

(11) Patento numeris: **6626** (51) Int. Cl. (2019.01): **C12N 15/00**
C07H 19/00
(21) Paraiškos numeris: **2017 533** **C12Q 1/00**
A61P 35/00

(22) Paraiškos padavimo data: **2017-11-08**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **2019-05-10**

(45) Patento paskelbimo data: **2019-06-10**

(62) Paraiškos, iš kurios dokumentas išskirtas, numeris: —

(86) Tarptautinės paraiškos numeris: —

(86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: —

(85) Nacionalinio PCT lygio procedūros pradžios data: —

(30) Prioritetas: —

(72) Išradėjas:

Jaunius URBONAVIČIUS, LT
Daiva TAURAITĖ, LT
Agota AUČYNAITĖ, LT
Rasa RUTKIENĖ, LT
Rolandas MEŠKYS, LT

(73) Patento savininkas:

Vilniaus Universitetas, Universiteto g. 3, LT-01513 Vilnius, LT

(74) Patentinis patikėtinis/atstovas:

**Jurga PETNIŪNAITĖ, AAA Law, A. Goštauto g. 40B, Verslo centras „Dvyniai”,
LT-03163 Vilnius, LT**

(54) Pavadinimas:

**Izocitozino deaminazės/5-fluorizocitozino fermento/provaisto pora vėžio genų
terapijai**

(57) Referatas:

Išradimas skirtas onkologinių susirgimų genų terapijos būdai panaudojant naują fermento izocitozino deaminazės ir provaisto 5-fluorizocitozino porą. Naujai atrasti fermentai – izocitozino deaminazės - verčia naują provaistą 5-fluorizocitoziną toksišku vaistu 5-fluoruracilu, kuris gali būti panaudotas įvairių vėžinių susirgimų gydymui ir ląstelių mechanizmų tyrimams.

Išradimo sritis

Išradimas susijęs su nauju onkologinių susirgimų genų terapijos būdu. Genų terapijos pagalba norimi genai yra nutaikomi į vėžines ląsteles. Šių genų raiškos poveikyje ląstelės yra sunaikinamos dėl netoksiškų provaistų vartojimo vaistais ir išskyrimo į aplinką šalia vėžinių ląstelių.

Išradimo technikos lygis

Bendras mirtingumas nuo vėžinių susirgimų didėjo didžiąją 20-ojo amžiaus dalį, labiausiai dėl išaugusio tabako vartojimo ir to sukeliama plaučių vėžio. Stabilus rūkymo mažinimas, o taip pat vėžio prevencijos, ankstyvos detekcijos bei gydymo vystymasis per pastaruosius 20 metų bendrą mirtingumą nuo vėžinių susirgimų sumažino 23 % (Siegel et al., 2016). Nepaisant to, vėžys išlieka antra pagrindine mirties priežastimi visame pasaulyje. Kai kurios vėžio formos, pvz., smegenų navikai, gali labai greitai progresuoti pačiuose būtiniausiuose organuose, dėl ko mirtingumas nuo šios vėžio formos yra labai didelis. Kitos vėžio rūšys, pvz., kiaušidžių ar kasos, gali progresuoti iki pažengusių stadijų beveik be jokių simptomų, kas irgi didina mirtingumą. Gaubtinės žarnos, prostatos ar krūtų vėžiai, nors ir ne visuomet mirtini, stipriai pakeičia įvairius paciento gyvenimo kokybės aspektus. Piktybiniai navikai, kurie skleidžia metastazes į įvairius organus ir juose išlieka nepastebėti yra praktiškai neišgydomi lokaliai, be to – sunkiai gydomi net ir sisteminėmis terapijomis. Tokios vėžio formos yra atsakingos už net 90 % visų mirčių, susijusių su vėžiniais susirgimais (Malecki, 2012).

Vėžinės ligos pasižymi nekontroliuojamu ir invaziniu ląstelių augimu, kuris atsiranda dėl DNR ar chromatinio pakitimų – tokių ląstelių dauginimosi reguliavimas yra sutrikęs, jos išstumia ir naikina aplinkinius audinius, gali plisti per kraują ar limfą į kitas organizmo vietas ir ten formuoti metastazes. Vėžys gali pažeisti bet kurį organą ar audinį, kiekvienas piktybinis navikas yra skirtingas, jam būdingas nevienodas augimo greitis, polinkis plisti. Vėžio simptomai priklauso nuo jo rūšies ir išplitimo, organų ir audinių pažeidimo laipsnio. Šie skirtumai yra svarbiausia kliūtis ieškant efektyvaus gydymo. Pagrindinis vėžio terapijos tikslas – sunaikinti visas vėžines ląsteles nepakenkiant sveikoms, ką sunku pasiekti vėžio gydymui naudojamomis įvairiomis terapijomis: chirurgine, spinduline, chemine, fotodinamine, hipertermine ir kt. (Jain, 2001). Viena perspektyviausių ir šiuo metu aktyviai vystoma bei tiriama strategija yra genų terapija, kuri turi daugiausiai potencialo naikinti vien tik vėžines ląsteles,

nekenkdama sveikoms. Jos veiksmingumas priklauso nuo pagrindinių trijų komponentų: fermento, provaisto ir vektoriaus (fermentą koduojančio geno nukreipimo į vėžines ląsteles sistemos) (Malekshah et al., 2016). Genų terapijos pagalba norimi genai yra nutaikomi į vėžines ląsteles. Šių genų raiškos (fermento) poveikyje ląstelės yra sunaikinamos dėl netoksiškų provaistų virstimo vaistais ir išskyrimo į aplinką šalia vėžinių ląstelių arba jų viduje. Kaip vektoriai tokių genų pernešimui yra naudojami virusai, bakterijos ar kitos ląstelės, pasižyminčios migracija link vėžinių auglių bei mikrometastazių (Patyar et al., 2010; Stuckey et al., 2014). Šiuo metu tiriama daug vėžio genų terapijos fermentų-provaistų kombinacijų – keletas pavyzdžių aprašyti žemiau.

Herpes simplex viruso timidino kinazės-gancikloviro sistema (HSVTK/GCV).

Timidino kinazė (TK) yra reikalinga *Herpes simplex* viruso (HSV) reaktyvacijai iš latentinės fazės. TK inicijuoja timidino fosforilinimą iki timidino monofosfato, kurį ląstelinės kinazės toliau paverčia timidino trifosfatu. Šis mechanizmas yra būtinas virusinės DNR replikacijai ląstelėse šeimininkėse. Nepaisant savo tiesioginės funkcijos, *herpes* viruso TK (HSV TK) yra naudojama sintetiniam guanozino analogui (ganciklovirui, GCV) aktyvinti (fosforilinti), šį aktyvintą GCV monofosfatą ląstelinės kinazės paverčia toksišku GCV trifosfatu (GCV-TP). GCV-TP ląstelėje konkuruoja su deoksiguanozino trifosfatu. GCV-TP įjungimas į DNR struktūrą sukelia viengrandinius DNR trūkius ir galiausiai ląstelinės DNR polimerazės inhibiciją. HSV TK yra 1000 kartų giminingesnė GCV, lyginant su citozolinėmis timidino kinazėmis, todėl pirmąjį GCV fosforilinimą daugiausia atlieka virusinė TK. HSVTK/GCV sistema veikia tik besidalijančias ląsteles, kuriose blokuoja DNR sintezę, stabdo ląstelės ciklą S ir G2 fazėse, sukelia mitochondrijų pažeidimus, ląstelės žūva dėl nekrozės ir apoptozės, o ne dėl tiesioginio cheminio toksiškumo. HSVTK/GCV sistema yra dažniausiai naudojama ikiklinikiniams vėžio genų terapijos tyrimams, lyginant su kitomis genų terapijos sistemomis. Nepaisant to, susiduriama su keletu problemų. Daugelyje vėžinių audinių jungtys tarp ląstelių nėra normalios, todėl naudojant HSVTK/GCV ne visuomet veikia vadinamasis „kaimyno efektas“ (angl. bystander effect), kuris tiesiogiai priklauso nuo aktyvaus transporto per ląstelines jungtis, kuomet vyksta toksiškų medžiagų difuzija į gretimas ląsteles per ląstelines jungtis. Šis efektas dažniausiai yra naudingas, nes jo dėka sunaikinamos ne tik tos ląstelės, kuriose vyksta provaisto virstimas vaistu, bet ir greta esančios. Taip pat, problemų kelia HSVTK

