

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2014 年 9 月 25 日 (25.09.2014)



(10) 国际公布号
WO 2014/146242 A1

(51) 国际专利分类号:
C12P 19/36 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2013/072845

(22) 国际申请日: 2013 年 3 月 19 日 (19.03.2013)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(71) 申请人: 苏州汉酶生物技术有限公司 (EN-ZYMEWORKS, INC.) [CN/CN]; 中国江苏省张家港国泰北路 1 号 F 栋 2 楼, Jiangsu 215600 (CN)。

(72) 发明人: 陶军华 (TAO, Junhua); 中国江苏省张家港国泰北路 1 号 F 栋 2 楼, Jiangsu 215600 (CN)。李斌 (LI, Bin); 中国江苏省张家港国泰北路 1 号 F 栋 2 楼, Jiangsu 215600 (CN)。谢磊 (XIE, Lei); 中国江苏省张家港国泰北路 1 号 F 栋 2 楼, Jiangsu 215600 (CN)。庄季昌 (ZHUANG, Jichang); 中国江苏省张家港国泰北路 1 号 F 栋 2 楼, Jiangsu 215600 (CN)。周永达 (ZHOU, Yongda); 中国江苏省张家港国泰北路 1 号 F 栋 2 楼, Jiangsu 215600 (CN)。张超 (ZHANG, Chao); 中国江苏省张家港国泰北路 1 号 F 栋 2 楼, Jiangsu 215600 (CN)。刘根 (LIU, Gen); 中国江苏省张家港国泰北路 1 号 F 栋 2 楼, Jiangsu 215600 (CN)。

(74) 代理人: 苏州创元专利商标事务所有限公司 (SU-ZHOU CREATOR PATENT & TRADEMARK

AGENCY LTD.); 中国江苏省苏州市干将西路 93 号, Jiangsu 215002 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

根据细则 4.17 的声明:

— 发明人资格(细则 4.17(iv))

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

(54) Title: ENZYMATIC PREPARATION METHOD FOR OXIDIZED COENZYME II

(54) 发明名称: 一种氧化型辅酶 II 的酶催化制备方法

(57) Abstract: The present invention relates an enzymatic preparation method for an oxidized coenzyme II using a one pot method. Three substrates: nicotinamide nucleotide (NR), adenosine triphosphate disodium salt (ATP- Na_2), and sodium hexametaphosphate are used as raw materials, to make them react in the existence of four enzymes: nicotinamide nucleoside kinase (NRK), inorganic pyrophosphatase, NAD kinase, and poly-pyrophosphokinase, in a buffer solution with pH being 4.0 to 8.5, and at a temperature of 10°C to 40°C, so as to obtain the oxidized coenzyme II. The present invention solves the technical problem that nicotinamide nucleotide has a high cost and is difficult to be obtained, the reaction time is long, a process cost is high, and a process condition is not suitable for industrial scale-up in a current enzymatic preparation method; and the oxidized coenzyme II can be obtained with high efficiency and a low cost in an industrialized scale-up production manner.

(57) 摘要: 本发明涉及一种一锅法氧化型辅酶 II 的酶催化制备方法, 其以烟酰胺核苷(NR)、三磷酸腺苷二钠盐(ATP- Na_2)和六偏磷酸钠三种底物为原料, 使它们在烟酰胺核苷激酶(NRK)、无机焦磷酸酶、NAD 激酶及多聚焦磷酸激酶四种酶存在下, 在 pH 为 4.0~8.5 的缓冲溶液中, 以及温度 10 °C~40 °C 下进行反应得到氧化型辅酶 II。本发明解决了目前酶催化制备方法中烟酰胺核苷磷酸成本高且不易得到, 反应时间长, 工艺成本较高, 工艺条件也不适合工业放大的技术难题, 能够高效, 低成本, 且易于工业化放大生产的获得氧化型辅酶 II。



