



(19) REPUBLIKA HRVATSKA
DRŽAVNI ZAVOD ZA
INTELEKTUALNO VLASNIŠTVO



(21) Broj prijave:

HR P20040109A A2

HR P20040109A A2

(12) PRIJAVA PATENTA

(51) Int. Cl.⁷: **C 12 Q 1/42**
C 12 Q 1/18
C 12 Q 1/48
C 12 Q 1/527

(22) Datum podnošenja prijave patenta u HR: 30.01.2004.

(43) Datum objave prijave patenta u HR: 30.06.2004.

(86) Broj međunarodne prijave: PCT/EP02/09421

Datum podnošenja međunarodne prijave 30.07.2002.

(87) Broj međunarodne objave: WO 03/012132

Datum međunarodne objave 13.02.2003.

(31) Broj prve prijave: 01402085.3

(32) Datum podnošenja prve prijave: 01.08.2001.

(33) Država ili organizacija podnošenja prve prijave: EP

(71) Podnositelj prijave:

Aventis Pharma S.A., 20 Avenue Raymond Aron, 92160 Antony, FR

(72) Izumitelj:

Thérèse Stachyra, 10 rue du Verger, 94250 Villiers, FR

Jacques Biton, 9 impasse Dagobert, 60610 Lacroix Saint Ouen, FR

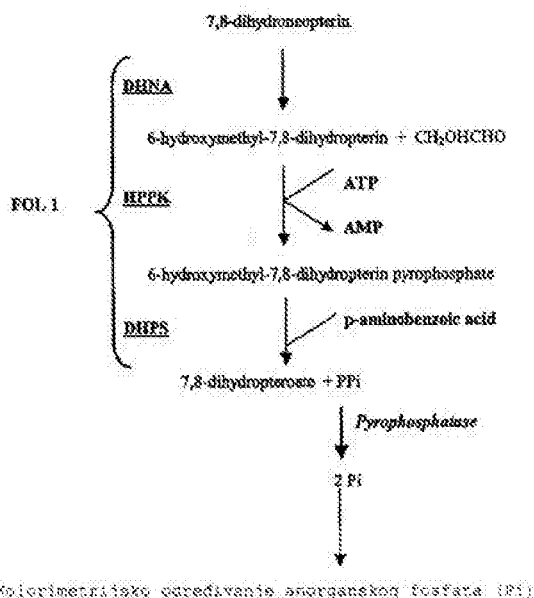
(74) Punomoćnik:

CPZ - CENTAR ZA PATENTE d.d., ZAGREB, HR

(54) Naziv izuma:

**POSTUPAK ODREĐIVANJA INHIBITORNE AKTIVNOSTI SPOJA JEDNOG OD ENZIMA PUTA
SINTEZE FOLATA**

(57) Sažetak: Izum se odnosi na postupak određivanja inhibitorne aktivnosti ispitivanog spoja na najmanje jednu DHPS aktivnost folatnog puta sinteze, a koji je u vezi sa detekcijom otpuštanja stvorenog anorganskog fosfata. Enzimatski test u kojem se primjenjuje navedeni postupak određivanja enzimatskog pripravka, isto tako pripada dosegu izuma. Navedeni test je prikladan za probir velikog broja spojeva koji djeluju na putu sinteze folata.



HR P20040109A A2

OPIS IZUMA**Područje izuma**

- 5 Izum se odnosi na postupak određivanja inhibitorne aktivnosti spoja kod kojeg se ispituje najmanje DHPS aktivnost na putu sinteze folata, a koji je u vezi s otkrićem otpuštanja stvorenog fosfata.

Pozadina izuma

- 10 Reducirani folatni kofaktori su osnova za sintezu purina, timidilata, glicin metionina, pantotenske kiseline i N-formil metionil-tRNA. Folati predstavljaju vitamine za ljude, dok većina stanica mikroorganizama mora sintetizirati folate *de novo* budući da im nedostaje nosačem posredovani sistem aktivnog transporta koji je prisutan u stanicama sisavaca, a koji omogućuje uporabu preformiranog folata iz hrane.
- 15 Kod *P.carinii* (Volpe i sur., 1995), *S.cerevisiae* (Sen-Gupta i sur., 1997) i *C.albicans*, jedan gen kodira tri enzima folatnog puta sinteze *de novo*. Fol 1 gen iz *C.albicans* kodira navodni protein od 88.6 kDa (788 amino kiseline), vidi PCT Prijavu WO00/15838 (CaNL 256), vidi SEQ ID 1.

- 20 Sljedovi Fol 1 proteina pokazuju značajnu homologiju sa proteinima koji su sudjeluju u biosintezi dihidropteroata (Lopez & Lacks, 1993, Slock i sur., 1990) u eukariotskim i prokariotskim mikroorganizmima.

- Fol 1 gen iz *P.carinii*, *S.cerevisiae* i *C.albicans* kodiraju multifunkcionalni enzim koji katalizira zadnja tri koraka u slijedu biosintetskog puta 7,8-dihidropteroata (vidi Sliku 1). Prvu aktivnost predstavlja 1,8-dihidroneopterin aldolaza ili DHNA koja katalizira pretvorbu 7,8-dihidroneopterin u 6-hidroksimetil-7,8-dihidropterin. Drugu aktivnost predstavlja 25 7,8-dihidro-6-hidroksimetilpterin-pirofosfokinaza ili HPPK; a koja pretvara produkt DHNA reakcije u 6-hidroksimetil-7,8-dihidropterin pirofosfat. Treću aktivnost predstavlja dihidropteroat sintetaza ili DHPS, a katalizira kondenzaciju para-aminobenzojeve kiseline (pABA) sa 6-hidroksimetil-7,8-dihidropterin pirofosfatom do nastanka 7,8-dihidropteroata.

- 30 Bez varijanta kod sisavaca, navedeni enzimi su atraktivni kemoterapeutske ciljevi, budući da je moguće na njih djelovati ciljno, visoko selektivnim lijekovima za liječenje bolesti uzrokovanih mikroorganizmima. Nekoliko je spojeva razvijeno u obliku antimikrobnih sredstava koja djeluju ciljno na dva od sedam enzima folatnog puta. Trimetoprim inhibira dihidrofolat reduktazu i na taj način sprječava stvaranje tetrahidrofolata (Huovinen i sur., 1995). Sulfonamidi pokazuju svoje antimikrobno djelovanje na različitim biosintetskim enzimima, dihidropteroat sintetazi (Slock i sur., 1990).

- 35 Usporedbe slijeda amino kiseline i funkcionalne studije otkrivaju značajnu raznolikost u DHNA, HPPK i DHPS strukturi i organizaciji različitih vrsta (Slock i sur., 1990; Lopez & Lacks, 1993). Ovisno o izvoru, navedene tri aktivnosti su izražene kao mono-, bi- ili tri- funkcionalni enzim na istom polipeptidu. Uzimajući u obzir teškoću proizvodnje multifunkcionalnih enzima, u slučaju multifunkcionalnih enzima, pristupi u literaturi su svedeni na izoliranje i ekspresiju sljedova monofunkcionalne domene sa ciljem proučavanja enzimatskog sustava (Volpe i sur., 40 1995).

- Prethodne studije sa monofunkcionalnim proteinom su zahtijevale spajanje DHNA aktivnosti sa ekstrinzičnim pročišćenim HPPK i DHPS aktivnostima, ili vezanje HPPK sa ekstrinzičnim pročišćenim DHPS-om (Lopez & Lacks, 45 1993). Štoviše, isto tako je obuhvaćena i sinteza HPPK ili DHPS supstrata.

- Testovi opisani u literaturi (Lopez & Lacks, 1993, Volpe i sur., 1995) se ne mogu primjeniti obzirom na veliku količinu materijala za probir (H.T.S). Općenito je korišten radioizotopom obilježen supstrat: para-amino benzojeva kiselina ([³H]pABA ili [¹⁴C]pABA), koji obuhvaćaju korak razdvajanja supstrata od produkata prije mjerenja radioaktivnosti. 50 Nastali radioaktivni dihidropteroat je odvojen od supstrata kromatografijom na papiru i izmjeran je na scintilacijskom brojaču (Volpe i sur., 1995). Radioaktivni dihidropteroat se može odvojiti od neizreagiranog [³H]pABA metodom ekstrakcije eterom prije mjerenja radioaktivnosti na scintilacijskom brojaču. Navedeni koraci, ekstrakcija solventa ili kromatografija na papiru, se ne mogu primjeniti na H.T.S.

Sažetak izuma

- Izum se odnosi na postupak određivanja inhibitorne aktivnosti ispitivanog spoja na aktivnost jednog od enzima puta sinteze folata, a obuhvaća korake inkubacije navedenog spoja sa enzimskim pripravkom koji posjeduje najmanje DHPS aktivnost, te detekciju otpuštanja fosfata.

- 60 U prikladnom ostvarenju, DHPS aktivnost je povezana sa pirofosfatom.

U skladu sa jednim od ostvarenja izuma, enzimatski pripravak posjeduje DHPS aktivnost, ili DHPS i HPPK aktivnosti, ili DHPS i HPPK i DHNA aktivnosti.

5 Navedeni postupak određivanja obuhvaća isto tako primjenu enzima koji je/su kodiran/i sa SEQ ID N°1 ili njegovim homologom i njegovim funkcionalnim fragmentima kao i odgovarajućim kodiranim proteinom SEQ N°1 ili njegovim funkcionalnim polipeptidnim fragmentom.

10 U skladu s drugim ostvarenjem, postupak određivanja je izveden na osnovi enzimatskog pripravka koji potječe od gljiva, bakterija ili protozoa.

