

(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
2022 年 12 月 15 日 (15.12.2022)



(10) 国际公布号
WO 2022/258014 A1

(51) 国际专利分类号:
C12P 19/38 (2006.01) *C12N 15/31* (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2022/097869

(22) 国际申请日: 2022 年 6 月 9 日 (09.06.2022)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202110641036.8 2021年6月9日 (09.06.2021) CN

(71) 申请人: 正大天晴药业集团股份有限公司 (CHIA TAI TIANQING PHARMACEUTICAL GROUP CO., LTD.) [CN/CN]; 中国江苏省连云港市郁州南路369号, Jiangsu 222062 (CN)。

(72) 发明人: 张传志(ZHANG, Chuanzhi); 中国江苏省连云港市郁州南路369号, Jiangsu 222062 (CN)。黄文龙(HUANG, Wenlong); 中国江苏省连云港市郁州南路369号, Jiangsu 222062 (CN)。王蓓华(WANG, Beihua); 中国江苏省连云港市郁州南路369号, Jiangsu 222062 (CN)。王光明(WANG, Guangming); 中国江苏省连云港市郁州南路369号, Jiangsu 222062 (CN)。于敏(YU, Min); 中国江苏省连云港市郁州南路369号, Jiangsu 222062 (CN)。夏春光(XIA, Chunguang); 中国江苏省连云港市郁州南路369号, Jiangsu 222062 (CN)。

(74) 代理人: 北京信慧永光知识产权代理有限公司 (BEIJING SUNHOPE INTELLECTUAL PROPERTY LTD.); 中国北京市海淀区知春路9号坤讯大厦1106室, Beijing 100191 (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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,

GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, 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, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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, ST, 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, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括按细则13之二规定在说明书以外提交的关于生物材料保藏的说明(细则13之二. 4(d) (i) 和 48. 2(a) (viii))。

(54) **Title:** RECOMBINANT GENETICALLY ENGINEERED BACTERIA FOR PREPARING NELARABINE, AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: 用于制备奈拉滨的重组基因工程菌及其应用

(57) **Abstract:** The present invention provides a recombinant genetically engineered bacteria for preparing nelarabine, and an application thereof, which relate to the field of biochemicals. A bioenzyme catalyst cultured by applying the recombinant genetically engineered bacteria exhibits significantly improved enzyme activity. The method for preparing nelarabine by applying the recombinant genetically engineered bacteria or the bioenzyme catalyst has the advantages of short catalysis time, high biological conversion rates, reduced enzyme liquid requirements, high substrate utilization rates, high enzyme activity stability, is economically feasible, and is suitable for industrial production and preparation.

(57) **摘要:** 提供一种用于制备奈拉滨的重组基因工程菌及其应用, 属于生物化工领域。应用所述重组基因工程菌培养得到的生物酶催化剂, 表现出明显提高的酶活性, 并且应用重组基因工程菌或生物酶催化剂制备奈拉滨的方法具有催化时间短、生物转化率高、酶液需求量减少、底物利用率高、酶活性的稳定性高等优点, 经济可行, 适合工业化生产制备。



WO 2022/258014 A1

用于制备奈拉滨的重组基因工程菌及其应用

相关申请的引用

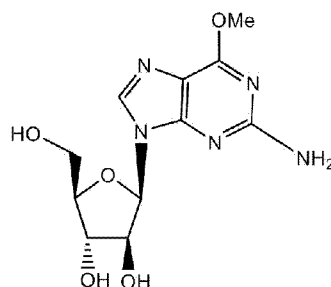
本申请要求于 2021 年 06 月 09 日向中华人民共和国国家知识产权局提交的第 202110641036.8 号中国专利申请的优先权和权益，在此将其全部内容以援引的方式整体并入本文中。

技术领域

本申请属于生物化工领域，具体涉及一种用于制备奈拉滨的重组基因工程菌及其应用。

背景技术

奈拉滨是一种细胞毒素类药物，化学名为 9-β-D-阿拉伯呋喃糖-6-甲氧基-9H-嘌呤-2-胺。2005 年 10 月获得美国食品及药品管理局（FDA）批准上市，其商品名为 Arranon®，是葛兰素史克公司研发新药，用于治疗两次化疗以上无效果或病情复发的 T 细胞急性淋巴瘤母细胞性白血病、T 细胞淋巴瘤母细胞性淋巴瘤。其结构式 I 如下所示：



式 I 化合物

迄今为止，现有文献与资料已经公开的奈拉滨的合成方法主要包括化学法合成和生物转化法合成。J. Heterocyclic Chem., 1988,25,1899-1903 报道了以 D-阿拉伯糖为原料，经过多步上保护基的反应制备化合物建立起糖苷键，得到奈拉滨的化学偶联合成法。中国专利 CN101092441A 公开了以 6-氯鸟苷为原料，经过六步化学合成将呋喃核糖转化为阿拉伯糖，从而制得奈拉滨。

中国专利 CN1020107C 公开了以 2-氨基-6-甲氧基嘌呤和尿嘧啶阿糖苷为原料，在纯的嘌呤核苷磷酸化酶和尿苷磷酸化酶溶液中于 37℃ 温孵，反应 26 天之后，过滤反应物，经过分离纯化得到 2-氨基-6-甲氧基嘌呤-9-β-D-阿拉伯呋喃糖苷结晶。

化学法工艺复杂，反应条件苛刻，使用重金属试剂，污染环境。生物转化法相比之下反应条件温和，步骤简单，绿色环保，但也存在工艺要求严格，产率较低，转化酶不易制得，价格昂贵，反应时间长等问题。

基于以上情况，有必要开发出一种对路线简便，制造成本低，收率与纯度较高，经济可行且适合于工业化生产的方法。

发明概述

第一方面，本申请提供了一种用于制备奈拉滨的重组基因工程菌。

第二方面，本申请提供了一种微生物制剂，包含所述重组基因工程菌的湿菌体。

第三方面，本申请提供了一种应用重组基因工程菌培养得到的生物酶催化剂、及应用所述重组基因工程菌或所述生物酶催化剂制备奈拉滨的方法。

第四方面，本申请提供了一种重组基因工程菌及其培养得到的生物酶催化剂用于制备奈拉滨的用途。

发明内容

第一方面，本申请提供了一种用于制备奈拉滨的重组基因工程菌。

本申请涉及用于制备奈拉滨的重组基因工程菌，其中，重组基因工程菌是含有共表达尿嘧啶核苷磷酸化酶（UPase）和嘌呤核苷磷酸化酶（PNPase）的基因的工程菌 *Escherichia coli* 7N04（下文中，也称为“工程菌 7N04”或“重组基因工程菌 7N04”）。中文名为大肠埃希氏菌（在本文中，也称为“大肠杆菌”），拉丁文学名为 *Escherichia coli*，已于 2021 年 4 月 29 日保藏于中国国家知识产权局指定的中国典型培养物保藏中心，保藏地址为中国武汉市武汉大学，保藏编号为：CCTCC No. M2021490。本申请的重组基因工程菌也称为 *Escherichia coli* BL21(DE3)Plyss-PNPase-UPase。

在一些实施方案中，本申请涉及一种重组基因工程菌（例如重组大肠杆菌），其中，所述重组基因工

程菌在其基因组中整合有共表达尿嘧啶核苷磷酸化酶 (UPase) 和嘌呤核苷磷酸化酶 (PNPase) 的基因。或者, 所述重组基因工程菌包含含有共表达尿嘧啶核苷磷酸化酶 (UPase) 和嘌呤核苷磷酸化酶 (PNPase) 的基因的重组质粒。在一些实施方案中, 所述重组基因工程菌是在其基因组中整合有共表达尿嘧啶核苷磷酸化酶 (UPase) 和嘌呤核苷磷酸化酶 (PNPase) 的基因的 *Escherichia coli* 7N04。或者, 在一些实施方案中, 所述重组基因工程菌是包含含有共表达尿嘧啶核苷磷酸化酶 (UPase) 和嘌呤核苷磷酸化酶 (PNPase) 的基因的重组质粒的 *Escherichia coli* 7N04。

在一些实施方案中, 所述的重组基因工程菌 7N04 的特征在于: $OD_{600nm} \geq 3.0$, 细胞形态为短杆状, 菌体形态较均一, 培养液呈现浑浊、棕黄色。

在一些实施方案中, 所述的重组基因工程菌 7N04 的特征在于: $OD_{600nm} \geq 9.0$, 细胞形态为短杆状, 菌体形态较均一, 培养液呈现浑浊、棕黄色。

在一些实施方案中, 所述的重组基因工程菌 7N04 具有卡那霉素抗性。或者, 所述的重组基因工程菌 7N04 能够表达氨基糖苷磷酸转移酶 (APH(3')II 酶)。或者, 所述的重组基因工程菌 7N04 在其基因组中整合有卡那霉素抗性基因 (Kan)。或者, 所述的重组基因工程菌 7N04 包含含有卡那霉素抗性基因的重组质粒。卡那霉素抗性基因是基因工程中常用的选择标记基因之一, 通过在培养基中添加卡那霉素从而能够有助于筛选出阳性克隆。

在一些实施方案中, 所述重组基因工程菌处于湿菌体的形式, 所述湿菌体通过如下方法得到: 接种保藏编号为 CCTCC No. M2021490 的重组基因工程菌 7N04, 发酵培养, 发酵终止后收集得到湿菌体。其中, 所述的湿菌体中尿嘧啶核苷磷酸化酶活性和嘌呤核苷磷酸化酶活性的比值为 1:1~1:3。在一些实施方案中, 所述的湿菌体中尿嘧啶核苷磷酸化酶活性和嘌呤核苷磷酸化酶活性的比值为 1:1.5~1:2.5。在一些实施方案中, 所述湿菌体中尿嘧啶核苷磷酸化酶活性为 750~800U/mL 湿菌体, 嘌呤核苷磷酸化酶活性为 1750~1850U/mL 湿菌体。

