

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl. ⁷
C12P 19/38

(11) 공개번호 특2002 - 0006046
(43) 공개일자 2002년01월18일

(21) 출원번호	10 - 2001 - 7014446		
(22) 출원일자	2001년11월13일		
번역문 제출일자	2001년11월13일		
(86) 국제출원번호	PCT/JP2000/03095	(87) 국제공개번호	WO 2000/70074
(86) 국제출원출원일자	2000년05월15일	(87) 국제공개일자	2000년11월23일

(81) 지정국 국내특허 : 캐나다, 중국, 대한민국, 미국, 인도,
 EP 유럽특허: 오스트리아, 벨기에, 스위스, 독일, 덴마크, 스페인, 프랑스, 영국, 그리스, 아
 일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투갈, 스웨덴, 핀란드, 사이프러스,

(30) 우선권주장 JP - P - 1999 - 0013 1999년05월13일 일본(JP)
 2144

(71) 출원인 미쯔이카가쿠 가부시기가이샤
 사토 아키오
 일본국 도오교오도 지요다구 가스미가세끼 3쵸오메 2반 5고

(72) 발명자 니쿠마루세이야
 일본국치바켄모바라시토고2142
 나카무라타케시
 일본국치바켄이치하라시치하라다이4쵸메38 - 20

(74) 대리인 신중훈
 임옥순

심사청구 : 있음

(54) 뉴클레오사이드화합물의 제조방법

요약

뉴클레오사이드 포스포릴라제의 효소활성의 존재하에, 펜토스 - 1 - 인산과 핵산염기 또는 해당 핵산염기의 유사화합물을 반응시킴으로써 뉴클레오사이드화합물을 제조하는 데 있어서, 인산이온과 난수용성 염을 형성할 수 있는 금속양이온을 반응계에 첨가시켜 됨으로써, 부생성물인 인산을 반응계로부터 제거해서, 평형반응이 뉴클레오사이드합성방향으로 이동함으로써, 목적의 뉴클레오사이드화합물을 고수율로 얻는 것이 가능하다.

명세서

기술분야

본 발명은, 뉴클레오사이드 포스포릴라제를 이용한 뉴클레오사이드의 제조방법에 관한 것이다. 각종 뉴클레오사이드 및 그 유사화합물(analogue)은, 항바이러스의약품, 항암의약품 또는 안티센스의약품 등의 제조시의 합성용 출발물질 또는 의약조성물로서 사용된다.

배경기술

용어 "뉴클레오사이드 포스포릴라제"란, 인산의 존재하에 뉴클레오사이드의 N-글리코사이드결합의 가인산분해시에 포함된 효소의 총칭이며, 리보뉴클레오사이드를 이용한 예로서, 다음 식:

리보뉴클레오사이드 + 인산(인산염) → 핵산염기 + 리보스-1-인산

으로 표시되는 반응을 촉매한다.

일반적으로 푸린 뉴클레오사이드 포스포릴라제와 피리미딘 포스포릴라제로 분류되는 해당 효소는, 생물계에 널리 분포하며, 예를 들면, 포유류, 조류, 어류 등의 조직이나; 효모; 세균에 존재한다. 이 효소반응은 가역적이고, 그 역반응을 이용한 각종 뉴클레오사이드화합물의 합성이 수년전부터 알려져 있다.

예를 들면, 2'-데옥시리보스-1-인산과 핵산염기(각각 티민, 아데닌 또는 구아닌)로부터 티미딘(일본국 공개특허 평 1-104190호 공보), 2'-데옥시아데노신(일본국 공개특허 평 11-137290호 공보) 또는 2'-데옥시구아노신(일본국 공개특허 평 11-137290호 공보)을 제조하는 방법이 공지되어 있다. 또, Agric. Biol. Chem., Vol. 50(1), pp. 121 ~ 126(1986)에는, 이노신을, 인산의 존재하에 엔테로박터 아에로게네스(*Enterobacter aerogenes*)로부터 유래된 푸린 뉴클레오사이드 포스포릴라제를 이용한 반응에 의해, 리보스-1-인산과 하이포크산틴으로 분해한 후, 이온교환수지에 의해 분리한 리보스-1-인산과 1,2,4-트리아졸-3-카르복시아미드를 마찬가지로 엔테로박터 아에로게네스로부터 유래된 푸린 뉴클레오사이드 포스포릴라제를 이용해서 반응시킴으로써, 항바이러스제인 리바비린을 제조하는 기술이 기재되어 있다.

그러나, 해당 효소를 이용한 역반응에 의해 펜토스-1-인산 또는 그 염과 핵산염기로부터 뉴클레오사이드화합물을 생성시키는 반응은 평형반응이므로, 전화율이 향상될 수 없다고 하는 기술적 결점을 지니고 있었다.

공업적으로 뉴클레오사이드를 제조할 경우, 높은 전화율로 반응을 진행시키는 것이, 원료비용의 저감화 및 이와 같이 해서 얻어진 제품의 순도향상을 위해서는 필수이다.

즉, 본 발명의 목적은, 펜토스-1-인산과 핵산염기 혹은 그 유사화합물을, 뉴클레오사이드 포스포릴라제활성의 존재하에 반응시키는 공정을 구비하고, 해당 반응에 있어서의 뉴클레오사이드화합물로의 전화율이 향상되는 범용성이 높은 뉴클레오사이드화합물의 제조방법을 제공하는 데 있다.

발명의 상세한 설명

발명의 개시

본 발명자들은, 이들 과제를 해결하기 위해 예의 검토를 행한 결과, 반응액에 인산이온과 난수용성 염을 형성할 수 있는 금속양이온을 존재시키면, 반응의 부생성물인 인산이온이 난수용성 염으로서 침전되어 반응계로부터 제거됨으로써, 반응의 평형이 뉴클레오사이드화합물의 합성방향으로 이동하여, 반응전화율이 향상되는 것을 발견하였다.