WO 2014/146242 A1

说明书

发明名称: 一种氧化型辅酶 II 的酶催化制备方法

[1] 技术领域

[2] 本发明涉及一种氧化型辅酶 II 的酶催化制备方法。

[3] 背景技术

[4] 氧化型辅酶 II(Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸, 简称: NADP+) 是一种极为重要的 核苷酸 类 辅酶, 它是氧化型辅酶 I(Nicotinamide adenine dinucleotide, 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸, 简称: NAD+) 中与腺嘌呤相连的核糖环系 2'- 位的 磷酸化 衍生物, 是 生物 氧化过程中不可缺少的氢传递体, 参与多种合成代谢反应, 如脂类、脂肪酸和核苷酸的合成。这些反应中需要 NADPH 作为还原剂、氢负供体, NADPH 是 NADP+ 的还原形式。NADP+ 是 NAD+ 通过 NAD 激酶 催化 磷酸化 所产生。NAD+ 和 DPNA+ 是各种不需氧脱氢酶的辅酶, 可以接受底物分子上提供的氢负离子 (H-) 而还原为 NADH 和 PNADH。植物叶绿体中, 光合作用 光反应 电子链的最后一步以 NADP+ 为原料, 经 铁氧还蛋白-NADP+还原酶 的催化而产生 NADPH。产生的 NADPH 接下来在) 中被用于二氧化碳的同化。对于动物来说, 磷酸戊糖途径的氧化相是细胞中 NADPH 的主要来源, 由它可以产生 60 % 的所需 NADPH。

[5] 目前人类合成 NADP+ 的方法可以分为化学法和生物法。化学法以烟酰胺为原料, 经多步反应合成出 NADP+, 化学法存在反应路线长, 反应条件苛刻, 选择性差, 易生成副产物, 产物纯度低, 收率低, 需用到昂贵的试剂, 成本较高等不足; 此外, 大量有机溶剂的使用还会造成环境污染。因此, 该工艺路线不适合于工业化大生产 [James Dowden et al, Chemical Synthesis of the Second Messenger Nicotinic Acid Adenine Dinucleotide Phosphate by Total Synthesis of Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate, [Angew. Chem. Int. Ed. 2004, 43, 4637-4640]。

[6] 传统的生物法是采用发酵或其它微生物培养技术, 并通过对酵母或其它微生物的分离提取得到 NADP+。该工艺过程虽然已很成熟, 但是原料耗费巨大, 劳动

强度大，能源消耗大，产量有限，生产成本低，产品价格高，限制了氧化型辅酶 II (NADP⁺) 的广泛应用 [Sakai, T., Biotech. Bioeng. 1980, 22, Suppl. 1, 143-162; Uchida, T. et al, Agric. Biol. Chem. 1971, 37, 1049-1056; Sakai, T. and Uchida, T. et al, Agric. Biol. Chem. 1973, 37, 1041-1048]。

- [7] 酶催化转化是一种高选择性反应，不同种类的酶可作用于不同构型和不同种类的特定底物，从而达到定向转化的目的，酶法以其所具有的反应条件温和、立体专一性强、转化率高等特点，被广泛地研究和应用。生物酶法合成 NADP⁺ 的研究中，Whitesides 和其同事构建了聚丙烯酰胺凝胶固定化的 NAD 焦磷酸化酶和 NAD 激酶及 ATP 再生酶催化反应体系，催化烟酰胺核苷磷酸（简称 NMN）合成 NADP⁺ 的方法 [An Efficient Chemical and Enzymatic Synthesis of Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NAD⁺) . J. Am. Chem. SOC., 1984, 106, 234-239]。然而，该工艺难于放大，原因在于：一是原料合成烟酰胺核苷磷酸合成收率低，且不易放大，原料来源受到限制；二是酶催化合成 NAD⁺ 和 NADP⁺ 只能在克级范围得到高的转化率，但反应时间长达 16 天，产能低；三是由于采用固定化的 NAD 焦磷酸化酶和 NAD 激酶，烟酰胺核苷磷酸和 NAD⁺ 与固定化 NAD 焦磷酸化酶和 NAD 激酶之间的传质受到阻碍，影响了固定化 NAD 焦磷酸化酶和 NAD 激酶的催化效率，而且该文作者指出该方法未能放大，因此该工艺路线难于适应放大的要求。有必要进一步开发适应于放大生产需要的新工艺。
- [8] 发明内容
- [9] 本发明所要解决的技术问题是克服现有技术的不足，提供一种易于工业化放大生产的氧化型辅酶 II 的酶催化制备方法。
- [10] 为解决以上技术问题，本发明采取如下技术方案：一种氧化型辅酶 II 的酶催化制备方法，其以烟酰胺核苷 (NR)、六偏磷酸钠和三磷酸腺苷二钠盐 (ATP-Na₂) 为原料，使它们在烟酰胺核苷激酶 (NRK)、无机焦磷酸酶、NAD 激酶及多聚磷酸激酶四种酶存在下，在 pH 为 4.0~8.5 的缓冲溶液中，以及温度 10 °C ~40 °C 下进行一锅煮反应得到氧化型辅酶 II。与其它反应不同的是，利用六偏磷酸钠代替 ATP 在第二步中进行反应，可以降低 ATP 的用量，提高反应的经济性。
- [11] 根据本发明的一具体实施例中，缓冲溶液可以为磷酸盐缓冲溶液、Tri-HCl 缓

