

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

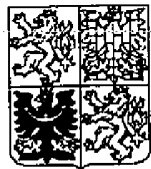
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2419-98

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **31. 07. 98**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **04.08.97**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **97/209133**

(33) Země priority: **JP**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **17. 02. 99**

(Věstník č. 2/99)

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

C 07 H 19/16
C 12 S 13/00

(71) Přihlášovatel:

YUKI GOSEI KOGYO CO., LTD. A
JAPANESE CORPORATION, Tokyo, JP;

(72) Původce:

Mikami Yoichi, Tokyo, JP;
Matsumoto Seichiro, Tokyo, JP;
Yoshinaka Shinjhi, Tokyo, JP;
Sunaga Yonosuke, Tokyo, JP;
Hasegawa Ayumi, Tokyo, JP;

(74) Zástupce:

Hořejš Milan Dr. Ing., Národní 32, Praha 1,
11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Způsob přípravy purinové nukleosidové
sloučeniny**

(57) Anotace:

Při přípravě purinové nukleosidové sloučeniny se pyrimidinová nukleosidová sloučenina a purinová báze podrobí výměnné reakci báze ve vodném roztoku obsahujícím fosforečnanové ionty v přítomnosti pyrimidinové nukleosidové fosforylasy a purinové nukleosidové fosforylasy. Pyrimidinová báze vytvořená výměnnou reakcí báze se převede mikroorganismem nebo tohoto mikroorganismu odvozeným enzymem uracilthymindehydrogenasou nebo dihydrouracildehydrogenasou na sloučeninu neschopnou působit jako substráty pyrimidinové nukleosidové fosforylasy a purinové nukleosidové fosforylasy a tak se získá požadovaná purinová nukleosidová sloučenina.

CZ 2419-98 A3

Způsob přípravy purinové nukleosidové sloučeniny

Oblast techniky

Předložený vynález se týká způsobu přípravy purinové nukleosidové sloučeniny s vysokým výtěžkem za použití výměnné reakce báze nukleové kyseliny, která se provádí v přítomnosti enzymu, a mikroorganismů produkujících enzymy, použitých pro přípravu purinové nukleosidové sloučeniny.

Dosavadní stav techniky

Je znám způsob přípravy nukleosidové sloučeniny za pomoci výměnné reakce báze nukleové kyseliny, prováděné v přítomnosti enzymu. Při této známé metodě se však uskutečňuje rovnováha mezi výchozími látkami a reakčními produkty, která vede k tomu, že se nedosáhne zvýšení výtěžku. Pro překonání této obtíže zveřejnění japonského patentu (Kokai) číslo 4-197193 uvádí výměnnou reakci báze mezi inosinem nebo 2'-deoxyinosinem (zde označovaným jako "deoxyinosin") a pyrimidinovou bází, která se provádí ve vodném roztoku fosfatu v přítomnosti purinové nukleosidové fosforylasy (EC2.4.2.1) a pyrimidinové nukleosidové fosforylasy (EC2.4.2.2) a pak se hypoxanthin vytvořený touto výměnnou reakcí převede na kyselinu močovou pomocí xanthinoxidasy tak, že se zvýší výtěžek reakce. Při tomto způsobu, protože kyselina močová nemůže působit jako substrát nukleosidové fosforylasy, reakce probíhá jednosměrně k vytvoření pyrimidinového nukleosidu.

Avšak JP 4-197193 zmíněný výše, který je usměrněn na způsob účinné přípravy pyrimidinového nukleosidu pomocí inosinu nebo deoxyinosinu a pyrimidinové báze jako výchozích látek, neuvádí způsob přípravy purinové nukleosidové slouče-

niny za použití pyrimidinové nukleosidové sloučeniny a purinové báze jako výchozích materiálů, které jsou snadno dostupné při nízkých nákladech. Tam, kde se použije pyrimidinová nukleosidová sloučenina jako výchozí látka, je nutné přidat enzym sloužící k rozkladu pyrimidinové báze, vytvoření výměnnou reakcí bází do reakčního systému, aby se vychýlila rovnováha a zvýšil reakční výtěžek.

Avšak příprava nebo izolace enzymu z přírodního produktu ve vysoce aktivním stavu nebyla dosud zmíněna. Jinými slovy způsob přípravy purinové nukleosidové sloučeniny za vysokého výtěžku při použití pyrimidinové nukleosidové sloučeniny jako výchozí látky dosud nebyl zjištěn. Přirozeně to má vysokou důležitost pro vývoj způsobu přípravy purinové nukleosidové sloučeniny, která je stabilní při vysokém výtěžku.

Podstata vynálezu

Za těchto okolností původci vynálezu provedli rozsáhlý výzkum mikroorganismů produkujících enzymy účinné pro přeměnu pyrimidinové báze získané při výměnné reakci mezi pyrimidinovou nukleosidovou sloučeninou a purinovou bází, na sloučeninu nezpůsobitou působit jako substrát pyrimidinové nukleosidové fosforylasy a purinové nukleosidové fosforylasy, a zjistili, že mikroorganismy náležející k druhům *Arthrobacter species*, *Bacillus species*, *Pseudomonas species* nebo *Rhodococcus species* jsou schopny produkce takových enzymů, které se objevují v tomto vynálezu.

Podle jednoho aspektu tohoto vynálezu je vytvořen způsob přípravy purinové nukleosidové sloučeniny s vysokým výtěžkem, který zahrnuje stupeň podrobení pyrimidinové nukleosidové sloučeniny a purinové báze výměnné reakci báze ve vod-

ném roztoku obsahujícím fosfatové ionty v přítomnosti purinové nukleosidové fosforylasy a pyrimidinové nukleosidové fosforylasy, přičemž pyrimidinová báze vytvořená reakcí se převede mikroorganizmem nebo enzymem odvozeným z tohoto mikroorganismu na sloučeninu nezpůsobilou působit jako substrát pyrimidinové nukleosidové fosforylasy a purinové nukleosidové fosforylasy.

Podle dalšího aspektu tohoto vynálezu je vytvořen mikroorganismus schopný produkce uracilthymindehydrogenasy a dihydrouracildehydrogenasy, přičemž tento mikroorganismus je vybrán ze skupiny zahrnující *Arthrobacter species*, YGK 222 (FERM BP-5907), *Bacillus megaterium* YGK 252 (FERM BP-5908) a *Pseudomonas species* YGK 443 (FERM BP-5909).

Způsob tohoto vynálezu pro přípravu purinové nukleosidové sloučeniny využitím výměnné reakce báze nukleové kyseliny umožňuje přípravu purinové nukleosidové sloučeniny s vysokým výtěžkem a s vysokou stabilitou za použití startovacích látek pyrimidinové nukleosidové sloučeniny a purinové báze, které jsou snadno dostupné při nízkých nákladech.

Další cíle a výhody tohoto vynálezu budou dále uvedeny v popisu, který následuje a zčásti budou zřejmé z tohoto popisu nebo mohou být zjištěny při provádění tohoto vynálezu. Tyto cíle a výhody tohoto vynálezu mohou být realizovány a získány pomocí prostředků a kombinací, na které je dále příslušně poukázáno.

Popis přiložených výkresů

Přiložené výkresy, které jsou začleněny a tvoří část tohoto popisu, zobrazují nyní výhodná provedení vynálezu a spolu s obecným popisem uvedeným výše a detailním popisem

výhodných provedení uvedeným dále, slouží k vysvětlení principů tohoto vynálezu.

Obr. 1 je graf ukazující časové změny v koncentraci každé ze složek reakčního systému v příkladu 1 obsahujícím roztok uracil-thyminového rozkladového enzymu, a

obr. 2 je graf ukazující časové změny v koncentraci každé ze složek reakčního systému v příkladu 1, který neobsahuje roztok uracil-thyminového rozkladového enzymu.

Detailní popis vynálezu

První aspekt tohoto vynálezu je směřován na způsob přípravy purinové nukleosidové sloučeniny zahrnující stupeň podrobení pyrimidinové nukleosidové sloučeniny a purinové báze výměnné reakci báze ve vodném roztoku obsahujícím fosfatové ionty v přítomnosti purinové nukleosidové fosforylasy a pyrimidinové nukleosidové fosforylasy, přičemž pyrimidinová báze vytvořená při reakci se převede pomocí mikroorganismu nebo enzymu odvozeného z tohoto mikroorganismu na sloučeninu neschopnou působit jako substráty pyrimidinové nukleosidové fosforylasy a purinové nukleosidové fosforylasy.

Startovací látky

Pyrimidinová nukleosidová sloučenina použitá jako startovací látka je buď přírodního typu nebo nepřírodního typu a není zvláště omezena, pokud tato sloučenina akceptuje působení pyrimidinové nukleosidové fosforylasy a vytvořená pyrimidinová báze akceptuje působení použitého rozkladového enzymu. Například pyrimidinová nukleosidová sloučenina zahrnuje uridin, deoxyuridin, 5-methyluridin a thymidin a také je možné použít nepřírodního typu pyrimidinového nukleosidu a nepřírodního deoxypyrimidinového nukleosidu.

Purinová báze použitá v tomto vynálezu není zvlášť omezena pokud tato báze akceptuje působení purinové nukleosidové fosforylasy a zahrnuje například přírodní purinové báze jako je adenin, guanin a hypoxanthin, a nepřírodní puriny zahrnující benzimidazol, aminované puriny jako je 2-aminopurin a 2,6-diaminopurin, halogenované puriny jako je 2-chlorpurin, 6-chlorpurin, 2,6-dichlorpurin a 2-amino-6-chlorpurin, a thiované puriny jako je 6-merkaptopurin a 6-methylthiopurin.

