(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 689 244**

(21) Número de solicitud: 201730659

(51) Int. Cl.:

C12Q 1/48 (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01)
C07H 19/06 (2006.01)
C07H 19/16 (2006.01)

(12) PATENTE DE INVENCIÓN CON EXAMEN B2

(22) Fecha de presentación:

05.05.2017

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

12.11.2018

Fecha de concesión:

02.04.2019

(45) Fecha de publicación de la concesión:

09.04.2019

(73) Titular/es:

UNIVERSIDAD EUROPEA DE MADRID, S.L.U. (100.0%)
C/ Tajo s/n
28670 Villaviciosa de Odón (Madrid) ES

(72) Inventor/es:

FERNANDEZ LUCAS, Jesús;
HORMIGO CISNERO, Daniel;
CLEMENTE SUAREZ, Vicente Javier;
DEL ARCO ARRIETA, Jon;
ÁLVAREZ SÁNCHEZ, Rodrigo;
MARTÍNEZ GONZÁLEZ, María;
GALINDO PEREZ, Javier y
ACOSTA BUENO, Javier

(74) Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel;

Observaciones:

La lista de secuencias está accesible al público en la página web de la OEPM para su descarga en formato electrónico.

(54) Título: **PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN DE NUCLEÓSIDOS EN UN SOLO PASO EN PRESENCIA DE UNA ENZIMA NUCLEÓSIDO 2´-DESOXIRRIBOSILTRANSFERASA TERMOESTABLE TIPO II PROCEDENTE DE CHROOCOCCIDIOPSIS THERMALIS PCC 7203 (CtNDT)**

(57) Resumen:

Procedimiento de obtención de nucleósidos en un solo paso en presencia de una enzima nucleósido 2'-desoxirribosiltransferasa (NDT) termoestable tipo II procedente de Chroococcidiopsis Thermalis PCC 7203 (CtNDT). La presente invención se refiere a un procedimiento enzimático de obtención de nucleósidos naturales y no naturales con actividad terapéutica mediante el uso de la CtNDT en una reacción de transglicosilación obteniéndose altos rendimientos.

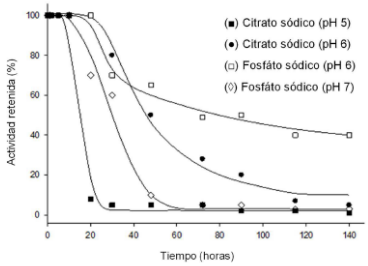


Fig. 3

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015.
Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

ES 2 689 244 B2

DESCRIPCIÓN

PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN DE NUCLEÓSIDOS EN UN SOLO PASO EN PRESENCIA DE UNA ENZIMA NUCLEÓSIDO 2´-DESOXIRRIBOSILTRANSFERASA TERMOESTABLE TIPO II PROCEDENTE DE *CHROOCOCCIDIOPSIS THERMALIS* PCC 7203 (*Ct*NDT)

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se encuadra dentro del campo de la biotecnología. Más concretamente, se refiere a la obtención de nucleósidos naturales y no naturales con actividad terapéutica mediante métodos biotecnológicos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Los ácidos nucleicos son moléculas de vital importancia para los seres vivos ya que están implicados en diferentes tipos de procesos bioquímicos, como almacenamiento y transferencia de información genética. Por ello, numerosos compuestos derivados de ácido nucleicos (NADs) han sido utilizados en diferentes áreas de investigación con diversos fines.

En este sentido diversos NADs son utilizados habitualmente en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer, enfermedades linfoproliferativas, infecciones virales (como hepatitis o VIH) y algunas enfermedades inflamatorias, como por ejemplo la enfermedad de Crohn, así como materiales de partida para la síntesis de oligonucleótidos antisentido.

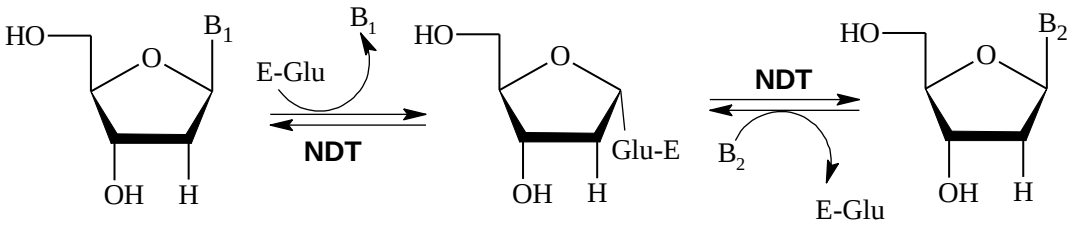
La síntesis de NADs se ha llevado a cabo tradicionalmente mediante métodos químicos que implican numerosos de pasos de protección-desprotección de grupos funcionales y conllevan la presencia de mezclas de esteroisómeros, dificultando el proceso de purificación de los productos y disminuyendo el rendimiento global de la reacción.

