



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

(21) **PI0806321-4 A2**

(22) Data de Depósito: 08/01/2008
(43) Data da Publicação: 06/09/2011
(RPI 2122)



(51) *Int.Cl.:*
C12Q 1/26

(54) Título: MÉTODOS PARA IDENTIFICAÇÃO DA ESTABILIDADE DE METILENOAMINAS ORGÂNICAS NA PRESENÇA DE AMINA OXIDASE SENSÍVEL À SEMICARBAZIDA E PARA DETERMINAÇÃO DO PERFIL DA MESMA

(30) Prioridade Unionista: 10/01/2007 US 60/884,263

(73) Titular(es): Sanofi-Aventis

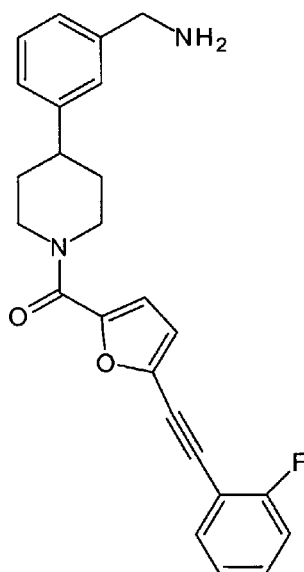
(72) Inventor(es): Adedayo Adedoyin, Guyan Liang, Heng-Keang Lim, Jennifer Cairns, Julie Ann Bick, Michael E. Angelastro, Yongqing Huang

(74) Procurador(es): Dannemann, Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT US2008050456 de 08/01/2008

(87) Publicação Internacional: WO 2008/086325de 17/07/2008

(57) Resumo: MÉTODOS PARA IDENTIFICAÇÃO DA ESTABILIDADE DE METILENOAMINAS ORGÂNICAS NA PRESENÇA DE AMINAOXIDASE SENSÍVEL À SEMICARBAZIDA E PARA DETERMINAÇÃO DO PERFIL DA MESMA. A presente invenção refere-se a métodos para determinar a estabilidade de metilenoamina, compostos similares à metilenoamina ou compostos contendo uma porção de metilenoamina na presença de amina oxidase sensível à semicarbazida (SSAO) ou uma amostra biológica contendo atividade de SSAO. Os métodos descritos podem ser configurados em um formato de ensaio para aplicações de classificação de alta produção.





PI0806321-4

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DA ESTABILIDADE DE METILENOAMINAS ORGÂNICAS NA PRESENÇA DE AMINA OXIDASE SENSÍVEL À SEMI-CARBAZIDA**".

5 A presente invenção refere-se a métodos para determinação da estabilidade de metilenoamina, compostos similares à metilenoamina, ou compostos contendo uma porção de metilenoamina na presença de amina oxidase sensível à semicarbazida (SSAO), ou uma amostra biológica con-
tendo atividade de SSAO. Os métodos descritos podem ser configurados em
10 um formato de ensaio para aplicações de classificação de alta produção.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Amina oxidases sensíveis à semicarbazida (SSAO) são amplamente distribuídas nos tecidos, particularmente vasos sanguíneos, sugerindo um papel para esta enzima para inativar circulação de metilenoaminas (L-
15 yles, Prog. Brain Res., 106:293-303, 1995). Muitos investigadores têm focalizado seus esforços na descoberta de um ligante endógeno para SSAO e na procura de inibidores desta enzima (Precious et al., Biochem. Pharmacol., 37:707-713, 1988; Crosbie and Callingham, J. Neural Transm. Suppl., 41:427-432, 1994; Elliot et al., Biochem. Pharmacol. 38:1507-1515, 1989;
20 Boomsma et al., Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol., 126:69-78, 2000; Yraola et al., J. Med. Chem. 49:6197-6208; WO 02/066669). Outros têm pesquisado papéis fisiológicos alternativos de SSAO. Por exemplo, SSAO, também denominada proteína de adesão vascular -1 (VAP-1), tem sido mostrada ser regulada superiormente sob condições inflamatórias e
25 para mediar a ligação de linfócitos (WO 98/53049). A presente invenção utiliza a atividade de enzima de SSAO para medir a estabilidade metabólica de agente de testes em células e amostra biológicas.

A estabilidade metabólica de agentes de teste tem se tornado um fator crítico no desenvolvimento de fármaco; desse modo, a presente
30 invenção soluciona o problema de identificação potencial de agentes de teste que são submetidos a metabolismo por SSAO. Os avanços na química, biologia molecular e tecnologia de alta produção têm proporcionado progra-

mas de descoberta de fármacos com a capacidade de classificar um número enorme de compostos contra um grande número de alvos para identificar compostos de condutor. Estes condutores em seguida suportam seleção mais criteriosa para identificar aqueles compostos com ótimas propriedades "similares a fármaco" (isto é, estabilidade físico-química, solubilidade, segurança, eficácia, disposição in vivo adequadas). Esforços significantes são dirigidos à identificação e eliminação de compostos (ou classes de composto) que são mais provavelmente para ter propriedades "similares a fármaco" em estágios anteriores de descoberta. As três razões principais de um fármaco falhar durante ensaios clínicos são falta de eficácia, efeitos adversos inaceitáveis, e propriedades de ADME desfavoráveis (absorção, distribuição, metabolismo, excreção). Portanto, o sucesso final de um composto não é somente definido por sua atividade e potência biológica, mas também por suas ADME/propriedades de toxicidade. Como um resultado, programas de otimização de condutor têm incorporado classificações para selecionar fármacos com ADME/propriedades de toxicidade desejáveis para intensificar a probabilidade que novos compostos de condutor terão sucesso na clínica. A transformação metabólica de moléculas de fármaco representa um processo-chave pelo qual fármacos são removidos do corpo. Dada a distribuição ampla de SSAO em muitos compartimentos corpóreos, acredita-se que SSAO pode ser uma enzima importante que contribui para uma deficiência metabólica potencial dos fármacos. Desse modo, a presente invenção usa métodos de determinação da estabilidade metabólica de agentes de teste expostos a SSAO. Métodos direcionados para determinação do metabolismo de um fármaco, ou outro agente de teste, por enzimas envolvidas em biotransformação, em particular SSAO, têm implicações importantes para desenvolvimento de fármaco.

Em estudos in vitro, o composto A (Patente dos Estados Unidos 6.977.263 B) foi incubado com plasma de várias espécies incluindo ser humano. O composto A foi observado ser mais estável em plasma humano em comparação a ovelha, porquinho-da-índia, rato, e camundongo até uma hora. Adicionalmente, nenhum metabolismo significativo ou degradação foi ob-

servado para o composto em plasma humano até 4 horas com ou sem semicarbazida. Contudo, dados farmacocinéticos a partir do estudo "primeiro no homem" mostraram que o mesmo composto foi rapidamente metabolizado, e a uma extensão maior do que aquela demonstrada in vitro usando-se plasma de humano e de outras espécies. Estudos subsequentes confirmaram que SSAO ligada à membrana foi principalmente responsável pelo metabolismo do composto no homem. Estes dados indicam que SSAO solúvel encontrada no plasma humano não possui o mesmo nível de atividade de enzima e/ou especificidade de substrato como a SSAO ligada à membrana sob condições fisiológicas. Portanto, conforme ilustrado pelo composto A, a medição da estabilidade de plasma humano não é predita de estabilidade de SSAO no homem e, desse modo, é de utilidade limitada na seleção de agentes farmacêuticos como candidatos clínicos.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

15 Figura 1 mostra a sequência de aminoácido de SSAO humana (Acesso no Banco de Gene No. Q16853; SEQ ID NO: 1).

 Figura 2 mostra a sequência de nucleotídeo de SSAO humana (Acesso no Banco de Gene No. NM_00374; SEQ ID NO: 2).

 Figura 3 mostra a estrutura química do composto A.

20 DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

 Todas as publicações aqui citadas são, desse modo, incorporadas por referência. A menos que de outro modo definido, todos os termos técnicos e científicos aqui usados têm o mesmo significado conforme comumente compreendido a um técnico no assunto ao qual esta invenção pertence.

25 A terminologia usada neste relatório descritivo e nas reivindicações em anexo é para a proposta de concretizações particulares somente e o uso no relatório descritivo não é limitado para estar limitando a invenção. As formas singulares de uma palavra são pretendidas para incluírem as formas plurais, a menos que o contexto indique claramente de outro modo. Por exemplo, as formas singulares de "um", "uma" e "o" são pretendidas para incluírem as formas plurais também. Adicionalmente, referência a um agente

30

pode incluir uma mistura de dois ou mais agentes. Desse modo, o termo "um agente" inclui uma pluralidade de agentes, incluindo misturas e/ou enantiômeros destes. Deve também ser notado que o termo "ou" é geralmente empregado em seu sentido incluindo "e/ou", a menos que o conteúdo mencione claramente de outro modo. Será adicionalmente compreendido que os termos "compreende" e/ou "compreendendo," quando usados neste relatório descritivo, especificam a presença de características, etapas, elementos, e/ou componentes citados, mas não impedem a presença ou adição de um ou mais outras características, etapas, elementos, componentes, e/ou grupos destes.

Além disso, de acordo com a presente invenção, pode ser empregada biologia molecular convencional, microbiologia, DNA recombinante e técnicas analíticas dentro da técnica. Tais técnicas são explanadas totalmente na literatura. Ver, *por exemplo*, Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition* (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (aqui "Sambrook et al., 1989"); *DNA Cloning: A Practical Approach, Volumes I e II* (D. N. Glover ed. 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait ed. 1984); *Nucleic Acid Hybridization* [B. D. Hames & S. J. Higgins eds. (1985)]; *Transcription and Translation* [B. D. Hames & S. J. Higgins, eds. (1984)]; *Animal Cell Culture* [R. I. Freshney, ed. (1986)]; *Immobilized Cells and Enzymes* [IRL Press, (1986)]; B. Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984); F. M. Ausubel et al. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc. (1994); *A Handbook of Bioanalysis and Drug Metabolism*, G. Evans (2004).

Uma concretização da presente invenção é um método de identificação de estabilidade metabólica de um agente de teste devido a metabolismo catalisado de amina oxidase sensível à semicarbazida (SSAO), o método compreendendo: (a) cultura de células que expressam SSAO; (b) adição de um agente de teste às células; (c) incubação do agente de teste com as células por um período de tempo predeterminado; (d) medição da quantidade do agente de teste remanescente na presença das células compreendendo SSAO expressa no período de tempo predeterminado; e (e) compara-

ção da quantidade do agente de teste no período de tempo predeterminado à quantidade de agente de teste em um controle para determinar um valor no qual o valor identifica a estabilidade metabólica no agente de teste na presença de células compreendendo SSAO expressa.