Mikroorganismy a enzymy

V principu purinová nukleosidová fosforylase a pyrimidinová nukleosidová fosforylase, které jsou použity v tomto vynálezu, mohou být jakéhokoli původu.

Enzymy odvozené z mikroorganismů, které jsou použity v tomto vynálezu pro rozklad pyrimidinové báze nejsou zvláště omezeny, pokud tyto enzymy umožňují konverzi pyrimidinové báze vytvořené výměnnou reakcí báze na sloučeninu neschopnou působit jako substráty pyrimidinové nukleosidové fosforylasy a purinové nukleosidové fosforylasy a zahrnují například uracilthymindehydrogenasu (EC1.2.99.1) a dihydrouracyl dehydrogenasu (EC1.3.1.1). Zvlášť je žádoucí použít enzymy vytvořené z mikroorganismů specifikovaných dále a z *Rhodococcus erythropolis* JCM 3132 nebo *Rhodococcus erythropolis* JCM 3191.

Jak je zde použito "pomocí mikroorganismů nebo enzymů odvozených z mikroorganismů" znamená provádění při rozkladové reakci pyrimidinové báze pomocí suspenze mikroorganismů (to je bakteriální suspenze), nebo enzymů produkovaných z mikroorganismů.

V souhlase s tím v tomto vynálezu mohou být použity suspenze obsahující mikroorganismy nebo enzymy produkované z těchto mikroorganismů pro rozkladovou reakci pyrimidinové báze.

Jinými slovy, bakteriální suspenze samotná obsahující mikroorganismy může být použita pro rozkladovou reakci pyrimidinové báze. Alternativně enzymy produkované ze suspendovaných mikroorganismů mohou být použity pro rozkladovou reakci pyrimidinové báze.

Stabilizátor ribosa-1-fosfatu

Při výměnné reakci báze tohoto vynálezu, která se provádí v přítomnosti pyrimidinové nukleosidové fosforylasy a purinové nukleosidové fosforylasy, cukerné deriváty ribosa-1-fosfatu nebo deoxyribosa-1-fosfatu se produkují jako meziprodukty. Tyto meziprodukty jsou nestabilní. Když se ponechají stát, tyto meziprodukty se rozloží během doby na cukr jako je ribosa nebo deoxyribosa a fosfatové ionty. Jestliže fosfataasa je přítomna v reakčním systému, hydrolýza meziproduktů se dále urychlí.

Mělo by být poznamenáno, že cukr jako je ribosa nebo deoxyribosa vytvořený rozkladem meziproduktů nepůsobí jako substrát nukleosidové fosforylasy, což vede ke snížené tvorbě purinového nukleosidu nebo deoxypurinového nukleosidu. Aby se zvýšila tvorba účinku těchto purinových nukleosidových sloučenin, původci vynálezu provedli rozsáhlý výzkum ve snaze najít látku účinnou pro stabilizaci cukerného derivátu jako je ribosa-1-fosfát nebo deoxyribosa-1-fosfát a také účinnou pro inhibici aktivity fosfatasy, přičemž našli kombinaci některých druhů komplexotvorných sloučenin, která je účinná pro stabilizaci cukerného derivátu a pro inhibici aktivity fosfatasy.

Konkrétně vynálezci zjistili, že je účinné použít alespoň jednu sloučeninu vybranou ze skupiny zahrnující glycin,

iminodioctovou kyselinu, nitriltrioctovou kyselinu, ethylen-diamintetraoctovou kyselinu (EDTA), ethylenglykol-(2-amino-ethylether)tetraoctovou kyselinu (EGTA) a jejich soli v kombinaci s kyselinou boritou nebo její soli. Zejména se prominentní účinek vytvoří kombinací kyseliny borité a ethylendiamino-tetraoctové kyseliny.

Reakční podmínky a izolační rafinace

Pokud jde o reakční podmínky, počáteční koncentrace pyrimidinové nukleosidové sloučeniny použité jako startovací látky v tomto vynálezu, by měla být 5 až 300 mM, výhodně 10 až 50 mM. Na druhé straně počáteční koncentrace purinové báze, která má obecně nízkou rozpustnost, by měla být 5 až 300 mM, výhodně 10 až 50 mM, přičemž se počítá, že všechna purinová báze, která je zpočátku přidána, bude rozpuštěna. Pro počáteční koncentraci fosfatových iontů dostačuje, aby byla 1 až 20 mM. Obecně nukleosid a purinová báze jsou uspořádány ve stejné počáteční koncentraci.

Také výtěžek produktové purinové nukleosidové sloučeniny se zvýší obecně se zvýšením poměru koncentrace nukleosidu k fosfatovým iontům.

Když se přichází ke komplexotvorným sloučeninám použitým jako stabilizátor, množství kyseliny borité nebo její soli by mělo být 5 až 200 mM, výhodně 50 až 100 mM. Na druhé straně množství protějšku kombinace, například EDTA nebo její soli, by mělo být 2 až 12 mM, výhodně 4 až 6 mM.

Hodnota pH reakčního systému by měla být 6,5 až 10,5, výhodně 7,0 až 8,0. Reakční teplota by měla být 35 až 60 °C, výhodně 35 až 45 °C.

Vytvořený produkt může být izolován z reakční směsi pomocí například krystalizace nebo chromatografie.

Princip a teorie tohoto vynálezu

1. V prvním stadiu tohoto vynálezu reakce mezi pyrimidinovou nukleosidovou sloučeninou a fosfatovým iontem se provádí v přítomnosti fosfatového iontu a pyrimidinové nukleosidové fosforylasy, čímž se vytvoří pyrimidinová báze a cukerný derivát, ve kterém se fosfatový iont váže k 1-poloze cukru, jako je ribosa-1-fosfat nebo 2-deoxyribosa-1-fosfat.

2. V druhém stadiu se substituční reakce provádí mezi cukerným derivátem vytvořeným v prvním stadiu a purinovou bází v přítomnosti purinové nukleosidové fosforylasy tak, že se vytvoří purinová nukleosidová sloučenina a fosfatový iont.

Při aranžování stadia 1 a 2 se výměnná reakce báze provádí mezi pyrimidinovým nukleosidem a purinovou bází v prvním a druhém stadiu v přítomnosti purinové nukleosidové fosforylasy a pyrimidinové nukleosidové fosforylasy, takže se vytvoří pyrimidinová fáze a purinová nukleosidová sloučenina.

3. V tomto vynálezu reakční systém obsahuje enzym sloužící ke konverzi pyrimidinové báze na sloučeninu neschopnou působit jako substráty pyrimidinové nukleosidové fosforylasy a purinové nukleosidové fosforylasy. Alternativně reakční systém obsahuje mikroorganismy produkující příslušný enzym. Je žádoucí použít v tomto vynálezu mikroorganismy produkující enzym jako je uracilthymindehydrogenasa nebo dihydrouracil-dehydrogenasa, i když mikroorganismy použité v tomto vynálezu nejsou zvlášť omezeny.

V předloženém vynálezu příslušný enzym nebo mikroorganizmy produkující enzym jsou přítomny v reakčním systému společně s akceptorem elektronu tak, že se převede pyrimidinová báze na sloučeninu neschopnou působit jako substrát pro pyrimidinovou nukleosidovou fosforylasu a purinovou nukleosidovou fosforylasu. V případě, kde se použije bakteriální suspenze při reakci, akceptor elektronu nemusí být přidán do reakčního systému, poněvadž akceptor elektronu je obsažen v bakteriích.

Mělo by být poznamenáno, že převedená pyrimidinová báze, která je neschopna působení jako substráty pro purinovou nukleosidovou fosforylasu a pyrimidinovou nukleosidovou fosforylasu, není zahrnuta ve výměnné reakci substrátu a tedy je vyloučena z reakčního systému. Následkem toho je rovnováha reakce posunuta směrem na stranu, na které se tvoří produkt purinová nukleosidová sloučenina, což umožňuje získat požadovaný produkt ve vysokém výtěžku.

4. Dále je možné pro reakční systém, aby obsahoval enzym sloužící dalšímu rozkladu převedené sloučeniny, když je to nutné, jak je to popsáno dále ve spojení s výhodným provedením.

Výhodné provedení

Při výhodném provedení tohoto vynálezu se uridin nebo 2'-deoxyuridin (zde označovaný jako "deoxyuridin") použije jako startovací látka pyrimidinové nukleosidové sloučeniny. Purinová báze se použije jako báze nukleové kyseliny. Dále purinová nukleosidová fosforylasa, pyrimidinová nukleosidová fosforylasa a uracilthymindehydrogenasa (EC 1.2.99.1), se použijí jako enzymy.

(1) V prvním stadiu se reakce mezi uridinem nebo deoxyuridinem a fosfatovými ionty provádí v přítomnosti fosfatových iontů a pyrimidinové nukleosidové fosforylasy tak, že se vytvoří uracil a ribosa-1-fosfat nebo 2-deoxyribosa-1-fosfat (dále zde označovaný jako "deoxyribosa-1-fosfat").

(2) V druhém stadiu se substituční reakce mezi vytvořeným ribosa-1-fosfatem nebo deoxyribosa-1-fosfatem a purinovou bází provádí v přítomnosti purinové nukleosidové fosforylasy. Purinový nukleosid a fosfatové ionty se vytvoří reakcí mezi ribosa-1-fosfatem a purinovou bází. Na druhé straně 2'-deoxypurinový nukleosid (zde dále označovaný jako "deoxypurinový nukleosid") a fosfatové ionty se vytvoří reakcí mezi deoxyribosou-1-fosfatem a purinovou bází.

