



(12) **BREVET DE INVENȚIE**

Hotărârea de acordare a brevetului de invenție poate fi revocată
în termen de 6 luni de la data publicării

(21) Nr. cerere: **98-01362**

(22) Data de depozit: **27.01.97**

(30) Prioritate: **08.03.96 US 08/612, 542**

(41) Data publicării cererii:
30.04.99 BOPI nr. 4/99

(42) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului:
28.03.2003 BOPI nr. 3/2003

(45) Data eliberării și publicării brevetului:
BOPI nr.

(61) Perfecționare la brevet:
Nr.

(62) Divizată din cererea:
Nr.

(86) Cerere internațională PCT:
Nr. **US 97/01193 27.01.97**

(87) Publicare internațională:
Nr. **WO 97/32994 12.09.97**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
US 4792520; 4822736

(71) Solicitant: **THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA, OAKLAND, CALIFORNIA, US**

(73) Titular: **THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA, OAKLAND, CALIFORNIA, US**

(72) Inventatori: **CARRERA CARLOS J., SAN DIEGO, US; CARSON DENNIS A., DEL MAR, CALIFORNIA, US;
COTTAM HOWARD B., FALLBROOK, US; NOBORI TSUTOMU, SAN DIEGO, CALIFORNIA, US**

(74) Mandatar: **CABINET ENPORA S.R.L., BUCUREȘTI**

(54) **METODĂ DE INHIBARE A ACTIVITĂȚII ADENILOSUCCINAT
SINTETAZEI ÎN CELULELE DEFICITARE ÎN METILTIOADENOZINFOS-
FORILAZĂ**

(57) **Rezumat:** Invenția se referă la o metodă pentru inhibarea activității adenilosuccinat sintetazei (ASS) în celulele deficitare în metiltioadenozinfosforilază (MTAză), care cuprinde următoarele etape: (a) opțional, se determină dacă o populație de celule obținută de la o gazdă mamaliană este deficitară în MTAZă; și (b) se administrează o

cantitate eficientă terapeutică dintr-un agent inhibitor ASS la gazdă, care are efectul epuizării celulelor gazdă deficitare în MTAZă de adenzin 5'-monofosfat.

Revendicări: 7
Figuri: 7

RO 118210 B



Invenția se referă la o metodă de inhibare a activității adenilsuccinat sintetazei în celulele deficitare în metiltioadenozin fosforilază și are aplicabilitate în tratamentul chemo-terapeutic al cancerului.

Metiltioadenozina (MTA) este clivată în celulele mamifere sănătoase de metiltioadenozin fosforilază (MTA_z) în adenină și metiltioriboză-1-P, din care ultima este un substrat pentru sinteza metabolică a metioninei. Adenina este recuperată într-un depozit celular de adenzin 5'-monofosfat (AMP), de la care celulele derivă adenzin 5'-trifosfat (ATP) pentru energie metabolică și 2'-deoxiadenozin-5'-trifosfat (dATP) pentru sinteza ADN.

Pe baza unor studii *in vitro* mai vechi, izomerul L al unei alanozine bacteriene anti-biotice (obținută de la *Streptomyces alanosinicus*; în continuare, "L-alanozină") s-a încercat a fi utilizat ca agent antiviral și antitumoral. În special, se crede că L-alanozina inhibă adenilsuccinat sintetaza (ASS) și conversia inozin 5'-monofostatului (IMP) la AMP, epuizând astfel celulele țintă de AMP și ATP (în absența adeninei). Cu toate acestea, studii clinice ale eficacității terapeutice a L-alanozinei la pacienți umani canceroși au fost nesatisfăcătoare (vezi, de exemplu, datele prezentate în Tyagi și Cooney, *Adv. Pharmacol. Chemotherapy*, 20:69-120, 1984 [rezultatele la acea dată până în prezent au oferit "puțină încurajare" în ceea ce privește eficacitatea L-alanozinei pentru tratamentul cancerelor umane]; Creagan, și colab., *Cancer*, 52:615-618; 1993 [Studii Faza II au avut rata globală a răspunsului de numai 4%]; Creagan, și colab., *Am. J. Clin. Oncol.*, 7:543-544, 1984 [Studii Faza II la pacienți cu melanom; s-a observat răspuns terapeutic slab]; VonHoff, și colab., *Invest. New Drugs*, 9:87-88. 1991 [nu s-a observat nici un răspuns obiectiv la pacienți cu cancer de sân]). În cele din urmă, toate experimentările clinice ale L-alanozinei pentru utilizare în tratamentul cancerului au fost abandonate.

Alt inhibitor cunoscut al activității ASS este hadacina. Totuși, hadacina este considerată la oameni mai toxică decât L-alanozina. În plus, activitatea altor inhibitori ai sintezei *de novo* a purinei (cum ar fi, metotrexat, 6-mercaptopurină, 6-tioguanină și d-ideazatetrahidrofolat) care blochează sinteza IMP (și prin urmare, teoretic elimină IMP ca o sursă pentru producerea AMP) a fost oprită *in vivo* prin recuperarea hipoxantinei, care este abundentă în plasmă, pentru folosire ca un substrat pentru producerea IMP. De aici, până în prezent performanța *in vivo* a agenților care blochează calea metabolică a adeninei pentru producerea intracelulară de AMP a fost deosebit de slabă înșelând orice așteptări.

Cu toate acestea, o dată cu punerea la punct a unei analize suficient de sensibile pentru identificarea delețiilor homozigote ale genei care codifică MTA_z în unele celule canceroase umane (US 08/176855), acum se pare că tumorile tratate în experimentele clinice ale L-alanozinei au produs MTA_z și au fost prin urmare capabile să furnizeze suficientă adenină pentru a menține un depozit de AMP, în ciuda inhibării producerii de AMP din IMP.

Prezenta invenție se referă la o metodă pentru inhibarea activității adenilsuccinat sintetazei (ASS) în celule deficitare în metiltioadenozinfosforilază (MTA_z) care cuprinde etapele:

a). opțional se determină dacă o populație de celule obținută de la o gazdă mamaliană este deficitară în MTA_z; și

b). se administrează o cantitate eficientă terapeutică dintr-un agent inhibitor ASS la gazdă, în care numitul contact are efectul epuizării celulelor gazdă deficitare în MTA_z de adenzin 5'-monofosfat.

Se determină deficiențe în MTA_z prin:

a). obținerea unei probe analizabile din celule care sunt suspecte ca fiind deficiente în MTA_z;

b). adăugarea sondelor oligonucleotidice care vor hibridiza specific la oricare acid nucleic care codifică pentru MTA_z prezent în probă;