Postupak određivanja obuhvaća korak inkubacije ispitivanog spoja sa 7,8-dihidroneopterinom, ATP, pABA, Fol1, pirofosfatazom i korak detekcije otpuštanja fosfata. Navedeno se može izvesti mjerenjem DHPS aktivnosti, no isto tako i DHNA i/ili HPPK aktivnosti.

15 Navedeni postupak određivanja omogućuje *in vitro* sintezu HPPK supstrata, DHPS supstrata i produkta.

Prikladno ostvarenje prikazanog izuma predstavlja detekciju fosfata kolorimetrijskim postupkom. Pored toga, detekcija fosfata se isto tako može izvesti fluorometrijom ili putem radioaktivnih postupaka.

20 Izum je isto tako usmjeren na postupak probira spojeva sa potencijalnim inhibitornim učinkom na enzimatski pripravak primjenom prethodno opisanog postupka.

Na kraju, izum se odnosi na enzimatski test za *in vitro* ispitivanje spojeva obzirom na njihov inhibitorni učinak na enzimatski pripravak kao što je prethodno prikazano, a sadrži kao supstrat 7,8-dihidroneopterin, Fol1 enzim i enzim pirofosfatazu, te pABA i ATP za istovremenu ili uzastopnu primjenu.

Kratak opis podataka

- Sl. 1 Shema tri reakcije katalizirane Fol1.
- 30 Sl. 2 Kinetika DHNA+HPPK+DHPS, HPPK+DHPS i DHPS aktivnosti. Apsorbanca je mjerena na 850 nm; vremenska skala je u minutama.
- Sl. 3 U testu 1, kinetika DHNA+HPPK+DHPS aktivnosti je izmjerena na 850 nm u uzorcima. Nakon jednog sata perioda inkubacije, supstrat 7,8-dihidroneopterin je dodan uzorcima sa ili bez inhibitora 1.
- Sl. 4 U testu 2, kinetike HPPK+DHPS aktivnosti su izmjerene na 850 nm u uzorcima. Nakon jednog sata inkubacije, supstrat ATP je dodan uzorcima sa ili bez inhibitora 1.
- 35 Sl. 5 O testu 3, kinetike DHPS aktivnosti su izmjerene na 850 nm u uzorcima. Nakon jednog sata inkubacije, dodan je supstrat pABA uzorcima sa ili bez inhibitora 1.
- Sl. 6 Primjer inhibitora (inhibitor 2) koji inhibira samo DHNA aktivnost Fol 1. Inhibicija je zabilježena samo u stanju 1 (test 1/Sl. 6A). U stanjima 2 i 3 (test 2/Sl. 6B, odnosno 3/Sl. 6C), doze inhibitora 2 su dodane nakon
- 40 nakupljanja 6-hidroksimetil-7,8-dihidropterina i 6-hidroksimetil-7,8-dihidropterin pirofosfata, te prije dodavanja ATP-a, odnosno p-aminobenzojeve kiseline.

Detaljan opis izuma

45 Fol1 *gen* iz *C.albicans* koji kodira DHNA, HPPK i DHPS, je kloniran i izražen u *E.coli*. Rekombinantni protein je pročišćen, a enzimatska aktivnost navedenog proteina je ispitivana.

Jedan cilj izuma je osigurati jednostavan i brzi postupak za probir velikog broja spojeva sa sposobnošću inhibicije specifično Fol1 enzima inhibiranjem najmanje jedne od njegove tri aktivnosti (DHNA, HPPK i DHPS).

50 Izum je usmjeren na postupak enzimskog testiranja koji obuhvaća multifunkcionalni protein Fol1, a koji katalizira sekvencijske reakcije putem DHNA, HPPD i DHPS, Navedeni automatski test koji izvodi robot za mjerenje DHNA, HPPK i DHPS vezanih aktivnosti putem detekcije anorganskog fosfata se zatim može primjeniti na veliku količinu materijala za probir (H.T.S) koji se mogu koristiti u otkrivanju novih antibakterijskih, antifungalnih lijekova ili lijekova

55 za liječenje infekcija uzrokovanih protozoama.

Navedeni postupak i test su se pokazali svestranim budući da djeluju bilo na sve tri aktivnosti DHNA, HPPK i DHPS zajedno (trifunkcionalni protein) ili na samo jednu od ove tri aktivnosti (monofunkcionalni proteini). Posljedično tome, test za probir se može koristiti ciljno za antibakterijske, antimikrobne ili antiprotozoalne enzime.

60 Trifunkcionalnost Fol1 je potvrđena isto tako HPLC i HPLC/MS postupcima.

Prema tome, navedeni postupak za probih inhibitornih spojeva se može primjeniti za enzimatske reakcije porijeklom iz slijedećih organizama; bakterija, gljiva ili protozoa.

Jedno prikladno ostvarenje je usmjereno na enzimatski test koji se izvodi na rekombinantnom Foll pročišćenom proteinu iz *C.albicans*,

Mjerenje DHNA, HPPK i DHPS aktivnosti je povezano sa aktivnošću pirofosfataze, dovodeći do detekcije anorganskog fosfata. Kolorimetrijski, fluorimetrijski ili radioaktivni postupci detekcije anorganskog fosfata se mogu koristiti u otkrivanju anorganskog fosfata. Na primjer, moguće je otkriti spektrofotometrijski anorganski fosfat reakcijom kataliziranom uridin difosfoglukoza pirofosforilazom i vezanjem na fosfoglukoza mutazu i glukoza R-fosfat dehidrogenazu (Johnson, i sur., 1968). U skladu sa ostvarenjem, slična enzimatska reakcija sa uridin 5'-difosfol [¹⁴C] glukozom se može koristiti kao što je prikazano u Cheung & Suhadolnik, 1977.

U skladu s drugim ostvarenjem, fluorometrijski postupak se izvodi kako bi se odredio anorganski fosfat vezanjem UDPG pirofosforilazne reakcije sa druga tri enzima sistema fosforilacije i dvostrukom redukcijom do nastanka NADPH u skladu s prikazom iz Caines i sur., 1984.

Prikladan postupak za navedeni test probira se temelji na kolorimetrijskom otkrivanju fosfata, izbjegavajući primjenu radioizotopom označenih supstrata DHNA, HPPK ili DHPS. Kako bi se to ostvarilo, DHPS reakcija je vezana sa pirofosfatazom i na taj način je izveden postupak detekcije.

Budući da primjena radioelemenata nije obavezna, Foll test se može primjeniti na veliku količinu materijala za probir (H.T.S).

Spektrofotometrijski test se koristi u mjerenju otpuštanja fosfata kataliziranog pirofosfatazom koja je dodana reakcijskoj smjesi. Fosfat se otkriva kolorimetrijskim postupkom na temelju stvaranja fosfomolibdatnog kompleksa (Upson i sur., 1996; Baykov, 1989). Navedeni spektrometrijski test se može automatizirati.

Kolorimetrijska reakcija se prati mjerenjem porasta absorbance na 850 nm. Nakupljanje dvije molekule fosfata iz svake molekule pirofosfata povećava osjetljivost testa, linearnog raspona najmanje od 2 do 20 mmol pirofosfata u reakcijskom volumenu od 200 µl.

Test iz prikazane prijave je prikladan za H.T.S. u skladu s tri reakcije katalizirane Foll kao što je prethodno opisano. Reakcijski medij sadrži slijedeće supstrate: 7,8-dihidroneopterin₇ ATP i pABA. U odsustvu inhibitora, 3 enzimatske aktivnosti Foll imaju različite kinetike. Izumljivači su pokazali da na 37°C, HPPK reakcija je 2 puta brža od DHNA reakcije, a DHPS reakcija je približno 5 puta brža od HPPK reakcije, te 10 puta brža od DHNA reakcije. Na taj način, u odsustvu inhibitora, 3 enzimatske aktivnosti Foll posjeduju različite kinetike.

Navedeni izum nadalje predstavlja postupak i reagense za *in vitro* sintezu HPPK supstrata, DHPS supstrata i DHPS produkta. Kao supstrati navedenih enzimatskih aktivnosti, samo je 1,8-dihidroneopterin (DHNA supstrat) dostupan na tržištu, drugi supstrati su nestabilni i teško ih je pripremiti. Navedeni postupak na taj način zaobilazi kemijsku sintezu 6-hidroksimetil-7,8-dihidropterina (HPPK supstrat) i 6-hidroksimetil-7,8-dihidropterin pirofosfata (DHPS supstrat).

Enzimatski pripravci za određivanje enzimatskih aktivnosti u skladu s prikazanim izumom se mogu dobiti iz nepročišćenih ekstrakta ili postupcima rekombinacije gena. Prikladan postupak za pripremljanje predstavlja rekombinaciju gena. Navedene tehnike su dobro poznate osobi iz struke.

Ispitivan je potencijalni inhibični učinak spojeva izvođenjem testova u tri prethodno opisana reakcijska stanja. Još je uvijek u dosegu izuma izvođenje samo jedne ili dvije od navedene tri reakcije, osobito kada se određuje enzimatski enzim/i na koje djeluje inhibitor.

Opći test inhibicije se temelji na usporedbi aktivnosti navedena tri enzima u različitim reakcijskim uvjetima. Navedeni opći test inhibicije se izvodi u 3 različita koraka, dalje opisanih kao test 1, test 2 i test 3. Prateći navedene korake, ako se inhibicija otkrije u reakcijskim uvjetima 1, ali ne i u reakcijskim uvjetima 2 i 3, djelovanje inhibitora je usmjereno na prvu enzimatsku aktivnost (tj. DHNA). Ako se inhibicija otkrije u reakcijskim uvjetima 2, ali ne i u 1 i 3, djelovanje inhibitora je usmjereno na drugu enzimatsku aktivnost (tj. HPPK). Ako samo treći test pokazuje inhibiciju sa potencijalnim inhibitorom, cilj je u tom slučaju treća aktivnost (DHPS).