5 Um técnico no assunto reconhecerá que o método pode ser efetuado usando-se o lisato de célula ao invés das células. Desse modo, uma concretização da presente invenção é um método de identificação da estabilidade metabólica de um agente de teste devido ao metabolismo catalisado de amina oxidase sensível à semicarbazida (SSAO), o método compreendendo: (a) cultura de células que expressam SSAO; (b) lisação das células para formar um lisato de célula; (c) adição de um agente de teste ao lisato de célula; (d) incubação do agente de teste com o lisato de célula por um período de tempo predeterminado; (e) medição da quantidade do agente de teste remanescente na presença do lisato de célula compreendendo SSAO
10 expressa no período de tempo predeterminado; e (f) comparação da quantidade do agente de teste no período de tempo predeterminado à quantidade de agente de teste em um controle para determinar um valor no qual o valor identifica a estabilidade metabólica do agente de teste na presença de lisato de célula compreendendo SSAO expressa. Outra concretização combina as etapas (b) e (c) em uma etapa única.
15
20

Uma concretização adicional da presente invenção é um método de identificação da estabilidade metabólica de um agente de teste devido ao metabolismo catalisado de SSAO em uma amostra biológica, o método compreendendo: (a) obtenção de uma amostra biológica compreendendo SSAO; (b) adição de um agente de teste à amostra biológica; (c) incubação do agente de teste com a amostra biológica por um período de tempo predeterminado; (d) medição da quantidade do agente de teste no período de tempo predeterminado; e (e) comparação da quantidade do agente de teste no período de tempo predeterminado à quantidade de agente de teste em um controle para determinar um valor no qual o valor identifica a estabilidade metabólica do agente de teste na presença de uma amostra biológica compreendendo SSAO.
25
30

Uma concretização da presente invenção usa cultura de célula primária ou linhagens de célula que são comercialmente disponíveis. Como um exemplo não-limitativo, células que podem ser usadas são disponíveis a partir de American Tissue Culture Company. Em uma concretização, células de CHO são usadas. As células podem ser procarióticas ou eucarióticas. O escopo da invenção não é limitado pelo tipo de células usado.

Uma amostra biológica pode incluir, mas não é limitada a, tecido ou fluidos, seções de tecidos, tais como biópsia e amostras de autópsia, e seções congeladas tomadas para propostas histológicas. Tais amostras incluem sangue, saliva, tecido, células de cultura, (por exemplo, culturas primárias, explantes, e células transformadas), partes de ou órgãos totais (por exemplo, fígado, pulmão, íleo, artéria, cordão umbilical), fezes, urina, etc. Uma amostra biológica pode ser obtida de um organismo eucariótico, incluindo de mamíferos, tais como um primata, *por exemplo*, chimpanzé, macaco ou ser humano, vaca, cão, gato, um roedor, *por exemplo*, porquinho-da-índia, rato, camundongo, coelho, ou um pássaro, réptil, ou peixe. Em exemplo não-limitativo de uma concretização da presente invenção é investigar se um agente de teste particular ou composto tem maior risco de deficiência metabólica ou, inversamente, é metabolicamente estável em um compartimento de tecido versus outros compartimentos de tecido, *por exemplo*, se um composto tem maior estabilidade metabólica no fígado comparada ao pulmão. Adicionalmente, uma amostra biológica pode ser processada para proporcionar uma suspensão de seus componentes celulares, ou usada para cultura primária dos componentes celulares.

Uma concretização da invenção é usar uma amostra biológica de um indivíduo humano ou não-humano para quantificar a estabilidade metabólica de um agente de teste. Uma amostra biológica pode ser uma amostra de órgão derivada de um ou mais órgãos de animais não-humanos ou humanos, uma amostra de tecido derivada de um ou mais tecidos de animais não-humanos ou humanos, bem como amostras de célula, derivadas de uma ou mais células de animais não-humanos ou humanos, ou de culturas de célula. Para experimentação animal, as amostras biológicas podem

compreender tecidos órgãos-alvo obtidos, por exemplo, após necropsia ou biópsia, ou podem ser fluidos corpóreos, tal como sangue. Para uso clínico, as amostras podem compreender fluidos corpóreos, similares a sangue, soro, plasma, urina, fluido sinovial, fluido espinhal, fluido cerebrospinal, sêmen ou linfa, bem como tecidos corpóreos obtidos por biópsia. Uma referência ou controle é compreendido pelo técnico no assunto. Uma referência ou controle pode incluir, mas não é limitado a, uma amostra biológica de um indivíduo não-adoentado no qual o indivíduo é um animal não-humano ou humano. Adicionalmente, uma referência ou controle pode ser uma amostra biológica de um indivíduo não-tratado. Alternativamente, uma referência ou controle pode ser do mesmo indivíduo antes, durante e após tratamento. Uma referência ou controle pode ser do mesmo indivíduo, mas é uma célula diferente, amostra de tecido ou órgão do que a fonte de célula, tecido ou órgão usada para identificar a estabilidade metabólica do agente de teste. Uma referência ou controle não tem que ser uma amostra biológica, mas pode ser uma amostra com uma quantidade desconhecida de atividade de SSAO. Uma referência ou controle pode ser um agente que não é metabolizado por SSAO, ou que é metabolizado por SSAO com uma quantidade conhecida de deficiência de SSAO.

A presente invenção proporciona métodos para identificação da estabilidade metabólica ou deficiência metabólica de agentes de teste. O termo "agente de teste", conforme aqui usado, descreve qualquer molécula, por exemplo, proteína, composto orgânico de não-proteína, ou farmacêutico, com a capacidade de ser afetada por ou afetando a atividade de enzima de SSAO. Estas não são restrições particulares como para os agentes de teste que podem ser ensaiados. Em uma concretização da invenção, um agente de teste é um composto. Exemplos de agentes de teste incluem agentes simples ou bibliotecas de moléculas químicas de peso molecular pequeno, médio ou alto. Um agente pode ser na forma de uma biblioteca de agentes de teste, tal como uma biblioteca combinatorial ou randomizada, que proporciona uma faixa suficiente de diversidade, ou, inversamente, estão limitados a estruturas ou características similares. Os agentes podem ser opcional-

mente ligados a um coparticipante de fusão, *exemplo*, compostos-alvo, compostos de livramento, compostos de dimerização, compostos de estabilização, compostos endereçáveis, e outras porções funcionais. Convencionalmente, novas entidades químicas com propriedades úteis são geradas pela
5 identificação de um agente de teste (denominado um "composto de condutor" ou um "condutor") com alguma propriedade ou atividade desejável, por exemplo, inibição da atividade ou modulação. O composto de condutor é, em seguida, usado como uma armação para criar variantes do composto de condutor, e, adicionalmente, avaliar a propriedade e atividade daqueles
10 compostos variantes. Um técnico no assunto apreciará a utilidade de usar a presente invenção para otimizar a seleção de composto pela identificação da estabilidade metabólica e, desse modo, a deficiência metabólica de compostos de condutor potenciais, e identificação ou seleção daqueles compostos com deficiência mínima para metabolismo de SSAO.

15 A SSAO da presente invenção é SSAO de comprimento total ou um fragmento desta que retém atividade de enzima total ou parcial. A atividade de enzima parcial pode ser 30% da atividade de enzima total, ou maior, por exemplo, 40% ou 50%. Um exemplo não-limitativo é uma SSAO isolada de uma espécie outra do que humana. Exemplos não-limitativos de outras
20 espécies incluem roedores, tais como ratos, camundongos e porquinhos-da Índia, ou primatas não-humanos, tais como macacos ou chimpanzés. Um exemplo não-limitativo adicional é SSAO humana de comprimento total, conforme descrito em SEQ ID NO: 1, ou fragmentos desta tendo atividade de metilenoamina oxidase.

25 Estabilidade metabólica ou deficiência metabólica são termos da técnica pelo técnico no assunto. Estabilidade metabólica se refere à susceptibilidade ou extensão a qual um agente de teste ou uma molécula de fármaco suporta metabolismo sob uma dada condição. Desse modo, quanto mais alta a extensão de metabolismo, mais baixa a estabilidade metabólica. A es-
30 tabilidade metabólica é um de vários determinantes maiores na definição da biodisponibilidade oral e folga sistêmica de um fármaco, composto ou agente de teste. Como uma ilustração não-limitativa, após um fármaco ser adminis-

trado oralmente, ele primeiro encontra enzimas metabólicas no lúmen gastrointestinal, bem como no epitélio intestinal. Após ele ser absorvido na corrente sanguínea através do epitélio intestinal, ele é distribuído ao fígado via a veia portal. Um fármaco pode ser efetivamente removido por metabolismo intestinal ou hepático antes dele alcançar circulação sistêmica, um processo conhecido como primeiro metabolismo de passagem. A estabilidade ou deficiência de um fármaco para metabolismo dentro do fígado, bem como tecidos extra-hepáticos determinarão por último a concentração de fármaco encontrada na circulação sistêmica, e afetam sua meia-vida e tempo de residência dentro do corpo. O tipo de biotransformações tipicamente referido como metabolismo de Fase I inclui oxidação, redução, e hidrólise, que servem principalmente para aumentar a hidrofiliabilidade e intensifica a excreção de um fármaco por descerramento ou incorporação de um grupo funcional polar na molécula (OH, SH, NH₂, ou CO₂H). As reações de Fase II ou reações de conjugação adicionalmente aumentam a polaridade de um fármaco pela modificação de um grupo funcional para formar O- ou N- glucuronidas, sulfato ésteres, alfa-carboxiamidas e adutos de glutathionila. Uma concretização da presente invenção é a estabilidade metabólica ou deficiência metabólica de um fármaco, composto ou agente de teste para metabolismo por SSAO.

Uma concretização da invenção seleciona as amostras biológicas mais relevantes e outras espécies para examinar a estabilidade metabólica de tecido ao metabolismo de SSAO. Por exemplo, metabolismo baseado em fígado é responsável pela folga metabólica de muitos fármacos assim de interesse no primeiro metabolismo de passagem pode focalizar no metabolismo hepático e, as vezes, intestinal. A presença ubíqua de SSAO em tecidos e fluidos biológicos e sua atividade particularmente alta em muitos tecidos, tais como pulmão e vasos sanguíneos, torna imperativo usar as amostras biológicas apropriadas em adição a ou no lugar de fígado para examinar a estabilidade metabólica do agente de teste na presença de SSAO. Em adição ao metabolismo intestinal e ao primeiro metabolismo de passagem, a exposição de um agente de teste objeto ao SSAO pode ser limitada pelo

primeiro metabolismo de passagem nos locais outros do que tecidos intestinal e hepático, tais como veias portais, vasos sanguíneos, e pulmões. Um agente de teste pode demonstrar estabilidade metabólica diferente contra formas diferentes de SSAO. Amostras biológicas diferentes podem conter

5 formas diferentes de SSAO. Um exemplo não-limitativo é que um agente de teste pode mostrar estabilidade metabólica relativa contra a forma solúvel de SSAO em plasma humano, mas instabilidade metabólica mais alta contra SSAO ligada à membrana em tecidos. Adicionalmente, uma espécie animal pode mostrar atividade de SSAO solúvel muito mais alta ou mais baixa em

10 plasma do que o nível de atividade de SSAO solúvel encontrado em humano, sob condições de ensaio comparáveis.