c). detectarea hibridizării sondelor la oricare astfel de acid nucleic este indicatoare a prezenței MTazei activă sau inactivă catalitic într-o celulă.	50
Prezenta invenție prezintă avantajul că se identifică celulele canceroase care nu metabolizează metiladenozinfosforilaza la adenină, metoda fiind utilizată cu succes în tratamentele chemoterapeutice ale cancerului.	
În continuare, invenția va fi descrisă în detaliu, cu referire și la fig.1...7, care reprezintă:	55
- fig.1, secvență nucleotidică pentru MTAză genomică (SEQ.ID Nr.1) în care exonii sunt subliniați;	
- fig.2, grafic care ilustrează efectul <i>in vivo</i> al L-alanozinei după infuzare continuă în celule umane stabilite MTAză competente și celule deficitare MTAză din tumori xenogrefe canceroase ale celulelor pulmonare care nu sunt mici la șoareci fără păr;	60
- fig.3, grafic care ilustrează efectul <i>in vivo</i> al L-alanozinei după infuzare continuă în celule umane stabilite deficitare MTAză din tumori xenogrefe de leucemie limfoblastică acută la șoareci fără păr;	
- fig.4 și 5 (A-B), grafice care ilustrează efectul administrării în diverse substraturi MTAză exogene la linii de celule MTAză competente sau MTAză deficitare după tratament cu L-alanozină;	65
- fig.6, prezentare schematică a căilor metabolice intracelulare pentru producerea de AMP;	
- fig.7, grafic care ilustrează efectul <i>in vivo</i> al L-alanozinei după injectare zilnică în celule umane stabilite deficitare MTAză din tumori xenogrefe canceroase ale celulelor pulmonare care nu sunt mici la șoareci fără păr.	70
S-a descoperit că celulele de la care gena care codifică proteina MTAză prezintă o deleție și prin urmare nu sunt capabile să metabolizeze MTA la adenină ("celule deficitare MTAză") sunt distruse selectiv <i>in vivo</i> la contact cu doze eficiente terapeutic ale unui inhibitor al sintezei <i>de novo</i> a AMP cum ar fi L-alanozina. Astfel, în timp ce L-alanozina nu este eficientă terapeutic împotriva tuturor celulelor canceroase, ea este eficientă terapeutic împotriva celulelor deficitare MTAză.	75
Pe de altă parte invenția prezintă o metodă pentru determinarea dacă celulele canceroase particulare sunt deficitare MTAză prin furnizarea testelor pentru determinarea dacă celulelor le lipsește proteina MTAză. Testul preferat pentru folosire în această privință este unul pentru detectarea delețiilor homozigote ale genei care codifică proteina MTAză din celule.	80
Într-un alt aspect, invenția prezintă o metodă pentru tratarea cancerelor deficitare MTAză prin contactarea celulelor deficiente MTAză cu o cantitate eficientă terapeutic dintr-un inhibitor al sintezei <i>de novo</i> a purinei care inhibă activitatea ASS, de preferință L-alanozină. Agenții inhibitori ASS ai invenției se pot administra prin orice mijloace acceptabile clinic, dar sunt administrate de preferință prin infuzare continuă la concentrații sub doza maximă tolerată pentru prelungirea activității inhibitoare dorite și reducerea toxicității pentru țesuturile gazdei.	85
De asemenea, se pot utiliza truse care includ reactivi pentru utilizare în realizarea testului de deficiență MTAză al invenției precum și compoziții farmaceutice ale unui inhibitor ASS, de preferință L-alanozină și/sau metabolitul său activ, L-alanozinil AICOR.	90
Pentru a ajuta la înțelegerea invenției, în fig.6, este prezentată o hartă care ilustrează căile metabolice prin care este produs AMP. În rezumat, există trei surse principale de substraturi pentru producerea intracelulară de AMP. Prima este catabolismul metiltioadenozinei la adenină prin MTAză. Această cale este blocată în celulele deficitare MTAză.	95

RO 118210 B

A doua este conversia IMP la AMP prin activitatea ASS sau adenilsuccinat liazei (ASL). Nu există inhibitori cunoscuți ai activității ASL. Totuși, cu pierderea de activitate ASS, conversia IMP AMP este substanțial eliminată.

A treia este recuperarea hipoxantinei la AMP. Dar, deoarece conversia IMP AMP are loc distal față de recuperarea hipoxantinei, inhibarea catabolismului ASS al IMP AMP blochează calea de recuperare a hipoxantinei.

Metoda preferată pentru determinarea dacă o populație particulară de celule sunt celule deficitare MTază este prin analiză de hibridizare pentru detectarea delețiilor genei care codifică MTaza din celule. Procedurile de căutare care se bazează pe hibridizarea acidului nucleic fac posibil să se detecteze orice secvență polinucleotidică (și, prin interferență orice proteină codificată prin asemenea secvență polinucleotidică) în orice organism, cu condiția că este accesibilă o sondă corespunzătoare.

O descriere completă a tehnicilor de hibridizare adecvate pentru folosire în invenție, precum și o descriere a genei care codifică MTaza, se găsesc în **US 08/176855** a cărei descriere este încorporată aici prin această referire, împreună cu orice amendamente care pot fi făcute la aceasta. Pentru ușurința referirii, secvența polinucleotidică a genei care codifică MTază este descrisă aici la SEQ.ID.Nr.1 în Lista Secvențelor anexată, și în fig.1, unde regiunile de codificare ale genei sunt identificate prin subliniere.

Polinucleotida genomică MTază este localizată pe cromozomul 9 la regiunea p21. Interesant, un procent foarte ridicat al celulelor care au o deleție homozigotă a genei care codifică supresorul tumoral p16 au o deleție homozigotă a genei care codifică MTază. Astfel, un mijloc alternativ de detectare a delețiilor homozigote ale ultimei gene (pentru MTază este prin detectarea unei deleții homozigote a genei anterioare (pentru p16). Pentru referință suplimentară în această privință, se poate consulta **US 08/227800**, a cărei descriere este încorporată aici prin această referire.

O tulpină de *E.coli* care conține ADN-ul genomic de lungime integrală pentru MTaza de la șobolan a fost depozitată la ATCC, Rockville, MD, prin expediție poștală înainte de 29 decembrie, 1993 și s-au acordat colectiv numerele 55536, 55537, 55538, 55539 și 55540. Nu s-a făcut sau nu s-a intenționat nici o admitere că acest depozit este necesar ca să facă posibil pentru cineva să practice această invenție. Cu toate acestea, depozitul va fi menținut în formă viabilă toată perioada cât este sau poate fi cerut de legile de brevet aplicabile la această descriere.

Pentru determinarea dacă gena MTază a fost deletată în condiții homozigote din celulele de interes, se obține de la gazdă o probă de celule care se pot analiza. De exemplu, proba poate să cuprindă un fluid corporal sau celule, de exemplu, de la un țesut sau tumoră a gazdei. Asemenea probe sunt obținute folosind metode cunoscute în domeniul clinic, de exemplu, celule tumorale pot fi dobândite prin biopsie sau rezecție chirurgicală. De preferință, celulele sunt esențial lipsite de "contaminanți"; adică, celule, proteine și componente similare care s-ar putea să falsifice rezultatul analizei. De exemplu, când tumorile solide sunt sursa pentru o probă analizabilă de celule, celulele normale nemaligne și MTaza care se poate elibera din celule normale în timpul procedurii realizate pentru obținerea probei biologice vor fi considerate ca, contaminanți. Astfel de contaminanți pot fi îndepărtați prin tehnici de purificare convenționale: de exemplu, cromatografie de afinitate cu un anticorp anti-MTază.

Deoarece, invenția este orientată spre detectarea prezenței sau absenței acestei gene într-o probă de celule care sunt suspectate de a fi MTază negative, acizii nucleici din probă vor fi, de preferință, amplificați pentru a intensifica sensibilitatea metodei de detectare. Această amplificare se face, de preferință, prin utilizarea reacției polimerazice de catenă (PCR), deși folosirea unei reacții de catenă în etapa de polimerizare nu este absolut necesară.

Acidul nucleic de amplificat din probă va consta din ADN genomic sau de tip sălbatic care în mod normal va fi de așteptat să codifice MTAză dacă este prezentă în probă (vezi, SEQ.ID.Nr.1). ADN-ul care codifică MTAză (în continuare "ADN țintă") este considerat ca fiind prezent în toate celulele mamifere normale, inclusiv celule umane. Pentru utilizare drept control sau ca sursă de sonde oligonucleotidice și primeri, ADN genomic care codifică MTAză poate fi izolat conform metodelor cunoscute în domeniu cum ar fi metoda descrisă de Maniatis, *și colab.* în *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory, 1982). Aici este dat un exemplu practic care demonstrează izolarea unei clone genomice a genei MTAză umane în care o bancă a cosmidelor genei este cercetată folosind o sondă oligonucleotidică cADN MTAză (vezi, exemplul 3). Cu toate acestea, cei cu pregătire în domeniu vor recunoaște că se pot folosi și alte mijloace corespunzătoare de obținere a ADN-ului care codifică MTAză. 150

De exemplu, o bancă cADN crezută că ar conține o polinucleotidă de interes poate fi căutată prin injectare de diverse mRNA-uri derivate de la cADN-uri în oocite, lăsarea unui timp suficient pentru a avea loc expresia produselor genei cADN, și testarea pentru prezența produsului expresiei cADN-ului dorit, de exemplu, folosind un anticorp specific pentru o peptidă codificată de polinucleotida de interes sau folosind sonde pentru motivele repetate și un tablou al expresiei unui țesut caracteristic unei peptide codificate de polinucleotida de interes. Alternativ, o bancă cADN poate fi cercetată indirect pentru expresia peptidelor de interes (de exemplu, proteina MTAză) având cel puțin un epitop folosind anticorpi specifici pentru peptide. Asemenea anticorpi pot să fie policlonali sau monoclonali derivați și folosiți pentru detectarea produsului expresiei indicator al prezenței cADN-ului de interes (vezi, pentru referință suplimentară, Maniatis, *și colab.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Lab., New York, 1982). 155 160 165 170

Polinucleotide pentru utilizare drept control, sonde sau primeri în invenție pot fi sintetizate, de asemenea, folosind tehnici și echipament de sinteză al acidului nucleic care sunt bine cunoscute în domeniu. Pentru referință în această privință, vezi Ausubel, *și colab.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, Chs. 2 și (Wiley Interscience, 1989). 175