Primjeri**Test 1:****Praćenje kombiniranih aktivnosti DHNA i HPPK i DHPS**

Opća reakcija je praćena putem otpuštanja anorganskog fosfata. Cijela reakcija ovisi o DHNA reakciji, a koja je ograničena temperaturom od 37°C.

Kinetike Foll aktivnosti su prikazane na Slici 2.

Tijekom navedenog testa (ili probira 1), cilj je specifično pronaći DHNA inhibitore (najsporija reakcija). Cjelokupni reakcijski medij i mogući inhibitor se koriste, a reakcija se izvodi uz održavanje temperature na 37°C tijekom 120 minuta.

U skladu s navedenim testom, 3 Foll aktivnosti (tj. DHNA, HPPK i DHPS), su izmjerene, dodatkom svih supstrata enzimatskih reakcija (7,8-dihidroneopterin, ATP-a i pABA) reakcijskom mediju koji sadrži Foll, pirofosfatazu i inhibitor.

Konačne koncentracije u reakcijskom mediju su navedene u tabeli 1.

Tabela 1

	Završna testu koncentracija u testu
Tris/HCl pufer 44 mM pH 8,2	40 mM
2-merkaptotanol 1M	10 mM
MgCl ₂ 0,5 M	25 mM
Pirofosfataza 25 kazeinu U/ml u 1 mg/ml	2.5 U/ml
ATP 10 mM	100 µM
p-aminobenzojeva kiselina 2 mM	75 µM
Fol 1; 50 µg/ml u kazeinu 1 mg /ml	5 µg/ml
DMSO 50% (+ /- Inhibitor)	5.00%
7,8-dihidro-D-neopterin 0.5 mM	50 µM

NB: završna koncentracija u kazeinu iznosi 0.2 mg/ml Reakcijski medij je: V_f=80 µl

Pripravljanje zaliha enzimskih otopina:

Foll otopina 10X:

Alikvot Foll na 9.6 mg/ml je razrijeđen prvo sa 200 µl/ml, te još jedanput sa 50 µl/ml, u Tris puferu koji sadrži kazein 1 mg/ml.

Otopine se moraju pripremiti svaki dan i pohraniti u ledenu otopinu. Otopina 10X anorganske pirofosfataze:

Iz komercijalnog pripravka anorganske pirofosfataze na 1000 U, otopina od 1000 U/ml je pripravljena u deioniziranoj vodi (milliQ). Alikvoti sadržaja 20 µl pri 1000 U/ml su pohranjeni na temperaturi od -80°C.

Jedan alikvot je razrijeđen na 25 U/ml u Tris puferu sadržaja 1 mg/ml kazeina. Alikvot ne smije biti pohranjen tijekom više od 10 sati (jednog dana).

Reakcijski medij predstavlja V_f=80 µl.

Bazen 1 sadrži : Tris pufer; 2-merkaptotanol, MgCl₂, ATP, p-aminobenzojeva kiselina i Fol 1, te pirofosfatazne enzime pripravljene kao što je prethodno opisano.

Reakcijski medij na 96 jažičnoj Mikroploči sadrži 64 µl sredstva iz bazena 1, zatim je inkubiran tijekom 60 minuta na 37°C uz tresenje. Navedeni korak je izveden kako bi Foll stajao u istim reakcijskim uvjetima kao i test 2 i test 3. Zatim je dodano u reakcijski medij 8 µl inhibitora u DMSO 50% i 8 µl 7,8-dihidro-D-neopterin 0.5 mM. Reakcijski medij je zatim inkubiran na 37°C tijekom 1 sata uz tresenje.

Reakcija zaustavljanja

Foll i pirofosfataza reakcije su zaustavljene zakiseljavanjem, u slučaju kada je dodan reagens 1 za detekciju anorganskog fosfata.

Prazna (ili negativna kontrola):

Reakcijski medij ne sadrži 7,8-dihidro-D-neopterin. Odgovara 0% aktivnosti kontrole.

5 **Pozitivna kontrola:**

Reakcijski medij ne sadrži inhibitor. Odgovara 100% aktivnosti.

«Lažno pozitivna» kontrola:

10 Navedena kontrola je izvršena kako bi se pratila inhibicija anorganske pirofosfataze ili kolorimetrijski kompleks. U navedenoj kontroli, 50 μ M 7,8-dihidroneopterin je zamijenjen sa 50 μ M anorganskog pirofosfata u reakcijskom mediju koji sadrži potencijalni inhibitor.

• Detekcija anorganskog fosfata (molibdat-Arsenitni postupak): $V_f=220$ μ l

Reagensi korišteni za detekciju anorganskog fosfata (molibdat-Arsenitni postupak) su slijedeći:

15

Reagens 1 se sastoji od:

- 6 volumena amonijeva heptamolibdata 0.5% u H_2SO_4 0.5 M
- 1 volumen askorbinske kiseline 10%
- 2 volumena SDS 10%

20

Reagens 2 se sastoji od:

- natrijeva citrata 2%
- natrijeva meta-arsenita 2%
- octene kiseline 2%

25

Svaka jažica sadrži 80 μ l reakcijskog medija. Volumen od 80 μ l reagensa 1 je dodan i smjesa je inkubirana na 37°C tijekom 5 minuta bez tresenja. Zatim je dodano 60 μ l reagensa 2 smjesi i inkubacija je nastavljena na 37°C tijekom 10 minuta bez tresenja. Absorbanca je očitana na 850 nm primjenom detektora mikroploče (Molekulski Uređaj SpectraMax Plus).

30

U pogledu rezultata prikazanih na Slici 3, ne postoji razlika u pogledu aktivnosti sa ili bez inhibitora 1, te na taj način nije otkrivena inhibicija na kombiniranim DHNA i HPPK i DHPS aktivnostima Fol1.

Nasuprot tome, rezultati testa 1 (stanje 1) izvedenog primjenom inhibitora 2, pokazuju da inhibitor 2, inhibira jednu ili više aktivnosti Fol1 (DHNA ili/i HPPK ili/i DHPS (cf. slika 6)).

35

Test 2:**Praćenje kombiniranih aktivnosti HPPK i DHPS**

40 U stvari, drugi test mjeri inhibiciju aktivnosti HPPK budući da je navedeni enzim ograničavajuća reakcija u pogledu kinetike između HPPK i DHPS. U takvim uvjetima, (isti supstrati i enzimi kao u uvjetima primjenjenim u testu 1, ATP izostavljen) produkt prve enzimatske reakcije (6-hidroksimetil-7,8-dihidropterin) je nakupljen u reakcijskom mediju tijekom određenog vremena. Završne koncentracije u reakcijskom mediju su identične onim korištenim u testu 1.

45 Reakcijski medij predstavlja $V_f=80$ μ l.

Bazen 2 sadrži: Tris pufer; 2-merkaptoetanol, $MgCl_2$, 7,8-dihidro-O-neopterin, p-aminobenzojevu kiselinu i 2 enzima Fol 1, Pirofosfatazu pripremljene kao što je prethodno opisano.

50 Na 96 jažičnu Mikroploču je nanoseno 64 μ l sadržaja iz bazena 2. Medij je inkubiran tijekom 60 minuta na 37°C uz tresenje. Tijekom opisanog koraka, 7,8-dihidro-D-neopterin je u cijelosti pretvoren u 6-hidroksimetil-7,8-dihidropterin. Zatim je dodano reakcijskoj smjesi u slijedu 8 μ l inhibitora u 50% DMSO i 8 μ l 1 mM ATP-a. Reakcija je izvedena na 37°C tijekom 1 sata uz tresenje.

55 Otpuštanje anorganskog fosfata je praćeno, a kontrole su sprovedene kao u testu 1.

Rezultati kinetike kombiniranih aktivnosti HPPK i DHPS su prikazani na Slici 4.

60 Jasno je iz navedenih podataka da je 50% inhibicije otkriveno pri kombinaciji aktivnosti HPPK i DHPS Fol1 kada je dodan inhibitor 1.

Nasuprot tome, inhibicija nije uočena pri kombiniranim aktivnostima HPPK i DHPS (stanje 2) kada je dodan inhibitor 2, pokazujući da navedeni inhibitor ne inhibira HPPK i/ili DHPS aktivnosti (vidi sliku 6).

Test 3:

Praćenja DHPS aktivnosti

Navedeni test mjeri inhibiciju aktivnosti DHPS, primjenom istih supstrata i enzima kao u testu 1, no bez pABA. Reakcijski medij je V_F –80 μ l.

Bazen 3 sadrži: Tris pufer; 3-merkaptotetanol, $MgCl_2$, 7,8-dihidro-D-neopterin, ATP, te 2 enzima Fol1, Pirofosfatazu pripremljenu kao što je prethodno opisano.

Na 96 jažičnu Mikroploču je nanoseno 64 μ l sadržaja iz bazena 3 i inkubacija je sprovedena na temperaturi od 37°C tijekom 60 minuta uz tresenje. Tijekom navedenog koraka, 1,8-dihidroneopterin je u potpunosti pretvoren u 6-hidroksimetil-7,8-dihidropterin pirofosfat. Volumen od 8 μ l inhibitora u 50% DMSO je dodan reakcijskoj smjesi, a potom je dodano 8 μ l 0.75 mM p-aminobenzojeve kiseline. Reakcijska smjesa je inkubirana na temperaturi od 37°C tijekom 1 sata uz tresenje.