Además, el uso necesario de re-agentes y disolventes orgánicos contaminantes, hace que estos procesos sean poco sostenibles lo cual desde un punto de vista industrial dificulta el escalado de los mismos. Debido a ello, este tipo de compuestos presentan precios elevados, impidiendo su uso clínico en muchos casos y limitando su aplicación en industrias como la farmacéutica o la alimentaria. En las últimas décadas se ha convertido una práctica habitual en la industria la sustitución parcial o total de estos métodos químicos por métodos enzimáticos (Boryski J. Curr Org Chem 2008, 12:309-325; Fresco-Taboada A, de la Mata I, Arroyo M, Fernández-Lucas J. Appl Microbiol Biotechnol 2013, 97:3773–3785; Fernández-

Lucas, J. Appl Microbiol Biotechnol 2015, 99, 4615-4627; Rozzell, J. D. Bioorg Med Chem 1999, 7: 2253-2261).

La síntesis enzimática de NADs mediante células enteras o enzimas supone una interesante alternativa a los tradicionales métodos químicos que ofrece muchas ventajas, como la reacción en un solo recipiente (*one-pot*), bajo condiciones suaves de pH y temperatura, con una total estereo, regio y enantioselectividad y bajo unas condiciones respetuosas con el medio ambiente. Dichas reacciones se pueden llevar a cabo mediante una única enzima con el objetivo de llevar a cabo una reacción específica en un solo paso ("*one-pot, one step*"), o bien mediante dos o más enzimas que actúen secuencialmente o en paralelo ("*one-pot, x steps*") para conseguir los productos deseados.

Las nucleósido desoxirribosiltransferasas (NDTs) (EC 2.4.2.6) catalizan la reacción de transglicosilación entre bases púricas y/o pirimidínicas (Fresco-Taboada A, de la Mata I, Arroyo M, Fernández-Lucas J. *Appl Microbiol Biotechnol* 2013, 97:3773–3785) utilizando un 2'-desoxirribonucleósido que actúa como donador y una base nitrogenada como aceptor. La reacción transcurre a través de un intermedio covalente enzima-sustrato generado por el ataque nucleófilo de un residuo de ácido glutámico (Glu) catalítico sobre el carbono anomérico del 2′-desoxirribonucleósido. Posteriormente este complejo es atacado por una segunda base generando un 2′-desoxirribonucleósido de igual configuración a la inicial (anómero β). La reacción llevada a cabo es la siguiente:



donde B1 y B2 son purina o pirimidina.

En función de la especificidad en el reconocimiento de sustrato existen dos tipos de NDTs, las nucleósido 2′-desoxirribosiltransferasas tipo I (PDT), específicas para bases púricas, y las nucleósido 2′-desoxirribosiltransferasas tipo II (NDT), que catalizan la reacción de transglicosilación entre purinas y/o pirimidinas. Ambos tipos de NDTs, NDT y PDT, aceptan distintas bases naturales y no naturales, pero son altamente específicas sobre 2′-desoxirribosa. Teniendo en cuenta que las NDTs operan de manera regio (glicosilación a través del N1 de pirimidinas y N9 de purinas) y estereoselectivas (se forma únicamente el

anómero β) ofrecen un gran potencial como biocatalizador para la síntesis industrial de NADs.

A pesar de que este proceso de síntesis de nucleósidos sería en principio una alternativa eficiente a los tradicionales métodos de síntesis química, existe un problema a la hora de su implementación como biocatalizadores en procesos industriales, ya que no todos los tipos de bases púricas o pirimidínicas usadas como sustrato para generar los análogos de nucleósidos son solubles en medios acuosos.

Esto limita la concentración de sustrato con la que se puede trabajar y dificulta en muchos casos el escalado del proceso. Para solventar este tipo de problemas se utilizan diversos tipos de alternativas como por ejemplo la adicción de co-solventes orgánicos al medio de reacción, el aumento o disminución del pH de del medio o el aumento de factores como la temperatura o la presión. El problema de este tipo de estrategias es que no es fácil encontrar enzimas que sean estables bajo estas condiciones, por ello la búsqueda de enzimas procedentes de microorganismos que crezcan en condiciones extremas de pH, temperatura, salinidad o presión constituye es un área de interés.

Los organismos termófilos son un tipo de organismos cuyas temperaturas óptimas de crecimiento se encuentran por encima de 45 ºC. En su mayoría son microorganismos pertenecientes a los dominios Bacteria y Archaea, y, según su temperatura óptima de crecimiento, se pueden dividir en termófilos moderados (45-65 ºC), termófilos extremos (65-80ºC) e hipertermófilos (>80 ºC).

El empleo de enzimas provenientes de termófilos, termozimas, en biocatálisis resulta de especial interés ya que a su termorresistencia natural, que permite el trabajo a altas temperaturas, se asocian frecuentemente una serie de ventajas adicionales como, por ejemplo:

i) Reducción de la viscosidad del medio, aumento de la solubilidad y del coeficiente de difusión de sustratos y/o productos;

ii) Purificación eficiente de termozimas cuando se expresan en un sistema mesófilo como *E. coli* o *Saccharomyces cerevisiae* mediante técnicas de desnaturalización diferencial;

iii) Menor riesgo de contaminación del biorreactor por especies mesófilas ambientales por encima de los 60 ºC;

iv) Mayor resistencia del biocatalizador a agentes desnaturalizantes y solventes orgánicos;

v) Mayor rendimiento debido a que se minimizan los subproductos de reacción, lo que permite una recuperación del producto más fácil.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de nucleósidos que comprende una reacción enzimática de transglicosilación en un solo paso, entre un nucleósido donador y una base nitrogenada aceptora en presencia de una enzima nucleósido 2´-desoxirribosiltransferasa tipo II termoestable procedente de *Chroococcidiopsis thermalis* PCC 7203 (*Ct*NDT) caracterizada por la secuencia SEQ ID NO: 1.