第二方面, 本申请提供了一种微生物制剂, 包含上述的重组基因工程菌的湿菌体。在一些方案中, 所述湿菌体通过如下方法得到: 接种保藏编号为 CCTCC No. M2021490 的重组基因工程菌 7N04, 发酵培养, 发酵终止后收集得到湿菌体。其中, 所述的湿菌体中尿嘧啶核苷磷酸化酶活性和嘌呤核苷磷酸化酶活性的比值为 1:1~1:3。在一些实施方案中, 所述的湿菌体中尿嘧啶核苷磷酸化酶活性和嘌呤核苷磷酸化酶活性的比值为 1:1.5~1:2.5。在一些实施方案中, 所述湿菌体中尿嘧啶核苷磷酸化酶活性为 750~800U/mL 湿菌体, 嘌呤核苷磷酸化酶活性为 1750~1850U/mL 湿菌体。

第三方面, 本申请提供了一种应用保藏编号为 CCTCC No. M2021490 的重组基因工程菌培养得到的生物酶催化剂、及应用所述重组基因工程菌或所述生物酶催化剂制备奈拉滨的方法。

在一些实施方案中, 本申请提供了一种含有粗酶液的生物酶催化剂, 所述生物酶催化剂应用保藏编号为 CCTCC No. M2021490 的重组基因工程菌 7N04 通过发酵培养、高压均质、高温除杂制备得到。

在一些实施方案中, 本申请提供了一种生物酶催化剂, 其来自保藏编号为 CCTCC No. M2021490 的重组基因工程菌 7N04 的发酵培养物。在一些实施方案中, 本申请提供了一种生物酶催化剂, 其中, 通过将保藏编号为 CCTCC No. M2021490 的重组基因工程菌 7N04 进行发酵培养, 离心收集菌体, 然后将得到的菌体经高压均质和高温除杂获得所述生物酶催化剂。在一些实施方案中, 本申请提供了一种生物酶催化剂, 其中, 通过将保藏编号为 CCTCC No. M2021490 的重组基因工程菌 7N04 进行发酵培养, 离心收集菌体, 然后将得到的菌体重悬在磷酸盐缓冲液中之后, 在 600-1200bar 下进行高压均质, 通过水浴加热除去杂蛋白, 获得所述生物酶催化剂。在一些实施方案中, 本申请提供了一种生物酶催化剂, 其中, 通过将保藏编号为 CCTCC No. M2021490 的重组基因工程菌 7N04 进行发酵培养, 离心收集菌体, 然后将得到的菌体重悬在磷酸盐缓冲液中之后, 在 600-1200bar 下进行高压均质, 通过水浴 (例如 50~70℃ 的水浴) 加热除去杂蛋白, 获得所述生物酶催化剂, 并且其中, 所述的生物酶催化剂中尿嘧啶核苷磷酸化酶活性为 100~6000U/mL 生物酶催化剂, 嘌呤核苷磷酸化酶活性为 200~12000U/mL 生物酶催化剂。

在一些实施方案中, 所述生物酶催化剂的制备方法, 包括以下步骤:

(1) 接种保藏编号为 CCTCC No. M2021490 的重组基因工程菌 7N04, 发酵培养, 发酵过程中用诱导剂诱导蛋白表达, 发酵终止后收集菌体;

(2) 用磷酸盐缓冲液重悬菌体后高压均质, 高温除杂得到含有粗酶液的生物酶催化剂。

在一些实施方式中, 所述诱导剂为异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 和/或乳糖。在一些实施方案中, 所述的诱导剂为 IPTG。

在一些实施方案中, 所述的粗酶液的特征在于: 尿嘧啶核苷磷酸化酶活性和嘌呤核苷磷酸化酶活性的比值为 1:1~1:3。在一些实施方案中, 所述的粗酶液中尿嘧啶核苷磷酸化酶活性和嘌呤核苷磷酸化酶活性的比值为 1:1.5~1:2.5。在一些实施方案中, 所述的粗酶液中尿嘧啶核苷磷酸化酶活性为 800~900U/mL 粗酶液,

嘌呤核苷磷酸化酶活性为 1800~1900U/mL 粗酶液。

在一些实施方案中，所述的生物酶催化剂包括粗酶液进一步浓缩、或稀释得到的酶液。在一些实施方案中，所述的生物酶催化剂包括粗酶液进一步冻干形成的粗酶粉。在一些实施方案中，所述的生物酶催化剂包括粗酶液进一步与固定化树脂结合形成的固定化酶。

在一些实施方案中，所述的生物酶催化剂的特征在于：尿嘧啶核苷磷酸化酶活性和嘌呤核苷磷酸化酶活性的比值为 1:1~1:3。在一些实施方案中，所述的生物酶催化剂中尿嘧啶核苷磷酸化酶活性和嘌呤核苷磷酸化酶活性的比值为 1:1.5~1:2.5。在一些实施方案中，所述的生物酶催化剂中尿嘧啶核苷磷酸化酶活性为 100~6000U/mL 生物酶催化剂，嘌呤核苷磷酸化酶活性为 200~12000U/mL 生物酶催化剂。

在一些实施方案中，所述生物酶催化剂的制备方法中的高压均质的压力为 600-1200bar。在一些实施方案中，所述制备方法中的高压均质的压力为 800-1000bar。

在一些实施方案中，所述生物酶催化剂的制备方法中的高温除杂的温度为 50~70℃。在一些实施方案中，所述制备方法中的高温除杂在水浴中进行。在一些实施方案中，所述制备方法中的高温除杂在 60℃ 水浴加热下进行。

在一些实施方案中，在所述发酵培养之前，进行一级种子培养和二级种子培养。

在一些实施方案中，采用包含如下组分的培养基进行一级种子培养和二级种子培养：酵母浸粉、氯化钠、葡萄糖、酵母浸膏、玉米浆。例如，所述培养基由如下组成（以重量计）：酵母浸粉 2%、氯化钠 0.5%、葡萄糖 0.1%、酵母浸膏 0.5%、玉米浆 0.5%、以及余量的水。或者，在一些实施方案中，采用包含如下组分的培养基进行一级种子培养和二级种子培养：酵母浸粉、氯化钠、蛋白胨。例如，所述培养基由如下组成（以重量计）：蛋白胨 1.0%、酵母浸粉 0.5%、氯化钠 0.5%、以及余量的水。

在一些实施方案中，将所述的一级种子培养和二级种子培养的培养基用 NaOH 溶液调节 pH 至 6.8~8.0（例如 7.0~7.2）。

在一些实施方案中，将 OD 大于等于 9 的二级种子培养物进行发酵培养。在一些实施方案中，将 OD 大于等于 9 的二级种子培养物以 0.1%~1%（例如 0.5%）的接种量接种至发酵培养基中进行所述发酵培养。

在一些实施方案中，将 OD 大于等于 3 的二级种子培养物进行发酵培养。在一些实施方案中，将 OD 大于等于 3 的二级种子培养物以 1%~10%（例如 5%）的接种量接种至发酵培养基中进行所述发酵培养。

在一些实施方案中，采用包含如下组分的培养基进行所述发酵培养：酵母浸粉、氯化钠、葡萄糖、酵母浸膏、玉米浆、聚醚消泡剂。例如，所述培养基由如下组成（以重量计）：酵母浸粉 4.0%、氯化钠 0.5%、葡萄糖 0.25%、酵母浸膏 0.5%、玉米浆 0.5%、聚醚消泡剂 0.02%、以及余量的水。或者，在一些实施方案中，采用包含如下组分的培养基进行所述发酵培养：一水合柠檬酸、氯化钾、硫酸铵、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、七水硫酸镁、氯化钙、甘油、微量元素溶液（一水合柠檬酸、二水合氯化钙、七水合硫酸锌、一水合硫酸锰、五水合硫酸铜、六水合氯化钴、六水合三氯化铁、硼酸、钼酸钠）、聚醚消泡剂。例如，所述培养基由如下组成（以重量计）：一水合柠檬酸 0.116%、氯化钾 0.403%、硫酸铵 5.2%、磷酸二氢钠 5.0%、磷酸氢二钠 1.86%、七水硫酸镁 0.104%、氯化钙 0.255%、甘油 3.0%、微量元素溶液 1.0%（其中相对于微量元素溶液的总量而言，包含：一水合柠檬酸 1.04%、二水合氯化钙 0.522%、七水合硫酸锌 0.206%、一水合硫酸锰 0.406%、五水合硫酸铜 0.811%、六水合氯化钴 0.36%、六水合三氯化铁 1.006%、硼酸 0.003%、钼酸钠 0.002%）、聚醚消泡剂 0.02%、以及余量的水。

在一些实施方案中，所述的发酵培养基用 NaOH 溶液调节 pH 至 6.0~7.5（例如 6.5~7.0）。

在一些实施方案中，本申请提供了一种应用所述生物酶催化剂通过生物转化制备奈拉滨的方法。

在一些实施方案中，所述奈拉滨的制备方法包括以 2-氨基-6-甲氧基嘌呤和阿糖尿苷为底物，加入所述生物酶催化剂，在磷酸盐缓冲液中进行生物转化反应，分离纯化得到奈拉滨。

在一些实施方案中，本申请提供了一种应用保藏编号为 CCTCC No. M2021490 的重组基因工程菌 7N04 共表达嘌呤核苷磷酸化酶和尿嘧啶核苷磷酸化酶，通过生物转化制备奈拉滨的方法。

在一些实施方案中，所述奈拉滨的制备方法包括先应用保藏编号为 CCTCC No. M2021490 的重组基因工程菌 7N04 共表达嘌呤核苷磷酸化酶和尿嘧啶核苷磷酸化酶来制备生物酶催化剂，再以 2-氨基-6-甲氧基嘌呤和阿糖尿苷为底物，加入所述生物酶催化剂，在磷酸盐缓冲液中进行生物转化反应，分离纯化得到奈拉滨。