또, 본 발명자들은, 인산과 난수용성 염을 형성할 수 있는 금속양이온을 펜토스-1-인산염의 형태로 반응액중에 존재시킴으로써, 상기 인산과 난수용성 염을 형성할 수 있는 금속양이온 또는 그 염을 첨가한 경우와 거의 마찬가지로의 효과를 얻을 수 있다는 것을 발견하였다.

본 발명은 이들 지면에 의거한 것이다.

특히, 본 발명에 의한 뉴클레오사이드화합물의 제조방법은, 수성 반응매체중에서, 뉴클레오사이드 포스포릴라제활성의 존재하에, 펜토스 - 1 - 인산과 핵산염기 또는 그 유사화합물을 반응시켜 뉴클레오사이드화합물을 생성시키는 공정을 구비한 뉴클레오사이드화합물의 제조방법에 있어서, 상기 수성 반응매체중에, 인산이온과 난수용성 염을 형성할 수 있는 금속양이온을 존재시키는 것을 특징으로 한다.

이 제조방법에 있어서의 펜토스 - 1 - 인산으로서는, 리보스 - 1 - 인산 또는 2 - 데옥시리보스 - 1 - 인산을 이용할 수 있다.

상기 인산과 난수용성 염을 형성할 수 있는 금속양이온으로서는, 칼슘이온, 바륨이온 및 알루미늄이온으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1종의 이온을 사용할 수 있다.

상기 인산이온과 난수용성 염을 형성할 수 있는 금속양이온은, 염소이온, 질소이온, 탄산이온, 황산이온 및 아세트산이온으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1종의 음이온과의 금속염으로서 상기 수성 반응매체중에 첨가하는 것이 가능하다.

상기 인산이온과 난수용성 염을 형성할 수 있는 금속양이온은, 펜토스 - 1 - 인산염으로서 상기 수성 반응매체중에 존재시키는 것이 가능하다.

본 발명에 의하면, 뉴클레오사이드 포스포릴라제의 효소활성을 이용한 펜토스 - 1 - 인산과 핵산염기 또는 그 유사화합물로부터의 뉴클레오사이드화합물의 합성반응에 있어서의 반응수율을 인산과 난수용성 염을 형성할 수 있는 금속양이온을 존재시킴으로써 대폭 향상시킬 수 있어, 효율적인 뉴클레오사이드화합물의 제조방법을 제공하는 것이 가능하다.

발명을 실시하기 위한 최량의 형태

여기서 사용하는 " 펜토스 - 1 - 인산" 이란, 폴리하이드록시알데하이드 또는 폴리하이드록시케톤 혹은 그 유도체의 1위치에 인산기가 에스테르결합을 통해 부착된 것을 의미한다.

그 대표적인 예로서는, 리보스 - 1 - 인산, 2' - 데옥시리보스 - 1 - 인산, 2',3' - 디데옥시리보스 - 1 - 인산, 아라비노스 - 1 - 인산 등을 들 수 있으나, 이들로 한정되는 것은 아니다.

폴리하이드록시알데하이드 또는 폴리하이드록시케톤의 예로서는, 천연물로부터 유래된 것으로서 D - 아라비노스, L - 아라비노스, D - 크실로스, L - 크실로스, D - 리보스 등의 알도펜토스류; D - 크실루로스, L - 크실루로스, D - 리불로스 등의 케토펙토스류; D - 2 - 데옥시리보스, D - 2,3 - 디데옥시리보스 등의 데옥시당류를 들 수 있으나, 이들로 한정되는 것은 아니다.

이들 펜토스 - 1 - 인산은, 뉴클레오사이드 포스포릴라제의 작용에 의해 뉴클레오사이드화합물의 가인산분해반응을 행하여 제조하는 방법(J. Biol. Chem. Vol. 184, 437, 1950)이나, 아노머선택적인 화학합성법 등에 의해서도 제조하는 것이 가능하다.

본 발명에 이용되는 핵산염기 또는 그 유사화합물에는 DNA나 RNA의 화학구조식요소로 되어 있는 질소원자를 함유하는 헤테로고리식 화합물이며, 피리미딘, 푸린, 핵산염기유사화합물로 이루어진 군으로부터 선택된 천연 혹은 합성형의 핵산염기 또는 그들의 유사화합물이 포함된다.

이들 핵산염기 또는 그 유사화합물은, 할로젠원자, 알킬기, 할로알킬기, 알케닐기, 할로알케닐기, 알킬닐기, 아미노기, 알킬아미노기, 수산기, 하이드록시아미노기, 아미노옥시기, 알콕시기, 메르캅토기, 알킬메르캅토기, 아릴기, 아릴옥시기 또는 시아노기로 치환되어 있어도 된다.

치환기로서의 할로젠원자의 예로서는, 염소원자, 불소원자, 요드원자, 브롬원자를 들 수 있다.

알킬기의 예로서는, 메틸기, 에틸기, 프로필기 등의 탄소수 1 내지 7의 알킬기를 들 수 있다.

할로알킬기의 예로서는, 플루오로메틸기, 디플루오로메틸기, 트리플루오로메틸기, 브로모메틸기, 브로모에틸기 등의 탄소수 1 내지 7의 알킬기를 지닌 것을 들 수 있다.

알케닐기의 예로서는, 비닐기, 알릴기 등의 탄소수 2 내지 7을 지닌 것을 들 수 있다.

할로알케닐기의 예로서는, 브로모비닐기, 클로로비닐기 등의 탄소수 2 내지 7의 알케닐기를 지닌 것을 들 수 있다.

알키닐기의 예로서는, 에티닐기, 프로피닐기 등의 탄소수 2 내지 7을 지닌 것을 들 수 있다.

알킬아미노기의 예로서는, 메틸아미노기, 에틸아미노기 등의 탄소수 1 내지 7의 알키닐기를 지닌 것을 들 수 있다.