giminingumas savo natūraliam substratui timidinui – nepaisant to, kad HSVTK efektyviau fosforilina GCV, pastarojo dozės, reikalingos efektyviai konkurencijai su timidinu, yra gerokai per didelės ir sukelia nespecifinį toksiškumą organizmui (stiprų kaulų čiulpų ir imuninės sistemos slopinimą, lėtą ir nepilną vėžinių ląstelių žūtį). Šios problemos yra sprendžiamos įvairiais būdais: mutuoiant HSVTK ir keičiant jos savybes (Karjoo et al., 2016). Patente WO1997035024 yra aprašomos modifikuotos (pakeista baltymo aminorūgščių seka) HSVTK, efektyviau fosforilinančios guanozino analogus. Kartu su jomis naudojami papildomi ne žmoginės kilmės fermentai, reikalingi efektyviau fosforilinti provaistus iki veiklių trifosfatų. Šis išradimas sumažina reikalingas GCV (gancikloviro), acikloviro ar pencikloviro provaisto dozes, o taip pat padidina „kaimyno efektą“. Tačiau nepaisant pagerinto HSVTK/GCV terapijos efektyvumo, vis tiek išlieka bendrojo toksiškumo organizmui problema.

Citochromo P450/oksazafosforino sistema. Citochromo fermentai yra svarbūs ksenobiotikų metabolizmui todėl, kad jų dėka toksiški junginiai kepenyse yra deaktivuojami. Be to, jie gali aktyvinti oksazafosforino junginius. Oksazafosforinai yra priešvėžinių vaistų grupė, kuriai priklauso ciklofosfamidai ir ifosfamidai. Abu šiuos alkilinančius junginius citochromo P450 fermentai verčia hidroksilintais dariniais. Gauti metabolitai toliau dalyvauja cheminėse reakcijose, kol galų gale sudaro konjugatus su ląstelės DNR, nuo ko šios ląstelės žūva. Reaktyvios metabolitų formos pereina į aplinkines ląsteles nepriklausomai nuo ląstelinių jungčių, todėl „kaimyno efektas“ naudojant citochromo P450/oksazafosforino sistemą yra stiprus. Kitas jos privalumas – mažesnis negu kitų sistemų imunogeniškumas dėl natūralių P450 fermentų žmogaus organizme. Tačiau vienas pagrindinių sistemos trūkumų irgi kyla dėl tos pačios priežasties – provaistai yra metabolizuojami kepenyse, kas toksiškai veikia širdį, neuronus bei inkstus, be to slopina kaulų čiulpus. Todėl pagrindinis iššūkis pritaikant šią sistemą yra rasti būdus, kaip slopinti kepenų citochromo P450 fermentus, kad provaistai virstų toksiškais tik vėžiniuose audiniuose. Tai bandoma pasiekti kombinuojant šią sistemą su kitais vaistais, inhibuojančiais kepenų fermentus, arba modifikuojant naudojamą P450 fermentą, tobulinant jo pristatymą į vėžines ląsteles ir pan. (Roy ir Waxman, 2006). Patente US20170071959 yra aprašomi nauji oksazafosforinų dariniai susiorganizuojantys į nanodaleles, jų farmacinės sudėties ir terapinis pritaikymas vėžio gydymui. Išradimo privalumas – tai, jog šių darinių aktyvinimui nereikalingas citochromas P450, kas sumažina jų metabolizmą kepenyse

ir bendrąjį toksinį poveikį organizmui.

Nitroreduktazės/CB1954 sistema. Ši sistema sudaryta iš grupės fermentų nitroreduktazių (NTR), kurie gali aktyvuoti tokius provaistus, kaip pvz., CB1954 (5-(aziridin-1-il)-2,4-dinitro-benzamidas). Tiriamos dvi fermentų klasės ir keturi provaistų tipai. Fermentai skirstomi pagal jautrumą deguoniui. I tipo NTR gali sudaryti nitrozo, hidroksilamino ir/ar amino grupes turinčius produktus esant molekulinio deguonies. II tipo NTR gali sudaryti šiuos produktus nesant deguonies. Keturi provaistų tipai yra: dinitroaziridinilbenzamidai, dinitrobenzamidų bischloroalkilaminai, 4-nitrobenzilkarbamatai ir nitroindolinai. Dažniausiai naudojamas provaistas CB1954 priklauso dinitrobenzamidams. Šio provaisto metabolitai gali laisvai difunduoti į aplinkines ląsteles, todėl „kaimyno efektas“ yra stiprus. Dėl savo chelatinių savybių jie pažeidžia DNR, ir įvyksta nuo p53 ir ląstelės ciklo nepriklausoma apoptozė, tiek besidalijančiose, tiek nesidalijančiose ląstelėse. Pagrindinė sistemos problema yra silpnas CB1954 aktyvinimas. Tai sprendžiama modifikuojuant nitroreduktazes arba jų substratus – abi strategijos duoda daug žadančių rezultatų. Patente WO2003018788 aprašomi vieną ar daugiau mutacijų (pakeistų aminorūgščių) baltymo sekoje turintys *E. coli* NFSB geno koduojamos nitroreduktazės variantai. Mutacijos yra specialiai parinktos tokios, kurios stipriai padidina šių rekombinantinių baltymų giminingumą provaistui CB1954, lyginant su nemutuotu fermentu. Šis išradimas skirtas spręsti CB1954 aktyvinimo problemą. NTR sistemos panaudotos keletui klinikinių prostatos ir kepenų vėžio gydymo tyrimų, tačiau CB1954 aktyvinimas ir toksiškumas kepenims išlieka pagrindinėmis šios sistemos taikymo klinikoje problemomis (Williams et al., 2015).