Pentru sporirea sensibilității analizelor de hibridizare ale invenției, proba de celule de analizat este supusă de preferință la condiții care favorizează amplificarea selectivă a acidului nucleic țintă. De preferință, acidul nucleic țintă va fi o porțiune polinucleotidică a genei care codifică MTAză (adică "polinucleotida țintă"). Mijlocul preferat de amplificare al polinucleotidei țintă este prin PCR. 180

PCR este o metodă *in vitro* pentru sinteza enzimatică a secvențelor ADN sau ARN specifice folosind primeri oligonucleotidici care hibridizează la secvențe specifice de acid nucleic și regiunea de flancare de interes din acidul nucleic țintă. O serie repetitivă de cicluri de denaturare a matriței, alinierea primerului și extinderea enzimatică a primerilor normalizați rezultă într-o acumulare exponențială a unui fragment specific de acid nucleic definit la capetele terminale prin capetele 5' ale primerilor. Produsele rezultate (produse PCR) sintetizate într-un ciclu acționează ca matrițe pentru următorul; ca urmare, numărul copiilor acidului nucleic țintă se dublează aproximativ în fiecare ciclu. 185

Tehnicile PCR de bază sunt descrise în brevetele **US 4683195** și **4683202** pentru Mullis, *și colab.*, ale căror descrieri sunt încorporate aici ca exemple ale tehnicilor convenționale pentru performanța PCR. Totuși, invenția nu are intenția să fie limitată la folosirea tehnicilor PCR care sunt expuse în brevetul **US 4683202** pentru Mullis *și colab.* Începând de la punerea în aplicare a tehnicii lui Mullis *și colab.* s-au dezvoltat numeroase analize bazate pe PCR care utilizează modificări ale acelei tehnici. Aceste modificări sunt bine cunoscute în domeniu, și prin urmare, nu vor fi descrise în detaliu aici. Totuși, pentru scopul ilustrării întinderii stadiului tehnicii în acest domeniu, câteva dintre aceste modificări sunt descrise în cele ce urmează. 190 195

O tehnică PCR care asigură un standard de amplificare internă folosind o matriță competitor care diferă de acidul nucleic țintă în secvență și mărime este descrisă în *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1990) 87: 2725-2729 (Gilliland, *și colab.*, autori). Altă tehnică pentru realizarea PCR "competitivă" care utilizează matrițe care diferă în secvență, dar nu în mărime, este descrisă în *Nuc. Acids. Res.*, 21:3469-3472, (1993), (Kohsaka, *și colab.*, autori). Această tehnică este o tehnică preferată în mod deosebit pentru tehnologia utilizării sale într-o analiză de enzimă legată la imunoabsorbant (ELISA) pentru analizarea acidului(lor) nucleici amplificați. O tehnică PCR necompetitivă care utilizează oligonucleotide specifice situsului pentru detectarea mutațiilor sau polimorfismelor din gene care, de asemenea, se poate aplica la metoda invenției este descrisă în *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1989) 86: 6230-6234 (Saiki, *și colab.*, autori). Fiecare dintre aceste tehnici are avantajul utilizării sondelor de hibridizare care ajută în eliminarea rezultatelor pozitive false derivate de la orice amplificare nespecifică care se poate întâlni în timpul PCR.

Date suplimentare pot fi obținute și din publicația lui Innis, *și colab.*, "Optimization of PCR's", PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Acad. Press, 1990). Această publicație prezintă tehnici pentru influențarea specificității, fidelității și randamentului produselor PCR dorite.

Sunt selectați primeri oligonucleotidici (cel puțin o pereche de primeri) care vor hibridiza specific la un sector mic de baze perechi pe fiecare latură (adică, 5' și 3') a polinucleotidei țintă MTază (adică, "secvențe de flancare"). Cei cu pregătire în domeniu vor fi imediat capabili să selecteze primeri corespunzători fără a mai supune experimentelor pe baza informației secvenței polinucleotidice menționată în Lista de Secvențe anexate aici ca SEQ.ID.Nr.1 și în fig.1.

Pentru desemnarea primerului, este important ca primerii să nu conțină baze complementare, astfel, încât ei să poată hibridiza cu ei înșiși. Pentru eliminarea amplificării oricărui material contaminant care poate fi prezent în probă, primerii sunt desemnați, de preferință, să înconjoare exoni (care, pentru gena MTază, sunt subliniați în fig.1).

Așa cum s-a remarcat mai sus, poate să nu fie necesar să se utilizeze reacția de catenă în această etapă de polimerizare în scopul amplificării adecvate a acizilor nucleici din probă. De exemplu, unde se utilizează tehnica descrisă de Kohsaka, *și colab.*, *supra* astfel încât reacția de polimerizare se realizează pe suport fază solidă și este urmată de hibridizare cu sonde polinucleotidice specifice țintă, sensibilitatea analizei va fi astfel încât o singură polimerizare a polinucleotidei țintă să poată fi tot ce este necesar.

O dată ce etapa de amplificare este completă, produsele PCR sunt analizate pentru a determina prin aceasta dacă gena pentru codificarea MTazei este prezentă în probă. De preferință, produsele PCR cu bandă dublă vor fi legate la faza solidă, astfel, încât benzile lor să poată fi separate prin denaturare, prin aceasta permițând sondelor specifice secvenței să hibridizeze la banda antisens legată a produsului PCR pentru detectarea genei substanțial, cum s-a descris în Kohsaka, *și colab.*, *supra*. Alternativ, produsele PCR vor fi îndepărtate din mediul de reacție și separate din amestecul de amplificare înaintea adăugării sondelor pentru hibridizare la produsele PCR dublu bandă. În această ultimă abordare, produsele PCR sunt separate din amestecul de amplificare conform metodelor cunoscute în domeniu, considerând metoda particulară aleasă pentru detectare; de exemplu, prin gel de excludere, electroforeză sau cromatografie de afinitate.

Detecția produsului amplificat poate fi obținută folosind sonde de hibridizare care sunt asociate stabil cu un marcaj detectabil. Un marcaj este o substanță care poate fi atașată covalent la sau ferm asociată cu o sondă de acid nucleic care va rezulta în capacitatea de a detecta sonda. De exemplu, un marcaj poate fi un radioizotop, un substrat enzimatic sau inhibitor, o enzimă, o substanță radioopacă (inclusiv metale coloidale), un

marcaj fluorescent, o moleculă chemiluminescentă, lipozomi care conțin oricare dintre marcasele de mai sus, sau un membru pereche de legare specifică. Un marcaj corespunzător nu va pierde calitatea de a fi responsabil pentru detectabilitate în timpul amplificării.

Cei cu pregătire în domeniul diagnosticării vor fi familiari cu marcaje detectabile corespunzătoare pentru utilizare în analizele de detectare *in vitro*. De exemplu, radioizotopi pentru folosire *in vitro* includ ^3H , ^{125}I , ^{131}I , ^{32}P , ^{14}C , ^{35}S . Fragmente amplificate marcate prin intermediul unui radioizotop pot fi detectate direct prin contorul gamma sau prin densitometria autoradiografiilor, prin Southern blot-ul fragmentelor amplificate combinat cu densitometria. Exemple de molecule chemiluminescente corespunzătoare sunt acridinele sau luminolul. Secvențele țintă hibridizate cu sonde derivate cu ester acridiniu sunt protejate de hidroliză prin intercalare. Exemple de substanțe fluorescente corespunzătoare sunt fluoresceina, ficobiliproteina, chelați ai pământurilor rare, dansil sau rodamină.

Exemple de substraturi sau inhibitori enzimatici adecvați sunt compuși care se vor lega specific la peroxidază de hrean, glucoz oxidază, glucoz-6-fosfat dehidrogenază, β -galactozidază, piruvat kinază sau alcalin fosfatază acetilcolinesterază. Exemple de substanță radiopacă sunt aurul coloidal sau particulele magnetice.

O pereche de legare specifică cuprinde două molecule diferite, în care una dintre molecule are o zonă pe suprafața sa sau într-o cavitare care se leagă specific la o organizare spațială sau polară particulară a altei molecule. Membrii perechii de legare specifică sunt adesea denumiți ca un ligand și receptor sau ligand și antiligand. De exemplu, dacă receptorul este un anticorp ligandul este antigenul corespondent. Alte perechi de legare specifice includ perechi hormon-receptor, perechi enzimă-substrat, perechi biotină-avidină și perechi glicoproteină-receptor. Sunt incluse fragmente și porțiuni ale perechilor de legare specifică care rețin specificitatea de legare, cum ar fi fragmente ale imunoglobulinelor, inclusiv fragmente Fab și altele. Anticorpii pot să fie monoclonali sau policlonali. Dacă un membru al unei perechi de legare specifică se folosește ca marcaj, procedura de separare preferată va implica cromatografia de afinitate.