알콕시기의 예로서는, 메톡시기, 에톡시기 등의 탄소수 1 내지 7을 지닌 것을 들 수 있다.

알킬메르캅토기의 예로서는, 메틸메르캅토기, 에틸메르캅토기 등의 탄소수 1 내지 7의 알키닐기를 지닌 것을 들 수 있다.

아릴기의 예로서는, 페닐기; 메틸페닐기, 에틸페닐기 등의 탄소수 1 내지 5의 알킬기를 지닌 알킬페닐기; 메톡시페닐기, 에톡시페닐기 등의 탄소수 1 내지 5의 알콕시기를 지닌 알콕시페닐기; 디메틸아미노페닐기, 디에틸아미노페닐기 등의 탄소수 1 내지 5의 알킬아미노기를 지닌 알킬아미노페닐기; 클로로페닐기, 브로모페닐기 등의 할로게노페닐기 등을 들 수 있다.

피리미딘화합물의 예로서는, 시토신, 우라실, 5-플루오로시토신, 5-플루오로우라실, 5-클로로시토신, 5-클로로우라실, 5-브로모시토신, 5-브로모우라실, 5-아이오도시토신, 5-아이오도우라실, 5-메틸시토신, 5-메틸우라실(티민), 5-에틸시토신, 5-에틸우라실, 5-플루오로메틸시토신, 5-플루오로우라실, 5-트리플루오로시토신, 5-트리플루오로우라실, 5-비닐우라실, 5-브로모비닐우라실, 5-클로로비닐우라실, 5-에티닐시토신, 5-에티닐우라실, 5-프로피닐우라실, 피리미딘-2-온, 4-하이드록시아미노피리미딘-2-온, 4-아미녹시피리미딘-2-온, 4-메톡시피리미딘-2-온, 4-아세톡시피리미딘-2-온, 4-플루오로피리미딘-2-온, 5-플루오로피리미딘-2-온 등을 들 수 있다.

푸린화합물의 예로서는, 푸린, 6-아미노푸린(아데닌), 6-하이드록시푸린, 6-플루오로푸린, 6-클로로푸린, 6-메틸아미노푸린, 6-디메틸아미노푸린, 6-트리플루오로메틸아미노푸린, 6-벤조일아미노푸린, 6-아세틸아미노푸린, 6-하이드록시아미노푸린, 6-아미녹시푸린, 6-메톡시푸린, 6-아세톡시푸린, 6-벤조일옥시푸린, 6-메틸푸린, 6-에틸푸린, 6-트리플루오로메틸푸린, 6-페닐푸린, 6-메르캅토프린, 6-메틸메르캅토프린, 6-아미노푸린-1-옥사이드, 6-하이드록시푸린-1-옥사이드, 2-아미노-6-하이드록시푸린(구아닌), 2,6-디아미노푸린, 2-아미노-6-클로로푸린, 2-아미노-6-아이오도푸린, 2-아미노푸린, 2-아미노-6-메르캅토프린, 2-아미노-6-메틸메르캅토프린, 2-아미노-6-하이드록시아미노푸린, 2-아미노-6-메톡시푸린, 2-아미노-6-벤조일옥시푸린, 2-아미노-6-아세톡시푸린, 2-아미노-6-메틸푸린, 2-아미노-6-시클로프로필아미노메틸푸린, 2-아미노-6-페닐푸린, 2-아미노-8-브로모푸린, 6-시아노푸린, 6-아미노-2-클로로푸린(2-클로로아데닌), 6-아미노-2-플루오로푸린(2-플루오로아데닌) 등을 들 수 있다.

핵산염기유사화합물의 예로서는, 6-아미노-3-데아자푸린, 6-아미노-8-아자푸린, 2-아미노-6-하이드록시-8-아자푸린, 6-아미노-7-데아자푸린, 6-아미노-1-데아자푸린, 6-아미노-2-아자푸린 등을 들 수 있다.

본 발명에 있어서의 뉴클레오사이드화합물이란, 상기 폴리하이드록시알데하이드 또는 폴리하이드록시케톤의 1위치에

피리미딘화합물, 푸린화합물 또는 핵산염기유사화합물이 N - 글리코사이드결합을 통해 부착된 것을 의미하며, 그 예로서는, 티미딘, 데옥시티미딘, 데옥시우리딘, 데옥시구아노신, 데옥시아데노신, 디데옥시아데노신, 트리플루오로티미딘, 리바비린, 오로티딘, 우라실 아라비노사이드, 아데닌 아라비노사이드, 2 - 메틸 - 아데닌 아라비노사이드, 2 - 클로로 - 하이포크산틴 아라비노사이드, 티오구아닌 아라비노사이드, 2,6 - 디아미노푸린 아라비노사이드, 시토신 아라비노사이드, 구아닌 아라비노사이드, 티민 아라비노사이드, 에노시타빈, 겐시타빈, 아지도티미딘, 이독슈리딘(idoxuridine), 디데옥시아데노신, 디데옥시이노신, 디데옥시시티딘, 디데하이드로데옥시티미딘, 티아디데옥시시티딘, 소리부딘, 5 - 메틸우리딘, 비라줄, 티오이노신, 테가푸르(tegafur), 독시플루리딘, 브레디닌, 네불라린, 알로푸리놀 우라실, 5 - 플루오로우라실, 2' - 아미노우리딘, 2' - 아미노아데노신, 2' - 아미노구아니딘, 2 - 클로로 - 2' - 아미노이노신 등을 들 수 있다.

