nucleósido-difosfato, basados bien en el azúcar-1-fosfato liberado, bien en el nucleósido monofosfato producido, ambos por la reacción catalizada por la AGPPasa.

ES 2 164 582 A1

DESCRIPCION

ADPglucosa pirofosfatasa vegetal, alternativamente llamada ADPglucosa fosfodiesterasa, procedimiento de obtención y su uso en la fabricación de dispositivos de ensayo.

5 Sector de la técnica al que se refiere la invención

La invención se refiere al sector de la obtención, purificación y caracterización del enzima ADPglucosa pirofosfatasa (AGPPasa), también llamada ADPglucosa fosfodiesterasa, y a las aplicaciones de este enzima en la determinación de niveles de azúcares-nucleósidos.

10

Estado de la técnica anterior

15

El almidón constituye la forma principal de almacenamiento de carbohidratos en los vegetales. Se acumula en grandes cantidades en órganos tales como semillas (trigo, cebada, maíz, guisante, etc.) y tubérculos (patata y batata entre otros), y es un constituyente fundamental de la dieta del ser humano. Por otro lado, el almidón es un polímero utilizado frecuentemente en las industrias papelera, cosmética, farmacéutica y alimentaria, y también se utiliza como componente fundamental para la fabricación de plásticos biodegradables y pinturas de bajo impacto medioambiental. Consecuentemente, el estudio de los procesos implicados en la síntesis de este polímero de glucosa constituye un tema prioritario en diversos 20 ámbitos de la producción industrial.

20

El ADPglucosa (ADPG) es el precursor universal de la biosíntesis del almidón en tejidos de reserva de la planta. Su concentración en la célula resulta determinante para la cantidad y calidad del almidón producido por la planta. Las reflexiones acerca de los factores que gobiernan los niveles endógenos de 25 ADPG en la célula vegetal han girado fundamentalmente en torno a sus enzimas sintetizadores, tales como la ADPGpirofosforilasa (AGPasa) y la Sacarosa sintasa (Preiss, (1988) "Biosynthesis of starch and its regulation". The Biochemistry of Plants. Vol. 14, Academic Press, New York, pp. 182-249; Pozueta-Romero, J., Perata, P., Akazawa, T. (1999) "Sucrose-starch conversion in heterotrophic tissues". Crit. Rev. Plant. Sci. 18, 489-525). Sin embargo, poco se ha investigado en relación con la maquinaria 30 responsable de la degradación de este azúcar-nucleótido (Feingold, D.S., Avigad, G. (1980) "Sugar transformation in plants". The Biochemistry of Plants. Vol. 3, Stumpf, P.K. and Conn, E.E. eds. Academic Press, New York, pp. 101-170).

35

Existen indicios de que tanto bacterias como mamíferos disponen de una maquinaria enzimática capaz de hidrolizar azúcares-nucleótidos tales como el ADPG (Melo, A., Glaser, L. (1966) "Nucleotide diphosphate hexose pyrophosphatases". Biochem. Biophys. Res. Commun. 22, 524-531; Bessman, M.J., Frick, D.N., O'Handley, S.F. (1996) "The MutT proteins or Nudix hydrolases, a family of versatile, widely distributed housecleaning enzymes". J. Biol. Chem. 271, 25059-25062; Rodríguez, P., Bass, S.T., Hansen, R.G. (1968) "A pyrophosphatase from mammalian tissues specific for derivatives of ADP". Biochim. Biophys. Acta. 167, 199-201; Gasmi, L., Cartwright, J.L., McLennan, A.G. (1999) "Cloning, expression and characterization of YSA1H, a human adenosine 5'-diphosphosugar pyrophosphatase possessing a MutT motif". Biochem. J. 331-337). En plantas, tal tipo de actividad no ha sido descrito en la literatura y hasta el presente se desconoce totalmente la existencia de enzimas hidrolíticas del ADPG.

45

En esta patente, sin embargo, se describe la purificación y aplicaciones de un producto enzimático de origen vegetal que denominamos AGPPasa que cataliza la hidrólisis de pequeñas moléculas con enlaces fosfodiéster entre las que destaca el ADPG por ser el substrato preferente.