Uma concretização da invenção usa vários inibidores químicos para inibir várias formas de atividades de amina oxidase e atribuir a instabilidade metabólica observada como, ou SSAO catalisada, ou monoamina oxidase (MAO)-A, ou metabolismo catalisado de MAO-B. Um exemplo não-

15 limitativo é a adição de hidralazina como um inibidor de amina oxidase não-discriminante, clorgilina como um inibidor de MAO-A específico, pargilina como um MAO-A misturado e inibidor de MAO-B, semicarbazida e bromoetilamina como inibidores de SSAO específicos.

20 Outro exemplo não-limitativo da invenção é determinar a estabilidade metabólica de um agente de teste em indivíduos tratados com um fármaco ou uma combinação de fármacos para determinar se existe uma mudança na estabilidade metabólica do agente de teste em tais indivíduos comparada a indivíduos de controle. Um técnico no assunto apreciará a utilidade de obtenção de amostras biológicas de indivíduos humanos ou não-

25 humanos que sofrem de uma ou mais doenças, ou foram manipulados para induzir um ou mais estados de doença, cirurgicamente ou geneticamente alterados ou pré-tratados com um fármaco, composto ou agente de teste. Um exemplo não-limitativo inclui o uso da invenção para determinar a estabilidade metabólica de um agente de teste em órgãos que podem ser comprometidos pela doença comparado a órgãos de não-doença. Como um

30 exemplo não-limitante adicional, a estabilidade metabólica de um composto

pode ser avaliada no tecido do pulmão de um indivíduo humano que sofre de asma, e comparado à estabilidade metabólica do composto em tecido de pulmão saudável de um indivíduo de idade equiparada ou de controle. Outro exemplo não-limitativo seria estudar a estabilidade metabólica de um composto em uma amostra biológica tal como em fígado "jovem" comparado a fígado "velho" ou "de idade", onde "jovem", "velho" e "de idade" são definidos pelas espécies particulares sob investigação.

Uma concretização da invenção usa uma população de célula homogênea ou uma amostra biológica. Uma concretização alternativa da invenção usa uma população de célula heterogênea ou uma combinação de mais do que uma amostra biológica. As células ou amostra biológica podem ser de qualquer tipo e em qualquer proporção para completar os métodos da invenção.

Uma concretização da invenção usa uma célula recombinante que expressa SSAO. Um vetor de expressão recombinante da invenção compreende uma molécula de ácido nucleico em uma forma adequada para expressão do ácido nucleico em uma célula hospedeira. Desse modo, um vetor de expressão recombinante da presente invenção pode incluir uma ou mais sequências regulatórias, selecionadas com base nas células hospedeiras a serem usadas para expressão, que é operavelmente ligada ao ácido nucleico a ser expresso. Dentro de um vetor de expressão recombinante, "operavelmente ligado" é pretendido para significar que a sequência de nucleotídeo de interesse é ligada à(s) sequência(s) regulatória(s) em uma maneira que permite(m) expressão da sequência de nucleotídeo (*por exemplo*, em um sistema de transcrição/translação *in vitro*, ou em uma célula hospedeira quando o vetor é introduzido na célula hospedeira). O termo "sequência regulatória" é pretendido para incluir promotores, intensificadores e outros elementos de controle de expressão (*por exemplo*, sinais de poliadenilação). Tais sequências regulatórias são descritas, por exemplo, em Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology Vol. 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990). Às sequências regulatórias incluem aquelas que dirigem expressão constitutiva da sequência de nucleotídeo em muitos

tipos de células hospedeiras (*por exemplo*, sequências regulatórias específicas de tecido). Será apreciado por aqueles técnicos no assunto que o desenho do vetor de expressão pode depender de fatores tais como a escolha de célula hospedeira a ser transformada, do nível de expressão de proteína desejado, etc. Os vetores de expressão da invenção podem ser introduzidos em células hospedeiras para produzir proteínas ou peptídeos codificados por ácidos nucleicos conforme descrito aqui.

O termo "sobreexpressão", conforme aqui usado, se refere à expressão de um polipeptídeo em um nível que é maior do que o nível normal de expressão do polipeptídeo em uma célula que normalmente expressa o polipeptídeo, ou em uma célula que não expressa normalmente o polipeptídeo. Por exemplo, a expressão do polipeptídeo pode ser 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70, 80%, 90%, 100%, ou mais, conforme comparado à expressão do polipeptídeo em uma célula tipo selvagem que expressa normalmente o polipeptídeo. Mutantes, variantes, ou análogos do polipeptídeo de interesse, podem ser sobreexpressos.

Conforme aqui usado, o termo expressão "transiente" se refere à expressão de molécula(s) de ácido nucleico exógeno que são separadas a partir dos cromossomos da célula. A expressão transiente geralmente alcança seu máximo em 2-3 dias após introdução do ácido nucleico exógeno e, subsequentemente, declina.

Conforme aqui usado, o termo expressão "estável" se refere à expressão de molécula(s) de ácido nucleico exógeno que se torna uma parte integrada do(s) cromossomo(s) da célula. Em geral, vetores para expressão de genes incluem um ou mais marcadores de seleção.

As técnicas de cultura de célula para cultura primária transformada, não-transformada, e amostras biológicas, são bem-conhecidas na técnica. As amostras biológicas ou células cultivadas podem ser armazenadas até que requeridas para uso. O meio usado para cultura pode ser especificamente designado ou comprado de fontes comerciais.

Uma concretização da invenção envolve a lisação das células. As células podem ser lisadas pela adição de um detergente contendo tam-

pão lise. Contudo, a invenção não é limitada ao uso de detergente no tampão lise mas pode incluir qualquer método que é apropriado para lisação de células. Por exemplo, as células podem ser lisadas por exposição a tampão hipertônico, sonicação ou congelamento/descongelamento. Estes e outros métodos de lisação de células são bem conhecidos aos técnicos no assunto.

Uma concretização da invenção usa um controle. Um controle é um termo da técnica bem compreendido pelos técnicos no assunto. Um controle apropriado pode ser dependente dos parâmetros de ensaio, ou da questão experimental sob investigação. Um controle pode ser um conjunto particular de condições de ensaio, ou a adição ou eliminação de um composto particular para o ensaio. Portanto, um exemplo não-limitativo de um controle é uma condição onde um agente de teste é incubado na ausência de células ou lisato de células que expressam SSAO. Um controle pode ser considerado um controle positivo em que as condições de ensaio ou composto de controle adicionado proporcionam a resposta antecipada. Por exemplo, se o agente sob investigação é esperado ser metabolizado, um controle positivo seria um composto que é metabolizado por SSAO. Adicionalmente, um controle positivo pode ser um composto que é metabolizado por SSAO em subprodutos metabólicos conhecidos. Um exemplo não-limitativo de um controle positivo é a adição de benzilamina. Um controle pode também ser um controle negativo. Um controle negativo pode ser um conjunto particular de condições de ensaio, ou a adição ou eliminação de um composto particular para o ensaio que não proporcionaria a resposta antecipada. Por exemplo, se o agente sob investigação é esperado ser metabolizado, então um controle negativo seria esperado não ser metabolizado. Um exemplo não-limitativo de um controle negativo é a adição de ácido benzóico que não tem um grupo metilenoamina, e não é metabolizado por SSAO. Um exemplo não-limitativo de um conjunto particular de condições de ensaio como um controle negativo pode ser a adição de um inibidor tendo como alvo atividade de enzima de SSAO, tal como hidralazina, no qual a atividade de SSAO é inibida. Um controle pode ser um controle de "veículo". Por exemplo, se o agente de teste é dissolvido em DMSO, então o controle de veículo

seria DMSO sem agente de teste. Um controle pode simplesmente ser o uso de dados históricos.

Uma concretização da presente invenção é medição da quantidade do agente de teste incubado na presença de SSAO no período de tempo predeterminado e comparação da quantidade do agente de teste no período de tempo predeterminado à quantidade de agente de teste em um controle para determinar a estabilidade metabólica do agente de teste na presença de SSAO. É prontamente aparente a um técnico no assunto que a estabilidade metabólica de agente de teste pode ser medida pelo desaparecimento do agente de teste, ou, alternativamente, pela medição do aparecimento de um ou mais metabolitos do agente de teste. Uma concretização adicional da presente invenção é medir o aparecimento de um ou mais metabolitos do agente de teste em adição a ou no lugar de medição da quantidade de agente de teste.

A quantidade de agente de teste ou o aparecimento de um ou mais metabolitos do agente de teste pode ser medida por qualquer número de técnicas disponíveis a um técnico no assunto. Exemplos não-limitativos incluem espectrometria de massa, cromatografia líquida de alta pressão (H-PLC), cromatografia líquida/espectrometria de massa, cromatografia líquida/espectrometria de massa/espectrometria de massa e cromatografia líquida/detecção radiométrica. Adicionalmente, a quantidade de agente de teste ou o aparecimento de um ou mais metabolitos do agente de teste podem ser medidos pelo uso de moléculas indicadoras, tais como radioisótopos, corantes fluorescentes ou anticorpos. A presente invenção não é limitada pelo método de medição do agente de teste ou qualquer um ou mais metabolitos do agente de teste.

O agente de teste pode ser etiquetado com um radioisótopo, tal como, mas não limitado a, ^3H ou ^{14}C . Desse modo, uma concretização da invenção é um método de identificação da estabilidade metabólica de um agente de teste radioetiquetado devido ao metabolismo catalisado de amina oxidase sensível à semicarbazida (SSAO), o método compreendendo: (a) cultura de células que expressam SSAO; (b) adição de um agente de teste

radioetiquetado às células; (c) incubação do agente de teste radioetiquetado com as células por um período de tempo predeterminado; e (d) medição da quantidade do agente de teste radioetiquetado remanescente na presença das células compreendendo SSAO expressa no período de tempo predeter-

5
foi metabolizada identifica a estabilidade metabólica do agente de teste radioetiquetado na presença de células compreendendo SSAO expressa. Um técnico no assunto reconhecerá que o método pode ser efetuado usando-se lisato de células ao invés das células. Adicionalmente, a presente invenção

10 não é limitada pelo uso de radioisótopos, mas pode usar quaisquer meios disponíveis na técnica para etiquetar o agente de teste.

Uma concretização adicional da presente invenção é um método de identificação da estabilidade metabólica de um agente de teste radioetiquetado devido ao metabolismo de SSAO catalisada em uma amostra bioló-

15 gica, o método compreendendo: (a) obtenção de uma amostra biológica compreendendo SSAO; (b) adição de um agente de teste radioetiquetado à amostra biológica; (c) incubação do agente de teste radioetiquetado com a amostra biológica por um período de tempo predeterminado; e (d) medição da quantidade do agente de teste radioetiquetado no período de tempo pre-

20 determinado no qual a percentagem de agente de teste radioetiquetado que não foi metabolizado identifica a estabilidade metabólica do agente de teste na presença de uma amostra biológica compreendendo SSAO.

O técnico no assunto pode apreciar a utilidade de comparação da estabilidade metabólica de um agente de teste em células ou lisatos de célula à estabilidade metabólica do agente de teste em amostras biológicas.