Dacă nici un produs amplificat nu se poate detecta în analiza descrisă mai sus, aceasta este indicatoare a celulelor deficitare în MTAză prezente în probă. Deoarece celulele normale (adică, nemaligne) vor fi întotdeauna de așteptat să aibă gena care codifică MTAză prezentă în cantități detectabile (chiar pierderea unei allele), o descoperire că celulele lipsite de o genă care codifică MTAză (adică, au o deleție homozigotă a genei) arată că celulele analizate sunt lipsite, atât de MTAză catalitic activă, cât și MTAză catalitic inactivă.

Cu toate acestea, dacă se dorește, proba poate fi precercetată pentru activitate catalitică MTAză folosind metoda descrisă de Seidenfeld, *și colab.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **95**: 1861-1866 (1980); vezi, de asemenea, Exemplul I, *infra*). Analiza inventivă va fi folosită apoi pentru a determina dacă gena care codifică MTAză este prezentă în celulele din probă. De asemenea, proba poate fi testată pentru prezența proteinei active sau inactive catalitic pentru scopul găsirii și eliminării din proba de analizat a contaminanților celulari; adică, celulelor nemaligne. O imunoanaliză pentru folosire alternativă în această privință (adică, în locul analizei de hibridizare) este descrisă în Nobori, *și colab.*, *Cancer res.* **53**:1098-1101 (1991) și **US 08/177855**.

Folosind tehnicile de analiză descrise mai sus, s-au determinat următoarele tumori umane primare ca fiind deficitare în MTAză. Se va înțelege că această listă este reprezentativă, dară nu exhaustivă, a tipurilor de cancer care pot fi determinate ca fiind deficitare în MTAză folosind metodele de analiză descrise.

Leucemii limfoblastice acute (aparitie aproximativ 80%)

Glioame (aparitie aproximativ 67%)

RO 118210 B

Cancere ale celulelor pulmonare care nu sunt mici (aparitie aproximativ 18%)

Tumori uroteliale (de exemplu, cancer al vezicii urinare; incidența variază cu tipul tumorii)

Pe baza acestor date, deficiența MTază ar fi puternic suspectată la pacienții care suferă de aceste condiții. Astfel, probe de celule de la asemenea pacienți vor fi analizate de rutină pentru deficiența MTază pentru a determina dacă pacientul ar fi posibil să beneficieze de metoda terapeutică a invenției.

Probe de celule de la alți pacienți canceroși se vor analiza pentru deficiența MTază după cum este indicat clinic. Pentru referință, probe de tumori primare de la pacienți care suferă de următoarele condiții s-au dovedit a nu fi deficitare MTază (adică, cancerul este "MTază competent"):

Cancer de sân

Cancer al colonului

Cancer al capului și gâtului

Melanom

Cancer renal

Leucemii nelimfoblastice la adult

Anumite leucemii acute (la adult și juvenile).

S-au dirijat experimente clinice folosind L-alanozină pentru tratarea cancerelor MTază competente, fără nici un succes remarcabil.

La primate, aproximativ 75% din L-alanozină este excretată în urină în circa 24 h, în principal ca formele nucleozidice ale L-alanosinei de L-alanosinil-IMP și L-alanosinil-AICOR. Eliminarea din plasmă după administrare intravenoasă la oameni este bifazică, cu $t_{1/2\alpha}=14$ min și $t_{1/2\beta}=99$ minute (unde " $t_{1/2}$ " este durata de înjumătățire și timp (t) sunt aproximați).

În experimentele clinice, toxicitatea a fost limitată de doză, incluzând toxicitate renală, stomatite, esofagite și, cu frecvență mai mică, mielosupresie, durere de cap, greață și hipotensiune sau hipertensiune. Toxicitatea renală întâlnită la doze cu un bol unic care depășește 4 g/m^2 greutate corporală. În plus, doi pacienți pediatrici care au primit doze mai mari de circa 350 mg/m^2 greutate corporală per zi în doze separate au suferit de afecțiune a ficatului. Stomatitele și esofagitele s-au întâlnit după dozări multiple cu boluri. Alte reacții observate au fost specifice pacientului.

O fază II a experimentului a utilizat infuzarea continuă la o doză de circa 125 mg/m^2 greutate corporală timp de 5 zile la adulți suferinzi de leucemie acută nelimfoblastică. Limitarea toxicității dozei a fost mucozitatea.

Gazde mamifere (de exemplu, oameni) care suferă de cancer determinate a fi deficitare MTază în conformitate cu analiza deficienței MTază a invenției sunt tratate cu doze eficiente terapeutic ale unui inhibitor ASS cum ar fi L-alanozină, L-alanosinil-AICOR sau hadacină, de preferință prima dintre ele. În această privință, un "dozaj eficient terapeutic" este unul care produce un răspuns obiectiv al tumorii la pacienți care se pot evalua, unde răspunsul tumorii este o încetare sau regresie în creștere determinată față de standarde acceptate clinic (vezi, de exemplu, Eagan, și colab., *Cancer*, 44:1125-1128, 1979 [a cărei descriere este încorporată aici prin această referire] și rapoartele accesibile public ale parametrilor aplicați în principal Eagan, și colab.) în experimentele clinice sub IND#14,247 (Food and Drug Administration)). Cu referire la aceste standarde, determinarea dozelor eficiente terapeutic pentru inhibitorii ASS se poate folosi în invenție pentru epuizarea AMP intracelular se poate face cu ușurință de către cei cu pregătire obișnuită în domeniul oncologic.

În general, administrarea zilnică sau infuzarea continuă a inhibitorilor ASS la doze mai mici decât cele cunoscute ca producând toxicități va fi protocolul terapeutic preferat pentru intensificarea activității de antimetabolit a medicamentelor. Datorită sensibilității unice a celulelor deficitare MTază față de această metodă de tratament, pot fi de așteptat că doze mai mici decât cele testate în experimentările clinice ale L-alanozinei în tratamentul celulelor MTază competente, reducând astfel toxicitatea față de celulele nepliferative. 345

Celule nemaligne MTază competente pot fi protejate de asemenea, de orice efect al expunerii la inhibitori ASS prin administrare de MTA sau un substrat analog corespunzător pentru utilizare în sinteza adeninei. Compuși corespunzători pentru utilizare în această privință includ MTA, 2'-5'-dideoxiadenozină, 5'-deoxiadenozină, 2'-deoxi-5-deoxi-5'-metiltioadenozină (vezi, de exemplu, exemplul 2). Se va aprecia, totuși, că celulele MTază competente sunt capabile să producă adenină din metabolismul metiltioadenozinei pentru completarea rezervei de AMP celular și, prin urmare, nu va fi de așteptat să se epuizeze AMP la aceeași extindere ca în celulele deficitare MTază. 350 355

În continuare, se dau cinci exemple de realizare a invenției.

Exemplul 1. *Efectul in vivo al L-alanozinei asupra tumorilor xenogrefe umane MTază deficitare și MTază competente după infuzare continuă*

Pentru evaluarea efectului *in vivo* al L-alanozinei asupra tumorilor deficitare MTază umane cunoscute după infuzare continuă și compararea acelui efect la efectul medicamentului asupra tumorilor MTază competente umane cunoscute, 2×10^6 celule H292 NSCLC deficitare MTază și celule tumorale Calu-6 MTază competente (în 0,3 ml cu purtători 50% MATRIGEL™), s-au injectat în latura dreaptă și, respectiv stângă a 8 șoareci Balb/C, atimici, lipsiți de păr. Inițial, MATRIGEL™ formează o matrice solidă *in vivo* care s-a măsurat la fiecare șoarece în prima zi a infuzării pentru un control al mărimii tumorii (care este resorbită într-o perioadă de 14 zile). Pentru comparare suplimentară, 10^7 celule CEM T-ALL (leucemie limfoblastică acută deficitară MTază) în purtător 50% MATRIGEL™ s-au injectat în flancul drept al altor 8 șoareci lipsiți de păr. Cele mai multe celule s-au obținut din linii de celule accesibile comercial de la ATCC comercializate sub numele de acces ATCC CRL-1848 și, respectiv, HTB-56. 360 365 370