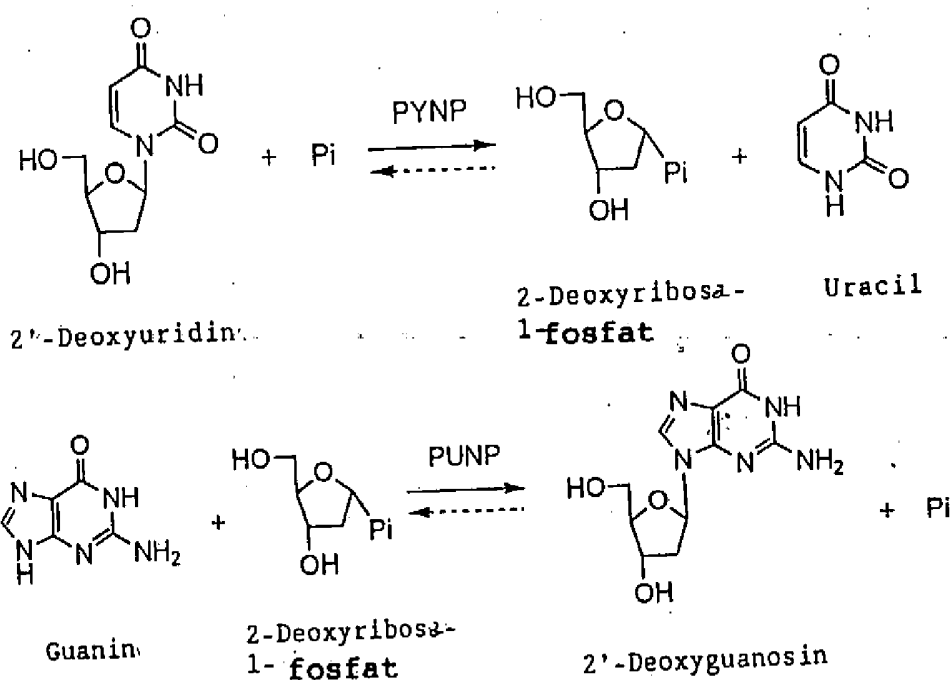
Jinými slovy v prvním a druhém stadiu, které jsou výše popsány, se výměnné reakce bází provádějí mezi uridinem nebo deoxyuridinem a purinovou bází v přítomnosti purinové nukleosidové fosforylasy a pyrimidinové nukleosidové fosforylasy tak, že se vytvoří uracil a purinový nukleosid nebo deoxypurinový nukleosid.

(3) Umožněním, aby uracilthymindehydrogenasa samotná nebo jak uracilthymindehydrogenasa a akceptor elektronů (oxidační typ) jako je NAD, byly přítomny v reakčním systému, uracil vytvořený rozkladem uridinu nebo deoxyuridinu se nevratně převede na kyselinu barbiturovou. Protože vytvořená kyselina barbiturová nemůže působit jako substráty purinové nukleosidové fosforylasy a pyrimidinové nukleosidové fosforylasy, není kyselina barbiturová zahrnuta ve výměnné reakci a je vyloučena z reakčního systému.

Následkem toho se rovnováha reakce posune směrem na stranu na které se tvoří požadovaný produkt purinové nukleosidové sloučeniny, což umožňuje získat požadovaný produkt ve vysokém výtěžku.

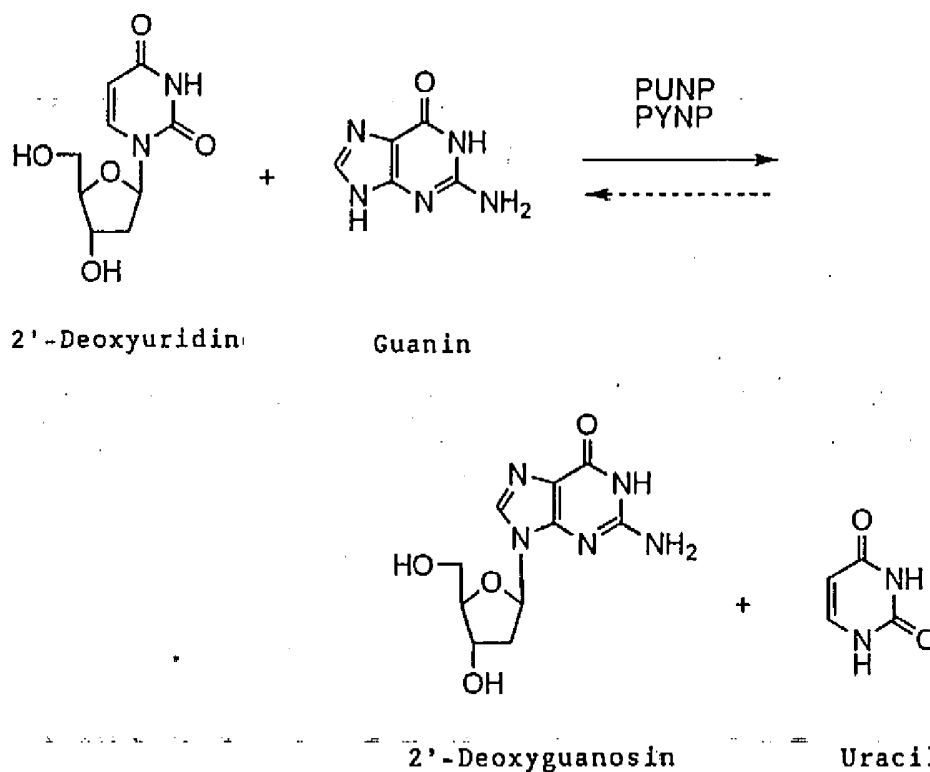
(4) Dále umožněním, aby barbiturasa (EC 3.5.2.1) byla přítomna v reakčním systému, kyselina barbiturová se rozloží na močovinu a malonovou kyselinu. Následkem toho se výměnná reakce podporuje v přítomnosti uracilthymindehydrogenasy.

Například kde se získá 2'-deoxyguanosin (zde dále označovaný jako "deoxyguanosin") jako produktová purinová nukleosidová sloučenina ze startovacích látek deoxyuridinu jako pyrimidinové nukleosidové sloučeniny a guaninu jako purinové báze, přičemž reakce se provádí následovně:

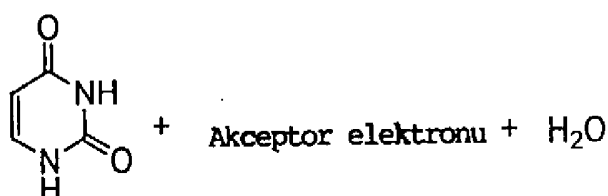


V reakčním schematu uvedeném výše¹ zkratky PYNP, PUNP a Pi představuje popořadě pyrimidinovou nukleosidovou fosforylasu¹, purinovou nukleosidovou fosforylasu a fosfatové ionty.

Z prvního a druhého stadia (1) a (2) popsaných dříve, se stanoví reakční schema uvedené dále:

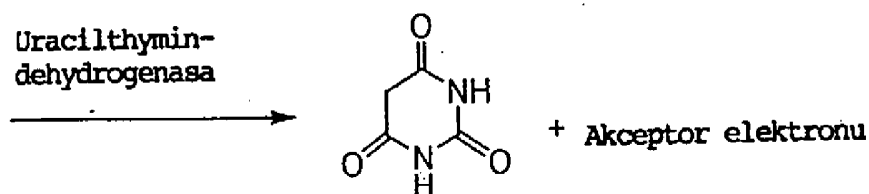


V tomto reakčním schematu uvedeném výše zkratky PYNP a PUNP představují popořadě pyrimidinovou nukleosidovou a purinovou nukleosidovou fosforylasu jako v dříve popsaném reakčním schematu.

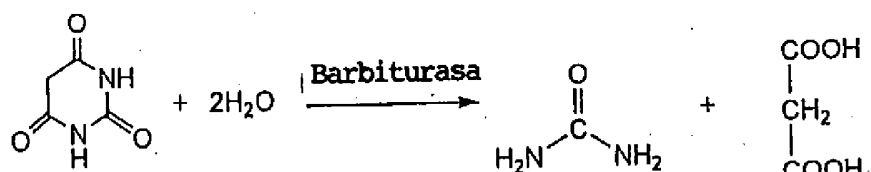


Uracil

Uracilthymin-
dehydrogenasa



Kyselina barbiturová



kyselina barbiturová

močovina

kyselina
malonová

Při výhodném provedení tohoto vynálezu se uridin nebo deoxyuridin použije jako pyrimidinová nukleosidová sloučenina. Také purinová báze se použije jako báze nukleové kyseliny.) Dále purinová nukleosidová fosforylase, pyrimidinová nukleosidová fosforylase a dihydrouracildehydrogenasa (EC 1.3.1.1) se použijí jako enzymy.

(1) Reakce mezi uridinem nebo deoxyuridinem a fosfatovými ionty se provádí v přítomnosti pyrimidinové nukleosidové fosforylasy, čímž se vytvoří uracil a ribosa-1-fosfat nebo deoxyribosa-1-fosfat.

(2) Pak ribosa-1-fosfat nebo deoxyribosa-1-fosfat takto vytvořené se podrobí substituční reakci s purinovou bází v přítomnosti purinové nukleosidové fosforylasy. V tomto případě purinové nukleosidové a fosfatové ionty se vytvoří reakcí mezi ribosa-1-fosfatem a purinovou bází. Podobně deoxypurinové nukleosidové a fosfatové ionty se vytvoří reakcí mezi deoxyribosa-1-fosfatem a purinovou bází.