Karboksipeptidazės G2/azoto bischloroalkilaminų sistema. Fermentas karboksipeptidazė G2 (CPG2) yra gautas iš *Pseudomonas* bakterijų RS-16 kamieno ir neturi analogo žmogaus organizme. Karboksipeptidazė G2 atskelia glutamo rūgštį nuo azoto bischloroalkilamino pagrindu gautų provaistų pvz., 4-[(2-chloroetil)(2-meziloksietil)amino]benzoil-L-glutamo rūgšties (CMDA). Gauti junginiai be jokių papildomų modifikacijų gali alkilinti DNR. Aktyvios provaisto formos įvairiais būdais jungiasi su DNR grandinėmis ir sukelia apoptozę tiek besidalijančiose, tiek nesidalijančiose ląstelėse. Jos gali difunduoti į gretimas ląsteles nepriklausomai nuo ląstelinių jungčių, todėl sukelia stiprų „kaimyno efektą“. Tai, kad šios sistemos provaistai nėra aktyvuojami natūralių žmogaus fermentų, suteikia jai pranašumą prieš

kitas sistemas. CMDA, kuris buvo pirmasis iš sėkmingų G2 substratų, yra tobulinamas, pvz., jo pagrindu sukurtas provaistas ZD2767P yra 300 kartų aktyvesnis už CMDA. Gerinant fermento aktyvumą, CPG2 genas buvo sulietas su kraujagyslių endotelio augimo faktoriaus (VEGF) genu, dėl ko sekretuojamas CPG2 jungiasi prie VEGF receptorių, o tai sulaiko provaistą CMDA prie vėžinių ląstelių ir sumažina sisteminius pašalinius poveikius organizmui. Patente WO2001085960 aprašomi keletas modifikuotų bakterinių karboksipeptidazių CPG2 variantų. Šių fermentų stabilumas ir katalitinis aktyvumas buvo pagerinti pakeitus tam tikras baltymo sekoje esančias aminorūgštis kitomis. Taip pat šiame išradime patentuojami ir pagerintiems fermentams tinkami įvairūs substratai, sukurti CMDA pagrindu. CPG2/CMDA sistema keliuose skirtinguose klinikiniuose tyrimuose buvo naudojama kartu su navikams specifiniais antikūnais, tačiau imunogeniškumas ir nepakankama fermento-antikūno lokalizacija trukdo sėkmingam tokios sistemos panaudojimui vėžio terapijai (Malekshah et al., 2016).

Citozino deaminazės/5-fluorcitozino (CD/5-FC) sistema. Priešvėžinis vaistas 5-fluoruracilas jau daugiau negu 40 metų yra naudojamas gaubtinės ir tiesiosios žarnos, krūties, galvos bei kaklo navikams gydyti. Jo pašaliniai poveikiai yra kaulų čiulpų slopinimas, mukozitas, dermatitas, viduriavimas, toksinis poveikis širdžiai ir kt. (Papanastasopoulou ir Stebbing, 2014). Bakterinės ir grybelinės citozino deaminazės (CD), kurių žinduolių ląstelėse nėra, verčia provaistą 5-fluorcitoziną (5-FC) toksišku vaistu 5-fluoruracilu (5-FU). Tolesnis 5-FU metabolizmas ląstelėje (Pav. 1) veda prie timino biosintezės sutrikimų („betimininės mirties“ (Peters, 2015)). Viduląsteliniai fermentai verčia 5-FU keletu metabolitų, kurie stabdo RNR, baltymų ir DNR sintezę ląstelėje, slopina timidilato sintetazę ir galų gale įvyksta apoptozė. Esant didelėms 5-FU koncentracijoms vyksta jo įjungimas į iRNR, o tai trukdo normaliam iRNR apdorojimui ir stipriai sutrikdo baltymų sintezę, todėl net ir nesidalijančios vėžinės ląstelės žūva (Garcia-Sanchez et al., 1998). 5-FU, dėl savo mažo dydžio ir neutralaus krūvio, gali lengvai difunduoti į gretimas ląsteles – CD/5-FC sistemos sukeliamas „kaimyno efektas“ nėra priklausomas nuo jungčių tarp ląstelių, tikriausiai dėl to CD/5-FC sistema buvo efektyvesnė už HSVTK/GCV sistemą tiriant poveikį inkstų ir tiesiosios žarnos karcinomoms (Malekshah et al., 2016). Taip pat, 5-FC, bet ne 5-FU, gali difunduoti per hematoencefalinį barjerą – todėl gali būti pritaikyta sunkiai pasiekiamiems smegenų navikams gydyti. Kitas CD/5-FC sistemos privalumas – tai,

jog 5-FU padidina ląstelių jautrumą radioterapijai. Nepaisant išvardintų privalumų, yra keletas CD/5-FC sistemos trūkumų, kurie stabdo jos pritaikymą klinikoje (Karjoo et al., 2016). Visų pirma, natūralios žarnyno bakterijos gali turėti CD ir 5-FC versti į 5-FU – tai sukelia šalutinį bendrą toksiškumą organizmui. Be to, CD yra stipriai gimininga savo natūraliam substratui citozinui – todėl reikia didelių 5-FC dozių. Patente EP1080100 aprašomos CD, kurias koduojančių genų sekos yra modifikuotos taip, kad patentuojamos CD žinduolių ląstelėse 300-500 kartų efektyviau verčia 5-FC į 5-FU negu *E. coli* CD. Patente CA2506329 aprašyta CD iš organizmo *Candida kefyr*, kuri 5-fluorcitoziną verčia 5-fluoruracilu efektyviau negu savo natūralų substratą citoziną uracilu. Šis fermentas daug efektyvesnis negu *E. coli* CD, kuri yra giminingesnė citozinui negu 5-FC. CD iš *Saccharomyces cerevisiae* yra giminingesnė 5-FC negu bakterinės, tačiau ji yra neatspari temperatūros pokyčiams ir trumpai išlieka *in vivo*, todėl yra sunkiai panaudojama klinikiniams tyrimams. Patente US5545548 yra aprašoma mielėse *Saccharomyces cerevisiae* netikėtai atrasta CD, kurios baltymo aminorūgščių seka yra nepanaši į jokių kitų baltymų. Šis fermentas pasižymi gerokai didesniu termostabilumu negu prieš tai tyrimams naudota mielių CD. Klinikiniuose tyrimuose CD/5-FC sistema yra naudojama kartu su HSVTK/GCV sistema tiriant poveikį prostatos vėžiui (Freytag et al., 2007). CD/5-FC sistema buvo panaudota tiriant jos poveikį įvairioms vėžio rūšims – gaubtinės žarnos karcinomai, gliomoms ir kasos vėžiui. Šiuo metu vykdoma keletas klinikinių tyrimų su CD/5-FC sistema. Viename jų genetiškai modifikuotos nervinės kamieninės ląstelės, turinčios bakterinės CD raišką, yra naudojamos kartu su per burną vartojamu 5-FC gydyti pasikartojančioms gliomoms. Kitame I-II fazės klinikiniame tyrime tiriamas naujas APS001F vaistas kartu su rekombinantinėmis *Bifidobacterium longum* bakterijomis, kurios gali produkuoti CD. Taip pat vyksta I fazės klinikinis tyrimas, skirtas III/IV stadijos gliomų gydymui naudojant retrovirusinį vektorių (Toca511) kartu su 5-FC (Malekshah et al., 2016). Be išvardintų, yra tiriama ir daugiau fermento-provaisto porų: purinų nukleozidų fosforilazės/6-metilpurino deoksiribozės (PNP/MEP), krienų peroksidazės/indolo-3-acto rūgšties (HRP/IAA), karboksilesterazės/irinotekano (CE/CPT-11) (Karjoo et al., 2016; Malekshah et al., 2016).