뉴클레오사이드 포스포릴라제는, 인산의 존재하에 뉴클레오사이드내의 N - 글리코사이드결합의 가인산분해가능한 효소의 통칭이며, 본 발명에 있어서는, 이 효소활성을 이용한 반응의 역반응을 이용하는 것이 가능하다. 반응에 사용되는 효소는, 대응하는 펜토스 - 1 - 인산과 핵산염기 또는 그 유사화합물로부터 소량의 뉴클레오사이드를 형성하는 능력을 지닌 한 종류나 기원은 어느 것이라도 된다. 효소는, 일반적으로 푸린형과 피리미딘형의 2종류로 분류된다. 푸린형 효소의 예로서는, 푸린 뉴클레오사이드 포스포릴라제(EC2.4.2.1), 구아노신 포스포릴라제(EC2.4.2.15)를 들 수 있고, 피리미딘형 효소의 예로서는, 피리미딘 뉴클레오사이드 포스포릴라제(EC2.4.2.2), 우리딘 포스포릴라제(EC2.4.2.3), 티미딘 포스포릴라제(EC2.4.2.4) 및 데옥시우리딘 포스포릴라제(EC2.4.2.23)를 들 수 있다.

본 발명에 있어서의 뉴클레오사이드 포스포릴라제활성은, 해당 효소활성을 지닌 미생물을 수성 반응매체중 혹은 수성 반응매체에 접촉한 상태에서 이용함으로써 반응계에 적용시키는 것도 가능하다. 이러한 미생물은, 제약은 없고, 푸린 뉴클레오사이드 포스포릴라제(EC2.4.2.1), 구아노신 포스포릴라제(EC2.4.2.15), 피리미딘 뉴클레오사이드 포스포릴라제(EC2.4.2.2), 우리딘 포스포릴라제(EC2.4.2.3), 티미딘 포스포릴라제(EC2.4.2.4) 및 데옥시우리딘 포스포릴라제(EC2.4.2.23)로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1종의 뉴클레오사이드 포스포릴라제를 발현하는 미생물이면 어느 것이라도 된다.

이러한 미생물의 바람직한 예로서는, 노카르디아(Nocardia)속, 마이크로박테리움(Microbacterium)속, 코리네박테리움(Corynebacterium)속, 브레비박테리움(Brevibacterium)속, 셀룰로모나스(Cellulomonas)속, 플라보박테리움(Flabobacterium)속, 클루이베레(Kluyvere)속, 미코박테리움(Micobacterium)속, 하에모필루스(Haemophilus)속, 미코플라나(Micoplana)속, 프로타미노박터(Protaminobacter)속, 칸디다(Candida)속, 사카로마이세스(Saccharomyces)속, 바실루스(Bacillus)속, 호열성 바실루스속, 슈도모나스(Pseudomonas)속, 마이크로코커스(Micrococcus)속, 하프니아(Hafnia)속, 프로테우스(Proteus)속, 비브리오(Vibrio)속, 스타피로코커스(Staphyrococcus)속, 프로피오니박테리움(Propionibacterium)속, 사르티나(Sartina)속, 플라노코커스(Planococcus)속, 에세리히아(Escherichia)속, 쿠르티아(Kurthia)속, 로도코커스(Rhodococcus)속, 아시네토박터(Acinotobacter)속, 크산토박터(Xanthobacter)속, 스트렙토마이세스(Streptomyces)속, 리조비움(Rhizobium)속, 살모넬라(Salmonella)속, 클레브시엘라(Klebsiella)속, 엔테로박터(Enterobacter)속, 에르위니아(Erwinia)속, 아에로모나스(Aeromonas)속, 시트로박터(Citrobacter)속, 아크로모박터(Achromobacter)속, 아그로박테리움(Agrobacterium)속, 아르쓰로박터(Arthrobacter)속, 슈도노카르디아(Pseudonocardia)속에 속하는 균주를 들 수 있다.

근년의 분자생물학 및 유전공학의 진보에 의하면, 상기 균주내의 뉴클레오사이드 포스포릴라제의 분자생물학적 특성, 아미노산서열 등을 해석함으로써, 해당 균주로부터 해당 단백질의 유전자를 취득하고; 해당 유전자 및 그 발현에 필요한 제어영역이 삽입된 재조합플라스미드를 구축하고; 이 플라스미드를 주어진 숙주에 도입해서, 단백질을 발현시킨 유전자재조합균주를 생산하는 것이 가능해졌다. 최근의 기술수준에 비추어, 뉴클레오사이드 포스포릴라제의 유전자를 주어진 숙주에 도입한 유전공학적 재조합균주도, 본 발명에 의한 뉴클레오사이드 포스포릴라제를 발현하는 미생물에 포함되는 것으로 한다.

여기서 발현에 필요한 제어영역이란, 프로모터서열(전사를 제어하는 오퍼레이터서열), 리보솜결합서열(SD서열), 전사 종결서열 등이다. 프로모터서열의 예로서는, 대장균(*E. coli*)으로부터 유래된 트립토판오페론의 *trp* 오퍼레이터; 락토즈 오페론내의 *lac* 프로모터; 람다페이지로부터 유래된 P_L 프로모터 및 P_R 프로모터; 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)로부터 유래된 글루코네이트 신타제 프로모터(*gnt*); 알칼리 프로테아제 프로모터(*apr*); 중성 프로테아제 프로모터(*npr*); α -아밀라제프로모터(*amy*) 등을 들 수 있다. *tac* 프로모터 등의 독자적으로 변성설계된 서열을 사용해도 된다. 리보솜결합서열은, 예를 들면, 대장균 혹은 바실러스 서브틸리스로부터 유래된 서열이어도 되나, 대장균 혹은 바실러스 서브틸리스 등의 소정의 숙주에서 기능할 수 있다면 어느 서열이라도 된다. 예를 들면, DNA합성에 의해 형성된 콘센서스서열, 즉, 16S 리보솜 RNA내의 3'-말단영역에 상보적인 염기가 4개이상 연속한 서열을 사용할 수 있다. 전사종결서열은, 반드시 필요한 것은 아니고, ρ -인자비의존성인 터미네이터, 예를 들면, 리포프로테인 터미네이터, *trp* 오페론 터미네이터 등을 사용해도 된다. 바람직하게는, 재조합플라스미드상의 이들 제어영역은, 다음과 같이 순차 정렬되어 있어도 된다: 5'-말단의 상류로부터, 프로모터서열, 리보솜결합서열, 뉴클레오사이드 포스포릴라제 코딩유전자 및 전사 종결서열.