50

En diversas industrias, el almidón constituye un agente viscosizante y gelificante de primera necesidad. La biosíntesis del almidón en la célula vegetal a partir del ADPG tiene lugar en el compartimento subcelular denominado plástido. Tanto la síntesis como la degradación del ADPG se producen en este compartimento y por tanto el control de los niveles de almidón producido en el plástido puede tener lugar mediante el control de los procesos reguladores de los niveles de ADPG. Las diferentes aplicaciones del almidón producido en una planta están basadas en el balance de amilosa y amilopectina, el cual determina 55 la estructura del gránulo de almidón, así como su viscosidad en suspensiones acuosas. Tal proporción de amilosa y amilopectina depende de la concentración de ADPG en la célula vegetal. No se conoce hasta el momento ningún procedimiento para regular las características del almidón producido en una planta mediante el control de la degradación de ADPG, que el enzima descrito en la presente invención puede proporcionar.

60

Las técnicas cromatográficas, por último, constituyen una poderosa herramienta de determinación de niveles de azúcares-nucleósido difosfato (tales como los derivados de glucosa, ribosa, manosa, galac-

tosa, ácido glucurónico, fructosa y ácido galacturónico) en extractos crudos de origen animal, vegetal o microbiano. Aunque de uso muy generalizado, requieren una inversión importante en equipamientos y en la preparación de las muestras problema. Lamentablemente, se hace escaso uso de posibles métodos alternativos que permitan la detección y cuantificación de azúcares-nucleótidos de una manera simple y eficaz. El análisis de los niveles en sangre, músculo o hígado de algunos de los azúcares-nucleótidos mencionados son importantes en clínica. Así por ejemplo, dado que el UDPglucosa es el precursor del glucógeno en animales, el análisis de los niveles de esta molécula puede ser importante en el estudio y el diagnóstico de enfermedades relacionadas con el metabolismo de los carbohidratos como por ejemplo distintos tipos de diabetes. Evidentemente, la posibilidad de analizar de manera simple y poco costosa los niveles de estas sustancias en una muestra constituye una alternativa ventajosa respecto a las técnicas 10 cromatográficas.

Descripción de la invención

15 Es objeto de la presente invención, en primer lugar, la obtención del enzima AGPPasa en forma sustancialmente pura, a partir de tejidos vegetales, y su caracterización.

Otro objeto de la presente invención es el procedimiento seguido para la elaboración de dispositivos 20 o kits de determinación de azúcares-nucleósido difosfatos basados en el empleo del producto enzimático con actividad AGPPasa. Tal y como se ha explicado en el Estado de la Técnica Anterior, el UDPglucosa es el precursor del glucógeno en animales, de modo que sus niveles en diversos tejidos y órganos (sangre, músculo, hígado) están relacionados con las diversas situaciones, patológicas o no, del metabolismo glucídico. Por este motivo, el disponer de kits para la determinación sencilla, rápida y económica de 25 azúcares nucleósidos presenta un notable interés para la industria de productos biomédicos, tanto de diagnóstico como de investigación en fisiología.

La obtención y purificación del producto vegetal con actividad enzimática AGPPasa objeto de la 30 presente invención puede hacerse a partir de cualquier tejido vegetal de cualquier especie, como puede ser cualquier Monocotiledónea o Dicotiledónea, como por ejemplo, cebada (*Hordeum vulgare*), trigo (*Triticum aestivum*), pimiento (*Capsicum annuum*), tomate (*Lycopersicon esculentum*), patata (*Solanum tuberosum*), *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*), o arce (*Acer pseudoplatanus L.*), por citar sólo algunos de los innumerables ejemplos representativos de diferentes familias y géneros.

El enzima vegetal objeto de la presente invención presenta diversas isoformas en los tejidos vegetales 35 de los que puede obtenerse. La isoforma de extracción más sencilla es la que denominados soluble, mientras que otras isoformas, que podemos denominar particuladas, se encuentran íntimamente adheridas a los gránulos de almidón, de tal modo que para obtenerlas es preciso destruir el gránulo hidrolizando el almidón.

40 Obtención y purificación de isoformas solubles de la AGPPasa

El método general de obtención y purificación de la AGPPasa soluble vegetal incluye los siguientes pasos, en los que pueden admitirse pequeñas variaciones que no modifiquen sustancialmente el esquema general del procedimiento de extracción y purificación, a partir de cualquier tejido vegetal:

- 45 1. Homogeneización del tejido vegetal con un tampón de extracción.
2. Filtración a través de cuatro capas de Miracloth® (tela filtrante para suero lácteo empleada en industrias queseras).
- 50 3. Ultracentrifugación del homogeneizado filtrado.
4. Precipitación en sulfato amónico de las proteínas del sobrenadante.
5. Resuspensión del precipitado en tampón de pH 4,2.
- 55 6. Calentamiento durante al menos 15 minutos a una temperatura entre 60 y 65°C.
7. Centrifugación.
- 60 8. Concentración del sobrenadante y purificación de la proteína por cromatografía de filtración en gel. La actividad enzimática de la AGPPasa se detecta mediante la detección de la producción de G1P y AMP en muestras incubadas con ADPG.