Detekcija otpuštanja anorganskog fosfata i kontrole su izvedeni kao što je opisano u testu 1.

Rezultati kintike DHPS aktivnosti, sa ili bez inhibitora 1, su prikazani na Slici 5.

Podaci pokazuju da nije otkrivena inhibicija DHPS aktivnosti, te da inhibitor inhibira samo HPPK aktivnost. Uočeno je da HPPK inhibicija ne može biti zabilježena u testu 1 zato što u navedenim reakcijskim uvjetima, DHNA reakcija predstavlja ograničavajući korak.

Obzirom na inhibitor 2, podaci iz stanja 3 pokazuju da nije zabilježena inhibicija DHPS aktivnosti, te da inhibitor 2 inhibira specifično DHNA aktivnost (vidi sliku 6).

Reference

Baykov A. Anorganski pirofosfat. *Methods of enzymatic Analysis*. Treće izdanje, vol. VII: 558-566 (1989).

Calnes F.S.M., Thibert R.J. i Draisey T.F. Poboljšani enzimski fluorometrijski postupak za određivanje pirofosfata u plazmi i trombocitima: *Microchemical Journal*, 29, 168-181 (1984)

Cheung C.P. i Suhadolnik R.J. Analiza anorganskog pirofosfata pri pikomolskoj razini: *Analytical biochemistry*, 83, 61-63, (1977).

Johanson J.C., Shanoff M, Bass S.T., Boezi J.A. i Hansen F.G. Enzimatski postupak za određivanje anorganskog pirofosfata i njegova primjena kao testa za RNA polimerazu: *Anal. Biochem.* 26, 137-145 (1968).

Huovinen F, Sundstrom L, Swedberg G, Skold O, Rezistencija trimetoprima i sulfonamida. *Antimicrob Agents Chemother.* Feb; 39(2): 279-89 (1995).

Lopez, P.; Lacks, S.A.: Biofunkcionalni protein na putu sinteze folata Streptokoka pneumonije sa dihidroneopterin aldolazom i hidroksimetildihidropterin pirofosfokinaznim aktivnostima: *J. Bacteriol.*, 175; 2214-2220 (1993)

Sen-Gupta M, Guldener U, Beinhauer J, Fiedler T, Hegemann JH. Analiza slijeda 33 kb dugačke regije između ORC5 i SUH na lijevom kraku kromosoma XIV iz *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* Jul; 13(9): 849-60 (1997).

Slock J, Stahly DP, Han CY, Six EW, Crawford IP Vidljivi *Bacillus subtilis* folna kiselina biosintetski operon koji sadrži pab, amfibolični trpG gen, treći gen potreban za sintezu para-aminobenzojeve kiseline i dihidropteroat sintetaza gen. *J Bacteriol*; 172, 12, 7211-26 (1990).

Upson, R.H., Haugland, R.P., Malakzadeh, M.N.: Spektrofotometrijski postupak mjerenja enzimatske aktivnosti u reakciji koja dovodi do nakupljanja anorganskog pirofosfata. *Analytical Biochemistry*, 243, 1, 41-5 (1996).

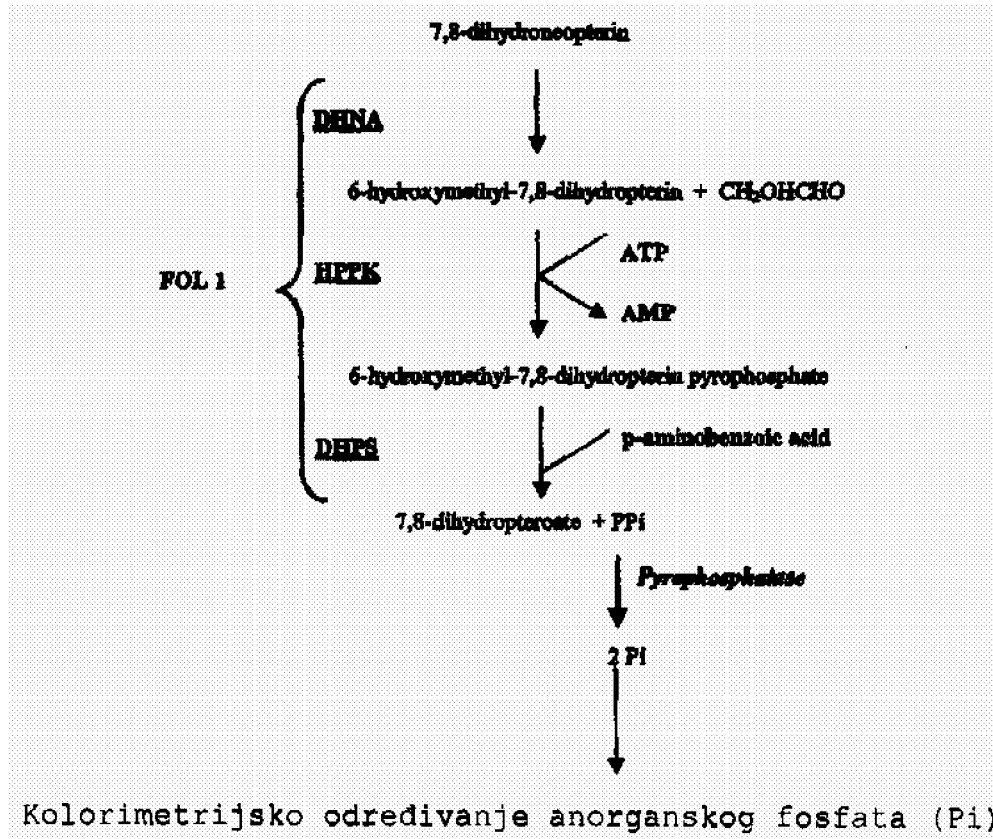
Volpe, F.; Ballantine, S.P.; Delves, C.J.: Dvije domene sličnosti sa amino kiselinskim slijedom su potrebne za funkciju dihidroneopterin aldolaze u multifunkcionalnom Fas proteinu sinteze folne kiseline *Pneumocystis carinii*; *Gene*, 160; 41-46 (1995).

PATENTNI ZAHTJEVI

1. Postupak određivanja inhibitorne aktivnosti spoja ispitivane na jednom od enzima puta sinteze folata, **naznačen time**, da obuhvaća slijedeće korake:
 - (i) inkubiranje navedenog spoja sa enzimskim pripravkom koji posjeduje najmanje jednu DHPS aktivnost,
 - (ii) detekciju otpuštanja fosfata.
2. Postupak u skladu sa zahtjevom 1, **naznačen time**, da je enzim koji se koristi vezan na pirofosfat, a korak (ii) je izveden na anorganskom fosfatu.
3. Postupak u skladu sa zahtjevom 1 ili 2, **naznačen time**, da enzimatski pripravak posjeduje DHPS aktivnost, ili DHPS i HPPK aktivnosti, ili DHPS i HPPK i DHNA aktivnosti.
4. Postupak u skladu s bilo kojim od zahtjeva 1 do 3, **naznačen time**, da enzimatski pripravak predstavlja Foll.
5. Postupak određivanja inhibitorne aktivnosti ispitivanog spoja na enzimima puta sinteze folata u skladu s bilo kojim od zahtjeva 1 do 4, **naznačenog time**, da navedeni enzim/i je/su kodiran/i sa SEQ ID N°1 ili njegovim homologom i njegovim funkcionalnim fragmentima kao i odgovarajućim kodiranim proteinom SEQ ID N°1 ili njegovim funkcionalnim polipeptidnim fragmentom.
6. Postupak određivanja inhibitorne aktivnosti ispitivanog spoja u skladu s bilo kojim od zahtjeva 1 do 5, **naznačenog time**, da korišteni enzimatski pripravak potječe iz gljiva, bakterija ili protozoa.
7. Postupak određivanja inhibitorne aktivnosti ispitivanog spoja u skladu s bilo kojim od zahtjeva 1 do 6, **naznačen time**, da obuhvaća inkubiranje ispitivanog spoja sa 1,8-dihidroneopterinom, ATP, pABA, Foll, pirofosfatazom i detekciju otpuštanja anorganskog fosfata.
8. Postupak određivanja inhibitorne aktivnosti ispitivanog spoja u skladu s bilo kojim od zahtjeva 1 do 7, **naznačen time**, da predstavlja mjerenje DHNA aktivnosti, a obuhvaća inkubaciju ispitivanog spoja sa 7,8-dihidroneopterinom, ATP, pABA, Foll, pirofosfatazom i detekciju otpuštanja anorganskog fosfata.
9. Postupak određivanja inhibitorne aktivnosti ispitivanog spoja u skladu s bilo kojim od zahtjeva 1 do 8, **naznačen time**, da je HPPK aktivnost izmjerena samo u jednom testu:
 - (i) dodatkom 7,8-dihidroneopterina, pABA, no uz izostavljanje ATP-a u reakcijskom mediju koji sadrži Foll, pirofosfat;
 - (ii) dodatkom navedenog ispitivanog spoja i ATP-a kada se nakuplja produkt DHNA reakcije, 6-hidroksimetil -7,8-dihidropterin, tijekom određenog vremenskog perioda;
 - (iii) praćenje otpuštanja anorganskog fosfata.
10. Postupak određivanja inhibitorne aktivnosti ispitivanog spoja u skladu s bilo kojim od zahtjeva 1 do 8, **naznačen time**, da je DHPS aktivnost izmjerena u jednom testu:
 - (i) dodatkom 7,8-dihidroneopterina, ATP-a, no uz izostavljanje pABA u reakcijskom mediju koji sadrži Foll, pirofosfat;
 - (ii) dodatkom navedenog ispitivanog spoja i pABA kada se nakuplja supstrat DHPS reakcije, 6-hidroksimetil -7,8-dihidropterin pirofosfat, tijekom određenog vremenskog perioda;
 - (iii) praćenje otpuštanja anorganskog fosfata.
11. Postupak određivanja inhibitorne aktivnosti ispitivanog spoja u skladu s bilo kojim od zahtjeva 1 do 10, **naznačen time**, da je DHPS supstrat sintetiziran *in vitro*.
12. Postupak određivanja inhibitorne aktivnosti ispitivanog spoja u skladu s bilo kojim od zahtjeva 1 do 11, **naznačen time**, da se navedeno otkrivanje fosfata izvodi kolorimetrijom.
13. Postupak određivanja inhibitorne aktivnosti ispitivanog spoja u skladu s bilo kojim od zahtjeva 1 do 11, **naznačen time**, da se navedeno otkrivanje fosfata izvodi fluorometrijom.
14. Postupak određivanja inhibitorne aktivnosti ispitivanog spoja u skladu s bilo kojim od zahtjeva 1 do 11, **naznačen time**, da se navedeno otkrivanje fosfata izvodi radioaktivnim putem.
15. Postupak probira spojeva sa potencijalnim inhibitornim djelovanjem na enzimatski pripravak, **naznačenih time**, da se primjenjuje postupak utvrđivanja u skladu s bilo kojim od zahtjeva 1 do 14.
16. Enzimatski test za in vitro testiranje spojeva na njihov inhibitorni učinak na enzimatski pripravak kao što je prikazano u bilo kojem od zahtjeva 1 do 15, **naznačen time**, da obuhvaća:
 - (i) supstrat 7,8-dihidroneopterin i
 - (ii) foll enzim i
 - (iii) enzim pirofosfatazu, te
 - (iv) pABA i ATP za istovremenu ili sekvencijsku primjenu.