在一些实施方案中，所述奈拉滨的制备方法，包括以下步骤：

（1）接种保藏编号为 CCTCC No. M2021490 的重组基因工程菌 7N04，发酵培养，发酵过程中用诱导剂诱导蛋白表达，发酵终止后收集菌体；

（2）用磷酸盐缓冲液重悬菌体后高压均质，高温除杂得到含有粗酶液的生物酶催化剂；

(3) 以 2-氨基-6-甲氧基嘌呤和阿糖尿苷为底物, 在磷酸盐缓冲液中加入生物酶催化剂, 进行生物转化反应, 分离纯化合成奈拉滨。

在一些实施方案中, 步骤(1)中发酵培养的初始 pH 采用 NaOH 溶液调 pH 值至 6.5~8.0。在一些实施方案中, 步骤(1)中发酵培养的初始 pH 采用 NaOH 溶液调 pH 值至 6.5~7.0。在一些实施方案中, 步骤(1)中发酵培养的初始 pH 采用 NaOH 溶液调 pH 值至 6.8~8.0。在一些实施方案中, 步骤(1)中发酵培养的初始 pH 采用 NaOH 溶液调 pH 值至 7.0~7.2。

在一些实施方案中, 步骤(1)中发酵培养过程 pH 为 6.5~7.0。在一些实施方案中, 步骤(1)中发酵培养过程 pH 为 6.8~8.0。在一些实施方案中, 发酵培养过程 pH 为 7.5~7.6。

在一些实施方案中, 步骤(1)中发酵培养过程温度为 30~40℃。在一些实施方案中, 发酵培养过程温度为 30~37℃。在一些实施方案中, 发酵培养过程温度为 35~37℃。

在一些实施方案中, 步骤(1)中发酵培养过程转速为 100~1000 转/分。在一些实施方案中, 步骤(1)中发酵培养过程转速为 200~700 转/分。

在一些实施方案中, 采用包含如下组分的培养基进行所述发酵培养: 酵母浸粉、氯化钠、葡萄糖、酵母浸膏、玉米浆、聚醚消泡剂。在一些实施方案中, 将所述培养基用 NaOH 溶液调节 pH 至 6.8~8.0 (例如 7.0~7.2), 进行所述发酵培养。

在一些实施方案中, 采用包含如下组分的培养基进行所述发酵培养: 一水合柠檬酸、氯化钾、硫酸铵、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、七水硫酸镁、氯化钙、甘油、微量元素溶液(一水合柠檬酸、二水合氯化钙、七水合硫酸锌、一水合硫酸锰、五水合硫酸铜、六水合氯化钴、六水合三氯化铁、硼酸、钼酸钠)、聚醚消泡剂。在一些实施方案中, 将所述培养基用 NaOH 溶液调节 pH 至 6.0~7.5 (例如 6.5~7.0), 进行所述发酵培养。

在一些实施方案中, 步骤(1)中所述的诱导剂包括但不限于异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)、乳糖; 在一些实施方案中, 所述的诱导剂为 IPTG。

在一些实施方案中, 步骤(1)中发酵培养过程还包括一级种子、二级种子的培养。在一些实施方案中, 一级种子、二级种子的培养过程 pH 为 6.8~8.0; 在一些实施方案中, 一级种子、二级种子的培养过程 pH 为 7.0~7.2; 在一些实施方案中, 一级种子、二级种子的培养过程温度为 30~40℃; 在一些实施方案中, 一级种子、二级种子的培养过程温度为 35~37℃; 在一些实施方案中, 一级种子、二级种子的培养过程转速为 100~500 转/分; 在一些实施方案中, 一级种子、二级种子的培养过程转速为 200~300 转/分。

在一些实施方案中, 采用包含如下组分的培养基进行一级种子培养和二级种子培养: 酵母浸粉、氯化钠、葡萄糖、酵母浸膏、玉米浆。或者, 在一些实施方案中, 采用包含如下组分的培养基进行一级种子培养和二级种子培养: 酵母浸粉、氯化钠、蛋白胨。在一些实施方案中, 将所述的一级种子培养和二级种子培养的培养基用 NaOH 溶液调节 pH 至 6.8~8.0 (例如 7.0~7.2)。

在一些实施方案中, 将 OD 大于等于 9 的二级种子培养物进行发酵培养。在一些实施方案中, 将 OD 大于等于 9 的二级种子培养物以 0.1%~1% (例如 0.5%) 的接种量接种至发酵培养基中进行所述发酵培养。

在一些实施方案中, 将 OD 大于等于 3 的二级种子培养物进行发酵培养。在一些实施方案中, 将 OD 大于等于 3 的二级种子培养物以 1%~10% (例如 5%) 的接种量接种至发酵培养基中进行所述发酵培养。

在一些实施方案中, 步骤(1)中发酵培养过程还包括培养基的灭菌的过程。

在一些实施方案中, 步骤(1)采用离心收集菌体。在一些实施方案中, 离心转速为 4000~5000rpm。在一些实施方案中, 离心时间为 10~30 分钟; 在一些实施方案中, 离心时间为 15~20 分钟。

在一些实施方案中, 步骤(2)的粗酶液中尿嘧啶核苷磷酸化酶活性和嘌呤核苷磷酸化酶活性的比值为 1:1~1:3。在一些实施方案中, 步骤(2)的粗酶液中尿嘧啶核苷磷酸化酶活性和嘌呤核苷磷酸化酶活性的比值为 1:1.5~1:2.5。

在一些实施方案中, 所述的粗酶液的特征在于: 尿嘧啶核苷磷酸化酶活性和嘌呤核苷磷酸化酶活性的比值为 1:1~1:3。在一些实施方案中, 所述的粗酶液中尿嘧啶核苷磷酸化酶活性和嘌呤核苷磷酸化酶活性的比值为 1:1.5~1:2.5。在一些实施方案中, 所述的粗酶液中尿嘧啶核苷磷酸化酶活性为 800~900U/mL 粗酶液, 嘌呤核苷磷酸化酶活性为 1800~1900U/mL 粗酶液。

在一些实施方案中, 步骤(2)的生物酶催化剂包括粗酶液进一步浓缩或稀释得到的酶液。在一些实施方案中, 步骤(2)的生物酶催化剂包括粗酶液进一步冻干形成的粗酶粉。在一些实施方案中, 步骤(2)的生物酶催化剂包括粗酶液进一步与固定化树脂结合形成的固定化酶。在一些实施方案中, 步骤(2)的生物酶催化剂包括粗酶液和环氧树脂混合得到固定化酶。

在一些实施方案中,所述的生物酶催化剂的特征在于:尿嘧啶核苷磷酸化酶活性和嘌呤核苷磷酸化酶活性的比值为1:1~1:3。在一些实施方案中,所述的生物酶催化剂中尿嘧啶核苷磷酸化酶活性和嘌呤核苷磷酸化酶活性的比值为1:1.5~1:2.5。在一些实施方案中,所述的生物酶催化剂中尿嘧啶核苷磷酸化酶活性为100~6000U/mL生物酶催化剂,嘌呤核苷磷酸化酶活性为200~12000U/mL生物酶催化剂。

在一些实施方案中,所述的用于制备奈拉滨的生物酶催化剂的特征在于:嘌呤核苷磷酸化酶活性为200~4000U/mL,生物转化率达到75%以上、优选80%以上。

在一些实施方案中,所述的用于制备奈拉滨的生物酶催化剂的特征在于:嘌呤核苷磷酸化酶活性为200~4000U/mL,生物转化率达到90%以上。

在一些实施方案中,步骤(2)中的高压均质的压力为600-1200bar。在一些实施方案中,步骤(2)中的高压均质的压力为800-1000bar。

在一些实施方案中,步骤(2)中的高温除杂的温度为50~70℃。在一些实施方案中,步骤(2)中的高温除杂在水浴中进行。在一些实施方案中,步骤(2)中的高温除杂在60℃水浴加热下进行。

在一些实施方案中,步骤(2)、(3)中磷酸盐缓冲液包括但不限于磷酸二氢盐及其共轭碱磷酸氢二盐的溶液;在一些实施方案中,步骤(2)、(3)中磷酸盐缓冲液中的磷酸根离子包括下列盐配成的水溶液所产生的磷酸根离子:磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、磷酸氢二铵、磷酸二氢铵;在一些实施方案中,磷酸盐缓冲液为磷酸氢二钾和磷酸二氢钾的溶液。

在一些实施方案中,步骤(2)、(3)中磷酸盐缓冲液pH为6.0~8.0、例如6.5~8.0或者6.8~8.0;在一些实施方案中,磷酸盐缓冲液pH为7.0~7.2。

在一些实施方案中,步骤(2)中菌体与磷酸盐缓冲液的重量比例为1:5~1:10;在一些实施方案中,步骤(2)中菌体与磷酸盐缓冲液的重量比例为1:9。

在一些实施方案中,步骤(3)中反应的温度为50~85℃;在一些实施方案中,步骤(3)中反应的温度为50~60℃;在一些实施方案中,步骤(3)中反应的温度为55~60℃。

在一些实施方案中,步骤(3)中反应的转速为60~500rpm;在一些实施方案中,步骤(3)中反应的转速为90~300rpm;在一些实施方案中,步骤(3)中反应的转速为100~180rpm。

在一些实施方案中,步骤(3)中2-氨基-6-甲氧基嘌呤的浓度为5~35 g/L;在一些实施方案中,步骤(3)中2-氨基-6-甲氧基嘌呤的浓度为6~15 g/L、例如8~13 g/L;在一些实施方案中,步骤(3)中2-氨基-6-甲氧基嘌呤的浓度为13 g/L;在一些实施方案中,步骤(3)中2-氨基-6-甲氧基嘌呤的浓度为8 g/L。