여기서 플라스미드의 구체예로서는, 벡터로서, 대장균내의 자율복제영역을 지닌 pBR322, pUC18, 블루스크립트 II SK(+), pKK223-3 및 pSC101; 바실러스 서브틸리스내의 자율복제영역을 지닌 pUB110, pTZ4, pC194, ρ 11, ϕ 1, ϕ 105 등을 들 수 있다. 2종이상의 숙주에서 자율복제가능한 플라스미드의 예로서는, 벡터로서 pHV14, TRp7, YEp7, pBS7 등을 들 수 있다.

여기서 주어진 숙주는, 한정되는 것은 아니지만, 대표적으로는, 후술하는 대장균(*Escherichia coli*) 이외에도, 바실러스 서브틸리스, 효모, 방선균 등을 포함한 바실러스속 등의 균주를 사용해도 된다.

본 발명에 있어서의 뉴클레오사이드 포스포릴라제 또는 그 활성을 발현가능한 미생물로서는, 시판의 효소, 해당 활성을 발현하는 미생물균체, 균체의 처리물 및 그의 고정화물이어도 된다. 균체의 처리물로서는, 예를 들면, 아세톤건조균체 또는 기계적 파괴, 초음파분해, 동결·융해, 가압·감압, 삼투압법, 자기소화, 세포벽분해, 계면활성제처리 등의 적절한 절차에 의해 제작된 균체파쇄물 등을 들 수 있다. 필요에 따라, 균체는 또한, 황산암모늄침전, 아세톤침전 또는 컬럼크로마토그래피에 의해 정제해도 된다.

본 발명에 있어서, 인산이온과 난수용성 염을 형성가능한 금속양이온은, 제약없이, 반응시 부생성물로서 인산이온과 난수용성 염을 형성하여 침전시킬 수 있는 금속양이온이면 어느 것이라도 사용가능하며; 그 금속양이온의 예로서는, 칼슘이온, 마그네슘이온, 바륨이온, 철이온, 코발트이온, 니켈이온, 구리이온, 은이온, 폴리브덴이온, 납이온, 아연이온, 리튬이온 등을 들 수 있다. 이들 중, 반응에 악영향을 주지 않는 공업적으로 보편적이고 안전한 금속이온, 예를 들면, 칼슘이온, 바륨이온, 알루미늄이온 등이 특히 바람직하다.

본 발명에 있어서 인산이온과 난수용성 염을 형성가능한 금속양이온은, 반응액중에 인산이온과 난수용성 염을 형성가능한 금속양이온과 염소이온, 질소이온, 탄산이온, 황산이온 및 아세트산이온으로부터 선택된 적어도 1종의 음이온과의 염을 첨가함으로써 얻을 수 있다. 그러한 염의 예로서는, 염화칼슘, 질화칼슘, 탄산칼슘, 황산칼슘, 아세트산칼슘, 염화바륨, 질화바륨, 탄산바륨, 황산바륨, 아세트산바륨, 염화알루미늄, 질화알루미늄, 탄산알루미늄, 황산알루미늄, 아세트산알루미늄 등을 들 수 있다.

본 발명에 있어서의 금속양이온은, 펜토스-1-인산과의 염으로서 반응액중에 존재시켜도 되며, 그 구체예로서는, 리보스-1-인산 칼슘염, 2-데옥시리보스-1-인산 칼슘염, 2,3-디데옥시리보스-1-인산 칼슘염, 아라비노스-1-인산 칼슘염, 리보스-1-인산 바륨염, 2-데옥시리보스-1-인산 바륨염, 2,3-디데옥시리보스-1-인산 바륨염, 아라비노스-1-인산 바륨염, 리보스-1-인산 알루미늄염, 2-데옥시리보스-1-인산 알루미늄염, 2,3-디데옥시리보스-1-인산

알루미늄염, 아라비노스 - 1 - 인산 알루미늄염 등을 들 수 있다.

본 발명에 사용되는 반응액을 구성하는 수성 반응매체는, 물을 주성분으로 하는 반응매체로, 본 발명에서 목적으로 하는 효소활성을 이용한 반응이 진행하여, 인산이온을 금속양이온과 반응시켜서 난용성 염으로서 침전시킴으로써 반응계로부터 제거할 수 있는 것이면 된다. 그와 같은 수성 반응매체의 예로서는, 물, 물에 저급 알콜, 아세톤, 디메틸설폭사이드 등의 수용성의 유기용매를 첨가한 수성 반응매체를 들 수 있다. 수용성 유기용매를 사용할 경우, 물에 대한 수용성 유기용매의 배합비는, 예를 들면, 0.1 내지 70중량%로 하면 된다. 또, 반응의 안정성을 확보하기 위해, 수성 반응매체를 이용한 반응액은 완충액으로서 제조하는 것도 가능하다. 이 완충액으로서는 본 발명에 관한 효소반응에 사용할 수 있는 공지의 완충액을 이용하는 것이 가능하다.