9. Isoelectroenfoque. La posición de la AGPPasa puede determinarse fácilmente de alguna de las siguientes maneras:

- a) Elución de la proteína y posterior detección de la producción de G1P en presencia de ADPG.
- b) Incubación del gel en una solución con bis-paranitrofenilfosfato (bisPNPP) y revelado en una solución básica según se describió por Nishimura y Beevers (Nishimura, M., Beevers, H (1978) Plant Physiol. 62, 44-48).

10. Separación por electroforesis de la proteína en gel desnaturizante en un sistema de tampones neutros o ligeramente ácidos tales como el NuPAGE 4-12 % Bis-Tris (Novex, San Diego, California). La posición de la AGPPasa puede determinarse fácilmente de alguna de las siguientes maneras:

- a) Elución de la proteína y posterior detección de la producción de G1P en presencia de ADPG.
- b) Incubación del gel en una solución con bis-PNPP y revelado en una solución básica.

Identificación del producto con actividad enzimática AGPPasa

El producto enzimático obtenido por los procedimientos arriba descritos, u otros equivalentes, se identifica mediante los siguientes patrones funcionales:

- Es una fosfodiesterasa (EC 3.1.4) que cataliza la hidrólisis del ADPG en cantidades equimolares de G1P y AMP.
- Además del ADPG, reconoce pequeñas moléculas que poseen enlaces fosfodiéster, tales como el UDP-glucosa, GDP-glucosa, GDP-manosa, ADP-manosa, bis-PNPP y otros de estructura similar, cuya hidrólisis tiene lugar con menor eficacia que con el ADPG.
- No hidroliza moléculas con enlaces fosfomonooéster tales como la G1P, G6P, AMP, 3-fosfoglicerato, y otras similares. Tampoco hidroliza AMP cíclico ni ácidos nucleicos de larga cadena tales como ADN o ARN, que son substratos de otras fosfodiesterasas descritas en la literatura.
- A diferencia de pirofosfatasas de ADP-azúcares (EC 3.6.1.13, EC 3.6.1.21) descritos en bacterias y animales y a diferencia de otras fosfodiesterasas (EC 3.1.4), sus requerimientos iónicos son reducidos, por lo que puede trabajar en ausencia de iones de Magnesio, Manganeso, Cobalto, y otros cationes divalentes.
- A diferencia de las pirofosfatasas de azúcar-nucleósidos difosfatos de bacterias y animales, la AGPPasa hidroliza bis-PNPP.
- Se inhibe por moléculas fosforiladas tales como el AMP, ADP, ATP, 3-fosfoglicerato, ortofosfato, pirofosfato inorgánico, y otras de características semejantes.
- Se inhibe fuertemente por molibdato y arsenato.
- Es resistente a detergentes iónicos tales como el SDS (dodecilsulfato sódico).
- Es resistente a la acción de una amplia gama de proteasas, como Proteinasa K y Pronase (Boehringer).
- Su actividad no se ve afectada por la acción de inhibidores típicos de fosfodiesterasas tales como el β -mercaptoetanol, EDTA, cisteína reducida, ascorbato, y otros agentes reductores y quelantes.
- Es sensible a pH ligeramente básico y es muy estable a pH entre 4 y 7,5.

Elaboración de dispositivos (kits) de ensayo para determinación de azúcares-nucleósido difosfatos

Los kits diseñados para la determinación de azúcares-nucleósido difosfatos están basados en la acción del producto con actividad AGPPasa sobre enlaces fosfodiéster de pequeñas moléculas que, tras ser hidrolizadas, dan lugar a otras moléculas de fácil detección y cuantificación.

Las dos estrategias más convenientes para la elaboración de estos kits parten de la hidrólisis del azúcar-nucleósido difosfato mediante el enzima objeto de la presente invención, esto es, AGPPasa, produciendo cantidades equimolares de azúcar-1-fosfato y del correspondiente nucleósido monofosfato. A partir de aquí puede plantearse la determinación a partir del azúcar-1-fosfato, o bien a partir del nucleósido monofosfato producido, según se especifica a continuación:

- En el caso de que el azúcar-1-fosfato sea glucosa-1-P (G1P), se somete dicho compuesto a la acción del enzima fosfoglucomutasa rindiendo glucosa-6-fosfato, que a su vez puede hacerse reaccionar acopladamente con NAD⁺ por acción del enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, obteniéndose 6-fosfoglucónato y NADH, fácilmente determinable.
- 5 • En el caso de que el azúcar-1-fosfato no sea G1P, la determinación del azúcar-1-fosfato y del nucleósido monofosfato tiene lugar mediante determinación colorimétrica del ortofosfato (Pi) producido tras la hidrólisis de estos compuestos con fosfatasa alcalina. Alternativamente, se puede utilizar como enzima acoplador la 5'nucleotidasa la cual hidrolizará el nucleósido monofosfato en cantidades equimolares del nucleósido correspondiente y Pi. El Pi liberado en cualquiera de los dos casos resulta fácilmente cuantificable por métodos colorimétricos conocidos.
- 10

Ejemplos de realización de la invención

15 Se describe a continuación un ejemplo en el que se, muestra detalladamente el procedimiento de obtención y purificación de la AGPPasa, en su isoforma soluble, a partir de hojas de cebada. El mismo procedimiento, con mínimas variaciones adecuadas a cada caso, puede aplicarse a cualquier otro tejido vegetal, para obtener las correspondientes isoformas solubles con la actividad enzimática descrita.

Ejemplo 1

AGPPasa soluble obtenida a partir de hojas de cebada

Extracción y purificación de la AGPPasa

25 Todos los pasos se desarrollaron a 4°C, a no ser que se indique otra cosa. El tejido vegetal (200 g) se homogeneizó con 600, mL de tampón de extracción (Mes 50 mM pH 6, EDTA 1 mM, DTT 2 mM) empleando un Waring Blender. El homogeneizado se filtró a través de cuatro capas de Miracloth®, se centrifugó a 100.000 g durante 30 minutos y el sobrenadante se ajustó al 50 % de sulfato amónico. El precipitado obtenido tras 30 minutos de centrifugación a 30.000 g (20°C) fue resuspendido en 560 mL de Mes 50 mM pH 4,2, luego calentado en baño de agua a 62°C durante 20 minutos, enfriado en hielo, y centrifugado a 30.000 g durante 20 minutos. Las proteínas del sobrenadante se precipitaron mediante sulfato amónico 50 %, y se resuspendieron en 5,7 mL de Mes 50 mM pH 6. La muestra se sometió a continuación a filtración en gel en columna Superdex 200 (Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Suecia) preequilibrada con Mes pH 6 y NaCl 150 mM. La elución se efectuó con el mismo tampón. Las fracciones 30 con actividad AGPPasa se juntaron y concentraron. Las proteínas se separaron electroforéticamente en 35 un sistema de geles NuPAGE 4-12 % Bis-Tris (Novex, San Diego, California).

Ensayos enzimáticos

40 A no ser que se indique otra cosa, todas las reacciones enzimáticas se desarrollaron a 37°C. Las determinaciones de actividades AGPPasa se realizaron utilizando la determinación espectrofotométrica de G1P en dos pasos descrita por Sowokinos (1981) (Sowokinos, 1981, *Plant Physiol.* **68**, 924-929). La mezcla de reacción contenía Hepes 50 mM pH 7, la cantidad especificada de ADPG y el extracto proteico en un volumen total de 50 microlitros. Todos los ensayos se realizaron frente a blanco de ADPG. Tras 45 20 minutos de incubación, la reacción se detenía mediante ebullición en baño seco durante 2 minutos. La mezcla se centrifugaba a 20.000 g durante 5 minutos y se recuperaba el sobrenadante. En el segundo paso, se determinaba G1P espectrofotométricamente en 300 microlitros de mezcla contenido Hepes 50 mM pH 7, EDTA 1 mM, MgCl₂ 2 mM, KCl 15 mM, NAD⁺ 0,6 mM, una unidad de fosfoglucomutasa y otra de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de *Leuconostoc mesenteroides*, y 30 microlitros del sobrenadante 50 resultante del paso uno. Tras 20 minutos de incubación, la producción de NADH se monitorizó a 340 nm utilizando un espectrofotómetro Multiskan EX (Labsystems). Fue despreciable la cantidad de NADH producida por cualquier extracto proteico en ausencia de ADPG en el paso uno.

55 La masa molecular nativa de la AGPPasa se determinó mediante filtración en gel por medio de una representación del coeficiente de partición (Kav) frente al logaritmo de la masa molecular de las siguientes proteínas patrones: tiroglobulina bovina (670 kDa), gamma-globulina bovina (158 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), mioglobina (17 kDa) y vitamina B-12 (1,3 kDa). El contenido en proteína se determinó por el método de Bradford utilizando el reactivo preparado por Bio-Rad y gamma-globulina como patrón.