În ziua următoare, 4 șoareci cu NSCLC bilaterală și 4 cu inocule T-ALL s-au implantat subcutanat cu pompe de infuzie osmotică ALZET™ 1007D, în spate, la o distanță de siturile inoculării celulelor tumorale. Pompele au fost umplute cu L-alanozină la o concentrație calculată să elibereze 60 mg/kg zilnic prin infuzare continuă. Deoarece nici o toxicitate nu a fost evidentă după 7 zile la dozajul 60 mg/kg, pompele s-au înlocuit cu pompe conținând L-alanozină pentru eliberarea a 90 mg/kg per zi pentru 7 zile suplimentare. 375

Așa cum s-a arătat în fig.1 și 3, L-alanozina administrată a produs reducerea NSCLC stabilită deficitară MTază ("H292 L-alan Tx"; fig.2) și inocule xenogrefe T-ALL ("șoareci tratați"; fig.3) la gazde murine imunodeficiente și a împiedicat creșterea NSCLC deficitară MTază recentă, sau inoculului xenogrefă T-ALL la gazde murine imunodeficiente așa cum s-a comparat la celule NSCLC MTază competente tratate și celule deficitare MTază netratate. În special, tumorile MTază competente stabilite au crescut rapid în ciuda L-alanozinei, așa cum au făcut-o NSCLC deficitare MTAP sau xenogrefele T-ALL netratate. 380

Exemplul 2. *Protecția celulelor sănătoase MTază competente cu substraturi MTază* 385

Incapacitatea selectivă a celulelor NSCLC deficitare MTază de a prolifera în prezența L-alanozinei (la 40 μ M) în ciuda adăugării la fiecare cultură a substratului MTază metiltioadenozină (MTA) s-a confirmat într-o comparație a două linii de celule, Calu-6 MTază competentă și H292 deficitară MTază (fig.4). Culturile de control care conțin adenină (tAde) proliferază în ciuda L-alanozinei, confirmând că toxicitatea selectivă se datorează unui eșec al celulelor deficitare MTază de a metaboliza MTA la adenină. 390

Pentru compararea suplimentară, adăugarea de MTA sau a analogului de substrat MTA 5'-deoxiadenozină a rezultat în creșterea restaurării numai pentru celule A427 MTază competente și celule MOLT-4, în timp ce celulele A549 și CEM deficitare MTază au rămas cu creșterea inhibată (fig.5A și B). Deoarece MTA este un inhibitor feedback al spermin sintetazei, unele linii celulare cum ar fi MOLT-4 sunt inhibate de concentrații ridicate.

Aceasta are ca urmare o curbă de restaurare a creșterii bifazică cu concentrația în creștere a MTA (fig.5A).

Exemplul 3. Clonarea și caracterizarea parțială a clonei genomice MTază

O clonă genomică a MTazei umane s-a izolat după cum urmează. O bancă a cosmidului genei construită de la ADN placentar uman (Clontech) s-a cercetat folosind o sondă genă cADN MTază, fragmentul NotI/EcoRI de la subclona MTAP-7. Celule *E.coli* transformate din bancă sunt etalate pe plăci LB conținând ampicilină (50 mg/l) cu o densitate de colonie a plăcii de $1-2 \times 10^4 / 135 \times 15$ mm.

S-au realizat următoarele proceduri. De la o jumătate de milion colonii, o singură colonie pozitivă desemnată ca MTAP-10 s-a izolat și parțial s-a caracterizat prin analiză PCR și prin secvențiere directă. Doi primeri, o oligonucleotidă sens localizată 120 bp în amonte codonului stop și o oligonucleotidă sens localizată 120 bp în amonte codonului stop au fost sintetizați și folosiți pentru analiza PCR. S-a realizat PCR 25 cicluri, fiecare ciclu constând din denaturare (92°C, 1 minut), aliniere (55°C, 2 min) și extensie (72°C, 5 min). Produsele PCR s-au separat pe un gel de agaroză 0,8%.

Localizarea exonilor identificați până în prezent în gena MTază folosind tehnica descrisă mai sus este ilustrată în fig.1 prin subliniere.

Exemplul 4. Aplicarea secvenței specifice oligonucleotidelor MTază la linii celulare maligne pentru detectarea prezenței sau absenței de aici a MTazei

Pentru testarea utilității sondelor oligonucleotidice dezvoltate de la clona genomică MTază identificată cum s-a descris în exemplul 4 (SEQ ID NR:1 s-a aplicat PCR la câteva linii de celule canceroase pulmonare umane care au fost cunoscute conținând celule competente MTază (Calu-6; Desemnare ATCC Nr.HTB-56) și celule deficitare MTază (A549; Desemnare ATCC Nr. CCL-185). S-a izolat ADN genomic cum s-a descris în exemplul 2 și 1 μ g din acesta s-a folosit pentru PCR.

Amplificarea s-a realizat 40 cicluri cum s-a descris mai sus, cu fiecare ciclu constând din denaturare (92°C, 1 min), de călire (55°C, 1 min) și extensie (72°C, $\frac{1}{2}$ min). Produsele PCR s-au analizat pe un gel de agaroză 1,5%. Nu s-a detectat MTază în liniile de celule care au fost cunoscute ca fiind deficitare MTază, în timp ce MTază s-a detectat în liniile de celule MTază competente.

Exemplul 5. Inhibarea L-alanozină a tumorilor deficitare MTAP după injectare zilnică în șoareci fără păr cu tumori xenogrefe stabilite

S-au injectat subcutanat 10^7 celule A549 sau celule A427 NSCLC în șoareci Balb/c, atimici, lipsiți de păr în vârstă de 6 săptămâni. Când tumorile au atins un diametru de aproximativ 0,4 cm, s-a început tratamentul cu L-alanozină sau soluție salină prin injectare intraperitoneală la fiecare 12 h.

Șoarecii au primit 15 mg/kg per injecție timp de 7 zile, apoi 22,5 mg/kg timp de 5 zile. Mărimea tumorii s-a măsurat ca produsul diametrelor perpendiculare. Rezultatele pentru șoareci tratați ($n = 6$ [număr probă] pentru fiecare tip de celulă) sunt prezentate în fig.7.

Nu a fost evidentă toxicitate la orice nivel de dozare testat (șoarecii au avut greutate stabile în timpul testării). L-alanozina administrată de 2 ori zilnic ca o injecție bol a produs o descreștere în mărimea tumorilor deficitare MTAP bine stabilite, dar nu a avut nici un efect asupra creșterii celulelor MTAP pozitive.

SECVENȚA ID NR 1 este clona genomică pentru metiltioadenozin fosforilază (MTAZĂ).

LISTA DE SECVENȚE

445

(1) INFORMAȚIE GENERALĂ:

(i) SOLICITANȚI: THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA

(ii) TITLUL INVENȚIEI: METODĂ PENTRU INHIBAREA ACTIVITĂȚII ADENILOSUCCINAT SINTETAZEI ÎN CELULE MALIGNNE DEFICITARE METILTIOADENOZIN FOSFORILAZĂ

450

(iii) NUMĂR DE SECVENȚE: 1

(iv) ADRESA PENTRU CORESPONDENȚĂ:

(A) ADRESANT: Robbins, Berliner & Carson

455

(B) STRADA: 201 N. Figueroa Street, 5th Floor

(C) ORAȘ: Los Angeles

(D) STAT: California

(E) ȚARA: SUA

(F) zip: 90012-2628

460

(v) FORMA CITIBILĂ PE COMPUTER:

(A) TIP MEDIU: Floppy disk

(B) COMPUTER: compatibil IBM PC

(C) SISTEM DE OPERARE: PC-DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE: Patent In Release #1,0, Version #1,25

465

(vi) DATE CURENTE ALE CERERII:

(A) NUMĂR CERERE:

(B) DATA DEPUNERII:

(C) CLASIFICARE:

(viii) INFORMAȚIE MANDATAR/AGENT:

470

(A) NUME: Berliner, Robert

(B) NUMĂR DE ÎNREGISTRARE: 20121

(C) NUMĂR DE REFERINȚĂ/DOSAR: 5555-423

(ix) INFORMAȚIE TELECOMUNICAȚIE:

(A) TELEFON: (213) 977-1001

475

(B) TELEFAX: (213) 977-1003

(2) INFORMAȚIE PENTRU SEQ ID NR:1:

(i) CARACTERISTICI DE SECVENȚĂ:

(A) LUNGIME: 2763 baze perechi

(B) TIP: acid nucleic

480

(C) ÎMPLETIRE: simplă

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) TIP MOLECULĂ: ADN (genomic)