본 발명에 있어서의 뉴클레오사이드화합물을 제조하는 반응은, 목적으로 하는 뉴클레오사이드, 기질로서의 펜토스 - 1 - 인산과 핵산 또는 그 유사화합물, 반응촉매로서의 뉴클레오사이드 포스포릴라제 또는 효소의 활성을 발현하는 미생물 혹은 해당 미생물로부터의 각종 조제물, 반응계로부터 인산을 제거하기 위해 첨가하는 금속염의 종류와 성질에 따라, 적절한 pH 및 온도 등의 조건하에 행하면 되나; 통상, pH는 5 내지 10, 온도는 10 내지 60°C이다. pH가 관리폭을 벗어난 경우, 예를 들면, 목표물 또는 기질의 안정성 불량, 효소활성의 저감, 인산과 난수용성 염을 형성하는 데 대한 실패 등에 의해 반응전하율이 저하될 수 있다. 반응도중에 pH가 변하면, 필요에 따라, 염화수소산, 황산 등의 산 혹은 수산화나트륨, 수산화칼륨 등의 알칼리를 적절한 시기에 첨가하면 된다. 펜토스 - 1 - 인산 및 핵산염기 또는 그 유사화합물의 농도는 약 0.1 내지 1000mM이 적당하다. 이들간의 몰비에 대해서는, 펜토스 - 1 - 인산 또는 그 염에 대한 핵산염기 또는 그 유사화합물의 몰비는 1 내지 10, 반응전하율의 점에서, 바람직하게는 0.95이하이다. 2종이상의 핵산염기 또는 그 유사화합물을 혼합물로서 이용할 경우, 사용된 총량에 대해서 상기 농도 및 몰비를 선택하면 된다.

첨가된 인산과 난수용성 염을 형성가능한 금속양이온은, 반응에 사용된 펜토스 - 1 - 인산에 대해 0.1 내지 10의 몰비, 보다 바람직하게는 0.5 내지 5의 몰비로 첨가하면 된다. 또, 고농도의 반응에 있어서는, 기질로서의 핵산염기 또는 그 유사화합물이나 생성물로서의 뉴클레오사이드가 반응액중에 완전히 용해되지 않지만, 이러한 경우에도 본 발명을 적용할 수 있다. 금속양이온으로서 2종이상의 재료를 혼합해서 사용할 경우에는, 사용된 총량에 대해서 상기 몰비를 선택하면 된다.

이와 같이 해서 제조된 뉴클레오사이드화합물은, 농축, 결정화, 용해, 전해, 이온교환수지나 활성탄을 이용한 흡·탈착 등의 통상의 절차에 의해 분리할 수 있다.

실시예

이하, 본 발명을 실시예 및 비교예를 참조해서 보다 구체적으로 설명하나, 본 발명은 이들 실시예로 한정되는 것은 아니다.

분석법

제조된 뉴클레오사이드화합물은 모두 이하의 분석조건하에서 고속액체크로마토그래피에 의해 정량분석하였다:

컬럼: YMC - Pack ODS - A312 150×6.0mmI.D.(YMC Co., Ltd);

컬럼온도: 40°C;

펌프유속: 0.75ml/분;

검출: UV 260nm;

용리액: 10mM인산:아세트니트릴=95:5(v/v).

실시예 1

2.5mM 2' - 데옥시리보스 - 1 - 인산 디(모노시클로헥실암모늄)염(SIGMA사 제품) 2.5mM 아데닌(와코준야쿠사 제품, 특급), 12유닛/ml 푸린 뉴클레오사이드 포스포릴라제(푸나코시사 제품), 10mM 염화칼슘(와코준야쿠사 제품, 특급) 및 10mM 트리스염산완충액(pH 7.4)으로 이루어진 반응혼합액 1ml를 30°C에서 24시간 반응시켰다. 반응종료후, 백색의 침전물이 생성되어 있었다. 반응혼합액을 희석한 후 분석한 바, 2.40mM의 데옥시아데노신이 96.0%의 수율로 생성되어 있었다.

비교예 1

염화칼슘을 첨가하지 않은 이외에는 실시예 1과 마찬가지로 수순으로 반응을 행하였다. 반응종료후, 침전물은 생성되어 있지 않았다. 반응혼합액을 희석한 후 분석한 바, 2.01mM의 데옥시아데노신이 80.4%의 수율로 생성되어 있었다.

실시예 2

염화칼슘농도를 2.5mM로 한 이외에는 실시예 1과 마찬가지로 수순으로 반응을 행하였다. 반응종료후, 백색침전물이 생성되어 있었다. 반응혼합액을 희석한 후 분석한 바, 2.27mM의 데옥시아데노신이 90.8%의 수율로 생성되어 있었다.

실시예 3

염화칼슘대신에 염화알루미늄을 첨가한 이외에는 실시예 1과 마찬가지로 수순으로 반응을 행하였다. 반응종료후, 백색침전물이 생성되어 있었다. 반응혼합액을 희석한 후 분석한 바, 2.31mM의 데옥시아데노신이 93.3%의 수율로 생성되어 있었다.

실시예 4

염화칼슘대신에 염화바륨을 첨가한 이외에는 실시예 1과 마찬가지로 수순으로 반응을 행하였다. 반응종료후, 백색침전물이 생성되어 있었다. 반응혼합액을 희석한 후 분석한 바, 2.31mM의 데옥시아데노신이 92.4%의 수율로 생성되어 있었다.

실시예 5

염화바륨의 농도를 2.5mM로 한 이외에는 실시예 4와 마찬가지로 수순으로 반응을 행하였다. 반응종료후, 백색침전물이 생성되어 있었다. 반응혼합액을 희석한 후 분석한 바, 2.27mM의 데옥시아데노신이 90.2%의 수율로 생성되어 있었다.

실시예 6

Journal of Biological Chemistry, Vol. 184, pp. 449 - 459(1950)에 기재된 바와 같이, 2 - 데옥시리보스 - 1 - 인산 바륨염을 제조하였다. 2.5mM 2 - 데옥시리보스 - 1 - 인산 바륨염, 2.5mM 아데닌(와코준야쿠사 제품, 특급), 12유닛/ml 푸린 뉴클레오사이드 포스포릴라제(푸나코시사 제품), 10mM 염화칼슘(와코준야쿠사 제품, 특급) 및 10mM 트리스염산완충액(pH 7.4)으로 이루어진 반응혼합액 1ml를 30°C에서 24시간 반응시켰다. 반응종료후, 백색의 침전물이

생성되어 있었다. 반응혼합액을 희석한 후 분석한 바, 2.40mM의 데옥시아데노신이 91.1%의 수율로 생성되어 있었다.