60 La tabla 1 presentada a continuación refleja la purificación de la AGPPasa a partir de hojas de cebada por el método descrito. La unidad (U) se define como la cantidad de enzima que cataliza la producción de 1 μmol de producto por minuto.

ES 2 164 582 A1

TABLA 1

	Volumen total (mL)	Proteína total (mg)	Actividad total (mU)	Actividad específica (mU/mg proteína)	Purificación (factor)	Rendimiento (%)	
5	Extracto crudo	560	5107,8	105000	20,6	-	100
10	Sobrenadante 100000 x g	520	3436,7	100500	29,2	1,4	95,7
15	Sulfato amónico 50 %	520	748,6	97500	130,2	6,3	92,8
20	PH 4,2 / 62°C	520	24,9	90500	3634	176,4	86,2
25	Sulfato-amónico 50 %	5,7	8,1	47300	5839	283,4	45,0
30	Superdex 200	1,7	1,3	30200	23230	1127,6	28,7
35	NuPAGE-SDS Electroforesis	1,7	0,026	30000	1161500	56350	28

Identificación del producto con actividad enzimática obtenido

- 40 El producto con actividad AGPPasa así obtenido cumple las siguientes características:
- Es una fosfodiesterasa que cataliza la hidrólisis del ADPG produciendo cantidades equimolares de G1P y AMP.
 - Además del ADPG, reconoce otras moléculas de pequeño tamaño que poseen enlaces fosfodiéster, tales como el UDP-glucosa, GDP-glucosa, bis-PNPP y otros de estructura similar.
 - No hidroliza moléculas con enlaces fosfomonooéster tales como la G1P, G6P, AMP, 3-fosfoglicerato, y otras similares. Tampoco hidroliza AMP cíclico ni ácidos nucleicos tales como ADN y ARN, que son substratos de otras fosfodiesterasas descritas en la literatura.
 - Sus requerimientos iónicos son reducidos, por lo que puede trabajar en ausencia de iones de Magnesio, Manganeso, Cobalto, y otros cationes divalentes, que son efectores fundamentales para el funcionamiento de otras fosfodiesterasas descritas en la literatura.
 - A diferencia de las pirofosfatasas de azúcar-nucleósidos difosfatos de bacterias y animales, la AGPPasa obtenida hidroliza bis-PNPP.
 - Se inhibe por moléculas fosforiladas tales como el AMP, ADP, ATP, 3-fosfoglicerato, ortofosfato, pirofosfato inorgánico, y otras de características semejantes.
 - Se inhibe fuertemente por molibdato y arsenato.
 - Es resistente a detergentes iónicos tales como el SDS (dodecilsulfato sódico).

- Es resistente a la acción de una amplia gama de proteasas, como Proteinasa K y Pronasa (Boehringer).
- Su actividad no se ve afectada por la acción de inhibidores típicos de fosfodiesteras tales como el β -mercaptoetanol, EDTA, cisteína reducida, ascorbato, y otros agentes reductores y quelantes.
- Es sensible a pH ligeramente básico y es muy estable a pH entre 4 y 7,5. Esta característica es una de las que convierten a la AGPPasa en un enzima totalmente diferente a la mayoría de las fosfodiesteras descritas en la literatura, dado que éstas últimas son estables y activas en pHs ligeramente básicos.
- Es resistente a una temperatura de 65°C durante 30 minutos, y puede ser caracterizada por los siguientes datos:
- Peso molecular aparente medido por filtración en gel, en torno a 35-55 kDa.
- K_{eq}' de la reacción de 110.
- Incremento de Energía Libre estándar ($\Delta G'$) de -2,9 kcal/mol.
- Constante de Michaelis-Menten (K_m) para ADP-glucosa, de 0,5 mMolar, la cual es unas cuatro a cinco veces inferior a la K_m correspondiente a otros substratos azúcares-nucleótidos como por ejemplo ADP-ribosa, UDP-glucosa o similares.

Ejemplo 2

25 *Productos con actividad AGPPasa a partir de diversos vegetales*

El enzima AGPPasa muestra una muy amplia difusión entre los vegetales, de modo que el producto enzimático con actividad AGPPasa puede ser obtenido a partir de cualquier vegetal. Como ejemplo, se presenta la siguiente tabla II con las actividades específicas (mU / mg proteína) obtenidas en varias 30 Monocotiledóneas y Dicotiledóneas.