25 Desse modo, uma concretização da presente invenção inclui um método de determinar o perfil de estabilidade metabólica de um agente de teste, o método compreendendo (a) obtenção do valor de estabilidade metabólica do agente de teste incubado na presença de células ou lisato de célula compre-

30 endendo SSAO expressa e (b) obtenção do valor de estabilidade metabólica do agente de teste incubado na presença de uma amostra biológica compreendendo SSAO expressa, no qual o valor de estabilidade metabólica do

agente de teste na presença das células ou lisato de célula compreendendo SSAO expressa é comparado ao valor de estabilidade metabólica do agente de teste na presença da amostra biológica compreendendo SSAO, proporcionando o perfil de estabilidade metabólica do agente de teste.

5 Refinamentos tais como uso da presente invenção com métodos de classificação de alta produção (HTS) estão bem dentro do conhecimento e capacidade do técnico no assunto e são concretizações consideradas da invenção. Uma concretização da invenção é o uso em métodos de classificação de alta produção (HTS). HTS é o teste automático simultâneo de milhares de compostos químicos distintos em ensaios designados para modelar mecanismos biológicos ou aspectos de patologias de doença. Mais do que um composto, *por exemplo*, uma pluralidade de compostos, pode ser testada simultaneamente. Em uma concretização, o termo método de classificação de HTS se refere a ensaios que testam a estabilidade metabólica de um composto em uma pluralidade de amostras biológicas ou uma pluralidade de compostos em uma ou mais amostras biológicas.

15 Uma concretização da presente invenção compreende uma série de receptáculos que podem receber células, lisatos de células, amostras corpóreas ou outros materiais tais como metilenoamina ou agente de teste similar à metilenoamina sob investigação. Uma série de receptáculos pode ser qualquer número de receptáculos de pelo menos um ou mais do que um receptáculo adequado para retenção de materiais dentro do escopo da invenção. Exemplos incluem, mas não estão limitados a, frascos, pratos de cultura, lâminas, tubos, tais como tubos de 1,5 mL, placas de 12 poços, placas de 96 poços, placas de 384 poços e placas de microtitulação miniaturizadas com talvez 4000 receptáculos (Pedido de Patente dos Estados Unidos 20050255580). A série de receptáculos pode ser emendável para a adição de uma cobertura protetora, prevenindo, desse modo, contra entrada de contaminantes ou evaporação de conteúdos.

30 Uma característica adicional dos receptáculos é que o receptáculo pode permitir análise. Exemplos não-limitativos incluem análise por espectrometria de massa ou HPLC. Contudo, não existe uma limitação para

receptores que podem ser usados dentro do escopo da presente invenção, dado que as amostras podem ser transferidas para um recipiente adicional para análise adicional. Um exemplo não-limitativo é modificar o método tal que o método adicionalmente compreende provisão de uma segunda série de receptáculos na qual uma ou mais etapas são realizadas na segunda série de receptáculos.

Sistemas de manuseio de líquido, equipamento analítico, tais como leitoras de fluorescência ou contadores de cintilação e robóticos para cultura de célula e manipulação de amostra são bem conhecidos na técnica. Sistemas mecânicos, tais como braços robóticos, ou dispositivos de "cherry-picking" são disponíveis ao técnico no assunto. Leitoras de placa comerciais são disponíveis para analisar placas de 96 poços e de 384 poços convencionais. Leitoras de amostra única, amostra múltipla ou amostra de placa são disponíveis que analisam poços predeterminados e geram relatos de dados brutos. Os dados brutos podem ser transformados e apresentados em uma variedade de modos.

Uma concretização adicional da presente invenção é um kit compreendendo pelo menos um elemento de um sistema de ensaio para realizar os métodos aqui descritos, e instruções para uso. Desse modo, os componentes do sistema de ensaio podem ser providos separadamente, ou podem ser providos juntos em tal kit. Os componentes do sistema de ensaio podem ser preparados e incluídos em um kit de acordo com métodos que maximizam a estabilidade dos componentes individuais. Tais métodos são familiares àqueles técnicos no assunto. Por exemplo, as células do sistema de ensaio podem ser providas como uma suspensão, ou as células podem ser congeladas ou liofilizadas. Os componentes adicionais do sistema de ensaio podem também ser incluídos, tais como tampões, recipientes para mistura dos componentes de ensaio, tais como placas de microtitulação ou tubos de teste. O sistema de ensaio pode ser provido na forma de um kit que inclui instruções para realização do ensaio e instruções para manuseio e interpretação de dados.

A presente invenção é adicionalmente descrita nos exemplos

seguintes, que não limitam o escopo da invenção descrita nas reivindicações. Conquanto a invenção tenha sido descrita e exemplificada em detalhe suficiente para aqueles técnicos nesta área técnica para produzir e usar, várias alternativas, modificações e aperfeiçoamentos devem ser aparentes sem fugir do espírito e escopo da invenção. Um técnico no assunto apreciará que a presente invenção é bem adaptada para efetuar o objetivo e obter as finalidade e vantagens mencionadas, bem como aquelas inerentes na mesma. Os exemplos que se seguem são descrições de concretizações e não são pretendidos como limitações no escopo da invenção. Modificações na mesma e outros usos ocorrerão àqueles técnicos no assunto. Estas modificações estão envolvidas dentro do espírito da invenção, e são definidas pelo escopo das reivindicações.

A presente invenção descrita ilustrativamente aqui pode ser praticada na ausência de qualquer elemento ou elementos, limitação ou limitações, que não são especificamente aqui descritos. Os termos e expressões que foram empregados são usados como termos de descrição, e não de limitação, e não há intenção que no uso de tais termos e expressões de exclusão de quaisquer equivalentes das características mostradas e descritas ou porções destas, mas é reconhecido que várias modificações são possíveis dentro do escopo da invenção reivindicada. Desse modo, deve ser compreendido que embora a presente invenção tenha sido especificamente descrita pelas concretizações e características opcionais, modificação e variação dos conceitos aqui descritos podem ser feitas por aquele técnico no assunto, e que tais modificações e variações são consideradas estarem dentro do escopo desta invenção conforme definida pelas reivindicações em anexo.

Exemplo 1

A. Clonagem e Expressão de SSAO Humana

1) De modo a facilitar a produção de constructo de expressão, um plasmídeo de SSAO de comprimento total pDONR221 inicial foi gerado conforme segue:

Uma primeira PCR foi realizada usando-se os iniciadores espe-

cíficos de gene mostrados abaixo. O iniciador de avanço tinha metade do local *att* (Invitrogen) e uma sequência Kozak mostrada em negrito. O iniciador reverso tinha a metade restante do local *att* mostrado em negrito. PCR foi realizada usando-se cordão umbilical humano como o gabarito de DNA (preparado de RNA comprado de Biochain e kit II superescripte de RT-PCR de Invitrogen):

Iniciadores de Clonagem Iniciais:

Avanço (SEQ ID NO: 3):

5'-**AAAAGCAGGCTTAGGA**ATGAACCAGAAGACAATCCTC-3'

10 Reverso (SEQ ID NO: 4):

5'-**CAAGAAAGCTGGGTC**CTAGTTGTGAGAGAAGCCCC-3'

Uma segunda PCR foi, em seguida, efetuada usando-se os iniciadores universais mostrados abaixo. O iniciador de avanço e o iniciador reverso incluem sequências de local *att* (mostradas em negrito) e sequências de vetores.

Sequências de Iniciador Universais:

Avanço (SEQ ID NO: 5):

5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAA**AGCAGGCTTAGGA**-3'

Reverso (SEQ ID NO: 6):

20 5'-GGGGACCACTTTGTAC**AAAGCTGGGTC**-3'

Este segundo produto de PCR foi clonado em pDONR221 usando-se a reação BP de Invitrogen. Usando-se este vetor de entrada como gabarito, seis variações de constructos de expressão de SSAO humana foram preparadas; três formas (uma de comprimento total e duas truncadas) sem etiquetas e três etiquetas 6xHIS com carboxil-terminal para facilitar a purificação da enzima.

2) A SSAO de comprimento total:

As sequências mostradas em negrito no iniciador de avanço e nos iniciadores reversos indicam sequência de local de *att*.

30 Sequências de Iniciador para Clonagem de SSAO de Comprimento total Não-Etiquetado:

Avanço (SEQ ID NO: 7):

5'-**AAAAGCAGGCTTAGGAATGAACCAGAAGACAATCCTC**-3'

Reverso (SEQ ID NO: 8):

5'-

CAAGAAAGCTGGGTCCTAGTTGTGAGAGAAGCCCCCGTGG-3'

5 Para adicionar 3' 6xHIS antes do códon de parada, os seguintes iniciadores foram usados:

As sequências mostradas em negrito no iniciador de avanço e no iniciador reverso indicam sequência de local *att*, as sequências sublinhadas no iniciador reverso indicam e etiqueta 6xHIS.

10 Sequências de Iniciador para Clonagem de SSAO de Comprimento total com etiqueta 6xHIS C-terminal:

Avanço (SEQ ID NO: 9):

5'-**AAAAGCAGGCTTAGGAATGAACCAGAAGACAATCCTC**-3'

Reverso (SEQ ID NO: 10):

15 5'-

CAAGAAAGCTGGGTCCTAATGGTGATGGTGATGGTGGTTGTGAGAGAA
GCCCCCGTGG-3'

3) T₁ (Gly27-Asn763) representando a enzima que falta na região de ancoragem de membrana:

20 As sequências mostradas em negrito no iniciador de avanço e no iniciador reverso indicam a sequência de local *att*, sequências sublinhadas no iniciador de avanço indicam Met N-terminal adicional.

Sequências de Iniciador para Clonagem de SSAO Não-Etiquetada, N-terminal, Truncada:

25 Avanço (SEQ ID NO: 11):

5'-

AAAAGCAGGCTTAGGAATGGGCAGGGGTGGAGATGGGGGTG-3'

Reverso (SEQ ID NO: 12):

5'-**CAAGAAAGCTGGGTCCTAGTTGTGAGAGAAGCCCC**-3'

30 Para adicionar 3' 6xHIS antes do códon de parada, os seguintes iniciadores são usados:

As sequências mostradas em negrito no iniciador de avanço e

no iniciador reverso indicam sequência de local *att*, sequências sublinhadas no iniciador de avanço indicam Met N-terminal adicional, e as sequências sublinhadas no iniciador reverso indicam a etiqueta 6xHIS.

Sequências de Iniciador para Clonagem de SSAO de etiqueta
5 6xHIS N-terminal Truncada, C-terminal:

Avanço (SEQ ID NO: 13):

5'-

AAAAGCAGGCTTAGGAATGGGCAGGGGTGGAGATGGGGGTG-3'

Reverso (SEQ ID NO: 14):

10

5'-

**CAAGAAAGCTGGGTCCTAATGGTGATGGTGATGGTGGTTGTGAGAGAA
GCCCCGTGG-3'**

4) T₂ (Met211-Asn763) representando o domínio catalítico putativo.

15 As sequências mostradas em negrito no iniciador de avanço e no iniciador reverso indicam a sequência de local *att*, e as sequências sublinhadas no iniciador de avanço indicam Met N-terminal adicional.