在一些实施方案中,步骤(3)中阿糖尿苷的浓度为10~70 g/L;在一些实施方案中,步骤(3)中阿糖尿苷的浓度为13~65 g/L;在一些实施方案中,步骤(3)中阿糖尿苷的浓度为13~65 g/L;在一些实施方案中,步骤(3)中阿糖尿苷的浓度为14~50 g/L;在一些实施方案中,步骤(3)中阿糖尿苷的浓度为15~35 g/L;在一些实施方案中,步骤(3)中阿糖尿苷的浓度为16~26 g/L;在一些实施方案中,步骤(3)中阿糖尿苷的浓度为16 g/L;在一些实施方案中,步骤(3)中阿糖尿苷的浓度为26 g/L。

在一些实施方案中,底物2-氨基-6-甲氧基嘌呤与阿糖尿苷的投料量的摩尔比为1:1~1:3;在一些实施方案中,底物2-氨基-6-甲氧基嘌呤与阿糖尿苷的投料量的摩尔比为1:1.2~1:2;在一些实施方案中,底物2-氨基-6-甲氧基嘌呤与阿糖尿苷的投料量的摩尔比为1:1.6。

在一些实施方案中,步骤(3)中的生物酶催化剂的特征在于:所述生物酶催化剂中尿嘧啶核苷磷酸化酶活性和嘌呤核苷磷酸化酶活性的比值为1:1~1:3。在一些实施方案中,所述生物酶催化剂中尿嘧啶核苷磷酸化酶活性和嘌呤核苷磷酸化酶活性的比值为1:1.5~1:2.5。

在一些实施方案中,步骤(3)中的生物酶催化剂的特征在于:嘌呤核苷磷酸化酶活性为200~4000U/mL,生物转化率达到75%以上。

在一些实施方案中,步骤(3)中的生物酶催化剂的特征在于:嘌呤核苷磷酸化酶活性为200~4000U/mL,生物转化率达到90%以上。

在一些实施方案中,步骤(3)的生物转化反应,在嘌呤核苷磷酸化酶活性为2000U~4000U/mL时,反应3~6小时后转化率达到90%以上。

在一些实施方案中,步骤(3)的生物转化反应,在嘌呤核苷磷酸化酶活性为3000U/mL时,反应3小时后转化率达到95%以上。

在一些实施方案中,步骤(3)的生物转化反应,在嘌呤核苷磷酸化酶活性为400U~1000U/mL时,反应24~48小时后转化率达到75%以上。

在一些实施方案中,步骤(3)的生物转化反应,在嘌呤核苷磷酸化酶活性为400U~1000U/mL时,反

应 24~48 小时后转化率达到 90%以上。

在一些实施方案中，步骤（3）的生物转化反应，在嘌呤核苷磷酸化酶活性为 400U/mL 时，反应 24 小时后转化率达到 75%以上。

在一些实施方案中，步骤（3）的生物转化反应，在嘌呤核苷磷酸化酶活性为 600U/mL 时，反应 24~48 小时后转化率达到 95%以上。

在一些实施方案中，步骤（3）中分离纯化的过程包括但不限于转化液预处理、柱层析、浓缩、结晶、干燥。在一些实施方案中，视需要，步骤（3）中分离纯化得到的奈拉滨可以进行重结晶精制。

在一些实施方案中，步骤（3）中分离纯化的过程使用的有机溶剂包括但不限于甲醇和/或乙醇和/或丙酮。在一些实施方案中，步骤（3）中分离纯化的过程使用的有机溶剂为乙醇。

第四方面，本申请提供了一种保藏编号为 CCTCC No. M2021490 的重组基因工程菌及其培养得到的生物酶催化剂、包含其湿菌体的微生物制剂用于制备奈拉滨的用途。

在一些实施方案中，所述的重组基因工程菌是含有共表达尿嘧啶核苷磷酸化酶（UPase）、嘌呤核苷磷酸化酶（PNPase）基因的工程菌 7N04。或者，所述的重组基因工程菌是在其基因组中整合有共表达尿嘧啶核苷磷酸化酶（UPase）和嘌呤核苷磷酸化酶（PNPase）的基因的工程菌 7N04。或者，所述重组基因工程菌是包含含有共表达尿嘧啶核苷磷酸化酶（UPase）和嘌呤核苷磷酸化酶（PNPase）的基因的重组质粒的工程菌 7N04。

在一些实施方案中，所述的重组基因工程菌为：通过接种保藏编号为 CCTCC No. M2021490 的重组基因工程菌 7N04，发酵培养，发酵终止后收集得到的湿菌体，其中，所述的湿菌体中尿嘧啶核苷磷酸化酶活性和嘌呤核苷磷酸化酶活性的比值为 1:1~1:3。在一些实施方案中，所述湿菌体中尿嘧啶核苷磷酸化酶活性和嘌呤核苷磷酸化酶活性的比值为 1:1.5~1:2.5。在一些实施方案中，所述湿菌体中尿嘧啶核苷磷酸化酶活性为 750~800U/mL 湿菌体，嘌呤核苷磷酸化酶活性为 1750~1850U/mL 湿菌体。

在一些实施方案中，所述的生物酶催化剂的特征在于含有应用保藏编号为 CCTCC No. M2021490 的重组基因工程菌 7N04 通过发酵培养、高压均质、高温除杂制备得到的粗酶液。在一些实施方案中，所述的生物酶催化剂包括粗酶液进一步浓缩、或稀释得到的酶液。在一些实施方案中，所述的生物酶催化剂包括粗酶液进一步冻干形成的粗酶粉。在一些实施方案中，所述的生物酶催化剂包括粗酶液进一步与固定化树脂结合形成的固定化酶。

在一些实施方案中，所述的粗酶液的特征在于：尿嘧啶核苷磷酸化酶活性和嘌呤核苷磷酸化酶活性的比值为 1:1~1:3。在一些实施方案中，所述的粗酶液中尿嘧啶核苷磷酸化酶活性和嘌呤核苷磷酸化酶活性的比值为 1:1.5~1:2.5。在一些实施方案中，所述的粗酶液中尿嘧啶核苷磷酸化酶活性为 800~900U/mL 粗酶液，嘌呤核苷磷酸化酶活性为 1800~1900U/mL 粗酶液。

在一些实施方案中，所述的生物酶催化剂的特征在于：尿嘧啶核苷磷酸化酶活性和嘌呤核苷磷酸化酶活性的比值为 1:1~1:3。在一些实施方案中，所述的生物酶催化剂中尿嘧啶核苷磷酸化酶活性和嘌呤核苷磷酸化酶活性的比值为 1:1.5~1:2.5。在一些实施方案中，所述的生物酶催化剂中尿嘧啶核苷磷酸化酶活性为 100~6000U/mL 生物酶催化剂，嘌呤核苷磷酸化酶活性为 200~12000U/mL 生物酶催化剂。

在一些实施方案中，所述的用于制备奈拉滨的生物酶催化剂的特征在于：嘌呤核苷磷酸化酶活性为 200~4000U/mL，生物转化率达到 75%以上。

在一些实施方案中，所述的用于制备奈拉滨的生物酶催化剂的特征在于：嘌呤核苷磷酸化酶活性为 200~4000U/mL，生物转化率达到 90%以上。

在一些实施方案中，所述的生物酶催化剂用于制备奈拉滨的生物转化反应，在嘌呤核苷磷酸化酶活性为 2000U~4000U/mL 时，反应 3~6 小时后转化率达到 90%以上。

在一些实施方案中，所述的生物酶催化剂用于制备奈拉滨的生物转化反应，在嘌呤核苷磷酸化酶活性为 3000U/mL 时，反应 3 小时后转化率达到 95%以上。

在一些实施方案中，所述的生物酶催化剂用于制备奈拉滨的生物转化反应，在嘌呤核苷磷酸化酶活性为 400U~1000U/mL 时，反应 24~48 小时后转化率达到 75%以上。

在一些实施方案中，所述的生物酶催化剂用于制备奈拉滨的生物转化反应，在嘌呤核苷磷酸化酶活性为 400U~1000U/mL 时，反应 24~48 小时后转化率达到 90%以上。

在一些实施方案中，所述的生物酶催化剂用于制备奈拉滨的生物转化反应，在嘌呤核苷磷酸化酶活性为 400U/mL 时，反应 24 小时后转化率达到 75%以上。

在一些实施方案中，所述的生物酶催化剂用于制备奈拉滨的生物转化反应，在嘌呤核苷磷酸化酶活性

为 600U/mL 时，反应 24~48 小时后转化率达到 95%以上。

本申请采用重组基因工程菌 7N04 作为用于合成奈拉滨的一种新的酶来源，酶催化反应仅仅需要 1 步反应，催化时间短，生物转化率高。与人工诱变的阿氏肠杆菌株表达的野生酶相比，酶液需求量缩小了 20~40 倍、酶液的酶活性提升了 10~400 倍，生物转化反应时间由 5~6 天缩减至 1~2 天，奈拉滨的转化率由 40~50% 提升至 90%以上，反应液体积缩小了 2~4 倍。底物利用率高、酶活性的稳定性高。且本申请应用重组基因工程菌 7N04 催化合成奈拉滨具有短时间（3 小时）达到高转化率（ $\geq 95\%$ ）的优势。奈拉滨生物转化的整个制备工艺只用到乙醇作为溶剂，对环境污染小，条件温和，操作工序简单，生产周期短，并且收率明显增加，后期产品的残留检测、蛋白检测等实验的方法开发容易，对设备要求不高，生产成本较低，是一种经济可行、适合工业化生产制备方法。

在本文中，除非另有说明，术语“包含、包括和含有（comprise、comprises 和 comprising）”或其等同物（例如 contain、containing、include、including）为开放式表述，应理解为“包括但不限于”，意味着除所列出的要素、组分和步骤外，还可涵盖其它未指明的要素、组分和步骤。