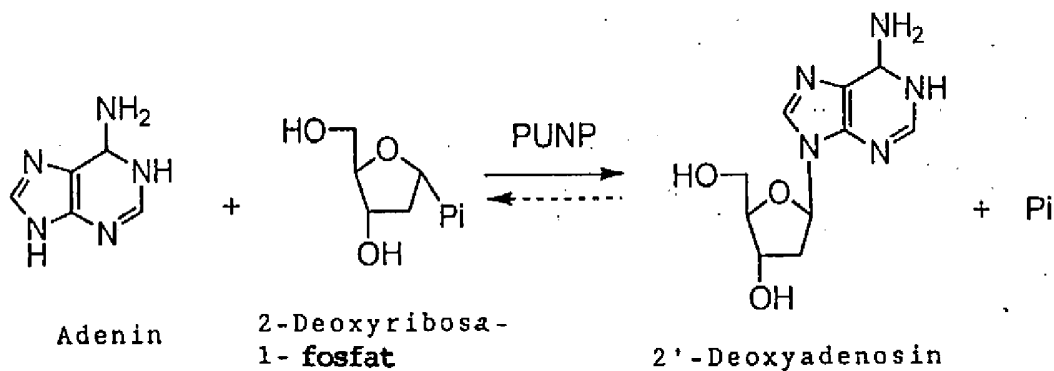
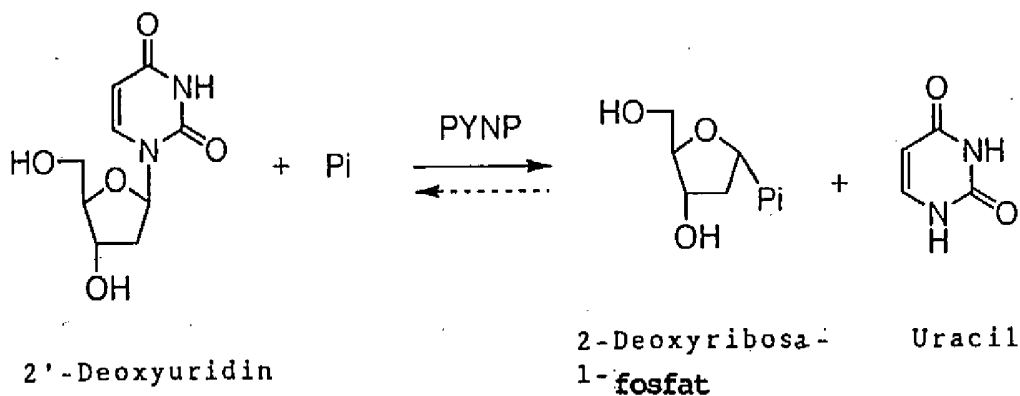
Tam, kde se reakce (1) a (2) uvedené výše uskutečňují společně, může být řečeno, že výměnné reakce bází se provádějí mezi uridinem nebo deoxyuridinem a purinovou bází v přítomnosti purinové nukleosidové fosforylasy a pyrimidinové nukleosidové fosforylasy, čímž se vytvoří purinový nukleosid nebo deoxypurinový nukleosid a uracil.

(3) Umožněním, aby dihydrouracyldehydrogenasa samotná nebo jak dihydrouracildehydrogenasa, tak akceptor elektronu (redukční typ) jako je NADH byly přítomny v reakčním systému, uracil vytvořený rozkladem uridinu nebo deoxyuridinu se nevratně převede na dihydrouracil. Takto vytvořený dihydrouracil, který nemůže působit jako substráty pro purinovou nukleosidovou fosforylasu a pyrimidinovou nukleosidovou fosforylasu, není zahrnut ve výměnné reakci substrátu a tak je vyloučen z reakčního systému. Následkem toho se rovnováha reakce posune na stranu, na které se tvoří požadovaný produkt purinové nukleosidové sloučeniny, což umožňuje získat požadovaný produkt kvantitativně.

(4) Dále se dihydrouracil rozkládá na N-karbamoyl-beta-alanin přítomností dihydropyrimidiny (EC 3.5.2.2). Jako následek se podpoří reakce dihydrouracildehydrogenasy.

Tam, kde se například získá 2'-deoxyadenosin (zde dále označovaný jako "deoxyadenosin") jako požadovaná purinová

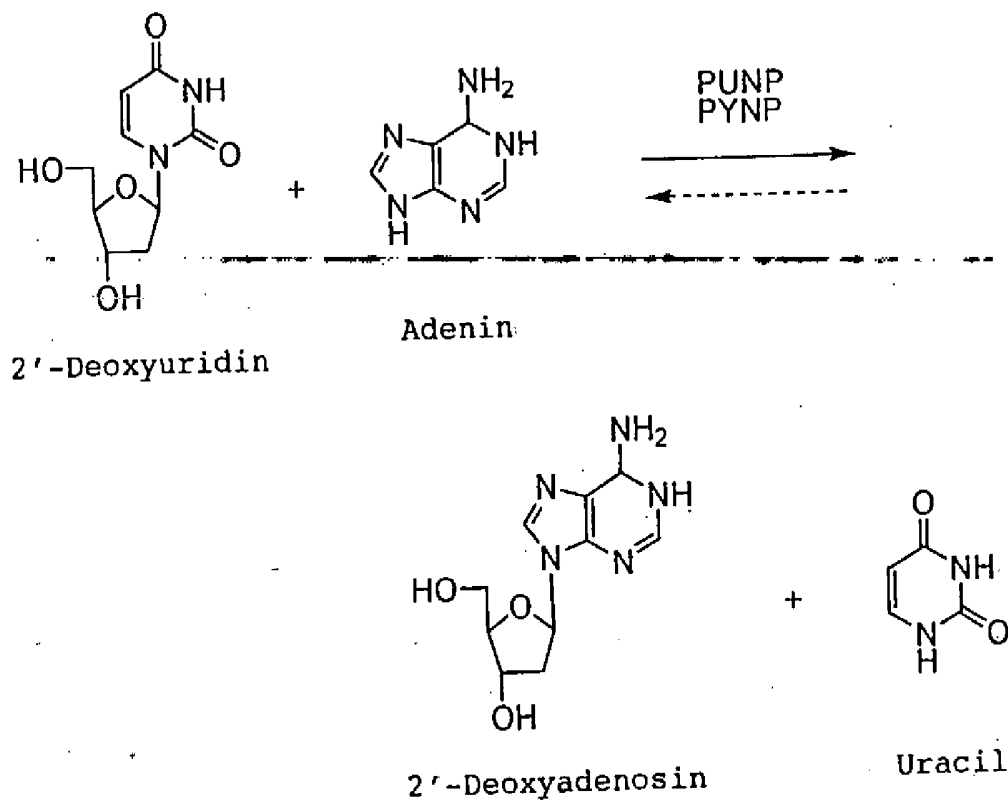
nukleosidová sloučenina z deoxyuridinu, který je pyrimidino-
vou nukleosidovou sloučeninou použitou jako jedna ze starto-
vacích látek a adeninu, který je použitou purinovou bází jako
druhý startovací materiál, reakce se provádí následovně:



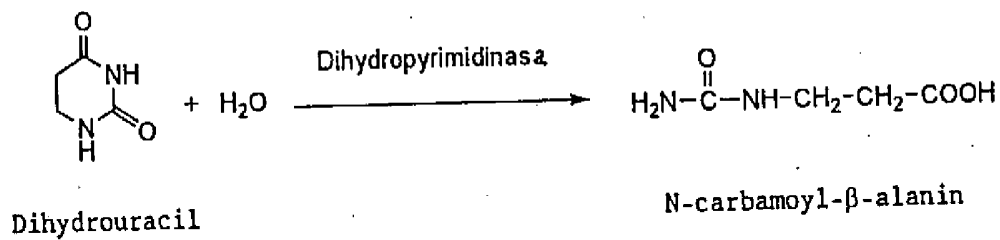
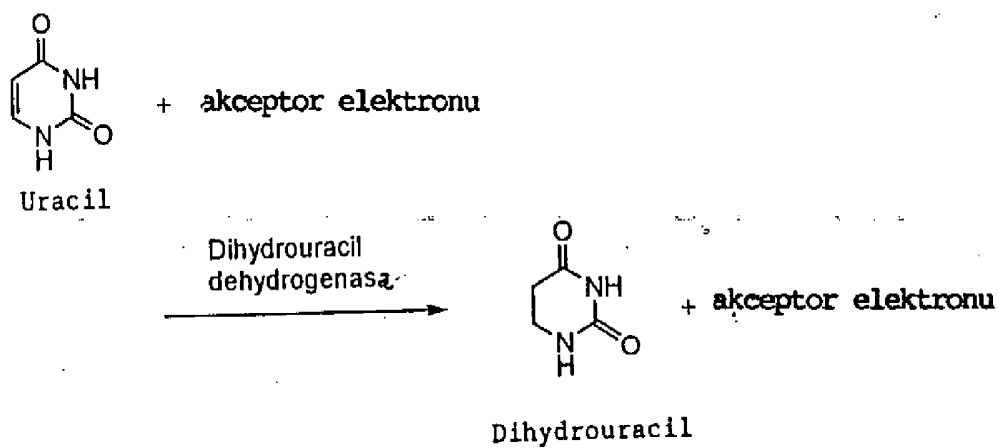
5

Zkratky PYNP, PUNP a Pi uvedené ve výše uvedeném reak-
čním schematu mají dříve definovaný význam.