SAŽETAK

Izum se odnosi na postupak određivanja inhibitorne aktivnosti ispitivanog spoja na najmanje jednu DHPS aktivnost folatnog puta sinteze, a koji je u vezi sa detekcijom otpuštanja stvorenog anorganskog fosfata. Enzimatski test u kojem se primjenjuje navedeni postupak određivanja enzimatskog pripravka, isto tako pripada dosegu izuma. Navedeni test je prikladan za probir velikog broja spojeva koji djeluju na putu sinteze folata.



POPIS SLIJEDOVA

POPIS SLIJEDOVA

<110> AVENTIS PHARMA S.A.

<120> METHOD FOR DETERMINING INHIBITION ACTIVITY OF A
COMPOUND ON ONE OF THE BRANCHES OF THE FOLATE SYNTHESIS
PATHWAY

<130> 18119KUU

<140>

<141>

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2364

<212> DNA

<213> Candida albicans

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (2364)

<220>

<221> gene

<222> (1) .. (2364)

<223> gene CanL256

<400> 1

atg ttg aaa aac gat acc ggt ttc act aaa gat att tct tgt acg gag	48
Met Leu Lys Asn Asp Thr Val Phe Thr Lys Asp Ile Ser Cys Thr Ala	
1 5 10 15	
ata act ggt aaa gat ggc tgg aat cgg ccc acc cca caa ccc atc aat	96
Ile Thr Gly Lys Asp Ala Trp Asn Arg Pro Thr Pro Gln Pro Ile Thr	
20 25 30	
ata tca tta tct ttc aat act gat ttc cat aag gca tgg gaa ttg gat	144
Ile Ser Leu Ser Phe Asn Thr Asp Phe His Lys Ala Ser Glu Leu Asp	
35 40 45	
aat ttg aaa tac tca att aat tat gct gtt att acc aga aat gta aat	192
Asn Leu Lys Tyr Ser Ile Asn Tyr Ala Val Ile Thr Arg Asn Val Thr	
50 55 60	
gaa ttt atg aaa tca aat gag cat tta aat ttc aag tca tta gga aat	240
Glu Phe Met Lys Ser Asn Glu His Leu Asn Phe Lys Ser Leu Gly Asn	
65 70 75 80	
att gct caa gaa att agt gat att gga tta gat caa tct aga ggt ggt	288
Ile Ala Gln Ala Ile Ser Asp Ile Gly Leu Asp Gln Ser Arg Gly Gly	
85 90 95	
gga tct att gtg gat gtc aag ata aaa agt ttg aaa tca gaa ata aga	336
Gly Ser Ile Val Asp Val Thr Ile Lys Ser Leu Lys Ser Glu Ile Arg	
100 105 110	

gct gaa agt gtc gaa tat aac att aat aga aac act ttg ggt cca ccc	384
Ala Glu Ser Val Glu Tyr Lys Ile Asn Arg Asn Thr Leu Gly Gln Pro	
115 120 125	
ggt cca tta gat att ttc cca gtt aat aca ttg aga tta ttg aag att	432
Val Pro Leu Asp Ile Phe Gln Val Asn Lys Leu Arg Leu Leu Thr Ile	
130 135 140	
att gga gtt ttc aca ttt gaa aga tta cca aca cca ata gtt gat gtt	480
Ile Gly Val Phe Thr Phe Glu Arg Leu Gln Lys Gln Ile Val Asp Val	
145 150 155 160	
gat ttg cca ttt aac att gaa oca aat tcc aat tta tat ttc cat cca	528
Asp Leu Gln Phe Lys Ile Glu Pro Asn Ser Asn Leu Tyr Phe His Gln	
165 170 175	
ata att gct gat att gtt tca tcc gtg gaa tca tct aat ttc aac oca	576
Ile Ile Ala Asp Ile Val Ser Tyr Val Glu Ser Ser Asn Phe Lys Thr	
180 185 190	
gta gaa gca ttg gtg tct aag att ggt cca ttg aca ttt cag aac tat	624
Val Glu Ala Leu Val Ser Lys Ile Gly Gln Leu Thr Phe Gln Lys Tyr	
195 200 205	
gac gga gta gct gaa gtt gtt gct act gtc act aac cag aat gca ttt	672
Asp Gly Val Ala Glu Val Val Ala Thr Val Thr Lys Pro Asn Ala Phe	
210 215 220	
agt cat gtt gaa ggt gtt gga gta tca tct acc atg gtc aac gac aat	720
Ser His Val Glu Gly Val Gly Val Ser Ser Thr Met Val Lys Asp Asn	
225 230 235 240	
ttc aac gat atg gaa cca gtt aac ttt gaa aac aca att gct cca act	768
Phe Lys Asp Met Glu Pro Val Lys Phe Glu Asn Thr Ile Ala Gln Thr	
245 250 255	
aat aga gca ttc aat tta oca gtt gaa aat gag aac act gag gat tat	816
Asn Arg Ala Phe Asn Leu Pro Val Glu Asn Glu Lys Thr Glu Asp Tyr	
260 265 270	
acc ggg tac cac aat gca ttt att acc ttt aac tcc aat act cca aat	864
Thr Gly Tyr His Thr Ala Phe Ile Ala Phe Gly Ser Asn Thr Gly Asn	
275 280 285	
caa gta gaa aat att acc aat tca tta gaa ttg ttg cca aac tat gga	912
Gln Val Glu Asn Ile Thr Asn Ser Phe Glu Leu Leu Gln Lys Tyr Gly	
290 295 300	
atc acc ata gaa gca act tca tca ttg tac att tct aac cca atg tat	960
Ile Thr Ile Glu Ala Thr Ser Ser Leu Tyr Ile Ser Lys Pro Met Tyr	
305 310 315 320	
tac ttg gat cca cca gat ttt ttc aat gga gta att aac gtg aat ttc	1008
Tyr Leu Asp Gln Pro Asp Phe Phe Asn Gly Val Ile Lys Val Asn Phe	
325 330 335	
caa aac att tca act ttc cag ttg ttg aac att cta aac gat att gaa	1056
Gln Asn Ile Ser Pro Phe Gln Leu Leu Lys Ile Leu Lys Asp Ile Glu	
340 345 350	