Sequências de Iniciador para Clonagem de domínio catalítico de SSAO não-etiquetada:

20 Avanço (SEQ ID NO: 15):

5'-**AAAAGCAGGCTTAGGAATGACCACGGCTCCCCGTGGTC-**

3'

Reverso (SEQ ID NO: 16):

5'-**CAAGAAAGCTGGGTCCTAGTTGTGAGAGAAGCCCC-3'**

25 Para adicionar 3' 6xHIS antes do códon de parada, os seguintes iniciadores foram usados:

30 As sequências mostradas em negrito no iniciador de avanço e no iniciador reverso indicam sequência de local *att*, as sequências sublinhadas no iniciador de avanço indicam Met N-terminal adicional, as sequências sublinhadas no iniciador reverso indicam a etiqueta 6xHIS.

Sequências de Iniciador para Clonagem de domínio catalítico de SSAO com etiqueta 6xHIS C-terminal:

Avanço (SEQ ID NO: 17):

5'-**AAAAGCAGGCTTAGGAATGACCACGGCTCCCCGTGGTC-**
3'

Reverso (SEQ ID NO: 18):

5
5'-
CAAGAAAGCTGGGTCCTAATGGTGATGGTGATGGTGGTTGTGAGAGAA
GCCCCGTGG-3'

Os constructos de expressão foram preparados por clonagem destes produtos de PCR no vetor pCDNA5-FRT-Para-DEST (Invitrogen, Gateway System[®]). A sequência de DNA de avanço e reversa de cada constructo foi confirmada incluindo sequências expressas e pelo menos 100 pares bases ou lados destas. As linhagens de célula estáveis para Flp-In CHO, Flp-In CHO T-Rex, e Flp-In HEK 293 (Invitrogen, Flp-In system[®]) foram geradas usando-se estes 6 constructos de acordo com as instruções do fabricante. As células foram cotransfectadas com o vetor regulatório pOG44, e cada um dos constructos pCDNA5-FRT-Para-DEST usando Lipfectamina (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Desse modo, 18 linhagens de célula foram geradas: SSAO de comprimento total CHO Flp-In; SSAO de comprimento total CHO Flp-In com etiqueta 6xHIS C-terminal; SSAO CHO Flp-In T₁; SSAO CHO Flp-In T₁ com etiqueta 6xHIS C-terminal; SSAO CHO Flp-In T₂; SSAO CHO Flp-In T₂ com etiqueta 6xHIS C-terminal; SSAO de comprimento total CHO T-Rex Flp-In; SSAO de comprimento total CHO T-Rex Flp-In etiqueta 6xHIS C-terminal; SSAO CHO T-Rex Flp-In T₁; SSAO CHO T-Rex Flp-In T₁ com etiqueta 6xHIS C-terminal ; SSAO CHO T-Rex Flp-In T₂; SSAO CHO Flp-In T₂ com etiqueta 6xHIS C-terminal; SSAO de comprimento total HEK 293 Flp-In; SSAO de comprimento total HEK 293 Flp-In com etiqueta 6xHIS C-terminal; SSAO HEK 293 Flp-In T₁; SSAO HEK 293 Flp-In T₁ com etiqueta 6xHIS C-terminal ; SSAO HEK 293 Flp-In T₂; SSAO HEK 293 Flp-In T₂ com etiqueta 6xHIS C-terminal.

30 Células CHO aderentes foram cultivadas a 37 °C, 5% de CO₂ em meio contendo Ham's F12, 10% de soro bovino fetal, 2 mM de L-glutamina, 1% de Penicilina/Estreptomicina, 300 µM de higromicina B. Células aderen-

tes HEK 293 foram cultivadas a 37 °C, 5% de CO₂ em D-MEM (alta glicose), 10% de soro bovino fetal, 2 mM de L-glutamina, e 200 µM de higromicina B. Transformantes estáveis foram identificados por perda de resistência à zeocina. Uma vez que as células estavam 80% confluentes, a expressão de SSAO foi induzida pela adição de Tetraciclina a 1 µg/mL. Em seguida a 18 horas, as células foram colhidas usando-se um tratamento de tripsina de 3 minutos, à temperatura ambiente. As células foram lavadas 3 vezes em solução salina tamponada de fosfato antes de congelamento instantâneo em nitrogênio líquido.

Para a preparação de lisato de célula para teste de atividade, pelotas de célula congeladas foram ressuspensas em tampão de lisato contendo 10 mM de Tris-HCl (pH 7,2), 150 mM de NaCl, 1,5 mM de MgCl₂, 1% v/v de NP-40 e incubadas por 15 minutos em gelo. O lisato foi removido por centrifugação 800 x g por 10 minutos, 4 °C, e armazenado em alíquotas a -80 °C até uso. As proteínas foram determinadas usando-se Reagente de Proteína Pierce Coomassie, de acordo com as instruções do fabricante.

B. Teste da Proteína Recombinante para Atividade Enzimática

(i). Preparação da Amostra.

Para cada ensaio efetuado, 1 mL de lisato de célula (1,5 mg/mL de proteína) foi misturado com benzilamina a 2000 ng/mL de concentração final. Em cada ponto de tempo correspondente, 20 µL da mistura de incubação foram transferidos para um tubo de micro centrifuga (1,7 mL) e misturados com 50 µL de acetonitrila. Os tubos foram misturados em vórtice brevemente para assegurar mistura completa e, em seguida, centrifugados a 10.000 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi removido, e 50 µL foram transferidos a um frasco autoamostrador e misturados com 50 µL de água antes da análise de LC/MS/MS. A benzilamina que permanece no lisato foi analisada com método de LC/MS/MS.

(ii). Análise

Análise de LC/MS/MS foi realizada com um espectrômetro de massa PE Sciex API 3000 sob as seguintes condições listadas abaixo e nas Tabelas 1 e 2:

Coluna analítica: Jupiter C-4, 5 μ M, 50 x 2,1 mm
 Temperatura da coluna: ambiente
 Taxa de fluxo: 0,2 mL/min
 Volume de injeção: 15 μ L

5 Tabela 1: Gradiente de Fase Móvel

Tempo (min)	Solução A (%)	Solução B (%)
0	40	60
0,1	95	5
2,9	95	5
3,0	40	60
6,0	40	60

A solução A foi 90% de metanol em água, a solução B foi 10 mM de tampão de acetato de amônio, pH 7,0

Válvula de desvio: 0-1,5 min para perda, 1,5 - 5 min para detector de MS

10 Tabela 2: LC/MS/MS

Composto	RT (min)	Transição de massa			
Benzilamina	2,74	108,1	para	65,1	+Ve

(iii) Resultados de lisato de célula de análise de LC/MS/MS são mostrados na Tabela 3.

Tabela 3: Atividade Enzimática de SSAO em Linhagens de Célula que Expressam SSAO de Comprimento Total ou Truncada

Fonte de Lisato de Célula	SSAO Expressa	Etiqueta	Benzilamina Remanescente (%)		
			0 min	10 min	2 horas
Controle CHO	Nenhuma	Nenhuma	100	111	110
Controle CHO Flp-In	Nenhuma	Nenhuma	100	104	99
CHO Flp-In	Comprimento Total	Nenhuma	100	1	1
CHO Flp-In	Comprimento Total	6xHIS C-terminal	100	101	73
CHO Flp-In	T1	Nenhuma	100	109	103
CHO Flp-In	T1	6xHIS C-terminal	100	101	98

Fonte de Lisato de Célula	SSAO Expressa	Etiqueta	Benzilamina Remanescente (%)		
			0 min	10 min	2 horas
CHO Flp-In	T2	Nenhuma	100	105	98
CHO Flp-In	T2	6xHIS C-terminal	100	108	102
CHO Flp-In T-Rex	Nenhuma	Nenhuma	100	104	99
CHO Flp-In T-Rex	Comprimento Total	Nenhuma	100	6	0
CHO Flp-In T-Rex	Comprimento Total	6xHIS C-terminal	100	94	59
CHO Flp-In T-Rex	T1	Uma	100	104	92
CHO Flp-In T-Rex	T1	6xHIS C-terminal	100	95	93
CHO Flp-In T-Rex	T2	Nenhuma	100	97	83
CHO Flp-In T-Rex	T2	6xHIS C-terminal	100	100	97
HEK293 controle	Nenhuma	Nenhuma	100	106	123
HEK293	Comprimento total	Nenhuma	100	58	2
HEK293	Comprimento total	6xHIS C-terminal	100	105	98
HEK293	T1	Nenhuma	100	105	102
HEK293	T1	6xHIS C-terminal	100	111	103
HEK293	T2	Nenhuma	100	113	101
HEK293	T2	6xHIS C-terminal	100	100	117

Os lisatos ativos de CHO Flp-In, CHO Flp-In T-Rex ou HEK293 Flp-In que expressam SSAO de comprimento total (não-etiquetada) foram subsequentemente testados e atividade confirmada (Tabela 4). Desde que as linhagens de célula de SSAO ativa foi a CHO Flp-In que expressa SSAO de comprimento total (não-etiquetada), esta preparação foi usada para teste de atividade subsequente.

Tabela 4: Atividade Enzimática de SSAO em Linhagens de Célula que Expressam SSAO de Comprimento Total

Tipo de Célula que Expressam SSAO de Comprimento total (não-etiquetada)	Benzilamina Remanescente (%)		
	0 min	10 min	30 min
HEK293 Flp-In	100	50	9
CHO Flp-In	100	9	1
CHO Flp-In T-Rex	100	16	1

Exemplo 2

Otimização das Condições de Ensaio de LCMS/MS

5 O ensaio Amplex Red (um ensaio comercialmente disponível), foi usado inicialmente para medir a atividade específica do SSAO humana recombinante. Amplex Red é um derivado incolor não-fluorescente de dihidroresorufin. Na presença de amina oxidases e SSAO, o Amplex Red reage com H₂O₂ para produzir o produto altamente fluorescente, resorufin. Resorufin tem uma excitação máxima a 563 nm e emissão máxima a 587 nm, e o ensaio pode ser quantificado pela leitura da placa de microtitulação a 587 nm. A atividade específica de SSAO recombinante foi determinada para ser 280 pmol/min/mg de proteína e esta foi determinada para ser equivalente à atividade específica de SSAO encontrada em tecido de pulmão humano.

10 Para ensaios subsequentes para moldar compostos no ensaio de LC/MS/MS, SSAO humana recombinante (rhSSAO) foi usada nesta atividade específica definida.

15

O ensaio de LC/MS/MS conforme descrito acima foi usado para avaliar a susceptibilidade do composto A a metabolismo por rhSSAO. A estrutura química do composto A é mostrada na Figura 3 (a Patente dos Estados Unidos 6.977.263 B2 genericamente envolve moléculas e métodos de produção das mesmas). O composto A mostrado na Tabela 5 foi incubado a 37 °C com rhSSAO (tendo uma atividade específica definida que é compatível com aquela encontrada em tecidos humanos conforme descrito acima)

20 por 4 horas inicialmente ou por 24 horas. No tempo zero e tempo 4 horas (ou 24 horas), uma alíquota da amostra foi removida e resfriada rapidamente com acetoneitrila. As amostras foram, em seguida, analisadas por LC/MS/MS

25

para medir a quantidade de composto original remanescente a 24 horas comparada àquela presente no tempo zero.

Os valores mostrados na Tabela 5 são percentagens de composto original remanescente nos vários tempos indicados seguindo incubação com rhSSAO.