TABLA II

	<i>Actividad específica (mU / mg proteína)</i>
	(+ADPG)
40	<i>Monocotiledóneas</i>
45	Hoja de cebada (<i>Hordeum vulgare</i>) 113,7 ± 3,5
50	Hoja de trigo (<i>Triticum aestivum</i>) 22,4 ± 2,5
55	<i>Dicotiledóneas</i>
60	Hoja de <i>Arabidopsis thaliana</i> (Wt) 5,2 ± 0,6
	Hoja de pimiento (<i>Capsicum annuum</i>) 5,0 ± 0,6
	Hoja de tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i>) 5,6 ± 0,5
	Cultivo celular de arce (<i>Acer pseudoplatanus</i>) 16,5 ± 7,2

ES 2 164 582 A1

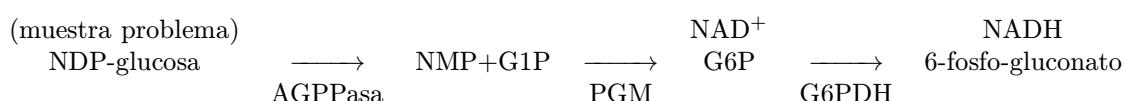
Ejemplo 3

Elaboración de kits enzimáticos de determinación de glucosa-nucleósido difosfatos

5 Para la determinación de glucosa-nucleósido difosfatos tales como ADPG, UDP-glucosa, CDP-glucosa, GDP-glucosa y TMP-glucosa, se elabora un kit que contiene los siguientes elementos:

- a. AGPPasa
10 b. NAD⁺
c. Fosfoglucomutasa (PGM)
d. G6P deshidrogenasa (G6PDH)
15 e. Tampón

La determinación de la cantidad de glucosa-nucleósido difosfato presente en la muestra problema se basa en la determinación espectrofotométrica del NADH producido según la siguiente reacción acoplada:



25 La determinación de la cantidad de NDP-glucosa en una muestra problema tendría lugar mediante la elaboración de un cocktail cuya composición sería (para 1 ml):

- Muestra problema
 - 1 U de AGPPasa
 - 1 U de PGM
 - 1 U de G6PDH
 - 0.6 mM NAD⁺
 - Tampón Mes o Hepes 50 mM pH 7
 - Agua (hasta completar 1 ml).

Se incuba a 37°C durante 20 minutos y se observa la variación de absorbancia de la muestra a 340 nm. Como control negativo se puede utilizar un cocktail en el que falte la AGPPasa.

45 Ejemplo 4

Elaboración de kits enzimáticos de determinación de nucleósido difosfatos de azúcares distintos a glucosa

Se preparan kits de determinación de los siguientes azúcares-nucleósido difosfatos:

- ribosa-nucleósido difosfatos (ADP-ribosa, GDP-ribosa, UDP-ribosa, CDP-ribosa o TDP-ribosa)
 - manosa-nucleósido difosfatos (ADP-manosa, GDP-manosa, TDP-manosa, UDP-manosa o CDP-manosa)
 - galactosa-nucleósido difosfatos (ADP-galactosa, GDP-galactosa, UDP-galactosa o CDP-galactosa)
 - glucurónico-nucleósido difosfatos (GDP-glucurónico, UDP-glucurónico, ADP-glucurónico, CDP-glucurónico o TDP-glucurónico)
 - fructosa-nucleósido difosfatos (GDP-fructosa, ADP-fructosa, CDP-fructosa, UDP-fructosa, TDP-fructosa)

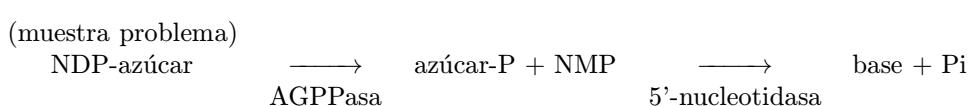
ES 2 164 582 A1

- galacturónico-nucleósido difosfatos (UDP-galacturónico, GDP-galacturónico, CDP-galacturónico, TDP-galacturónico o ADP-galacturónico)

En el kit intervienen los siguientes elementos:

- 5 a. AGPPasa
b. 5'-nucleotidasa (o, alternativamente, fosfatasa alcalina)
10 c. tampón

La determinación de la cantidad de azúcar-nucleósido difosfato presente en la muestra problema se basa en la determinación colorimétrica del ortofosfato liberado según la siguiente reacción enzimática acoplada:



- 20 La determinación del ortofosfato (Pi) tiene lugar según cualquiera de los múltiples métodos colorimétricos disponibles en la bibliografía y en el mercado.