Chroococcidiopsis thermalis PCC 7203 es una cepa de *C. thermalis*

La enzima nucleósido 2´-desoxirribosiltransferasa se puede obtener recombinante mediante la expresión del gen *ndt* de *Chroococcidiopsis thermalis* PCC 7203, caracterizado por la SEQ ID NO: 2, en una bacteria accesible como, por ejemplo, *Escherichia coli*. La enzima recombinante se puede obtener partiendo de secuencias cuya expresión da lugar a polipéptidos que conservan la actividad nucleósido 2´-desoxirribosiltransferasa.

Gracias al empleo de la *Ct*NDT en la reacción enzimática de transglicosilación en un solo paso se obtienen distintos nucleósidos naturales y no naturales y, dentro de estos últimos, arabinosil-nucleósidos como el arabinósido de adenina (ara-A), citosina (ara-C), hipoxantina (ara-H) y guanina (ara-G), 2′,3′-didesoxiribosil nucleósidos como la didanosina (ddIno), así como diferentes 2'-fluoro-2'- desoxiribonucleósidos como la 2 '-fluoro-2'-desoxiadenosina (2´F-dAdo) y el 2´-fluoro-2´-desoxiguanosine (2´F-dGuo). Estos nucleósidos naturales tienen interés terapéutico.

En otro aspecto de la invención, la reacción enzimática de transglicosilación en un solo paso se lleva a cabo en presencia de disolventes orgánicos en una concentración del 20 %-40 % en volumen. Se ha demostrado que tanto la actividad de la enzima como su estabilidad no se ven afectadas por la presencia de disolventes orgánicos en diferentes concentraciones comprendidas dentro del rango de 20 %-40 % en volumen.

Los disolventes orgánicos empleados para dicha reacción pueden ser polares apróticos, alcoholes y polioles. En una realización preferida el disolvente orgánico es acetona, acetato de etilo, acetonitrilo, cloroformo, dimetilformamida, dimetilsulfóxido, etanol, isopropanol, metanol, glicerol, etilenglicol o propilenglicol.

En otro aspecto de la invención, las reacciones de transglicosilación se realizan a distintas temperaturas (20-90 ºC) y diferentes valores de pH (3-11), preferentemente a una temperatura entre 40 ºC y 90 ºC y a un pH entre 3 y 7, ya que se observa un valor de actividad retenida superior al 70 %.

En otro aspecto de la invención, la base nitrogenada aceptora es adenina, guanina, hipoxantina o citosina.

En otro aspecto de la invención, el nucleósido donador es 2′,3′-didesoxiribosilnucleósido, 2′-fluoro-2′-desoxiribosilnucleósido, arabinosiladenina, arabinosilcitosina, arabinosilhipoxantina, 2’-desoxicitidina, 2’-desoxiuridina, 2’-desoxiadenosina, 2’-desoxiguanosina, 2’-desoxiinosina o 2’-desoxitimidina.

TEXTO LIBRE DEL LISTADO DE SECUENCIAS

A continuación, se aporta una traducción del texto libre en inglés que aparece en la lista de secuencias.

SEQ ID NO: 1. Proteína con actividad nucleósido 2´-desoxirribosiltransferasa tipo II de la cepa PCC 7203 de *Chroococcidiopsis thermalis.*

SEQ ID NO: 2. Gen con actividad nucleósido 2´-desoxirribosiltransferasa tipo II de la cepa PCC 7203 de *Chroococcidiopsis thermalis.*

SEQ ID NO: 3. Cebador Promotor T7

SEQ ID NO: 4. Cebador Terminador T7

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Efecto de la temperatura en la actividad de *Ct*NDT.

Figura 2. Efecto del pH en la actividad de *Ct*NDT.

Figura 3. Efecto de la temperatura en la estabilidad de *Ct*NDT mediante estudios de desnaturalización térmica de la enzima a diversos valores de pH en diversos tampones (Citrato sódico pH 5-6 y Fosfato potásico, 6-7) a 60 ºC.

Figura 4. Actividad de la *Ct*NDT en presencia de un 20 % de disolventes polares apróticos (acetona, acetato de etilo, acetonitrilo, cloroformo, dimetilformamida, dimetilsulfóxido), alcoholes (etanol, isopropanol, metanol) y polioles (glicerol, etilenglicol y propilenglicol)

DESCRIPCIÓN DE MODOS DE REALIZACIÓN

Habiendo descrito la presente invención, se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1. Construcción del microorganismo recombinante *E. coli Ct*NDT

Partiendo del genoma de la cianobacteria cocoide extremófila *Chroococcidiopsis thermalis* PCC 7203 alojada en la base de datos de secuencias genéticas del NIH (National Institutes of Health de Estados Unidos, GenBank), se ha llevado a cabo la búsqueda bioinformática en el mismo de secuencias de ADN que pudieran codificar posibles 2'-desoxirribosiltransferasas putativas empleando los algoritmos BlastN y BlastP respectivamente (Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. *J. Mol. Biol.* 1990, 215:403-410) a través del servidor del National Center for Biotechnology Information (NCBI; http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/).