Tabela 5: Percentagem de Composto Original Remanescente Seguindo Incubação com rhSSAO

% de Composto Original Remanescente			
Composto	0 h (%)	4 h (%)	24 h (%)
A	100	25	3,2

Exemplo 3

Teste de Estabilidade Metabólica do Composto A nas Preparações de Sobrenadante de Homogenatos de Tecido Animal e Humano

(i) Tecidos usados

Os seguintes tecidos foram usados: pulmão, fígado e íleo de porquinho-da-índia, macaco cynomolgus, e humano; artéria de porquinho-da-índia e macaco; e cordão umbilical de humano.

(ii) Preparação de tecido

Tecidos foram processados para obter sobrenadantes. Brevemente, os tecidos excisados foram enxaguados imediatamente com quantidades copiosas de solução salina fisiológica (pré-resfriadas a 4 °C) para remover sangue. Os tecidos reunidos foram homogeneizados em tampão de fosfato de sódio a 0,01 M resfriado a pH 7,4 (10 mL por g de tecido) com um Polytron. O homogenato foi tratado com Triton X-100 a uma concentração adicionada de cerca de 1% sob sacudimento brando contínuo por 2 horas a 4 °C e, em seguida, centrifugado (4 °C, 15 minutos, 3000 x g). O sobrenadante foi cuidadosamente separado e aliqotado em porções de 2 mL e congelado a aproximadamente -80 °C até uso.

(iii) Otimização de condições de incubação com composto de teste

Todas as incubações foram conduzidas a 37 °C usando-se um banho de água preaquecido. Composto teste M radioetiquetado ¹⁴C- foi incubado a 1 ou 10. Incubações preliminares foram realizadas para cada

combinação de tecido/composto para selecionar as durações de incubação apropriadas. As durações de incubação de 1,5 a 6 horas foram então usadas. O volume de incubação suficiente foi usado para permitir pelo menos cinco amostras em série durante a duração de incubação. Alíquotas individuais (1 mL) tomadas a partir da mistura de incubação foram imediatamente resfriadas rapidamente com dois volumes de acetonitrila, e as misturas resfriadas rapidamente foram secadas por congelamento. As amostras secadas por congelamento foram, ou reconstituídas imediatamente para análise de amostra, ou armazenadas a aproximadamente -80 °C até análise. A reconstituição foi realizada com uma mistura de 500 L (90% a 20 mM de acetato de amônio, pH 4,0 e 10% de metanol (v/v)). Logo após centrifugação, 100 amostras reconstituídas foram injetadas para separação cromatográfica líquida de alto desempenho (HPLC), seguido por detecção radiométrica.

(iv) Análise de dados e cálculos

Amostras reconstituídas de incubações foram analisadas por HPLC, seguido por detecção radiométrica. A identidade do composto teste e respectivos benzilaldeído e metabolitos ácidos foi verificada pela equiparação dos tempos de retenção com os padrões de referência do composto original e seus respectivos metabolitos. A quantidade do composto teste remanescente é calculada como a percentagem da radioatividade do pico original na radioatividade total do radiocromatograma de uma amostra reconstituída. A percentagem de composto teste remanescente versus tempo de incubação mostrou cinéticas de primeira ordem quando plotada em uma escala linear de log. A taxa constante de primeira ordem foi calculada para incubações individuais como a inclinação entre o logaritmo do composto teste remanescente versus tempo baseado na análise de regressão linear de mínimo quadrado.

(v) Resultados de estabilidade metabólica de composto teste em preparações de tecido

A constante de taxa de primeira ordem (1/h) para a degradação metabólica do composto teste é listada na Tabela 6. Assumindo-se que o metabolismo seguido de cinéticas de Michaelis-Menten, a aproximação a

cinéticas de primeira ordem M implicou que K para até $10_m \gg M$ para a reação enzimática. 10

Tabela 6: Estabilidade metabólica do Composto A nas Preparações de Tecido

Espécies	Tecido	Composto A	
		$M \square 1$	$M \square 10$
Humano	Fígado	0,418	0,365
	Íleo	0,352	0,353
	Pulmão	0,675	0,706
	Cordão umbilical	0,688	0,697
Porquinho-da-Índia	Fígado	0,318	0,305
	Íleo	0,0775	0,0782
	Pulmão	0,747	0,709
	Artéria	0,127	0,111
Macaco	Fígado	2,05	2,64
	Íleo	0,328	0,277
	Pulmão	0,177	0,208
	Artéria	0,835	0,673

- 5 Conforme mostrado na Tabela 6, a presente invenção demonstra uma boa correlação entre os dados do tecido e o perfil metabólico clínico observado do composto A. Comparado ao uso somente de medições de estabilidade de plasma humano, a presente invenção pode refletir melhor a estabilidade de SSAO humana de um agente farmacêutico sob condições
- 10 fisiológicas, e é uma ferramenta predita mais relevante para guiar a seleção de e o desenvolvimento farmacêutico de candidatos clínicos.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

<110> sanofi-aventis US LLC
 ADEDOYIN, Adedayo
 ANGELASTRO, Michael R

5 BICK, Julie Ann
 CAIRNS, Jennifer
 HUANG, Yongqing
 LIANG, Guyan
 LIM, Heng-Keang

10 <120> MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DA ESTABILIDADE DE METILENOAMINAS OR-
 GÂNICAS NA PRESENÇA DE AMINA OXIDASE SENSÍVEL À SEMICARBAZIDA

<130> US2005/172 WO PCT

<160> 18

<170> PatentIn versão 3.3

15 <210> 1
 <211> 763
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 1

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

30 Pro Gly Leu Val Asp Ala Ala Gln Ala Arg Pro Ser Asp Asn Cys Val
 85 90 95
 Phe Ser Val Glu Leu Gln Leu Pro Pro Lys Ala Ala Ala Leu Ala His

	610		615		620	
	Phe Ser Trp Glu Arg Tyr Gln Leu Ala Val Thr Gln Arg Lys Glu Glu					
	625		630		635	640
	Glu Pro Ser Ser Ser Ser Val Phe Asn Gln Asn Asp Pro Trp Ala Pro					
5		645		650		655
	Thr Val Asp Phe Ser Asp Phe Ile Asn Asn Glu Thr Ile Ala Gly Lys					
		660		665		670
	Asp Leu Val Ala Trp Val Thr Ala Gly Phe Leu His Ile Pro His Ala					
		675		680		685
10	Glu Asp Ile Pro Asn Thr Val Thr Val Gly Asn Gly Val Gly Phe Phe					
	690		695		700	
	Leu Arg Pro Tyr Asn Phe Phe Asp Glu Asp Pro Ser Phe Tyr Ser Ala					
	705		710		715	720
	Asp Ser Ile Tyr Phe Arg Gly Asp Gln Asp Ala Gly Ala Cys Glu Val					
15		725		730		735
	Asn Pro Leu Ala Cys Leu Pro Gln Ala Ala Ala Cys Ala Pro Asp Leu					
		740		745		750
	Pro Ala Phe Ser His Gly Gly Phe Ser His Asn					
		755		760		
20	<210>	2				
	<211>	2292				
	<212>	DNA				
	<213>	Homo sapiens				
	<400>	2				
25	atgaaccaga agacaatcct cgtgctcctc attctggccg tcatcaccat cttgccttg					60
	gtttgtgtcc tgctggtggg caggggtgga gatgggggtg aaccagcca gcttcccat					120
	tgcccctctg tatctcccag tgcccagcct tggacacacc ctggccagag ccagctgttt					180
	gcagacctga gccgagagga gctgacggct gtgatgcgct ttctgacca gcggctgggg					240
	ccagggctgg tggatgcagc ccaggcccgg ccctcggaca actgtgtctt ctcagtggag					300
30	ttgcagctgc ctccaaggc tgcagccctg gctcacttgg acagggggag cccccacct					360
	gcccgggagg cactggccat cgtcttcttt ggcaggcaac cccagcccaa cgtgagtgg					420
	ctggtggtgg ggccactgcc tcaccctcc tacatgcggg acgtgactgt ggagcgtcat					480

ggaggccccc tgcctatca cgcagcccc gtgctgttcc aagagtacct ggacatagac 540
 cagatgatct tcaacagaga gctgccccag gcttctgggc ttctccacca ctgttgcttc 600
 tacaagcacc ggggacggaa cctggtgaca atgaccacgg ctccccgtgg tctgcaatca 660
 ggggaccggg ccacctggtt tggcctctac tacaacatct cgggagctgg gttcttctg 720
 5 caccacgtgg gcttgagct gctagtgaac cacaaggccc ttgaccctgc ccgctggact 780
 atccagaagg tgttctatca aggccgctac tacgacagcc tggcccagct ggaggcccag 840
 ttgaggccg gcctggtgaa tgtggtgctg atccagaca atggcacagg tgggtcctgg 900
 tccctgaagt cccctgtgcc cccgggtcca gctccccctc tacagttcta tccccaaaggc 960
 ccccgttca gtgtccaggg aagtcgagtg gcctcctcac tgtggacttt ctctttggc 1020
 10 ctcgagcat tcagtggccc aaggatcttt gacgttcgct tccaaggaga aagactagtt 1080
 tatgagataa gcctccaaga ggccttgccc atctatggtg gaaattcccc agcagcaatg 1140
 acgaccgct atgtggatgg aggccttggc atgggcaagt acaccacgcc cctgaccctg 1200
 ggggtggact gccctactt ggccacctac gtggactggc acttcctttt ggagtcccag 1260
 gcccccaaga caatacgtga tgccttttgt gtgtttgaac agaaccaggg cctccccctg 1320
 15 cggcgacacc actcagatct ctactcgac tactttgggg gtcttgcgga aacggtgctg 1380
 gtcgtcagat ctatgtccac cttgetcaac tatgactatg tgtgggatac ggtcttccac 1440
 cccagtgggg ccatagaaat acgattctat gccacgggct acatcagctc ggcatctctc 1500
 tttggtgcta ctgggaagta cgggaaccaa gtgtcagagc acacctggg cacggtccac 1560
 acccacagcg cccacttcaa ggtgatctg gatgtagcag gactggagaa ctgggtctgg 1620
 20 gccgaggata tggcttttgt ccccatggct gtgccctgga gcctgagca ccagctgcag 1680
 aggtgcagg tgaccggaa gctgctggag atggaggagc aggccgctt cctcgtggga 1740
 agcggcacc ctcgctacct gtacctggcc agcaaccaca gcaacaagtg gggtcacccc 1800
 cggggctacc gcatccagat gctcagcttt gctggagagc cgtgccccca aaacagctcc 1860
 atggcgagag gcttcagctg ggagaggtag cagctggctg tgaccagcg gaaggaggag 1920
 25 gagcccagta gcagcagct tttcaatcag aatgaccctt gggccccac tgtggatttc 1980
 agtgacttca tcaacaatga gaccattgct ggaaaggatt tgggtggcctg ggtgacagct 2040
 ggttttctgc atatcccaca tgcagaggac attcctaaca cagtgactgt ggggaacggc 2100
 gtgggcttct tcctccgacc ctataacttc tttgacgaag acccctcctt ctactctgcc 2160
 gactccatct acttccgagg ggaccaggat gctggggcct gcgaggtcaa cccctagct 2220
 30 tgctgcccc aggtgctgc ctgtgcccc gacctcctg ccttctocca cgggggcttc 2280
 tctcacaact ag 2292