cat aac cat tta gaa agg aac aac gac ttt gat aat gag ccc aga tca Tyr Lys His Leu Glu Arg Lys Lys Asp Phe Asp Asn Gly Pro Arg Ser 355 360 365	1104
ata gat ttg gat att ata cta tat gac gat tta cca tta aat acc gag Ile Asp Leu Asp Ile Ile Leu Tyr Asp Asp Leu Gln Leu Asn Thr Glu 370 375 380	1132
aat cta att att cca cat aac tca atg tta gaa aga aca ttt gaa tta Asn Leu Ile Ile Pro His Lys Ser Met Leu Glu Arg Thr Phe Val Leu 385 390 395 400	1200
caa cca tta tgt gaa gta ttg ccc cct gat tat att cat ccc atc agt Gln Pro Leu Cys Glu Val Leu Pro Pro Asp Tyr Ile His Pro Ile Ser 405 410 415	1248
gca gaa agt ttg cat ago cat tta cca caa tta ata aat gat aac cct Ala Glu Ser Leu His Ser His Leu Gln Gln Leu Ile Asn Asp Lys Pro 420 425 430	1296
caa gag aac gta cca gaa tog tct gat tta tta cca ttt atc cca gtc Gln Glu Thr Val Gln Gln Ser Ser Asp Leu Leu Gln Phe Ile Pro Val 435 440 445	1344
tct aga ttg cct gtc aac gat aat att ttg aac ttt gat cca att aat Ser Arg Leu Pro Val Lys Asp Asn Ile Leu Lys Phe Asp Gln Ile Asn 450 455 460	1392
cat aac tct cct act ttg att atg ggt ata ttg aat atg act cct gat His Lys Ser Pro Thr Leu Ile Met Gly Ile Leu Asn Met Thr Pro Asp 465 470 475 480	1440
tca ttt agt gat ggt ggg aac cat ttt gga aac gaa cta gat aat act Ser Phe Ser Asp Gly Gly Lys His Phe Gly Lys Glu Leu Asp Asn Thr 485 490 495	1488
gtg aag cag gaa gag aac tta gtc act gag cgt gat aag att att gaa Val Lys Gln Ala Glu Lys Leu Val Ser Glu Gly Ala Thr Ile Ile Asp 500 505 510	1536
att gga gga gtt tcc aca cgc cca gga agt gtt gaa ccc act gag gaa Ile Gly Gly Val Ser Thr Arg Pro Gly Ser Val Glu Pro Thr Glu Glu 515 520 525	1584
gaa gaa ttg gaa cgt gtg att cca tta att aac gct att cgt cca tca Glu Glu Leu Glu Arg Val Ile Pro Leu Ile Lys Ala Ile Arg Gln Ser 530 535 540	1632
ctg aac cct gat tta ctg aag gtg ttg att tog gtt gat act tat cgt Leu Asn Pro Asp Leu Leu Lys Val Leu Ile Ser Val Asp Thr Tyr Arg 545 550 555 560	1680
agg aac gtt gct gaa cca agt tta ctt gtg ggt got gac ata atc aac Arg Asn Val Ala Gln Gln Ser Leu Leu Val Gly Ala Asp Ile Ile Asn 565 570 575	1728
gat atc tca atg ggc aac tat gat gaa aac ata ttt gat gtg gtt got Asp Ile Ser Met Gly Lys Tyr Asp Glu Lys Ile Phe Asp Val Val Ala 580 585 590	1776

```

aaa tac gga tgt cct tat atc atg aat cat aot oga gga tca cct aaa 1824
Lys Tyr Gly Cys Pro Tyr Ile Met Asn His Thr Arg Gly Ser Pro Lys
595 600 605

acc atg tot aaa ttg acc aat tat gaa tca aat aca aat gat gat att 1872
Thr Met Ser Lys Leu Thr Asn Tyr Glu Ser Asn Thr Asn Asp Asp Ile
610 615 620

atc gaa tat ata att gat cct aaa tta gga cat caa gaa ttg gat ttg 1920
Ile Glu Tyr Ile Ile Asp Pro Lys Leu Gly His Gln Glu Leu Asp Leu
625 630 635 640

tca cct gaa atc aag aat tta ctc aat gga atc agt cgt gaa ttg agt 1968
Ser Pro Glu Ile Lys Asn Leu Leu Asn Gly Ile Ser Arg Glu Leu Ser
645 650 655

tta caa atg ttt aaa gcc atg gct aaa gga gtg aaa aaa tgg caa att 2016
Leu Gln Met Phe Lys Ala Met Ala Lys Gly Val Lys Lys Trp Gln Ile
660 665 670

att ttg gat cct ggt att gga ttt gct aaa aat ttg aat caa aat tta 2064
Ile Leu Asp Pro Gly Ile Gly Phe Ala Lys Asn Leu Asn Gln Asn Leu
675 680 685

gaa gtt aat ogt aat gcc tog ttt ttt aaa aaa tat tct att caa att 2112
Ala Val Ile Arg Asn Ala Ser Phe Phe Lys Lys Tyr Ser Ile Gln Ile
690 695 700

aat gaa cgt gtt gat gat gtg aca atc aaa cat aaa tat tta agt ttt 2160
Asn Glu Arg Val Asp Asp Val Thr Ile Lys His Lys Tyr Leu Ser Phe
705 710 715 720

aat ggt gct tgt gtt ttg gtg ggg aca tca aga aag aag ttt ttg ggg 2208
Asn Gly Ala Cys Val Leu Val Gly Thr Ser Arg Lys Lys Phe Leu Gly
725 730 735

aca tta act ggt aat gaa gtg cct ctg gat oga gta ttt gga aot ggt 2256
Thr Leu Thr Gly Asn Glu Val Pro Leu Asp Arg Val Phe Gly Thr Gly
740 745 750

gaa aca gtg tct gcc tgt att gaa caa aac act gat att gta aga gtt 2304
Ala Thr Val Ser Ala Cys Ile Glu Gln Asn Thr Asp Ile Val Arg Val
755 760 765

cat gat gtt aaa gaa atg aaa gat gta gta tgt ata agt gat gca att 2352
His Asp Val Lys Glu Met Lys Asp Val Val Cys Ile Ser Asp Ala Ile
770 775 780

tat aaa aat gta
Tyr Lys Asn Val
785

```

<210> 2

<211> 788

<212> PRT

<213> *Candida albicans*

<400> 2

```

Met Leu Lys Asn Asp Thr Val Phe Thr Lys Asp Ile Ser Cys Thr Ala
 1           5           10           15

Ile Thr Gly Lys Asp Ala Trp Asn Arg Pro Thr Pro Gln Pro Ile Thr
          20           25           30

Ile Ser Leu Ser Phe Asn Thr Asp Phe His Lys Ala Ser Glu Leu Asp
 35           40           45

Asn Leu Lys Tyr Ser Ile Asn Tyr Ala Val Ile Thr Arg Asn Val Thr
 50           55           60

Glu Phe Met Lys Ser Asn Glu His Leu Asn Phe Lys Ser Leu Gly Asn
 65           70           75           80

Ile Ala Gln Ala Ile Ser Asp Ile Gly Leu Asp Gln Ser Arg Gly Gly
          85           90           95

Gly Ser Ile Val Asp Val Thr Ile Lys Ser Leu Lys Ser Glu Ile Arg
100           105           110

Ala Glu Ser Val Glu Tyr Lys Ile Asn Arg Asn Thr Leu Gly Gln Pro
115           120           125

Val Pro Leu Asp Ile Phe Gln Val Asn Lys Leu Arg Leu Leu Thr Ile
130           135           140

Ile Gly Val Phe Thr Phe Glu Arg Leu Gln Lys Gln Ile Val Asp Val
145           150           155           160

Asp Leu Gln Phe Lys Ile Glu Pro Asn Ser Asn Leu Tyr Phe His Gln
          165           170           175

Ile Ile Ala Asp Ile Val Ser Tyr Val Glu Ser Ser Asn Phe Lys Thr
180           185           190

Val Glu Ala Leu Val Ser Lys Ile Gly Gln Leu Thr Phe Gln Lys Tyr
195           200           205

Asp Gly Val Ala Glu Val Val Ala Thr Val Thr Lys Pro Asn Ala Phe
210           215           220

Ser His Val Glu Gly Val Gly Val Ser Ser Thr Met Val Lys Asp Asn
225           230           235           240

Phe Lys Asp Met Glu Pro Val Lys Phe Glu Asn Thr Ile Ala Gln Thr
          245           250           255

Asn Arg Ala Phe Asn Leu Pro Val Glu Asn Glu Lys Thr Glu Asp Tyr
260           265           270

Thr Gly Tyr His Thr Ala Phe Ile Ala Phe Gly Ser Asn Thr Gly Asn
275           280           285

Gln Val Glu Asn Ile Thr Asn Ser Phe Glu Leu Leu Gln Lys Tyr Gly
290           295           300

Ile Thr Ile Glu Ala Thr Ser Ser Leu Tyr Ile Ser Lys Pro Met Tyr
305           310           315           320

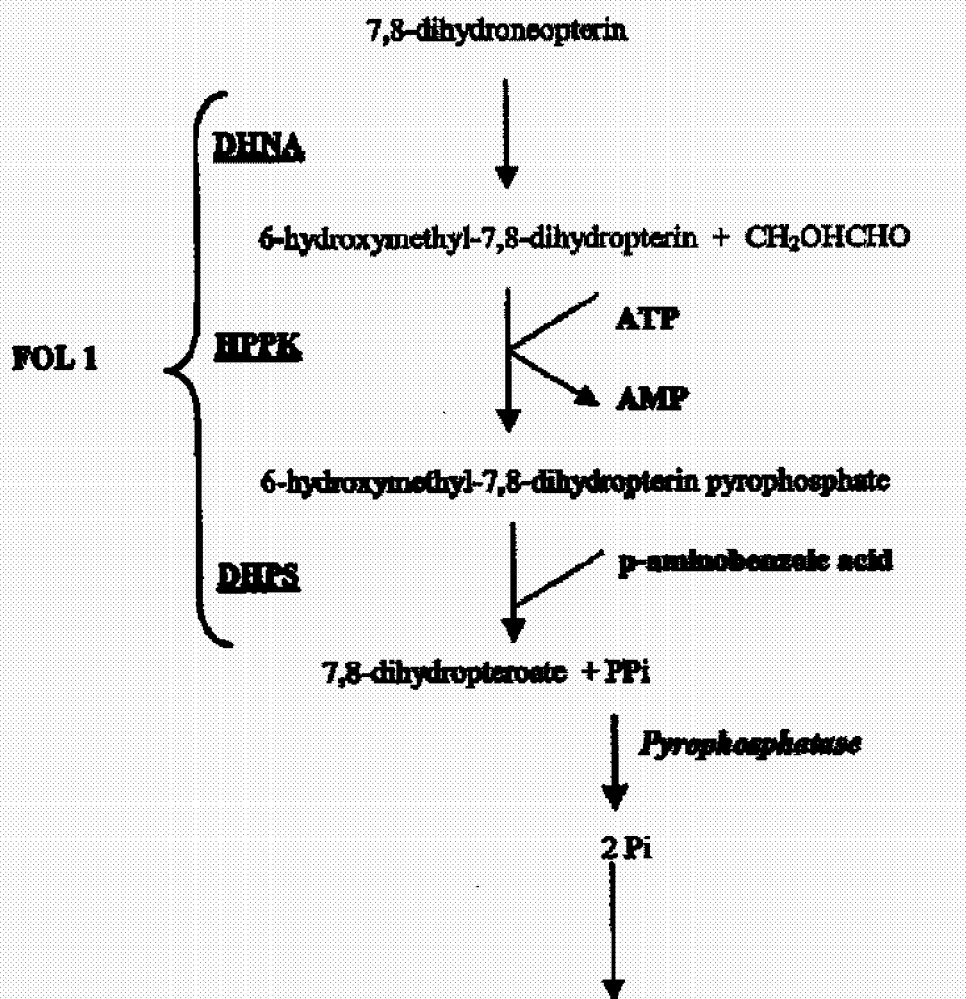
```