Como resultado de ello, se encontró la secuencia génica con número de acceso GenBank: AFY86715.1, que se nombró como ndt_{Ct} (SEQ ID Nº2). Mediante el alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos correspondiente a la traducción de gen ndt_{Ct} , con secuencias de otras NDTs, se observó que dicho gen podía codificar una 2′-desoxiribosiltransferasa (*Ct*NDT). Para llevar a cabo dicho alineamiento se empleó el programa Clustal Ω (Goujon M, McWilliam H, Li W, Valentin F, Squizzato S, Paern J, Lopez R. *Nucleic acids research* 2010, 38 Suppl: W695-9) alojado en el servidor EMBL-EBI (https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/).

Una vez efectuado el análisis bioinformático del gen de interés, se encargó a la casa comercial GenScript (http://www.genscript.com/) la síntesis del mismo, así como su inclusión como fragmento *Nde*I-*Eco*RI dentro del vector de expresión pET28b(+) (Novagen) dando como resultado el plásmido recombinante pET28b*Ct*NDT. Dicho vector porta un marcador de resistencia a Kanamicina, un promotor de expresión *lac* inducible por IPTG para su selección en este género y una secuencia de ADN que codificaría para la presencia de 6 histidinas en el extremo N-terminal de la proteína, dando como resultado la proteína de fusión His-*Ct*NDT. A continuación, se llevó a cabo la transformación mediante choque

térmico de células competentes de *E. coli* BL21(D3) obtenidas previamente según el procedimiento del RbCl (Sambrook *et al.* (1989) Molecular Cloning: A laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York, USA) y se obtuvieron clones recombinantes que expresaban de forma constitutiva el gen ndt_{Ct} (nombrados *E. coli Ct*NDT). Los transformantes se seleccionaron en medio Luria-Bertani sólido al que se le había adicionado kanamicina (50 μg/ml). Mediante este procedimiento se obtuvieron varios clones que se analizaron mediante electroforesis de los plásmidos purificados, mediante el procedimiento High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche), en geles de agarosa al 1 % y posterior secuenciación utilizando los oligonucleótidos T7 promotor (SEQ IDNO: 3) y T7 reverse 5'- (SEQ ID NO: 4).

Ejemplo 2. Producción y purificación de la *Ct*NDT

Para la producción de la *Ct*NDT utilizando el clon recombinante conseguido previamente, se cultivó una colonia aislada del organismo recombinante en medio Luria-Bertani, LB (Sambrook *et al.* (1989) Molecular Cloning: A laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York, USA)), a 37 ºC y 250 rpm, en presencia de una concentración de kanamicina de 50 μg/ml hasta obtener una densidad óptica de 0,6-0,8. En ese momento se adicionó IPTG hasta una concentración final 0,5 mM dejando el cultivo creciendo durante 3 horas en las condiciones anteriormente descritas. Transcurrido este tiempo, se centrifugó a 3500 x *g* durante 30 minutos a 4 ºC, y se procedió a la disrupción celular del sedimento obtenido, mediante sonicación en tampón fosfato sódico 10 mM pH=7. Una vez finalizado el proceso, las células lisadas se centrifugaron a 9500 x *g* 30 min a 4 ºC y se separó el sobrenadante de los desechos celulares. Dicho sobrenadante contiene la proteína de fusión His-*Ct*NDT, lo que permitió una sencilla purificación mediante cromatografía de afinidad. Para ello se procedió a aplicar el sobrenadante previamente obtenido en una columna Ni-NTA de 5-ml HisTrap FF (GE Healthcare) previamente equilibrada en el tampón 1 (20 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0, 100 mM NaCl y 10 mM imidazol), y posteriormente se eluyó en el tampón 2 (20 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0, 100 mM NaCl y 500 mM imidazol).

Posteriormente con las fracciones más puras se llevó a cabo una cromatografía de exclusión molecular mediante la aplicación de la muestra en una columna Hi-Load 16/60 Superdex 200 prep grade column (GE Healthcare) previamente equilibrada con el tampón 3 (20 mM Tris-HCl, pH 8.0). Para los procesos de purificación se utilizó un FPLC modelo Akta Prime (GE Healthcare). Las fracciones se analizaron mediante electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes en geles de poliacrilamida en presencia de SDS al 0,1 % (SDS-PAGE).

Ejemplo 3. Efecto del pH, temperatura y disolventes sobre la actividad y estabilidad de la *Ct*NDT.

Para ello se procedió a determinar la actividad de la enzima a diferentes valores de pH (4,5-11) y temperatura (20-90 ºC), observándose que la enzima mostró valores de actividad retenida superiores al 70 % en un amplio intervalo de temperatura (40-90 ºC) (Figura 1) y de pH (4-7) (Figura 2). Particularmente interesante, es el hecho de que la enzima presente valores de actividad mayor del 95 % en el intervalo 60-90 ºC, lo cual permitiría llevar a cabo los procesos a altas temperaturas, con las consiguientes ventajas que ello supondría. Ateniéndonos a los resultados, las condiciones óptimas de uso del biocatalizador serían en el intervalo de temperatura (60-90 ºC) y pH (4-6). Cómo condiciones estándar para la cuantificación de la actividad enzimática se eligieron pH 6 y 60 ºC. En esas condiciones el biocatalizador mostró una actividad de 37 unidad internacional de actividad (UI). Además, se ha evaluado el efecto de la temperatura en la estabilidad de la enzima mediante estudios de desnaturalización térmica de la enzima a diversos valores de pH en diversos tampones (Citrato sódico pH 5-6 y Fosfato potásico, 6-7) a 60 ºC (Figura 3).

