

# POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

157935



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY  
A OBJEVY

Přihlášeno 21. I. 1972 (PV 419-72)

Zveřejněno 22. I. 1974

Vydáno 15. V. 1975

MPT A 61 k 19/00

PT 6 a 22

MDT 577.155

Autor vynálezu RNDr. ALOIS ČIHÁK, CSc., a MUDr. JIŘÍ VESELÝ, CSc., PRAHA

**Způsob přípravy vysoce aktivního a termostabilního preparátu jaterní uridin-kinasy pro enzymatickou syntézu radioaktivních nukleosid 5'-fosfátů pyrimidinové řady**

1

Vynález se týká způsobu přípravy vysoce aktivního a termostabilního preparátu jaterní uridin-kinasy pro enzymatickou syntézu radioaktivních nukleosid 5'-fosfátů z pyrimidinové řady.

Jaterní uridin-kinasa má významnou funkci v řadě biologických procesů v živých buňkách, zejména v souvislosti s biosyntézou a metabolismem nukleových kyselin.

Uridin-kinasa se jeví jako velmi výhodný systém pro enzymatickou přípravu nukleosid 5'-fosfátů, které jsou důležitým meziproduktem při syntéze modelových polynukleotidů. K tomuto účelu se pak nejčastěji používá radioaktivních nukleosid 5'-fosfátů s vysokou specifickou radioaktivitou.

Studium těchto biochemických pochodů je nezbytné pro poznání a výzkum živé hmoty včetně narušených regulačních procesů, které se vyskytují v průběhu nádorového růstu.

Enzymatická syntéza radioaktivních nukleosid 5'-fosfátů má četné přednosti oproti jejich chemické syntéze.

a) několikastupňovou organickou syntézou je možno nahradit jedinou reakcí radioaktivního substrátu s donorem fosfátové skupiny za katalýzy vhodného enzymatického preparátu;

b) tento preparát je možno připravit s vy-

2

sokou enzymatickou aktivitou, popřípadě v dostatečně purifikovaném stavu, takže reakce pak probíhá řízeně a ve prospěch tvorby žádaného produktu;

c) metody izolace produktů jsou ve srovnání s organickou syntézou podstatně jednodušší.

Nepurifikovaného jaterního bezbuněčného extraktu obsahujícího uridin-kinasu lze použít jak v případě přirozených pyrimidinových nukleosidů při jejich transformaci na příslušné 5'-fosfáty, tak v případě anomálních, chemicky syntetizovaných jejich analogů.

Nejčastěji dosud používaným zdrojem uridin-kinasy jsou bakteriální buňky *Escherichia coli* B, buňky z Ehrlichova ascitického tumoru nebo jiných nádorů. Normální játra, neovlivněná vnějším zásahem, vykazují ve srovnání shora uvedenými zdroji uridin-kinasy její nižší aktivitu.

Podstatou způsobu přípravy vysoce aktivního a termostabilního preparátu jaterní uridin-kinasy podle vynálezu je, že se získá z živého organismu s výhodou z jater krysích samců po předchozí intraperitoneální aplikaci 5'-azacytidinu.

Uvedeného způsobu lze s výhodou použít u krysa, a to tak, že 5'-azacytidin se aplikuje do živého organismu ve fyziologickém roz-

toku v množství 5 až 15  $\mu\text{mol}$  na 100 g živé váhy zvířete, a to buď jednorázově, nebo opakovaně v 24 hodinových intervalech. Tento efekt nenastává po podání jiných, 5-azacytidinu strukturálně příbuzných látek, ani po podání četných dalších, biologicky vysoce účinných látek. Ke zvýšení aktivity uridin kinasy, provázené její zvýšenou termmostabilitou, dochází pravděpodobně v důsledku zásahu 5-azacytidinu do aktivity jaterních degeneračních systémů.

Obecnost a široké použití jaterní uridin kinasy vyplývá nejen z nízké substrátové specifity enzymu, ale rovněž ze skutečnosti, že změnou koncentrace některých složek inkubované směsi [například ATP, enzymu] lze regulovat průběh reakce ve směru tvorby požadovaného radioaktivního nukleotidu. Enzymatickou reakcí vzniká jednoduchá směs produktů, které jsou a) zužitkovány komerčními produkty, b) lze je izolovat metodami papírové chromatografie o chromatografické čistotě min. 96–98 %.