La determinación de la cantidad de NDP-azúcar en una muestra problema tendría lugar mediante la elaboración de un cocktail (1 ml) compuesto por:

- 25 ➤ Muestra problema

30 ➤ 1 U de AGPPasa
➤ 1 U de 5'-nucleotidasa (o, alternativamente, 1 U de fosfatasa alcalina)
➤ Tampón Mes o Hepes 50 mM pH 7.5
➤ Agua (hasta completar 1 ml)

Se incuba a 37°C durante 20 minutos y se determina la producción del Pi liberado según técnicas convencionales. Como control negativo se puede utilizar un cocktail en el que falte la AGPPasa.

40

45

50

60

REIVINDICACIONES

1. Producto enzimático de origen vegetal, denominado AGPPasa, con actividad enzimática ADP-glucosa fosfodiesterasa, **caracterizado** por ser una fosfodiesterasa (EC 3.1.4) que cataliza la hidrólisis del ADPG equimolarmente en G1P y AMP, no hidroliza moléculas con enlaces fosfomonooéster, no requiere de efectores iónicos de fosfodiesterasas, es capaz de hidrolizar bis-PNPP, se inhibe por molibdato, arsenato y moléculas fosforiladas, su actividad no se ve afectada por agentes reductores y quelantes inhibidores de fosfodiesterasas, es sensible a pH ligeramente básico y es muy estable a pH entre 4 y 7,5, es resistente a detergentes iónicos tipo SDS y a la acción de proteasas, y reconoce además del ADPG otros sustratos que poseen enlaces fosfodiéster, hidrolizándolos con una Km 4 a 5 veces superior a la del propio ADPG.
2. Producto enzimático según la reivindicación 1 **caracterizado** por no hidrolizar, entre otros, G1P, G6P, AMP, 3-fosfoglicerato, AMPc, ni ácidos nucleicos.
3. Producto enzimático según las reivindicaciones 1 y 2 **caracterizado** por no requerir como efectores, entre otros cationes divalentes, al Magnesio, Manganese o al Cobalto.
4. Producto enzimático según las reivindicaciones 1 a 3 **caracterizado** por ser inhibido por ortofosfato, pirofosfato inorgánico, y ésteres de fosfato tales como, entre otros, AMP, ADP, ATP, o 3-fosfoglicerato.
5. Producto enzimático según las reivindicaciones 1 a 4 **caracterizado** porque su actividad no es afectada, entre otros, por el β -mercaptoetanol, EDTA, cisteína reducida o ascorbato.
6. Producto enzimático según las reivindicaciones 1 a 5 **caracterizado** por ser resistente, entre otras, a Proteinasa K o Pronasa.
7. Producto enzimático según las reivindicaciones 1 a 6 **caracterizado** por reconocer como sustratos, entre otros, a la UDP-glucosa, GDP-glucosa, ADP-manosa o bis-PNPP.
8. Procedimiento de obtención de un producto enzimático de origen vegetal con actividad ADP-glucosa fosfodiesterasa **caracterizado** por someter a material de origen vegetal a una extracción de la fracción proteica por un tampón, la filtración del extracto, seguida de un procedimiento de purificación por sucesivas centrifugaciones y precipitaciones, con ajustes tanto del pH como de la fuerza iónica del medio, incluyendo preferentemente un calentamiento de la proteína por encima de 60°C y enfriamiento en hielo, y purificación por filtración en gel, isoelectroenfoque, electroforesis en gel desnaturizante, u otros medios equivalentes de purificación de proteínas extraídas a partir de tejidos vegetales.
9. Procedimiento según la reivindicación 8 que comprende los siguientes pasos: (1) homogenización del tejido vegetal con un tampón de extracción, por ejemplo, Mes 50 mM pH 6, EDTA 1 mM, DTT 2 mM, (2) filtración a través de 4 capas de Miracloth®, (3) ultracentrifugación a 100,000 g, (4) precipitación en sulfato amónico de las proteínas del sobrenadante, (5) resuspensión del precipitado en tampón de pH 4,2, (6) calentamiento durante al menos 15 minutos a una temperatura entre 60 y 65°C, seguido de enfriamiento en hielo, (7) centrifugación a 30.000 g, (8) concentración de la proteína del sobrenadante mediante precipitación en sulfato amónico y resuspensión a pH 6, y (9) purificación por cromatografía de filtración en gel, isoelectroenfoque y electroforesis en gel desnaturizante.
10. El producto enzimático de las reivindicaciones 1 a 7 obtenible por el procedimiento de las reivindicaciones 8 y 9.
11. Producto enzimático según las reivindicaciones 1 a 7 o 10, **caracterizado** por ser resistente a una temperatura de 65°C durante 30 minutos, y por presentar un peso molecular aparente determinado por filtración en gel en torno a 35-55 kDa, así como por mostrar una K_{eq}' de la reacción de 110, siendo su $\Delta G'$ de -2,9 kcal/mol, y su K_m para ADPG de 0,5 mMolar.
12. Producto enzimático según las reivindicaciones 1 a 7 y 10 a 11, **caracterizado** por haber sido aislado a partir de cualquier especie vegetal.
13. Uso del producto enzimático de las reivindicaciones 1 a 7 y 10 a 12 en la fabricación de dispositivos y/o composiciones de ensayo de aplicación en la determinación de azúcares-nucleósido difosfatos.
14. Dispositivo de ensayo para la determinación de azúcares-nucleósido difosfatos **caracterizado**