	<211>	37	
	<212>	DNA	
	<213>	Artificial	
	<220>		
5	<223>	iniciador de clonagem inicial - avanço	
	<400>	3	
	aaaagcaggc	ttaggaatga accagaagac aatcctc	37
	<210>	4	
	<211>	35	
10	<212>	DNA	
	<213>	Artificial	
	<220>		
	<223>	iniciador de clonagem inicial - reverso	
	<400>	4	
15	caagaaagct	gggtcctagt tgtgagagaa gcccc	35
	<210>	5	
	<211>	34	
	<212>	DNA	
	<213>	Artificial	
20	<220>		
	<223>	Iniciador universal - avanço	
	<400>	5	
	ggggacaagt	ttgtacaaaa aagcaggctt agga	34
	<210>	6	
25	<211>	30	
	<212>	DNA	
	<213>	Artificial	
	<220>		
	<223>	iniciador universal - reverso	
30	<400>	6	
	ggggaccact	ttgtacaaga aagctgggtc	30
	<210>	7	

<211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 5 <223> sequência de iniciador de avanço para clonagem de SSAO de comprimento com 6xHIS etiquetada C-terminal
 <400> 7
 aaaagcaggc ttaggaatga accagaagac aatcctc 37
 <210> 8
 10 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> sequência de iniciador de reverso para clonagem de SSAO de comprimento com 6xHIS etiquetada C-terminal
 15 <400> 8
 caagaaagct ggtcctagt tgtgagagaa gccccctgg 40
 <210> 9
 <211> 37
 20 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> sequências de iniciador reverso para clonagem de SSAO de comprimento total com etiqueta 6xHIS C-terminal
 25 <400> 9
 aaaagcaggc ttaggaatga accagaagac aatcctc 37
 <210> 10
 <211> 58
 <212> DNA
 30 <213> Artificial
 <220>
 <223> sequências de iniciador reverso para clonagem de SSAO de comprimento

mento total com etiqueta 6xHIS C-terminal

<400> 10

caagaaagct gggtcctaat ggtgatggtg atggtggtg tgagagaagc ccccgtagg 58

<210> 11

5 <211> 41

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> sequências de iniciador de avanço para clonagem de SSAO não-

10 etiquetada N-terminal truncada

<400> 11

aaaagcaggc ttaggaatgg gcaggggtgg agatgggggt g 41

<210> 12

<211> 35

15 <212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> sequências de iniciador reverso para clonagem de SSAO não-

20 etiquetada N-terminal truncada

<400> 12

caagaaagct gggtcctagt tgtgagagaa gccc 35

<210> 13

<211> 41

<212> DNA

25 <213> Artificial

<220>

<223> sequências de iniciador de avanço para clonagem de SSAO N-

terminal truncada de etiqueta 6xHIS C-terminal

<400> 13

30 aaaagcaggc ttaggaatgg gcaggggtgg agatgggggt g 41

<210> 14

<211> 58

<212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> sequências de iniciador reverso para clonagem de SSAO N-terminal
 5 truncada de etiqueta 6xHIS C-terminal
 <400> 14
 caagaaagct gggcctaat ggtgatggtg atggtggttg tgagagaagc ccccgtagg 58
 <210> 15
 <211> 38
 10 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> sequências de iniciador de avanço para clonagem de domínio cata-
 lítico de SSAO não-etiquetada
 15 <400> 15
 aaaagcaggc ttaggaatga ccacggctcc ccgtaggtc 38
 <210> 16
 <211> 35
 <212> DNA
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> sequências de iniciador reverso para clonagem de domínio catalí-
 tico de SSAO não-etiquetada
 <400> 16
 25 caagaaagct gggcctagt tgtgagagaa gcccc 35
 <210> 17
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> sequências de iniciador de avanço para clonagem de domínio cata-
 lítico de SSAO com etiqueta 6xHIS C-terminal

<400> 17
aaaagcaggc ttaggaatga ccacggctcc ccgtggtc 38

<210> 18
<211> 58

5 <212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> sequências de iniciador reversa para clonagem de domínio catalí-
tico de SSAO com etiqueta 6xHIS C-terminal

10 <400> 18
caagaaagct ggtcctaata ggtgatggtg atggtggttg tgagagaagc cccgtgg 58

REIVINDICAÇÕES

1. Método de identificação de estabilidade metabólica de um agente de teste devido ao metabolismo catalisado de amina oxidase sensível à semicarbazida (SSAO), o método compreendendo:

- 5 a) cultura das células que expressam SSAO;
- b) adição de um agente de teste às células;
- c) incubação do agente de teste com as células por um período de tempo predeterminado;
- d) medição da quantidade do agente de teste remanescente na presença das células compreendendo SSAO expressa no período de tempo predeterminado; e
- 10 e) comparação da quantidade do agente de teste no período de tempo predeterminado à quantidade de agente de teste em um controle para determinar um valor no qual o valor identifica a estabilidade metabólica do agente de teste na presença de células compreendendo SSAO expressa.
- 15

2. Método de identificação de estabilidade metabólica de um agente de teste radioetiquetado devido ao metabolismo catalisado de amina oxidase sensível à semicarbazida (SSAO), o método compreendendo:

- 20 a) cultura das células que expressam SSAO;
- b) adição de um agente de teste radioetiquetado às células;
- c) incubação do agente de teste radioetiquetado com as células por um período de tempo predeterminado; e
- d) medição da quantidade do agente de teste radioetiquetado remanescente na presença das células compreendendo SSAO expressa no período de tempo predeterminado; no qual a percentagem de agente de teste radioetiquetado que foi metabolizada identifica a estabilidade metabólica do agente de teste radioetiquetado na presença das células compreendendo SSAO expressa.
- 25

3. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou reivindicação 2, em que as células que expressam SSAO são produzidas por transfecção transiente ou estável das células com DNA que codifica SSAO.

30

4. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou reivindicação 2,

em que as células que expressam SSAO são procarióticas.

5. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou reivindicação 2, em que as células que expressam SSAO são eucarióticas.

6. Método de identificação da estabilidade metabólica de um agente de teste devido ao metabolismo catalisado de SSAO em uma amostra biológica, o método compreendendo:

- a) obtenção de uma amostra biológica compreendendo SSAO;
- b) adição de um agente de teste à amostra biológica;
- c) incubação do agente de teste com a amostra biológica por um período de tempo predeterminado;
- d) medição da quantidade do agente de teste no período de tempo predeterminado; e
- e) comparação da quantidade do agente de teste no período de tempo predeterminado à quantidade de agente de teste em um controle para determinar um valor no qual o valor identifica a estabilidade metabólica do agente de teste na presença de uma amostra biológica compreendendo SSAO.

7. Método de identificação da estabilidade metabólica de um agente de teste radioetiquetado devido ao metabolismo catalisado de SSAO em uma amostra biológica, o método compreendendo:

- a) obtenção de uma amostra biológica compreendendo SSAO;
- b) adição de um agente de teste radioetiquetado à amostra biológica;
- c) incubação do agente de teste radioetiquetado com a amostra biológica por um período de tempo predeterminado; e
- d) medição da quantidade do agente de teste radioetiquetado no período de tempo predeterminado, no qual a percentagem de agente de teste radioetiquetado que não foi metabolizada identifica a estabilidade metabólica do agente de teste na presença de uma amostra biológica compreendendo SSAO.

8. Método, de acordo com a reivindicação 6 ou reivindicação 7, em que a amostra biológica é selecionada a partir do grupo consistindo em

sangue, plasma, soro, artéria, cordão umbilical, fígado, íleo, e pulmão.

9. Método, de acordo com a reivindicação 8, em que a amostra biológica é de um indivíduo humano.

5 10. Método, de acordo com a reivindicação 8, em que a amostra biológica é de um indivíduo não-humano.

11. Método, de acordo com a reivindicação 9 ou reivindicação 10, em que o indivíduo humano ou não-humano é manipulado antes da obtenção da amostra biológica.

10 12. Método, de acordo com a reivindicação 11, em que a manipulação do indivíduo humano ou não-humano é selecionada a partir do grupo consistindo em tratamento com um ou mais fármacos, indução de um ou mais aspectos de um estado de doença, manipulação cirúrgica e alteração genética.

15 13. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou reivindicação 6, em que a quantidade de agente de teste é determinada por uma técnica selecionada a partir do grupo consistindo em espectrometria de massa, cromatografia líquida de alta pressão, cromatografia líquida/espectrometria de massa, cromatografia líquida/espectrometria de massa/espectrometria de massa e cromatografia líquida/detecção radiométrica.

20 14. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou reivindicação 6, em que uma ou mais etapas são realizadas por um dispositivo robótico.

25 15. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou reivindicação 6, em que a estabilidade metabólica do agente de teste é determinada por medição de um ou mais metabólitos do agente de teste em adição a ou no lugar da medição do agente de teste.

16. Método de determinar um perfil de estabilidade metabólica de um agente de teste, o método compreendendo:

30 a) obtenção do valor de estabilidade metabólica do agente de teste incubado na presença da célula compreendendo SSAO expressa usando-se o método como definido na reivindicação 1;

b) obtenção de uma amostra biológica compreendendo SSAO;

c) adição de um agente de teste à amostra biológica;

d) incubação do agente de teste com a amostra biológica por um período de tempo predeterminado;

e) medição da quantidade do agente de teste no período de tempo predeterminado; e

5 f) comparação da quantidade do agente de teste no período de tempo predeterminado à quantidade de agente de teste em um controle para determinar um valor que identifica a estabilidade metabólica do agente de teste na presença de uma amostra biológica compreendendo SSAO, em que o valor da estabilidade metabólica do agente de teste na presença da célula
10 compreendendo SSAO expressa é comparado ao valor de estabilidade metabólica do agente de teste na presença de uma amostra biológica compreendendo SSAO que proporciona o perfil de estabilidade metabólica do agente de teste.

17. Método de determinar o perfil de estabilidade metabólica de um agente de teste radioetiquetado, o método compreendendo:
15

a) obtenção do valor da estabilidade metabólica do agente de teste radioetiquetado incubado na presença do lisato de célula compreendendo SSAO expressa usando-se o método como definido na reivindicação 2;

20 b) obtenção de uma amostra biológica compreendendo SSAO;

c) adição de um agente de teste radioetiquetado à amostra biológica;

d) incubação do agente de teste radioetiquetado com a amostra biológica por um período de tempo predeterminado;

25 e) medição da quantidade do agente de teste radioetiquetado no período de tempo predeterminado; e

f) identificação da estabilidade metabólica do agente de teste radioetiquetado pela percentagem de agente de teste radioetiquetado que não foi metabolizada no período de tempo predeterminado, em que o valor da estabilidade metabólica do agente de teste radioetiquetado na presença
30 de lisato de célula compreendendo SSAO expressa é comparado ao valor de estabilidade metabólica do agente de teste radioetiquetado na presença de

uma amostra biológica compreendendo SSAO que proporciona o perfil de estabilidade metabólica do agente de teste.