在本文中，除非另有说明，术语“多核苷酸”、“核酸”、“核酸序列”和“基因”可互换使用，表示两个以上的核苷酸之间借助磷酸二酯键连接成的产物。

在本文中，除非另有说明，本文所使用的参数值应理解为在所有情况下均由术语“约”修饰。例如，当与百分比相连时，术语“约”可以表示例如相对于其所修饰的值存在 $\pm 0.1\%$ 、优选 $\pm 0.05\%$ 、更优选 $\pm 0.01\%$ 的变化。

除非上下文另有明确指示，单数术语涵盖复数的指示对象，反之亦然。类似地，除非上下文另有明确指示，词语“或”意在包括“和”，反之亦然。

在本文中，除非另有说明，术语“重组质粒”和“重组表达载体”可互换使用。

具体实施方式

以具体的实施例说明本申请的技术方案，但本申请的保护范围不限于下述的实施例范围。所采用的试剂、对照品均为市售产品。除非另有说明，如下实施例中使用的各耗材和仪器均为可商购的。

本申请中“湿菌体”、“粗酶液”、“生物酶催化剂”等作为待测样品，其尿嘧啶核苷磷酸化酶活性和嘌呤核苷磷酸化酶活性的测定方法的具体操作如下：

【尿嘧啶核苷磷酸化酶活力测定方法】

溶液 A 称取磷酸氢二钾三水合物 22.8g，加水 1000mL 使其溶解，即得 0.1mol/L 磷酸氢二钾溶液；称取无水磷酸二氢钾 13.6g，加水 1000mL 使其溶解，即得 0.1mol/L 磷酸二氢钾溶液；采用上述 0.1mol/L 磷酸二氢钾溶液调节 0.1mol/L 磷酸氢二钾溶液的 pH 值至 7.0，即得溶液 A（0.1mol/L 磷酸盐溶液，pH 7.0）。

尿嘧啶对照品溶液 取对照品尿嘧啶约 25mg，精密称定，置 250mL 量瓶中，加溶液 A 适量，超声 3 分钟使其溶解，用溶液 A 稀释至刻度，摇匀，精密量取 1mL，置 25mL 量瓶中，用溶液 A 稀释至刻度，摇匀。

底物溶液 取阿糖尿苷约 488mg，精密称定，置 50mL 西林瓶中，精确加入 20mL 溶液 A，加入转子，置磁力搅拌水浴锅内 60℃ 水浴预热 10 分钟后，加入 1mL 溶液 A，60℃ 条件下边搅拌边反应 30 分钟后，取出，立即加入 6mol/L 盐酸溶液 400 μ L，摇匀，用 0.22 μ m 滤膜滤过，取续滤液，即得。

酶贮备液 精密量取待测样品 1mL，置 50mL 量瓶中，用溶液 A 稀释至刻度，摇匀，精密移取 1mL，置 10mL 量瓶中，用溶液 A 稀释至刻度，摇匀。

供试品溶液 取阿糖尿苷约 488mg，精密称定，置 50mL 西林瓶中，精确加入 20mL 溶液 A，加入转子，置磁力搅拌水浴锅内 60℃ 水浴预热 10 分钟后，加入酶贮备液 1mL，60℃ 条件下边搅拌边反应 30 分钟后，取出，立即加入 6mol/L 盐酸溶液 400 μ L，摇匀，用 0.22 μ m 滤膜滤过，取续滤液，即得。

空白溶液 精密移取 20mL 溶液 A，置 50mL 西林瓶中，加入转子，置磁力搅拌水浴锅内 60℃ 水浴预热 10 分钟后，加入上述酶贮备液 1mL，60℃ 条件下边搅拌边反应 30 分钟后，取出，立即加入 6mol/L 盐酸溶液 400 μ L，摇匀，放冷，用 0.22 μ m 滤膜滤过，取续滤液，即得。

色谱条件 用十八烷基硅键合硅胶为填充剂（Waters AtlantisTM T3 柱 4.6mm $\times$ 150mm，3 μ m 或效能相当的色谱柱）；以 0.1vol% 三氟乙酸的水溶液为流动相 A，0.1vol% 三氟乙酸的乙腈溶液为流动相 B，按下表进行线性梯度洗脱；流速为每分钟 1.0mL；检测波长为 258nm；柱温为 30℃；进样体积 10 μ L。

时间（分钟）	流动相 A（%）	流动相 B（%）
0	100	0
7	100	0
10	90	10

15	20	80
20	20	80
20.1	100	0
30	100	0

测定法：精密量取尿嘧啶对照品溶液、底物溶液、供试品溶液及空白溶液，分别注入液相色谱仪，记录色谱图，按下式计算效价。

$$f = \frac{C_{\text{对}}}{A_{\text{对}}}$$

$$\text{效价 (单位/ml)} = \frac{(A_i - A_0 - A_{\text{底}}) \times f_{\text{均值}} \times \text{总反应液体积}}{\text{反应时间} \times M} \times n \times 1000$$

式中：

A_i ：供试品溶液中尿嘧啶的峰面积；

A_0 ：空白溶液中尿嘧啶的峰面积；

$A_{\text{底}}$ ：底物溶液中尿嘧啶的峰面积；

$A_{\text{对}}$ ：尿嘧啶对照品溶液中尿嘧啶的峰面积；

$C_{\text{对}}$ ：尿嘧啶对照品溶液中尿嘧啶的浓度 (mg/mL)；

n ：酶储备液的稀释倍数；

M ：尿嘧啶的摩尔质量 (112.09)；

$f_{\text{均值}}$ ： f 的平均值。

效价单位定义：上述条件下，每分钟催化阿糖尿苷生成 1 μmol 尿嘧啶所需的酶量，为 1 个尿嘧啶核苷磷酸化酶活力的单位。

【嘌呤核苷磷酸化酶活力测定方法】

溶液 A 称取磷酸氢二钾三水合物 22.8g，加水 1000mL 使其溶解，即得 0.1mol/L 磷酸氢二钾溶液；称取无水磷酸二氢钾 13.6g，加水 1000mL 使其溶解，即得 0.1mol/L 磷酸二氢钾溶液；采用上述 0.1mol/L 磷酸二氢钾溶液调节 0.1mol/L 磷酸氢二钾溶液的 pH 值至 7.0，即得溶液 A (0.1mol/L 磷酸钾溶液，pH 7.0)。

次黄嘌呤对照品溶液 取对照品次黄嘌呤约 25mg，精密称定，置 100mL 量瓶中，加溶液 A 适量，超声 3 分钟使其溶解，用溶液 A 稀释至刻度，摇匀，精密量取 1mL，置 20mL 量瓶中，用溶液 A 稀释至刻度，摇匀。

底物溶液 取肌苷约 536mg，精密称定，置 50mL 西林瓶中，精确加入 20mL 溶液 A，加入转子，置磁力搅拌水浴锅内 60℃ 水浴预热 10 分钟后，加入 1mL 溶液 A，60℃ 条件下边搅拌边反应 30 分钟后，取出，立即加入 10mol/L 氢氧化钠溶液 3mL，迅速摇匀，再加入 6mol/L 盐酸溶液 4.5mL，摇匀，放冷，用 0.22 μm 滤膜滤过，取续滤液，即得。

酶贮备液 精密量取待测样品 1mL，置 200mL 量瓶中，用溶液 A 稀释至刻度，摇匀。

供试品溶液 取肌苷约 536mg，精密称定，置 50mL 西林瓶中，精确加入 20mL 溶液 A，加入转子，置磁力搅拌水浴锅内 60℃ 水浴预热 10 分钟后，加入酶贮备液 0.1mL，60℃ 条件下边搅拌边反应 30 分钟后，取出，立即加入 10mol/L 氢氧化钠溶液 3mL，迅速摇匀，再加入 6mol/L 盐酸溶液 4.5mL，摇匀，放冷，用 0.22 μm 滤膜滤过，取续滤液，即得。

空白溶液 精确移取 20mL 溶液 A，置 50mL 西林瓶中，加入转子，置磁力搅拌水浴锅内 60℃ 水浴预热 10 分钟后，加入上述酶贮备液 0.1mL，60℃ 条件下边搅拌边反应 30 分钟后，取出，立即加入 10mol/L 氢氧化钠溶液 3mL，迅速摇匀，再加入 6mol/L 盐酸溶液 4.5mL，摇匀，用 0.22 μm 滤膜滤过，取续滤液，即得。

色谱条件 用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂 (Waters Atlantis™ T3 柱 4.6mm×150mm，3 μm 或效能相当的色谱柱)；以 0.1vol% 三氟乙酸的水溶液为流动相 A，0.1vol% 三氟乙酸的乙腈溶液为流动相 B，按下表进行线性梯度洗脱；流速为每分钟 1.0mL；检测波长为 249nm；柱温为 30℃；进样室温度为 10℃；进样体积 10 μL 。

时间 (分钟)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0	100	0
7	100	0
10	90	10
15	20	80

20	20	80
20.1	100	0
30	100	0

测定法：精密量取次黄嘌呤对照品溶液、底物溶液、供试品溶液及空白溶液，分别注入液相色谱仪，记录色谱图，按下式计算效价。

$$f = \frac{C_{\text{对}}}{A_{\text{对}}}$$
$$\text{效价 (单位/ml)} = \frac{(A_i - A_0 - A_{\text{底}}) \times f_{\text{均值}} \times \text{总反应液体积}}{\text{反应时间} \times M \times 0.1} \times n \times 1000$$

式中：

A_i ：供试品溶液中次黄嘌呤的峰面积；

A_0 ：空白溶液中次黄嘌呤的峰面积；

$A_{\text{底}}$ ：底物溶液中次黄嘌呤的峰面积；

$A_{\text{对}}$ ：次黄嘌呤对照品溶液中次黄嘌呤的峰面积；

$C_{\text{对}}$ ：次黄嘌呤对照品溶液中次黄嘌呤的浓度（mg/mL）；

n ：酶储备液的稀释倍数；

M ：次黄嘌呤的摩尔质量（136.11）；

$f_{\text{均值}}$ ： f 的平均值。

效价单位定义：在上述条件下，每分钟催化肌苷生成 1μmol 次黄嘌呤所需的酶量，为 1 个嘌呤核苷磷酸化酶活力的单位。

实施例 1：粗酶液的制备

用接种针从保藏编号为 CCTCC No. M2021490 的重组基因工程菌 7N04 的甘油管中蘸取少量菌液，采用二级发酵，采用摇瓶种子液为一级种子液，然后接入 50L 二级发酵罐，发酵终止后，离心收集菌体并洗涤菌体。