(vii) SURSĂ IMEDIATĂ:

(B) CLONĂ: metiladenozin fosfatază

485

(ix) TRĂSĂTURĂ:

(A) nume/CODIFICARE: CDS

(B) LOCALIZARE: 1...2763

RO 118210 B

(xi) DESCRIEREA SECVENȚEI: SEQ ID NR:1:

490	TTTATACAGA	GCATGACAGT	GGGGTCCTCA	CTAGGGTCTG	TCTGCCACTC	TACATATTTG	60
	AAACAGGAGT	GGCTTCTCAG	AATCCAGTGA	ACCTAAATTT	TAGTTTTAGT	TGCTCACTGG	120
	ACTGGGTCT	AGGAGACCCC	CTGTGTTAGT	CTGTGGTCAT	TGCTAGSAGA	ATCACTTAAT	180
	TTTTTCTAGA	CTCTAGGAGA	AAACAGTTGG	TGGTGTACTC	ATCACGGGTT	AACAATTTCT	240
495	TCTCTCCTTC	CATAGGCATG	GAAGGCAGCA	CACCATCATG	CCTTCAAAGG	TCAACTACCA	300
	GGCGAACATC	TGGGCTTTGA	AGGAAGAGGG	CTCTACACAT	GTCATAGTGA	CCACAGCTTG	360
	TGGCTCCTTG	AGGGAGGAGA	TTVAGCCCGG	CGATATTGTC	ATTATTGATC	AGTTCATTGA	420
	CANNNNNNNN	NNNNNNNNNN	GAGGTCGACG	GTATCGATAA	GCTTTGTAAA	CAATTGTCTT	480
	TAGCTTATCC	AGAGGAATTG	AGTCTGGAGT	AAAGACCCAA	ATATTGACCT	AGATAAAGTT	540
	GACTCACCAG	CCCTCGGAGG	ATGGAAAGAT	GGCCTTAAAA	TAAACAAAC	AAAAACCTTT	600
500	TTTGCTTTAT	TTTGTAGGAC	CACTATGAGA	CCTCAGTCCT	TCTATGATGG	AAGTCATTCT	660
	TGTGCCAGAG	GAGTGTGCCA	TATTCCAATG	GCTGAGCCGT	TTTGCCCCAA	AACGAGAGAG	720
	GTGTGTAGTC	TTTCTGGAAG	GTGTACCAGA	ATAAATCATG	TGGGCTTGGG	GTGGCATCTG	780
	GCATTTGGTT	AATTGGCAGA	CGGAGTGGCC	CCATACCCCTC	ACTCAAGTTT	GCTTTGTATT	840
	ATGCAAGTTT	ATGGAGAGTT	ATTTCTGTG	GCTAATAATT	TNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	900
505	AAGTGAAGCC	TTAAGTTGTG	CATGTGCTAG	TATGTTTTGA	ACTTTCTGGT	TTTTCTTTTC	960
	TAGGTTCTTA	TAGAGACTGC	TAAGAAGCTA	GGACTCCGGT	GCCACTCAAA	GGGGACAATG	1020
	GTCACAATCG	AGGGACCTCG	TTTTAGCTCC	CGGGCAGAAA	GCTTCATGTT	CCGCACCTGG	1080
	GGGGCGGATG	TTATCAACAT	GACCACAGTT	CCAGAGGTGG	TTCTTGCTAA	GGAGGCTGGA	1140
510	ATTTGTTACG	CAAGTATCGC	CATGGGCACA	GATTATGACT	GCTGGAAGGA	GCACGAGGAA	1200
	GCAGTAGGTG	GAATTCTTTT	CTAAGCACAT	ATAGCATGGG	TTTCTGGGTG	CCAATAGGGT	1260
	GTCTTAAGTG	TTTGTCTCTA	TTACGTTAGT	TTCAGAAAGT	GCCTTTCTAC	AAGGTTTTGA	1320
	AGTTGTAAAT	ATTTTCTGTA	GTTCCATTGG	AAGGTAAGAA	CAAAGATCAA	AAGAAAGAAA	1380
	GAGACACTTT	TACCAAGGA	TCAGTAGTGA	AAATAGTACA	TTGTAGGCAT	GTAGATGTGT	1440
515	TGAGAATCAT	ACTAAGACTT	GGGCCTTANN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNTACCCCTAC	1500
	ATTGAGGATT	CGGTTTCAGC	AGATAAATTT	GAGGGACACA	AACATTTAGG	CTGTAGCAAG	1560
	GCTGGAGCTC	AGAAAAATGT	TTTATGACAA	GCAGTGGAAT	TTTAAGTTCT	AGTAACCTCC	1620
	AGTGCTATTG	TTTCTCTAGG	TTTCGGTGGA	CCGGGTCTTA	AAGACCCTGA	AAGAAAACGC	1680
	TAATAAAGCC	AAAAGCTTAC	TGCTCACTAC	CATACCTCAG	ATAGGGTCCA	CAGAATGGTC	1740
520	AGAAACCCTC	CATAACCTGA	AGGTAAGTGC	AGCCATGGAC	AATCAGGCAT	GTCTGTAGAC	1800
	TCTCTATTGT	CTTCTTTTCT	TACTTGCAAT	TCACCTTTGG	TCCTCATGTA	TTTTTTGCCA	1860
	GCCTAGATGT	TTTCAACAAG	TTTTTTGTGAC	ATCTACTACT	ACCATACCAA	CCACTTGTGA	1920
	AACTGAGTAG	TCTTATTTTC	TTGGCTGGTA	GTGCAGANNN	NNNNNNNNNN	NNAATAAACA	1980
	ATAATCCAGG	ATGGGCTGGT	ATGGCAATAA	GTGATTATCA	GAACAATGCT	CTGAGATAAG	2040
525	CATTATTAAC	CTCACTTTAC	AGGAAAGGGA	GGTGAGGAAC	CAAGAGTTTA	GAGTACCCGA	2100
	AGTTCCACAT	CTGGTTAGTG	AACTTGAAAA	TTTTCTGTAG	AATTTATTTA	AAGTGTATGT	2160
	TTCTGCGTC	CTCACTTTGA	TCTAGAAAAT	CAAAATCTGT	TTTTTTTTTT	AACAAACATC	2220
	TCAGTAATTA	CGCCAACATG	TGAATATCAC	TGCCTCCTTT	CTTCCTTTCA	GAATATGGCC	2280
	CAGTTTTCTG	TTTTATTACC	AAGACATTAA	CGTAGCATGG	CTGCCCAGGA	GAAAAGAAGA	2340
	CATTCTAATT	CCAGTCATTT	TGGGAATTCC	TGCTTAACCT	GAAAAAATA	TGGGAAAGAC	2400
530	ATGCAGCTTT	CATGCCCTTG	CCTATCAAAG	AGTATGTTGT	AAGAAAGACA	AGACATTGTG	2460
	TGTATAGAGA	CTCCTCAATG	ATTTAGACAA	CTTCAAAATA	CAGAAGAAAA	GCAAATGACT	2520
	AGTAACATGT	GGGAAAAAAT	ATTACATTTT	AAGGGGGAAA	AAAAACCCCA	CCATTCTCTT	2580
	CTCCCCCTAT	TAAATTTGCA	ACAATAAAGG	GTGGAGGGTA	ATCTCTACTT	TCCTATACTG	2640
	CCAAAGAATG	TGAGGAAGAA	ATGGGACTCT	TTGGTTATTT	ATTGATGCGA	CTGTAAATTG	2700
535	GTACAGTATT	TCTGGAGGGC	AATTTGGTAA	AATGCATCAA	AAGACTTAAA	AATACGGACG	2760
	TAC						2763

Revendicări

1. Metodă pentru inhibarea activității adenilosuccinat sintetazei (ASS) în celule deficitare în metiltioadenozinfosforilază (MTAză), **caracterizată prin aceea că**, cuprinde etapele:
 - (a). opțional, se determină dacă o populație de celule obținută de la o gazdă mamaliană este deficitară în MTAză; și
 - (b). se administrează o cantitate eficientă terapeutic dintr-un agent inhibitor ASS la gazdă, în care numitul contact are efectul epuizării celulelor gazdă deficitare în MTAză de adenozin 5'-monofosfat. 540
2. Metodă conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că**, determinarea deficienței în MTAză este realizată prin:
 - (a). obținerea unei probe analizabile din celule care sunt suspecte ca fiind deficiente în MTAză; 545
 - (b). adăugarea sondelor oligonucleotidice care vor hibridiza specific la oricare acid nucleic care codifică pentru MTAză prezent în probă,
 - (c). detectarea hibridizării sondelor la oricare astfel de acid nucleic prezent în probă, în care prezența numitului acid nucleic este indicatoare a prezenței MTAzei activă sau inactivă catalitic într-o celulă. 550
3. Metodă, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că**, agentul inhibitor ASS este L-alanozină. 555
4. Metodă, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că**, gazda este un om.
5. Metodă, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că**, celulele gazdă deficitare în MTAză sunt celule tumorale primare selectate din grupul care constă din celule canceroase pulmonare, care nu sunt celule mici, celule de leucemie acută limfoblastică, celule gliomale și celule tumorale uroteliale. 560
6. Metodă, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că**, agentul inhibitor ASS se administrează la gazdă zilnic sau continuu. 565
7. Metodă, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că**, se administrează un substrat pentru producerea intracelulară de AMP la gazdă după tratamentul gazdei conform punctului (b) al revendicării 1.