Trumpas išradimo aprašymas

Panaudojus *E. coli* uracilo auksotrofija paremtą genetinę atrankos sistemą, metagenominėse bibliotekose buvo atrasti fermentai, priklausantys nuo metalo

priklausomų hidrolazių šeimai. Šie fermentai, toliau vadinami izocitozino deaminazėmis, geba efektyviai versti 5-fluorizocitoziną (šiuo atveju - naują provaistą) į gerai žinomą ir chemoterapijoje naudojamą vaistą 5-fluoruracilą. Siūloma naudoti naujai atrastų fermentų izocitozino deaminazių ir naujo provaisto 5-fluorizocitozino porą vėžio genų terapijai. Patentuojama sistema pranašesnė už pastaraisiais dešimtmečiais intensyviai tiriamą klasikinių citozino deaminazių bei jų provaisto 5-fluorocitozino sistemą (Yata et al., 2012) pirmiausia dėl to, kad natūrali organizmo mikroflora, tikėtina, neskaido izocitozino (ir taip pat provaisto 5-fluorizocitozino), nes jis nėra gamtoje natūraliai paplitęs. Provaisto virtimas toksišku vaistu vyktų tik ten, kur jis būtų prieinamas fermentams - izocitozino deaminazėms, t.y., konkrečiose numatytose vietose. Ši sistema leistų sumažinti bendrą gydymo provaistu toksiškumą (nespecifinį 5-fluoruracilo susidarymą) organizmui, kas yra viena pagrindinių vėžio genų terapijos problemų.

Išradimo esmė

Išradimo tikslas – naujas onkologinių susirgimų genų terapijos būdas. Genų terapijos pagalba norimi genai yra nutaikomi į vėžines ląsteles, jų raiškos poveikyje netoksiški provaistai yra verčiami vaistais aplinkoje šalia vėžinių ląstelių. Pasinaudojant uracilo auktrofija ir metagenominėmis bibliotekomis buvo atrasti fermentai izocitozino deaminazės, kurios *in vitro* geba efektyviai versti naują provaistą 5-fluorizocitoziną į gerai žinomą ir chemoterapijoje naudojamą vaistą 5-fluoruracilą. Tolesnis 5-fluoruracilo metabolizmas veda prie timino nukleotidų biosintezės sutrikimų ir ląstelių žūties (Pav. 1). Išradimas yra pranašesnis už jau žinomą ir plačiai tiriamą citozino deaminazės/5-fluorocitozino sistemą tuo, kad natūrali žmogaus mikrobioma turi citozino deaminazių raišką, dėl ko atsiranda nepageidaujamas toksiškas poveikis ne vien vėžiniuose audiniuose. Patentuojamos izocitozino deaminazės nėra plačiai paplitę fermentai, jų substratas izocitozinas nėra gamtoje aptinkama medžiaga. Dėl to, yra mažai tikėtina, kad natūrali žmogaus organizmo mikrobioma sugebėtų skaidyti izocitoziną ir tuo pačiu provaistą 5-fluorizocitoziną iki toksiško 5-fluorouracilo. Šia fermentų-provaisto sistema galima sumažinti vieną pagrindinių vėžio genų terapijos problemų – bendrąjį toksiškumą organizmui.

Trumpas paveikslų aprašymas

Pav. 1. Viduląstelinis 5-fluoruracilo veikimas. Sutrumpinimai: 5-FC – 5-fluorocitozinas; 5-FU – 5-fluoruracilas; FUMP – 5-fluoruridino monofosfatas; FUDP – 5-

fluoruridino difosfatas; FUTP – 5-fluoruridino trifosfatas; FdUMP – 5-fluordeoksiuridino monofosfatas (pagal Vermes et al., 2000).

Pav. 2. Išgryninti rekombinantiniai izocitozino deaminazių baltymai. ~5 µg rekombinantinių Vcz-6His (1) ir URA3-6His (2) deaminazių 12% SDS-PAGE gelyje. (S) PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific).

Pav. 3. Fermentų - izocitozino deaminazių (angl. isocytosine deaminases) veikimo schema.

Pav. 4. Rekombinantinių Vcz ir URA3 deaminazių in vitro fermentinio aktyvumo TLC analizė. 1 – citozinas (kontrolė), 2 – citozinas + Vcz deaminazė, 3 – citozinas + URA3 deaminazė, 4 – uracilas (kontrolė), 5 – izocitozinas (kontrolė), 6 – izocitozinas + Vcz deaminazė, 7 – izocitozinas + URA3 deaminazė, 8 – 5-fluorizocitozinas (kontrolė), 9 – 5-fluorizocitozinas + Vcz deaminazė, 10 – 5-fluorizocitozinas + URA3 deaminazė.

Išsamus išradimo aprašymas

Kaip jau minėta, bendrasis toksiškumas organizmui vis dar išlieka opia ir viena pagrindinių vėžio genų terapijos problemų. Ją galėtų padėti spręsti naujos provaistų-fermentų poros. Jeigu netoksiškas provaistas nėra natūraliai organizme aptinkama medžiaga – jis negali būti atpažįstamas žmogaus ar jo mikrofloros fermentų, todėl į aktyvią formą gali būti verčiamas tik naudojant terapijai skirtą fermentą. Fermentas taip pat neturėtų būti panašus į natūraliai organizme esančius fermentus – tuomet išnyktų provaisto ir kitų substratų konkurencijos problema, t.y., provaisto virtimas į toksišką formą būtų apribotas labai konkrečiomis sąlygomis – provaistas būtų aktyvinamas tiktai esant specialiam fermentui, ir jokios papildomos konversijos niekur kitur organizme vykti negali, jeigu ten nėra fermento.

Siekiant išspręsti vėžio genų terapijos bendrojo toksiškumo organizmui problemą yra ieškoma naujų fermento/provaisto porų. Tam pasitelkta *E. coli* uracilo auksotrofija paremta naujų genų paieškos metagenominėse bibliotekose sistema. Substratu naudojant izocitoziną buvo rasti trys nauji genai, koduojantis iki šiol nežinomos fermentus – izocitozino deaminazes (konkrečiais pavadinimais URA4, URA3 ir Vcz), kurie izocitoziną verčia uracilu.

URA4 izocitozino deaminazę koduojantis genas SEQ ID Nr. 1:

ATGAACTCCCTGCTGATCCACAACGCCGCCTGCATCGCCACCTTCGACCACGC
 CGATCCGGCGAAGGGCCGCGAACTCAAGGACGCCTCCCTGTTCTGTGCGCGAC
 AACGTCATCGAGTGATCGGCCCCACCGCCGAGTTGCCGCGCGCGCTGCGCG
 AATCGGCCGGCGAGGTGATCGACGCGCATGGCCACCTGGTCACGCCCCGGGCT
 GGTGAACACACACCACCACATGTACCAGTCGCTCACGCGCGCCATCCCCGGCG
 TGCAGGACGCCGAGCTGTTCTCCTGGCTGCGCGGGCTCTACCCGATCTGGGCC
 GGCCTCACGCCGGAGATGGTGCAGGTTTCGACCCAGGTGGCCATGGCCGAGC
 TGCTGATGAGCGGCTGCACCACCAGCAGCGACCACCTCTACATCTACCCCAAC
 GGGGTGCGGCTGGAGGACAGCATCGAAGCCGCACAGCGCATCGGCATGCGCT
 TCGTGGCCACGCGCGGCAGCATGAGCGTGGGCCAGTCGCAGGGCGGGGCTGC
 CGCCGGACCGCGTGGTGGAAAAGGAAGACGCAATCCTGAAAGACAGCCAGCG
 CCTGATCGAGGCCTGGCACAGCGCCGAACACGGCGCCATGGTGCAGGTGGCA
 CTCGCCCCGTGTTTCGCCGTTCTCGGTACGCCCCGCACTGATGCAGCAGAGCGC
 CGAGCTCGCACGCAGCTTCAAGGGCCAGGGCGTGCGCCTGCACACCCACCTG
 GCCGAGAACGACCACGACATCGCCTACAGCCGCGAGAAGTTCCACATGACGCC
 CGCGCAGTACGCGCAGGAACTGGGCTGGCTGGGCGACGACGTCTGGCACGCG
 CACTGCGTCAAGCTCGACGACGAGGGCATCTCGCTGTTTCGCGGCCAGCCGCAC
 CGGCGTGGCGCACTGCCCCTGCAGCAACATGCGCCTGGGCAGCGGCATCGCG
 CCCGTCCGCCGCATGCTGGACGCCGGGGTGCCGGTGGGCCTGGGCGTGGAC
 GGCAGCGCCAGCAACGACGGCGCGCACATGGTGAACGAGGCGCGGCAGGCG
 CTGCTGCTGGCGCGCGTGGGCCGCGCGCTCTCAGCCCCGAGACCCGCGAAG
 GCAAGACCTTCTTCGGCTGCGACCTCGGCCCGGCCGAGATGACCGCGCGCGA
 CGTGCTGCACATCGCCACCCGCGGTGGCGCGCAGGTGCTGGGCCGCCAAGAC
 ATCGGCCACCTGGCACCGGGCATGTGCGCCGACCTGGCGCTGTTTCGATCTGC
 GCAGCCTGGGCTTTGCCGGCGGTGCGGTGCACGACCCGCTGGCGAGCCTGCT
 GCTGTGTGCCAGCCCGCAGGCGGCCTACACGGTGGTCAACGGTCGGGTGGTG
 GTGCGGGAAGGCCGGCTCGTCACCGTGGACCTTGGCCCACTCGTGGAACGGC
 ACAACCGCCTGGCCATCGAACTGGCGAACGCGGCACGCTGA