1.1 摇瓶一级种子制备

- (1) 培养基成分：酵母浸粉 2%、氯化钠 0.5%、葡萄糖 0.1%、酵母浸膏 0.5%、玉米浆 0.5%、余量的水。
- (2) 配制与培养

用约 NaOH 溶液调节培养基的 pH 值至 7.0~7.2。将上述培养基分装于 500mL 规格的三角烧瓶中，装量为 100mL。121℃，灭菌 30 分钟。接种量 0.1%，培养温度：35℃，转速：220~230rpm，培养时间：9~10 小时。培养后移种时，OD 大于等于 9，确认无染菌后方可接入二级种子罐。

(3) 种子移种标准

项目	控制要求
外观	浑浊，棕黄色
OD _{600nm}	≥9.0
镜检	短杆状，菌体形态较均一

1.2 二级种子制备

- (1) 培养基成分：酵母浸粉 2%、氯化钠 0.5%、葡萄糖 0.1%、酵母浸膏 0.5%、玉米浆 0.5%、余量的水。
- (2) 配制与培养

用约 NaOH 溶液调节培养基的 pH 值至 7.0~7.2。121℃，灭菌 30 分钟。接种量 0.5%，培养温度：35℃，转速：220~230rpm，培养时间：3~5 小时。培养后移种时，OD 大于等于 9，确认无染菌后方可接入发酵罐。

(3) 种子移种标准

项目	控制要求
外观	浑浊，棕黄色
OD _{600nm}	≥9.0
镜检	短杆状，菌体形态较均一

1.3 发酵罐发酵工艺

(1) 培养基成分：酵母浸粉 4.0%、氯化钠 0.5%、葡萄糖 0.25%、酵母浸膏 0.5%、玉米浆 0.5%、聚醚消泡剂 0.02%（购自江苏斯德瑞克化工有限公司）、余量的水。

(2) 配制

分别称取各种培养基成分于配料桶中，加水搅拌溶解，再转入发酵罐中，用 NaOH 溶液调节培养基的 pH 值至 7.0~7.2。然后在 121~125℃，灭菌 30 分钟。

(3) 发酵罐培养工艺条件

项目	指标
接种量	0.5%
培养温度	35℃
罐压	0.04~0.06 MPa
转速	200~700 转/分
通气量	1.0~2.0v/v/m
溶氧	≥ 30%
培养时间	8~10 小时
pH 值控制	流加 50%的葡萄糖，控制 pH 在 7.5~7.6 范围内。

发酵过程中，用 0.05~0.2mmol/L 异丙基-β-D-硫代半乳糖苷诱导培养。

(4) 放罐指标

项目	控制要求
外观	浑浊，棕褐色
湿菌体浓度	≥12%

1.4 收集菌体

发酵终止后，采用离心收集菌体，离心条件为 4500rpm，15~20min。菌体再用适量蒸馏水洗涤一次。

1.5 粗酶液的制备

反应釜中配制 0.05 mol/L 磷酸氢二钾溶液作为缓冲液，用 0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液调 pH 为 7.0。将菌体和缓冲液按照菌体:缓冲液=1:9 的重量比例，重悬菌体，在 800-1000bar 的压力条件下均质，60℃水浴除去部分杂蛋白得到粗酶液。

实施例 2：粗酶液的制备

用接种针从保藏编号为 CCTCC No. M2021490 的重组基因工程菌 7N04 的甘油管中蘸取少量菌液，采用二级发酵，采用摇瓶种子液为一级种子液，然后接入 50L 二级发酵罐，发酵终止后，离心收集菌体并洗涤菌体。

2.1 摇瓶一级种子制备

(1) 培养基成分：蛋白胨 1.0%、酵母浸粉 0.5%、氯化钠 0.5%、余量的水。

(2) 配制与培养

将上述培养基分装于 500ml 规格的三角烧瓶中，装量为 100ml。121℃，灭菌 30 分钟。接种量 0.1%，培养温度：37℃，转速：220~230rpm，培养时间：6~10 小时。培养后移种时，OD≥3.0，确认无染菌后方可接入二级发酵罐。

(3) 种子移种标准

项目	控制要求
外观	浑浊，棕黄色
OD _{600nm}	≥3.0
镜检	短杆状，菌体形态较均一

2.2 二级种子制备

(1) 培养基成分：蛋白胨 1.0%、酵母浸粉 0.5%、氯化钠 0.5%、余量的水。

(2) 配制与培养

将上述培养基分装于 500ml 规格的三角烧瓶中，装量为 100ml。121℃，灭菌 30 分钟。接种量 0.1%，培养温度：37℃，转速：220~230rpm，培养时间：6~10 小时。培养后移种时，OD≥3.0，确认无染菌后

方可接入二级发酵罐。

(3) 种子移种标准

项目	控制要求
外观	浑浊，棕黄色
OD _{600nm}	≥3.0
镜检	短杆状，菌体形态较均一

2.3 发酵罐发酵工艺

(1) 培养基成分：一水合柠檬酸 0.116%、氯化钾 0.403%、硫酸铵 5.2%、磷酸二氢钠 5.0%、磷酸氢二钠 1.86%、七水硫酸镁 0.104%、氯化钙 0.255%、甘油 3.0%、微量元素溶液 1.0%（其中相对于微量元素溶液的总量，包含：一水合柠檬酸 1.04%、二水合氯化钙 0.522%、七水合硫酸锌 0.206%、一水合硫酸锰 0.406%、五水合硫酸铜 0.811%、六水合氯化钴 0.36%、六水合三氯化铁 1.006%、硼酸 0.003%、钼酸钠 0.002%）、聚醚消泡剂 0.02%、余量的水。

(2) 配制

分别称取各种培养基成分于配料桶中，加水搅拌溶解，再转入发酵罐中，用 NaOH 溶液调节培养基的 pH 值至 6.5~7.0。然后在 121~125℃，灭菌 30 分钟。

(3) 发酵罐培养工艺条件

项目	指标
接种量	5%
培养温度	30-37℃
罐压	0.04~0.06 MPa
转速	200~700 转/分
通气量	1.0~2.0v/v/m
溶氧	≥30%
培养时间	20-30 小时
补料	流加 80%的甘油，进行补料。

发酵过程中，用 0.05-0.2mmol/L 异丙基-β-D-硫代半乳糖苷诱导培养。

(4) 放罐指标

项目	控制要求
外观	浑浊，棕黄色
湿菌体浓度	≥15%

2.4 收集菌体

发酵终止后，采用离心收集菌体，离心条件为 4500rpm，15~20min。菌体再用适量蒸馏水洗涤一次。

2.5 粗酶液的制备

反应釜中配制 0.05 mol/L 磷酸氢二钾溶液作为缓冲液，用 0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液调 pH 为 7.0。将菌体和缓冲液按照菌体：缓冲液=1:9 的重量比例，重悬菌体，在 800-1000bar 的压力条件下均质，60℃水浴除去部分杂蛋白得到粗酶液。

实施例 3：奈拉滨的制备

在反应釜中用 0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液调 pH 为 7.0，加入底物 2-氨基-6-甲氧基嘌呤 8g/L 和阿糖尿苷 16g/L，升温至 50~60℃溶解，控制所得料液的温度为 55℃，加入嘌呤核苷磷酸化酶活力为 3000U/mL 粗酶液，进行生物转化反应，转速 100~180 rpm，反应约 3h，反应达到平衡，转化率达到 95.5%。

反应液静置沉淀，离心收集上层清液后调 pH 至 4.5，用蒸馏水洗涤、抽滤、离心得到固形物，合并离心得到的上清液和滤液，所得液体以 9~12mL/分钟速度经过大孔树脂柱进行吸附上柱（1g 样品/60mL 树脂）。吸附完毕后，用 6 倍树脂体积、pH 值为 10.84（用氨水调节 pH 值）的去离子水进行洗涤，再用 6 倍树脂体积的 20%乙醇进行解析。解析液在 50~55℃下真空减压浓缩约 18~20 倍，然后降至室温，然后 4~6℃低温结晶，搅拌 12 小时左右结晶，过滤，50℃真空干燥 3~4 小时，得到奈拉滨粗品，收率为 85%。

用无水甲醇将奈拉滨粗品在 60℃温度下重结晶，得到奈拉滨结晶粉末，过滤干燥得到成品奈拉滨，HPLC 纯度 98%以上，收率为 80%。

实施例 4：奈拉滨的制备

在反应釜中用 0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液调 pH 为 7.0, 加入底物 2-氨基-6-甲氧基嘌呤 13g/L 和阿糖尿苷 26g/L, 升温至 50~60℃溶解, 控制所得料液的温度为 55℃, 加入嘌呤核苷磷酸化酶活力为 600U/mL 粗酶液, 进行生物转化反应, 转速 100~180 rpm, 反应约 24~48h, 反应达到平衡, 转化率达到 95.6%。

反应液静置沉淀, 离心收集上层清液后调 pH 至 4.5, 用蒸馏水洗涤、抽滤、离心得到固形物, 合并离心得到的上清液和滤液, 所得液体以 9~12mL/分钟速度经过大孔树脂柱进行吸附上柱 (1g 样品/60mL 树脂)。吸附完毕后, 用 6 倍树脂体积、pH 值为 10.84 (用氨水调节 pH 值) 的去离子水进行洗涤, 再用 6 倍树脂体积的 20%乙醇进行解析。解析液在 50~55℃下真空减压浓缩约 18~20 倍, 然后降至室温, 然后 4~6℃低温结晶, 搅拌 12 小时左右结晶, 过滤, 50℃真空干燥 3~4 小时, 得到奈拉滨粗品, 收率为 86%。