Dále jsou uvedeny příklady získávání a použití jaterní uridin kinasy.

#### Příklad 1

Čtyřem krysím samcům o váze 180–200 gramů bylo podáno intraperitoneální cestou 10  $\mu\text{mol}$  5-azacytidinu na 100 g živé váhy zvířat jednorázově. Po 24 hodinách působení byla zvířata utracena, odebrána jejich játra a homogenisována za chlazení 0–4 °C ve skleněném homogenisátoru s těsným teflonovým páskem poháněným elektrickým motorkem (600–900 ot/min) se třemi váhovními objemy 0,25 M Tris — HCl pufru o pH 7,5–7,8 s 25 mM KCl a 5 mM  $\text{Mg}^{2+}$  — ionty. Homogenát byl odstředěn (10 000 ot/min, 20 minut, 2 °C) a tuhu zbavený supernatant byl použit jako zdroj uridin kinasy. (Získaný preparát lze uchovávat bez výraznějšího poklesu enzymové aktivity 6–8 týdnů při –10 až –15 °C).

Při přípravě purifikované jaterní uridin kinasy prosté uridin fosforylasy a uridin monofosfát kinasy se vychází ze shora uvedeného nepurifikovaného jaterního bezbuněčného extraktu. Další průběh purifikace je shodný s dříve popsáním postupem podle A. Orengo [J. Biol. Chem. 244, 2204/1969] a J. Veselého a kol. (Int. J. Cancer 8, 310/1971).

Na obr. 1, 2 a 3 jsou dále graficky znázorněny údaje, které charakterisují získaný enzymatický preparát ve srovnání s aktivitou uridin kinasy přítomné v normálních kontrolních játrech.

Na obr. 1 je znázorněn vzrůst aktivity jaterní uridin kinasy po opakovaném podání 5-azacytidinu krysím samcům v dávce 6  $\mu\text{mol}/100$  g živé váhy zvířete. Na vodorovné ose je znázorněn čas, při kterém byl pokusným zvířatům intraperitoneálně aplikován 5-azacytidin (šipky) a na svislé ose je vyjádřena aktivita uridin kinasy v m  $\mu\text{mol}$  6-a-

zauridin 5'-fosfátu (tj. 6Az UMP), vznikajícího v průběhu 5 minutové inkubace při 37 °C z 20 m  $\mu\text{mol}$  6-azauridinu jako substrátu s příslušným jaterním bezbuněčným extraktem obsahujícím uridin kinasu. Tak například v 72 hodině po působení 5-azacytidinu dochází k 50%ní přeměně 6-azauridinu jako substrátu na příslušný 5'-monofosfát (tj. 6 — Az UMP) (černé body), přičemž u kontrolních zvířat (bílé body) dochází za stejných podmínek pouze k 5%ní přeměně.

Na obr. 2 je znázorněn časový průběh jaterní uridin kinasy při měření její aktivity v bezbuněčném jaterním extraktu se 6-azauridinem jako substrátem.

Na vodorovné ose je znázorněna délka inkubace při 37 °C v minutách a na svislé ose je vyjádřena aktivita uridin kinasy v m  $\mu\text{mol}$  6-Az UMP vznikajícího z 20 m  $\mu\text{mol}$  6-azauridinu.

Na obr. 3 je graficky znázorněna rozdílná termmostabilita uridin kinasy získané z jater kontrolních zvířat (bílé body) a ze zvířat, kterým byl *in vivo* aplikován 5-azacytidin (černé body). Na vodorovné ose je znázorněna teplota v °C, při které byl enzymatický preparát 20 minut zahříván před stanovením zbylé aktivity uridin kinasy.

Aktivita uridin kinasy (vyjádřená na svislé ose v % původní enzymatické aktivity naměřené před termální aktivací) byla stanovena v průběhu 5 minutové inkubace při 37 °C a 20 m  $\mu\text{mol}$  6-azauridinem jako substrátem. Tak například 20 minutové zahřátí při 50 °C má u uridin kinasy z kontrolních zvířat (bílé body) za následek úplnou ztrátu enzymové aktivity. Přitom uridin kinasa ze zvířat vystavených účinku 5-azacytidinu (černé body) si podržuje kolem 80 % původní enzymatické aktivity.

Tabulky I.—III. obsahují příklady použití enzymatické přeměny radioaktivních nukleosidů na příslušné 5'-fosfáty.