ES 2 164 582 A1

porque incluye el producto enzimático de las reivindicaciones 1 a 7 o 10 a 12, de tal modo que la determinación se basa en el azúcar-1-fosfato liberado durante la reacción catalizada por la AGPPasa.

15. Dispositivo de ensayo para la determinación de azúcares-nucleósido difosfatos **caracterizado**
5 porque incluye el producto enzimático de las reivindicaciones 1 a 7 o 10 a 12, de tal modo que la determinación se basa en el nucleósido monofosfato producido durante la reacción catalizada por la AGPPasa.

16. Dispositivo de ensayo según la reivindicación 14 **caracterizado** porque la determinación se basa en la glucosa-1-fosfato liberada, la cual es sometida al enzima fosfoglucomutasa para producir glucosa-
10 6-fosfato, que a su vez se hace reaccionar acopladamente con NAD⁺ o NADP⁺, por acción del enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, obteniéndose 6-fosfogluconato y NADH o NADPH, determinables uno u otro por métodos espectrofotométricos, o de otra naturaleza, convencionales.

17. Dispositivo de ensayo según la reivindicación 15 **caracterizado** porque la determinación se basa en el nucleósido-monofosfato, el cual es susceptible de liberar ortofosfato, además de la base correspondiente, por acción de un enzima como 5'nucleotidasa, siendo el ortofosfato fácilmente determinable por métodos convencionales, por ejemplo colorimétricos.

18. Dispositivo de ensayo según reivindicaciones 14 y 15 **caracterizado** porque la determinación se basa en que el azúcar-1-fosfato y el nucleósido-monofosfato son susceptibles de liberar ortofosfato por acción de un enzima como fosfatasa alcalina o 5'nucleotidasa, siendo el ortofosfato fácilmente determinable por métodos convencionales, por ejemplo colorimétricos.

25

30

35

40

45

50

55

60



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

- (11) ES 2 164 582
 (21) N.º solicitud: 200000271
 (22) Fecha de presentación de la solicitud: 02.02.2000
 (32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) Int. Cl.⁷: C12N 9/16, 15/55, 15/82, G01N 33/50

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	VALLELIAN-BINDSSCHEDLER, L. et al., Structure, expression and localization of a germin-like protein in barley (<i>Hordeum vulgare L.</i>) that is insolubilized in stressed leaves. 1998. <i>Plant. Mol. Biol.</i> 37:297-308. Citado en la solicitud.	1-7,10-12
A	VAN DIJK, WILLEM et al., A universal and rapid spectrophotometric assay of CMP-sialic acid hydrolase and nucleoside-diphosphosugar pyrophosphatase activities and detection in polyacrylamide gels. 1981. <i>Anal. Biochem.</i> 117 (2), 346-53.	13-18
A	PUHAKAINEN, E. et al., UDP glucuronic acid pyrophosphatase assay with the aid of alkaline phosphatase. 1977. <i>Acta Chem. Scand.</i> , Ser. B, B31 (2), 125-9.	13-18
A	JP 52-061286 A (JAPAN MONOPOLY CORP.) 20.05.1977 (resumen) World Patentes Index [en línea]. Londres (Reino Unido): Derwent Publications Ltd. [recuperado el día 10.05.2001]. Recuperado de: EPOQUE, EPO, DW 197726, N° de acceso 1977-46195Y	8-9

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

O: referido a divulgación no escrita

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

A: refleja el estado de la técnica

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n°:

Fecha de realización del informe 02.11.2001	Examinador M. Hernández Cuéllar	Página 1/1
------------------------------------------------	------------------------------------	---------------