Adicionalmente se ha evaluado el efecto de la adición de disolventes orgánicos en la actividad de la enzima (Figura 4). En este sentido se ha evaluado la actividad de la enzima en presencia de un 20 % de disolventes orgánicos, como por ejemplo disolventes polares apróticos (acetona, acetato de etilo, acetonitrilo, cloroformo, dimetilformamida, dimetilsulfóxido), alcoholes (etanol, isopropanol, metanol) y polioles (glicerol, etilenglicol y propilenglicol). Como se puede observar en la Figura 4 se obtuvieron valores de actividad retenida superiores al 60 % por ciento en todos los casos. Esta tolerancia de la enzima a la utilización de disolventes orgánicos, unida a la gran termoestabilidad mostrada por la misma permite ser optimistas de cara a la posible implementación de proceso a nivel industrial.

Ejemplo 4. Determinación y caracterización de la actividad desoxiribosiltransferasa en *Ct*NDT

Para la determinación de actividad de la proteína, se llevó a cabo el ensayo de actividad estándar que consistió en la síntesis de 2'-desoxiadenosina a partir de 2'-desoxiinosina y adenina. Para ello diversas concentraciones de enzima se añadieron a una solución de 2'-desoxiinosina (dIno) 10 mM y Adenina (Ade) 10 mM tampón fosfato 50 mM, pH=6,0. La reacción se mantuvo en agitación a 60 ºC y 350 r.p.m. en un intervalo comprendido entre 0 y 30 minutos horas, con el objetivo de determinar el intervalo de tiempo en el que la enzima

muestra una respuesta lineal. La reacción se detuvo añadiendo un volumen de metanol previamente enfriado a 4ºC, y posteriormente se calentó a 95 ºC con el objetivo de desnaturalizar la enzima. Posteriormente tras la centrifugación, los productos obtenidos fueron determinados determinan mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) según la metodología descrita (Fernández-Lucas J. *et al*. (2007) *Enzyme Microb. Technol*. 40, 1147-1155). En estas condiciones de reacción, una unidad internacional de actividad (UI) se define como la cantidad de biocatalizador que produce 1 µmol de 2′-desoxiadenosina por minuto.

Ejemplo 5. Síntesis de diferentes nucleósidos mediante el empleo de *Ct*NDT

A continuación, se explica el procedimiento para la síntesis de diferentes nucleósidos mediante el empleo como biocatalizador de la *Ct*NDT En los diferentes ejemplos que se presentan, los productos de reacción se pueden cuantificar mediante HPLC utilizando las siguientes condiciones: columna ACE 5 C18-PFP (250 x 4,6 mm); fase móvil: (1) gradiente lineal durante 10 minutos de acetato de trimetilamonio 0.1 M hasta alcanzar 90/10 (v/v) acetato de trimetilamonio 0,1 M /acetonitrilo, (2) 10 minutos con 90/10 (v/v) acetato de trimetilamonio 0,1 M /acetonitrilo. El flujo se fija a 1 ml/min (180 bares de presión) y el detector UV se ajusta a 260 nm. En estas condiciones, los tiempos de retención de las bases y nucleósidos detectados se presentan en la Tabla I.

Tras determinar las condiciones óptimas de actividad de *Ct*NDT, se procedió a realizar estudios de especificidad de sustrato, utilizando diferentes 2′-desoxinucleósidos y bases, con el fin de determinar cuáles son los sustratos que mejor reconoce la enzima. Para ello la enzima se incubó en condiciones óptimas de actividad y estabilidad descritas en el apartado anterior utilizando diferentes 2’-desoxinucleósidos (dAdo, dCyd, dGuo, dIno, dThd y dUrd) 10 mM y bases (Ade, Cyt, Hyp, Gua, Ura y Thy), Las condiciones de reacción fueron:

- 36 unidades de enzima en 40 µl a 60 ºC, 5-10 min, 300 rpm. [Sustratos] = 1 mM, tampón MES 50 mM, pH 6.5, para Ade, Cyt, Hyp, Ura y Thy, y
- 0,6 µg de enzima en 40 µl a 60 ºC, 5-10 min, 300 rpm. [Sustratos] = 1 mM, tampón borato sódico 50 mM, pH 8.5, para Gua.

Como se puede observar en la Tabla II, *Ct*NDT reconoce de manera similar como donador 2’-desoxiadenosina (dAdo), 2′-desoxiinosina (dIno) y 2′-desoxiguanosina (dGuo), no sucediendo lo mismo con los nucleósidos pirimidínicos, a excepción de 2′-desoxicitidina. Esto concuerda con los resultados que se obtienen al utilizar diversas bases como aceptor,

ya que como se puede observar la enzima reconoce como mejores sustratos Adenina (Ade) e Hipoxantina (Hyp), mostrando una actividad menor sobre Citosina (Cit) y nula sobre Uracilo (Ura) y Timina (Thy).

Tabla I. Tiempos de retención de bases, 2'-desoxinucleosidos y nucleósidos obtenidos.