URA3 izocitozino deaminazę koduojantis genas SEQ ID Nr. 2:

ATGGCCAAAACACTCTTGGTAAAAAATGCTGAATTGCTGGTAACCATGGATGGT
 CAGCGGCGGGAAATCCGACAAGGGGGGATGTTTCATCGAGGACAACCGGATCG
 TGCAGGTCGGGCCCCGCCGCCGAGTTGCCGCAGACGGCGGACGAGGTGCTGGA
 CCTCAAAGGCAAGGTGGTCATTCCCGGCCTGGTCAACACCCACCACCACATGT

ACCAGAGCCTCACCCGCGTGGTGCCGGCAGCGCAGGACGGTGAGCTGTTCAA
CTGGCTGACCAACCTTTATCCGATCTGGGCACGGCTGACGCCGGAGATGATCC
AGGTCTCCACCCAGACCGCTATGGCCGAGCTGATCCTTTCCGGCTGCACCACC
TCCAGCGACCATCTCTACATCTACCCCAACGGCTGCAAGCTGGACGACAGCATT
CATGCCGCTGGTGAGATCGGCATGCGTTTCCATGCCGCGCGCGGCAGCATGAG
CGTCGGCCGCAGCCAGGGTGGCTTGCCGCCGGATTGCGTGGTGGAGAAGGAA
GCCGATATCCTCAAGGAGTCCCAGCGCCTGATCGAGGATTACCACGACGCCGC
CCATGGTTCGATGCTGCGAGTGGTGGTCGCGCCGTGTTGCGCGTTCTCGGTCA
GCCGTGACCTGATGCGCGAGGCGGCGGTGCTGGCGCGCAATTACGGGGTTTC
CCTGCACACCCACCTGGCCGAGAACGTCAACGACATCGCCTACAGCCGCGAGA
AGTTCGGCATGACCCCGGCGGAATACGCGGAAGACCTGGGTTGGGTGCGTCA
CGACGTCTGGCATGCGCACTGTGTGCAGCTGGACGAACACGGTATCGAGCTGT
TCGCCCCGACGGGGACTGGTGTGCCCATTGCCCATGCTCGAACATGCGCTTG
GCCTCAGGCATCGCCCCGGTACGGCGCATGCGTGATGCCGGCGTGCCGGTCG
GGCTGGGCGTGGATGGCTCGGCCTCCAACGACGGCGCCAGCATGATCGGCGA
AGTACGCCAGGCGCTGCTGTTGCAACGGGTGCGCTTCGGCCCCGGATGCCATGA
CCGCCCCGCGAGGCTCTGGAAATCGCCACCCTGGGCGGTGCCAAGGTGCTCAA
CCGCGACGATATCGGGGCGTTGGCGCCAGGCATGGTGGCGGACTTCGTGCT
TTCGACCTGAACCACATCGCCTATGCCGGCGCGCTGCACGATCCGCTGGCGGC
CCTGGTGTCTGCACCCCGACCCATGTGTCTACCAGTGTGATCAACGGCAAGGT
GGTGGTCCGCGACGGCCAGCTGGTCACGGTCGACCTGCCGCGTGTGCTGGAA
CGCCACAACCAACTGGCTCGTCAATTGGTCATGGGTGAATAG

Vcz izocitozino deaminazę koduojantis genas SEQ ID Nr. 3:

ATGGACAAAAGAACGCTGCTCTTTAAGAACGCGGAATTACTCGTCACGA
TGGATGACGAGCGACGAGAAATTAGAGGTGGTTGCCTGCTGGTGGAGGGAAAT
CGCATCGTTGCCGTTGGCGGTGACGAACTTTGCGCTGCGCCAGCAGATGAAGA
GATAGACCTGCGTGGGCATATCGTTATTCCAGGACTGATCAACACGCATCATCA
TATGTTTCAGTCTTTGACGCGAGTGATACCTGATGCGCAAGACGGAGAGCTGTT
TGATTGGCTAAATAATCTCTATCCATTTGGGCGGGGCTCACCCAGAGATGAT
CCGAATTTGACCCAAACCGCGATGGCAGAATTGATGCTTTCTGGATGCACCAC
CTCCAGCGATCATCTCTACGTTTACCCAAACGGTTGTCGTTTAGATGACAGCATC
GATGGCGCTCGCGAAATCGGCATGCGTTTCCATGCTTGCCGTGGAAGCATGAG
CGTAGGGCGCAGTAAGGGGGGCTTACCTCCAGATGAATTGGTCGAAAATGAGC

AGGCCATTTTAGAAGACTCATTGCGTTTAATTCATAGTTATCACGATGCCCAGCG
 CTATAGCATGCTGCGTATCGCGTTGGCACCTTGCTCGCCTTTCTCCGTTAGCCG
 AGAGTTAATGGTGAAAACAGCGCAGATGGCGCGCGAACAGGGTGTGTCACTTC
 ATACCCATCTGGCTGAAAATGACAGCGATGTGAGCTACAGTCAGACGCATTTTG
 GTATGACGCCAGCGCAGTACGCCGAAGATTTAGGATGGGTCCGAAGCGATGTT
 TGGCATGCACACTGCGTCAAACCTGGACCGCGCAGGGATTTCTGTTGTTTGCGAG
 AACCGGGACAGGTGTGGCGCATTGCCCATGTTCAAATATGAGATTGGCGTCGG
 GTATCGCACCTATTCGTGCGATGCTTGATGAAGGCGTCTCTGTTGGCCTTGGCG
 TTGACGGTTCAGCATCTAACGATGCAGGTAACATGATTGCAGAAACGCGGCAGG
 CAATGCTGTTACAGCGGGTTGGCTTCGGCCCCGATGCGATGAATGCAAGACAG
 GCTTTAGAGATTGCGACGAGAGGCGGGGCGAAAGTACTTAACCGAGATGATATT
 GGCTATTTAGCCACGGGTATGGCCGCCGATTTTGTGCGATTTGATCTCAATACC
 TTGAATCTTGCGGGTGCCAAACACGATCCGCTGGCGGCGTTAGTTTTCTGTACG
 CCAGGGAACGTGGCTTTTCAGCGTGATTAACGGGCAGGTTGTTATCCGCGAAGG
 GGTATTGCAGACCATTGACTTACCTTCGGTTGTGCAACAACACAATCGCTTGGC
 ATGCTTGTTAGTGAACCGGCATCGGCTGTAA