Reakční schéma uvedené dále je stanoveno z odstavců (1)
a (2) uvedených výše:



Zkratky PYNP a PUNP uvedené v tomto reakčním schématu mají dříve uvedený význam.



Druhý aspekt tohoto vynálezu je směřován k mikroorganizmům produkujícím uracilthymindehydrogenasu nebo dihydrouracildehydrogenasu. Tyto mikroorganismy jsou vybrány ze skupiny zahrnující *Arthrobacter species* YGK 222 (FERM BP-5907), *Bacillus megaterium* YGK 252 (FERM BP-5908) a *Pseudomonas species* IKG 443 (FERM BP-5909).

Mikroorganismy produkující enzymy a jejich identifikace

Vynálezci zjistili, že alespoň jeden ze série enzymů sloužících k přeměně pyrimidinové báze na sloučeniny neschopné působit jako substráty pyrimidinové nukleosidové fosforylasy a purinové nukleosidové fosforylasy je produkován mikroorganismy. Konkrétně u těchto mikroorganismů bylo zjištěno, že produkují alespoň jeden enzym vybraný ze skupiny zahrnující (1) uracilthymindehydrogenasu, (2) dihydrouracildehydrogenasu, (3) uracilthymindehydrogenasu a barbiturasu (EC3.5.2.1) a (4) dihydrouracildehydrogenasu a dihydropyrimidinasu (EC3.5.2.2).

Kultivační podmínky a příprava enzymů

Tyto mikroorganismy dobře rostou v běžném kultivačním mediu bakterií a vytvářejí požadované enzymy. Pro zvýšení aktivity enzymů je účinné přidat pyrimidinovou bázi do kultivačního prostředí.

Kultivované kmeny mohou být použity jako takové jako surový enzym. Je také možné získat surový enzym běžnou metodou pro využití v tomto vynálezu.

Arthrobacter species YGK 222 (FERM BP-5907),

Bacillus megaterium YGK 252 (FERM BP-5908),

Pseudomonas species YGK 443 (FERM BP-5909),

Rhodococcus erythropolis JCM 3132,

Rhodococcus erythropolis JCM 3191.

Symbol "JCM" znamená, že kmeny jsou uloženy v Japonské sbírce mikroorganismů v Institutu fyzikálního a chemického výzkumu (Rikagatu Kenkyusho). Tyto kmeny jsou získatelné z Japonské sbírky mikroorganismů uvedené výše.

Ostatní kmeny to je YGK 222 (FERM BP-5907), YGK 252 (FERM BP-5908), YGK 443 (FERM BP-5909), jsou uloženy v Národním institutu biovědy a humánní technologie, Agentura průmyslové vědy a technologie. Tyto mikroorganismy YGK 222 (FERM BP-5907), YGK 252 (FERM BP-5908), YGK 443 (FERM BP-5909) byly uloženy 11. dubna 1997 podle Budapeštské smlouvy o mezinárodním uznávání uložení mikroorganismů pro účely patentového postupu. Tyto mikroorganismy jsou uloženy pod depozitními čísly uvedenými v závorkách.

Bakteriální vlastnosti těchto uložených kmenů byly studovány podle "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology č. 8 (1975)", "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology č. 1 (1984) a č. 2 (1986)", čímž se získaly výsledky uvedené níže. Experimenty byly prováděny způsobem popsáným v "Classification and Identification of Microorganisms" sestavené Takei Hasegavou, revidované vydání, publikované Gakkai Shuppan Center, 1985. Tyto údaje jsou zde začleněny formou odkazu.

Arthrobacter species YGK 222

1. Morfologické vlastnosti

- (1) Rozměr buňky: tyčinka o rozměru 0,5 až 0,7krát 1,0 až 5,0 mikrometru
- (2) Gramův kmen: pozitivní

- (3) Polymorfismus buňky: je rozpoznán nápadný polymorfismus koku až tyčinky doprovázející růstový cyklus
- (4) Pohyblivost: pohyblivost je rozpoznána při kultivaci po dobu 5 až 24 hodin v kapalném kultivačním mediu připraveném přidavkem bujónu do kvasinkového extraktu
- (5) Adherentní stav bičíku: 1 až 2stranný bičík
- (6) Spora: žádná
- (7) Odolnost vůči kyselinám: žádná

2. Kultivační vlastnosti

- (1) Kultivace na bujonové agarové plotně: kruhová vlnitá kolonie, která je mléčně bílá, průsvitná a má drsný povrch, se vytvoří při kultivaci při 30 °C po dobu 24 hodin
- (2) Bujonová agarová šikmá kultivace: bleděžluté a průsvitné mikroorganismy rostou dobře po celém kultivačním mediu
- (3) Bujonová kapalná kultivace: růstová rychlost je nízká. Dobrý růst byl zjištěn v třepané kultuře mající přidáný kvasinkový extrakt
- (4) Bujonová želatinová očkovaná kultura: povrchová oblast samotná je mírně ztekucená
- (5) Lakmusové mléko: žádná změna

3. Fyziologické vlastnosti

- (1) Redukce nitrátu: negativní
- (2) Denitrifikační reakce: negativní
- (3) MR test: negativní
- (4) VP test: negativní

(5) Tvorba indolu: negativní

(6) Tvorba hydrogensulfidu: negativní

(7) Využití kyseliny citronové:

Christensen agar: negativní

Koser medium: negativní

(8) Využití zdroje anorganického dusíku:

nitrat: pozitivní

amonná sůl: negativní

(9) Chromogenese: žádná

(10) Ureasa: negativní

(11) Oxidasa: negativní

(12) Katalasa: pozitivní

(13) Oblast růstu:

pH rozmezí: 5,5 až 9,5

teplotní rozmezí: 19 až 38 °C

(14) Vztah k volnému kyslíku: aerobní

(15) O-F test:

glukosa: žádná změna

sacharosa: žádná změna

(16) Využití různých zdrojů uhlíku

L-arabinosa +

D-xylosa +

D-glukosa +

D-mannosa +

D-fruktosa +

D-galaktosa +

maltosa +

sacharosa +

laktosa -

trehalosa +

D-sorbitol	+
D-mannitol	+
inositol	+
glycerin	-
škrob	-

4. GC obsah (HPLC metodou):

$$G + C \text{ (molární \%)} = 69,6$$

Mikroorganizmy byly vyčištěny, aby náležely k *Arthrobacter species* na základě bakteriologických vlastností uvedených výše.

Bacillus megaterium YGK 252

1. Morfologické vlastnosti

- (1) Rozměr buňky: tyčinky o rozměrech 1,6krát 4,0 až 9,9 mikrometrů
- (2) Gramův kmen: pozitivní
- (3) Polymorfismus buňky: žádný
- (4) Pohyblivost: rozpoznána
- (5) Adherentní stav bičíku: rozpoznán, peritrichální bičík
- (6) Spora: sporangia nejsou zduřená, spora je elipsoidální
- (7) Odolnost vůči kyselině: žádná

2. Kultivační vlastnosti

- (1) Bujonová agarová plotnová kultivace: kruhová vlnitá kolonie, která je mléčně bílá a opakní a má drsný povrch, je vytvořena při kultivaci při 30 °C po dobu 24 hodin
- (2) Bujonová agarová šikmá kultivace: bleděžluté a opakní mikroorganizmy, mající mírně suchý povrch a drsný okraj, rostou dobře podél rýhy

- (3) Bujonová kapalná kultivace: růstová rychlost je nízká.
Dobrý růst je zjištěn, když se přidá kvasinkový extrakt.
- (4) Bujonová želatinová, očkovaná kultura: povrchová oblast samotná je mírně ztekucená
- (5) Lakmusové mléko: mírná kyselost a koagulace je zjištěna

3. Fyziologické vlastnosti

- (1) Redukce nitrátu: pozitivní
- (2) Denitrifikační reakce: pozitivní
- (3) MR test: pozitivní
- (4) VP test: negativní
- (5) Tvorba indolu: negativní
- (6) Tvorba hydrogensulfidu: negativní
- (7) Využití kyseliny citronové:
Christensen agar: pozitivní
Koser medium: pozitivní
- (8) Využití zdroje anorganického dusíku
nitrát: pozitivní
amonná sůl: pozitivní
- (9) Chromogeneze: žádná
- (10) Ureasa: pozitivní
- (11) Oxidasa: pozitivní
- (12) Katalasa: pozitivní
- (13) Oblast růstu
pH oblast: 5,5 až 10,5
oblast teplot: 10 až 43 °C
- (14) Vztah k volnému kyslíku: aerobní
- (15) O-F test
glukosa: žádná změna
sacharosa: žádná změna

(16) Využití různých zdrojů uhlíku

L-arabinosa	-
D-xylosa	-
D-glukosa	-
D-mannosa	-
D-fruktosa	-
D-galaktosa	-
maltosa	-
sacharosa	-
laktosa	-
trehalosa	-
D-sorbitol	-
D-mannitol	-
inositol	-
glycerin	-
škrob	+

4. GC obsah (HPLC metodou):

$$G + C \text{ (molární \%)} = 34,7$$

Mikroorganismus byl vyčištěn, aby náležel k *Bacillus megaterium* na základě bakteriologických vlastností uvedených výše.