Bases	Tiempo de retención (min)
Adenina (Ade)	10,14
Citosina (Cyt)	4,14
Guanina (Gua)	8,60
Hipoxantina (Hyp)	8,40
Timina (Thy)	9,50
Uracilo (Ura)	5,41
2'-desoxinucleósidos	
2'-desoxiadenosina (dAdo)	15,50
2'-desoxiguanosina (dGuo)	12,50
2'-desoxiinosina (dIno)	12,20
2'-desoxicitidina (dCyd)	8,22
2'-desoxitimidina (dThd)	13,57
2'-desoxiuridina (dUrd)	9,40
Nucleósidos obtenidos	
2'-fluoro-2'-desoxiadenosina (2'-FdAde)	17,50
2'-fluoro-2'-desoxiguanosina (2'-FdGuo)	14,00
2'-fluoro-2'-desoxiinosina (2'-FdIno)	13,70
ara-Adenina (ara-A)	13,90
ara-Citosina (ara-C)	7,78
ara-Guanina (ara-G)	12,10
ara-Hipoxantina (ara-H)	11,80
ara-Uracilo (ara U)	8,68
2',3'-didesoxiadenosina (ddAdo)	18,85
2',3'-didesoxicitidina (ddCyd)	10,20
2',3'-didesoxiguanosina (ddGuo)	16,20
2',3'-didesoxiinosina (ddIno)	16,00

	Actividad *Ct*NDT (Unidades/mg de proteína)					
Aceptor / Donador	**Ade**	**Gua**	**Hyp**	**Cyt**	**Thy**	**Ura**
dAdo	-	nd	27	7,7	nd	nd
dGuo	30	-	25	8	nd	nd
dIno	37	0,04	-	8,8	nd	nd
dCyd	12	nd	9,3	-	nd	nd
dThd	1,8	nd	0,7	nd	-	nd
dUrd	2,5	0,01	6	0,33	nd	-

Tabla II. Actividad de la CtNDT

nd= no determinado

5.1. Síntesis de arabinosil nucleósidos mediante el uso de la *Ct*NDT.

Para la síntesis de arabinosil nucleósidos se procedió de la siguiente manera:

- 225 unidades de enzima en 30 μL de una solución que contenía arabinosil nucleósido (ara-A, ara-C, ara-H o ara-G) 1 mM, [Base] = 1 mM, en tampón MES 50 mM a pH 6.5, para Ade, Hyp y Cyt.
- 225 unidades de enzima en 30 μL de una solución que contenía arabinosil nucleósido (ara-A, ara-C, ara-H o ara-G), [Base] = 1 mM, en tampón borato sódico 50 mM a pH 8,5, para Gua.

La reacción se mantiene en agitación a 60 ºC y 300 r.p.m. durante un periodo de 24 horas. Los rendimientos de las correspondientes se muestran en la tabla III. Particularmente interesante es la obtención de ara-A (Vidarabina), usado para el tratamiento del virus herpes y varicela-zoster viruses, además de ser un potencial precursor de drogas antitumorales como la fludarabina o la clofarabina. Por otro lado el ara-G, usado para tratar la leucemia linfoblástica aguda de células T (LAA-T) y el linfoma linfoblástico de células T (LLB-T).

Tabla III. Rendimientos de la producción de arabinosil nucleósidos

Rendimiento (%)								
Aceptor / Donador	Ade		Gua		Hyp		Cyt	
	4 h	24 h	4 h	24 h	4 h	24 h	4 h	24 h
ara A	-	-	7	15	1	4,1	3	1
ara G	7	14	-	-	n.d.	4	n.d.	n.d
ara H	2	9	2	11	-	-	n.d.	n.d.

nd= no determinado

5.2. Síntesis de 2′-fluoro-2′-desoxiribosilnucleósidos mediante el uso de la CtNDT.

Para la síntesis de 2′-fluoro-2′-desoxiribosilnucleósidos se procedió de la siguiente manera:

- 225 unidades de enzima en 30 μL de una solución que contenía 2′-fluoro-2′-desoxiribosilnucleósido (2′F-dIno) 1 mM, [Base] = 1 mM, en tampón MES 50 mM a pH 6.5, para Ade, Hyp y Cyt.
- 225 unidades de enzima en 30 μL de una solución que contenía 2′-fluoro-2′-desoxiribosilnucleósido (2′F-dIno) 1 mM, [Base] = 1 mM, en tampón borato sódico 50 mM a pH 8,5, para Gua.

La reacción se mantiene en agitación a 60ºC y 300 r.p.m. durante un periodo de 24 horas. Los rendimientos de las correspondientes se muestran en la tabla IV. En este caso destacamos la obtención de 2´-fluoro-2´-desoxiguanosina (2´F-dGuo), usado como antiviral para el tratamiento de virus influenza.

Tabla IV. Rendimientos de la producción de 2′-fluoro-2′-desoxiribosilnucleósidos

Rendimiento (%)								
Aceptor / Donador	Ade		Gua		Hyp		Cyt	
	4 h	24 h	4 h	24 h	4 h	24 h	4 h	24 h
2′F-dIno	4	11	3	11	-	-	n.d.	n.d.

nd= no determinado

5.3. Síntesis de 2′,3′-didesoxiribosil nucleósidos mediante el uso de la CtNDT.

Para la síntesis de 2′,3′-didesoxiribosil nucleósidos (Figura 3) se procedió de la siguiente manera:

- 225 unidades de enzima en 30 μL de una solución que contenía 2′,3′-didesoxiribosil nucleósido (ddAdo, ddIno), [Base] = 1 mM en tampón MES 50 mM a pH 6.5, para Ade, Hyp y Cyt.
- 225 unidades de enzima en 30 μL de una solución que contenía 2′,3′-didesoxiribosil nucleósido (ddAdo, ddIno), [Base] = 1 mM en tampón borato sódico 50 mM a pH 8,5, para Gua.