Președintele comisiei de examinare: **biochim. Crețu Adina**

Examinator: **biol. Țenea Gabriela**

RO 118210 B

(51) Int.Cl.⁷ C 12 Q 1/02;
C 12 Q 1/00

1	TTTATACAGA	GCATGACAGT	GGGGTCCTCA	CTAGGGTCTG	TCTGCCACTC
51	TACATATTTG	AAACAGGAGT	GGCTTCTCAG	AATCCAGTGA	ACCTAAATTT
101	TAGTTTTAGT	TGCTCACTGG	ACTGGGTTCT	AGGAGACCCC	CTGTGTTAGT
151	CTGTGGTCAT	TGCTAGSAGA	ATCACTTAAT	TTTTTCTAGA	CTCTAGGAGA
201	AAACAGTTGG	TGGTGTACTC	ATCACGGGTT	AACAATTTCT	TCTCTCCTTC
251	CATAGGCATG	GAAGGCAGCA	CACCATCATG	CCTTCAAAGG	TCAACTACCA
301	<u>GGCGAACATC</u>	<u>TGGGCTTTGA</u>	<u>AGGAAGAGGG</u>	<u>CTGTACACAT</u>	<u>GTCATAGTGA</u>
351	<u>CCACAGCTTG</u>	<u>TGGCTCCTTG</u>	<u>AGGGAGGAGA</u>	<u>TTCAGCCCCG</u>	<u>CGATATTGTC</u>
401	<u>ATTATTGATC</u>	<u>AGTTCATTGA</u>	<u>CANNNNNNNN</u>	<u>NNNNNNNNNN</u>	<u>GAGGTCGACG</u>
451	GTATCGATAA	GCTTTGTAAA	CAATTGTCTT	TAGCTTATCC	AGAGGAATTG
501	AGTCTGGAGT	AAAGACCCAA	ATATTGACCT	AGATAAAGTT	GACTCACCAG
551	CCCTCGGAGG	ATGGAAGAT	GGCCTTAAAA	TAAAACAAAC	AAAAACCTTT
601	TTTGCTTTAT	TTTGTAGGAC	CACTATGAGA	CCTCAGTCCT	TCTATGATGG
651	<u>AAGTCATTCT</u>	<u>TGTGCCAGAG</u>	<u>GAGGTGCGCA</u>	<u>TATTCCAATG</u>	<u>GCTGAGCCGT</u>
701	<u>TTTGCCCCAA</u>	<u>AACGAGAGAG</u>	<u>GTGTGTAGTC</u>	<u>TTTCTGGAAG</u>	<u>GTGTACCAGA</u>
751	ATAAATCATG	TGGGCTTGGG	GTGGCATCTG	GCATTTGGTT	AATTGGCAGA
801	CGGAGTGGCC	CCATACCTC	ACTCAAGTTT	GCTTTGTATT	ATGCAAGTTT
851	ATGGAGAGTT	ATTTCTGT	GCTAATAATT	TNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN
901	AAGTGCAGCC	TTAAGTTGTG	CATGTGCTAG	TATGTTTGA	AGTTTCTGGT
951	TTTTCTTTTC	TAGGTTCTTA	TAGAGACTGC	TAAGAAGCTA	GGACTCCGGT
1001	<u>GCCACTCAA</u>	<u>GGGGACAATG</u>	<u>GTCACAATCG</u>	<u>AGGGACCTCG</u>	<u>TTTLAGCTCC</u>
1051	<u>CGGGCAGAAA</u>	<u>GCTTCATGTT</u>	<u>CCGCACCTGG</u>	<u>GGGGCGGATG</u>	<u>TTATCAACAT</u>
1101	<u>GACCACAGTT</u>	<u>CCAGAGGTGG</u>	<u>TTCTTGCTAA</u>	<u>GGAGGCTGGA</u>	<u>ATTTGTTACG</u>
1151	<u>CAAGTATCGC</u>	<u>CATGGGCACA</u>	<u>GATTATGACT</u>	<u>GCTGGAAGGA</u>	<u>GCACGAGGAA</u>
1201	<u>GCAGTAGGTG</u>	<u>GAATTCTTTT</u>	<u>CTAAGCACAT</u>	<u>ATAGCATGGG</u>	<u>TTTCTGGGTG</u>
1251	CCAATAGGGT	GTCTTAACTG	TTTGTTTCTA	TTACGTTAGT	TTCAGAAAGT
1301	GCCTTTCTAC	AAGGTTTTGA	AGTTGTTAAT	ATTTTCTGTA	GTTCCATTGG
1351	AAGGTAAGAA	CAAAGATCAA	AAGAAAGAAA	GAGACACTTT	TACCCAAGGA
1401	TCAGTAGTGA	AAATAGTACA	TTGTAGGCAT	GTAGATGTGT	TGAGAATCAT