Pseudomonas species YGK 443

1. Morfologické vlastnosti

- (1) Rozměr buňky: tyčinky o rozměrech 0,4 až 0,6krát 0,6 až 2,4 mikrometru
- (2) Gramův kmen: negativní
- (3) Polymorfismus buňky: žádný
- (4) Pohyblivost: rozpoznána
- (5) Adherentní stav bičíku: 4 až 5 polárních bičíků bylo zjištěno

(6) Spora: žádná

(7) Odolnost vůči kyselině: negativní

2. Kultivační vlastnosti

- (1) Bujonová agarová plotnová kultivace: kruhová vlnitá kolonie, která je mléčně bílá a má hladký povrch se vytvoří při kultivaci při 30 °C po dobu 24 hodin
- (2) Bujonová agarová šikmá kultivace: bleděžluté průsvitné a lesklé mikroorganismy rostou dobře podél rýhy
- (3) Bujonová kapalná kultivace: dobrý růst je zjištěn při třepání kultury
- (4) Bujonová želatinová očkovaná kultura: žádná změna
- (5) Lakmusové mléko: alkalické a nepeptonizované

3. Fyziologické vlastnosti

- (1) Redukce nitrátu: pozitivní
- (2) Denitrifikační reakce: negativní
- (3) MR test: negativní
- (4) VP test: negativní
- (5) Tvorba indolu: negativní
- (6) Tvorba hydrogensulfidu: negativní
- (7) Využití kyseliny citronové
Christensen agar: pozitivní
Koser medium: pozitivní
- (8) Využití zdroje anorganického dusíku
nitrát: pozitivní
amonná sůl: pozitivní
- (9) Fluorescentní chromogeneze: žádná



J. j. 140892

(10) Ureasa: pozitivní

(11) Oxidasa: pozitivní

(12) Katalasa: pozitivní

(13) Oblast růstu

pH oblast: 4,2 až 10,5

teplotní oblast: 17 až 43 °C

(14) Vztah k volnému kyslíku: aerobní

(15) O-F test

glukosa: 0 (oxidační)

sacharosa: žádná změna

(16) Rozklad argininu: negativní

(17) Využití různých zdrojů uhlíku

L-arabinosa	+
D-xylosa	+
D-glukosa	+
D-mannosa	+
D-fruktosa	+
D-galaktosa	+
maltosa	+
sacharosa	+
laktosa	-
trehalosa	+
D-sorbitol	-
D-mannitol	+
inositol	+
glycerin	+
škrob	-

4. GC obsah (HPLC metodou):

G + C (molární %) = 62,3

Mikroorganismus byl vyčištěn, aby náležel k *Pseudomonas* species na základě bakteriologických vlastností uvedených výše.

Příklady provedení vynálezu

Předložený vynález je popsán detailněji s odkazem na přípravné příklady, experimenty a příklady, které následují.

Přípravný příklad 1

Příprava bakteriální suspenze obsahující purinovou nukleosidovou fosforylasu a pyrimidinovou nukleosidovou fosforylasu

Bacillus stearothermophilus JTS 859 (FERM P-9666), který je bakterií produkující purinovou nukleosidovou fosforylasu (PUNP) a pyrimidinovou nukleosidovou fosforylasu (PYNP) byl kultivován následovně.

Pro kultivaci bakterií bylo použito kultivační medium o pH hodnotě 6,2 a obsahující 10 g baktotriptonu, 5 g kvasnicového extraktu, 3 g glukosy, 3 g stolní soli, 1 g inosinu a 1 l vody. Do 1,5 l kultivačního media bylo přidáno 3×10^7 spor *Bacillus stearothermophilus* JTS 859 (FERM P-9666) pro kultivaci při cirkulaci vzduchu vvm a kultivační teplotě 65 °C a pH hodnotě 6,0 až 6,4 za použití 3 litrové fermentační nádoby vybavené horními a spodními míchacími lopatkami, z nichž každá má průměr 70 mm. Během kultivace se míchací lopatky otáčely rychlostí 500 otáček/min. Po skončení kultivace byly bakterie centrifugálně sdruženy (10 000 G), 4 °C, 15 minut).

20 g vlhkých bakterií takto získaných bylo suspendováno ve 30 ml 10mM roztoku fosforečnanu draselného (pH 7), takže se připraví bakteriální suspenze obsahující purinovou nukleosidovou fosforylasu a pyrimidinovou nukleosidovou fosforylasu (zde dále označovanou jako "PUNP·PYNP enzymový roztok").

Přípravný příklad 2

Příprava bakteriální suspenze mající rozkladovou aktivitu pro uracil a thymin.

Bakteriální suspenze *Arthrobacter species* YGK 222 (FERM BP-5907), *Bacillus megaterium* YGK 252 (FERM BP-5908), *Pseudomonas species* YGK 443 (FERM BP-5909), *Rhodococcus erythropolis* JCM 3132 nebo *Rhodococcus erythropolis* JCM 3191, přičemž každý má rozkladovou aktivitu pro uracil a thymin, byla připravena následovně.

Pro kultivaci bakterií bylo použito kultivační medium mající hodnotu pH 7,0 a sestávající ze 2 g uracilu, 1 g dihydrogenfosforečnanu draselného, 3 g hydrogenfosforečnanu dvojdraselného, 6 g kvasnicového extraktu a 1 l vody. Kultivační medium bylo dáno do 2litrové Erlenmeyerovy baňky a inokulováno $3 \cdot 10^7$ bakterií nebo spor výše zmíněných mikroorganismů. Za těchto podmínek byla kultivace prováděna po dobu 15 hodin při 35 °C, přičemž se Erlenmeyerova baňka otáčela rychlostí 200 otáček za minutu.

Po skončení kultivace byly bakterie centrifugálně sdruženy (10 000 G, 4 °C, 15 minut), a vlhké bakterie takto získané byly suspendovány v 6 ml pufového roztoku (pH 7) obsahujícího 10 mM fosforečnanu draselného tak, aby se připravila bakteriální suspenze (zde dále označovaná jako "roztok enzymu rozkládající uracil·thymin").

Experiment 1

Produkce enzymu z mikroorganismů rozkládajícího uracil a thymin

1 ml reakčního roztoku obsahujícího buď 50 mM uracilu nebo 50 mM thyminu, 100 mM fosforečnanového pufrového roztoku (pH 7), a 0,05 ml některého enzymového roztoku rozkládajícího uracil-thymin odvozeného od kmenů připravených v přípravném příkladu 2 bylo ponecháno reagovat při 35 °C po dobu 15 minut a rozkladová aktivita pro thymin a uracil v reakčním roztoku byla měřena vysokovýkonnou kapalinovou chromatografií.

Tabulka 1 ukazuje výsledky. Rozkladová aktivita U uvedená v tabulce 1 značí množství enzymové aktivity vyžadované pro rozklad 1 mikromolu substrátu (uracilu nebo thyminu) za minutu při 35 °C.

Tabulka 1

Kmen	Rozkladová aktivita (U/vlhké bakterie g)	
	uracil	thymin
Arthrobactor species YGK 222	36,4	14,5
Bacillus megaterium YGK 252	5,8	2,1
Pseudomonas species YGK 443	2,2	1,4
Rhodococcus erythropolis JCM 3132	10,6	4,2
Rhodococcus erythropolis JCM 3191	7,8	3,2

Experiment 2

Produkce enzymu bakterie produkující enzym rozkládající
uracil·thymín

1 ml reakčního roztoku obsahujícího 50 mM uracilu, 100 mM fosforečnanového roztoku (pH 7) a 0,05 ml kteréhokoli z enzymových roztoků rozkládajících uracil·thymín odvozeného z kmenů připravených v přípravném příkladu 2 bylo ponecháno reagovat při 35 °C po dobu 15 až 30 minut. Přítomnost uracil-thymindehydrogenasy, barbiturasy, dihydrouracildehydogenasy a dihydropyrimidinasy stejně jako tvorba a mizení kyseliny barbiturové a dihydrouracilu bylo detekováno sledováním pomocí vysokovýkonné kapalinové chromatografie.

Tabulka 2 ukazuje výsledky. Symboly "+" a "-" v tabulce 2 popořadě označují, že enzym byl detekován nebo nedetekován.

Mělo by se poznamenat, že kde například aktivita dihydropyrimidinasy je vyšší než aktivita dihydrouracildehydogenasy, vytvořený produkt dihydrouracil není detekován. Z toho vyplývá, že symbol "-" v tabulce 2 nutně nepopírá stoprocentně přítomnost příslušného enzymu.

Tabulka 2

Kmen č.	Detekce každého enzymu			
	uracilthymín-dehydrogenasa	barbiturasa	dihydro-uracil-dehydrogenasa	dihydro-pyrimidinasa
YGK 222	+	+	-	-
YGK 443	+	+	+	+
YGK 252	+	+	+	+
JCM 3132	+	+	-	-
JCM 3191	+	+	-	-

Příklad 1

Příprava purinového nukleosidu pomocí PUNP·PYNP enzymového roztoku a enzymového roztoku rozkládajícího uracil·thymín

100 ml vodného roztoku (pH 7) obsahujícího 20 mM thymidinu, 20 mM guaninu, 1,25 mM fosforečnanu draselného, 2 ml PUNP PYNP enzymového roztoku připraveného v přípravném příkladu 1, 0,5 ml enzymového roztoku rozkládajícího uracil·thymín odvozeného z *Arthrobacter species* YGK 222, který byl připraven v přípravném příkladu 2, 100 mM kyseliny borité a 4 mM ethylendiamintetraoctové kyseliny bylo ponecháno reagovat při 35 °C po dobu 110 hodin tak, že se měří koncentrace substrátů a produktů obsažených v reakční směsi. Obr. 1 ukazuje výsledky.