冲溶液或 TEA 缓冲溶液，缓冲溶液的 pH 可用无机酸或碱来调节。缓冲溶液的一般浓度为 100~500 mM，优选为 100~200 mM。

- [12] 根据本发明的一个优选实施例，在上述一锅煮反应开始时，烟酰胺核苷、六偏磷酸钠和三磷酸腺苷二钠盐的浓度分别为 10~100 mg/ml、20~200 mg/ml 和 20~200 mg/ml。烟酰胺核苷激酶、无机焦磷酸酶、NAD 激酶及多聚磷酸激酶的加入量分别为分别为 5-50mg 酶粉 /ml 缓冲溶液、10-100mg 酶粉 /ml 缓冲溶液、5-50mg 酶粉 /ml 缓冲溶液和 10-100mg 酶粉 / ml 缓冲溶液。
- [13] 进一步优选地，一锅煮反应在无机盐存在下进行，该无机盐可以为选自钠、钾、镁、锌、锰、钴及铁的金属的硫酸、盐酸或磷酸盐中的一种或多种的混合物。无机盐的加入量为 1~50mg/ml 缓冲溶液。无机盐的具体实例有例如氯化镁、硫酸镁、氯化钠、二氯化锰、氯化锌、硫酸锌等。
- [14] 在一根据本发明的特定实施方案中，制备方法的实施过程如下：在反应容器中加入缓冲溶液，然后依次加入烟酰胺核苷、三磷酸腺苷二钠盐、六偏磷酸钠、烟酰胺核苷激酶、无机焦磷酸酶、NAD 激酶、多聚磷酸激酶以及无机盐，控制温度 10 °C ~40 °C，搅拌反应，利用液相色谱-质谱联用监测反应的转化率，至检测到磷酸腺苷消耗完毕，停止反应。
- [15] 优选地，控制反应在温度 20 °C ~40 °C 下进行。
- [16] 在停止反应后，依次经过滤、大孔树脂吸附、冻干、用乙醇和水的混合溶剂重结晶得到氧化型辅酶 II。
- [17] 由于以上技术方案的实施，本发明与现有技术相比具有如下优点：
- [18] 本发明是一种利用微生物酶在温和条件下高效制备氧化型辅酶 II 的方法。与已存在的从酵母中分离提取的方法相比，本方法避免了传统方法的高能耗、高材料消耗和产物价格昂贵等缺点，具备酶催化过程所特有的反应条件温和、立体专一性强、催化效率高等特点。本发明与现有的酶催化技术相比，原料易于大量得到，用多酶偶联一锅法方式进行转化，简单有效，反应周期短，产能大，进一步结合等电点结晶和大孔树脂相结合的方式对产物进行分离纯化，使得整个工艺成本较低，有利于大批量地工业化制备氧化型辅酶 II。
- [19] 具体实施方式