Jau yra žinoma (aprašyta aukščiau) bakterinių citozino deaminazių (CD) ir 5-fluorcitozino (5-FC) fermento/provaisto pora, šiuo metu aktyviai tiriama ir naudojama vėžio genų terapijoje. Kaip jau minėta, CD/5-FC kombinacija nėra ideali dėl to, kad atsiranda bendras toksiškumas organizmui. Patentuojamos izocitozino deaminazės yra fermentai (Pav. 3), skirti naujai sistemai kartu su provaistu 5-fluorizocitozinu. In vitro pademonstruota (Pav. 4), jog rekombinantinės URA3 ir Vcz izocitozino deaminazės geba versti 5-fluorizocitoziną toksišku vaistu 5-fluoruracilu, kurio veikimas ląstelėje (Pav. 1) yra gerai žinomas. Be to, kaip matyti Pav. 4, natūraliai organizme aptinkamas citozinas nėra šių fermentų substratas. Tai įrodo, jog ši sistema gali būti pranašesnė už CD/5-FC sistemą vėžio genų terapijoje. Natūrali organizmo mikroflora neturėtų turėti izocitozino deaminazių funkciją atitinkančių fermentų todėl, jog izocitozinas nėra gamtoje aptinkama medžiaga. Be to, provaistas 5-fluorcitozinas, naudojamas kartu su izocitozino deaminazėmis, turėtų nesukelti bendro sisteminio toksiškumo, o veikti tiksliai tose vietose, kuriose jis būtų prieinamas izocitozino deaminazėms.

Išradimo įgyvendinimo pavyzdžiai

Toliau pateikiami išradimo pavyzdžiai. Išradimas nėra ribojamas šiais

pavyzdžiais.

Pavyzdys 1. DNR konstrukcija, koduojanti Vcz izocitozino deaminazę.

Naudojantis metagenominėje bibliotekoje atrastu DNR fragmentu, oligonukleotidų pradmenimis Vcz 28a FW bei Vcz 28a his RV ir Phusion High-Fidelity PCR Master Mix with HF Buffer PGR reakcijos mišiniu buvo susintetintas DNR fragmentas, koduojantis Vcz izocitozino deaminazės geną, kurio 5' ir 3' galuose atitinkamai įvestos NcoI bei XhoI restrikcijos endonukleazių vietos. Šis fragmentas hidrolizuotas minėtomis restrikcijos endonukleazėmis ir liguotas su atitinkamai paruoštu pET-28a(+) plazmidiniu vektoriumi. Naudojantis standartiniais molekulinės biologijos protokolais (Sambrook ir Russell, 2001) gautos plazmidinės DNR, kurių seka patikrinta sekoskaitos (MacroGen) būdu.

Pavyzdys 2. DNR konstrukcija, koduojanti URA3 izocitozino deaminazę.

Naudojantis metagenominėje bibliotekoje atrastu DNR fragmentu, oligonukleotidų pradmenimis URA3 21b FW bei URA3 21b his RV ir Phusion High-Fidelity PCR Master Mix with HF Buffer PGR reakcijos mišiniu buvo susintetintas DNR fragmentas, koduojantis URA3 izocitozino deaminazės geną, kurio 5' ir 3' galuose atitinkamai įvestos NdeI bei XhoI restrikcijos endonukleazių vietos. Šis fragmentas hidrolizuotas minėtomis restrikcijos endonukleazėmis ir liguotas su atitinkamai paruoštu pET-21b(+) plazmidiniu vektoriumi. Naudojantis standartiniais molekulinės biologijos protokolais (Sambrook ir Russell, 2001) gautos plazmidinės DNR, kurių seka patikrinta sekoskaitos (MacroGen) būdu.

Pavyzdys 3. DNR konstrukcija, koduojanti URA4 izocitozino deaminazę.

Naudojantis metagenominėje bibliotekoje atrastu DNR fragmentu, oligonukleotidų pradmenimis ir Phusion High-Fidelity PCR Master Mix with HF Buffer PGR reakcijos mišiniu galima susintetinti DNR fragmentą, koduojantį URA4 izocitozino deaminazės geną, kurio 5' ir 3' galuose atitinkamai bus įvestos restrikcijos endonukleazių vietos, skirtos URA4 koduojančio geno perkėlimui į pasirinktą plazmidinį vektorių, naudojantis standartiniais molekulinės biologijos protokolais (Sambrook ir Russell 2001).

Pavyzdys 4. Rekombinantinis Vcz izocitozino deaminazės baltymas.

Baltymų raiškos vektoriuje pET-28a(+) koduojama Vcz izocitozino deaminazė

buvo perkelta į baltymų raiškai skirtą *E. coli* BL21(DE-3) kamieną. Rekombinantinio baltymo raiška ląstelėse indukuota IPTG. Pasitelkiant Ni^{2+} jonų chelatinę baltymų chromatografiją (GE Healthcare) buvo išgryninta rekombinantinė Vcz izocitozino deaminazė, turinti 6xHis žymenį (Pav. 2).

Pavyzdys 5. Rekombinantinis URA3 izocitozino deaminazės baltymas.

Baltymų raiškos vektoriuje pET-21b(+) koduojama URA3 izocitozino deaminazė buvo perkelta į baltymų raiškai skirtą *E. coli* BL21(DE-3) kamieną. Rekombinantinio baltymo raiška ląstelėse indukuota IPTG. Pasitelkiant Ni^{2+} jonų chelatinę baltymų chromatografiją (GE Healthcare) buvo išgryninta rekombinantinė URA3 izocitozino deaminazė, turinti 6xHis žymenį (Pav. 2).

Pavyzdys 6. Rekombinantinis URA4 izocitozino deaminazės baltymas.

Baltymų raiškos vektoriuje koduojama URA4 izocitozino deaminazė galėtų būti perkelta į baltymų raiškai skirtą *E. coli* kamieną. Rekombinantinio baltymo raiška ląstelėse galėtų būti indukuota. Pasitelkiant baltymų chromatografiją galėtų būti išgryninta rekombinantinė URA4 izocitozino deaminazė.

Pavyzdys 7. Rekombinantinės Vcz izocitozino deaminazės vykdoma reakcija.

Išgrynintos rekombinantinės Vcz izocitozino deaminazės fermentinis aktyvumas tikrintas plonasluoksnės chromatografijos būdu. Rekombinantinis fermentas ($\sim 0,4$ nM / 20 μg) buvo inkubuotas su substratu (20 mM citozino / izocitozino / 5-fluorizocitozino) 37 °C 1 val. 1 μL reakcijos mišinio analizuota ant silikagelių padengtos aliuminio plokštelės F254 kaip mobiliąją fazę naudojant metanolio:chloroformo (1:9) mišinį. Plonasluoksnė chromatografija vizualizuota 254 nm UV šviesoje. Pav. 4 matyti, kad citozinas nėra rekombinantinės Vcz izocitozino deaminazės substratas; izocitozinas rekombinantinės Vcz izocitozino deaminazės yra verčiamas uracilu; 5-fluorizocitozinas rekombinantinės Vcz izocitozino deaminazės yra verčiamas 5-fluoruracilu.