用无水甲醇将奈拉滨粗品在 60℃温度下重结晶, 得到奈拉滨结晶粉末, 过滤干燥得到成品奈拉滨, HPLC 纯度 98%以上, 收率为 81%。

为了描述和公开的目的, 以引用的方式将所有的专利、专利申请和其它已确定的出版物在此明确地并入本文。这些出版物仅因为它们的公开早于本申请的申请日而提供。所有关于这些文件的日期或这些文件的内容的表述是基于申请者可得的信息, 并且不构成任何关于这些文件的日期或这些文件的内容的正确性的承认。而且, 在任何国家, 在本文中对这些出版物的任何引用并不构成关于该出版物成为本领域的公知常识的一部分的认可。

本领域技术人员将认识到, 本公开的范围并不限于上文描述的各种具体实施方式和实施例, 而是能够在不脱离本公开的精神和构思的情况下, 进行各种修改、替换、或重新组合, 这都落入了本公开的保护范围内。

权利要求书

1. 用于制备奈拉滨的重组基因工程菌 7N04, 其中, 所述重组基因工程菌 7N04 为含有共表达尿嘧啶核苷磷酸化酶和嘌呤核苷磷酸化酶的基因的大肠埃希氏菌, 保藏编号为 CCTCC No. M2021490。
2. 权利要求 1 所述的重组基因工程菌 7N04, 其中, 所述重组基因工程菌处于湿菌体的形式, 所述湿菌体通过接种重组基因工程菌 7N04, 发酵培养, 发酵终止后收集得到, 所述的湿菌体中尿嘧啶核苷磷酸化酶活性和嘌呤核苷磷酸化酶活性的比值为 1:1~1:3;
或者, 所述湿菌体中尿嘧啶核苷磷酸化酶活性为 750~800U/mL 湿菌体, 嘌呤核苷磷酸化酶活性为 1750~1850U/mL 湿菌体。
3. 权利要求 1 或 2 所述的重组基因工程菌 7N04, 其中, 所述重组基因工程菌 7N04 在其基因组中整合有共表达尿嘧啶核苷磷酸化酶(UPase)和嘌呤核苷磷酸化酶(PNPase)的基因; 或者
所述重组基因工程菌 7N04 包含含有共表达尿嘧啶核苷磷酸化酶(UPase)和嘌呤核苷磷酸化酶(PNPase)的基因的重组质粒。
4. 一种微生物制剂, 包含权利要求 1-3 任一项所述的重组基因工程菌 7N04 的湿菌体。
5. 一种含有粗酶液的生物酶催化剂, 所述生物酶催化剂应用权利要求 1-3 任一项所述的重组基因工程菌 7N04 得到。
6. 权利要求 5 所述的生物酶催化剂, 其中, 所述的粗酶液中尿嘧啶核苷磷酸化酶活性和嘌呤核苷磷酸化酶活性的比值为 1:1~1:3;
或者, 所述的粗酶液中尿嘧啶核苷磷酸化酶活性为 800~900U/mL 粗酶液, 嘌呤核苷磷酸化酶活性为 1800~1900U/mL 粗酶液。
7. 权利要求 5 或 6 所述的生物酶催化剂, 其中, 所述的生物酶催化剂中尿嘧啶核苷磷酸化酶活性和嘌呤核苷磷酸化酶活性的比值为 1:1~1:3;
或者, 所述的生物酶催化剂中尿嘧啶核苷磷酸化酶活性为 100~6000U/mL 生物酶催化剂, 嘌呤核苷磷酸化酶活性为 200~12000U/mL 生物酶催化剂。
8. 一种制备权利要求 5-7 任一项所述的生物酶催化剂的方法, 包括:
(1) 接种权利要求 1-3 任一项所述的重组基因工程菌 7N04, 发酵培养, 发酵过程中用诱导剂诱导蛋白表达, 发酵终止后收集菌体;
(2) 用磷酸盐缓冲液重悬菌体后高压均质, 高温除杂得到含有粗酶液的生物酶催化剂。
9. 权利要求 8 所述的方法, 其中, 所述的生物酶催化剂还包括粗酶液进一步浓缩、稀释得到的酶液、或进一步冻干形成的粗酶粉、或进一步与固定化树脂结合形成的固定化酶。
10. 一种制备奈拉滨的方法, 包括: 以 2-氨基-6-甲氧基嘌呤和阿糖尿苷为底物, 加入权利要求 5-7 任一项所述生物酶催化剂, 在磷酸盐缓冲液中进行生物转化反应, 分离纯化得到奈拉滨;
或者, 包括:
(1) 接种权利要求 1-3 任一项所述的保藏编号为 CCTCC No. M2021490 的重组基因工程菌 7N04, 发酵培养, 发酵过程中用诱导剂诱导蛋白表达, 发酵终止后收集菌体;
(2) 用磷酸盐缓冲液重悬菌体后高压均质, 高温除杂得到含有粗酶液的生物酶催化剂;
(3) 以 2-氨基-6-甲氧基嘌呤和阿糖尿苷为底物, 在磷酸盐缓冲液中加入生物酶催化剂, 进行生物转化反应, 分离纯化合成奈拉滨。
11. 权利要求 10 所述的方法, 其中, 所述高压均质的压力为 600-1200bar;
或者, 所述高温除杂的温度为 50~70℃。
12. 权利要求 10 或 11 所述的方法, 其中, 所述磷酸盐缓冲液包括磷酸二氢盐及其共轭碱磷酸氢二盐的溶液, 优选为磷酸氢二钾和磷酸二氢钾的溶液;
任选地, 所述磷酸盐缓冲液 pH 为 6.5~8.0 或 6.8~8.0;
任选地, 步骤(2)中菌体与磷酸盐缓冲液的重量比例为 1:5~1:10。
13. 权利要求 10-12 任一项所述的方法, 其中, 所述生物转化反应的温度为 50~85℃;
或者, 所述生物转化反应的转速为 60~500rpm。
14. 权利要求 10-13 任一项所述的方法, 其中, 所述 2-氨基-6-甲氧基嘌呤的浓度为 5~35 g/L, 阿糖尿苷的浓度为 10~70 g/L;
或者, 底物 2-氨基-6-甲氧基嘌呤与阿糖尿苷的投料量的摩尔比为 1:1~1:3。

15. 权利要求 1-3 任一项所述的重组基因工程菌、权利要求 4 所述的微生物制剂或权利要求 5-7 任一项所述的生物酶催化剂用于制备奈拉滨的用途。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/097869

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12P 19/38(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i; C12N 15/31(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)

C12P; C12N

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)

DWPI; CNABS; CNTXT; CNKI; WOTXT; USTXT; EPTXT; 万方, WANFANG; 百度学术, BAIDU SCHOLAR; BING; Pubmed; CJFD; VEN; ENTXTC: 尿嘧啶核苷磷酸化酶, 大肠杆菌, 嘌呤核苷磷酸化酶, upase, pnpase, e.coli, arranon, nelarabine, synthesis, ara-G, 正大天晴, 张传志, 黄文龙, 王蓓华, 王光明, 于敏, 夏春光, 磷酸化酶, TP, PNP, UP

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 101067145 A (FUDAN UNIVERSITY) 07 November 2007 (2007-11-07) entire document	1-15
A	CN 1020107 C (THE WELLCOME FOUNDATION LTD.) 17 March 1993 (1993-03-17) entire document	1-15
A	US 5424295 A (BURROUGHS WELLCOME & CO.) 13 June 1995 (1995-06-13) entire document	1-15
A	CN 102250178 A (JIANGSU CHIA TAI TIANQING PHARMACEUTICAL GROUP CO., LTD.) 23 November 2011 (2011-11-23) entire document	1-15
A	CN 101348511 A (JIANGSU CHIA TAI TIANQING PHARMACEUTICAL GROUP CO., LTD.) 21 January 2009 (2009-01-21) entire document	1-15
A	CN 101092441 A (BENCAOTIANYUAN MEDICINES ACADEMY OF BEIJING) 26 December 2007 (2007-12-26) entire document	1-15



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“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)

“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

“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

“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

“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

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

08 August 2022

Date of mailing of the international search report

31 August 2022

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)

No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing
100088, China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/097869

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WEI, Xiaokun et al. "Two-step Enzymatic Synthesis of Guanine Arabinoside." <i>Chinese Journal of Chemical Engineering.</i> , Vol. 16, No. 6, 31 December 2008 (2008-12-31), pages 934-937	1-15
A	BARAI, V. N. et al. "A Universal Biocatalyst for the Preparation of Base- and Sugar-Modified Nucleosides via an Enzymatic Transglycosylation." <i>HELVETICA CHIMICA ACTA.</i> , Vol. 85, 31 December 2002 (2002-12-31), pages 1901-1908	1-15
A	梁平等 (LIANG, Ping et al.). "奈拉滨的合成研究进展. (Progress on Synthesis of Nelarabine.)" <i>精细化工中间体 (Fine Chemical Intermediates).</i> , Vol. 38, No. 5, 31 October 2008 (2008-10-31), pages 8-10	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2022/097869