- [20] 本发明采用廉价易得的烟酰胺核苷和 ATP 二钠盐为起始原料，首先通过烟酰胺核苷激酶和无机焦磷酸酶为催化剂，添加金属离子作为酶活力增强剂，催化烟酰胺核苷和 ATP 二钠盐偶联转化为 NAD⁺；然后利用 NAD 激酶和 NAD⁺ 合成 NADP⁺，反应中通过加入六偏磷酸钠代替昂贵的 ATP 作为 NAD 转化为 NADP 反应的磷酸供体。本发明的特征还在于，为了启动酶催化反应，使用对烟酰胺核苷和 ATP 没有影响的缓冲溶液，如磷酸盐缓冲溶液、Tri-HCl 缓冲溶液或 TEA 缓冲溶液中，其中优选磷酸盐缓冲溶液，酶反应适当地在 4.0~8.5，更优选地 5.0~7.5 pH 值范围内进行，可用无机酸或碱例如氢氧化钾调节 pH 值；合适的反应温度为 10~60°C，优选温度是 10~40°C，更优选 20~40°C，特别优选 30~40°C。保温时间可以根据反应条件来改变，但通常反应时间为 30 分钟~24 小时，更优选地 1~18 小时，可以实现以 85~100% 的转化率制备产物氧化型辅酶 II。
- [21] 本发明所述的反应以原料和生物酶催化剂同时加入水相反应体系开始酶促催化反应，中间体无需分离纯化。
- [22] 停止反应后，可以容易的按照下述的方法回收，例如，反应结束后，反应混合物中的蛋白通过加热、酸、碱或有机溶剂变性沉淀并通过离心除去。为此目的，可以使用一般用于上清液提取某些产物并适合于氧化型辅酶 II 各种特性的方法，因此例如，用大孔树脂纯化上清中的氧化型辅酶 II，进一步利用等电点特性从用乙醇和水的混合溶剂的混合物中重结晶出氧化型辅酶 II。
- [23] 下面结合具体实施例对本发明做进一步详细的说明，但本发明的保护范围并不限于以下实施例。
- [24] 实施例 1
- [25] 在 20 mL 三口烧瓶中加入 10 mL 磷酸盐缓冲溶液 (100 mM，pH 为 5.8)，依次加入烟酰胺核苷 (*J. Med. Chem.* 2007, 50, 6458-6461) 50 mg，三磷酸腺苷二钠盐 25 mg，六偏磷酸钠 50mg，烟酰胺核苷激酶 (*PLoS Biology*, 2007, 5(10), 2220-2230) 8 mg，无机焦磷酸酶 (9024-82-2, EC 3.6.1.1) 10 mg，NAD 激酶 (*European Journal of Biochemistry*, 2001, 268(15), 4359-4365) 5 mg 和多聚磷酸激酶 (*PNAS*, 1997, 94(2), 439-442) 12 mg，氯化镁 20 mM，于 37 °C 下，200 rpm 搅拌反应，利用液相色谱 - 质谱联用监测反应的转化率，经过

10 小时反应后检测三磷酸腺苷和 NAD 已经消耗完毕，停止反应。通过进一步的过滤，HZ-818 型大孔树脂吸附，冻干，用乙醇和水的混合溶剂 (15:1) 重结晶即可获得氧化型辅酶 II 产品，收率 60%。

[26] 实施例 2

[27] 在 20 mL 三口烧瓶中加入 10 mL Tris-HCl 缓冲溶液 (200 mM, pH 为 7.5)，依次加入烟酰胺核苷 (*J. Med. Chem.* 2007, 50, 6458-6461) 50 mg，三磷酸腺苷二钠盐 25 mg，六偏磷酸钠 50mg，烟酰胺核苷激酶 (*PLoS Biology*, 2007, 5(10), 2220-2230) 12 mg，无机焦磷酸酶 (9024-82-2, EC 3.6.1.1) 15 mg，NAD 激酶 (*European Journal of Biochemistry*, 2001, 268(15), 4359-4365) 12 mg 和多聚磷酸激酶 (*PNAS*, 1997, 94(2), 439-442) 20 mg, 氯化锰 30 mM，氯化镁 20 mM，于 37 °C 下，200 rpm 搅拌反应，利用液相色谱 - 质谱联用监测反应的转化率，经过 12 小时反应后检测三磷酸腺苷和 NAD 已经消耗完毕，停止反应。通过进一步的过滤，D-101 型大孔树脂吸附，冻干，用乙醇和水的混合溶剂 (20:1) 重结晶即可获得氧化型辅酶 II 产品，收率 75%。

[28] 本说明书中公开的所有特征，或公开的所有方法或过程中的步骤，除了互相排斥的特征和 / 或步骤以外，均可以以任何方式组合。

[29] 上述实施例只为说明本发明的技术构思及特点，其目的在于让熟悉此项技术的人士能够了解本发明的内容并据以实施，并不能以此限制本发明的保护范围。凡根据本发明精神实质所作的等效变化或修饰，都应涵盖在本发明的保护范围之内。