Tabulka I je příkladem na metabolickou přeměnu radioaktivního uridinu na příslušné uridin 5'-fosfáty za použití nepurifikovaného jaterního extraktu s uridin kinasou.

Tabulka II je příkladem na metabolickou přeměnu radioaktivního 6-azauridinu na 6-azauridin 5'-monofosfát za použití nepurifikovaného jaterního extraktu s uridin kinasou.

Tabulka III je příkladem na metabolickou přeměnu radioaktivního uridinu na uridin 5'-monofosfát za použití částečně purifikované jaterní uridin kinasy.

Podle těchto tabulek se při použití nepurifikovaného jaterního extraktu s vhodným donorem fosfátové skupiny (adensin 5'-trifosfát) se tvoří převážně 5' trifosfát příslušného radioaktivního nukleosidu (podle tabulky I.).

Při použití anomálního radioaktivního nukleosidu (například 6-azauridinu viz tabulka II) se tvoří pouze příslušný 5'-monofosfát.

Purifikovaný preparát jaterní uridin kina-

sy vede za stejných podmínek pouze ke vzniku příslušných 5'-monofosfátů a za optimálních podmínek až k 85–95 % přeměně. [Tabulka III.].

Přednosti uridin kinasy získané z jater živých organismů podle vynálezu je její vy-

soká enzymatická aktivita již v nepurifikovaném bezbuněčném jaterním extraktu. Získaný preparát vykazuje zvýšenou odolnost při zacházení za vyšších teplot, což usnadňuje jeho použitelnost v provozních podmínkách.

Tabulka 1

**Metabolická přeměna radioaktivního uridinu na příslušné uridin 5'-fosfáty za použití nepurifikovaného jaterního extraktu s uridin kinasou**

**Složení inkubační směsi**

0,1 mM uridin-2-<sup>14</sup>C

5 mM adenosin 5'-trifosfát (ATP)

2,5 mM Mg<sup>2+</sup> — ionty

0,2 ml jaterního bezbuněčného extraktu v celkovém objemu 1 ml inkubační směsi; inkubace 10 minut při 37 °C v 0,04 M Tris-HCl pufru o pH 7,4.

Jaterní bezbuněčný extrakt	Nezreagovaný uridin m μmol	Uridin 5'-monofosfát m μmol	Uridin 5'-trifosfát m μmol	Uracil m μmol
Kontrolní	47,2	14,2	10,6 (100 %)	18,0
Po 24 hod. působení 5-azacytidinu <i>in vivo</i> (10 μmol/100 g)	43,0	11,1	29,7 (280 %)	16,2

Rozdělení produktů vznikajících v inkubační směsi bylo provedeno papírovou chromatografií 20 hod. dělením na papíře Whatman č. 1 v soustavě kyselina isomáselná — hydroxid amonný — voda (66 : 1,5 : 33)

Tabulka II

**Metabolická přeměna radioaktivního 6-azauridinu na 6-azauridin 5'-monofosfát za použití nepurifikovaného jaterního extraktu s uridin kinasou**

**Složení inkubační směsi**

0,02 mM 6-azauridin-4,5-<sup>14</sup>C

1 mM adenosin 5'-trifosfát (ATP)

1 mM Mg<sup>2+</sup> — ionty

0,2 ml jaterního bezbuněčného extraktu v celkovém objemu 1 ml inkubační směsi; inkubace 10 min při 37 °C v 0,04 M Tris-HCl pufru o pH 7,4.

Jaterní bezbuněčný extrakt	6-Azauridin m μmol	6-Azauridin-5'-mono-fosfát m μmol
Kontrolní	17,1	2,9 (100 %)
Po 24 hod. působení 5-azacytidinu <i>in vivo</i> (10 μmol/100 g)	12,9	7,1 (245 %)

Tabulka III

**Metabolická přeměna radioaktivního uridinu na uridin 5'-monofosfát za použití částečně purifikované jaterní uridin kinasy**

**Složení inkubační směsi**

0,02 mM uridin-2-<sup>14</sup>C

1 mM adenosin 5'-trifosfát (ATP)

1 mM Mg<sup>2+</sup> — ionty

50 mg proteinů purifikované frakce v celkovém objemu 0,5 ml inkubační směsi; inkubace 10 min. při 37 °C v 0,06 M Tris-HCl pufru o pH 7,5

Uridin kinasa purifikovaná z	Nezreagovaný uridin m μmol	Uridin 5'-monofosfát m μmol	Uridin 5'-trifosfát m μmol	Uracil m μmol
kontrolních krys	16,2	3,7 (100 %)	0,1	0
Po 24 hod. působení 5-azacytidinu u krys (10 μmol/100 g)	8,5	11,3 (305 %)	0,1	0,1

Prodloužením času (například 30 min. inkubace) a přidáním většího množství enzymaticky aktivního proteinu (například 100  $\mu$ g) lze získat až 85–95 % přeměnu na uridin 5'-monofosfát.