Seqüência de amino ácido de SSAO humana
ACESSO Q16853

MNQKTILVLL ILAVITIFAL VCVLLVGRGG DGGEPSQLPH CPSVSPSAQP
WTHPGQSOLF 60
ADLSREELTA VMRFLTQRLG PGLVDAAQAR PSDNCVFSVE LQLPPKAAAL
AHLDRGSPPP 120
AREALAIFFF GRQPQPNVSE LVVGPLPHPS YMRDVTVERH GGPLPYHRRP
VLFQEYLDID 180
QMIFNRELPQ ASGLLHHCCF YKHRGRNLVT MTTAPRGLQS GDRATWFGLY
YNISGAGFFL 240
HHVGLELLVN HKALDPARWT IQKVFYQGRY YDSLAQLEAQ FEAGLVNVVL
IPDNGTGGSW 300
SLKSPVPPGP APPLQFYYPQG PRFSVQGSRV ASSLWTFSG LGAFSGPRIF
DVRFQGERLV 360
YEISLQEALA IYGGNSPAAAM TTRYVDGGFG MGKYTTPLTR GVDCPYLATY
VDWHFLLESQ 420
APKTIRDAFC VFEQNQGLPL RRHSDLYSH YFGGLAETVL VVRSMSTLLN
YDYVWDTVFH 480
PSGAIEIRFY ATGYISSAFL FGATGKYGNQ VSEHTLGT VH THSAHFKVDL
DVAGLENWWW 540
AEDMVFPMA VPWSPEHQLQ RLQVTRKLE MEEQAAFLVG SATPRYLYLA
SNHSNKWGHP 600
RGYRIQMLSF AGEPLPQNSS MARGFSWERY QLAVTQRKEE EPSSSSVFNQ
NDPWAPTVDV 660
SDFINNETIA GKDLVAWVTA GFLHIPHAED IPNTVTVGNG VGFFLRPYNF
FDEDPSFYSA 720
DSIYFRGDQD AGACEVNPLA CLPQAAACAP DLPAFSHGGF SHN

FIG. 1

Seqüência de Nucleotídeo de SSAO humana (NM_003734)

ATGAACCAGA AGACAATCCT CGTGCTCCTC ATTCTGGCCG TCATCACCAT
 CTTTGCCTTG 60
 GTTTGTGTCC TGCTGGTGGG CAGGGGTGGA GATGGGGGTG AACCCAGCCA
 GCTTCCCAT 120
 TGCCCCTCTG TATCTCCCAG TGCCCAGCCT TGGACACACC CTGGCCAGAG
 CCAGCTGTTT 180
 GCAGACCTGA GCCGAGAGGA GCTGACGGCT GTGATGCGCT TTCTGACCCA
 GCGGCTGGGG 240
 CCAGGGCTGG TGGATGCAGC CCAGGCCCGG CCCTCGGACA ACTGTGTCTT
 CTCAGTGGAG 300
 TTGCAGCTGC CTCCAAGGC TGCAGCCCTG GCTCACTTGG ACAGGGGGAG
 CCCCCACCT 360
 GCCCGGGAGG CACTGGCCAT CGTCTTCTTT GGCAGGCAAC CCCAGCCCAA
 CGTGAGTGAG 420
 CTGGTGGTGG GGCCACTGCC TCACCCCTCC TACATGCGGG ACGTGACTGT
 GGAGCGTCAT 480
 GGAGGCCCCC TGCCCTATCA CCGACGCCCC GTGCTGTTCC AAGAGTACCT
 GGACATAGAC 540
 CAGATGATCT TCAACAGAGA GCTGCCCCAG GCTTCTGGGC TTCTCCACCA
 CTGTTGCTTC 600
 TACAAGCACC GGGGACGGAA CCTGGTGACA ATGACCACGG CTCCCCGTGG
 TCTGCAATCA 660
 GGGGACCGGG CCACCTGGTT TGGCCTCTAC TACAACATCT CGGGCGCTGG
 GTTCTTCCTG 720
 CACCACGTGG GCTTGGAGCT GCTAGTGAAC CACAAGGCC TTGACCCTGC
 CCGCTGGACT 780
 ATCCAGAAGG TGTTCTATCA AGGCCGCTAC TACGACAGCC TGGCCCAGCT
 GGAGGCCCAG 840
 TTTGAGGCCG GCCTGGTGAA TGTGGTGCTG ATCCCAGACA ATGGCACAGG
 TGGGTCCTGG 900
 TCCCTGAAGT CCCCTGTGCC CCCGGGTCCA GCTCCCCCTC TACAGTTCTA
 TCCCAAGGC 960
 CCCCCTTCA GTGTCCAGGG AAGTCGAGTG GCCTCCTCAC TGTGGACTTT
 CTCTTTGGC 1020
 CTCGGAGCAT TCAGTGGCCC AAGGATCTTT GACGTTGCT TCCAAGGAGA
 AAGACTAGTT 1080
 TATGAGATAA GCCTCCAAGA GGCCTTGGCC ATCTATGGTG GAAATTCCCC
 AGCAGCAATG 1140
 ACGACCCGCT ATGTGGATGG AGGCTTTGGC ATGGGCAAGT ACACCACGCC
 CCTGACCCGT 1200
 GGGGTGGACT GCCCCTACTT GGCCACCTAC GTGGACTGGC ACTTCCTTTT
 GGAGTCCCAG 1260
 GCCCCCAAGA CAATACGTGA TGCCTTTTGT GTGTTTGAAC AGAACCAGGG
 CCTCCCCCTG 1320
 CGGCGACACC ACTCAGATCT CTACTIONGAC TACTTTGGGG GTCTTGCGGA
 AACGGTGCTG 1380

FIG. 2

GTCGTCAGAT CTATGTCCAC CTTGCTCAAC TATGACTATG TGTGGGATAC
GGTCTTCCAC 1440
CCCAGTGGGG CCATAGAAAT ACGATTCTAT GCCACGGGCT ACATCAGCTC
GGCATTCTC 1500
TTTGGTGCTA CTGGGAAGTA CGGGAACCAA GTGTCAGAGC ACACCCTGGG
CACGGTCCAC 1560
ACCCACAGCG CCCACTTCAA GGTGGATCTG GATGTAGCAG GACTGGAGAA
CTGGGTCTGG 1620
GCCGAGGATA TGGTCTTTGT CCCCATGGCT GTGCCCTGGA GCCCTGAGCA
CCAGCTGCAG 1680
AGGCTGCAGG TGACCCGGAA GCTGCTGGAG ATGGAGGAGC AGGCCGCCTT
CCTCGTGGGA 1740
AGCGCCACCC CTCGCTACCT GTACCTGGCC AGCAACCACA GCAACAAGTG
GGGTCACCCC 1800
CGGGGCTACC GCATCCAGAT GCTCAGCTTT GCTGGAGAGC CGCTGCCCCA
AACAGCTCC 1860
ATGGCGAGAG GCTTCAGCTG GGAGAGGTAC CAGCTGGCTG TGACCCAGCG
GAAGGAGGAG 1920
GAGCCCAGTA GCAGCAGCGT TTTCAATCAG AATGACCCTT GGGCCCCAC
TGTGGATTC 1980
AGTGACTTCA TCAACAATGA GACCATTGCT GGAAAGGATT TGGTGGCCTG
GGTGACAGCT 2040
GGTTTTCTGC ATATCCCACA TGCAGAGGAC ATTCCTAACA CAGTGACTGT
GGGAACGGC 2100
GTGGGCTTCT TCCTCCGACC CTATAACTTC TTTGACGAAG ACCCCTCCTT
CTACTCTGCC 2160
GACTCCATCT ACTTCCGAGG GGACCAGGAT GCTGGGGCCT GCGAGGTCAA
CCCCTAGCT 2220
TGCCTGCCCC AGGCTGCTGC CTGTGCCCCC GACCTCCCTG CCTTCTCCCA
CGGGGGCTTC 2280
TCTCACA ACT AG 2292

FIG. 2
(Continuação)

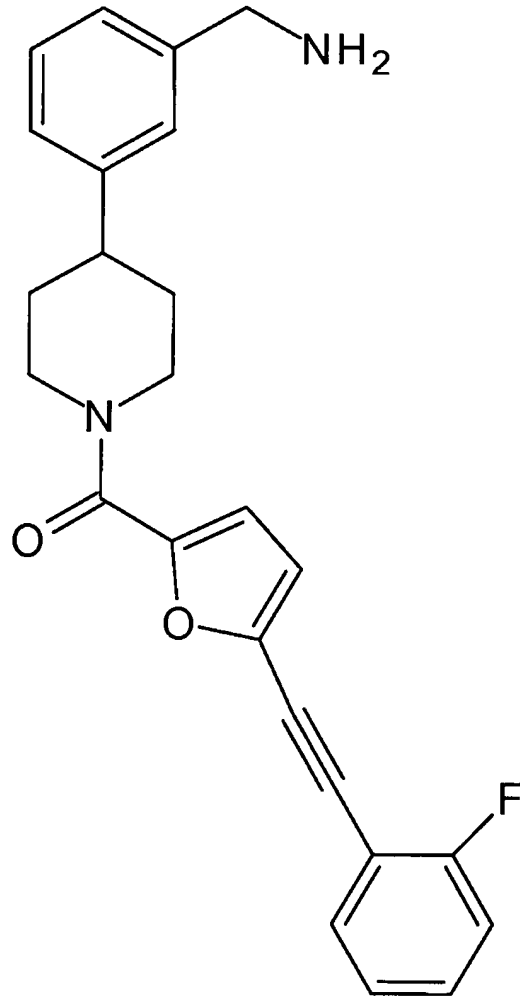


FIG. 3

RESUMO

Patente de Invenção: **"MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DA ESTABILIDADE DE METILENOAMINAS ORGÂNICAS NA PRESENÇA DE AMINA OXIDASE SENSÍVEL À SEMICARBAZIDA"**.

5 A presente invenção refere-se a métodos para determinar a estabilidade de metilenoamina, compostos similares à metilenoamina ou compostos contendo uma porção de metilenoamina na presença de amina oxidase sensível à semicarbazida (SSAO) ou uma amostra biológica contendo atividade de SSAO. Os métodos descritos podem ser configurados em um
10 formato de ensaio para aplicações de classificação de alta produção.

PI0806321-4

RESUMO

Patente de Invenção: "MÉTODOS PARA IDENTIFICAÇÃO DA ESTABILIDADE DE METILENOAMINAS ORGÂNICAS NA PRESENÇA DE AMINA OXIDASE SENSÍVEL À SEMICARBAZIDA E PARA DETERMINAÇÃO DO PERFIL DA MESMA".

A presente invenção refere-se a métodos para determinar a estabilidade de metilenoamina, compostos similares à metilenoamina ou compostos contendo uma porção de metilenoamina na presença de amina oxidase sensível à semicarbazida (SSAO) ou uma amostra biológica contendo atividade de SSAO. Os métodos descritos podem ser configurados em um formato de ensaio para aplicações de classificação de alta produção.