权利要求书

- [权利要求 1] 1、一种氧化型辅酶 II 的酶催化制备方法，其特征在于：所述制备方法以烟酰胺核苷、三磷酸腺苷二钠盐和六偏磷酸钠为原料，使它们在烟酰胺核苷激酶、无机焦磷酸酶、NAD 激酶及多聚磷酸激酶四种酶存在下，在 pH 为 4.0~8.5 的缓冲溶液中，以及温度 10℃~40℃下进行一锅煮反应得到氧化型辅酶 II。
- [权利要求 2] 2、根据权利要求 1 所述的氧化型辅酶 II 的酶催化制备方法，其特征在于：缓冲溶液为磷酸盐缓冲溶液、Tri-HCl 缓冲溶液或 TEA 缓冲溶液，缓冲溶液的 pH 用无机酸或碱来调节。
- [权利要求 3] 3、根据权利要求 1 或 2 所述的氧化型辅酶 II 的酶催化制备方法，其特征在于：缓冲溶液的浓度为 100~500 mM。
- [权利要求 4] 4、根据权利要求 1 所述的氧化型辅酶 II 的酶催化制备方法，其特征在于：反应开始时，烟酰胺核苷、三磷酸腺苷二钠盐和六偏磷酸钠的浓度分别为 10~100 mg/ml、20~200 mg/ml 和 20~200 mg/ml。
- [权利要求 5] 5、根据权利要求 1 至 4 中任一项所述的氧化型辅酶 II 的酶催化制备方法，其特征在于：烟酰胺核苷激酶、无机焦磷酸酶、NAD 激酶及多聚磷酸激酶的加入量分别为 5-50mg 酶粉/ml 缓冲溶液、10-100mg 酶粉/ml 缓冲溶液、5-50mg 酶粉/ml 缓冲溶液和 10-100mg 酶粉/ml 缓冲溶液。
- [权利要求 6] 6、根据权利要求 1 所述的氧化型辅酶 II 的酶催化制备方法，其特征在于：一锅煮反应在无机盐存在下进行，所述无机盐为选自钠、钾、镁、锌、锰、钴及铁的金属的硫酸、盐酸或磷酸盐中的一种或多种的混合物，所述无机盐的加入量为 1-50mg/ml 缓冲溶液。
- [权利要求 7] 7、根据权利要求 6 所述的氧化型辅酶 II 的酶催化制备方法，其特征在于：无机盐为氯化镁或氯化锰。
- [权利要求 8] 8、根据权利要求 6 或 7 所述的氧化型辅酶 II 的酶催化制备方法

，其特征在于：所述制备方法的实施过程如下：在反应容器中加入缓冲溶液，然后依次加入烟酰胺核苷、三磷酸腺苷二钠盐、六偏磷酸钠、烟酰胺核苷激酶、无机焦磷酸酶、NAD 激酶、多聚磷酸激酶以及无机盐，控制温度为 10 °C ~40°C，搅拌反应，利用液相色谱-质谱联用监测反应的转化率，至检测到磷酸腺苷消耗完毕，停止反应。

[权利要求 9]

9、根据权利要求 8 所述的氧化型辅酶 II 的酶催化制备方法，其特征在于：所述制备方法还包括：停止反应后，依次经过滤、大孔树脂吸附、冻干、用乙醇和水的混合溶剂重结晶得到氧化型辅酶 II。

[权利要求 10]

10、据权利要求 8 所述的氧化型辅酶 II 的酶催化制备方法，其特征在于：控制反应在温度 20 °C ~40°C 下进行。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2013/072845

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12P 19/36 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: C12P 19/-

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, EPODOC, CNKI, CNPAT, ISI Web of Knowledge, Google: coenzyme, nicotinamide nucleotides, ATP-Na₂, Adenosine triphosphate disodium salt, Sodium hexametaphosphate, NAD⁺ kinase, nicotinamide nucleoside kinase, metaphosphoric acid, hexasodium salt, hexasodium metaphosphate, glassy sodium, NADP, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NRK, inorganic pyrophosphatase, polyphosphate kinase, SHMP, graham's salt, sodium polyphosphate kinase

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 102605027 A (SUZHOU ENZYMEWORKS BIOLOG TECHNOLOGY CO., LTD.) 25 July 2012 (25.07.2012) claims 1-10	1-10
Y	EP 1416051 A1 (ORIENTAL YEAST CO., LTD.) 06 May 2004 (06.05.2004) claims 1 and 7, description, paragraph [0134]	1-10
A	CN 102605026 A (SUZHOU ENZYMEWORKS BIOLOG TECHNOLOGY CO., LTD.) 25 July 2012 (25.07.2012) the whole document	1-10
A	US 4411995 (MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY) 25 October 1983 (25.10.1983) the whole document	1-10