실시예 7

2.5mM 2 - 데옥시리보스 - 1 - 인산 디(모노시클로헥실암모늄)염(SIGMA사 제품) 2.5mM 티민(와코준야쿠사 제품, 특급), 12유닛/ml 티미딘 포스포릴라제(SIGMA사 제품), 10mM 질산칼슘(와코준야쿠사 제품, 특급) 및 10mM 트리스 염산완충액(pH 7.4)으로 이루어진 반응혼합액 1ml를 30°C에서 24시간 반응시켰다. 반응종료후, 백색의 침전물이 생성되어 있었다. 반응혼합액을 희석한 후 분석한 바, 2.28mM의 티미딘이 91.2%의 수율로 생성되어 있었다.

비교예 2

질산칼슘을 첨가하지 않은 이외에는 실시예 7과 마찬가지로 수순으로 반응을 행하였다. 반응종료후, 침전물은 생성되어 있지 않았다. 반응혼합액을 희석한 후 분석한 바, 1.88mM의 티미딘이 75.2%의 수율로 생성되어 있었다.

실시예 8

2.5mM 리보스 - 1 - 인산 시클로헥실암모늄염(SIGMA사 제품) 2.5mM 2,6 - 디아미노푸린(Aldrich사 제품), 12유닛/ml 푸린 뉴클레오사이드 포스포릴라제(푸나코시사 제품), 10mM 염화칼슘(와코준야쿠사 제품, 특급) 및 10mM 트리스 염산완충액(pH 7.4)으로 이루어진 반응혼합액 1ml를 30°C에서 24시간 반응시켰다. 반응종료후, 백색의 침전물이 생성되어 있었다. 반응혼합액을 희석한 후 분석한 바, 1.94mM의 2,6 - 디아미노푸린 리보스가 77.6%의 수율로 생성되어 있었다.

비교예 3

염화칼슘을 첨가하지 않은 이외에는 실시예 8과 마찬가지로 수순으로 반응을 행하였다. 반응종료후, 침전물은 생성되어 있지 않았다. 반응혼합액을 희석한 후 분석한 바, 1.54mM의 2,6 - 디아미노푸린 리보스가 61.6%의 수율로 생성되어 있었다.

실시예 9

대장균 염색체 DNA를 다음과 같이 해서 제조하였다.

에세리히아 콜라이(Escherichia coli) K - 12/XL - 10균주(Stratagene Inc.)를 50ml의 LB배지에 접종하고, 37°C에서 하룻밤 배양한 후, 집균하여, 리소자임 1mg/ml를 함유하는 용균액(lysis solution)으로 용균하였다. 이 용균액을 페놀로 처리한 후, 통상의 방법에 의해 에탄올침전에 의해 DNA를 침전시켰다. 생성된 DNA침전은, 유리봉으로 회수한 후, 세정하여 PCR용의 소량의 DNA를 제조하였다.

PCR용 프라이머로서는, 에세리히아 콜라이의 기지의 deoD유전자의 염기서열(GenBank 수탁번호 제 AE000508호, 코팅 영역은 염기번호 11531 내지 12250)에 의거해서 설계한 하기 서열번호 1 및 2의 올리고뉴클레오사이드(위탁제조사인 혹카이도시스템 사이언스사에 의해서 제조한 것임)를 사용하였다. 이들 프라이머는, 5' - 말단부근 및 3' - 말단부근에 각각 EcoRI 및 Hind III의 제한효소인식서열을 지닌다.

서열번호 1: gtgaattcac aaaaaggata aaacaatggc

서열번호 2: tcgaagcttg cgaaacacaa ttactcttt

제한효소 Hind III에 의해 완전히 소화된 상기 대장균 염색체 DNA 6ng/ μ l 및 프라이머(각 3 μ M)를 함유하는 0.1ml의 PCR용 반응액을 이용해서, 1사이클당 변성: 96°C, 1분; 어닐링: 55°C, 1분; 신장: 74°C, 1분의 조건하에 30사이클의 PCR반응을 행하였다.

상기 반응생성물 및 플라스미드 pUC18(타카라슈조사 제품)을, EcoRI 및 Hind III으로 소화해서, 라이게이션 - 하이(토요보사 제품)를 이용해서 연결한 후, 얻어진 재조합 플라스미드를 이용해서, 에세리히아 콜라이 DH5 α 를 형질전환하였다. 이 형질전환균주를, 암피실린(Am) 50 μ g/ml 및 X - Gal(5 - 브로모 - 4 - 클로로 - 3 - 인돌릴 - β - D - 갈락토사이드)을 함유하는 LB한천배지에서 배양하여, 백색콜로니로서 Am내성의 형질전환균주를 얻었다.

이와 같이 해서 얻어진 형질전환균주로부터 플라스미드를 추출하고, 목적의 DNA단편이 삽입된 플라스미드를, pUC - PNP73으로 명명하였다. 이와 같이 해서 얻어진 형질전환균주를, 에세리히아 콜라이 MT - 10905로 명명하였다.

에세리히아 콜라이 MT - 10905균주를 암피실린 50 μ g/ml를 함유하는 LB배지 100ml에서 37°C, 하룻밤 진탕배양하였다. 얻어진 배양액을 13,000rpm에서 10분간 원심분리하여, 균체를 집균하였다. 해당 균체를 10mM 트리스염산완충액(pH 8.0) 10ml에 현탁하고, 초음파에 의해 파쇄한 것을 효소원으로서 사용하였다.

10mM의 2' - 데옥시리보스 - 1 - 인산 디(모노시클로헥실암모늄)염 (SIGMA사 제품), 10mM 아데닌(와코준야쿠사 제품, 특급), 20mM 염화칼슘, 100mM 트리스염산완충액(pH 8.0) 및 20유닛/ml의 상기 설명한 푸린 뉴클레오사이드 포스포릴라제로 이루어진 반응혼합액 1ml를 50°C에서 20시간 반응시켰다.