Tyr	Leu	Asp	Gln	Pro	Asp	Phe	Phe	Asp	Gly	Val	Ile	Lys	Val	Asn	Phe	
				335						330					335	
Gln	Asn	Ile	Ser	Pro	Phe	Gln	Leu	Leu	Lys	Ile	Leu	Lys	Asp	Ile	Glu	
			340					345					350			
Tyr	Lys	His	Leu	Gln	Arg	Lys	Lys	Asp	Phe	Asp	Asn	Gly	Pro	Arg	Ser	
	355					360						365				
Ile	Asp	Leu	Asp	Ile	Ile	Leu	Tyr	Asp	Asp	Leu	Gln	Leu	Asn	Thr	Glu	
	370					375					380					
Asn	Leu	Ile	Ile	Pro	His	Lys	Ser	Met	Leu	Glu	Arg	Thr	Phe	Val	Leu	
385					390					395					400	
Gln	Pro	Leu	Cys	Glu	Val	Leu	Pro	Pro	Asp	Tyr	Ile	His	Pro	Ile	Ser	
			405						410					415		
Ala	Glu	Ser	Leu	His	Ser	His	Leu	Gln	Gln	Leu	Ile	Asn	Asp	Lys	Pro	
			420					425					430			
Gln	Glu	Thr	Val	Gln	Glu	Ser	Ser	Asp	Leu	Leu	Gln	Phe	Ile	Pro	Val	
		435				440						445				
Ser	Arg	Leu	Pro	Val	Lys	Asp	Asn	Ile	Leu	Lys	Phe	Asp	Gln	Ile	Asn	
	450					455					460					
His	Lys	Ser	Pro	Thr	Leu	Ile	Met	Gly	Ile	Leu	Asn	Met	Thr	Pro	Asp	
465					470					475					480	
Ser	Phe	Ser	Asp	Gly	Gly	Lys	His	Phe	Gly	Lys	Glu	Leu	Asp	Asn	Thr	
				485					490					495		
Val	Lys	Gln	Ala	Glu	Lys	Leu	Val	Ser	Glu	Gly	Ala	Thr	Ile	Ile	Asp	
			500					505					510			
Ile	Gly	Gly	Val	Ser	Thr	Arg	Pro	Gly	Ser	Val	Glu	Pro	Thr	Glu	Glu	
		515					520					525				
Glu	Glu	Leu	Glu	Arg	Val	Ile	Pro	Met	Ile	Lys	Ala	Ile	Arg	Gln	Ser	
	530					535					540					
Leu	Asn	Pro	Asp	Leu	Leu	Lys	Val	Leu	Ile	Ser	Val	Asp	Thr	Tyr	Arg	
545					550					555					560	
Arg	Asn	Val	Ala	Glu	Gln	Ser	Leu	Leu	Val	Gly	Ala	Asp	Ile	Ile	Asn	
			565						570					575		
Asp	Ile	Ser	Met	Gly	Lys	Tyr	Asp	Glu	Lys	Ile	Phe	Asp	Val	Val	Ala	
			580					585					590			
Lys	Tyr	Gly	Cys	Pro	Tyr	Ile	Met	Asn	His	Thr	Arg	Gly	Ser	Pro	Lys	
	595					600						605				
Thr	Met	Ser	Lys	Leu	Thr	Asn	Tyr	Glu	Ser	Asn	Thr	Asn	Asp	Asp	Ile	
	610					615					620					
Ile	Glu	Tyr	Ile	Ile	Asp	Pro	Lys	Leu	Gly	His	Gln	Glu	Leu	Asp	Leu	
625					630					635					640	

Ser	Pro	Glu	Ile	Lys	Asn	Leu	Leu	Asn	Gly	Ile	Ser	Arg	Glu	Leu	Ser		
				645					650					655			
Leu	Gln	Met	Phe	Lys	Ala	Met	Ala	Lys	Gly	Val	Lys	Lys	Trp	Gln	Ile		
				660				665					670				
Ile	Leu	Asp	Pro	Gly	Ile	Gly	Phe	Ala	Lys	Asn	Leu	Asn	Gln	Asn	Leu		
		675					680					685					
Ala	Val	Ile	Arg	Asn	Ala	Ser	Phe	Phe	Lys	Lys	Tyr	Ser	Ile	Gln	Ile		
		690				695					700						
Asn	Glu	Arg	Val	Asp	Asp	Val	Thr	Ile	Lys	His	Lys	Tyr	Leu	Ser	Phe		
				710						715					720		
Asn	Gly	Ala	Cys	Val	Leu	Val	Gly	Thr	Ser	Arg	Lys	Lys	Phe	Leu	Gly		
				725					730					735			
Thr	Leu	Thr	Gly	Asn	Glu	Val	Pro	Leu	Asp	Arg	Val	Phe	Gly	Thr	Gly		
			740					745					750				
Ala	Thr	Val	Ser	Ala	Cys	Ile	Glu	Gln	Asn	Thr	Asp	Ile	Val	Arg	Val		
		755					760					765					
His	Asp	Val	Lys	Glu	Met	Lys	Asp	Val	Val	Cys	Ile	Ser	Asp	Ala	Ile		
		770				775					780						
Tyr	Lys	Asn	Val														
		785															