Další experiment byl prováděn podobně s výjimkou toho, že enzymový roztok rozkládající uracil·thymín nebyl přidán do reakčního roztoku, takže se měří koncentrace substrátů a produktů obsažených v reakční směsi. Tabulka 2 ukazuje výsledky.

V každém obr. 1 a 2 je thymidin označen bílými čtverci a deoxyguanosin je označen černými kosočtverci. Dále thymín a 5-methylbarbiturová kyselina jsou označeny popořadě černými trojúhelníky a bílými trojúhelníky.

Obr. 1 ukazuje tvorbu 5-methylbarbiturové kyseliny. Protože kyselina se rozkládá jakmile se objeví, osvětluje to, že uracilthymindehydrogenasa a barbiturasa jsou přítomny v enzymu rozkládajícím uracil·thymín. V případě obr. 1 thymidin zmizel v podstatě úplně, ačkoli startovací látka guanin byla nalezen, že zůstává jenom mírně.

Deoxyguanosin byl vytvořen v množství 14,9 mM (výtěžek 75%ní).

Ve srovnání s obr. 2 pokrývajícím případ, kde enzymový roztok rozkládající uracil·thymín nebyl přítomen, obr. 1 dokládá, že požadovaný produkt deoxyguanosin byl vytvořen ve velmi velkém množství.

Příklady 2 až 11

Příprava purinových nukleosidů pomocí různých startovacích látkových nukleosidů a různých startovacích látkových purinových bází

Reakce byla prováděna při 35 °C po dobu 90 hodin za stejných podmínek jako v příkladu 1, s výjimkou toho, že byly použity pyrimidinové nukleosidové sloučeniny a purinové báze uvedené v tabulce 3. Koncentrace substrátů a produktů obsažených v reakční směsi byly měřeny s výsledky uvedenými v tabulce 3.

Tabulka 3 také ukazuje srovnávací příklady. Tyto srovnávací příklady byly stejné jako samotné příklady s výjimkou toho, že 0,5 ml destilované vody bylo přidáno do reakčního systému místo roztoku enzymů rozkládajících uracil·thymín použitého v příkladech. Jak je zřejmé z tabulky 3, výtěžek purinové nukleosidové sloučeniny se zvýší přidavkem enzymového roztoku rozkládajícího uracil·thymín. Zejména výtěžky guanosinu a deoxyguanosinu byly značně zvýšeny přidavkem enzymového roztoku rozkládajícího uracil·thymín.

44 33 33

Tabulka 3

Př.	Suroviny		Vytvořená purinová nukleosidová sloučenina	Vytvř.množství mM	
	pyrimidinová nukleosidová sloučenina	purinová báze		enzym rozkládající uracil thymin	
				přítomen	nepřítom.
2	thymidin	adenin	deoxyadenosin	17,7	8,8
3	thymidin	hypoxanthin	deoxyinosin	16,4	12,4
4	thymidin	benzimidazol	benzimidazoldeoxyribosid	17,7	15,7
5	deoxyuridin	adenin	deoxyadenosin	16,6	8,8
6	deoxyuridin	adénin	deoxyguanosin	15,4	2,2
7	deoxyuridin	hypoxanthin	deoxyinosin	15,9	11,7
8	deoxyuridin	benzimidazol	benzimidazoldeoxyribosid	17,2	13,9
9	uridin	adenin	adenosin	12,9	3,7
10	uridin	guanin	guanosin	13,4	2,2
11	uridin	hypoxanthin	inosin	16,2	11,2

Příklad 12

Účinek enzymového roztoku rozkládajícího uracil·thymín, odvozeného od kteréhokoli z kmenů, na tvorbu purinové nukleosidové sloučeniny

Bylo připraveno 100 ml roztoku (pH 7) obsahující 20 mM thymidinu, 20 mM guaninu, 1,25 mM fosforečnanu draselného, 2 ml PUNP·PYNP enzymového roztoku připraveného v přípravném příkladu 1, 0,5 ml enzymového roztoku rozkládajícího uracil thymín odvozeného z kteréhokoli kmene, který byl připraven v přípravném příkladu 2, 100 mM kyseliny borité a 4 mM ethylendiamin-tetraoctové kyseliny. V tomto příkladu byly také prováděny srovnávací příklady stejným způsobem s výjimkou toho, že bylo přidáno 0,5 ml destilované vody do reakčního systému místo použitého enzymového roztoku rozkládajícího uracil·thymín.

Reakční systém byl podroben reakci při 35 °C po dobu 100 hodin tak, že se měřily koncentrace substrátů a produktů obsažených v reakční směsi. Tabulka 4 ukazuje výsledky.

Enzymový roztok rozkládající uracil·thymín odvozený z jakéhokoli z kmenů byl zjištěn, že je účinný pro zvýšení výtěžku produktu deoxyguanosinu.

Tabulka 4

Kmen	Tvorba deoxyguanosinu (mM)	
	Enzymový roztok rozkládající uracil·thymín	
	přítomen	nepřítomen
Arthrobactor species YGK 222	12,4	2,4
Bacillus megaterium YGK 252	3,2	2,4
Pseudomonas species YGK 443	2,7	2,4
Rhodococcus erythropolis JCM 3132	5,3	2,4
Rhodococcus erythropolis JCM 3191	4,6	2,4

Příklad 13

Stabilizace meziprojektu (ribosa-1-fosfat) a inhibice rozkladu fosfatasou

1 ml vodného roztoku (pH 7) obsahující 5 mM ribosa-1-fosfatu, stabilizátor uvedený v tabulce 5 (4 mM EDTA a 100 mM každého ze stabilizátorů bylo použito), 0,02 ml PUNP·PYNP enzymového roztoku připraveného v přípravném příkladu 1 a 0,01 ml enzymového roztoku rozkládajícího uracil·thymín odvozeného z *Arthrobacter species* YGK 222, který byl připraven v přípravném příkladu 2, byly podrobeny reakci při 35 °C po dobu 72 h. Přítomnost ribosa-1-fosfatu a ribosy vznikající z rozkladu ribosa-1-fosfatu v reakční směsi byla zkoušena tenkovrstvou chromatografií, jejíž výsledky jsou uvedeny v tabulce 5. Zkoušení bylo prováděno způsobem popsáným Ishii a j. v "Agric. Biol. Chem.", 53(12), 3209-3218 (1989)", což je zde začleněno formou odkazu.

Tabulka 5 také ukazuje kontrolu, která byla prováděna stejným způsobem s výjimkou, že 100 ml tris(hydroxymethyl)aminomethanhydrochloridu (zde označovaného jako "tris") bylo přidáno do reakčního systému místo PUNP·PYNP enzymového roztoku a použitého enzymového roztoku rozkládajícího uracil·thymín. Případně symbol "+" uvedený v tabulce 5 označuje, že byl zjištěn rozklad ribosa-1-fosfatu, přičemž symbol "-" označuje, že rozklad nebyl zjištěn.

Při kontrole, to znamená "tris(kontrola)", při které nebyl přidáván enzymový roztok, rozklad moc neprobíhal, což dokládá, že v enzymovém roztoku byla obsažena fosfatasa. Na druhé straně rozklad ribosa-1-fosfat nebyl zjištěn v případě použití jak kyselina borité, tak EDTA, což dokládá, že tyto stabilizátory slouží k inhibici aktivity fosfatasy obsažené

v enzymovém roztoku a přispívá ke stabilizaci ribosa-1-fosfatu.

Tabulka 5

Stabilizátor	Rozklad ribosa-1-fosfatu
tris (kontrola)	+
tris	+
kyselina boritá	+
glycin	-
glycin	±
kyselina boritá + glycin	±
kyselina boritá + tris	±
tris + EDTA	+
kyselina boritá + EDTA	-
glycin + EDTA	±
EDTA	+

Příklad 14

Účinek stabilizátor při tvorbě deoxyguanosinu

100 ml vodného roztoku (pH 7) obsahujícího 20 mM thymidin, 20 mM guaninu, stabilizátor uvedený v tabulce 6, 2 ml PUNP-PYNP enzymového roztoku připraveného v přípravném příkladu 1 a 0,5 ml enzymového roztoku rozkládajícího uracil-thymin odvozeného od *Arthrobacter species* YGK 222, který byl připraven v přípravném příkladu 2, byl podroben reakci při 35 °C po dobu 90 hodin. Množství stabilizátoru označeného "x" v tabulce 6 bylo 4 mM, množství jiného stabilizátoru bylo 100 mM.

Množství deoxyguanosinu obsaženého v reakční směsi bylo měřeno, přičemž výsledky jsou uvedeny v tabulce 6.

Experimentální data dokládají, že kombinace kyseliny borité a komplexotvorné sloučeniny podobné EDTA, přičemž tato kombinace je také testována v příkladu 13, je účinná pro inhibici rozkladu ribosa-1-fosfatu tak, že se stabilizuje ribosa-1-fosfat a tak se zvyšuje účinnost tvorby purinové nukleosidové sloučeniny.