La reacción se mantiene en agitación a 60 ºC y 300 r.p.m. durante un periodo de 24 horas. Los rendimientos de las correspondientes se muestran en la tabla V. En este caso destacamos la obtención de la didanosina (ddIno) un conocido antiviral para el tratamiento de la infección por VIH-1.

Tabla V. Rendimientos de la producción de 2′,3′-didesoxiribosil nucleósidos

	Rendimiento (%)							
Aceptor / Donador	**Ade**		**Gua**		**Hyp**		**Cyt**	
	4 h	**24 h**	**4 h**	**24 h**	**4 h**	**24 h**	**4 h**	**24 h**
ddAdo	-	-	6	n.d.	n.d.	1	n.d.	5
ddIno	12	1	3	n.d.	-	-	n.d.	n.d.

nd= no determinado

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de obtención de nucleósidos que comprende una reacción enzimática de transglicosilación en un solo paso, entre un nucleósido donador y una base nitrogenada aceptora en presencia de la enzima nucleósido 2´-desoxirribosiltransferasa tipo II procedente de *Chroococcidiopsis thermalis* PCC 7203 que comprende la secuencia SEQ ID NO: 1.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que se lleva a cabo en presencia de disolventes orgánicos en una concentración del 20 % - 40 % en volumen.

3. Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado por que el disolvente orgánico se encuentra seleccionado entre acetona, acetato de etilo, acetonitrilo, cloroformo, dimetilformamida, dimetilsulfóxido, etanol, isopropanol, metanol, glicerol, etilenglicol o propilenglicol.

4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, caracterizado por que la base nitrogenada aceptora se encuentra seleccionada entre adenina, guanina, hipoxantina o citosina.

5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, caracterizado por que el nucleósido donador se encuentra seleccionado entre 2′,3′-didesoxiribosilnucleósido, 2′-fluoro-2′-desoxiribosilnucleósido, arabinosiladenina, arabinosilcitosina, arabinosilhipoxantina, 2’-desoxicitidina, 2’-desoxiuridina, 2’-desoxiadenosina, 2’-desoxiguanosina, 2’-desoxiinosina o 2’-desoxitimidina.

6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, caracterizado por que se lleva a cabo a una temperatura entre 40 ºC y 90 ºC y a un pH entre 3 y 7.

