

CS 790 7471

CESKOSLOVENSKÁ
SOCIALISTICKÁ
REPUBLIKA

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

166342



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

Přihlášeno 15. I. 1973 (PV 318-73)

Zveřejněno 10. VI. 1975

Vydáno 15. XII. 1976

Int. Cl.²
C 07 D 51/52

MDT
547.95

Autor vynálezu Ing. JIŘÍ FILIP, CSc., dr. JIŘÍ VESELÝ, CSc.,
a dr. ALOIS ČIHÁK, CSc., PRAHA

Způsob přípravy thymidin-5'-monofosfátů značených tritiem s vysokou specifickou aktivitou

1

Předmětem vynálezu je způsob přípravy thymidin-5'-monofosfátů značených tritiem. Dosud známé metody přípravy nukleosid-5'-monofosfátu používají buď organické syntézy, nebo syntézy enzymové. Přednosti enzymové syntézy pro přípravu radioaktivních nukleotidů byly diskutovány [Canellakis E. S., Gotesman M. E., Kammen H. O.: *Biochim. Biophys. Acta* **39**, 82. (1960); Michelson A. M.: *Biochim. Biophys. Acta* **91**, 1 (1964); Njedlý Z., Ekl J., Hybš K., Filip J.: *Radioisotopy* **10**, 1. 143 (1969)].

Rozšířeným enzymovým systémem používaným pro přípravu nukleosid-5'-monofosfátu je enzymový systém z *Escherichia Coli* B., který však vyžaduje vysoký stupeň purifikace. Této metody nelze použít pro syntézu thymidin-5'-monofosfátu, neboť enzymový preparát nemá thymidin-kinasovou aktivitu. Enzymová fosforylace 5'-nukleotidů katalyzovaná enzymem z buněk spermatosa je pro praktické použití málo vhodná, neboť enzymový preparát je extrémně nestálý [Tarr H. L. A., Roy J.: *Can. J. Biochem.* **44**, 197 (1966)].

Předmětný vynález je novým způsobem enzymové přípravy thymidin-5'-monofosfátů značených radioisotopem ³H, založené na enzymové fosforylaci thymidinu značeného tritiem s vysokou specifickou aktivitou. Jako

2

zdroje thymidin-kinasy se používá supernatantní frakce připravené z buněk Yoshidova ascitického karcinomu u krys. Abychom vyloučili možnost isotopové výměny tritia mezi substrátem a prostředím při enzymové reakci, studovali jsme reakční podmínky s použitím thymidinu značeného ¹⁴C a zjistili jsme časovou a koncentrační závislost tvorby thymidin-5'-monofosfátu. Zjištěných závislostí bylo použito pro stanovení reakčních podmínek vhodných pro preparativní syntézu thymidin-5'-monofosfátů značených tritiem s vysokou specifickou aktivitou.

15 Příklad 1

Příprava enzymu

Enzymový preparát obsahující vysokou aktivitu thymidin-kinázy je supernatantní frakce připravená z buněk Yoshidova ascitického karcinomu u krys. [Cytologicky ascites pozůstává z uniformní populace nádorových buněk bez příměsí mononukleárů a polynukleárů. Mitotický index byl 0,6 %.] Za 10 dní po inokulaci nádorových buněk krysám byl intraperitoneální punkcí odebrán ascites (15 ml) do heparinu a po odstředění (2 °C a 20 min., 5000 g) byl buněčný sediment promyt 0,01 M Triss-HCl pufr30em (pH 7,8) s 0,15 M KCl a suspendován ve

166342

stejném pufru. Suspenze buněk byla sonikována 10 vteřin (MSE desintegrátor) a sonikát odstředěn (Spinco ultracentrifuga, 2 °C, 50 min., 105 000 g). Supernatantu bylo použito jako zdroje enzymu.

Thymidin-6-³H (1 μMol; 20 mCi), adenosin-5'-trifosfát (50 μMolů), chlorid hořečnatý (20 μMolů) bylo rozpuštěno v 10 ml 0,05 M Tris-HCl pufru (pH 7,5). K roztoku byl přidán 1 ml enzymového preparátu. Reakční směs byla inkubována 45 minut při 37 °C. Po ukončení reakce byla reakční směs nanesena bez deproteinace na chromatografický papír Whatman 3 a chromatografováno za laboratorní teploty při sestupném uspořádání v soustavě kys. isomáselná — voda — hydroxid amonný (66 : 33 : 1,5). Polo-
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65
70
75
80
85
90
95
100
105
110
115
120
125
130
135
140
145
150
155
160
165
170
175
180
185
190
195
200
205
210
215
220
225
230
235
240
245
250
255
260
265
270
275
280
285
290
295
300
305
310
315
320
325
330
335
340
345
350
355
360
365
370
375
380
385
390
395
400
405
410
415
420
425
430
435
440
445
450
455
460
465
470
475
480
485
490
495
500
505
510
515
520
525
530
535
540
545
550
555
560
565
570
575
580
585
590
595
600
605
610
615
620
625
630
635
640
645
650
655
660
665
670
675
680
685
690
695
700
705
710
715
720
725
730
735
740
745
750
755
760
765
770
775
780
785
790
795
800
805
810
815
820
825
830
835
840
845
850
855
860
865
870
875
880
885
890
895
900
905
910
915
920
925
930
935
940
945
950
955
960
965
970
975
980
985
990
995

Příklad 2

Thymidin-(methyl-³H) (44 mCi, 4 μMoly), adenosin-5'-trifosfát (160 μMolů), chlorid hořečnatý (20 μMolů), bylo rozpuštěno v 0,05 M Tris-HCl pufru (pH 7,5); k roztoku byly přidány 2 ml enzymového preparátu. Reakční směs byla inkubována 30 minut při 37 °C a pak nanesena bez deproteinace na chromatografický papír Whatman 3. Chromatografií v sestupném uspořádání při laboratorní teplotě v soustavě kys. isomáselná — voda — amoniak (66 : 33 : 1,5) byl z reakční směsi izolován thymidin-5'-monofosfát-(methyl-³H). Pruhy odpovídající standardům byly odpovídající a eluovány vodou. Bylo získáno 24,4 mCi thymidin-5'-monofosfátu-(methyl-³H), (tj. 55 %), o specifické aktivitě 10,9 Ci/mMol a radiochemické čistotě lepší než 95 %.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob přípravy thymidin-5'-monofosfátů značených tritiem s vysokou specifickou aktivitou, prováděné in vitro enzymovou syntézou, vyznačený tím, že fosforylace se provede katalytickým účinkem enzymu obsaženého v supernatantní frakci připravené

z Yoshidova ascitického karcinomu u krys.
2. Způsob přípravy podle bodu 1 vyznačený tím, že průběh enzymové reakce se reguluje koncentrací jednotlivých složek reakční směsi.