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	101067145	A	07 November 2007	None			
CN	1020107	C	17 March 1993	EP	0294114	A2	07 December 1988
				US	5424295	A	13 June 1995
				GR	3021257	T3	31 January 1997
				ES	2091750	T3	16 November 1996
				HU	895829	D0	28 January 1990
				NO	882357	D0	27 May 1988
				PT	87592	A	31 May 1989
				PL	272729	A1	06 February 1989
				CS	8803635	A2	12 September 1990
				MY	103567	A	28 August 1993
				HK	78497	A	20 June 1997
				NL	300302	I1	02 January 2008
				SA	99200688	A	03 December 2005
				DE	122008000003	I1	17 April 2008
				FI	882511	A0	27 May 1988
				ZA	897598	B	31 January 1990
				IL	86531	D0	15 November 1988
				GB	8712745	D0	01 July 1987
				LU	91370	I2	10 December 2007
				CY	2001	A	05 December 1997
				US	5539098	A	23 July 1996
				JP	S63310831	A	19 December 1988
				DD	282694	A5	19 September 1990
				NO	2007016	I1	14 January 2008
				AU	1671888	A	01 December 1988
				CN	1031233	A	22 February 1989
				HU	T47129	A	30 January 1989
				CA	1330990	C	26 July 1994
				ZA	8907598	B	31 January 1990
				NZ	224813	A	26 April 1991
				DE	3855522	D1	17 October 1996
				DK	289788	D0	27 May 1988
				DD	293962	A5	19 September 1991
				PH	27292	A	04 May 1993
				ZA	883829	B	31 January 1990
				KR	880013967	A	22 December 1988
				ZA	8803829	B	31 January 1990
				MC	1935	A1	19 May 1989
				AT	142636	T	15 September 1996
US	5424295	A	13 June 1995	EP	0294114	A2	07 December 1988
				GR	3021257	T3	31 January 1997
				ES	2091750	T3	16 November 1996
				HU	895829	D0	28 January 1990
				NO	882357	D0	27 May 1988
				PT	87592	A	31 May 1989
				PL	272729	A1	06 February 1989
				CS	8803635	A2	12 September 1990
				MY	103567	A	28 August 1993
				HK	78497	A	20 June 1997

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2022/097869

Patent document cited in search report				Publication date (day/month/year)		Patent family member(s)		Publication date (day/month/year)	
				NL	300302	I1		02 January 2008	
				SA	99200688	A		03 December 2005	
				DE	122008000003	I1		17 April 2008	
				FI	882511	A0		27 May 1988	
				ZA	897598	B		31 January 1990	
				IL	86531	D0		15 November 1988	
				GB	8712745	D0		01 July 1987	
				LU	91370	I2		10 December 2007	
				CY	2001	A		05 December 1997	
				US	5539098	A		23 July 1996	
				JP	S63310831	A		19 December 1988	
				DD	282694	A5		19 September 1990	
				NO	2007016	I1		14 January 2008	
				AU	1671888	A		01 December 1988	
				CN	1031233	A		22 February 1989	
				HU	T47129	A		30 January 1989	
				CA	1330990	C		26 July 1994	
				ZA	8907598	B		31 January 1990	
				NZ	224813	A		26 April 1991	
				DE	3855522	D1		17 October 1996	
				DK	289788	D0		27 May 1988	
				DD	293962	A5		19 September 1991	
				PH	27292	A		04 May 1993	
				ZA	883829	B		31 January 1990	
				KR	880013967	A		22 December 1988	
				ZA	8803829	B		31 January 1990	
				MC	1935	A1		19 May 1989	
				AT	142636	T		15 September 1996	
CN	102250178	A	23 November 2011	CN	101092441	A		26 December 2007	
				CN	101348511	A		21 January 2009	
CN	101348511	A	21 January 2009	CN	101092441	A		26 December 2007	
				CN	102250178	A		23 November 2011	
CN	101092441	A	26 December 2007	CN	102250178	A		23 November 2011	
				CN	101348511	A		21 January 2009	

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2022/097869

A. 主题的分类

C12P 19/38 (2006.01) i; C12N 15/63 (2006.01) i; C12N 15/31 (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)

C12P; C12N

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))

DWPI; CNABS; CNTXT; CNKI; WOTXT; USTXT; EPTXT; 万方; 百度学术; BING; Pubmed; CJFD; VEN; ENTXTC; 尿嘧啶核苷磷酸化酶, 大肠杆菌, 嘌呤核苷磷酸化酶, upase, pnpase, e. coli, arranon, nelarabine, synthesis, ara-G, 正大天晴, 张传志, 黄文龙, 王蓓华, 王光明, 于敏, 夏春光, 磷酸化酶, TP, PNP, UP

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 101067145 A (复旦大学) 2007年11月7日 (2007 - 11 - 07) 全文	1-15
A	CN 1020107 C (惠尔康基金会集团公司) 1993年3月17日 (1993 - 03 - 17) 全文	1-15
A	US 5424295 A (BURROUGHS WELLCOME CO.) 1995年6月13日 (1995 - 06 - 13) 全文	1-15
A	CN 102250178 A (江苏正大天晴药业股份有限公司) 2011年11月23日 (2011 - 11 - 23) 全文	1-15
A	CN 101348511 A (江苏正大天晴药业股份有限公司) 2009年1月21日 (2009 - 01 - 21) 全文	1-15
A	CN 101092441 A (北京本草天源药物研究院) 2007年12月26日 (2007 - 12 - 26) 全文	1-15
A	WEI, X.K. 等. "Two-step Enzymatic Synthesis of Guanine Arabinoside." Chinese Journal of Chemical Engineering., 第16卷, 第6期, 2008年12月31日 (2008 - 12 - 31), 第934-937页	1-15

☒ 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

2022年8月8日

国际检索报告邮寄日期

2022年8月31日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局 (ISA/CN)

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

周茂新

电话号码 86-(10)-53961922

C. 相关文件		
类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	BARAI, V.N. 等. "A Universal Biocatalyst for the Preparation of Base- and Su- gar-Modified Nucleosides via an Enzymatic Transglycosylation." HELVETICA CHIMICA ACTA., 第85卷, 2002年12月31日 (2002 - 12 - 31), 第1901-1908页	1-15
A	梁平等. "奈拉滨的合成研究进展." 精细化工中间体., 第38卷, 第5期, 2008年10月31日 (2008 - 10 - 31), 第8-10页	1-15

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2022/097869

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	101067145	A	2007年11月7日	无			
CN	1020107	C	1993年3月17日	EP	0294114	A2	1988年12月7日
				US	5424295	A	1995年6月13日
				GR	3021257	T3	1997年1月31日
				ES	2091750	T3	1996年11月16日
				HU	895829	D0	1990年1月28日
				NO	882357	D0	1988年5月27日
				PT	87592	A	1989年5月31日
				PL	272729	A1	1989年2月6日
				CS	8803635	A2	1990年9月12日
				MY	103567	A	1993年8月28日
				HK	78497	A	1997年6月20日
				NL	300302	I1	2008年1月2日
				SA	99200688	A	2005年12月3日
				DE	122008000003	I1	2008年4月17日
				FI	882511	A0	1988年5月27日
				ZA	897598	B	1990年1月31日
				IL	86531	D0	1988年11月15日
				GB	8712745	D0	1987年7月1日
				LU	91370	I2	2007年12月10日
				CY	2001	A	1997年12月5日
				US	5539098	A	1996年7月23日
				JP	S63310831	A	1988年12月19日
				DD	282694	A5	1990年9月19日
				NO	2007016	I1	2008年1月14日
				AU	1671888	A	1988年12月1日
				CN	1031233	A	1989年2月22日
				HU	T47129	A	1989年1月30日
				CA	1330990	C	1994年7月26日
				ZA	8907598	B	1990年1月31日
				NZ	224813	A	1991年4月26日
				DE	3855522	D1	1996年10月17日
				DK	289788	D0	1988年5月27日
				DD	293962	A5	1991年9月19日
				PH	27292	A	1993年5月4日
				ZA	883829	B	1990年1月31日
				KR	880013967	A	1988年12月22日
				ZA	8803829	B	1990年1月31日
				MC	1935	A1	1989年5月19日
				AT	142636	T	1996年9月15日
US	5424295	A	1995年6月13日	EP	0294114	A2	1988年12月7日
				GR	3021257	T3	1997年1月31日
				ES	2091750	T3	1996年11月16日
				HU	895829	D0	1990年1月28日
				NO	882357	D0	1988年5月27日
				PT	87592	A	1989年5月31日
				PL	272729	A1	1989年2月6日
				CS	8803635	A2	1990年9月12日
				MY	103567	A	1993年8月28日
				HK	78497	A	1997年6月20日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2022/097869

检索报告引用的专利文件				公布日 (年/月/日)		同族专利		公布日 (年/月/日)	
				NL	300302	I1		2008年1月2日	
				SA	99200688	A		2005年12月3日	
				DE	122008000003	I1		2008年4月17日	
				FI	882511	A0		1988年5月27日	
				ZA	897598	B		1990年1月31日	
				IL	86531	D0		1988年11月15日	
				GB	8712745	D0		1987年7月1日	
				LU	91370	I2		2007年12月10日	
				CY	2001	A		1997年12月5日	
				US	5539098	A		1996年7月23日	
				JP	S63310831	A		1988年12月19日	
				DD	282694	A5		1990年9月19日	
				NO	2007016	I1		2008年1月14日	
				AU	1671888	A		1988年12月1日	
				CN	1031233	A		1989年2月22日	
				HU	T47129	A		1989年1月30日	
				CA	1330990	C		1994年7月26日	
				ZA	8907598	B		1990年1月31日	
				NZ	224813	A		1991年4月26日	
				DE	3855522	D1		1996年10月17日	
				DK	289788	D0		1988年5月27日	
				DD	293962	A5		1991年9月19日	
				PH	27292	A		1993年5月4日	
				ZA	883829	B		1990年1月31日	
				KR	880013967	A		1988年12月22日	
				ZA	8803829	B		1990年1月31日	
				MC	1935	A1		1989年5月19日	
				AT	142636	T		1996年9月15日	
CN	102250178	A	2011年11月23日	CN	101092441	A		2007年12月26日	
				CN	101348511	A		2009年1月21日	
CN	101348511	A	2009年1月21日	CN	101092441	A		2007年12月26日	
				CN	102250178	A		2011年11月23日	
CN	101092441	A	2007年12月26日	CN	102250178	A		2011年11月23日	
				CN	101348511	A		2009年1月21日	