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 02 December 2013 (02.12.2013)	Date of mailing of the international search report 26 December 2013 (26.12.2013)
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451	Authorized officer LIAO, Wenying Telephone No. (86-10) 62413867

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2013/072845

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 102605027 A	25.07.2012	CN 102605027 B	17.04.2013
EP 1416051 A1	06.05.2004	WO 03004654 A1	16.01.2013
		AU 2002313322 A1	21.01.2003
		JPWO 03004654 A1	28.10.2004
		US 2004248263 A1	09.12.2004
		JP 4088251 B2	21.05.2008
		US 7863014 B2	04.01.2011
		EP 1416051 B1	08.06.2011
		CA 2452399 C	13.08.2013
CN 102605026 A	25.07.2012	CN 102605026 B	17.04.2013
US 4411995	25.10.1983	None	

A. 主题的分类 C12P 19/36 (2006.01) i 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类																	
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) IPC: C12P 19/- 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) WPI, EPODOC, CNKI, CNPAT, ISI Web of Knowledge, Google: NADP, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NAD+ kinase, NRK, inorganic pyrophosphatase, ATP-Na2, SHMP, Sodium hexametaphosphate, metaphosphoric acid, hexasodium salt, hexasodium metaphosphate, glassy sodium, graham's salt, sodium polymetaphosphate, 辅酶, 烟酰胺核苷, 三磷酸腺苷二钠盐, 六偏磷酸钠, NAD 激酶, 烟酰胺核苷激酶, 无机焦磷酸酶, 多聚磷酸激酶																	
C. 相关文件 <table border="1"> <thead> <tr> <th>类 型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>CN 102605027 A (苏州汉酶生物技术有限公司) 25.7 月 2012 (25.07.2012) 权利要求 1-10</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>EP 1416051 A1 (ORIENTAL YEAST CO., LTD.) 06.5 月 2004 (06.05.2004) 权利要求 1 和 7, 说明书第[0134]段</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 102605026 A (苏州汉酶生物技术有限公司) 25.7 月 2012 (25.07.2012) 全文</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 4411995 (MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY) 25.10 月 1983(25.10.1983) 全文</td> <td>1-10</td> </tr> </tbody> </table>			类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	Y	CN 102605027 A (苏州汉酶生物技术有限公司) 25.7 月 2012 (25.07.2012) 权利要求 1-10	1-10	Y	EP 1416051 A1 (ORIENTAL YEAST CO., LTD.) 06.5 月 2004 (06.05.2004) 权利要求 1 和 7, 说明书第[0134]段	1-10	A	CN 102605026 A (苏州汉酶生物技术有限公司) 25.7 月 2012 (25.07.2012) 全文	1-10	A	US 4411995 (MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY) 25.10 月 1983(25.10.1983) 全文	1-10
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求															
Y	CN 102605027 A (苏州汉酶生物技术有限公司) 25.7 月 2012 (25.07.2012) 权利要求 1-10	1-10															
Y	EP 1416051 A1 (ORIENTAL YEAST CO., LTD.) 06.5 月 2004 (06.05.2004) 权利要求 1 和 7, 说明书第[0134]段	1-10															
A	CN 102605026 A (苏州汉酶生物技术有限公司) 25.7 月 2012 (25.07.2012) 全文	1-10															
A	US 4411995 (MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY) 25.10 月 1983(25.10.1983) 全文	1-10															
☐ 其余文件在 C 栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。																	
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件																	
国际检索实际完成的日期 02.12 月 2013 (02.12.2013)		国际检索报告邮寄日期 26.12 月 2013 (26.12.2013)															
ISA/CN 的名称和邮寄地址: 中华人民共和国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088 传真号: (86-10)62019451		受权官员 廖文勇 电话号码: (86-10) 62413867															

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2013/072845

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN 102605027 A	25.07.2012	CN 102605027 B	17.04.2013
EP 1416051 A1	06.05.2004	WO 03004654 A1	16.01.2003
		AU 2002313322 A1	21.01.2003
		JP WO03004654 A1	28.10.2004
		US 2004248263 A1	09.12.2004
		JP 4088251 B2	21.05.2008
		US 7863014 B2	04.01.2011
		EP 1416051 B1	08.06.2011
		CA 2452399 C	13.08.2013
CN 102605026 A	25.07.2012	CN 102605026 B	17.04.2013
US 4411995	25.10.1983	无	