## P R E D M Ě T V Y N Á L E Z U

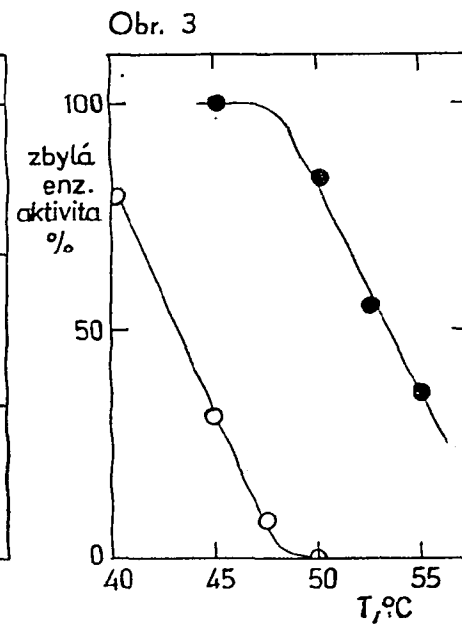
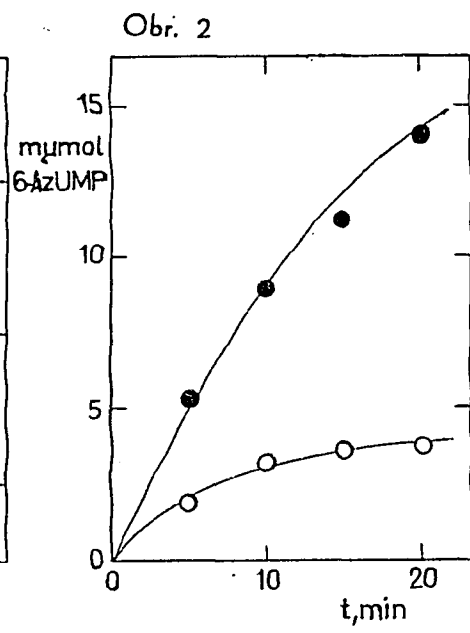
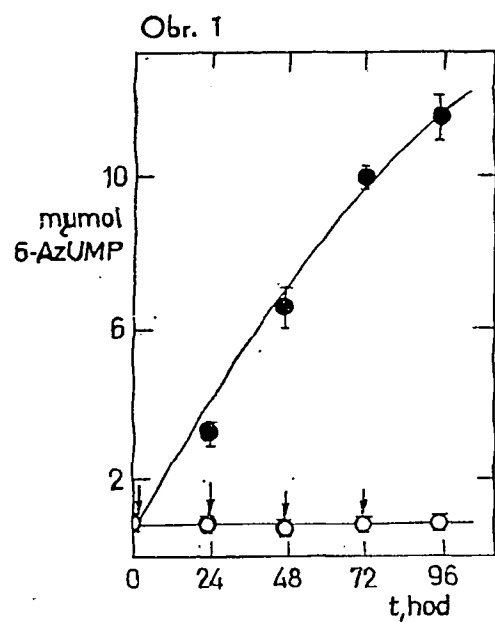
1. Způsob přípravy vysoce aktivního a termostabilního preparátu jaterní uridin-kinasy pro enzymatickou syntézu radioaktivních nukleosidů 5'-fosfátů pyrimidinové řady, vyznačený tím, že se získává z živého organismu s výhodou z jater kryšich samců po předchozí intraperitoneální aplikaci 5-azacytidinu.

2. Způsob přípravy podle bodu 1, vyznačený tím, že 5-azacytidin se aplikuje do živého organismu ve fyziologickém roztoku v množství 5–15  $\mu$ mol na 100 g živé váhy zvířete, a to buď jednorázově, nebo opakovaně v 24 hodinových intervalech.

---

1 list výkresů

---



○ Kontrola  
 ● Po působení 5-azacytidinu