반응종료후, 백색의 침전물이 생성되어 있었다. 반응혼합액을 희석한 후 분석한 바, 9.6mM의 데옥시아데노신이 96.0%의 수율로 생성되어 있었다.

비교예 4

염화칼슘을 첨가하지 않은 이외에는 실시예 9와 마찬가지로 수순으로 반응을 행하였다. 반응종료후, 침전물은 생성되어 있지 않았다. 반응혼합액을 희석한 후 분석한 바, 7.9mM의 데옥시아데노신이 79%의 수율로 생성되어 있었다.

실시예 10

10mM의 2' - 데옥시리보스 - 1 - 인산 디(모노시클로헥실암모늄)염 (SIGMA사 제품), 10mM 구아닌(와코준야쿠사 제품, 특급), 20mM 염화칼슘, 100mM 트리스염산완충액(pH 8.0) 및 20유닛/ml의 상기 설명한 푸린 뉴클레오사이드 포스포릴라제로 이루어진 반응혼합액 1ml를 50°C에서 20시간 반응시켰다.

반응종료후, 백색의 침전물이 생성되어 있었다. 반응혼합액을 희석한 후 분석한 바, 8.0mM의 데옥시구아노신이 80.0%의 수율로 생성되어 있었다.

비교예 5

염화칼슘을 첨가하지 않은 이외에는 실시예 10과 마찬가지로 수순으로 반응을 행하였다. 반응종료후, 침전물은 생성되어 있지 않았다. 반응혼합액을 희석한 후 분석한 바, 5.1mM의 데옥시구아노신이 51%의 수율로 생성되어 있었다.

실시예 11

10mM의 2' - 데옥시리보스 - 1 - 인산 디(모노시클로헥실암모늄)염 (SIGMA사 제품), 10mM 티민(와코준야쿠사 제품, 특급), 20mM 염화칼슘, 100mM 트리스염산완충액(pH 8.0) 및 20유닛/ml의 티미딘 포스포릴라제로 이루어진 반응혼합액 1ml를 50°C에서 20시간 반응시켰다.

반응종료후, 백색의 침전물이 생성되어 있었다. 반응혼합액을 희석한 후 분석한 바, 9.0mM의 티미딘이 90.0%의 수율로 생성되어 있었다.

비교예 6

염화칼슘을 첨가하지 않은 이외에는 실시예 11과 마찬가지로 수순으로 반응을 행하였다. 반응종료후, 침전물은 생성되어 있지 않았다. 반응혼합액을 희석한 후 분석한 바, 7.0mM의 데옥시구아노신이 70%의 수율로 생성되어 있었다.

산업상 이용 가능성

본 발명에 의하면, 뉴클레오사이드 포스포릴라제 또는 효소활성을 발현하는 미생물을 이용한 펜토스 - 1 - 인산과 핵산염기로부터의 뉴클레오사이드화합물의 제조에 있어서, 인산과 난수용성 염을 형성할 수 있는 금속염을 첨가함으로써 부생하는 인산이 반응계로부터 제외되어, 종래 기술에서는 달성되지 않았던 반응수율의 향상이 달성된다. 공업적 견지에서, 본 발명은 커다란 비용절감에 이르게 되어, 그 의의는 상당하다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

수성 반응매체중에서, 뉴클레오사이드 포스포릴라제활성의 존재하에, 펜토스 - 1 - 인산과 핵산염기 또는 해당 핵산염기의 유사화합물을 반응시켜 뉴클레오사이드화합물을 생성시키는 공정을 구비한 뉴클레오사이드화합물의 제조방법에 있어서,

상기 수성 반응매체중에, 인산이온과 난수용성 염을 형성할 수 있는 금속양이온을 존재시키는 것을 특징으로 하는 뉴클레오사이드화합물의 제조방법.

청구항 2.

제 1항에 있어서, 상기 펜토스 - 1 - 인산이 리보스 - 1 - 인산 또는 2 - 데옥시리보스 - 1 - 인산인 것을 특징으로 하는 뉴클레오사이드화합물의 제조방법.

청구항 3.

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 인산이온과 난수용성 염을 형성할 수 있는 금속양이온이 칼슘이온, 바륨이온 및 알루미늄이온으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종이상의 이온인 것을 특징으로 하는 뉴클레오사이드화합물의 제조방법.

청구항 4.

제 3항에 있어서, 상기 인산이온과 난수용성 염을 형성할 수 있는 금속양이온을, 염소이온, 질소이온, 탄산이온, 황산이온 및 아세트산이온으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종이상의 음이온과의 금속염으로서 상기 수성 반응매체중에 존재시키는 것을 특징으로 하는 뉴클레오사이드화합물의 제조방법.

청구항 5.

제 3항에 있어서, 상기 인산이온과 난수용성 염을 형성할 수 있는 금속양이온을, 펜토스 - 1 - 인산염으로서 상기 수성 반응매체중에 존재시키는 것을 특징으로 하는 뉴클레오사이드화합물의 제조방법.

<110> MITSUI CHEMICALS, INC
 <120> PROCESS FOR PRODUCING NUCLEOSIDE COMPOUND
 <150> PCT/JP 1999-132144
 <151> 1999-05-13
 <160> 2
 <170> KopatentIn 1.71

```

<210>      1
<211>      30
<212>      DNA
<213>      Artificial Sequence
<220>
<223>      01igonucleotide to act as a PCR primer for cloning of purine
              nucleoside phosphorylase of E.coli K-12
<400>      1
gtgaattcac aaaaaggata aaacaatggc                                30
<210>      2
<211>      29
<212>      DNA
<213>      Artificial Sequence
<220>
<223>      01igonucleotide to act as a PCR primer for cloning of purine
              nucleoside phosphorylase of E.coli K-12
<400>      2
tcgaagcttg cgaaacacaa ttactcttt                                29

```