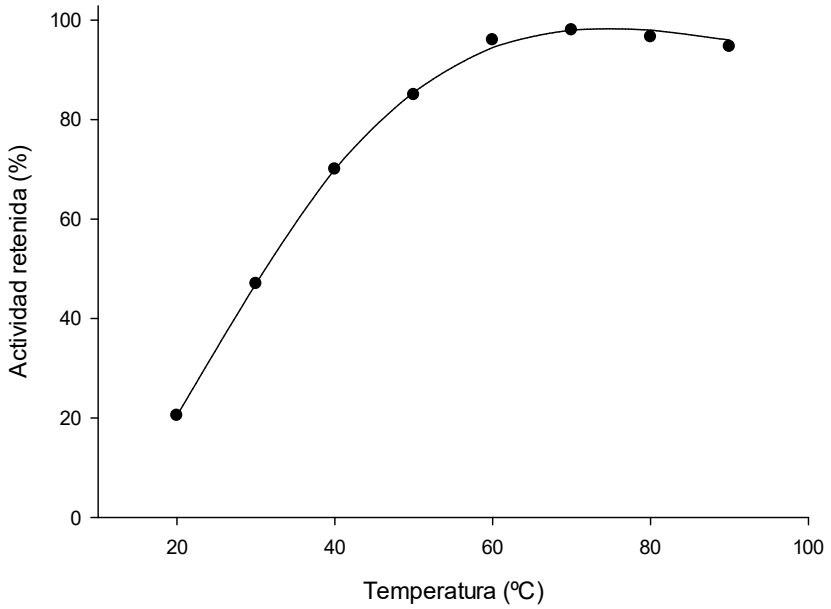

Actividad retenida (%)
Temperatura (ºC)
0
20
40
60
80
100
20
40
60
80
100

Fig. 1

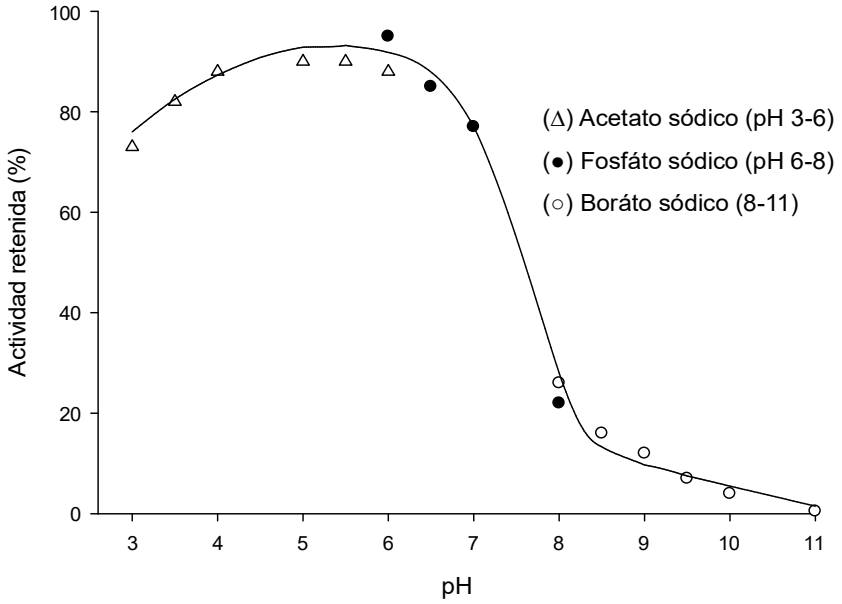

Actividad retenida (%)
pH
(Δ) Acetato sódico (pH 3-6)
(●) Fosfáto sódico (pH 6-8)
(○) Boráto sódico (8-11)
0
20
40
60
80
100
3
4
5
6
7
8
9
10
11

Fig. 2

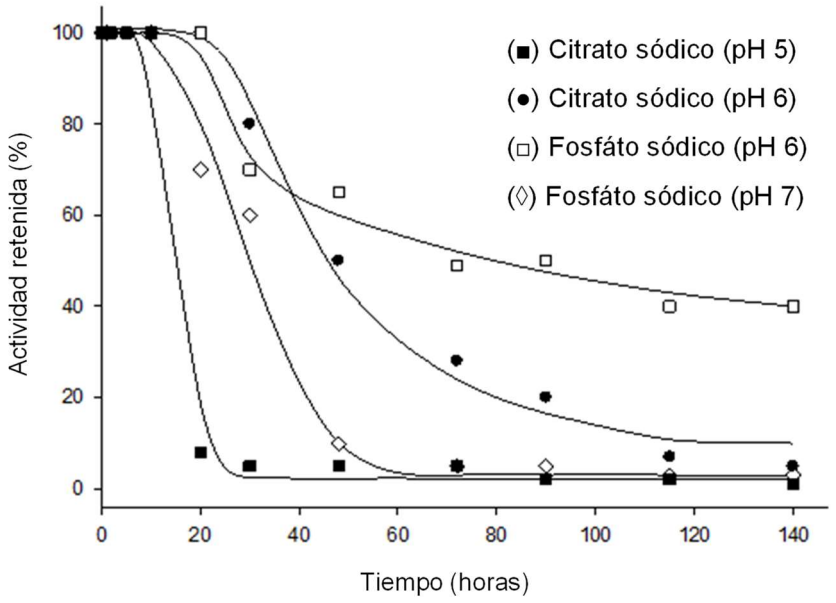

(■) Citrato sódico (pH 5)
(●) Citrato sódico (pH 6)
(□) Fosfáto sódico (pH 6)
(◊) Fosfáto sódico (pH 7)
Actividad retenida (%)
Tiempo (horas)
0
20
40
60
80
100
120
140

Fig. 3

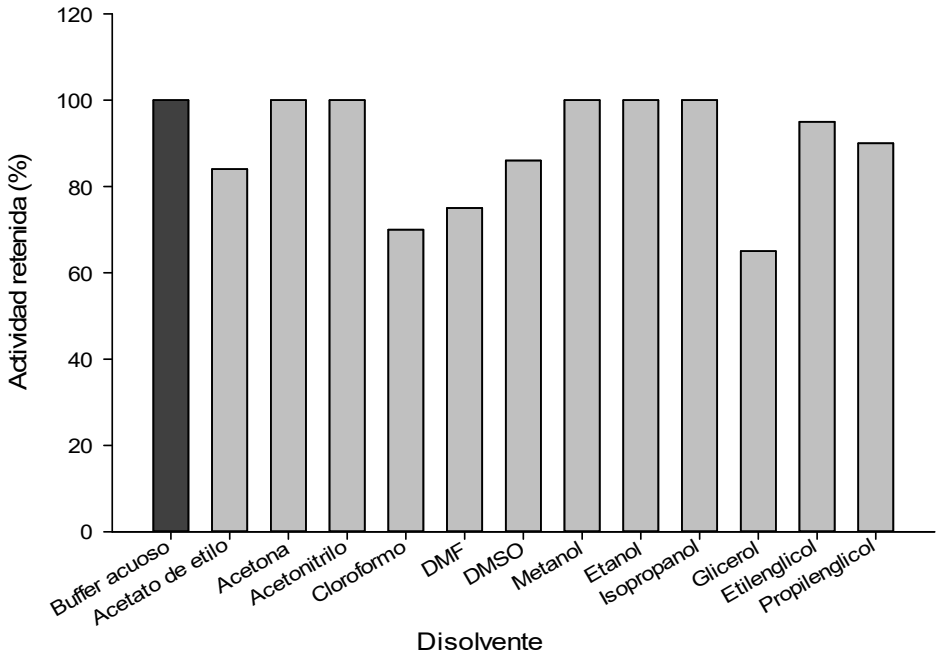

Actividad retenida (%)
Disolvente
Buffer acuoso
Acetato de etilo
Acetona
Acetonitrilo
Cloroformo
DMF
DMSO
Metanol
Etanol
Isopropanol
Glicerol
Etilenglicol
Propilenglicol
0
20
40
60
80
100
120

Fig. 4