Tabulka 6

Stabilizátor	Tvorba deoxyguanosinu (mM)
tris (kontrola)	0
kyselina boritá	1,5
glycin	0
iminodioctová kyselina ^x	0
nitrilotrioctová kyselina ^x	0
EDTA ^x	0
EGTA ^x	0
tris+EDTA ^x	0
glycin+EDTA ^x	0,4
kyselina boritá+tris	2,0
kyselina boritá+glycin	4,7
kyselina boritá + iminodioctová kyselina ^x	4,9
kys.boritá + nitrilotrioctová kyselina ^x	11,6
kyselina boritá + EDTA ^x	12,7
kyselina boritá + EGTA ^x	9,6

Další výhody a modifikace jsou lehce zřejmé odborníkům v oboru. Tudíž vynález v tomto svém širším aspektu není omezen na konkrétní detaily a příkladná provedení, která jsou zde ukázána a popsána. V souhlase s tím mohou být provedeny různé modifikace bez odchýlení se od ducha nebo rozsahu obecného vynálezeckého konceptu jak je definován v připojených patentových nárocích a jejich ekvivalentech.



P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Způsob přípravy purinové nukleosidové sloučeniny, zahrnující stupeň podrobení pyrimidinové nukleosidové sloučeniny a purinové báze výměnné reakci báze ve vodném roztoku obsahujícím fosforečnanové ionty v přítomnosti purinové nukleosidové fosforylasy a pyrimidinové nukleosidové fosforylasy, vyznačený tím, že pyrimidinová báze vytvořená touto reakcí se převede mikroorganizmem nebo enzymem odvozeným z tohoto mikroorganismu na sloučeninu neschopnou působit jako substráty pyrimidinové nukleosidové fosforylasy a purinové nukleosidové fosforylasy.
2. Způsob přípravy purinové nukleosidové sloučeniny podle nároku 1 vyznačený tím, že alespoň jedna sloučenina vybraná ze skupiny zahrnující glycin, iminodioctovou kyselinu, nitrilotrioctovou kyselinu, ethylendiamintetraoctovou kyselinu a ethylenglykol(2-aminoethylether)tetraoctovou kyselinu a kyselinu boritou nebo borat, se přidá jako stabilizátor ribosa-1-fosfatu nebo deoxyribosa-1-fosfatu, které se vytvoří jako meziprodukty při výměnné reakci báze.
3. Způsob přípravy purinové nukleosidové sloučeniny podle nároku 1 nebo 2 vyznačený tím, že se uvedený mikroorganismus vybere ze skupiny zahrnující rod *Arthrobacter*, rod *Bacillus*, rod *Pseudomonas* a rod *Rhodococcus*.
4. Způsob přípravy purinové nukleosidové sloučeniny podle nároku 1 nebo 2 vyznačený tím, že se pyrimidinová nukleosidová sloučenina vybere ze skupiny zahrnující uridin, deoxyuridin, 5-methyluridin a thymidin.
5. Způsob přípravy purinové nukleosidové sloučeniny podle nároku 1 nebo 2 vyznačený tím, že purinová báze se vybere

ze skupiny zahrnující adenin, guanin, benzimidazol, halogenovaný purin a aminovaný purin.

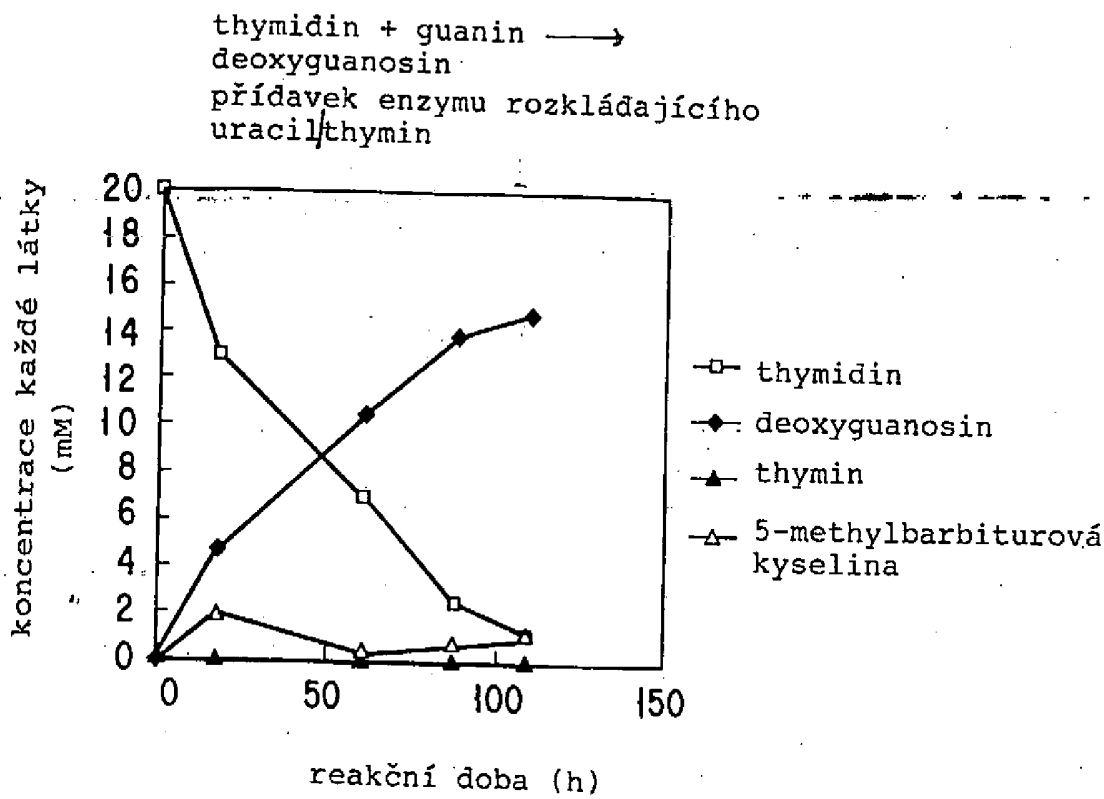
6. Způsob přípravy purinové nukleosidové sloučeniny podle nároku 1 nebo 2 vyznačený tím, že enzymem odvozeným z mikroorganismu je uracilthymindehydrogenasa nebo dihydrouracil-dehydrogenasa.

7. Způsob přípravy purinové nukleosidové sloučeniny podle nároku 1, 2 nebo 3 vyznačený tím, že uvedeným mikroorganizmem je *Arthrobacter species* YGK 222 (FERM BP-5907), *Bacillus megaterium* YGK 252 (FERM BP-5908), *Pseudomonas species* YGK 443 (FERM BP-5909), *Rhodococcus erythropolis* JCM 3132 nebo *Rhodococcus erythropolis* JCM 3191.

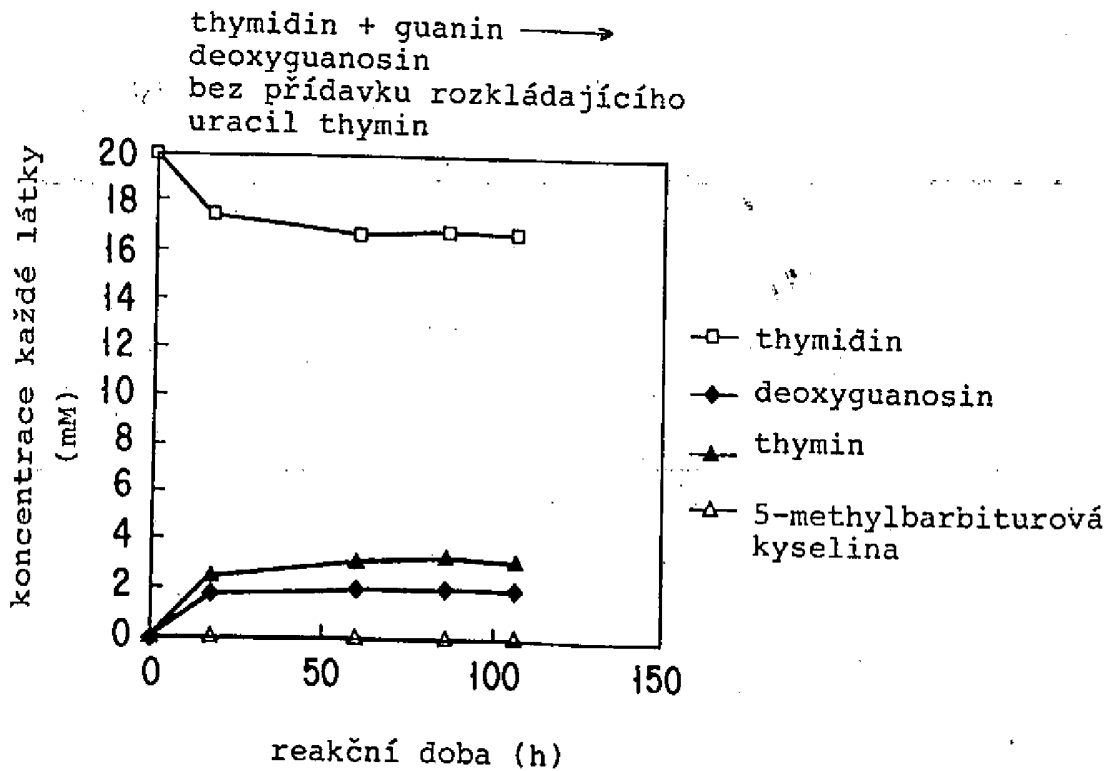
8. Mikroorganismus schopný produkovat uracilthymindehydrogenasu nebo dihydrouracildehydrogenasu vybraný ze skupiny zahrnující *Arthrobacter species* YGK 222 (FERM BP-5907), *Bacillus megaterium* YGK 252 (FERM BP-5908) a *Pseudomonas species* YGK 443 (FERM BP-5909).

Zastupuje: JUDr. Ing. Milan Hořejš

14.02.2017



Obr. 1



Obr. 2

67