Fig. 1A

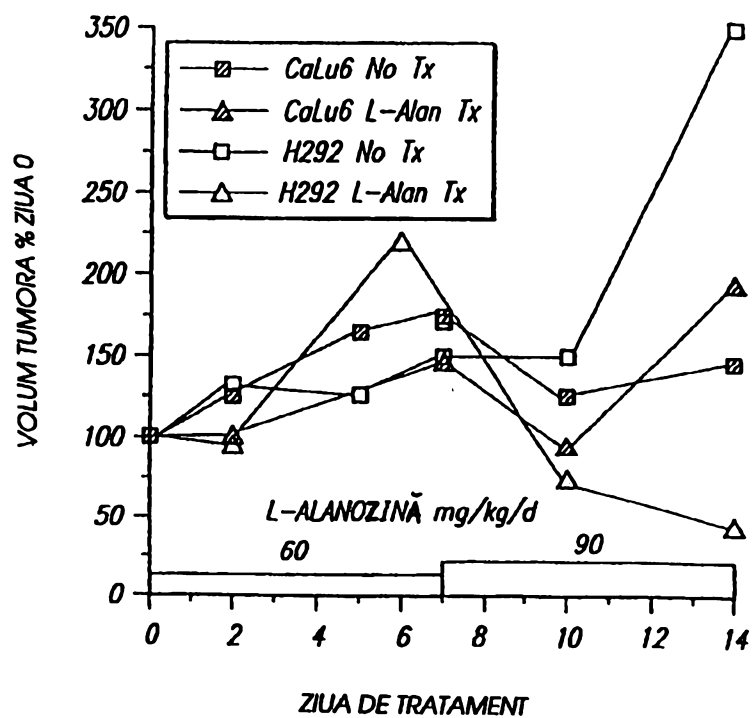


Fig. 2

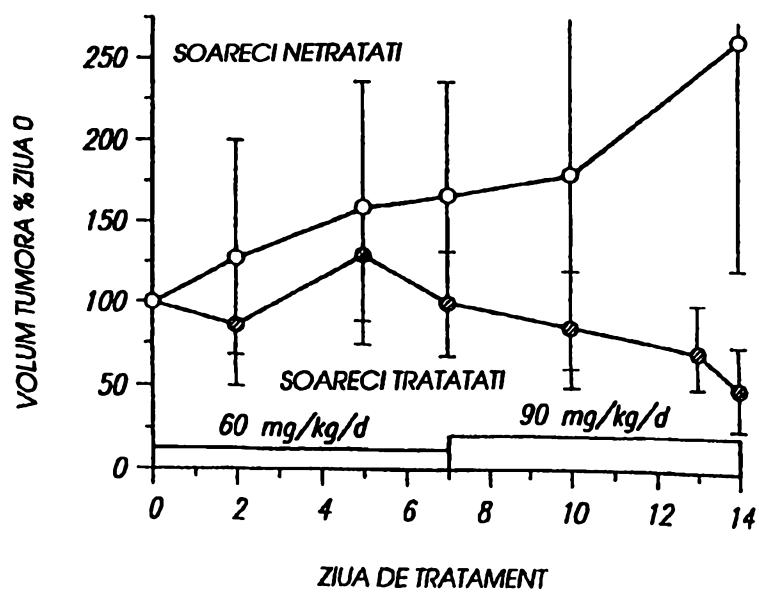


Fig. 3

RO 118210 B

(51) Int.Cl.⁷ C 12 Q 1/02;
C 12 Q 1/00

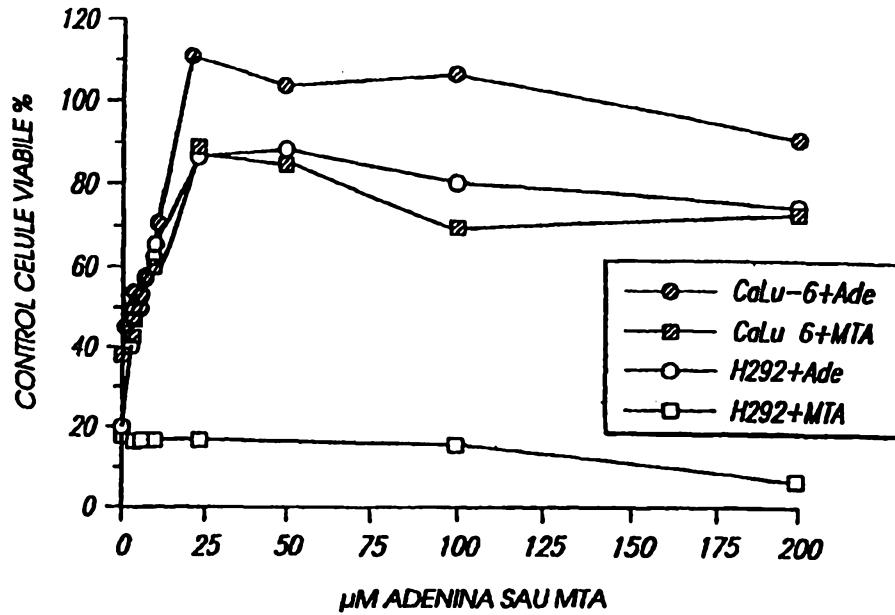


Fig. 4

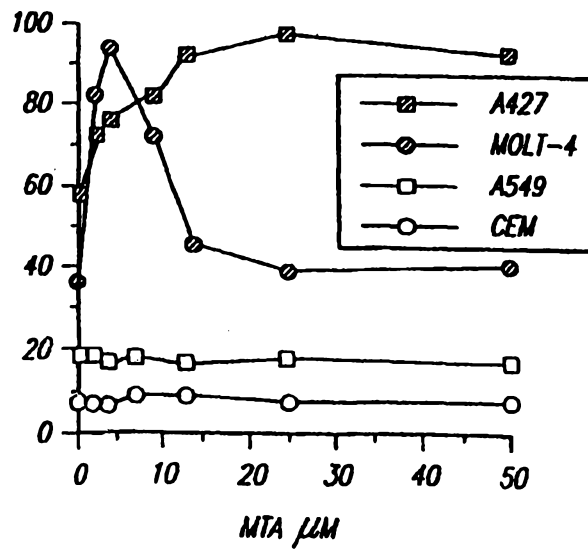


Fig. 5A

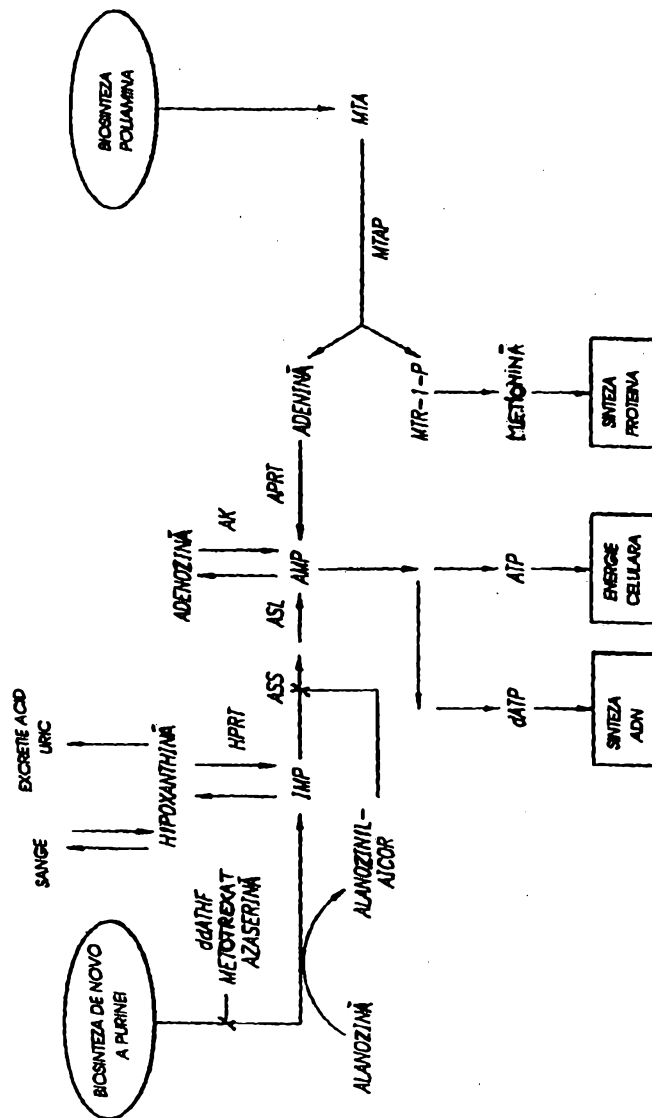


Fig. 6

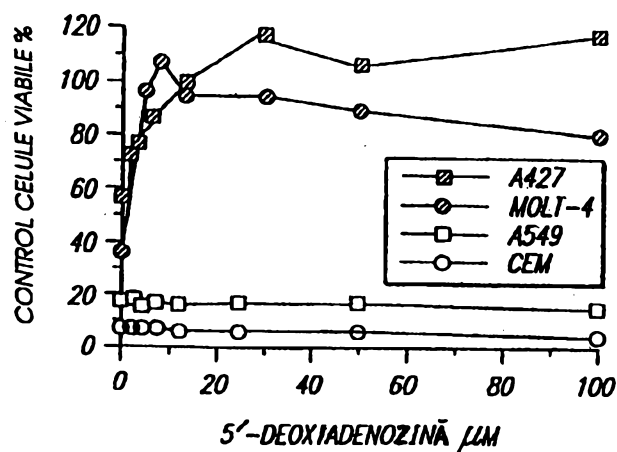


Fig. 5B

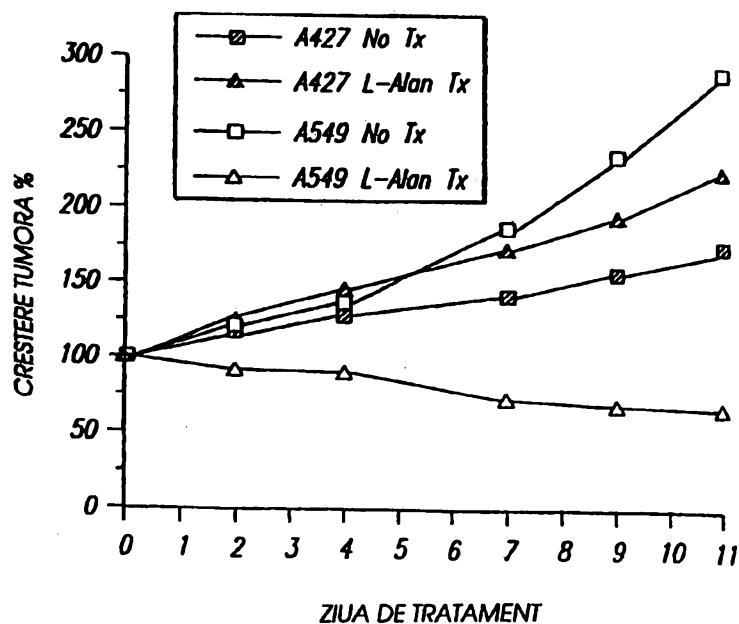


Fig. 7