Pavyzdys 8. Rekombinantinės URA3 izocitozino deaminazės vykdoma reakcija.

Išgrynintos rekombinantinės URA3 izocitozino deaminazės fermentinis aktyvumas tikrintas plonasluoksnės chromatografijos būdu. Rekombinantinis fermentas ($\sim 0,4$ nM / 20 μg) buvo inkubuotas su substratu (20 mM citozino / izocitozino

/ 5-fluorizocitozino) 37°C 1 val. 1 µL reakcijos mišinio analizuota ant silikageliu padengtos aliuminio plokštelės F254 kaip mobiliąją fazę naudojant metanolio:chloroformo (1:9) mišinį. Plonasluoksnė chromatografija vizualizuota 254 nm UV spinduliais. Pav. 4 matyti, kad citozinas nėra rekombinantinės URA3 izocitozino deaminazės substratas; izocitozinas rekombinantinės URA3 izocitozino deaminazės yra verčiamas uracilu; 5-fluorizocitozinas rekombinantinės URA3 izocitozino deaminazės yra verčiamas 5-fluoruracilu.

Pavyzdys 9. Vcz izocitozino deaminazės vykdoma 5-fluorizocitozino konversija į 5-fluoruracilą.

Izocitozino deaminazės Vcz kaip substratą gali panaudoti 5-fluorizocitoziną arba izocitoziną bei H₂O. Jos vykdomos hidrolizės reakcijos produktai yra 5-fluoruracilas arba uracilas ir NH₃. Reakcijos schema pavaizduota Pav. 3.

Pavyzdys 10. URA3 izocitozino deaminazės vykdoma 5-fluorizocitozino konversija į 5-fluoruracilą.

Izocitozino deaminazės URA3 kaip substratą gali panaudoti 5-fluorizocitoziną arba izocitoziną bei H₂O. Jos vykdomos hidrolizės reakcijos produktai yra 5-fluoruracilas arba uracilas ir NH₃. Reakcijos schema pavaizduota Pav. 3.

Pavyzdys 11. URA4 izocitozino deaminazės vykdoma 5-fluorizocitozino konversija į 5-fluoruracilą.

Izocitozino deaminazės URA4 kaip substratą gali panaudoti 5-fluorizocitoziną arba izocitoziną bei H₂O. Jos vykdomos hidrolizės reakcijos produktai yra 5-fluoruracilas arba uracilas ir NH₃. Reakcijos schema pavaizduota Pav. 3.

Medžiagos ir metodai

Oligonukleotidų pradmenys

Vcz 28a FW SEQ ID Nr. 4: 5'-ATATACCATGGACAAAAGAACGCTGC-3'
(pagaminta Metabion)

Vcz 28a his RV SEQ ID Nr. 5: 5'-TATATCTCGAGCAGCCGATGCCGGTT-3'
(pagaminta Metabion)

URA3 21b FW SEQ ID Nr. 6: 5'-ATATACATATGGCCAAAACACTCTTGG-3'
(pagaminta Metabion)

URA3 21b his RV SEQ ID Nr. 7: 5'-TATATCTCGAGTTCACCCATGACC-3'
(pagaminta Metabion)

Plazmidiniai vektoriai

pET-21b(+): Novagen®, Merck KGaA

pET-28a(+): Novagen®, Merck KGaA

Bakterijų kamienai

BL21(DE-3): Novagen®, Merck KGaA

DH10BΔpyr: sukurtas VU GMC BChI Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyriuje DH10B (Thermo Fisher Scientific) pagrindu

Medžiagos ir reagentai

5-fluorizocitozinas buvo susintetintas VU GMC BChI Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyriuje remiantis WO 2009/158011 A1 patente aprašytais reakcijomis.

Phusion High-Fidelity PCR Master Mix with HF Buffer PGR reakcijos mišinys:
Thermo Fisher Scientific Inc.

Restrikcijos endonukleazės *NdeI*, *XhoI*, *NcoI*: Thermo Fisher Scientific Inc.

T4 ligazė: Thermo Fisher Scientific Inc.

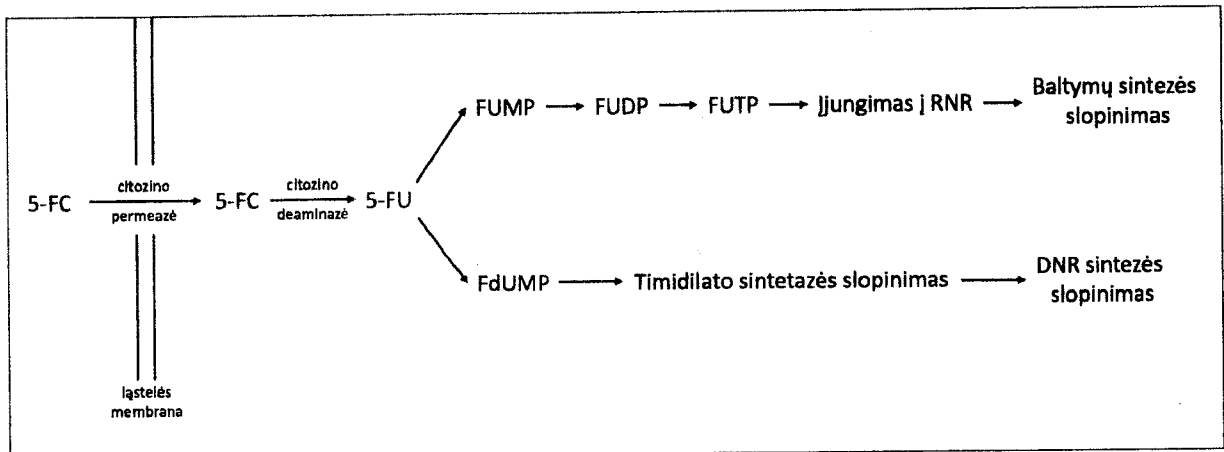
Literatūros sąrašas

1. Forbes NS. Engineering the perfect (bacterial) cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2010 Nov;10(11):785-94. doi: 10.1038/nrc2934.
2. Freytag SO, Movsas B, Aref I, Stricker H, Peabody J, Pegg J, Zhang Y, Barton KN, Brown SL, Lu M, Saveria A, Kim JH. Phase I trial of replication-competent adenovirus-mediated suicide gene therapy combined with IMRT for prostate cancer. *Mol Ther*. 2007 May;15(5):1016-23.
3. Garcia-Sanchez F, Pizzorno G, Fu SQ, Nanakorn T, Krause DS, Liang J, Adams E, Leffert JJ, Yin LH, Cooperberg MR, Hanania E, Wang WL, Won JH, Peng XY, Cote R, Brown R, Burtness B, Giles R, Crystal R, Deisseroth AB. Cytosine deaminase adenoviral vector and 5-fluorocytosine selectively reduce breast cancer cells 1 million-fold when they contaminate hematopoietic cells: a potential purging method for autologous transplantation. *Blood*. 1998 Jul 15;92(2):672-82.
4. Yata VK, Gopinath P, Ghosh SS. Emerging implications of nonmammalian cytosine deaminases on cancer therapeutics. *Appl Biochem Biotechnol*. 2012 Aug;167(7):2103-16. doi: 10.1007/s12010-012-9746-0.
5. Jain RK. Delivery of molecular and cellular medicine to solid tumors. *Adv Drug Deliv Rev*. 2001 Mar 1;46(1-3):149-68.
6. Karjoo Z, Chen X, Hatefi A. Progress and problems with the use of suicide genes for targeted cancer therapy. *Adv Drug Deliv Rev*. 2016 Apr 1;99(Pt A):113-28. doi: 10.1016/j.addr.2015.05.009.
7. Malecki M. Frontiers in Suicide Gene Therapy of Cancer. *J Genet Syndr Gene Ther*. 2012 Oct 22;2012(3).
8. Malekshah OM, Chen X, Nomani A, Sarkar S, Hatefi A. Enzyme/Prodrug Systems for Cancer Gene Therapy. *Curr Pharmacol Rep*. 2016 Dec;2(6):299-308. doi: 10.1007/s40495-016-0073-y.
9. Mohit E, Rafati S. Biological delivery approaches for gene therapy: strategies to potentiate efficacy and enhance specificity. *Mol Immunol*. 2013 Dec;56(4):599-611. doi: 10.1016/j.molimm.2013.06.005.
10. Papanastasopoulos P, Stebbing J. Molecular basis of 5-fluorouracil-related toxicity: lessons from clinical practice. *Anticancer Res*. 2014 Apr;34(4):1531-5.