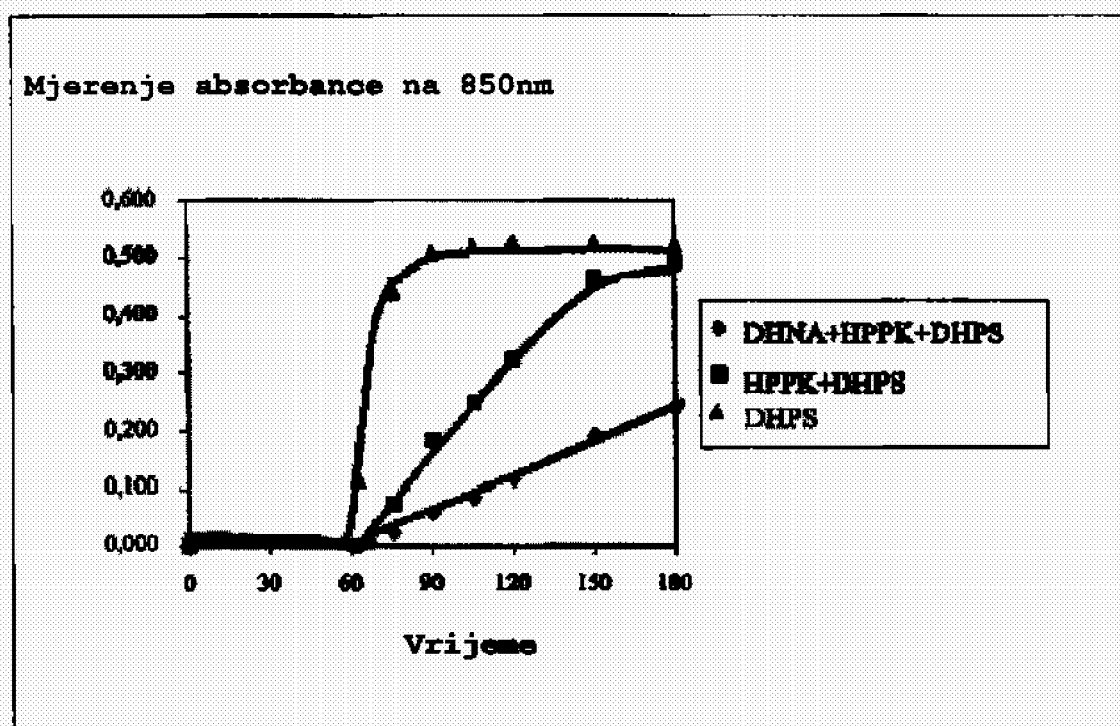
PLINKA 1

Slika 1



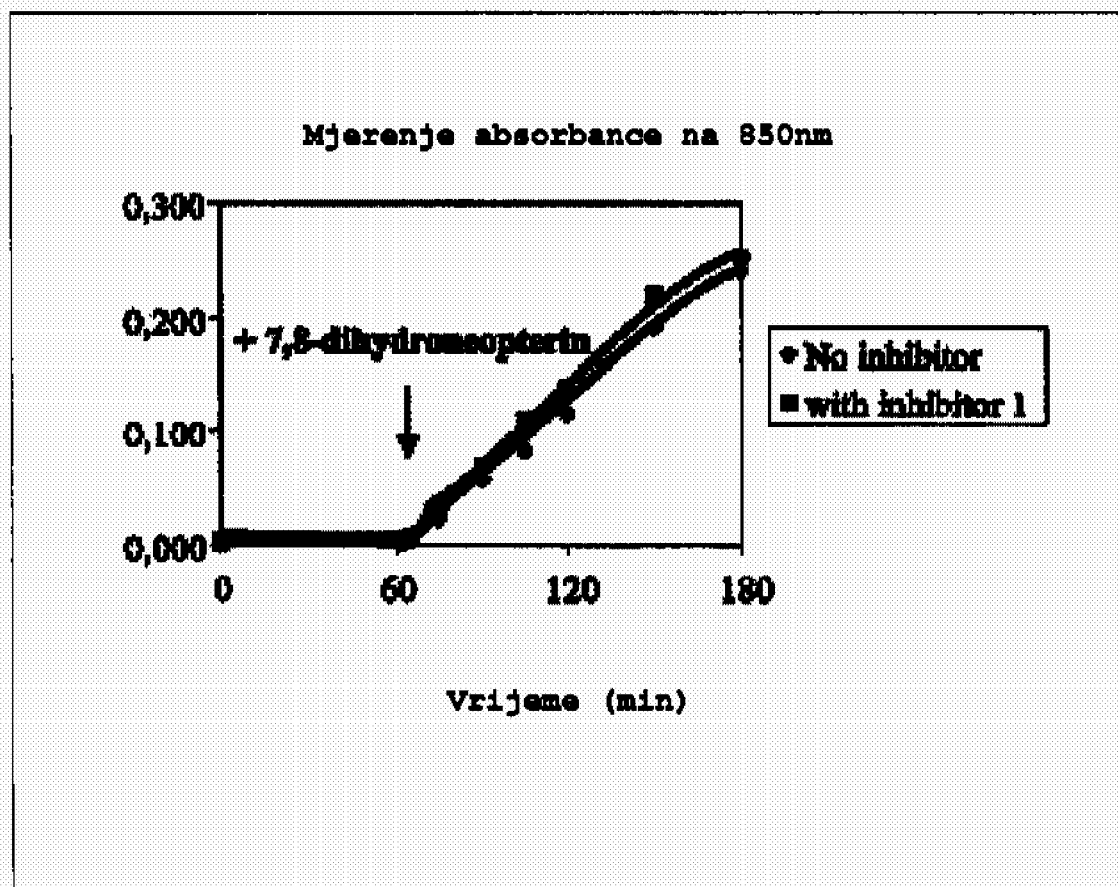
Kolorimetrijsko određivanje anorganskog fosfata (Pi)

Slika 2

Slika 2

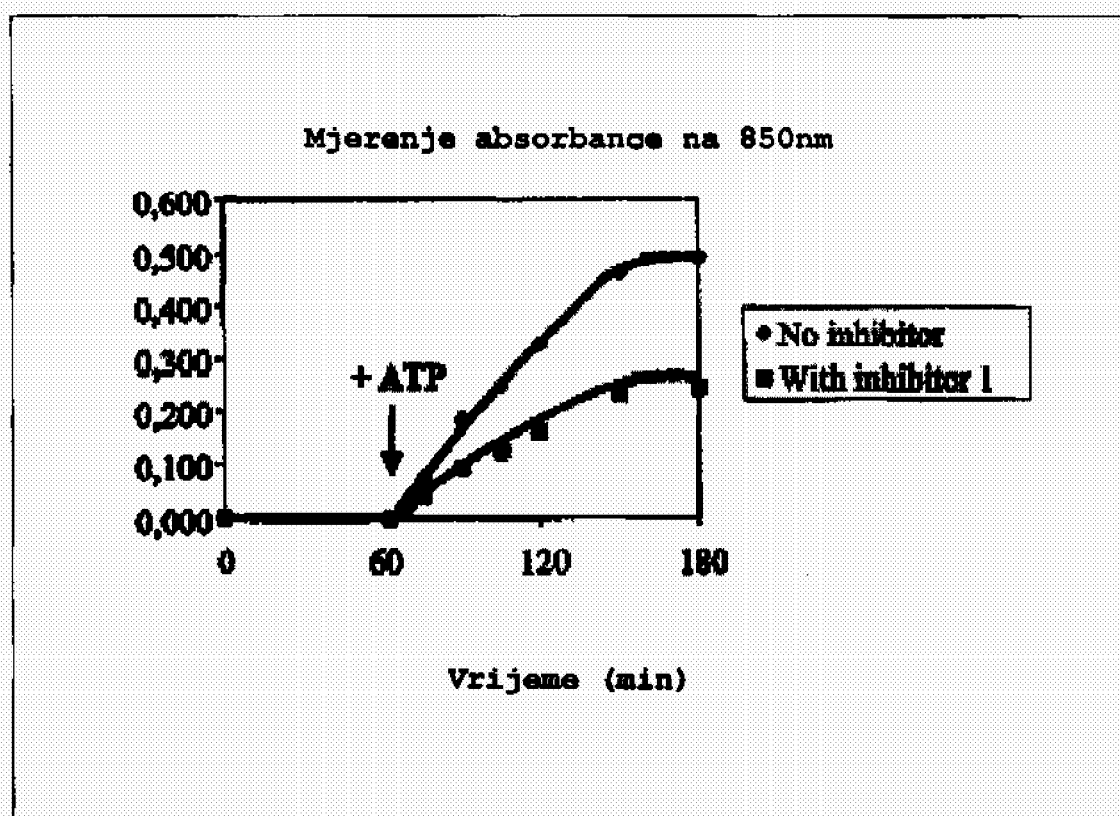
SLIKA 3

Slika 3



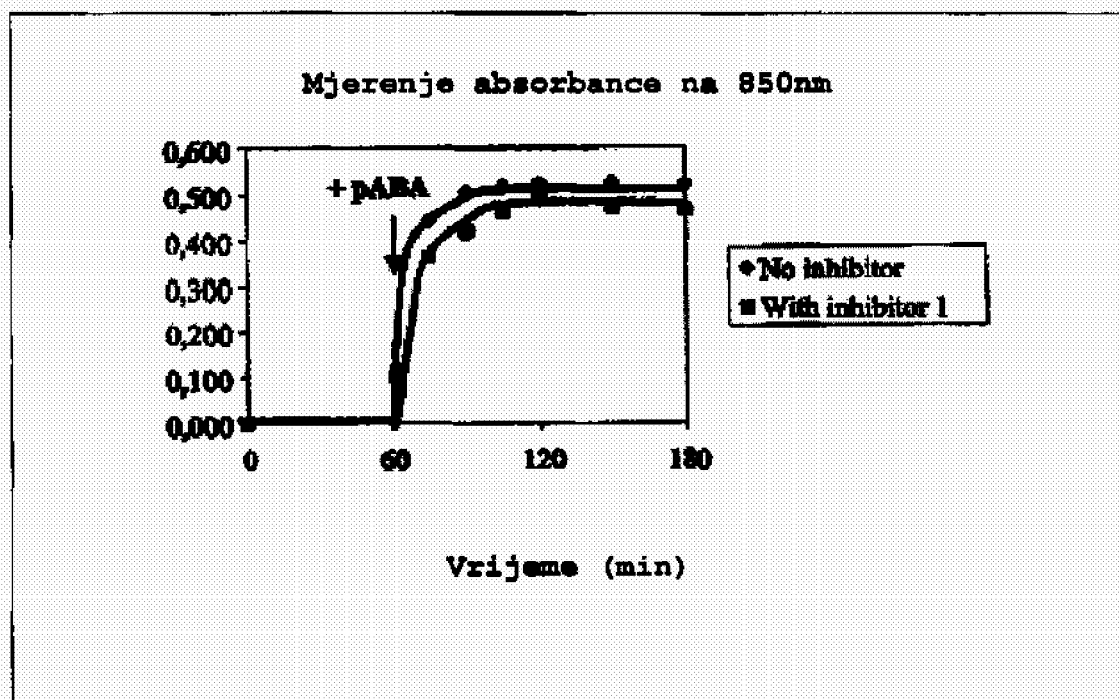
Slika 4

Slika 4



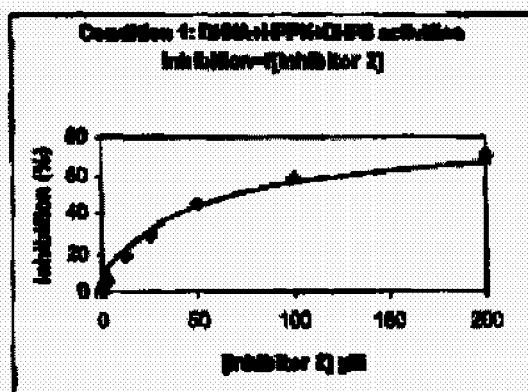
Slika 5

Slika 5

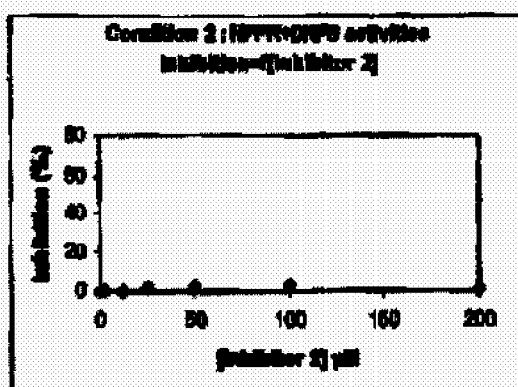


STIKVA A. A. 18361

Slika 6A



Slika 6B



Slika 6C