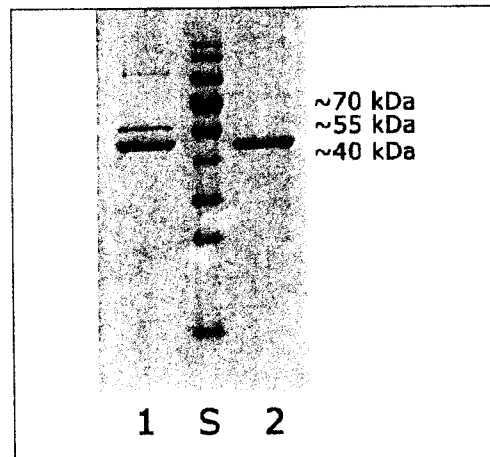
11. Patyar S, Joshi R, Byrav DS, Prakash A, Medhi B, Das BK. Bacteria in cancer therapy: a novel experimental strategy. *J Biomed Sci.* 2010 Mar 23;17(1):21. doi: 10.1186/1423-0127-17-21.
12. Peters GJ. Novel developments in the use of antimetabolites. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 2014;33(4-6):358-74. doi: 10.1080/15257770.2014.894197.
13. Roy P, Waxman DJ. Activation of oxazaphosphorines by cytochrome P450: application to gene-directed enzyme prodrug therapy for cancer. *Toxicol In Vitro.* 2006 Mar;20(2):176-86
14. Sambrook J, Russell DW. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
15. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin.* 2016 Jan-Feb;66(1):7-30. doi: 10.3322/caac.21332.
16. Stuckey DW, Shah K. Stem cell-based therapies for cancer treatment: separating hope from hype. *Nat Rev Cancer.* 2014 Oct;14(10):683-91. doi: 10.1038/nrc3798.
17. Vermes A, Guchelaar HJ, Dankert J. Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. *J Antimicrob Chemother.* 2000 Aug;46(2):171-9.
18. Williams EM, Little RF, Mowday AM, Rich MH, Chan-Hyams JV, Copp JN, Smaill JB, Patterson AV, Ackerley DF. Nitroreductase gene-directed enzyme prodrug therapy: insights and advances toward clinical utility. *Biochem J.* 2015 Oct 15;471(2):131-53. doi: 10.1042/BJ20150650.
19. Patents WO1997035024
20. Patents US20170071959
21. Patents WO2003018788
22. Patents WO2001085960
23. Patents EP1080100
24. Patents CA2506329
25. Patents US5545548

Išradimo apibrėžtis

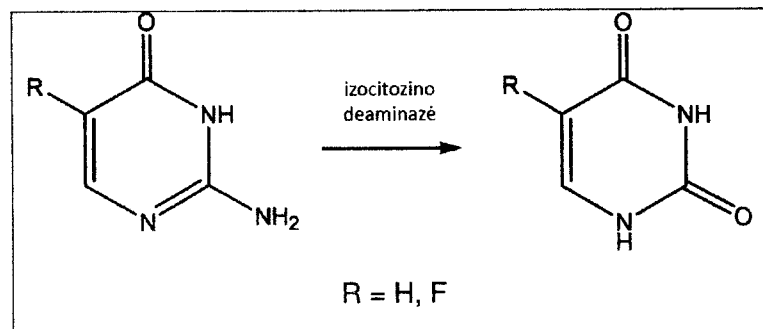
1. Fermentas URA4 izocitozino deaminazė, gautas metagenominės atrankos principu naudojant *E. coli* DH10BΔpyr ląsteles, c h a r a k t e r i z u o j a m a s tuo kad, hidrolizuoja izocitoziną.
2. Fermento pagal 1 punktą panaudojimas izocitozino hidrolizės reakcijoje, kur izocitozinas yra verčiamas į uracilą.
3. Fermento pagal 1 punktą panaudojimas 5-flourizocitozino hidrolizės reakcijoje, kur 5-flourizocitozinas yra verčiamas į biologiškai aktyvų 5-floururacilą.
4. Fermentas URA3 izocitozino deaminazė, gautas metagenominės atrankos principu naudojant *E. coli* DH10BΔpyr ląsteles, c h a r a k t e r i z u o j a m a s tuo kad, hidrolizuoja izocitoziną.
5. Fermento pagal 4 punktą panaudojimas izocitozino hidrolizės reakcijoje, kur izocitozinas yra verčiamas į uracilą.
6. Fermento pagal 4 punktą panaudojimas 5-flourizocitozino hidrolizės reakcijoje, kur 5-flourizocitozinas yra verčiamas į biologiškai aktyvų 5-floururacilą.
7. Fermentas Vcz izocitozino deaminazė, gautas metagenominės atrankos principu naudojant *E. coli* DH10BΔpyr ląsteles, c h a r a k t e r i z u o j a m a s tuo kad, hidrolizuoja izocitoziną.
8. Fermento pagal 7 punktą panaudojimas izocitozino hidrolizės reakcijoje, kur izocitozinas yra verčiamas į uracilą.
9. Fermento pagal 7 punktą panaudojimas 5-flourizocitozino hidrolizės reakcijoje, kur 5-flourizocitozinas yra verčiamas į biologiškai aktyvų 5-floururacilą.
10. Fermentų pagal 1 - 9 punktus panaudojimas laboratoriniuose ir(arba) klinikiniuose vėžinių susirgimų ir (arba) ląstelių tyrimuose, siekiant gauti 5-floururacilą.



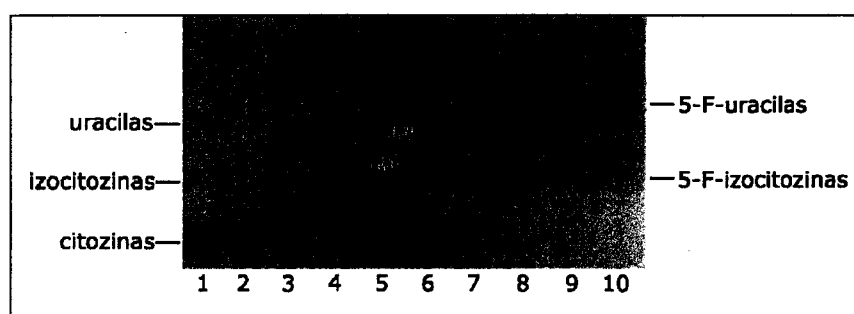
Pav. 1.



Pav. 2.



Pav. 3.



Pav. 4.